Медицинская иммунология
2011, Т. 13, № 6, стр. 597-602
© 2011, СПб РО РААКИ

ЭКСПРЕССИЯ АДАПТЕРА TH17-ЛИМФОЦИТОВ – TRAF3IP2 В КОЖЕ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Хайрутдинов В.Р.[1], Михайличенко А.Ф.[1], Пискунова А.А.[2], Бычкова Н. В.[3], Самцов А.В.[1], Имянитов Е.Н.[4]

[1] Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург
[2] Санкт-Петербургская Медицинская академия последипломного образования, Санкт-Петербург
[3] ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС РФ, Санкт-Петербург
[4] Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург

Резюме. Ген TRAF3IP2 играет важную роль в реализации таких процессов, как воспаление и аутоиммунный контроль. Белок TRAF3IP2 выполняет функцию проводника сигнала от мембранного рецептора к ядру клетки и необходим для осуществления биологических эффектов Th17-лимфоцитов. Цель работы – оценить влияние полиморфизма Arg74Trp гена TRAF3IP2 на формировании риска развития псориаза, исследовать уровень экспрессии мРНК TRAF3IP2 у больных псориазом и здоровых доноров. В качестве источника ДНК использовались лейкоциты периферической крови 261 больного и 482 здоровых доноров. Экспрессию мРНК TRAF3IP2 исследовали в биоптатах кожи 36 больных псориазом и 14 здоровых доноров. Генотипирование проводилось методом аллель-специфической ПЦР в режиме «реального времени». Уровень экспрессии мРНК определяли при помощи ПЦР в режиме «реального времени» в парных пробах с использованием гена-рефери (SDHA). Выявлено повышение частоты редкого аллеля Trp среди больных псориазом – 55/522 (10,5%), в сравнении со здоровыми лицами 67/964 (7,0%) (OR = 1,58, 95% CI: 1,09 – 2,28, p = 0,02). Обнаружена тенденция к более высокой встречаемости аллеля Trp у пациентов с тяжелой степенью псориаза – 21/154 (13,6%), по сравнению с больными легкой и средней степенью тяжести заболевания – 34/368 (9,2%) (p = 0,14). Не выявлено различий в экспрессии мРНК TRAF3IP2 в коже больных псориазом и здоровых лиц. Обнаруженная ассоциация между аллелем Trp гена TRAF3IP2 и риском развития псориаза позволяет предположить, что триптофановый вариант этого белка обладает более высокой ферментативной активностью. У носителей аллеля Trp будет интенсивнее индуцироваться процесс воспаления, что является предрасполагающим фактором к развитию псориаза.

Ключевые слова: псориаз, ген TRAF3IP2, предрасположенность, экспрессия, полиморфизм.

Khairutdinov V.R., Mikhailichenko A.F., Piskunova A.A., Bychkova N.V., Samtsov A.V., Imyanitov E.N.

EXPRESSION OF TH17-LYMPHOCYTE ADAPTER – TRAF3IP2 IN THE SKIN OF PSORIASIS PATIENTS

Abstract. TRAF3IP2 gene plays an important role in the processes of inflammation and autoimmune control. TRAF3IP2 protein acts as a signal transducer from membrane receptors to the cell nucleus and is essential for the biological effects of Th17-lymphocytes. The goal of present study was to investigate distribution of allelic variants of TRAF3IP2 Arg74Trp polymorphism as a risk factor in psoriasis development, and to evaluate TRAF3IP2 mRNA expression levels in psoriasis patients and healthy donors. Peripheral blood leukocytes were used as a source of DNA. Gene testing was performed for 261 patients and 482 healthy blood donors by real-time allele-specific PCR. TRAF3IP2 mRNA expression was measured in the skin biopsy samples from 36 patients with psoriasis and 14 healthy donors by means of quantitative reverse transcriptase PCR, using a paired-sample approach with SDHA reference gene. We have observed a significantly increased occurrence of rare Trp allele, with 10.5% among psoriasis patients (55/522), as compared with 7.0% (67/964) for healthy persons (OR = 1.58, 95% CI: 1.09 – 2.28, p = 0.02).

Адрес для переписки:
Хайрутдинов Владислав Ринатович
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 2.
E-mail: haric03@list.ru

A trend of higher Trp allele occurrence was revealed in patients with severe psoriasis – 21/154 (13.6%) when compared to the patients with milder course of the disease – 34/368 (9.2%) (p = 0.14). No differences were found for TRAF3IP2 mRNA expression in skin samples from psoriasis patients versus healthy persons. The association between TRAF3IP2 Trp allele and increased susceptibility to psoriasis suggests that Trp variant of this protein may display a higher enzymatic activity. Induction of inflammatory process in carriers of Trp allele would be more intensive, thus being a predisposing factor in psoriasis development. ***(Med. Immunol., 2011, vol. 13, N 6, pp 597-602)***

Keywords: psoriasis, TRAF3IP2 gene, predisposal, gene expression, gene polymorphism.

Введение

Псориаз относится к мультифакториальным болезням с полигенным типом наследования. Генетическая предрасположенность псориаза формируется при неблагоприятном сочетании полиморфных аллелей генов, участвующих в регуляции врожденного и приобретенного иммунитета, пролиферации и дифференцировке кератиноцитов. Результатом подобного наследования является взаимодействие различных генов, приводящее к изменению качественных и/или количественных параметров кодируемых продуктов, активности ферментативных систем, свойств сигнальных путей и т.д. Воздействие триггерных факторов приводит к нарушению существующего гомеостаза и инициации развития заболевания [10].

При проведении ассоциативных исследований полиморфизмов ДНК и риска развития псориаза, в интервале PSORS1 (psoriasis susceptibility – локус восприимчивости к псориазу), была обнаружена новая генетическая детерминанта этого заболевания – ген TRAF3IP2 [2]. Ген TRAF3IP2 кодирует белок, взаимодействующий с протеином TRAF3 (TRAF3 – фактор-3, связывающий рецептор фактора некроза опухолей). Белок TRAF3IP2, также известный, как активатор-1 (ACT1) ядерного фактора NF-κB, обладает протеинкиназной активностью и участвует в регуляции проведения сигнала от мембранного рецептора в ядро через транскрипционные факторы.

Согласно современным представлениям об иммунных механизмах развития псориаза важная роль в формировании псориатических поражений отводится Th17-клеткам. Субпопуляция Th17-лимфоцитов образуется путем дифференцировки Th0-клеток, стимулируемой дермальными миелоидными дендритными клетками. В коже Th17-лимфоциты секретируют провоспалительные цитокины – TNFα, IL-17, IL-22 [7, 10]. Результатом взаимодействия IL-17 с его рецепторами является передача сигнала внутрь клетки на молекулу TRAF3IP2, которая активизирует факторы транскрипции. Таким путем сигнал достигает генетического аппарата клетки, что сопровождается индукцией экспрессии провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и факторов роста [4, 12]. Биологические эффекты Th17-клеточного иммунного ответа в коже больных псориазом связаны с накоплением медиаторов воспаления в области формирования псориатических высыпаний, стимулирующих ангиогенез и миграцию нейтрофилов. Интерлейкин-22 вызывает усиление пролиферации и нарушение дифференцировки кератиноцитов, что приводит к формированию акантоза в эпидермисе и развитию характерных псориатических высыпаний на коже [11, 13].

Классический сигнальный каскад активации NF-κB запускается после связывания фактора некроза опухолей-α с рецепторами TNFRI и TNFRII. Происходит активация фактора, связывающего рецептор фактора некроза опухолей, который взаимодействует с TRAF3IP2. NFκB в клетке находиться в цитоплазме в ингибированном состоянии и связан с белком IκBα, который препятствует его перемещению в ядро. Сигнал, поступивший на белок TRAF3IP2 приводит к активации комплекса IκB киназ и деградации IκBα. Освободившийся ядерный фактор NF-κB перемещается в ядро клетки, где связывается с энхансерными участками ДНК или промоторами генов, регулирующих процессы воспаления и пролиферации [6]. При Th17-опосредованном воспалении активация TRAF3IP2 происходит после взаимодействия интерлейкина-17 с его рецептором (IL-17R) [8]. В экспериментах на TRAF3IP2-дефицитных мышах интенсивность воспалительного процесса была снижена, а экспериментальные аутоиммунные заболевания не удавалось индуцировать [12]. В данной работе было показано, белок TRAF3IP2 является необходимым для реализации «интерлейкин-17-зависимого» воспаления.

Ген TRAF3IP2 характеризуется наличием полиморфизма Arg74Trp в кодирующей области [5]. Изменение первичной структуры белка за счет замены аминокислоты в полипептидной цепочке может приводить к изменению пространственной структуры фермента и нарушению его функции. Подавление/усиление протеинкиназной активности TRAF3IP2 может повлиять на проведении сигнала от мембранного рецептора клетки к ядру и привести к изменению продукции цито-

кинов и факторов роста. Мы предположили, что полиморфизм Arg74Trp гена TRAF3IP2 может быть ассоциирован с риском развития псориаза и псориатического артрита, тяжестью заболевания.

Цель исследования – оценить влияние полиморфизма Arg74Trp гена TRAF3IP2 на формировании риска развития псориаза, исследовать уровень экспрессии мРНК TRAF3IP2 в коже больных псориазом и здоровых доноров.

Материалы и методы

В группу больных бляшечным псориазом вошли 261 пациент (средний возраст 41,7 ±0,88 лет). Критерием включения являлось наличие заболевания в течение 12 месяцев и более, подтвержденное медицинской документацией. Группу контроля составил 482 здоровых донора. Тяжесть болезни оценивалась по индексу площади и тяжести псориатических поражений PASI (Psoriasis Area and Severity Index): легкая степень (< 10 баллов) – 125 (47,9%) пациентов, средняя (≥ 10-20 < баллов) – 59 (22,6%) больных, тяжелая (≥ 20 баллов) – у 77 (29,5%) пациентов. В качестве источника ДНК использовались лейкоциты периферической крови. Материалом для исследования экспрессии мРНК TRAF3IP2 служили биоптаты кожи, полученных методом панч-биопсии от 36 больных псориазом, в прогрессирующем периоде, из периферии псориатических бляшек и 14 здоровых доноров. Панч-биопсия производилась с помощью одноразового стерильного пробойника диаметром 6 мм. Биоптаты фиксировали формалином и помещали в парафин.

Генотипирование полиморфизма Arg74Trp гена TRAF3IP2

Выделение ДНК из периферических лейкоцитов крови проводили при помощи модифицированного соль-хлороформного метода [9]. Молекулярно-генетическое тестирование было основано на применении методики аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени на приборе «iCycler iQ Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad Laboratories»). Реакцию проводили в 20 мкл с двумя парами праймеров. Реакционная смесь содержала: 1 мкл (50 нг) ДНК-лизата в ТЕ-буфере, 10,0 мкл 2-кратного ПЦР-буфера (pH 8,3), содержащего 200 мкМ каждого из нуклеотидтрифосфатов, 2,5 ед. ДНК-полимеразы «Thermostar», 1,0 мкл каждого праймера (аллель-специфический + общий), 0,2 мкл SYBR Green 100 и 7,6 мкл дистиллированной стерильной воды. Последовательности используемых праймеров: TRAF3IP2-asA 5'-TGAAACTTGCAAATCACCAGT-3', TRAF3IP2-asG 5'-TGAAACTTGCAAATCACCAGC-3' TRAF3IP2-F 5'-GAGCACCCAGAAGGGAAAG-3', Условия ПЦР-реакции: 10-минутная активация Taq-полимеразы при 95 °C, затем 50 циклов амплификации – денатурация (12 с, 95 °C), отжиг (25 с, 64 °C) и синтез (25 с, 72 °C).

Выделение мРНК из срезов кожи

Выделение мРНК проводилось из срезов кожи толщиной 10 мкм, которые депарафинизировали с помощью ксилола, регидратировали путем последовательной инкубации в 96%, 80% и 70% этаноле и лизировали на протяжении 16 часов при 60 °C. Состав лизирующего буфера включал 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 мМ EDTA, 2% SDS, и 500 мкг/мл протеиназы К. Экстракция производилась кислым фенолом (pH 4,0) и хлороформом. Затем мРНК осаждали изопропанолом в присутствии гликогена, промывали 70% этанолом и растворяли в воде. Полученный раствор РНК использовали для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) в реакции обратной транскрипции.

Определение экспрессии мРНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени («real-time PCR») проводилась на оборудовании «iCycler iQ Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad Laboratories»). Каждая ПЦР-реакция (суммарный объем: 20 мкл) содержала 1 мкл раствора кДНК, 2,5 ед. ДНК-полимеразы «Thermostar», 2-кратный ПЦР-буфер (pH 8,3), 3,0 мМ $MgCl_2$, 200 мкМ каждого из нуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров гена-рефери (SDHA), 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров гена-мишени (TRAF3IP2). Последовательности мРНК гена-мишени (TRAF3IP2) и гена-рефери (SDHA) амплифицировали при помощи праймеров TRAF3IP2-F 5'-TACCTTAGGGATAAGACCGTG-3' и TRAF3IP2-R 5'-GAACTCAATCTGCATCATTCGA-3', SDHA-F 5'-CCACTCGCTATTGCACACC-3' и SDHA-R 5'-CACTCCCCGTTCTCCATCA-3', соответственно. Подбор праймеров гена TRAF3IP2 выполнен в программе Primer-Blast, доступной в он-лайн режиме на сайте NCBI [1]. На этапе оптимизации условий ПЦР-реакции праймеры тестировали на отсутствие эффективной амплификации с хромосомальной ДНК. ПЦР-реакция начиналась с 10-минутной активации Taq-полимеразы при 95 °C; для накопления ПЦР-продукта проводилось 45 циклов амплификации – денатурация (12 с, 95 °C), отжиг (25 с, 62 °C) и синтез (25 с, 72 °C). При выборе гена-рефери предпочтение было отдано гену SDHA, кодирующему сукцинат-дегидрогеназу А [3] (рис. 1).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистической программы «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc). Уровень экспрессии выражался в условных единицах

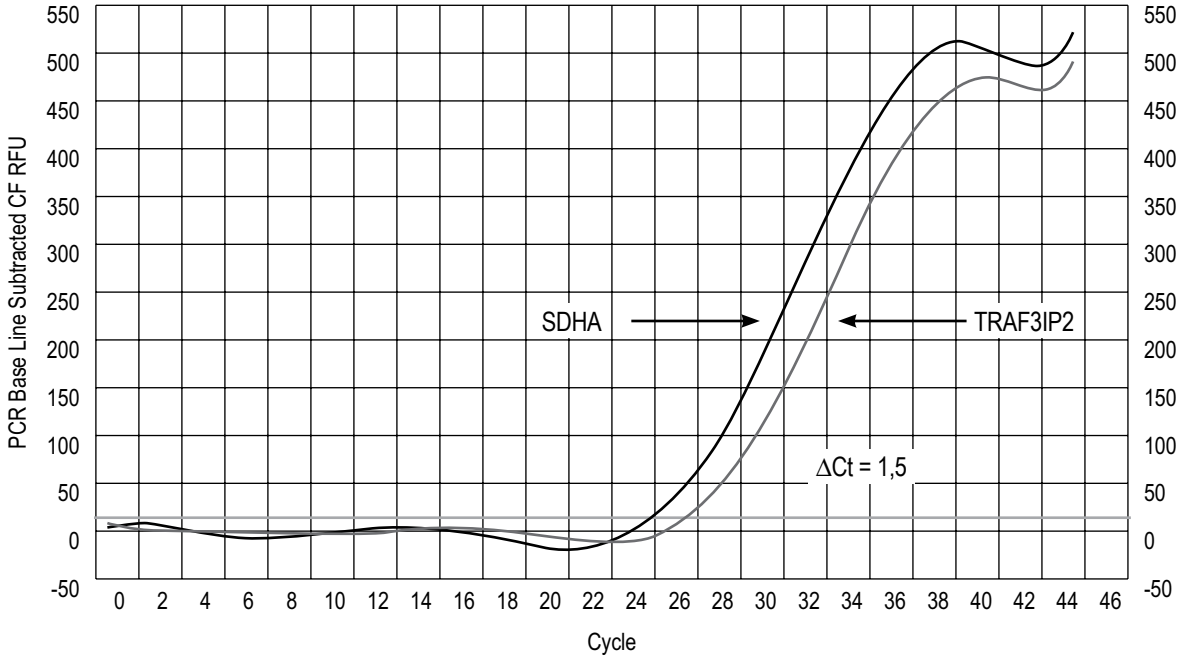

Рисунок 1. ПЦР в реальном времени: кривые амплификации мРНК генов TRAF3IP2 и SDHA

относительной экспрессии – NE = 2 (Ct,ref – Ct,tar), где Ct означает номер цикла ПЦР, при котором число копий превышает установленный порог и может быть определено по кривым накопления продукта, ref ген-рефери (SDHA), tar – ген-мишень (TRAF3IP2) (рис. 1). Для оценки различий между больными и здоровыми по уровню экспрессии мРНК применяли U-критерий Манна–Уитни. Наличие ассоциации между заболеванием и генотипом тестировали с помощью χ-квадрат критерия Пирсона, сравнивая распределение генотипов и аллелей между группами пациентов и контролей и между подгруппами больных псориазом. Показатель «отношения шансов» – OR (odds ratio) – с 95% доверительным интервалом (95% CI), рассчитывался относительно группы частого аллеля.

Результаты

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма Arg74Trp гена TRAF3IP2 выявил повышение встречаемости редкого аллеля Trp среди больных псориазом – 55/522 (10,5%), в сравнении со здоровыми лицами 67/964 (7,0%) (OR = 1,58, 95% CI: 1,09-2,28, p = 0,02) (табл. 1). Распределение частот генотипов и аллелей в каждой выборке соответствовало равновесию Харди–Вайнберга. Для расчета показателей использовалась мультипликативная модель наследования.

Для выявления возможного модифицирующего влияния полиморфизма Arg74Trp гена TRAF3IP2 на течение псориаза мы провели оценку характера распределения полиморфных вариантов в подгруппах пациентов с I и II типом болезни, с различной степенью тяжести заболевания, отягощенным и неотягощенным наследственным анамнезом, интермиттирующим и непрерывно рецидивирующим течением дерматоза. Выявлена тенденция к более высокой встречаемости аллеля Trp у пациентов с тяжелой степенью псориаза – 21/154 (13,6%), по сравнению с больными легкой и средней степенью тяжести заболевания – 34/368 (9,2%) (p = 0,14).

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА ARG74TRP ГЕНА TRAF3IP2 У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Генотип	Частота генотипов, абс. (отн., %)		Частота редкого аллеля Trp, абс. (отн., %)		Уровень значимости p	OR[1] (доверительный интервал)
	Псориаз	Контроль	Больные	Контроль		
Arg/Arg	210 (80,5)	418 (86,7)	55 (10,5)	67 (7,0)	0,02	1,58 (1,09-2,29)
Arg/Trp	47 (18)	61 (12,7)				
Trp/Trp	4 (1,5)	3 (0,6)				

Примечание. [1] – показатель OR рассчитан для частоты аллеля Trp относительно встречаемости аллеля Arg.

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЕНА TRAF3IP2 В КОЖЕ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Категория	Количество биоптатов	Уровень экспрессии, M±m	U-критерий Манна–Уитни	Критическое значение UKp p ≤ 0,05
Больные псориазом	36	1,98±0,17*	193,5	175
Здоровые доноры	14	1,55±0,24*		

Примечание. * — уровень экспрессии выражен в условных единицах относительной экспрессии; M — среднее значение; m — ошибка среднего значения.

Уровень экспрессии мРНК в коже в области псориатических поражений составил 1,98±0,17 усл. ед. и не имел статистически достоверных различий с экспрессией в коже здоровых доноров – 1,55±0,24 усл. ед. (U = 193,5, p = 0,2) (табл. 2).

Обсуждение

Иммунные нарушения в патогенезе псориаза обусловлены активацией клеточного иммунитета с девиацией в сторону Th17-лимфоцитов. Основные патогистологические изменения в псориатических очагах формируются в результате развития воспалительного процесса под действием цитокинов, индуктором которых являются Th17-клетки. Молекула TRAF3IP2 играет важную роль в реализации процесса воспаления и аутоиммунного контроля, выполняя функцию проводника в реализации инициирующего сигнала Th17-клеток [8]. В настоящей работе впервые исследована экспрессия мРНК TRAF3IP2 и проанализирована встречаемость полиморфных аллелей этого гена у больных псориазом. Не выявлено различий в экспрессии мРНК TRAF3IP2 в коже больных псориазом и здоровых лиц. Значительный уровень экспрессии мРНК TRAF3IP2 во всех исследуемых биоптатах, сравнимый с экспрессией мРНК SDHA, свидетельствует о высокой транскрипционной активности исследуемого гена. На уровне транскрипции гена отсутствует ассоциация между TRAF3IP2 и псориазом, его клиническими проявлениями. Полиморфизм кодирующей области гена TRAF3IP2 может отражаться на свойствах кодируемой им протеинкиназы. Обнаруженная ассоциация между аллелем Trp и риском развития псориаза позволяет предположить, что триптофановый вариант этого белка обладает более высокой ферментативной активностью. Допуская такую гипотезу, при одинаковом уровне транскрипции гена TRAF3IP2 у носителей аллеля Trp будет интенсивнее индуцироваться процесс воспаления, что является предрасполагающим фактором к развитию псориаза. Для целостного понимания патогенеза псориаза и поиска эффективных методов его терапии необходимо дальнейшее проведение ассоциативных исследований генов-участников сигнального каскада Th17-клеточного иммунного ответа и изучение уровня их экспрессии в очагах поражения.

Список литературы

1. Интернет-ресурс Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI). Primer-Blast: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC = BlastHome.

2. Ellinghaus E., Ellinghaus D., Stuart P.E. et al. Genome-wide association study identifies a psoriasis susceptibility locus at TRAF3IP2. Nat Genet. – 2010. – 42 (11). – P. 991-995.

3. Fischer M., Skowron M., Berthold F. Reliable transcript quantification by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in primary neuroblastoma using normalization to averaged expression levels of the control genes HPRT1 and SDHA // J. Mol Diagn. – 2005. – 7 (1). – P. 89-96.

4. Hacker H., Redecke V., Blagoev B. et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. Nature. – 2006. – 439. – P. 204-207.

5. Huffmeier U., Uebe S., Ekici A. et al. Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. Nat Genet. – 2010. – 42 (11). – P. 996-9.

6. Li X., Commane M., Nie H. et al. Act1, an NF-κB-activating protein. Proc Nat Acad Sci USA. – 2000. – 97. – P. 10489-10493.

7. Liang S.C., Tan X.Y., Luxenberg D.P. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides // J. Exp Med. – 2006. – 203. – P. 2271-2279.

8. Liu C., Qian W., Qian Y. et al. Act1, a U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17 signaling. Sci Signal. – 2009. – 2 (92): ra63.

9. Mullenbach R., Lagoda P.J., Welter C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. Trends Genet. – 1989. – 5 (12). – P. 391.

10. Nestle F.O., Kaplan D.H., Barker J. Review article: Mechanisms of Disease. Psoriasis // New England Journal of Medicine. – 2009. – 361. – P. 496-509.

11. Ouyang W., Kolls J.K., Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation // Immunity. – 2008. – 28. – P. 454-467.

12. Qian, Y., Liu C., Hartupee J. et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease // Nat. Immunol. – 2007. – 8. – P. 247-256.

13. Starnes T., Robertson M.J., Sledge G. et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production // J. Immunol. – 2001. – 167. – P. 4137-4140.

поступила в редакцию 01.06.2011
отправлена на доработку 15.06.2011
принята к печати 22.06.2011