

НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ NTN1 И UNC5B, НО ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА CCL19 В THP-1

NETRIN-1 UPREGULATES NTN1 AND UNC5B GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES CCL19 GENE EXPRESSION IN THP-1
10.15789/1563-0625-NUT-3151

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ: НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ СОБСТВЕННОГО ГЕНА И ГЕНА СВОЕГО РЕЦЕПТОРА UNC5B, НО ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА CCL-19 В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ THP-1

Некрасова Е. В. ¹,

Орлов С. В. ^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург.

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет”, Санкт-Петербург.

НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ NTN1 И UNC5B, НО ПОДАВЛЯЕТ
ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА CCL19 В THP-1

NETRIN-1 UPREGULATES NTN1 AND UNC5B GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES CCL19
GENE EXPRESSION IN THP-1

10.15789/1563-0625-NUT-3151

**NETRIN-1 UPREGULATES THE ITS OWN GENE EXPRESSION AND
UNC5B GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES CCL-19 GENE
EXPRESSION IN HUMAN MACROPHAGES THP-1 CELL LINE**

Nekrasova E.V. ^a,

Orlov S. V. ^{a, b}

^a Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia.

^b Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia.

Резюме

Актуальность исследования: По данным Всемирной организации здравоохранения за 2021 год основной причиной инвалидности и смертности людей во всем мире была ишемическая болезнь сердца, на третьем месте по числу смертей – инсульт. Данные сердечно-сосудистые заболевания, в том числе инфаркт миокарда и аневризмы стенки аорты, обусловлены системным хроническим воспалительным процессом под названием атеросклероз. Это заболевание развивается на протяжении десятилетий и характеризуется нарушением целостности эндотелиального слоя сосудов, избыточным накоплением липидов в стенках сосудов, дисфункцией макрофагов и гладкомышечных клеток и развитием воспаления артериальных стенок. Одним из путей регрессии атеросклероза может служить эмиграция макрофагов, нагруженных эфирами холестерина, из атеросклеротической бляшки по лимфатическим сосудам в региональные лимфоузлы и в дальнейшем в печень для последующего метаболизма холестерина. Белок нетрин-1 является ингибитором миграции иммунных клеток. Представляет интерес изучение аутокринной/паракринной регуляции экспрессии гена нетрина-1 в макрофагах человека. Понимание этого процесса может являться основой для поиска новых подходов в терапии атеросклероза.

Цель исследования: изучить влияние белка нетрина-1 на уровень экспрессии генов *ntn1*, его рецептора *unc5b* и хемокина *ccl19*.

Материалы и методы. Работа выполнена на макрофагах, дифференцированных из линии острой моноцитарной лейкемии человека THP-1. Анализ экспрессии генов *ntn1*, *unc5b*, *ccl19* на уровне матричной РНК проведен методами обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а на уровне белка анализ сделан методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты работы. Нетрин-1 в концентрации 50 нг/мл индуцировал экспрессию генов *ntn1* и *unc5b*, но подавлял экспрессию гена *ccl19* в макрофагах человека. Однако в концентрации 250 нг/мл нетрин-1 приводил к значительному снижению экспрессии собственного гена *ntn1*.

Заключение. Нетрин-1 оказывает ауторегулирующее влияние на экспрессию своего гена и гена своего рецептора *unc5b* в макрофагах человека. Подавление нетрином-1 экспрессии хемокина *ccl19* в макрофагах может являться одним из путей ингибирования эмиграции макрофагов данным эффектором. Полученные результаты расширяют представление о регуляции экспрессии белков, ответственных за миграцию макрофагов, и в перспективе могут быть использованы для поиска новых мишеней в терапии атеросклероза.

Ключевые слова: нетрин-1; NTN1; UNC5B; CCL19; макрофаги человека.

Abstract

The relevance of the theme: According to the World Health Organization data on 2021 the leading cause of human disability and mortality was ischemic heart disease at a global level, stroke was the third leading cause of death. These cardiovascular diseases, including myocardial infarction and aortic aneurysms, are caused by a systemic chronic inflammatory process called atherosclerosis. This disease develops over decades and is characterized by the disruption of the vascular endothelial layer integrity, the excessive lipid accumulation in the arterial walls, macrophage and smooth muscle cells dysfunction and the inflammation of the arterial walls development. One of the ways for atherosclerosis regression may be cholesterol ester-laden macrophage emigration from atherosclerotic plaque through the lymphatic vessels to the regional lymph nodes and then to the liver for the subsequent cholesterol metabolism. The protein netrin-1 is the inhibitor of immune cells migration. Particular interest is the study of the autocrine/paracrine regulation of netrin-1 gene expression in human macrophages. The understanding of this process may be basis for a discovery of the new approaches in atherosclerosis therapy.

The aim of the article: to study the influence of netrin-1 protein on the expression level NTN1 gene, its receptor UNC5B gene and CCL19 gene.

Materials and methods: The experiments were carried out on the macrophages differentiated from acute monocytic leukemia cell line THP-1. The analysis of NTN1, UNC5B, CCL19 genes expression was performed by methods the reverse transcription and real time quantitative polymerase chain reaction (on the messenger RNA level) and by flow cytometry (on the protein level).

Results: Netrin-1 in the concentration of 50 ng/ml induced NTN1 and UNC5B genes expression, but suppressed CCL19 gene expression in human macrophages. However, netrin-1 in the concentration of 250 ng/ml significant downregulated of its own NTN1 gene expression

Conclusions: Netrin-1 has autoregulatory effect on the expression of its own gene and the gene of its receptor UNC5B in human macrophages. Netrin-1 mediated downregulation of chemokine CCL19 expression in macrophages may be one of the ways which this effector inhibits macrophage emigration. The obtained results expand the insight of the regulation of the expression of proteins responsible for macrophage migration, which in the future will allow performing these data to research new targets in atherosclerosis therapy.

Keywords: netrin-1; NTN1; UNC5B; CCL19; human macrophages.

1 Введение

Атеросклероз – это хроническое системное заболевание, имеющее патолофизиологические последствия, такие как инсульт и инфаркт миокарда. Оно характеризуется аккумуляцией богатых холестерином липопротеинов низкой плотности (LDL) в стенках артерий в местах, где целостность эндотелия может быть повреждена: ветвления, изгибы сосудов и другое. После проникновения LDL в субэндотелиальное пространство они подвергаются химическим и энзиматическим модификациям, превращаясь в окисленные (oxLDL) и другие формы модифицированных LDL [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. OxLDL распознаются макрофагами как патогены и захватываются скавенджер рецепторами. Макрофаги приобретают провоспалительный фенотип, активно секретируют провоспалительные цитокины, трансформируются в пенистые клетки и теряют способность к эмиграции в периферические лимфоузлы и в дальнейшем в печень. Эти клетки формируют некротическое ядро бляшки, что является спутником развития атеросклероза [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

В недавних исследованиях был определен ряд факторов, подавляющих эмиграцию макрофагов из атеросклеротической бляшки: накопление холестерина в макрофагах, гипоксия, высокое артериальное давление, повышенная экспрессия в клетках ингибиторов миграции – нетрина-1 и семафорина 3А [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Нетрин-1 – это ламининоподобный белок, регулирующий хемотаксис клеток. На N-конце белка располагаются 2 домена: домен IV и домен V, которые связываются с рецепторами DCC (супрессор колоректального рака), неогенином и рецепторами семейства UNC5 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. В зависимости от того, с каким рецептором связывается нетрин-1, наблюдаются различные биологические эффекты. К примеру, связывание белка с рецептором DCC приводит к хемоаттракции, а связывание с семейством рецепторов UNC5 – к хеморепульсии [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. С-конец этого белка богат основными аминокислотами, которые выступают сайтами связывания мембранных гликолипидов и протеогликанов, тем самым обеспечивая взаимодействие белка с компонентами клеточной поверхности и внеклеточным матриксом [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

У человека ген нетрина-1 *ntn1* локализуется на 17 хромосоме и кодирует белок, состоящий из 604 аминокислотных остатков [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Высокий транскрипционный уровень нетрина-1 наблюдается в сердце, головном мозге, почках и легких, при этом низкий уровень – в печени, тонком кишечнике и селезенке [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Функции нетрина-1 в организме человека обширные: он оказывает влияние на ангиогенез, морфогенез, ингибирует апоптоз, ввиду чего относится к онкогенам [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Нетрин-1

контролирует эпителиально-мезенхимальный переход, ключевой процесс органогенеза легких [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Кроме того, показано, что нетрин-1 участвует в морфогенезе поджелудочной железы и remodelировании разных типов тканей в экспериментах *in vivo* [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Эти данные указывают на то, что нетрин-1 и его рецепторы играют важную роль в морфогенезе множества тканей.

Данные о влиянии нетрина-1 на иммунную систему противоречивы. В зависимости от модели исследования и типа клеток, продуцирующих нетрин-1, этот белок оказывает провоспалительное либо противовоспалительное действие. Так, при развитии острого воспаления легких, почек и при перитоните нетрин-1 является противовоспалительной молекулой. Однако в костной ткани и адипоцитах нетрин-1 выступает как провоспалительный агент. Он способен активировать остеокласты, что приводит к остеолизу, т.е. разрушению кости. При секреции нетрина-1 жировыми клетками развивается хроническое воспаление, инсулинорезистентность и подавление миграции близлежащих макрофагов [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

В условиях развития атеросклероза нетрин-1, связываясь с рецептором UNC5B, подавляет миграцию моноцитов и макрофагов [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. На гладкомышечных клетках имеется другой рецептор к нетрину-1 – неогенин. Через этот рецептор нетрин-1, наоборот, вызывает хемоаттракцию. Гладкомышечные клетки начинают активно мигрировать и образуют фиброзную капсулу вокруг бляшки [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Эндотелиальные клетки в нормальных физиологических условиях секретируют нетрин-1 в кровяное русло в высоких дозах. В крови нетрин-1 связывается с рецептором UNC5B на поверхности моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и препятствует адгезии этих клеток к слою эндотелия [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Помимо этого, нетрин-1 подавляет экспрессию адгезионных молекул в эндотелиоцитах. При прогрессировании атеросклеротического поражения сосудов количество секретируемого нетрина-1 эндотелием снижается, но возрастает количество адгезионных молекул на эндотелиальных клетках, таких как VCAM-1, ICAM-1, Е-селектин, что усиливает диапедез (процесс выхода форменных элементов крови через стенку сосуда в ткани) [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

В макрофагах нетрин-1 ингибирует миграцию, вызванную рядом хемокинов: CCL19, CCL21, CCL2 и анафилатоксином C5a через связывание со своим рецептором UNC5B [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]. За эмиграцию нагруженных липидами макрофагов за пределы бляшки отвечают хемокины CCL19 и CCL21 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Исследован механизм подавления хемотаксиса в макрофагах: нетрин-1 ингибирует миграцию посредством угнетения активности малой ГТФазы Rac1 и подавления фосфорилирования киназы фокальной адгезии FAK. Эти сигнальные молекулы ответственны за

реорганизацию актинового цитоскелета и поляризацию клеток [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Влияние макрофагального нетрина-1 на атерогенез было продемонстрировано в экспериментах по делеции нетрина-1 в макрофагах мышей с гиперхолестеринемией (линия мышей, нокаутных по гену рецептора LDL): отсутствие нетрина-1 приводило к эмиграции нагруженных эфирами холестерина макрофагов в лимфатическую систему и регрессии атеросклероза [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. В других экспериментах было показано, что при высокой продукции нетрина-1 макрофаги поляризуются в направлении M2 (противовоспалительный статус), начинают продуцировать IL-4, IL-13 и перестают продуцировать IL-6 и циклооксигеназу-2 (COX-2) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Нетрин-1 активирует транскрипционные факторы PPARs (рецепторы активаторов пролиферации пероксисом), участвующие в противовоспалительном сигналинге. Это приводит к репрессии активации фактора транскрипции NF-κB, подавлению синтеза тромбксана A2 и простагландина E2 в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. С одной стороны, поляризация клеток в направлении альтернативно активируемых макрофагов (M2) снижает локальное воспаление, с другой стороны, макрофаги M2 теряют способность к миграции, вызванной хемокинами CCL19 и CCL21, в отличие от M1 (провоспалительных) макрофагов. Дело в том, что на мембране макрофагов M1 выставлен рецептор, ответственный за хемотаксис, CCR7, в то время как в макрофагах M2 рецептор CCR7 уходит с поверхности цитоплазматической мембраны в мембраны эндоплазматического ретикулума и перестает быть функциональным [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Таким образом, имеющиеся данные в литературе показывают, что иммуномодулирующий эффект нетрина-1 зависит от того, в каких клетках продуцируется нетрин-1, и от соответствующего микроокружения.

Есть клинические данные, свидетельствующие о том, что концентрация нетрина-1 в плазме крови понижена у пациентов с субклиническим атеросклерозом по сравнению со здоровыми пациентами. Имеется обратная корреляция концентрации нетрина-1 в плазме крови с объемом атеросклеротических бляшек [Ошибка! Источник ссылки не найден.], а также с гликемией и высоким индексом массы тела, которые являются сердечно-сосудистыми факторами риска [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. При этом внутриклеточный уровень нетрина-1 в макрофагах повышен у пациентов со стабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Приведенный анализ показывает, что роль нетрина-1 в атерогенезе до сих пор обсуждается. Мало известно об аутокринной и паракринной регуляции нетрина-1 в макрофагах, о регуляции его рецептора UNC5B. В

настоящей работе нами впервые представлены данные о влиянии нетрина-1 на экспрессию генов *ntn1*, *unc5b*, *ccl19* в макрофагах человека.

2 Материалы и методы

Рекомбинантный человеческий нетрин-1 был приобретен у R&D Systems, США (6419-N1). Кроличьи поликлональные антитела против человеческого UNC5B (ab104871) и козы поликлональные антитела против IgG кроликов, меченные флуорофором TRITC (ab7051-1), были приобретены у компании Abcam (США).

Клеточные культуры

Клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека THP-1 была получена из банка клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C в среде RPMI-1640 (“Биолот”, Россия) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FCS) и гентамицина в концентрации 40 мкг/мл. Дифференцировку моноцитов THP-1 в макрофаги проводили с использованием форбол-12-миристат-13-ацетата (РМА) в концентрации 50 нг/мл (81 нМ) в течение 24 ч. Затем клетки отмывали от форболового эфира, меняли среду на свежую RPMI-1640, содержащую 10% FCS и 40 мкг/мл гентамицина, и продолжали дифференцировку в течение 48 ч. Общее время дифференцировки клеток THP-1 составляло 4 дня при инкубации с нетрином-1 в течение 24 ч и 5 дней при инкубации с нетрином-1 в течение 48 ч.

Выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени.

Тотальную РНК из культивируемых клеток выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью планшетного спектрофотометра Synergy 2 (“BioTek”, США). Отношение поглощения при длинах волн 260 и 280 нм было выше 2, и отношение поглощения при 260 и 230 нм было выше 1,7. Отсутствие деградации РНК проверяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле по сохранению целостности рибосомальных РНК. Для проведения реакции обратной транскрипции брали равное количество РНК для всех точек. Реакцию обратной транскрипции (с 1 мкг тотальной РНК) проводили с использованием смеси праймеров oligo(dT) и специфических 3'-праймеров к генам *ntn1*, *unc5b*, *ccl19*. Для проведения реакции использовали реактивы компании Евроген. ПЦР в реальном времени проводили по технологии Taqman или по интеркаляции SYBR Green с использованием амплификатора CFX96 (“Bio-Rad”, США). Компоненты реакционной смеси были приобретены у компании “Синтол”, Россия. Праймеры и флуоресцентные зонды для референсных генов, кодирующих белки 60S кислый рибосомальный белок Р0 (RPLP0), циклофилин А и β-актин, были описаны ранее [Ошибка! Источник ссылки

не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Для детекции мРНК гена *ntn1* использовали следующие праймеры и зонд: прямой праймер 5'_CCTGCAAAGCCTGTGATT_3'; обратный праймер 5'_GCGCTACAGGGATCTTTATG_3'; зонд 5'_ROX-CAGAGCCGCTCTCCCATCGC-BHQ2 3';

unc5b: прямой праймер 5'_CAAGCAGGCACTGATTCT_3'; обратный праймер 5'_CCGTTGCACTTGAAGTAGAT_3';

ccl19: прямой праймер 5'_GCTCACACATTCACCGTT_3'; обратный праймер 5'_CAGCCATCCTTGATGAGAAG_3'.

Нормирование результатов ПЦР проводили по среднему геометрическому из трех референсных генов (RPLP0, циклофилин А, β-актин), как описано ранее [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Пороговое число циклов (Ct) для каждого гена было определено с помощью CFX-96 RealTime PCR System и программой «Bio-Rad». Относительные значения уровня мРНК генов *ntn1*, *unc5b*, *ccl19*, выраженные в процентах относительно контроля, были вычислены по формуле:

$$2^{(\Delta Ct(\text{control}) - \Delta Ct(\text{опыт}))} \cdot 100\%.$$

Проточная цитофлуориметрия

Макрофаги инкубировали с коллагеназой (Accutase, ThermoFisher, США) 20 мин при 37°C, снимали с планшета, центрифугировали и инкубировали в блокирующем буфере (фосфатно-солевой буферный раствор, 2% FCS) 30 мин при комнатной температуре на шейкере (ST3, “ELMI”, Латвия) при 500 об/мин. Клетки инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против человеческого UNC5B (разведение 1:100) в блокирующем буфере в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере, отмывали 3 раза в фосфатно-солевом буфере и далее инкубировали со вторичными козьими поликлональными антителами против IgG кроликов, меченные флуорофором TRITC (разведение 1:1000) в блокирующем буфере, в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Затем клетки отмывали 3 раза в фосфатно-солевом буфере. Клетки, обработанные вторичными антителами, но не инкубированные с антителами против UNC5B, использовали в качестве контроля специфичности иммунной окраски (изотип контроль). Проточная цитофлуориметрия была проведена с использованием проточного цитометра Epics Altra flow cytometer (“Beckman Coulter”, США) и программы FCSalyzer (<https://sourceforge.net/projects/fcsalyzer/>).

Статистический анализ

Тест на нормальность распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении результаты представляли как среднее арифметическое значение ± стандартная ошибка среднего, при распределении, отличающемся от нормального — как медиана ± интерквартильный размах. Статистический анализ различий между

сравниваемыми группами выполняли с использованием *t*-критерия Стьюдента (непарный *t*-тест), критерия Манна-Уитни, теста Данна. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism8.

3 Результаты и обсуждение

Нетрин-1 секретируется эндотелиальными, гладкомышечными клетками и макрофагами [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Повышение продукции нетрина-1 макрофагами наблюдается при атерогенезе, а также в ходе трансформации макрофагов в пенистые клетки [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

В наших экспериментах мы стимулировали макрофаги THP-1 нетрином-1 в концентрации 10 нг/мл, 50 нг/мл и 250 нг/мл в течение 24 ч и 48 ч и определяли уровень мРНК нетрина-1 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Добавление нетрина-1 на 24 ч не приводило к значимому изменению уровня экспрессии гена *ntn1* (данные не представлены). Статистически значимые изменения в уровне экспрессии наблюдались только через 48 ч при добавлении нетрина-1 в концентрации 50 нг/мл (Рис. 1). Следовательно, нетрин-1 способен усиливать экспрессию своего гена в ауто-/паракринной манере только при длительном воздействии (48 ч) и только в концентрации 50 нг/мл. В связи с этим, данные условия инкубации мы применяли в последующих экспериментах. Примечательно, что нетрин-1 в более высокой концентрации (250 нг/мл), наоборот, вызывал снижение экспрессии гена *ntn1*, т.е. наблюдалась отрицательная обратная связь (Рис.1).

Концентрации нетрина-1 были выбраны согласно работам по стимуляции этим белком человеческих культур эндотелиальных клеток HuAоЕС, HUVES и HMVES [Ошибка! Источник ссылки не найден.], а также данным иммуноферментного анализа определения нетрина-1 в культуральной жидкости перитонеальных макрофагов, полученных от мышей с нокаутом по гену аполипопротеин Е (*apoE*) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. В концентрации 10 нг/мл нетрин-1 не оказывал биологических эффектов, в диапазоне 50-150 нг/мл этот белок активировал рецептор UNC5B, что через последовательную активацию протеинкиназ FAK и АКТ приводило к сдвигу клеточного равновесия в направлении выживания и пролиферации [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]. В концентрациях 250-1000 нг/мл нетрин-1 подавлял миграцию клеток, опосредованную тем же рецептором [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Наши эксперименты были проведены на нестимулированных макрофагах (M0). В научной литературе описано, что продукция нетрина-1 последовательно возрастает по мере дифференцировки моноцитов в макрофаги, а затем при поляризации макрофагов в направлении M1. Так M1 макрофаги линии THP-1 и альвеолярные крысиные макрофаги линии NR8383

значительно увеличивали уровень мРНК нетрина-1 через 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 и 48 ч с максимальным пиком через 12 ч по сравнению с M0 макрофагами. Секретция белка нетрина-1 в культуральную среду значительно повышалась через 24 и 48 ч в сравнении с M0 макрофагами [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

В данной работе при добавлении к макрофагам нетрина-1 уровень мРНК рецептора UNC5B увеличивался (Рис. 2).

Известно, что продукция UNC5B так же, как и нетрина-1, возрастает при дифференцировке моноцитов в макрофаги. В частности, стимуляция моноцитов PMA приводила к многократному увеличению уровня мРНК и белка UNC5B у макрофагов линии THP-1, HL-60 (человеческая линия миелоидной лейкемии), перитонеальных макрофагов и макрофагов, выделенных из костного мозга мышей C57BL/6J после инъекции тиюгликолатом [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Согласно данным анализа РНК одиночных клеток программы <https://www.proteinatlas.org/> экспрессия UNC5B в иммунных клетках перечислена далее от наибольшей к наименьшей: гранулоциты, макрофаги, Купферовские клетки, клетки Лангерганса, плацентарные макрофаги (клетки Кащенко-Гофбауэра).

Значимость повышения уровня мРНК нетрина-1 и его рецептора UNC5B в макрофагах подтверждают работы, проведенные на мышах с гиперхолестеринемией. Так, уровни мРНК *ntn1* и *unc5b* были значительно выше в макрофагах *apoE*-дефицитных мышей, чем у мышей дикого типа, а также у мышей, находящихся на холестерол-богатой диете (Western diet), по сравнению с мышами с обычным питанием [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Помимо этого, представлялось важным исследовать влияние нетрина-1 на экспрессию рецептора UNC5B не только на транскрипционном уровне, но и на уровне белкового продукта (содержание поверхностного UNC5B на цитоплазматической мембране макрофагов). Методом проточной цитофлуориметрии было выяснено, что нетрин-1 увеличивает содержание своего рецептора UNC5B на поверхности макрофагов (Рис. 4). Остается неисследованным влияние нетрина-1 на продукцию макрофагами белков: самого нетрина-1, а также хемокина CCL19. Это является задачей для последующих исследований.

4 Выводы

Нетрин-1 в концентрации 50 нг/мл увеличивает экспрессию своего гена и экспрессию гена *unc5b* (на уровне мРНК и белка) в макрофагах человека. Наоборот, нетрин-1 в более высокой концентрации (250 нг/мл) подавляет экспрессию гена *ntn1* в макрофагах. Нетрин-1 (50 нг/мл) снижает экспрессию гена хемокина *ccl19* в макрофагах, что может являться одним из путей ингибирования миграции макрофагов данным эффектором. На дальнейшем

этапе исследований будет установлено влияние нетрина-1 на продукцию макрофагами белков нетрина-1 и CCL19.

Благодарности

Мы благодарим д.м.н., доцента Д.А. Танянского (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия) за полезное критическое обсуждение; к.б.н., доцента Кудрявцева Игоря Владимировича (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия) за помощь в освоении методики проточной цитометрии.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках Госзадания ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, г. Санкт-Петербург

The work was carried out of the state assignment of FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg

РИСУНКИ

Рисунок 1 Влияние нетрина-1 на уровень мРНК гена *ntn1*. Макрофаги THP-1, дифференцированные в течение 3 суток, были инкубированы с тремя различными концентрациями нетрина-1 в течение 48 ч. Указан относительный уровень экспрессии мРНК *ntn1*, где за 100 % принят уровень мРНК в нестимулированных клетках. Представлены медианные значения, планки погрешности соответствуют интерквартильному размаху, $n=15$. Статистическая достоверность различий проверялась с использованием теста Данна, * $p < 0,05$.

Figure 1. The influence of netrin-1 on *ntn1* mRNA level. The macrophages THP-1 differentiated for 3 days were incubated in three different concentrations of netrin-1 for 48 h. The diagram shows the relative *ntn1* gene expression level (100% in the unstimulated cells). The diagram shows the median $\pm$ interquartile range, $n=15$. Statistical significance of differences was tested using the Dunn's test, * $p < 0,05$.

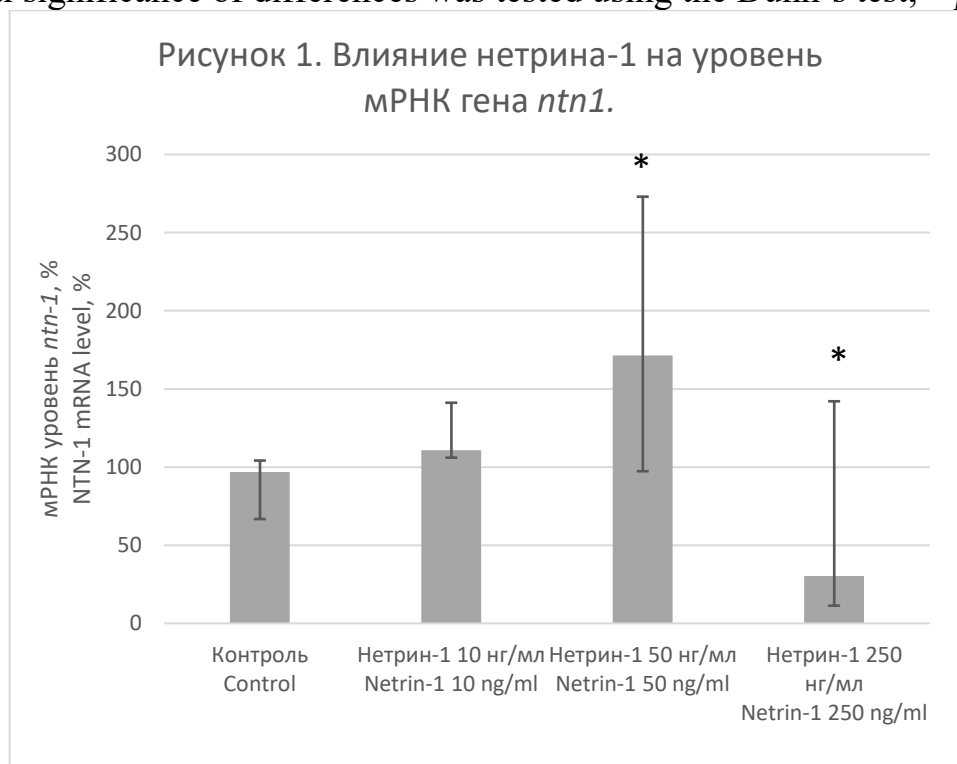


Рисунок 2. Влияние 50 нг/мл нетрина-1 на уровень мРНК *unc5b*. Макрофаги THP-1, дифференцированные в течение 3 суток, были инкубированы с нетрином-1 в течение 48 ч. Указан относительный уровень экспрессии мРНК *unc5b*, где за 100% принят уровень мРНК в нестимулированных клетках. Представлены средние значения, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего, $n=10$. t -критерий Стьюдента, * соответствует $p < 0,05$.

Figure 2. The influence of netrin-1 treatment in the concentration 50 ng/ml on mRNA level *unc5b* gene. The macrophages THP-1 differentiated for 3 days were incubated with netrin-1 for 48 h. The diagram shows the relative *unc5b* gene expression level (100% in the unstimulated cells). The diagram shows the mean values $\pm$ the standard error of mean, $n=10$. Student t -test, * $p < 0,05$.

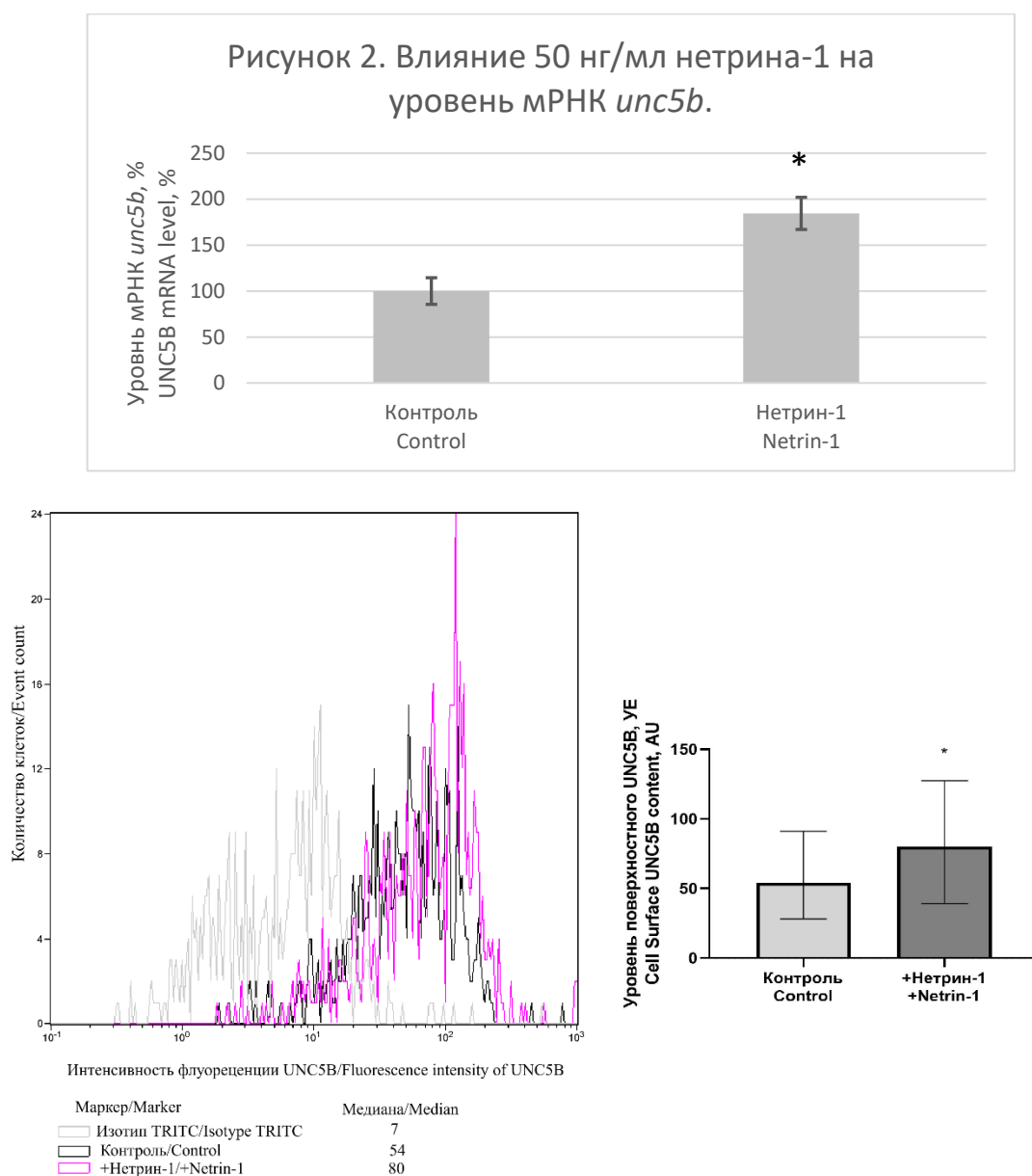


Рисунок 3. Влияние нетрина-1 в концентрации 50 нг/мл на экспрессию гена *ccl19*. Макрофаги THP-1, дифференцированные в течение 3 суток, были инкубированы с нетрином-1 в течение 48 ч. Указан относительный уровень экспрессии мРНК *ccl19*, где за 100 % принят уровень мРНК в нестимулированных клетках. Представлены результаты медианных значений, планки погрешности соответствуют интерквартильному размаху, n=9. Критерий Манна-Уитни, # соответствует $p < 0,05$.

Figure 3. The influence of netrin-1 in the concentration 50 ng/ml on mRNA level *ccl19* gene. The macrophages THP-1 differentiated for 3 days were incubated with netrin-1 for 48 h. The diagram shows the relative *ccl19* gene expression level (100% in the unstimulated cells). The diagram shows the median values $\pm$ interquartile range, n=9. Mann-Whitney test, # $p < 0,05$.

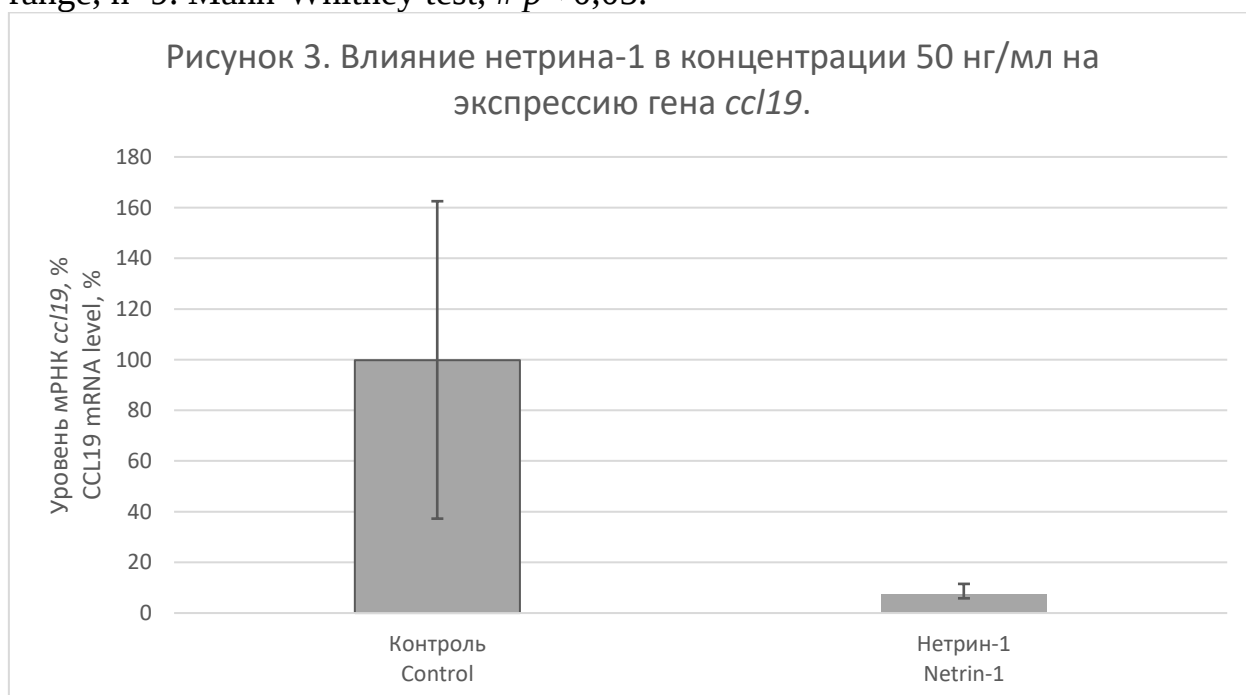
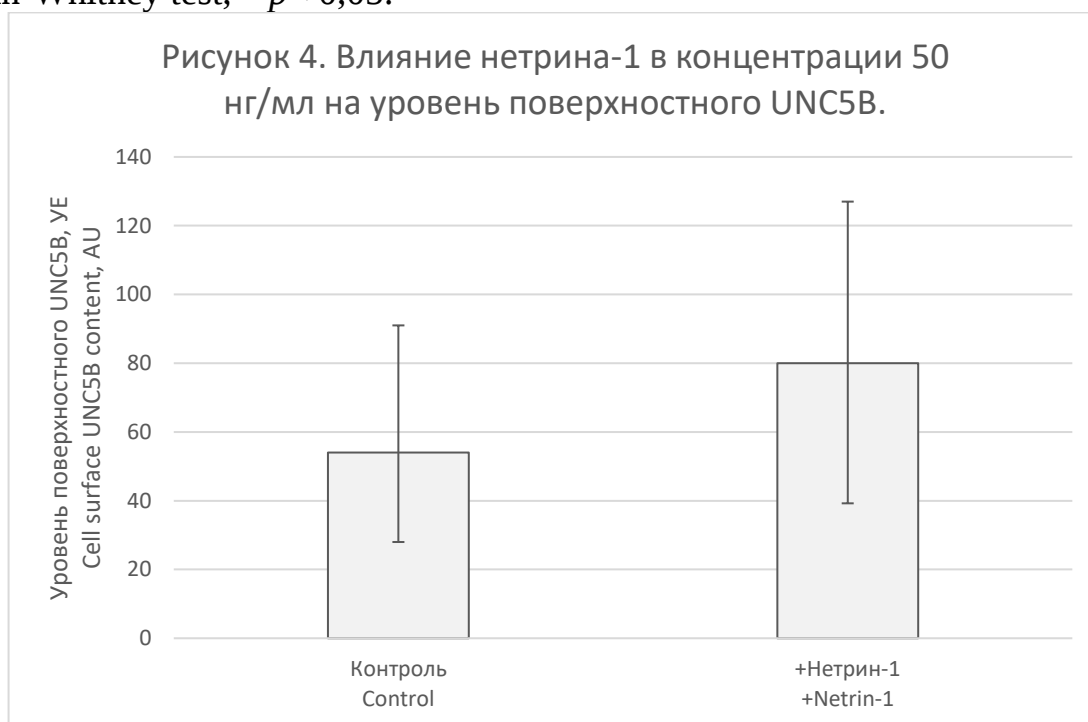


Рисунок 4. Влияние нетрина-1 в концентрации 50 нг/мл на уровень поверхностного UNC5B. THP-1 макрофаги, дифференцированные в течение 3 суток, были инкубированы с нетрином-1 в течение 48 ч. Контроль – нестимулированные макрофаги. +Нетрин-1 – макрофаги, инкубированные с нетрином-1. На диаграмме представлены медианные значения интенсивности флуоресценции $\pm$ интерквартильный размах, $n=4$. Критерий Манна-Уитни, * $p < 0,05$.

Figure 4. The influence of netrin-1 in the concentration 50 ng/ml on UNC5B surface level. THP-1 macrophages differentiated for 3 days were incubated with netrin-1 for 48 h. Control - macrophages without netrin-1 treatment. +Netrin-1 – macrophages treated by netrin-1. The diagram shows the median values $\pm$ interquartile range, $n=4$. Mann-Whitney test, * $p < 0,05$.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Некрасова Екатерина Викторовна, научный сотрудник;

ученая степень и ученое звание: нет;

адрес: 197022, Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, 12;

факс: 8(812)234-94-89;

телефон: 8(812)234-68-68;

e-mail: katherina.nekrasova@gmail.com

Nekrasova Ekaterina Viktorovna, researcher;

address: 197022, Acad. Pavlov Street, 12 St. Petersburg, Russia;

fax: 8(812)234-94-89;

telephone: 8(812)234-68-68;

e-mail: katherina.nekrasova@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Орлов Сергей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент,
старший научный сотрудник;

Ученые степени, ученые звания, должности: кандидат биологических наук,
доцент, старший научный сотрудник;

Orlov Sergey Vladimirovich, candidate of biological sciences (PhD in biology),
Associate Professor, Senior researcher.

НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *NTN1* И *UNC5B*, НО ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *CCL19* В THP-1

NETRIN-1 UPREGULATES *NTN1* AND *UNC5B* GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES *CCL19* GENE EXPRESSION IN THP-1
10.15789/1563-0625-NUT-3151

Блок 3. Метаданные статьи

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ: НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ СОБСТВЕННОГО ГЕНА И ГЕНА СВОЕГО РЕЦЕПТОРА *UNC5B*, НО ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *CCL-19* В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ THP-1

NETRIN-1 UPREGULATES THE ITS OWN GENE EXPRESSION AND *UNC5B* GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES *CCL-19* GENE EXPRESSION IN HUMAN MACROPHAGES THP-1 CELL LINE

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *NTN1* И *UNC5B*, НО ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *CCL19* В THP-1

NETRIN-1 UPREGULATES *NTN1* AND *UNC5B* GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES *CCL19* GENE EXPRESSION IN THP-1

Ключевые слова: нетрин-1; *NTN1*; *UNC5B*; *CCL19*; макрофаги человека.

Keywords: netrin-1; *NTN1*; *UNC5B*; *CCL19*; human macrophages.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 7,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 4.

10.12.2024

НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ NTN1 И UNC5B, НО ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА CCL19 В THP-1
NETRIN-1 UPREGULATES NTN1 AND UNC5B GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES CCL19 GENE EXPRESSION IN THP-1
10.15789/1563-0625-NUT-3151

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ