

УДК [573.6.086.83:577.21]:[615.373.3+615.277]

Елена Владимировна Якушенко¹, Юлия Анатольевна Лопатникова¹, Сергей Витальевич Сенников¹, Маргарита Николаевна Шаталина², Елена Александровна Филипенко², Елена Викторовна Дейнеко², Елена Николаевна Воронина³, Евгений Александрович Храпов³, Максим Леонидович Филипенко³, Владимир Константинович Шумный², Владимир Александрович Козлов¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МОРКОВИ - ПРОДУЦЕНТОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-18 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ У МЫШЕЙ

¹ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН

630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

²Институт цитологии и генетики СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

Исследованы иммуномодулирующие свойства полученных ранее генетически модифицированных растений моркови *Daucus carota* L., экспрессирующих ген интерлейкина-18 человека. При исследовании биологической активности полученных трансгенных растений показано, что пероральное употребление трансгенной моркови мышами приводит к увеличению продукции ИФН- γ спленоцитами и стимуляции реакции гиперчувствительности замедленного типа к Т-зависимому антигену эритроцитов барана.

Ключевые слова: трансгенные растения, интерлейкин-18, иммунитет

Одним из новых перспективных подходов в иммунорегуляции является использование пероральных вакцин на основе рекомбинантных специфических антигенов и иммунорегуляторных цитокинов. В различных экспериментальных моделях и клинических испытаниях показана эффективность перорального введения антигенов для модуляции иммунного ответа. Одним из возможных путей доставки антигенов или цитокинов является использование трансгенных растений. В настоящее время имеется возможность переносить в растения гены различных иммунорегуляторных белков, пептидов человека, а также разнообразных антигенов. Трансгенные растения используются для производства ряда биологически активных

продуктов, включая лекарственные препараты (например, цитокины, гормоны), а также съедобных вакцин против инфекционных заболеваний (например, гепатиты В и С, СПИД). Преимущество этих вакцин состоит в их дешевизне, что определяется низкой себестоимостью при возделывании растений, недорогой технологией их хранения и транспортировки, не требующей особых условий. Кроме того, растения не подвержены заражению патогенными для человека агентами; съедобные вакцины не требуют инъекционного введения, что более комфортно для пациентов и не требует расхода одноразовых инструментов для инъекций и участия медицинского персонала.

В настоящее время данный подход интенсивно

Якушенко Е.В. - с.н.с. лаборатории регуляции иммунопоэза, e-mail: e-yakushenko@mail.ru

Лопатникова Ю.А. - н.с. лаборатории молекулярной иммунологии, e-mail: lopatnikova_j_a@ngs.ru

Сенников С.В. - заведующий лабораторией регуляции иммунопоэза, e-mail: ici@ksn.ru

Шаталина М.Н. - аспирант лаборатории биоинженерии растений, e-mail: shatalina@gmail.com

Филипенко Е.А. - м.н.с. лаборатории биоинженерии растений, e-mail: filipenko@bionet.nsc.ru

Дейнеко Е.В. - заведующий лабораторией биоинженерии растений, e-mail: deineko@bionet.ru

Воронина Е.Н. - м.н.с. группы фармакогеномики, e-mail: voronina_l@mail.ru

Храпов Е.А. - м.н.с. группы фармакогеномики, e-mail: khrap_off@ngs.ru

Филипенко М.Л. - заведующий группой фармакогеномики, e-mail: max@niboch.nsc.ru

Шумный В.К. - директор, e-mail: shumny@bionet.nsc.ru

Козлов В.А. - директор, e-mail: niiki01@online.nsk.su

разрабатывается с привлечением таких растений, как картофель, кукуруза, салат, люцерна, морковь, томаты, огурцы, табак и другие виды [1]. Эти исследования направлены на создание трансгенных растений, несущих опухолевые, инфекционные антигены или иммунорегуляторные цитокины, с целью активации специфических иммунных реакций.

Интерлейкин-18 – это белок, постоянно продуцирующийся в организме человека и участвующий в формировании врожденного и приобретенного иммунного ответов, однако при ряде патологий продукция его становится недостаточной, например, при некоторых вирусных заболеваниях, когда сами вирусы продуцируют особый протеин, который нивелирует активность ИЛ-18, создавая тем самым предпосылки для формирования слабого иммунного ответа [2]. В таких случаях требуется введение пациентам рекомбинантного ИЛ-18, что эффективно в отношении активизации иммунитета.

Целью данной работы является изучение возможности перорального применения трансгенной моркови, несущей ген ИЛ-18 человека, для модуляции иммунных реакций в экспериментальных моделях на мышах.

Материалы и методы

Растительный материал. Исследование возможности применения трансгенных растений-продуцентов белков медицинского назначения для модуляции иммунных реакций проводили с использованием трансгенных растений моркови (*Daucus carota* L. сорта Нантская), полученных нами ранее методом агробактериальной трансформации [3]. В эксперименте использовали корнеплоды трансгенных растений, полученных от переопыления исходных трансгенных растений между собой. Каждый корнеплод предварительно индивидуально тестирован методом ПЦР на присутствие в геноме целевого гена. Для скормливания животным отбирали только те корнеплоды, обозначенные Crt-IL18, у которых в выделенной ДНК выявлялись фрагменты, амплифицирующиеся с праймерами на фрагмент гена ИЛ-18 человека. В качестве контроля использовали нетрансгенные растения моркови сорта Нантская (Crt).

Животные. Для исследования использовались мыши (самцы) линии (C57BL/6хСВА)F1 в возрасте 5 мес в количестве 126. На момент исследования масса животных составляла 20-22 г. Мыши получены из питомника лабораторных животных Института фармакологии СО РАМН (г. Томск). В течение 16 дней мыши получали в качестве добавки к стандартному рациону обычную (Crt, контрольная группа) или трансгенную по гену ИЛ-18 морковь (Crt-IL18, опытная группа) в дозе 1,7-2,0 г/мышь ежедневно. Интактная группа на-

ходила на стандартном рационе. Эвтаназия животных проводилась в соответствии с утвержденными «Правилами проведения работ с экспериментальными животными» с помощью ингаляционного наркоза хлороформом.

Культуральные среды и реагенты. RPMI-1640 (НПО «Вектор»), эмбриональная сыворотка телят (ЭТС) (НПО «Вектор»), Hepes («Sigma»), 2-меркаптоэтанол («Sigma»), L-глутамин (НПО «Вектор»), гентамицин (АО «Самсон», Санкт-Петербург), Конканавалин А (КонА) («Sigma»), ³H тимидин (компания «Изотоп», Санкт-Петербург), 96-луночные круглодонные планшеты («Медполимер», Санкт-Петербург).

Отбор корнеплодов на присутствие гена ИЛ-18 человека. Геномную ДНК генетически модифицированных растений моркови, несущих ген ИЛ-18 (CrtIL18), выделяли, как описано в [4]. Присутствие нуклеотидной последовательности ИЛ-18 человека в геномных ДНК трансформантов CrtIL18 подтверждали методом ПЦР с праймерами:

IL18-U 5'-TGAATTCCCATATGTA CTTTGGCAA GCTTGAATCTA-3',

IL18-R 5'-GAAGGATCCTAGTCTTCGCTTTGAACAGTG-3'.

Амплификацию проводили в 50 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис-HCl (pH 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01 %-й твин-20, 150 мкМ dNTP, 1 мкМ праймеры, 2 ед. акт. Таq-ДНК-полимеразы в течение 35 циклов в следующих режимах: денатурация – 1 мин при 94 °С, отжиг праймеров – 1 мин при 65 °С для пар праймеров IL18-U/R. Полученные амплификационные смеси анализировали электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием [5]. В работе использовали MoMLV РНК-зависимую ДНК полимеразу, ДНК-лигазу фага Т4, полинуклеотидкиназу фага Т4 («Promega»), Таq-ДНК-полимеразу, эндонуклеазы рестрикции («Сибэнзим»).

Культивирование спленоцитов и тимоцитов мыши. После окончания опыта мышей усыпляли хлороформом и в стерильных условиях выделяли селезенку и тимус. Выделенные спленоциты и тимоциты культивировали в полной среде (RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 80 мкг/мл гентамицина, 100 мкг/мл ампициллина, 2 мМ L-глутамина, меркаптоэтанол). Для стимуляции использовали Конканавалин А (КонА) в концентрации 5 мкг/мл. Время культивирования – 48 ч во влажной атмосфере при температуре 37 °С и концентрации CO₂ 5 %. Перед сбором кондиционной среды клетки осаждали центрифугированием в планшетах при 1000 об./мин в течение 10 мин. Собранные супер-

натанты хранились при -20°C до определения в них содержания цитокинов.

Определение количественного содержания цитокинов электрохемилюминесцентным (ЭХЛ) методом. Анализ количественного содержания цитокинов в супернатантах спленоцитов мышей проводили на приборе «ORIGEN ANALIZER» (IGEN Inc., США) [6] с помощью специфических моно- и поликлональных антител к мышиному ИФН γ (Peprotech, USA).

Оценка пролиферативной активности. Данную работу проводили по включению ^3H -тимидина в нуклеопротеидные фракции клеток. Подсчет радиоактивности производился в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 (Intertech, Франция).

Оценка гиперчувствительности замедленного типа к Т-зависимому антигену (эритроциты барана, ЭБ). Клеточный иммунитет оценивали по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) - величине отека лапы после введения разрешающей дозы ЭБ сенсibilизированным животным. Сенсibilизирующая доза – 0,5 % ЭБ в объеме 0,5 мл. Разрешающую дозу (50 % ЭБ) в объеме 50 мкл вводили под подошвенный апоневроз на 4-е сутки. В контралатеральную лапу вводили среду в том же объеме. Учет реакции проводили через 24 ч по величине местного отека.

Определение уровня первичного гуморального ответа (IgM) на Т-зависимый антиген (ЭБ). Количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке экспериментальных мышей оценивали по числу локальных зон гемолиза в полужидкой среде на 4-е сутки после иммунизации.

Статистическая обработка данных. На **рис. 1-4** представлены средние значения и стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость полученных результатов оценивали с помощью непараметрического критерия Mann-Whitney. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы «Statistica 5.0».

Результаты.

Анализ трансгенных растений моркови на наличие гена интерлейкина-18 человека. На **рис. 1** приведена электрофореграмма продуктов амплификации нуклеотидной последовательности ИЛ-18 человека на геномных ДНК трансгенных растений моркови, полученных от переопыления исходных форм между собой (дорожки 1-8). Согласно данным представленным на **рис. 1**, присутствие продуктов ПЦР, соответствующих по размерам целевому гену ИЛ-18 человека, свидетельствовало о его наличии в геноме анализируемых растений. Отсутствие сигнала на дорожках 7 и 8 не подтверждало трансгенный статус соответствующих растений, которые из дальнейшего анализа исключались.

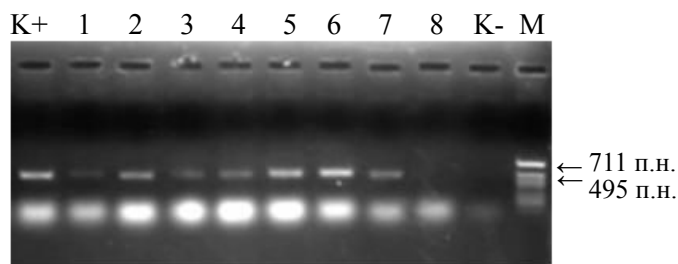


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации нуклеотидной последовательности ИЛ-18 человека на геномных ДНК трансгенных растений моркови: K^+ – положительный контроль (pBi101-IL18); 1-8 – ДНК анализируемых трансгенных растений; K^- – отрицательный контроль (ДНК нетрансгенного растения).

Растения моркови, отобранные на наличие в геноме гена ИЛ-18 человека, были использованы для исследования проявления иммунных реакций в экспериментальных моделях на мышах, так как ранее было показано, что кодируемый химерным геном рекомбинантный ИЛ-18 обладает биологической активностью, характерной для природного белка [7].

Влияние перорального введения трансгенной моркови на пролиферативную активность спленоцитов и тимоцитов мыши. Установлено, что прием в пищу Crt-IL18 или Crt в течение 16 дней не влияет на спонтанную и митоген-индуцированную (КонА, 5 мкг/мл) пролиферативную активность спленоцитов и тимоцитов мышей. В проведенных ранее исследованиях установлено, что рекомбинантный белок ИЛ-18 также не влияет на спонтанную и антиген-специфическую пролиферативную активность МНК ПК человека [7].

Исследование продукции ИФН- γ спленocyтaми мыши.

Функциональные свойства спленocyтoв мышей, получавших CrtIL18, оценивали по способности к продукции иммунорегуляторного цитокина ИФН- γ *in vitro*. Изучали спонтанную и стимулированную КонА продукцию ИФН- γ . Продукцию ИФН- γ измеряли в кондиционной среде клеток после 48 ч культивирования. Показано, что добавление в рацион мышей моркови (Crt и Crt-IL18) статистически значимо стимулирует спонтанную продукцию ИФН- γ спленocyтaми по сравнению с интактной группой. В то же время различий между группой получавшими обычную и трансгенную морковь Crt-IL18, не выявлено, хотя обнаружена тенденция к повышению продукции ИФН- γ в группе мышей, употреблявших Crt-IL18 (**рис. 2**). При оценке стимулированной продукции ИФН- γ (стимуляция КонА) выявлены статистически значимые различия между интактной (обычный рацион) и опытной (Crt-IL18) группами, а также между контрольной (Crt) и опытной (Crt-IL18) группами,

что свидетельствует о влиянии белка ИЛ-18, экспрессирующегося в трансгенной моркови, на продукцию ИФН- γ стимулированными спленоцитами. Таким образом, можно утверждать, что генетически модифицированная морковь (Crt-IL18) при пероральном применении может достоверно стимулировать продукцию ИФН- γ спленоцитами мышей, а следовательно, может способствовать развитию иммунного ответа Th1 типа.

Влияние перорального введения CrtIL18 на формирование клеточного иммунного ответа.

В дальнейших исследованиях мы изучалось влияние CrtIL18, экспрессирующей ген ИЛ-18 человека, который является фактором, стимулирующим медиаторы клеточного иммунного ответа на формирование реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к Т-зависимому антигену – эритроцитам барана. Добавление в пищу мышей CrtIL18 в дозе 1,7- 2,0 г в течение 16 дней достоверно стимулирует формирование клеточного иммунного ответа по сравнению с интактной (стандартный рацион) и контрольной (Crt) группами (рис. 3). Следует отметить, что и обычная морковь (например, экстракт семян и листьев *Daucus carota* L. var. *boissieri* (Apiaceae) способна стимулировать клеточный иммунитет, в частности, употребление обычной моркови приводит к активизации бластогенеза CD4+ Т-лимфоцитов селезенки и брыжеечных лимфоузлов у мышей [8]. В проведенных нами экспериментах обычная морковь не оказывала столь выраженного эффекта на клеточный иммунитет. Видимо, это обусловлено тем, что в работе [8] использовался экстракт, который оказывает более выраженный эффект.

Влияние перорального введения CrtIL18 на формирование гуморального иммунного ответа. При изучении влияния CrtIL18 на формирование гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген (ЭБ) достоверных изменений количества антителообразующих клеток (IgM) не выявлено, при этом употребле-

ление мышами обычной моркови в дозе 2 г в течение 16 дней приводило к увеличению количества антителообразующих клеток, продуцирующих IgM в селезенке в ответ на иммунизацию ЭБ (рис. 4). В работе [8] показано, что у мышей экстракт семян и листьев моркови стимулирует гуморальный иммунитет, в частности IgG, что подтверждает данные, полученные нами при пероральном введении обычной моркови.

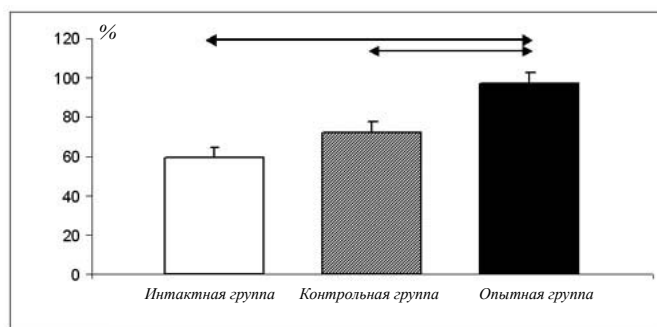


Рис. 3. Влияние перорального применения трансгенной моркови, несущей ген ИЛ-18, на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей:

Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки, $n=12$. Статистически достоверные различия ($p<0,05$, $p<0,005$) получены с использованием непараметрического теста Mann-Whitney.

Заключение

Установлено, что пероральное введение трансгенной моркови, несущей ген ИЛ-18, достоверно стимулирует продукцию ИФН- γ спленоцитами мыши, а также клеточный иммунный ответ, тестируемый по увеличению реакции гиперчувствительности замедленного типа. Эти результаты могут служить еще одним подтверждением перспективности использования трансгенных растений, включающих гены иммунорегуляторных цитокинов, для модуляции иммунных реакций.

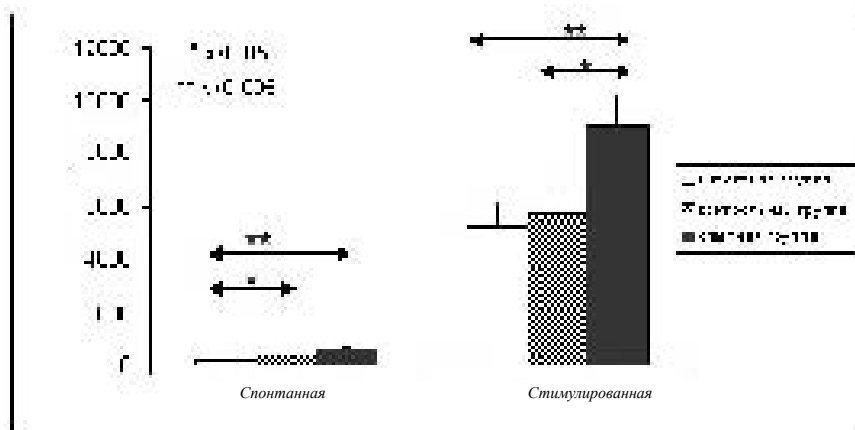


Рис. 2. Влияние перорального применения трансгенной моркови, несущей ген ИЛ-18, на продукцию ИФН- γ спленоцитами мышей (ng/ml):

Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки, $n=18$. Статистически достоверные различия ($p<0,05$, $p<0,005$) получены с использованием непараметрического теста Mann - Whitney.

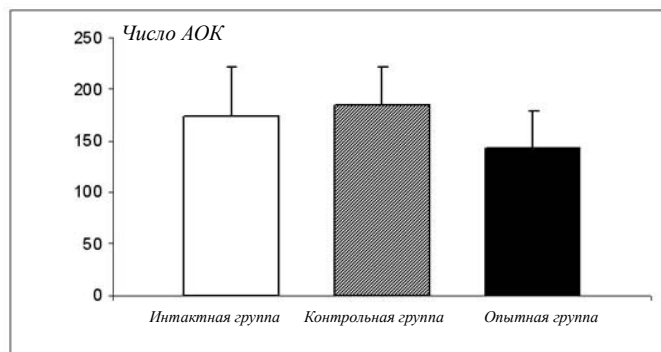


Рис. 4. Влияние перорального применения трансгенной моркови, несущей ген ИЛ-18, на формирование гуморального иммунного ответа у мышей. Число АОК на 10^6 ядросодержащих клеток селезенки. Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки, $n=12$. Статистический анализ проведен с помощью непараметрического теста Манн-Уитни. Статистически значимых различий не обнаружено.

Литература

1. Streatfield S.J., Howard J.A. Plant-based vaccines // Int. J. Parasitol. 2003. 33(5-6): 479-493.
2. Xiang Y., Moss B. IL-18 binding and inhibition of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1999. 96(20): 11537-11542.
3. Дейнеко Е.В., Шмыкова Н.А., Тюкавин Г.Б. и др. Создание трансгенных растений табака и моркови с геном интерлейкина-18 человека // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: Тр. 3-й Междунар. науч. конф. М. 2004. с. 130-131.
4. Deineko E.V., Shmykova N.A., Tyukavin G.B. etc. Creation of transgenic tobacco and carrot with human gene interleukine-18 // Biotechnology in plant cultivation, animal husbandry and veterinary: Proc. of the 3rd Intern. Sci. Conf. M., 2004. p. 130-131.
5. Turchinovich A.A., Deineko E.V., Filipenko M.L., et al. Transgenic tobacco plants producing human interleukin-18 // Dokl. Biochem. Biophys. 2004. 395: 104-107.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М. 1984. 480 с.
7. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular cloning. M. 1984. 480 p.
8. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V., et al. Quantitative analysis of human immunoregulatory cytokines by electrochemiluminescence method // J. of Imm. Meth. 2003. 275. p. 81-88.
9. Yakushenko E.V., Lopatnikova J.A., Khrapov E.A., et al. Biological and specific activity of recombinant human Interleukin-18 // Immunology 2004. Cytokine Network, and Regulatory Cells, signaling, and Apoptosis: Proc. of Intern. Sci. Conf. Medimond. 2004. p. 423-428.
10. Shalaby N.M., Maghraby A.S., el-Hagrassy A.M. Effect of *Daucus carota* var. *boissieri* extracts on immune response of *Schistosoma mansoni* infected mice // Folia Microbiol (Praha). 1999. 44(4): 441-448.

USING OF TRANSGENIC CARROT PLANTS PRODUCING HUMAN INTERLEUKIN-18 FOR STUDY OF MOUSE IMMUNE RESPONSE MODULATION

Elena Vladimirovna Yakushenko¹, Yuliya Anatolievna Lopatnikova¹, Sergei Vitalievich Sennikov¹, Marina Nikolaevna Shatalina², Elena Aleksandrovna Filipenko², Elena Viktorovna Deineko³, Elena Nikolaevna Voronina³, Evgeni Aleksandrovich Khrapov³, Maksim Leonidovich Filipenko³, Vladimir Konstantinovich Shumny², Vladimir Aleksandrovich Kozlov¹

¹SI Research Institute for Clinical Immunology of SB RAMS

14, Yadrintsevskaya street, Novosibirsk, 630099

²Institute of Cytology and Genetics of SB RAS

10, acad. Lavrent'ev avenue, Novosibirsk, 630090

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS

8, acad. Lavrent'ev avenue, Novosibirsk, 630090

The aim of this work was the study of immunogenic properties of genetically modified carrot *Daucus carota* L., expressing human interleukin-18 gene. Studying the biological activity of the transgenic plants demonstrated that per oral usage of the transgenic carrot by mice resulted in activation of the *in vitro* IFN γ production by spleenocytes and activation of delayed-type hypersensitivity reaction *in vivo*.

Key words: transgenic plants, interleukin-18, immunity

Yakushenko E.V. - senior staff scientist of laboratory of immunopoesis regulation, e-mail: e-yakushenko@mail.ru
Lopatnikova Y.A. - scientist of laboratory of laboratory of molecular immunology, e-mail: lopatnikova_j_a@ngs.ru
Sennikov S.V. - head of laboratory of immunopoesis regulation, e-mail: ici@ksn.ru
Shatalina M.N. - postgraduate student of laboratory of plant biological; e-mail: shatalina@gmail.com
Filipenko E.A. - junior scientist of laboratory of plant biological engineering, e-mail: filipenko@bionet.nsc.ru
Deineko E.V. - head of laboratory of plant biological engineering, e-mail: deineko@bionet.ru
Voronina E.N. - junior scientist of group of pharmacogenomics, e-mail: voronina_l@mail.ru
Khrapov E.A. - junior scientist of group of pharmacogenomics, e-mail: khrap_off@ngs.ru
Filipenko M.L. - head of group of pharmacogenomics, e-mail: max@niboch.nsc.ru
Shumny V.K. - director, e-mail: shumny@bionet.nsc.ru
Kozlov V.A. - director, e-mail: niiki01@online.nsk.su