

І.М. Гордієнко
 О.В. Журавель
 Л.М. Ковалевська
 М.О. Солдаткіна
 Л.М. Шлапацька
 В.М. Холоднюк
 С.П. Сидоренко
 П.В. Погрібний

Інститут експериментальної
 патології, онкології
 і радіобіології
 ім. Р.Є. Кавецького
 НАН України, Київ, Україна

Ключові слова:

бета-дефенсин-2 людини,
 транскрипційні фактори,
 лінії клітин людини
 В-лімфоцитарного походження,
 BCR, CD40, CD150.

ВПЛИВ БЕТА-ДЕФЕНСИНУ-2 ЛЮДИНИ НА ЕКСПРЕСІЮ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ У ЗЛОЯКІСНО ТРАНСФОРМОВАНИХ ЛІНІЯХ КЛІТИН В-ЛІМФОЦИТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Мета: дослідити вплив рекомбінантного бета-дефенсину-2 людини (hBD-2) на рівень експресії мРНК транскрипційних факторів (ТФ) у злоякісно трансформованих лініях клітин В-лімфоцитарного походження, а також з'ясувати можливість регуляції експресії hBD-2 через поверхневі рецептори цих клітин. **Об'єкт і методи:** в експериментах *in vitro* були використані злоякісно трансформовані лінії клітин В-лімфоцитарного походження, В-лімфобластоїдні лінії клітин та hBD-2. Визначення рівня експресії мРНК ТФ та hBD-2 проводили за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу. **Результати:** у цій роботі вперше показано вплив hBD-2 на рівень експресії мРНК ключових ТФ, необхідних для диференціювання В-лімфоцитів, причому ефект hBD-2 залежав від вихідного профілю експресії ТФ у клітинних лініях. Виявлено, що в лінії клітин VJAB бета-дефенсин-2 виступає негативним регулятором ТФ IRF4 та VLIMP-1, які функціонують як основні координатори термінальної стадії диференціювання В-лімфоцитів — стадії плазматичних клітин. У лінії клітин Raji внаслідок дії hBD-2 відмічено зниження експресії лише одного ТФ — IRF4, в той час як у В-лімфобластоїдній лінії клітин T5-1 при дії hBD-2 рівень ТФ не змінювався. Виявлено, що в В-лімфоцитах рівень експресії hBD-2 може регулюватися із залученням поверхневих рецепторів: чи то негативно через BCR в клітинах Raji, чи то позитивно через CD40 рецептор у клітинах T5-1, але не залежить від сигналювання через CD150. **Висновок:** показано потенційну роль hBD-2 в регуляції експресії мРНК ТФ у злоякісно трансформованих лініях клітин В-лімфоцитарного походження, а також можливість регуляції експресії hBD-2 через поверхневі рецептори цих клітин.

ВСТУП

Диференціювання В-лімфоцитів до термінально зрілих плазматичних клітин є багата стадійним процесом, який інтегрує різноманітні сигнали від факторів мікрооточення й антигенів [1]. Проходження В-клітиною будь-якої стадії диференціювання не є запрограмованим або автоматичним. На кожному етапі диференціювання, залежно від комбінації вхідних сигналів, В-клітина опиняється перед вибором подальших шляхів: проліферації, диференціювання або апоптозу. Така інтеграція вхідних сигналів координується мережею транскрипційних факторів (ТФ) [1, 2]. Залежно від стадії диференціювання нормальних В-лімфоцитів експресія та функції ТФ значно відрізняються. Наприклад, на стадії пре-В-лімфоцитів члени родини інтерферон-регулюючих факторів (interferon regulatory factor — IRF) — IRF4 та IRF8 — чинять взаємодоповнюючий вплив на процеси дозрівання В-лімфоцитів, індукуючи реаранжування генів

легких ланцюгів імуноглобулінів [3]. Під час антиген-залежного диференціювання В-лімфоцитів у зародковому центрі рівень експресії IRF4 та IRF8, як і їх функції, є протилежними. На стадії наївних В-лімфоцитів рівень експресії IRF4 низький, але швидко зростає після індукції сигналу через В-клітинний рецептор (B-cell receptor — BCR) і досягає максимуму на стадії плазмобластів, тим самим активуючи експресію VLIMP-1 [4, 5]. Навпаки, рівень IRF8 є максимальним у центробластах і знижується в центроцитах [5]. ТФ, які функціонують на кожному з етапів диференціювання В-лімфоцитів, перебувають у взаємозалежній регуляції через позитивні та негативні зворотні зв'язки. Так, IRF8/PU.1 виступають активаторами експресії ключового регулятора формування зародкового центру BCL6, який, у свою чергу, пригнічує транскрипцію VLIMP-1 і IRF4 — майстер-регуляторів плазматичних клітин [6, 7]. Генетичні аномалії, що призводять до злоякісної трансформації В-лімфоцитів, сприяють порушенню експресії низки ТФ, зумовлюючи зу-

пинку диференціювання і навіть дедиференціювання та прогресування клонів злоякісно трансформованих В-лімфоцитів [8]. Нерегульована експресія BCL6 та PAX5 спостерігається при дифузній великоклітинній В-клітинній лімфомі з фенотипом зародкового центру, IRF4 — при множинній мієломі, інактивація гена *PRDM1*, що кодує BLIMP-1, — при дифузній великоклітинній В-клітинній лімфомі з активованим фенотипом [9]. Механізми регуляції експресії та активності ТФ на різних стадіях диференціювання в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах залишаються до кінця не з'ясованими. На сьогодні пошук факторів, які беруть участь у регуляції експресії та активності ТФ, що контролюють процеси проліферації, диференціювання та апоптозу, є актуальним напрямком в експериментальній онкології.

Дефенсини людини належать до родини антимікробних пептидів, що є важливою складовою системи вродженого імунітету людини. Це молекули з молекулярною масою від 3,5 до 6,5 кДа, високим катіонним зарядом та гідрофобними властивостями. За даними досліджень останніх років, дефенсини вважають мультифункціональними сполуками, головними функціями яких є знешкодження патогенних мікроорганізмів та забезпечення зв'язку з клітинною та гуморальною ланкою набутого імунітету для модуляції імунної відповіді на чужорідні мікроорганізми. Такий зв'язок дефенсини здійснюють шляхом залучення моноцитів, дендритних клітин та Т-клітин до місця інфекції [10, 11]. Крім імуномодулюючої функції, дефенсини беруть участь у процесах запалення та загоєння ран, впливають на фертильність та онкогенез [12].

Особливий спектр активності щодо культивованих пухлинних клітин людини демонструє бета-дефенсин-2 людини (human beta-defensin-2 — hBD-2), катіонний пептидний антибіотик, експресія якого індукується в епітеліальних клітинах за умов запалення, інфекції або загоєння ран. Так, згідно з даними власних досліджень, рекомбінантний hBD-2 у концентраційно-залежний спосіб впливає на проліферацію та життєздатність культивованих пухлинних клітин різного гістогенезу, у тому числі клітин лімфоми Беркітта лінії Namalwa та лейкоцичних Т-клітин лінії Jurkat, а також викликає блокування клітинного циклу, зниження показників злоякісності клітин та зміни рівнів експресії певних маркерних білків [12–14]. Як і інші антимікробні пептиди людини, рівень експресії котрих визначає функціональну активність [11], рекомбінантний hBD-2 може викликати біологічні ефекти протилежної спрямованості залежно від концентрації в середовищі інкубації клітин.

Метою цієї роботи було дослідити потенційну роль hBD-2 в регуляції експресії мРНК ТФ у злоякісно трансформованих лініях клітин В-лімфоцитарного походження, а також можливість регуляції експресії hBD-2 через поверхневі рецептори цих клітин.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженнях були використані злоякісно трансформовані лінії клітин В-лімфоцитарного походження, у яких блок дозрівання виник на різних стадіях диференціювання, а саме, лінії клітин пре-В-лімфоцитарного лейкозу — REN, BLIN-1, NALM-6, лінії клітин лімфоми Ходжкіна — L1236, L428, KM-H2, лінії клітин лімфоми Беркітта — Daudi, Ramos, Raji, BJAB та В-лімфобластодні лінії клітин — MP-1, T5-1 (всі клітинні лінії люб'язно надані професором Е.А. Clark, Університет штату Вашингтон, Сіетл, США). Лінії клітин культивували за стандартних умов у середовищі RPMI-1640 із 10% ембріональної телячої сироватки, 2 μ M L-глутаміну та антибіотиками при 37 °C в атмосфері 5% CO₂.

Стимуляцію ліній клітин Raji, BJAB та T5-1 через поверхневі рецептори проводили, додаючи моноклональні антитіла (МкАТ) проти CD40 (G28-5, надані професором Е.А. Clark, Університет штату Вашингтон, Сіетл, США) (1 мкг/мл), CD150 (IPO-3, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України) (10 мкг/мл) та антитіла кози проти BCR (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., США) (10 мкг/мл).

Рекомбінантний hBD-2 експресовано у вигляді злитого протеїну в бактеріях штаму *E. coli* BL21(DE3) та очищено за схемою, що включала виділення злитого протеїну GST-hBD-2 із лізату бактеріальних клітин із застосуванням афінної хроматографії на глутатіон-агарозі, розщеплення протеїну тромбіном та розділення продуктів протеолізу шляхом зворотногофазової хроматографії згідно з методикою [15].

Для визначення впливу hBD-2 на рівень експресії мРНК ТФ лінії клітин інкубували протягом 4 год із додаванням рекомбінантного hBD-2 у концентрації 0,1 та 1 μ M у поживному середовищі RPMI-1640 без ембріональної телячої сироватки.

Сумарну РНК з ліній клітин виділяли, використовуючи TRIzol (Sigma, США) згідно з протоколом виробника. 2 мкг сумарної РНК конвертували в комплементарну ДНК (кДНК), додаючи праймери oligo(dT)₁₈, суміш нуклеотидів (dNTP), інгібітор РНКаз та зворотну транскриптазу M-MLV Reverse Transcriptase (усі реактиви від Thermo Scientific, США). Реакцію зворотної транскрипції проводили в ампліфікаторі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США) відповідно до заданої програми: 5 хв, 65 °C; 60 хв, 42 °C.

Визначення рівня експресії мРНК ТФ та hBD-2 проводили за допомогою кількісної ПЛР у режимі реального часу. Для цього використовували 2 мкл синтезованої кДНК, суміш (2 \times) SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) та суміш специфічних праймерів (прямий і зворотний, 25 μ M). Послідовності праймерів, використаних у дослідженні, наведено в таблиці. Для підбору праймерів був використаний інтернет-ресурс Primer Design and

Search Tool (<http://bisearch.enzim.hu/?m=search>). Специфічність праймерів перевіряли додатково в опції nucleotide-nucleotide alignment (blastn) в інтернет-програмі BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). ПЛР у режимі реального часу проводили в 96-лункових планшетах (Applied Biosystems, США) на приладі Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System в дублікатах для кожного гена. Для всіх досліджуваних генів були використані такі умови ампліфікації: 10 хв, 95 °С; 15 с, 95 °С; 40 с, 62 °С протягом 40 циклів з наступним етапом дисоціації для визначення специфічності ампліфікованого продукту (95 °С, 15 с, 64 °С, 40 с, 95 °С, 15 с).

Напівкількісний відносний аналіз експресії досліджуваних генів обчислювали за описаною К.К. Livak (2008) методикою [16]. Для нормалізації результатів було обрано рівень експресії гена β_2 -мікроглобуліну. Середнє для дублікатів граничне значення циклу (Ct) досліджуваного гена нормалізували відносно Ct ендogenous контролю. Значення Δ Ct для стимульованих клітин додатково нормалізували по Δ Ct для контрольних нестимульованих клітин, внаслідок чого отримували $\Delta\Delta$ Ct. Зміна експресії гена в певну кількість разів, порівняно з контролем, дорівнює $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результати обробляли в програмі Microsoft Excel і представляли у графічному вигляді.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі роботи в злякисно трансформованих лініях клітин В-лімфоцитарного походження та В-лімфобластоїдних лініях клітин, трансформованих вірусом Епштейна — Барр, було визначено профіль експресії ТФ, які характеризують різні стадії диференціювання нормальних В-лімфоцитів: IRF4, IRF8, PU.1, BCL6 та BLIMP-1. Серед досліджених злякисно трансформованих ліній клітин високий рівень експресії IRF4 був детектований у всіх лініях клітин, що походять із лімфоми Ходжкіна (КМ-Н2, L1236, L428) (рис. 1, а, IV), В-лімфобластоїдних лініях клітин (MP-1, T5-1) та лише в одній із трьох досліджених ліній клітин, що походять із пре-В-лімфоцитарного лейкозу — BLIN-1 (рис. 1, а, I та II). У всіх лініях клітин, що походять із лімфоми Беркітта із блоком диференціювання на стадії зародкового центру, виявлено закономірно низький рівень мРНК IRF4 (рис. 1, а, III). Експресія та функції IRF4 та IRF8 у нормальних В-лімфоцитах, що проходять диференціювання в зародковому центрі, має взаємовиключний характер [3]. Така взаємови-

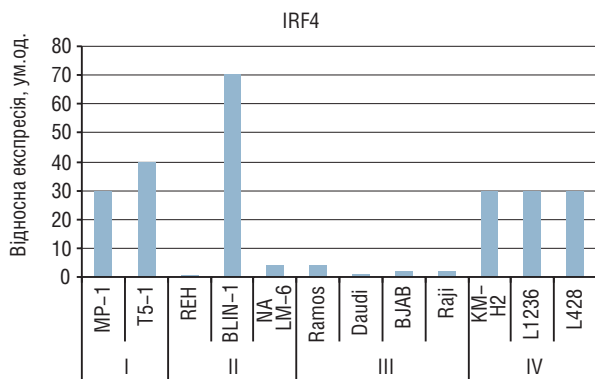
ключна експресія мРНК IRF4 та IRF8 зберігалася у В-лімфобластоїдних лініях клітин (MP-1, T5-1), лініях клітини лімфоми Ходжкіна та двох із чотирьох досліджених ліній клітин лімфоми Беркітта — Daudi та BJAB (рис. 1, а, б, I, IV та III). Однак в інших двох лініях клітин із лімфоми Беркітта (Ramos, Raji) спостерігався низький рівень мРНК як IRF4, так і IRF8 (рис. 1, а, б, III).

ТФ IRF4 та IRF8 найбільш гомологічні представники родини IRF. Як IRF4, так і IRF8 не можуть самостійно взаємодіяти з ISRE-мотивом ДНК (елементи інтерферон-стимульованої відповіді), тому функціонують у тандемі з іншими білками-партнерами, найчастіше це фактори родини Ets — PU.1 та Spi-B [17]. Характер експресії ТФ PU.1 у досліджених ліній клітин повторював такий для IRF8, але не для IRF4, що може свідчити про їх функціональний зв'язок як білків-партнерів (рис. 1, в). IRF8/PU.1 комплекс сприяє підтримці фенотипу активованих В-лімфоцитів через активацію експресії PAX5 та BCL6 і пригніченню BLIMP-1 [6]. У В-лімфобластоїдних лініях клітин (MP-1, T5-1), де відмічено високий рівень експресії мРНК IRF4 — репресора BCL6 — та низький рівень мРНК IRF8/PU.1, експресія мРНК BCL6, ключового регулятора формування зародкового центру, закономірно була низькою (рис. 1, а-г, I). Високу експресію мРНК BCL6 відмічено в двох із чотирьох досліджених ліній клітин лімфоми Беркітта — Daudi та BJAB — поряд з високою експресією мРНК IRF8/PU.1 та низькою експресією IRF4 (рис. 1, а-г, III). В інших двох лініях клітин лімфоми Беркітта — Ramos та Raji — рівень мРНК BCL6 був нетипово низьким як для клітин зародкового центру (рис. 1, г, I). У всіх досліджених лініях пре-В-лімфобластного лейкозу та лімфоми Ходжкіна виявлено високий рівень експресії мРНК BCL6 (рис. 1, г, II та IV). Рівень експресії мРНК BLIMP-1 як маркера плазматичних клітин був низьким у всіх досліджених лініях клітин (рис. 1, д). Таким чином, у злякисно трансформованих лініях клітин В-лімфоцитарного походження, на протигагу В-лімфобластоїдним лініям клітин, трансформованих вірусом Епштейна — Барр, профіль експресії ТФ IRF4, IRF8, BCL-6, PU.1 та BLIMP-1 не завжди відповідає стадії диференціювання, на якій виник блок дозрівання цих клітин. Аберантна експресія ТФ у злякисно трансформованих клітинах може віддзеркалювати проміжні стадії диференціювання, але більш вірогідним є дерегу-

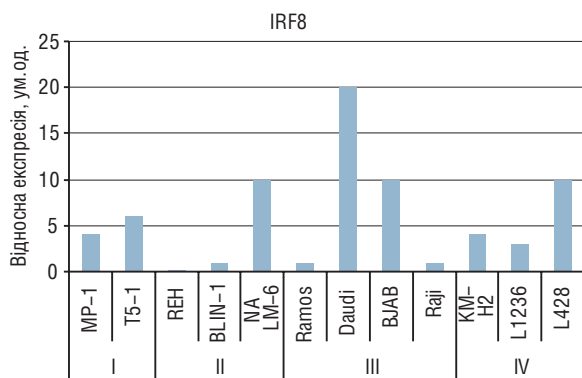
Таблиця

Праймери, використані в дослідженні

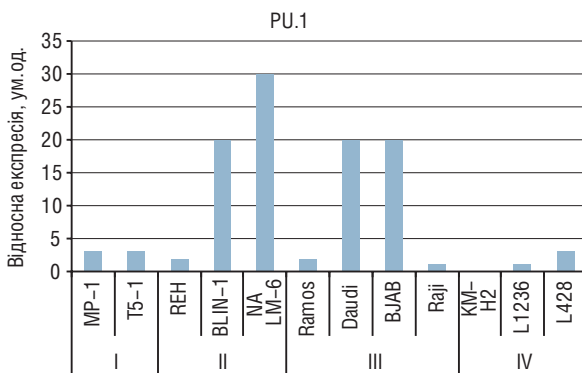
Продукт	Прямий праймер 5' → 3' (позиції у сиквенсі)	Зворотний праймер 5' → 3' (позиції у сиквенсі)
IRF4	CCACTACSTCSTTTCTATC	CCGTTCCCTTTTCAGAGTCCT
IRF8	CCAACAGATCACCGTCTAA	AAGTGCAAAGTAAGGCATC
PU.1	CTTCCAGTTCTCGTCAA	GAGCTTCTTTCACCTTC
BCL6	CTCCGTGCCCATGTGCTTA	GAGTCTGAAGGTGCCGAAA
BLIMP-1	GCTTAATACTTGGTGACCTC	GTATCTCTCTCCCTGGTT
β_2 -мікроглобулін	CCGTGTGAACCATGTGACTTTGTC	TGGCGCATCTTCAAACCTGCATGATC
hBD-2	GCTTGATGTCCTCCCAGACT	TAACAGGATCGCTATACCACCA



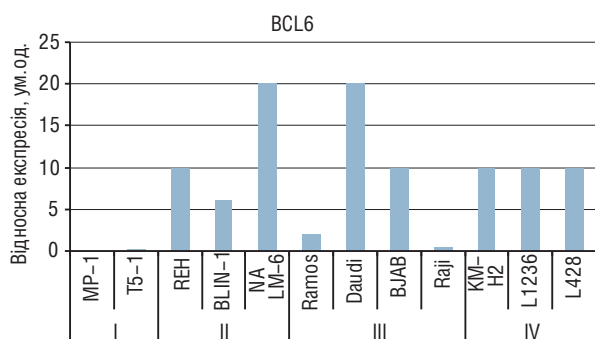
а



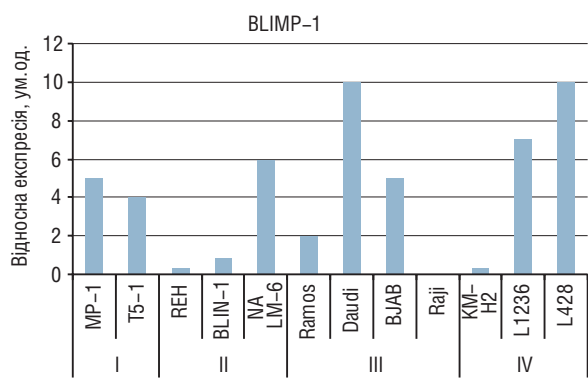
б



в



г



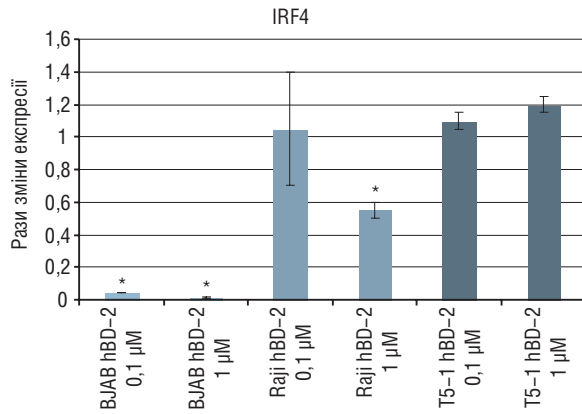
д

Рис. 1. Базальний профіль експресії транскрипційних факторів у ліній клітин В-лімфоцитарного походження: а – IRF4, б – IRF8, в – PU.1, г – BCL6, д – BLIMP-1; I – В-лімфобластоїдні лінії клітин трансформовані вірусом Епштейна – Барр, II – злоякісно трансформовані лінії клітин, що походять із пре-В-лімфобластного лейкозу, III – лімфоми Беркітта та IV – лімфоми Ходжкіна. Результати кількісної ПЛР в режимі реального часу

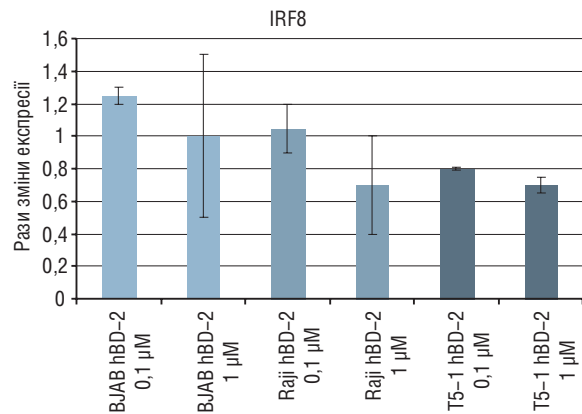
ляція сигнальних каскадів, що призводить до порушень координації змін транскрипційних регулонів.

Для визначення потенційної ролі hBD-2 у регуляції рівня експресії мРНК ТФ, клітини злоякісно трансформованих клітинних ліній, що походять із лімфоми Беркітта (BJAB, Raji) та В-лімфобластоїдної лінії клітин Т5–1, інкубували з рекомбінантним hBD-2 у концентрації 0,1 та 1 μM *in vitro*. Після цього з клітин виділяли сумарну РНК та проводили кількісну ПЛР у режимі реального часу щодо експресії IRF4, IRF8, BCL-6, PU.1 та BLIMP-1. Для дослідження були обрані лінії клітин BJAB та Raji, оскільки вони характеризувалися протилежним профілем експресії більшості досліджених ТФ (IRF8, PU.1, BCL6), але водночас мали однакове походження з лімфоми Беркітта. Як контроль обрали лімфобластоїдну лінію клітин Т5–1, де зберігалось кількісне співвідношення в експресії ТФ відносно нормальних В-лімфоцитів.

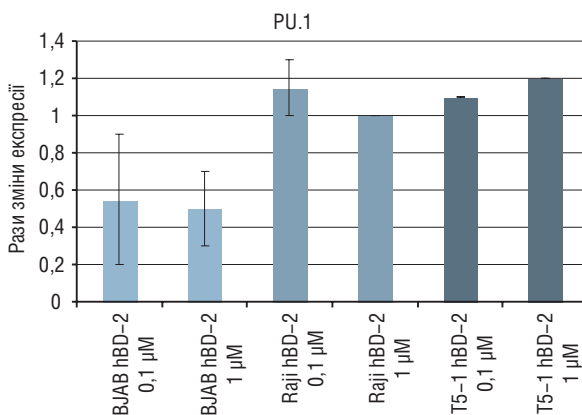
У ході проведених досліджень виявлено, що рекомбінантний hBD-2 в концентраціях 0,1 та 1 μM в лінії клітин BJAB сприяв достовірному зниженню експресії мРНК IRF4 у 25 та 67 разів відповідно (рис. 2, а). hBD-2 лише в концентрації 1 μM призводив до зниження експресії мРНК IRF4 вдвічі в лінії клітин Raji та не впливав в обох концентраціях на експресію цього ТФ у В-лімфобластоїдній лінії клітин Т5–1 (див. рис. 2, а). Достовірних змін в експресії мРНК IRF8 під впливом hBD-2 в досліджених лініях клітин не відмічено (рис. 2, б). Рівень експресії мРНК PU.1 знижувався під дією hBD-2 у концентрації 1 μM вдвічі в клітинній лінії BJAB, однак не змінювався в лініях клітин Raji та Т5–1, незалежно від концентрації hBD-2 (рис. 2, в). hBD-2 у концентрації 1 μM сприяв зниженню рівня мРНК BCL6 в лінії клітин BJAB (рис. 2, г). Експресія мРНК



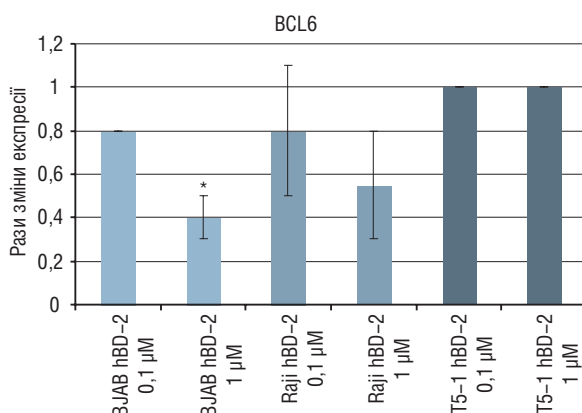
а



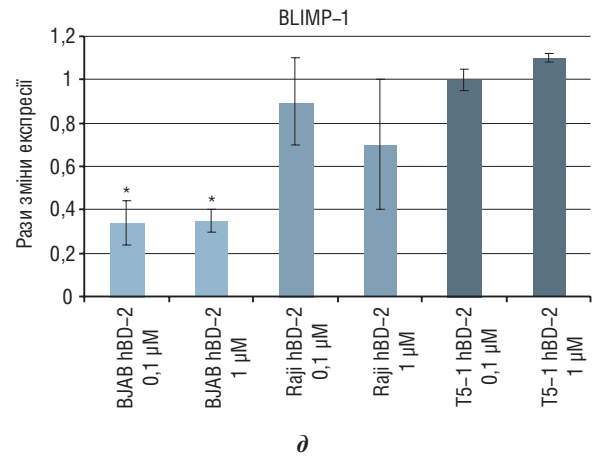
б



в



г



д

Рис. 2. Вплив рекомбінантного бета-дефенсину-2 на рівень експресії мРНК транскрипційних факторів у лініях клітин В-лімфоцитарного походження: а — IRF4, б — IRF8, в — PU.1, г — BCL6, д — BLIMP-1. Результати кількісної ПЛР у режимі реального часу. Значення рівня експресії ТФ у лініях клітин, культивованих лише в поживному середовищі, прийнято за контроль і позначено одиницею. * $p < 0,05$ порівняно із контролем

BLIMP-1 знижувалася більш ніж в 2 рази після впливу hBD-2 в обох концентраціях 0,1 та 1 μM на клітинну лінію VJAB (рис. 2, д). hBD-2 не викликав суттєвих змін в експресії BCL6 та BLIMP-1 у лініях клітин Raji та T5-1 (рис. 2, г, д).

У цій роботі вперше показано вплив hBD-2 на рівень експресії мРНК ключових ТФ, необхідних для диференціювання В-лімфоцитів, причому ефект бета-дефенсину-2 залежав від вихідного профілю експресії ТФ у клітинних лініях. Виявлено, що в лінії клітин VJAB hBD-2 виступає негативним регулятором ТФ IRF4 та BLIMP-1, які функціонують як основні координатори термінальної стадії диференціювання В-лімфоцитів — стадії плазматичних клітин. Тобто в клітинах лінії клітин VJAB дія hBD-2 може призводити до зупинки їх диференціювання. У лінії клітин Raji дія бета-дефенсину-2 мала наслідком зниження експресії лише одного ТФ — IRF4, в той час як у В-лімфобластоїдній лінії клітин T5-1 при дії hBD-2 рівень ТФ не змінювався. Чому бета-дефенсин-2 достовірно пригнічував рівень експресії ТФ IRF4 та BLIMP1 тільки в лінії лімфоми Беркитта VJAB? Нещодавно було показано, що синтетичний антимікробний пептид опосередковує свою дію на макрофаги через TLR4, впливаючи на TRIF-залежний сигнальний шлях, зокрема знижує рівень фосфорилування ТФ IRF3 [18]. За нашими даними, на поверхні лінії клітин VJAB експресований CD180, що належить також до Toll-подібних рецепторів. Тому можливо, що бета-дефенсин-2 впливає на сигнальні шляхи В-лімфоцитів через CD180. Ця гіпотеза заслуговує на подальші дослідження.

Треба зазначити, що в останні роки опубліковано результати багатьох досліджень про здатність дефенсинів впливати на активацію та дозрівання клітин імунної системи, в тому числі дендрит-

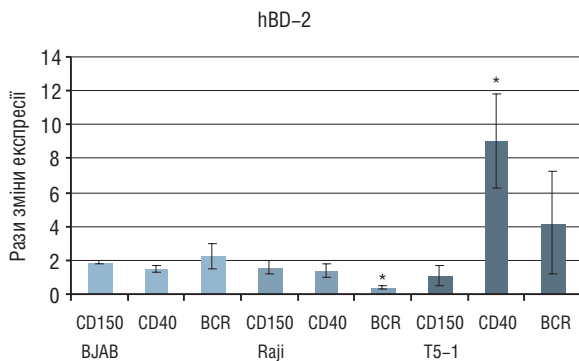


Рис. 3. Регуляція експресії hBD-2 через поверхні рецептори в ліній клітин В-лімфоцитарного походження. Результати кількісної ПЛР у режимі реального часу. Значення рівня експресії hBD-2 у ліній клітин, культивованих лише в поживному середовищі, прийнято за контроль і позначено одиницею. * $p < 0,05$ порівняно із контролем

них клітин. Так, в 2016 р. опубліковано результати дослідження щодо впливу HNP1, альфа-дефенсину людини, який зберігається в азурофільних гранулах нейтрофілів, на активацію плазмоцитоїдних дендритних клітин (pDCs) [19]. Як уже встановлено, HNP1 здатний викликати активацію pDCs і продукцію цими клітинами інтерферону альфа *in vitro* та *in vivo* із залученням сигнальних шляхів NF- κ B та ТФ IRF1, причому в одній із досліджених клітинних ліній (CAL-1) дія HNP1 призводила до ядерної транслокації ТФ IRF1. Оскільки, в наявній літературі відсутні дані щодо впливу дефенсинів на експресію ТФ у лімфоцитах, наше дослідження є першим у цьому напрямку.

Друга частина роботи була сфокусована на дослідженні можливих шляхів регуляції експресії hBD-2 через поверхні рецептори CD150, CD40 та BCR у злоякісно трансформованих ліній клітин В-лімфоцитарного походження. Лігація CD150 рецептора не призводила до достовірних змін в експресії мРНК hBD-2 у трьох досліджених ліній клітин (BJAB, Raji, T5-1) (рис. 3). Лігація CD40 рецептора також не впливала на рівень експресії мРНК hBD-2 у клітинних ліній BJAB та Raji, однак в клітинній лінії T5-1 призводила до достовірного зростання рівня мРНК hBD-2 в $9 \pm 2,8$ раза (див. рис. 3). Стимуляція BCR спричиняла достовірне зниження рівня експресії мРНК hBD-2 у $2,5 \pm 0,08$ раза в клітинній лінії Raji, але не в ліній клітин BJAB та T5-1 (див. рис. 3). Таким чином, встановлено, що CD40 рецептор виступає позитивним регулятором експресії hBD-2 у В-лімфобластоїдній лінії клітин T5-1, але не в злоякісно трансформованих ліній клітин, що походять із лімфоми Беркітта (BJAB та Raji). Водночас CD150 не залучений до регуляції експресії hBD-2, а BCR негативно регулює експресію мРНК hBD-2 в лінії клітин Raji.

У нашому попередньому дослідженні, яке було проведено на клітинах лінії Namalwa (лімфоми Бер-

кітта) та лейкоцитних Т-клітинах лінії Jurkat, із застосуванням напівкількісної ПЛР зі зворотною транскрипцією, встановлено, що зазначені клітини на відносно невисокому рівні експресують мРНК бета-дефенсину-1–3 людини [13]. Результати дослідження, проведеного методом кількісної ПЛР у режимі реального часу, також свідчать про наявність базової невисокої експресії hBD-2 у клітинах В-лімфоцитарного походження. Крім того, в нашому дослідженні вперше виявлено, що в В-лімфоцитах експресія hBD-2 може регулюватися із залученням поверхневих рецепторів — чи то негативно через BCR в клітинах Raji, чи то позитивно через CD40 рецептор у клітинах T5-1. Подальші дослідження допоможуть встановити, яку функціональну роль може відігравати регуляція експресії бета-дефенсину людини із залученням поверхневих рецепторів В-лімфоцитів.

Роботу виконано в рамках цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (номер державної реєстрації теми 0112U002194; 2012–2016 рр.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 497–508.
2. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, et al. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* 2010; 11: 681–8.
3. Shukla V, Lu R. IRF4 and IRF8: Governing the virtues of B lymphocytes. *Front Biol* 2014; 9: 269–82.
4. Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity* 2013; 38: 918–29.
5. Xu H, Chaudhri VK, Wu Z, et al. Regulation of bifurcating B cell trajectories by mutual antagonism between transcription factors IRF4 and IRF8. *Nat Immunol* 2015; 16: 1274–81.
6. Carotta S, Willis SN, Hasbold J, et al. The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *J Exp Med* 2014; 211: 2169–81.
7. Minnich M, Tagoh H, Bonelt P, et al. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat Immunol* 2016; 17: 331–43.
8. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 920–32.
9. Shaffer AL, 3-rd, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 565–610.
10. He Y, Zhang J, Donahue C, et al. Skin-derived dendritic cells induce potent CD8(+) T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity* 2006; 24: 643–56.
11. Semple F, Dorin JR. Beta-defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun* 2012; 4: 337–48.
12. Zhuravel E, Shestakova T, Efanova O, et al. Human beta-defensin-2 controls cell cycle in malignant epithelial cells: *in vitro* study. *Exp Oncol* 2011; 33: 114–20.
13. Gerastchenko OL, Zhuravel EV, Soldatkina MA, Pogrebnyov PV. Expression of human beta-defensins-1–4 mRNA in Namalwa and Jurkat cells. *Vistnyk Kyiv Univ* 2013; 2: 48–50.
14. Zhuravel OV, Gerastchenko OL, Khetsuriani MR, et al. Expression of human beta-defensins-1–4 in thyroid cancer cells

and new insight on biologic activity of hBD-2 *in vitro*. *Exp Oncol* 2014; **36**: 174–8.

15. Pogribnoy PV, Lisovsky IL, Markeeva NA, *et al.* Production of recombinant of hBD-2 — human antimicrobial peptide expressed in cervical and vulval cancer. *Exp Oncol* 2003; **25** (1): 36–9.

16. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; **3**: 1101–8.

17. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, *et al.* The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Ann Rev Immunol* 2008; **26**: 535–84.

18. Shim DW, Heo KH, Kim YK, *et al.* Anti-inflammatory action of an antimicrobial model peptide that suppresses the TRIF-dependent signaling pathway via inhibition of Toll-like receptor 4 endocytosis in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *PLoS One* 2015; **10**(5): e0126871. doi: 10.1371/journal.pone.0126871. eCollection 2015.

19. Wang F, Qiao L, Lv X, *et al.* Alarmin human alpha defensin HNP1 activates plasmacytoid dendritic cells by triggering NF-kappaB and IRF1 signaling pathways. *Cytokine* 2016; **83**: 53–60.

EFFECT OF HUMAN BETA-DEFENSIN-2 ON EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTORS IN MALIGNANT CELL LINES OF B-LYMPHOCYTE ORIGIN

I.M. Gordiienko, O.V. Zhuravel, L.M. Kovalevska, M.O. Soldatkina, L.M. Shlapatska, V.M. Kholodniuk, S.P. Sidorenko, P.V. Pogrebnoy

Summary. *Aim:* to study the effect of recombinant human beta-defensin-2 (hBD-2) on the level of mRNA expression of key transcription factors (TF) in malignant cell lines of B-lymphocyte origin, and to test the involvement of cell surface receptors in regulation of hBD-2 expression. **Object and methods:** malignant cell lines of B-lymphocyte origin, B-lymphoblastoid cell lines and recombinant hBD-2 have been used in experiments *in vitro*. The level of mRNA expression of TF and hBD-2 was eval-

uated using real-time polymerase chain reaction. **Results:** for the first time the effect of hBD-2 on the level of mRNA expression of key TF required for differentiation of B-lymphocytes was demonstrated. Moreover, the effect of hBD-2 was dependent on initial profile of TF expression in these cell lines. It was shown that in BJAB cell line IRF4 and BLIMP-1, the major coordinators of terminal differentiation of B-lymphocytes to the stage of plasma cells, were negatively regulated by hBD-2. Incubation of Raji cell line with hBD-2 resulted in decreased expression of just one TF, IRF4, while in lymphoblastoid T5-1 cell line treated with hBD-2 the level of TFs remained unaltered. It was revealed that in B-lymphocytes the level of hBD-2 expression could be regulated with the involvement of surface receptors: negatively through BCR in Raji cells, or positively through CD40 receptor in T5-1 cells, but was not dependent on CD150 signaling. **Conclusion:** the study highlighted a potential role of hBD-2 in regulation of the level of mRNA expression of TFs in malignant cell lines of B-lymphocyte origin, and possible regulation of hBD-2 expression through surface receptors in these cells.

Key Words: human beta-defensin-2, transcription factors, human cell lines of B-lymphocyte origin, BCR, CD40, CD150.

Адреса для листування:

Гордієнко І.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: hordiyenko24@mail.ru

Одержано: 11.11.2016