

УДК 575.1:616.1/9

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛОКУСА, УЧАСТВУЮЩЕГО В КОНТРОЛЕ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ, В ПРОКСИМАЛЬНОЙ ЧАСТИ КОМПЛЕКСА *H2* МЫШИ

© 2011 г. М. В. Коротецкая, М. А. Капина, М. М. Авербах, В. В. Евстифеев, А. С. Апт\*, Н. Н. Логунова

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза  
Российской академии медицинских наук, Москва, 107564

Поступила в редакцию и принята к печати 13.07.2010 г.

Один из генетических локусов, принимающих участие в контроле тяжести течения туберкулеза у мышей, находится в том сегменте хромосомы 17, где расположен комплекс *H2* (*MHC* мыши). Данная область имеет размер около 40 млн.п.н. и содержит сотни генов, влияющих на иммунный ответ и на взаимодействия паразит–хозяин, поэтому для идентификации конкретного гена(ов) необходимо сузить район поисков за счет генетической рекомбинации. Нами получена панель рекомбинантных конгенных линий мышей, у которых на генетическую основу мышей C57BL/6, резистентных к туберкулезу, перенесены различные участки области *H2* от генетически восприимчивых к туберкулезу мышей I/St. Сопоставление фенотипов “тяжелое–легкое течение инфекции” с генетической картой аллелей, унаследованных этими мышами от двух родительских линий, позволило локализовать locus, контролирующий течение туберкулеза, в пределах участка 33.305–34.479 млн.п.н. (~ 1.1 млн.п.н.) 17-й хромосомы. Таким образом было установлено, что в нашей экспериментальной системе на течение инфекции не должны влиять аллельные варианты провоспалительного регуляторного цитокина – фактора некроза опухолей. Этот результат подтвержден определением уровня фактора некроза опухолей в легочной ткани зараженных мышей разных линий. Картированный нами locus, контролирующий количественный признак (*QTL* – quantitative trait locus), влияет на несколько важных параметров инфекции: размножение микобактерий в легких, тяжесть легочной патологии и регуляцию ранней фазы воспаления.

**Ключевые слова:** генетический контроль, туберкулез, комплекс *H2*, рекомбинантные линии мышей, картирование *QTL*.

A LOCUS INVOLVED IN TUBERCULOSIS INFECTION CONTROL IN MICE LOCATES IN THE PROXIMAL PART OF THE *H2* COMPLEX, by M. V. Korotetskaya, M. A. Kapina, M. M. Averbakh, V. V. Evstifeev, A. S. Apt\*, N. N. Logunova (Central Institute for Tuberculosis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 107564 Russia; \*e-mail: asapt@aha.ru). One of genetic loci involved in tuberculosis (TB) infection control in mice is located within the segment of Chr. 17 occupied by the *H2* complex, the mouse *MHC*. As far as this region includes approximately 40 Mb and contains hundreds of genes affecting immune responses and host-parasite interactions, narrowing the interval by genetic recombination is pre-requisite for identification of particular gene(s). We have developed a panel of recombinant congenic strains bearing different parts of the *H2* complex from TB-susceptible I/St mice on the genetic background of TB-resistant C57BL/6 mice. By superposing the phenotype “severe vs. mild infectious course” against the chart of alleles inherited by these new strains from the two parental strains, we have mapped a locus involved in TB control within the segment 33.305–34.479 Mb (~1.1 Mb) of the Chr. 17. Such a location indicates that allelic variants of the prominent pro-inflammatory factor TNF do not affect TB course in our experimental system. This result was confirmed by the assessment of the TNF level in the lung tissue of infected mice of different strains. The *QTL* (quantitative trait locus) mapped in our study influences several important parameters of TB infection: multiplication of mycobacteria in the lungs, severity of lung pathology and regulation of the early inflammatory response.

**Keywords:** genetic control, tuberculosis, *H2* complex, recombinant mouse strains, *QTL* mapping.

Роль генетических факторов в контроле восприимчивости к туберкулезу (ТБ) и тяжести течения заболевания в настоящее время не вызывает сомнений, однако идентификация генов и аллелей, опре-

деляющих эти сложные фенотипы, особенно у человека, оказалась очень трудной задачей [1]. В экспериментальных исследованиях по генетике ТБ, почти все из которых выполнены на мышах, удается избежать многогранного влияния факторов внешней среды и различий между штаммами возбудите-

\* Эл. почта: asapt@aha.ru

ля, но при этом продолжает сказываться главная объективная трудность — сложный полигенный характер контроля различных факторов патогенеза и иммунного ответа на инфекцию.

Гены, участвующие в контроле ТБ, идентифицируют с использованием двух принципиально разных генетических методов. Множество работ выполнено на мышах, несущих индуцированные мутации в разных генах, которые приводят к потере функции (нокаут-мутации). С помощью этого подхода получены многочисленные данные о вовлеченных в ответ на ТБ ферментах, цитокинах, хемокинах, низкомолекулярных соединениях и каскадах реакций с участием этих молекул (см. обзоры [2, 3]). Однако следует отметить, что полное “выключение” генов, кодирующих функционально важные молекулы, как правило, приводит к серьезным физиологическим нарушениям. В природных популяциях подобные дефекты быстро элиминируются естественным отбором, поэтому не от них, в первую очередь, зависит реальный уровень наблюдаемого генетического разнообразия. Скорее, его определяют количественные различия в функциональной активности продуктов генов со слабым или умеренным уровнем влияния на сложный фенотип. Такие генетические детерминанты названы локусами количественных признаков (*QTL* — quantitative trait loci).

В нескольких независимых исследованиях с использованием разных инбредных линий мышей проведено генетическое картирование *QTL*, участвующих в контроле восприимчивости и тяжести течения ТБ [4–8]. Поскольку в каждом случае использовали свою пару чувствительных и резистентных линий мышей и разные фенотипы (срок выживания, размножение микобактерий в легких, скорость потери веса после заражения), то не удивительно, что локализация большей части *QTL* в разных работах не совпадала. Тем не менее, в работах группы И. Крамника [5] и нашей группы [6], выполненных на разных родительских линиях мышей, *QTL*, участвующий в контроле ТБ, был локализован на хромосоме 17, в области, соответствующей расположению генов *MHC* — главного комплекса тканевой совместимости мыши. Подобный результат вполне ожидаем, учитывая первостепенную роль генов *MHC* в контроле иммунного ответа. Более того, участие генов *MHC* мыши (*H2*) и человека (*HLA*) в определении уровня восприимчивости к ТБ и иммунного ответа на инфекцию подтверждено в многочисленных работах, выполненных на конгенных по *H2* линиях мышей и на разных популяциях человека [9–14].

При этом многочисленность иммунологически активных и высокополиморфных генов в составе *MHC* сильно затрудняет поиск значимых аллельных вариантов и зависящих от них биохимических меха-

низмов. В области *MHC* вполне могут располагаться несколько генов, влияющих на течение ТБ. Например, в этой области находятся гены, кодирующие высокополиморфные антигенпредставляющие молекулы классов I и II. Эти молекулы задают условия распознавания антигенных пептидов Т-лимфоцитами CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>. В этой же области находится структурный ген *tnfa*, кодирующий иммунорегуляторный и провоспалительный цитокин TNF (фактор некроза опухолей). Поскольку и продуцирующие интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) активированные Т-клетки, и TNF составляют основу протективного иммунного ответа при ТБ [3], аллельные варианты любого из этих генов могут влиять на течение инфекции. В нашей модельной системе неопределенность усугубляется еще и тем, что мыши чувствительной к ТБ линии I/St отличаются от всех других животных несинонимической заменой Arg8His в высококонсервативном лидерном пептиде белка про-TNF. В модельных условиях при трансфекции клеток эта замена приводила к повышенному уровню секреции TNF в культуре *in vitro* [12], поэтому первой задачей нашей работы стало получение новых линий мышей на генетической основе резистентных к ТБ мышей C57BL/6 [15], различные участки области *MHC* которых замещены за счет рекомбинации на соответствующие участки чувствительных к ТБ мышей I/St [16]. Затем на мышцах новых линий мы проанализировали фенотипы, характеризующие течение туберкулезной инфекции, что позволило значительно сузить генетическую область, участвующую в регуляции, и показало существенное влияние на течение болезни проксимальных сегментов *MHC*, но не области гена *tnfa* и дистально расположенных локусов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Животные.** В работе использовали мышей линий C57BL/6YCit (B6) и I/StYCit (I/St) в возрасте 2 месяцев к началу экспериментов всех типов. Линии поддерживали братско-сестринскими скрещиваниями в питомнике Центрального НИИ туберкулеза РАМН в обычных условиях, с доступом к корму и воде *ad libitum*. Для выведения конгенных по области *MHC* линий использовали классическую схему кросс-бэккросс-интеркросс, применяемую с 40-х годов XX-го века [17]. Отбор потомков возвратного скрещивания, несущих область *MHC* от родительской линии I/St, проводили в каждом из 10–14 поколений возвратного скрещивания ( $BC_{N=10-14}$ ), а затем получали гомозиготных мышей братско-сестринским скрещиванием. Выведенные линии поддерживали по общепринятым правилам.

**Генетическое типирование.** Генетические полиморфизмы внутри сегмента хромосомы 17, включа-

Маркер	143	57	133	198	81	175	147	Der4	28	103	21	22	Ea	13	TNFa	47	263	11	49	177	87	152
сМ	5.0	7.6	10.4	16.0	16.4	17.7	18.1		18.44	18.7	18.64	18.67	18.7	19.06	19.06	19.14	21	22	23.2	24.0	33.8	37.7
млн.п.н.	8.63	10.05	24.99	27.79	31.04	31.979	33.305	33.737	34.137	31.320	34.380	34.470	34.479	35.21	35.336	36.35	41.22		44.77	48.02	54.88	65.24
Линии мышей																						
B6.1-9.5A	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	b						
B6.1-9.3	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	b									
B6.1-219	b	j	j	j	j	j	j	b														
B6.1-9.5C				b	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	b						
B6.1-21							b	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j	b	
B6.1-20.15													b	j	j	j	j	j	j	j	b	
B6.1-411														b	j	j	j	j	j	j	b	
B6.1-107																		b	j	j	j	j

**Рис. 1.** Генетическая карта области комплекса *H2* новых конгенных линий мышей. Участки хромосомы, перенесенные от мышей I/St ( $H2^I$ ) на генетическую основу B6 ( $H2^b$ ), выделены серым (j – аллели гаплотипа мышей I/St, b – аллели гаплотипа мышей C57BL/6). В верхней части приведены маркеры Mit (микросателлитные маркеры, идентифицированные в Massachusetts Institute of Technology и опубликованные в Mouse Genome Database [www-genome.wi.mit.edu](http://www-genome.wi.mit.edu)), геномные позиции маркеров обозначены в сантиморганах (сМ) и миллионах пар нуклеотидов (млн.п.н.).

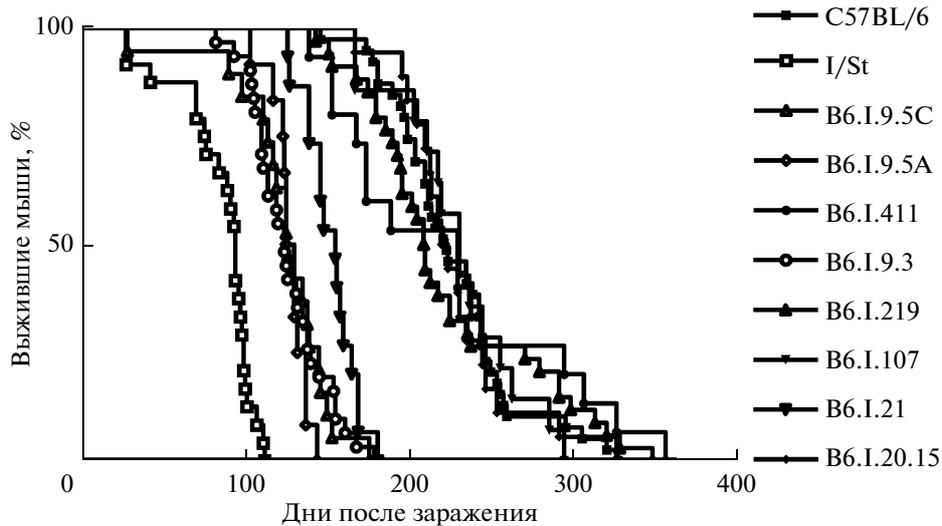
ющего комплекс *H2* и прилежащие области, определяли методом ПЦР для микросателлитных маркеров (SSLP). Праймеры для определения SSLP брали из открытой базы данных Джексоновской лаборатории (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, [www.jax.org](http://www.jax.org)). Проводили пробное типирование мышей B6 и I/St, для последующей работы отбирали те маркеры, которые различались по размеру получаемых при электрофорезе в 4 или 6%-ной агарозе ПЦР-продуктов. На рис. 1 приведены 20 информативных маркеров, использованных в работе, и их расположение на хромосоме 17. Аллельные варианты гена *tnfa* определяли методом ПДРФ продуктов ПЦР: аллели у мышей B6 и I/St отличаются заменой Arg8His (G > A), что приводит к появлению сайта для рестрикционной эндонуклеазы DraIII (NEB). ПЦР проводили с праймерами: *tnfa*F: 5'-CATCTCCCTCCAGAAAAGACACC-3' и *tnfa*R: 5'-CATCTTTCCAGATCTCTCCACG-3'. Аллельные варианты гена *H2-Ea* определяли по появлению молекулы H2-IE на поверхности клеток селезенки, поскольку у мышей B6 (гаплотип  $H2^b$ ), в отличие от I/St (гаплотип  $H2^I$ ), не экспрессируется молекула H2-IE. Клетки окрашивали моноклональными антителами 14-4-4S ("BDBioscience") и анализировали на проточном цитофлуориметре ("FACSCalibur").

**Заражение и параметры инфекции.** Животных заражали *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Pasteur) в дозе 200–600 КОЕ на мышью в аэрозольной камере ("Glas-Col", США), как подробно описано ранее [18]. Для определения количества микобактерий в органах стерильно выделяли легкие и селезенки, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, готовили серийные десятикратные разведения го-

могенатов органов и высевали на чашки Петри с агаром Дюбо ("Difco") по 50 мкл на чашку. Количество колоний подсчитывали через 21 день инкубации при 37°C. Животных взвешивали 1 раз в неделю, начиная с пятой недели после заражения, гибель животных регистрировали ежедневно.

**Продукция цитокинов.** Для определения общего количества TNF и интерлейкина-6 (IL-6) в ткани легкого целые органы, взятые индивидуально от трех животных каждой линии, гомогенизировали в 2 мл стерильного физиологического раствора и замораживали при –70°C до постановки реакции. После размораживания дебрис удаляли центрифугированием при 800 g и определяли содержание цитокинов в надосадочной жидкости методом ELISA с использованием коммерческих наборов OptEIA mouse TNF- $\alpha$  Set и OptEIA mouse IL-6 Set ("PharMingen-BD", США), следуя рекомендациям фирмы-изготовителя. Для определения секреции TNF клетками легкого получали суспензии клеток легкого по методу, описанному ранее [19]. Затем  $1.5 \times 10^6$  клеток культивировали в течение 48 ч в 24-луночных планшетах в присутствии 10 мкг/мл растворимой фракции обработанных ультразвуком микобактерий, и определяли количество TNF в культуральной жидкости тем же методом.

**Гистологические исследования.** Для изучения патологических изменений в легких ткань замораживали в режиме температурного градиента от –60 до –20°C в течение 1 ч в электронном криотоме ("ThermoShandon", Великобритания). Получали срезы толщиной 8 мкм, высушивали их на воздухе, фиксировали в метаноле и окрашивали гематоксилином и эозином. Часть срезов окрашивали мечеными мо-



**Рис. 2.** Кривые выживания мышей после заражения *Mycobacterium tuberculosis*. Конгенные рекомбинантные линии B6.I.411, B6.I.219, B6.I.107, B6.I.20.15 по выживаемости не отличаются от резистентной родительской линии B6, в то время как линии B6.I.9.5C, B6.I.9.5A, B6.I.9.3 и B6.I.21 значительно чувствительнее к инфекции.

ноклональными антителами к поверхностным маркерам CD19. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов проводили согласно рекомендации фирмы-производителя. Для визуализации структуры легочной ткани препараты докрасивали гематоксилином, после чего срезы заключали под покровные стекла в бальзаме HyperMount.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

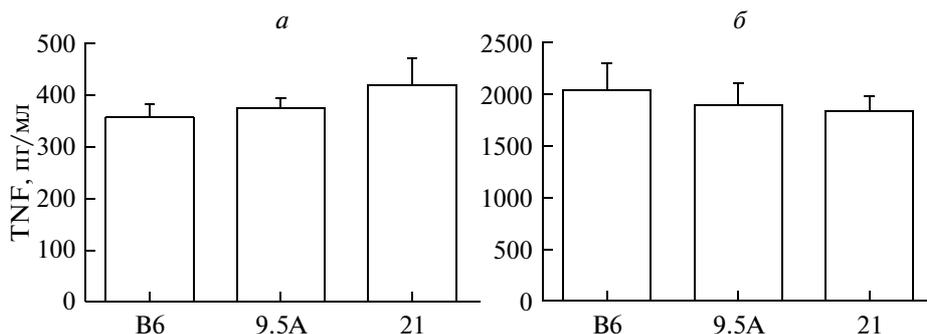
### *Аллельные варианты TNF не влияют на тяжесть течения туберкулеза*

На рис. 1 показан состав аллелей области *MHC* в новых рекомбинантных линиях мышей, полученных на основе линии B6 — панели линий B6.I. Из генетической карты следует, что в нескольких случаях рекомбинацией удалось отделить аллели гена *tnfa*, происходящие от линий B6 и I/St, от дистальных и проксимальных участков хромосомы, имеющих реципрокное происхождение. Так, в линии B6.I-411 остался исходный аллель *tnfb* линии B6, при том что фланкирующий справа участок длиной около 6 млн.п.н. заменен донорским сегментом от линии I/St, тогда как у генетически близкой линии B6.I-20.15 рекомбинация прошла левее, и на основу B6 перенесен и аллель *tnfa*<sup>1</sup>. Сходная ситуация возникла при рекомбинациях, приведших к появлению линий B6.I-9.5A и B6.I-9.3. С другой стороны, наличие неперекрывающихся участков рекомбинации у линий B6.I-219 и линий B6.I-20.15 и B6.I-411 позволило оценить, насколько важен для определения фенотипов чувствительности и резистентности срединный участок *MHC*, включающий гены класса II

*H2-IA*. В первой серии экспериментов фенотипом сравнения служил наиболее интегральный показатель — срок выживания животных после заражения.

На рис. 2 представлены кривые выживания мышей исходных линий B6 и I/St и вновь выведенных конгенных линий, рекомбинантных по *H2*. Отметим два общих обстоятельства. Во-первых, перенос некоторых участков *MHC* от чувствительных к ТБ мышей I/St на “резистентную” основу B6 привел к изменению фенотипа, тогда как перенос других участков не имел таких последствий, т.е., удалось значительно сузить функционально важный сегмент генетического материала. Во-вторых, перенос ни одного из участков *MHC* не привел к проявлению фенотипа чувствительности на уровне донорской линии I/St, подтверждая тем самым, что на восприимчивость к ТБ влияют как гены области *MHC*, так и гены из других участков генома.

Более подробный анализ позволяет сделать более детальные выводы. В первую очередь мы сравнили вклад аллелей гена *tnfa* и других сегментов изучаемой области. Оказалось, что обе генетически близкие линии — B6.I-20.15 и B6.I-411 — не уступают по резистентности линии B6, при том что первая линия приобрела аллель *tnfa*<sup>1</sup> от чувствительной линии I/St, а вторая нет. Обе линии с заменами участков в дистальной части *MHC*, B6.I-9.3 и B6.I-9.5C, более чувствительны к инфекции по сравнению с исходной линией B6, хотя у первой линии остался аллель *tnfb* линии B6, а вторая получила в результате рекомбинации аллель *tnfa*<sup>1</sup> от чувствительной линии I/St (рис. 1). Эти данные говорят в пользу того, что среди генов, расположенных в области *MHC*, основная роль



**Рис. 3.** Мыши конгенных линий, несущие разные аллели гена *tnfa*, не отличаются от родительской линии В6 и между собой по продукции TNF- $\alpha$  клетками легкого. Показано количество TNF в гомогенатах легких (а) и секретируемого цитокина в культуральной жидкости (б).

в определении уровня восприимчивости и тяжести течения ТБ не принадлежит продукту гена *tnfa*. Об этом же свидетельствуют и результаты непосредственной оценки продукции TNF- $\alpha$  клетками легкого. Сравнение резистентной исходной линии В6 с двумя чувствительными конгенными рекомбинантными линиями В6.1-9.5А и В6.1-21 показало, что они не отличаются ни по количеству TNF- $\alpha$  в легочной ткани (определение количества цитокина в гомогенатах легкого, рис. 3а), ни по способности клеток легкого секретировать TNF- $\alpha$  в ответ на стимуляцию антигенами микобактерий (определение цитокина в надосадочной жидкости клеточных культур, рис. 3б).

Следует принять во внимание, что часть резистентных линий приобрела от линии I/St участки генома, расположенные левее генов второго класса (линия В6.1-219), а часть – правее этих генов (В6.1-20.15 и В6.1-411). При этом все чувствительные линии несут средний сегмент *MHC* от донорской линии I/St (рис. 1). Сравнение областей с аллелями гаплотипа *H2<sup>d</sup>* между конгенными чувствительными линиями позволяет сузить искомую область до сравнительно небольшого интервала между маркером D17Mit147 (33.305 млн.п.н.) и геном *Ea* (34.479 млн.п.н.). Следовательно, расположенные в области *MHC* гены (или ген), влияющие на течение туберкулезной инфекции, находятся проксимальнее гена *tnfa*.

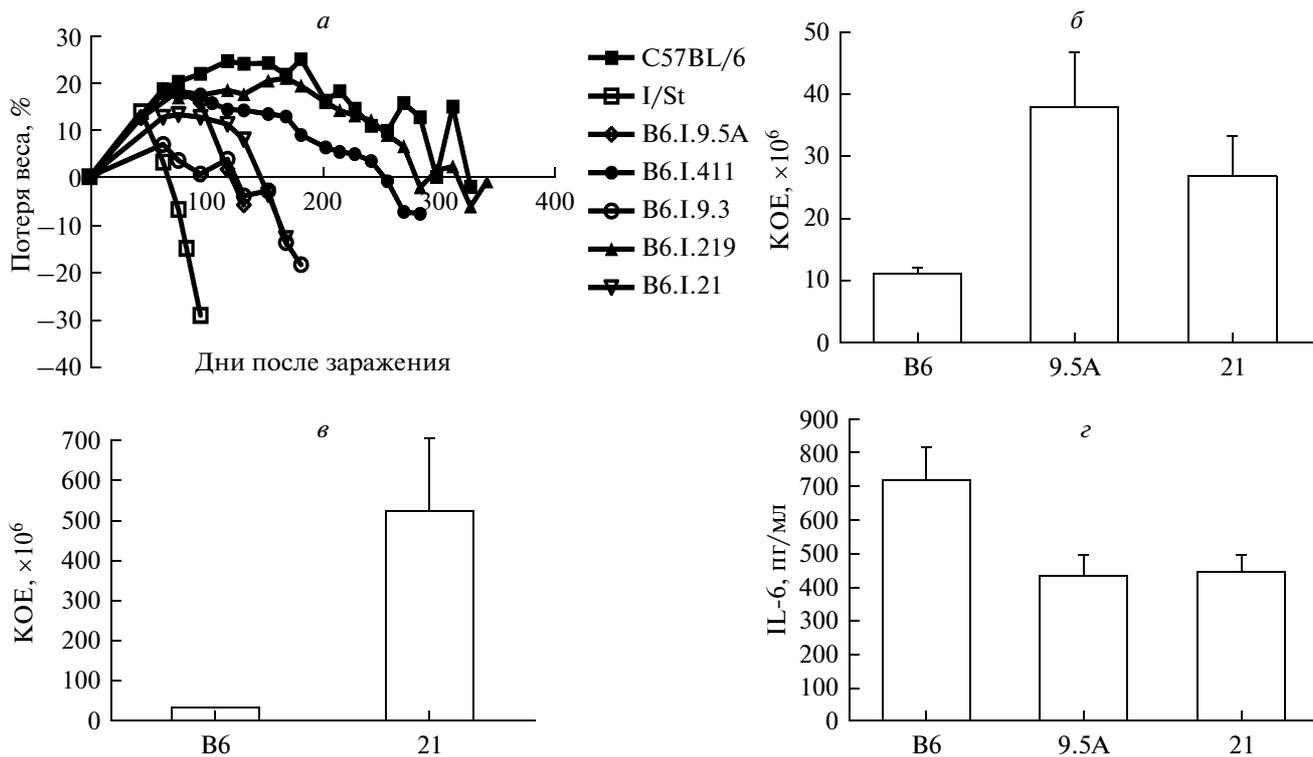
#### ***QTL* области *MHC* влияет на несколько параметров инфекции**

Вопрос о связях между разными фенотипами, характеризующими течение ТБ, и общим или раздельном генетическом контроле этих фенотипов возник довольно давно, но до сих пор не получил убедительного разрешения. В некоторых исследованиях такие признаки, как уровень размножения микобактерий в органах, степень поражения легочной ткани, ха-

рактер образования гранулем и срок жизни животных после заражения, оказались под контролем разных несцепленных *QTL*, даже если работу выполняли с использованием одной пары родительских линий мышей [7, 8, 20]. В этой связи интерес представляли параметры инфекции, на которые влияют локус(ы) проксимальной области *MHC*, картированные в данной работе. Для сравнения с резистентной родительской линией В6 были выбраны конгенные линии В6.1-9.5А и В6.1-21. Мыши этих линий явно отличаются по срокам гибели от линии В6 и несут унаследованный от чувствительных мышей I/St проксимальный участок *MHC*, влияние которого на выживание не вызывает сомнений (рис. 1, рис. 2).

На этом этапе мы сравнили проявление нескольких “классических” фенотипов. Во-первых, оценили динамику развития кахекии после заражения мышей родительской линии В6 и новых конгенных линий с учетом того, что послужившая донором *QTL* линия I/St отличается большой скоростью потери веса при ТБ [16]. Как показано на рис. 4а, мыши обеих чувствительных конгенных линий теряли вес быстрее, чем резистентные мыши В6. Во-вторых, определили уровень размножения микобактерий в легких мышей трех линий. Оказалось, что и по этому параметру мыши конгенных линий достоверно отличаются от мышей В6: на протяжении длительного времени они лучше контролировали размножение микобактерий в легких (рис. 4б, в).

Принципиальную роль в патогенезе ТБ и тяжести течения заболевания играет регуляция воспалительных реакций в легочной ткани. Большинство исследователей разделяют точку зрения, согласно которой на ранних стадиях инфекции воспалительные реакции, ведущие к образованию специфических гранулем, играют защитную роль, ограничивая диссеминацию микобактерий, тогда как неконтролируемое воспаление на поздних стадиях мешает дыхательной функции и опасно для хозяина [2, 3].



**Рис. 4.** Рекомбинантные линии B6.I.9.5A и B6.I.21 с перенесенным участком 33.3–34.5 млн.п.н. гаплотипа  $H2^j$  проявляют множественные фенотипические отличия от линии B6. Быстрая потеря веса после заражения по сравнению с другими линиями (а); выше уровень размножения микобактерий через 50 (б) и 150 (в) дней после заражения; ниже уровень продукции IL-6 клетками легкого через 30 дней после заражения (г).

Столкнувшись с тем, что мыши конгенных линий не отличаются от мышей B6 по продукции в легких провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  (рис. 3) и IFN- $\gamma$  (данные не приведены), мы определили уровень продукции еще одного фактора – IL-6, играющего важную роль в индукции ранних воспалительных реакций при ТБ [3]. Как показано на рис. 4г, у мышей чувствительных конгенных линий продукция IL-6 в легких через месяц после заражения (разгар реакций образования гранулем) составляла только около половины от уровня у мышей B6.

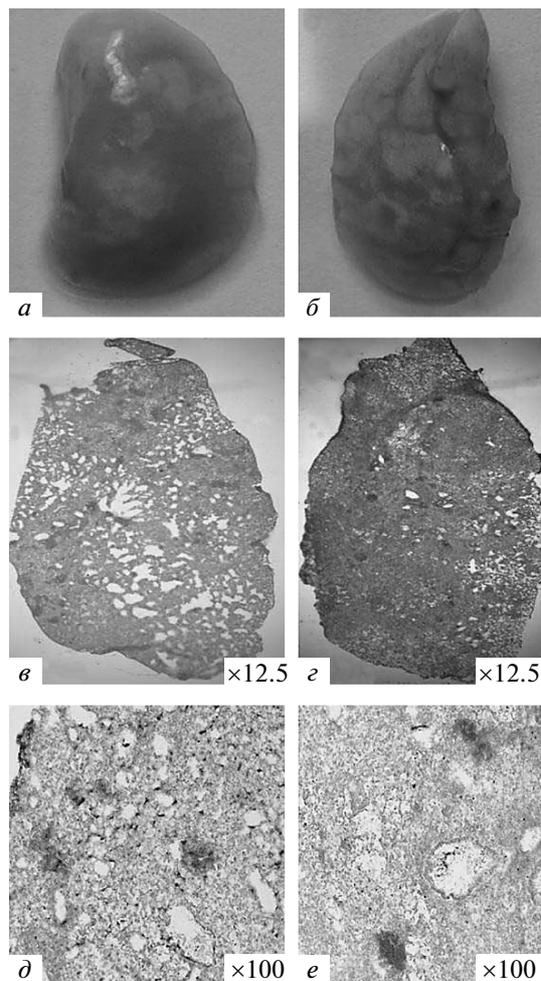
Наконец, мы изучили морфологически и гистологически характер воспалительных изменений в легком зараженных мышей на поздних стадиях болезни. Оказалось, что перенос на генетическую основу B6 участка генома мышей I/St, включающего центральную область *MHC*, приводит к принципиальным изменениям в развитии легочной патологии. Во-первых, у мышей конгенной линии B6.I-21 площадь поражения легких и размеры воспалительных очагов значительно больше, чем у мышей B6 (рис. 5а, б). Во-вторых, в отличие от мышей B6, у мышей B6.I-21 развивается диффузная туберкулезная пневмония со слиянием отдельных очагов воспаления (рис. 5в, г). В-третьих, у более чувствитель-

ных мышей гораздо ярче выражено образование В-клеточных фолликулов в легких: они плотнее и содержат больше В-клеток (рис. 5д, е) – реакция, характерная для мышей чувствительной родительской линии I/St [18].

Таким образом, генетические детерминанты в области *MHC* участвуют в контроле разнообразных параметров, характеризующих туберкулезную инфекцию. Безусловно, идентификация конкретных генов потребует дальнейшего сужения хромосомных сегментов, учитывая многочисленность иммунологически активных генов-кандидатов в данной области.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде работ, проведенных на рекомбинантных по комплексу *H2* мышах, показано, что аллельные варианты *H2* влияют как на чувствительность к туберкулезной инфекции, так и на регуляцию иммунного ответа на антигены микобактерий [9–11, 21]. Вместе с тем, до сегодняшнего дня не установлены гены комплекса *H2*, определяющие чувствительность или резистентность к ТБ. В представленной работе перенос различных участков хромосомы 17 от чувствительной линии мышей I/St на резистент-



**Рис. 5.** Патологические изменения в легких у мышей В6.1.21 выражены сильнее, чем у родительской линии В6. Легкие анализировали на 140 день после заражения. *а, в, д* – Резистентная линия В6; *б, г, е* – чувствительная линия В6.1.21. *а, б* – Макроскопический вид очагов; *в, г* – гистологическая оценка уровня туберкулезной пневмонии и степени слияния очагов; *д, е* – различия в плотности В-клеточных фолликулов. См. описание в тексте.

ную генетическую основу В6 позволил более точно определить область *H2*, участвующую в контроле чувствительности к ТБ. С помощью рекомбинантных конгенных линий изучен сегмент хромосомы 8.6–65.2 млн.п.н., и область поиска удалось сократить до интервала 33.3–34.5 проксимальнее гена *Eα*. Таким образом, из числа генов-кандидатов мы можем исключить два из трех классических генов класса I (*H2-D* и *H2-L*) и один из двух классических генов класса II (*H2-IE*), а также неклассические гены класса Ib – *H2-Q*, *T* и *M*, расположенные дистальнее гена *H2-IEα* [22]. Кроме того, наши данные указывают на то, что различия аллелей гена *TNF* у мышей В6 и I/St, не являются основной причиной тяжелого течения инфекции у мышей I/St: рекомбинантные

линии, несущие генетическую область 33.3–34.5 млн.п.н. от гаплотипа *H2<sup>J</sup>*, чувствительны к туберкулезной инфекции независимо от аллельных вариантов гена *tnfα*.

Несмотря на небольшие размеры определенной нами области (чуть более 1 млн.п.н.), она содержит более 40 генов, и многие из них – по характеру кодируемых продуктов – могут участвовать во взаимодействии организма-хозяина с *M. tuberculosis*. Прежде всего, здесь локализованы классические гены *H2-K* класса I и *H2-IA* класса II, продукты которых презентруют антигенные пептиды, соответственно, Т-клеткам  $CD8^+$  и  $CD4^+$  при развитии адаптивного иммунного ответа. Роль Т-клеток  $CD8^+$  при ТБ носит, вероятно, второстепенный характер [3], так что ген, кодирующий молекулу *H2-K*, а также локализованные в этой области генетические детерминанты вспомогательных белков *TAP1*, *TAP2* и протеасомных субъединиц *Psmb8* и *Psmb9*, участвующих в процессинге и транспорте антигенных пептидов при ответе клеток  $CD8^+$ , вряд ли можно отнести к наиболее вероятным кандидатам. Напротив, ответ Т-клеток  $CD4^+$  – основной фактор защитного иммунитета при туберкулезной инфекции, поэтому гены, кодирующие цепи  $A\alpha$  и  $A\beta$  молекулы *H2-IA*, вполне могут участвовать в определении фенотипа мышей новых конгенных линий. Сложно судить о возможной роли находящихся в той же области неклассических генов класса II *H2-DO* и *H2-DM*. Хотя их продукты участвуют в обмене антигенными пептидами с классическими молекулами класса II, они имеют очень низкий уровень полиморфизма, поэтому маловероятно, что они детерминируют генетические различия между линиями.

Исследуемая генетическая область богата генами, которые экспрессируются в нейтрофилах и макрофагах, а *M. tuberculosis* относится к внутриклеточным паразитам, интенсивно поглощаемым фагоцитами, которые играют ключевую роль в патогенезе заболевания [23–25]. В частности, ген *myo1f* кодирует один из миозинов класса 1, предположительно участвующего в миграции клеток, фагоцитозе, эндоцитозе и фолдинге молекул актина. Показано, что “нокаут” этого гена приводит к изменению адгезии нейтрофилов и к повышению чувствительности мышей к другому внутриклеточному патогену – *Listeria monocytogenes* [26].

Важную роль в защите от ТБ и регуляции иммунного ответа играет гибель фагоцитов и Т-клеток вследствие апоптоза [27]. В изучаемой области локализован ген *daxx* (Fas death domain-associated protein), продукт которого принимает участие в активации апоптоза, в частности индуцированного трансформирующим фактором роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [28, 29], и рассматривается в качестве гена, ответственного за

устойчивость мышей к африканскому трипанозомозу [30]. Интересно, что нейтрофилы чувствительных к ТБ мышей I/St гораздо устойчивее к апоптозу, чем нейтрофилы резистентных к ТБ мышей A/Sn, и эта особенность может иметь прямое отношение к тяжести течения заболевания [24].

В образование гранул могут быть вовлечены белки, формирующие и модулирующие внеклеточный матрикс, например металлопротеиназы. С этой точки зрения интересен ген *Adamts10*, кодирующий белок с дезинтегриновым и металлопротеазным доменами и мотивом типа 1 тромбоспондина. Белок ADAMTS представляет собой секретируемую протеазу, он принадлежит к семейству белков ADAM-ADAMTS, участвующих в формировании внеклеточного матрикса, процесса, важного для клеточной миграции, развития воспаления и иммунного ответа [31, 32].

Сложность и недостаточная изученность взаимодействия *M. tuberculosis* с клетками хозяина не позволяет исключить влияние многих генов разных классов на этот процесс. В последнее десятилетие в том сегменте хромосомы 17 мыши, где расположен комплекс *H2*, идентифицировано множество генов с разнообразными и ранее не предполагавшимися функциями. Таким образом, и упомянутые выше гены, и некоторые другие, локализованные в области 33.305–34.479 млн.п.н. хромосомы 17, могут рассматриваться как потенциальные гены, определяющие уровень восприимчивости и тяжести течения инфекции, вызванной *M. tuberculosis*.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИИ (R01-AI078864) и Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-00159).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schurr E., Kramnik I. 2008. Genetic control of host susceptibility to tuberculosis. In: *Handbook of Tuberculosis. Immunology and Cell Biology*. Eds Kaufmann S.H.E., Britton W.J. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 295–336.
- Russell D.G. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 39–47.
- North R.J., Jung Y.-J. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 599–623.
- Lavebratt C., Apt A.S., Nikonenko B.V., Schalling M., Schurr E. 1999. Severity of tuberculosis in mice is linked to distal chromosome 3 and proximal chromosome 9. *J. Inf. Dis.* **180**, 150–155.
- Yan B.-S., Kirbi A., Shebzukhov Y.V., Dali M.J., Kramnik I. 2006. Genetic architecture of tuberculosis resistance in a mouse model of infection. *Genes Immun.* **7**, 201–210.
- Sanchez F., Radaeva T.V., Nikonenko B.V., Persson A., Sengul S., Schalling M., Schurr E., Apt A.S., Lavebratt C. 2003. Multigenic control of disease severity after *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect. Immun.* **71**, 126–131.
- Mitsos L.M., Cardon L.R., Fortin A., Ryan L., LaCourse R., North R., Gros P. 2000. Genetic control of susceptibility to infection with *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Genes Immun.* **1**, 467–477.
- Mitsos L.M., Cardon L.R., Ryan L., LaCourse R., North R.J., Gros P. 2003. Susceptibility to tuberculosis: a locus on mouse chromosome 19 (Trl-4) regulates *Mycobacterium tuberculosis* replication in the lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 6610–6615.
- Apt A.S., Nickonenko B.V., Avdeenko V.G., Kramnik I.B., Moroz A.M., Skamene E. 1993. Distinct *H-2* complex control of mortality and immune responses to tuberculosis infection in virgin and BCG-vaccinated mice. *Clin. Exp. Immunol.* **94**, 322–331.
- Mischenko V.V., Kapina M.A., Eruslanov E.B., Kondratieva E.V., Lyadova I.V., Young D.B., Apt A.S. 2004. Mycobacterial dissemination and cellular responses after 1-lobe restricted tuberculosis infection of genetically susceptible and resistant mice. *J. Infect. Dis.* **190**, 2137–2145.
- Pichugin A.V., Petrovskaya S.N., Apt A.S. 2006. *H2* complex controls CD4/CD8 ratio, recurrent responsiveness to repeated stimulations, and resistance to activation-induced apoptosis during T cell response to mycobacterial antigens. *J. Leuk. Biol.* **79**, 739–746.
- Kahler A.K., Persson A.S., Sanchez F., Kallstrom H., Apt A.S., Schurr E., Lavebratt C. 2005. A new coding mutation in the Tnf-alpha leader sequence in tuberculosis-sensitive I/St mice causes higher secretion levels of soluble TNF-alpha. *Genes Immun.* **6**, 620–677.
- Mehra N.K. 1990. Role of HLA linked factors in governing susceptibility to leprosy and tuberculosis. *Tropical Med. Parasitol.* **41**, 352–354.
- Goldfeld A., Delgado J.C., Thim S., Bozon M.V., Ugialoro A.M., Turbay D., Cohen C., Yunis E.J. 1998. Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *J.A.M.A.* **279**, 226–228.
- Medina E., North R.J. 1998. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and *Nramp1* genotype. *Immunology.* **93**, 270–274.
- Nikonenko B.V., Averbakh M.M., Jr., Lavebratt C., Schurr E., Apt A.S. 2000. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *Tubercle Lung Dis.* **80**, 15–25.
- Snell G.D. 1948. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* **49**, 87–108.
- Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V., Majorov K.B., Apt A. 2008. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. *Tuberculosis (Edinburgh).* **88**, 576–585.
- Apt A.S., Kramnik I.B., Moroz A.M. 1991. Regulation of T cell proliferative responses by cells from solid lung tissue of *M. tuberculosis*-infected mice. *Immunology.* **73**, 173–179.
- Lyadova I.V., Tsiganov E.N., Kapina M.A., Shepelkova G.S., Sosunov V.V., Radaeva T.V., Majorov K.V., Shmitova N.S., van den Ham H.-J., Ganusov V.V., de Boer R.J., Ra-

- cine R., Winslow G.M. 2010. In mice, tuberculosis progression is associated with intensive inflammatory response and the accumulation of Gr-1<sup>dim</sup> cells in the lungs. *PLoS ONE*. **5**, e10469.
21. Kamath A.B., Alt J., Debbabi H., Taylor C., Behar S.M. 2004. The major histocompatibility complex affects T-cell recognition of mycobacterial antigens but not resistance to *Mycobacterium tuberculosis* in C3H mice. *Infect. Immun.* **72**, 6790–6798.
  22. [http:// www.imgt/org](http://www.imgt.org)
  23. Majorov K.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Eruslanov E.B., Rubakova E.I., Orlova M.O., Mischenko V.V., Apt A.S. 2003. Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat virulent *Mycobacterium tuberculosis*: phenotypes expressed in lung and extrapulmonary macrophages. *Infect. Immun.* **71**, 697–707.
  24. Eruslanov E.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Majorov K.B., Scheglov I.V., Orlova M.O., Apt A.S. 2005. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect. Immun.* **73**, 1744–1753.
  25. Апт А.С., Кондратьева Т.К. 2008. Туберкулез: патогенез, иммунный ответ и генетика хозяина. *Молекуляр. биология*. **42**, 880–890.
  26. Kim S.V., Mehal W.Z., Dong X., Heinrich V., Pypaert M., Mellman I., Dembo M., Mooseker M.S., Wu D., Flavell R.A. 2006. Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by Myo1f. *Science*. **314**, 136–139.
  27. Пичугин А.В., Апт А.С. 2005. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции. *Проблемы туберкулеза*. **3**, 3–7.
  28. Yang X., Khosravi-Far R., Chang H.Y., Baltimore D. 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. **89**, 1067–1076.
  29. Perlman R., Schiemann W.P., Brooks M.W., Lodish H.F., Weinberg R.A. 2001. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 708–714.
  30. Fisher P., Hedeler C., Wolstencroft K., Hulme H., Noyes H., Kemp S., Stevens R., Brass A. 2007. A systematic strategy for large-scale analysis of genotype phenotype correlations: identification of candidate genes involved in African trypanosomiasis. *Nucl. Acids Res.* **35**, 5625–5633.
  31. Huovila A.P., Turner A.J., Pelto-Huikko M., Karkkainen I., Ortiz R.M. 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 413–422.
  32. Yamamoto S., Higuchi Y., Yoshiyama K., Shimizu E., Kataoka M., Hijiya N., Matsuura K. 1999. ADAM family proteins in the immune system. *Immunol. Today*. **20**, 78–84.