

Экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в дендритных клетках человека, активированных двуцепочечной ДНК

А.С. Проскурина¹✉, К.Е. Орищенко¹, Е.А. Поттер¹, Е.В. Долгова¹, А.В. Спасельникова^{1,2}, Г.С. Риттер^{1,2}, Н.А. Вараксин³, Т.Г. Рябичева³, О.Ю. Леплина⁴, А.А. Останин⁴, Е.Р. Черных⁴, С.С. Богачев¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Акционерное общество «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Одно из важнейших свойств экстраклеточной двуцепочечной ДНК, имеющее отношение к терапии различных заболеваний, – это ее способность через дендритные клетки (ДК) активировать эффекторные клетки иммунной системы (противоопухольевый и вакцинальный иммунитет). Стимулирующий эффект ДНК на ДК опосредуется через TLR9 сигнальный путь и/или через систему цитозольных сенсоров и проявляется усилением экспрессии МНС антигенов II класса и костимулирующих молекул, а также синтеза иммунорегуляторных цитокинов. В настоящей работе была исследована экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в ДК, активированных двуцепочечной ДНК человека: (1) без использования каких-либо дополнительных факторов, (2) при использовании липофильного агента и (3) при блокировании TLR9 хлорохином. Оценка эффекта ДНК проводилась после 6- и 24-часовой экспозиции. Показано, что препарат двуцепочечной ДНК при трансфекции липофектаминам активирует ДК на таком же уровне, как и Poly(dA:dT), синтетический аналог двуцепочечной ДНК. Установлено, что совместная обработка ДНК и хлорохином усиливает экспрессию генов *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-8*, *MCP1*, *VEGF*, *CD25* и *CD83* к 24 ч инкубации. Впервые показано, что геномная «self» двуцепочечная ДНК как монопрепарат активирует синтез мРНК *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-8*, *IL-10* и *VEGF* в ДК к 6 часам индукции.

Ключевые слова: хлорохин; двуцепочечная ДНК; цитокины; дендритные клетки; Real-time ПЦР.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Проскурина А.С., Орищенко К.Е., Поттер Е.А., Долгова Е.В., Спасельникова А.В., Риттер Г.С., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в дендритных клетках человека, активированных двуцепочечной ДНК. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):717-727. DOI 10.18699/VJ17.289

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Potter E.A., Dolgova E.V., Spaselnikova A.V., Ritter G.S., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Expression of genes of cytokines, transcription factors and differentiation antigens in human dendritic cells activated by double-stranded DNA. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):717-727. DOI 10.18699/VJ17.289 (in Russian)

Received 09.12.2016

Accepted for publication 21.03.2017

© AUTHORS, 2017

Expression of genes of cytokines, transcription factors and differentiation antigens in human dendritic cells activated by double-stranded DNA

A.S. Proskurina¹✉, K.E. Orishchenko¹, E.A. Potter¹, E.V. Dolgova¹, A.V. Spaselnikova^{1,2}, G.S. Ritter^{1,2}, N.A. Varaksin³, T.G. Ryabicheva³, O.Y. Leplina⁴, A.A. Ostanin⁴, E.R. Chernykh⁴, S.S. Bogachev¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁴ Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

One of the most important properties of extracellular double-stranded DNA related to the treatment of various diseases is its ability to activate effector cells of the immune system (anti-tumor and vaccinal immunity) through dendritic cells (DCs). The stimulatory effect of DNA on DCs is mediated by the TLR9 signaling pathway and/or through a system of cytosolic sensors and is manifested by increased expression of MHC class II antigens and costimulatory molecules and by increased synthesis of immunoregulatory cytokines. In this work, the expression of cytokines, differentiation antigens and transcription factor genes has been investigated in DCs activated by double-stranded human DNA (i) without any additional factors, (ii) using a lipophilic agent, and (iii) by blocking TLR9 with chloroquine. Evaluation of the DNA effect was carried out after the 6- and 24-hour exposure. It was found that the preparation of double-stranded DNA transfected by Lipofectamine 2000 boosts DCs at the same level as Poly(dA:dT), a synthetic equivalent of double-stranded DNA. It was discovered that combined application of DNA and chloroquine enhances expression of the *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-8*, *MCP1*, *VEGF*, *CD25*, and *CD83* genes by hour 24 of incubation. It was for the first time shown that genomic "self" double-stranded DNA as a mono agent activates mRNA synthesis of cytokines *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-8*, *IL-10*, and *VEGF* in DCs at 6 hours of induction.

Key words: chloroquine; double-stranded DNA; cytokines; dendritic cells; real-time PCR.

Двуцепочечная ДНК различного происхождения, в различной форме и независимо от нуклеотидной последовательности принимает участие в регуляции врожденного и адаптивного иммунитета. Показано, что двуцепочечная ДНК в форме нуклеосом (Decker et al., 2005; Yasuda et al., 2005), очищенная геномная «self» ДНК млекопитающих, бактерий, вирусов (Martin, Elkon, 2006; Shirota et al., 2006), двуцепочечная ДНК, не содержащая CpG мотивы (Suzuki et al., 1999; Shirota et al., 2006), и одноцепочечные CpG олигонуклеотиды (Krieg, 2003) способны активировать дендритные клетки (ДК) и макрофаги. Стимулирующий эффект ДНК проявляется усилением экспрессии МНС антигенов II класса и костимулирующих молекул, а также синтеза иммунорегуляторных цитокинов, что во многом определяет направленность и выраженность иммунных реакций (Suzuki et al., 1999; Ishii et al., 2001; Zhu et al., 2003; Jiang et al., 2004; Decker et al., 2005; Martin, Elkon, 2006; Shirota et al., 2006).

В настоящее время ведутся целенаправленные исследования механизмов активации адаптивного иммунитета с участием нуклеиновых кислот. Экстраклеточная self ДНК определяется в самых различных внеклеточных жидкостях организма, включая плазму, сыворотку, мочу, слюну и даже спинномозговую жидкость (Giacona et al., 1998; Anker, 2000; Тамкович и др., 2008). Источником этой ДНК могут быть соматические, ядродержащие клетки, погибшие путем апоптоза или некроза; эритробласты, ядра которых энуклеируются в процессе дифференцировки в эритроциты; лимфоциты в процессе их апоптотической гибели после стимуляции (Stroun et al., 2001; Choi et al., 2005; Тамкович и др., 2008). Кроме того, при развитии инфекционных заболеваний в крови больных появляются нуклеиновые кислоты возбудителей (Ngan et al., 2004), а во время беременности в крови матери детектируется фетальная ДНК (Lo et al., 1997). На данный момент нет разработанной концепции оборота экстраклеточной self ДНК в жидкостных средах организма. Очевидно, что деградация до мономеров и их последующее участие в синтетических процессах клетки – самый простой путь утилизации свободной циркулирующей ДНК. Как функциональная молекула экстраклеточная ДНК может интернализироваться в клеточных компартментах и принимать участие в механизмах репаративной рекомбинации (Holmgren et al., 1999; Würtele et al., 2003; Rogachev et al., 2006; Franco et al., 2008; Alyamkina et al., 2010a). ДНК микроорганизмов или ДНК, попадающая в кровь в результате повреждения и гибели клеток, может активировать реакции врожденного и адаптивного иммунитета (Ishii, Akira, 2006, 2008; Medzhitov, 2007). Именно вопросу о механизмах активации иммунного ответа посредством различных форм ДНК и путях передачи активирующего сигнала в настоящее время уделяется наибольшее внимание (Barbalat et al., 2011; Barber, 2011a, b; Sharma, Fitzgerald, 2011).

CpG богатые нуклеиновые кислоты микроорганизмов (бактерий, вирусов) воспринимаются клетками врожденного иммунитета как чужеродные молекулы – так называемые патоген-ассоциированные молекулярные структуры (Yoneyama, Fujita, 2007). Широко известно, что ДНК, обогащенная метилированными CpG динуклеотидами, связывается с активной формой TLR9 в кислых эндосо-

мальных компартментах (Hemmi et al., 2000). Это связывание приводит к запуску каскада внутриклеточных последовательных взаимодействий регуляторных молекул. В результате трансдукции сигнала происходит активация транскрипционных факторов IRF3 и IRF7, что приводит к запуску транскрипции генов интерферонов первого типа. Одновременно активируется транскрипционный фактор NF-κB, который, в свою очередь, запускает транскрипцию генов провоспалительных цитокинов.

На данный момент известно, что независимо от TLR9 двуцепочечная ДНК активирует иммунокомпетентные клетки, в первую очередь ДК, к продукции интерферонов первого типа, цитокинов, хемокинов (Ishii et al., 2001, 2006; Jiang et al., 2004; Kis-Toth et al., 2011). Активирующим началом обладают как геномная self ДНК из подвергшихся апоптозу или поврежденных клеток организма, так и экзогенные геномные или синтетические фрагменты двуцепочечной ДНК, независимо от последовательности. Предполагается, что в этом случае активация ДК происходит за счет взаимодействия фрагментов двуцепочечной ДНК с системой цитозольных сенсоров (Takeshita, Ishii, 2008; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Unterholzner et al., 2010; Barbalat et al., 2011; Barber, 2011a, b; Sharma, Fitzgerald, 2011; Алямкина и др., 2013).

Как известно, основой развития антиген-специфического иммунного ответа является межклеточная, цитокин-опосредованная кооперация с участием целого ряда эффекторных и регуляторных клеток иммунной, кроветворной и других систем организма. Ключевую роль при этом играют ДК, которые являются «профессиональными» антиген-презентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены. Эффективность запуска иммунных реакций во многом зависит от уровня экспрессии на ДК антигенов гистосовместимости II класса и костимулирующих молекул, а также спектра продуцируемых ими цитокинов и хемокинов. В работе (Barber, 2011b) установлено, что двуцепочечная ДНК активирует ДК и макрофаги, а также клетки эндотелия и эпителия, что проявляется усилением синтеза интерферонов первого типа и провоспалительных цитокинов. Для активации иммунокомпетентных клеток использовалась синтетическая двуцепочечная ДНК, которая искусственно интродуцировалась в цитоплазму. В другой работе (Huang et al., 2005) для активации ДК использовалась геномная ДНК *Brucella abortus*. Показано, что нативная геномная двуцепочечная ДНК бактерии активировала ДК к синтезу цитокинов (ИЛ-12) без дополнительных факторов, аналогично материалу бактерий после их термической обработки (НКВА heat-killed *B. abortus*). Сравнение активирующего влияния геномной ДНК *B. abortus* и материала бактерий после их термической обработки демонстрирует, что для равного активирующего влияния в случае нативной ДНК требуется в 50 раз большее ее количество по сравнению с ДНК в составе НКВА. Для обоих вариантов активации показана необходимость функционирования системы передачи сигнала MyD88 и активной формы TLR9 в кислых эндосомальных компартментах.

В наших исследованиях было показано, что двуцепочечная геномная self ДНК естественным путем (т. е. без

применения каких-либо трансфецирующих агентов) эффективно активирует ДК человека миелоидного типа, генерированные *ex vivo* из моноцитов крови, что проявляется усилением экспрессии активационных и дифференцировочных антигенов, аллостимуляторной активности ДК в смешанной культуре лимфоцитов и способности ДК индуцировать пролиферацию перфоринсодержащих цитотоксических Т-лимфоцитов (Alyamkina et al., 2010a, b, 2012; Orishchenko et al., 2013). Было показано также, что препарат двуцепочечной ДНК человека стимулирует продукцию целого ряда цитокинов и хемокинов мононуклеарными клетками цельной крови: ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ИФН- α , ИФН- γ , MCP1, VEGF, ИЛ-1РА и ИЛ-10 (Orishchenko et al., 2013). Иммуностимулирующая активность двуцепочечной ДНК, в частности в отношении ДК, во многом определяет и обнаруженную нами клиническую эффективность препарата ДНК человека (Панаген[®]) при проведении второй фазы многоцентровых, двойных слепых, плацебо-контролируемых испытаний у пациенток с раком молочной железы II–IV стадии (Proskurina et al., 2015, 2016).

Активация ДК под влиянием двуцепочечной геномной self ДНК может осуществляться через TLR9 сигнальный путь и/или через систему цитозольных сенсоров. Система обнаружения нуклеиновых кислот через TLR9 сигнальный каскад описана во множестве научных работ (Yasuda et al., 2009; Kawai, Akira, 2011; Алямкина и др., 2013). Феномен активации ДК молекулами двуцепочечной self ДНК также описан в отдельных научных публикациях (Martin, Elkon, 2006; Alyamkina et al., 2010a, b). Однако молекулярные особенности этого процесса остаются неизученными. Характеристика экспрессии генов поверхностных антигенов и специфических цитокинов под воздействием двуцепочечной self ДНК как монопрепарата в условиях блокады TLR9 сигнального пути является первым целенаправленным шагом в понимании молекулярных механизмов активации ДК фрагментами экстраклеточной двуцепочечной ДНК.

В настоящей работе была исследована экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в ДК под воздействием двуцепочечной геномной self ДНК, при непосредственном воздействии на ДК без использования дополнительных факторов или при интернализации этой ДНК во внутриклеточное пространство с помощью трансфецирующего агента, в условиях блокирования TLR9 сигнального пути и без него. В первой части исследования сравнивалось множество различных обработок между собой. Во второй части целенаправленно изучалось совместное воздействие ДНК и хлорохина на выборке из трех доноров.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных клеток из крови человека. Отобранные образцы венозной крови от трех здоровых доноров разбавляли в 3 раза раствором PBS. Наслаивали образцы разбавленной крови на раствор фиколла-урографина ($\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$) из расчета 2:1 по объему. Центрифугировали 45 мин при 400 г при комнатной температуре. Отбирали интерфазные кольца клеток в пробирку со средой RPMI-1640 без сыворотки, ресуспендировали.

Трижды промывали клетки средой RPMI-1640, центрифугуя 10 мин при 200 г при комнатной температуре. Считали количество клеток в камере Горяева.

Генерация дендритных клеток человека. Моноциты выделяли на чашках Петри путем прилипания к пластику мононуклеарных клеток ((2–5) · 10⁶/мл) в течение 2 ч в присутствии 10 % сыворотки крови АВ(IV) группы. Для генерации ДК моноциты культивировали во флаконах (Nunc, Дания) в течение 4 суток в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0.3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5 % эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США), в присутствии ГМ-КСФ (40 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) и ИФН- α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария).

Препарат ДНК человека получали из плацент здоровых рожениц. В работе использовали плацентарный материал, имеющий отрицательные результаты анализов на наличие ВИЧ, сифилиса, гепатитов В и С. Для выделения ДНК использовали бесфенольный метод. ДНК фрагментировали ультразвуком при частоте 22 кГц до получения фрагментов ДНК размером от 200 до 6000 п. н. Данный препарат является фармакопейным (патентованное название «Панаген[®]», регистр. свидетельство ЛСР № 004429/08 от 09.06.2008). Полученный препарат фильтровали через 0.22 мкм.

Трансфекцию ДК проводили с использованием реагента Lipofectamine[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Получение кДНК. По окончании инкубации из каждого образца дендритных клеток выделяли полиА мРНК («Медиген», Россия), а затем синтезировали кДНК с помощью набора GoTaq 2-Step RT-qPCR System (Promega, США). Образцы РНК и кДНК хранили при –70 °С.

Real-time PCR проводили с помощью реагентов SYBR[®] Green PCR Master Mix на приборе фирмы Applied Biosystems[®]. Для нормирования в качестве внутреннего контроля брали ген большой субъединицы Р0 кислого рибосомного фосфорилированного белка (*RPLP0*) (Wang et al., 2012). Праймеры, использованные в первой и второй серии экспериментов, приведены в табл. 1 и 2. Олигонуклеотиды для ПЦР в реальном времени были синтезированы ООО «Биоссет» с очисткой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Относительный уровень экспрессии генов определяли методом $\Delta\Delta Ct$. Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы REST 2009.

Результаты

Экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции ДК человека после 6-часовой экспозиции с двуцепочечной ДНК

На первом этапе работы с помощью ПЦР в реальном времени был проведен анализ влияния двуцепочечной ДНК, ее синтетического аналога Poly(dA:dT) и ЛПС (классического активатора ДК) на экспрессию девяти генов цитокинов и хемокинов (ФНО- α , ИФН- α , ИФН- β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-1РА, ИЛ-18) в ДК человека после 6-часовой экспозиции. Помимо этого оценивалась экс-

Table 1. Primers for the genes for cytokines, differentiation antigens, and transcription factors of dendritic cells, and the human *RPLP0* gene used in the first series of experiments

Gene	Primer	Length, base	Sequence 5'–3'	Amplicon size, bp
<i>TNF-α</i>	for	21	GGCGTGGAGCTGAGAGATAAC	120
	rev	22	GGTGTGGGTGAGGAGCACAT	
<i>IFN-α</i>	for	26	GTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCAC	93
	rev	23	TCTCATGATTTCTGCTCTGACAA	
<i>IFN-β</i>	for	20	GTCAGAGTGGAAATCCTAAG	134
	rev	20	ACAGCATCTGCTGGTTGAAG	
<i>IL-6</i>	for	20	GAAAGCAGCAAAGAGGCACT	108
	rev	20	TTTACCAGGCAAGTCTCTCT	
<i>IL-8</i>	for	24	GAATGGGTTTGTAGAAATGTGATA	129
	rev	24	CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC	
<i>IL-1α</i>	for	20	ATACCCAAAACCATCACAGG	136
	rev	20	CCAAGCACACCCAGTAGTCT	
<i>IL-1β</i>	for	20	GAAATGATGGCTTATTACAG	110
	rev	20	CCATCCAGAGGGCAGAGGTC	
<i>IL-1PA</i>	for	20	GTGCCTGTCTGTGCAAGT	115
	rev	20	TGAGCGGATGAAGGCGAAGC	
<i>IL-18</i>	for	20	GGTATGGCTGTAACATATCTC	121
	rev	20	TGTCACCTTTTGTATCCTTG	
<i>CD-14</i>	for	19	ACGCCAGAACCTTGTGAGC	122
	rev	22	GCATGGATCTCCACCTCTACTG	
<i>CD-25</i>	for	21	CGCAGAATAAAAAGCGGGTCA	116
	rev	21	ACTTGTTTCGTTGTGTTCCGA	
<i>CD-83</i>	for	22	AAGGGGCAAATGGTCTTTTCG	96
	rev	19	GCACCTGTATGCCCCGAG	
<i>RIG-I</i>	for	22	TTCTCTTGATGCGTCAGTGATA	103
	rev	21	CCGTGATCCACTTTCCTGAA	
<i>MDA5</i>	for	22	GTCTCGTCACCAATGAAATAGC	145
	rev	26	TTATACATCATCTTCTCTCGGAAATC	
<i>IRF3</i>	for	20	GGTCAAGTTGTGCCACGT	144
	rev	20	AGGTAGGCCTTGTACTGGTC	
<i>IRF7</i>	for	20	GCTGCGCTACACGGAGGAAC	120
	rev	24	CCGCCACCTCCCAGTACACC	
<i>NF-κB</i>	for	20	GAAGCACGAATGACAGAGGC	137
	rev	21	GCTTGGCGGATTAGCTCTTTT	
<i>RPLP0</i>	for	21	CTAAAATCTCCAGGGGCACCA	120
	rev	21	AGGAGAAGGGGGAGATGTTGA	

прессия генов, кодирующих антигены дифференцировки (*CD14*, *CD83*) и активации ДК (*CD25*), а также факторов транскрипции (*IRF3*, *IRF7*, *NF-κB*) и трансдукции активирующего сигнала (*RIG-I*, *MDA5*).

Дендритные клетки человека генерировали из моноцитов крови с использованием ГМ-КСФ и ИФН-α. Полученные ДК были обработаны следующим образом: 1) контроль – интактные ДК; 2) ДК + Poly(dA:dT) (10 мкг/мл); 3) ДК + двуцепочечная ДНК (10 мкг/мл); 4) ДК с добавле-

нием только липофектамина 2000 (контроль на действие трансфецирующего агента); 5) ДК, трансфецированные Poly(dA:dT) (10 мкг/мл); 6) ДК, трансфецированные двуцепочечной ДНК (10 мкг/мл); 7) ДК + ЛПС (5 мкг/мл); 8) ДК, обработанные хлорохином (100 мкМ), плюс двуцепочечная ДНК (10 мкг/мл). Экспозицию со всеми агентами проводили в течение 6 ч, после чего из клеток была выделена мРНК и в реакции обратной транскрипции с помощью случайного праймера (random primer) синтезиро-

Table 2. Primers for the genes of cytokines and differentiation antigens of dendritic cells and the human *RPLP0* gene used in the second series of experiments

Gene	Primer	Length, base	5'–3' sequence	Optimum annealing temperature in PCR	Amplicon size, bp.
<i>IFN-α</i>	for	23	CAGAGTCACCCATCTCAGCAAGC	60	118
	rev	22	CAGCCCAGAGAGCAGCTTGA		
<i>IFN-β</i>	for	21	CCTTTGCTCTGGCACAACAGG	58	189
	rev	23	CATTCAATTGCCACAGGAGCTTC		
<i>IFN-γ</i>	for	23	GACTTGAATGTCCAACGCAAGC	58	140
	rev	23	CAGGACAACCATTACTGGGATGC		
<i>IL-8</i>	for	22	GCCAAGGGCCAAGAGAATATCC	58–60	177
	rev	22	GGCTAGCAGACTAGGGTTGCCA		
<i>IL-10</i>	for	23	ACGAAACTGAGACATCAGGGTGG	60	165
	rev	22	AATGGGGGTTGAGGTATCAGAGG		
<i>MCP1</i>	for	23	GCAGATGGTGGAGCTGAATATGC	60	174
	rev	23	GCTAAGCCACAGTTGCACTCATG		
<i>VEGF</i>	for	22	GAAGGAGCCTCCCTCAGGGTTT	60	161
	rev	23	GCGCAGAGTCTCCTTCTCCTTCA		
<i>CD-25</i>	for	23	GAATTTCTTGGTAAGAAGCCGGG	58	116
	rev	20	CTTCCAAAACGCAGGCAAGC		
<i>CD-83</i>	for	22	AAGGGGCAAAATGGTTCTTTCG	60	96
	rev	19	GCACCTGTATGTCCCGAG		
<i>RPLP0</i>	for	23	AGGCCTTCTGGCTGATCCATCT	58–60	135
	rev	22	TATCCTCGTCCGACTCCTCCGA		

вана кДНК. Анализ кДНК выполняли со специфическими парами праймеров, используя наборы реагентов М-443 «Синтол» и систему StepOnePlus (Applied Biosystems). Для нормирования в качестве внутреннего контроля использовали ген большой субъединицы Р0 кислого рибосомного фосфорилированного белка (*RPLP0*), так как экспрессия данного гена была наиболее стабильной при всех вариантах обработки дендритных клеток. Результаты представлены на рис. 1 и 2.

Видно, что краткосрочная, 6-часовая инкубация ДК с ЛПС, являющимся «классическим» активатором, который стимулирует конечное созревание ДК, приводит к небольшому (в 1.5–3.3 раза) усилению экспрессии генов *CD83* (маркер зрелости), *CD25* (рецептор ИЛ-2, маркер активации), фактора транскрипции (*NF-κB*) и отдельных цитокинов (*ИФН-α*, *ИЛ-1α*, *ИЛ-1β*). За столь короткий временной интервал экспрессия проанализированных генов в ДК значительно не менялась после их обработки двуцепочечной ДНК естественным путем (т. е. без использования трансфецирующих агентов). Тем не менее на фоне предварительного блокирования хлорохином TLR9 сигнального пути ДНК активировала ДК, что проявлялось усилением синтеза мРНК генов *CD25* и *CD83* (в 6.7 и 2.6 раза соответственно), а также отдельных цитокинов (*ИФН-β* в 5.2 раза) и хемокинов (*ИЛ-8* в 1.6 раза). Полученные данные позволяют предположить, что блокирование TLR9 активирует в ДК альтернативные пути распознавания нуклеиновых кислот (возможно, через систему цитозольных

сенсоров), что в свою очередь приводит к детекции двуцепочечной ДНК и последующему созреванию/активации дендритных клеток, а также усилению экспрессии генов *ИФН-β* и *ИЛ-8* – цитокинов/хемокинов, необходимых для запуска реакций врожденного иммунитета с участием нейтрофильных гранулоцитов.

Как и ожидалось, в эти сроки (после 6-часовой экспозиции) наиболее выраженный стимулирующий эффект ДНК на ДК человека регистрировался в случае направленной трансфекции клеток липофектаминам 2000 в комплексе с Poly(dA:dT), а также в комплексе с двуцепочечной ДНК. Так, по сравнению с группой Lip0 комплекс липофектамина с Poly(dA:dT) активировал экспрессию *ФНО-α*, *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИЛ-6* и *ИЛ-8* в 16, 13, 82, 289 и 8 раз соответственно (см. рис. 1). В меньшей степени (в 1.7–3.6 раза) активировалась экспрессия *ИЛ-1β*, *CD25*, *CD83*, *RIG-I*, *MDA5* и *NF-κB* (см. рис. 1 и 2). В свою очередь обработка ДК липофектаминам в комплексе с препаратом двуцепочечной ДНК приводила к выраженной активации экспрессии *ФНО-α*, *ИФН-α*, *ИФН-β* и *ИЛ-6* – в 9, 7, 46 и 102 раза соответственно (см. рис. 1). В меньшей степени (в 1.9–3.6 раза) активировалась экспрессия *ИЛ-8*, *CD25*, *CD83*, *RIG-I*, *MDA5* и *NF-κB* (см. рис. 1 и 2).

Таким образом, как Poly(dA:dT), так и двуцепочечная ДНК в комплексе с липофектаминам активируют экспрессию практически одного и того же набора генов. Исключение составляют только *ИЛ-1α* и *ИЛ-1β*, на экспрессию которых препарат двуцепочечной ДНК практически не

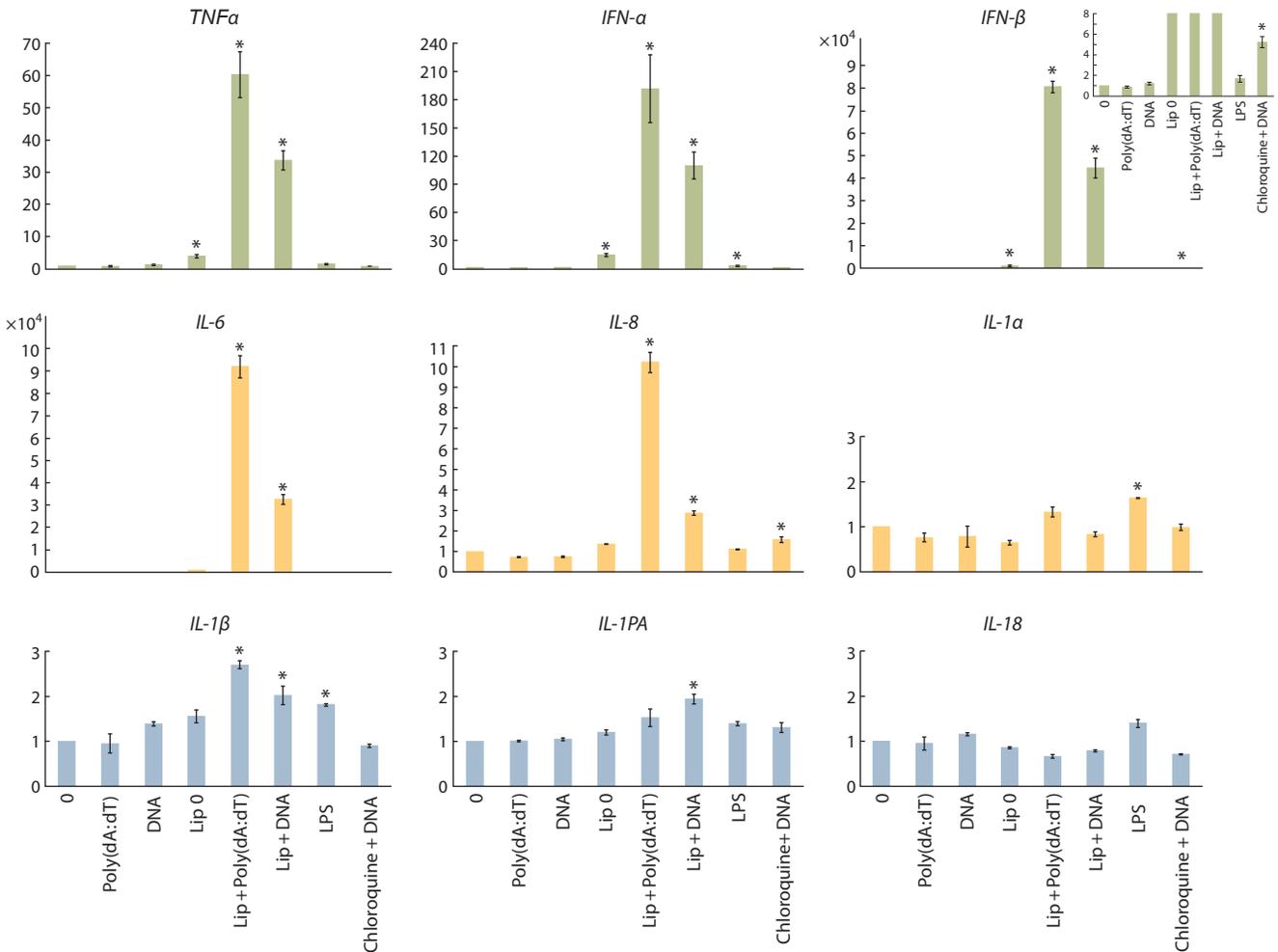


Fig. 1. Relative expression rates of cytokine genes in human dendritic cells.

Here and in Fig. 2: (0) intact DCs (control) and DCs after 6-h incubation with Poly(dA:dT), double-stranded DNA, lipofectamine (Lip0), transfection with Poly(dA:dT) (Lip + Poly(dA:dT)), transfection with double-stranded DNA (Lip + DNA), LPS, double-stranded DNA with chloroquine pretreatment. Y-Axis: gene expression in groups studied relative to the control group. * $p < 0.05$, significance of difference from the control group. The size of the additional block for *IFN-β* is chosen so that the level of mRNA production with the chloroquine + DNA treatment could be quantitated.

оказывал влияния, а Poly(dA:dT) активировал их незначительно (в 2.1 и 1.7 раза по сравнению с обработкой липофектаминам). Кроме того, по сравнению с двуцепочечной ДНК эффект Poly(dA:dT) был более выраженным (в 2–3 раза) в отношении генов цитокинов *ФНО-α*, *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИЛ-6* и *ИЛ-8* (см. рис. 1).

Следует отметить, что интерфероны первого типа (*ИФН-α/β*), провоспалительные цитокины (*ФНО-α*, *ИЛ-6*) а также СХС-хемокины (*ИЛ-8*) относятся к группе цитокинов так называемой первой волны. Они непосредственно участвуют в инициации реакций врожденного иммунитета (*ФНО-α*, *ИФН-α/β*), в рекрутировании в очаг повреждения/воспаления нейтрофильных гранулоцитов (*ИЛ-8*), в индукции синтеза гепатоцитами острофазовых белков (*ИЛ-6*). Кроме того, *ИФН-α* – один из главных инициаторов формирования адаптивного иммунного ответа Th1-направленности. *ИФН-α* способен также протектировать Т-клетки от апоптоза, а *ИЛ-6* – ингибировать функциональную активность супрессорных CD4+CD25+ Т-регуляторных лимфоцитов. Немаловажно, что *ИФН-α* и

ИЛ-6 стимулируют дифференцировку и созревание ДК из гемопоэтических предшественников (Zhang et al., 2010), обеспечивая пополнение пула антиген-презентирующих клеток в очаге повреждения/воспаления.

Таким образом, выявленная нами способность двуцепочечной ДНК и ее синтетического аналога Poly(dA:dT) усиливать в ДК экспрессию генов медиаторов первой волны, а также факторов сигналинга свидетельствует о выраженных иммуностимулирующих свойствах экстраклеточной ДНК.

Экспрессия генов цитокинов и антигенов дифференцировки ДК человека после 6- и 24-часовой экспозиции с двуцепочечной ДНК в условиях блокирования TLR9 сигнального пути

На втором этапе работы была проанализирована активация экспрессии генов интерферонов первого (*ИФН-α/β*) и второго (*ИФН-γ*) типа, цитокинов (*ИЛ-10*, *VEGF*), СХС и СС хемокинов (*ИЛ-8*, *MCP1*), а также антигенов диффе-

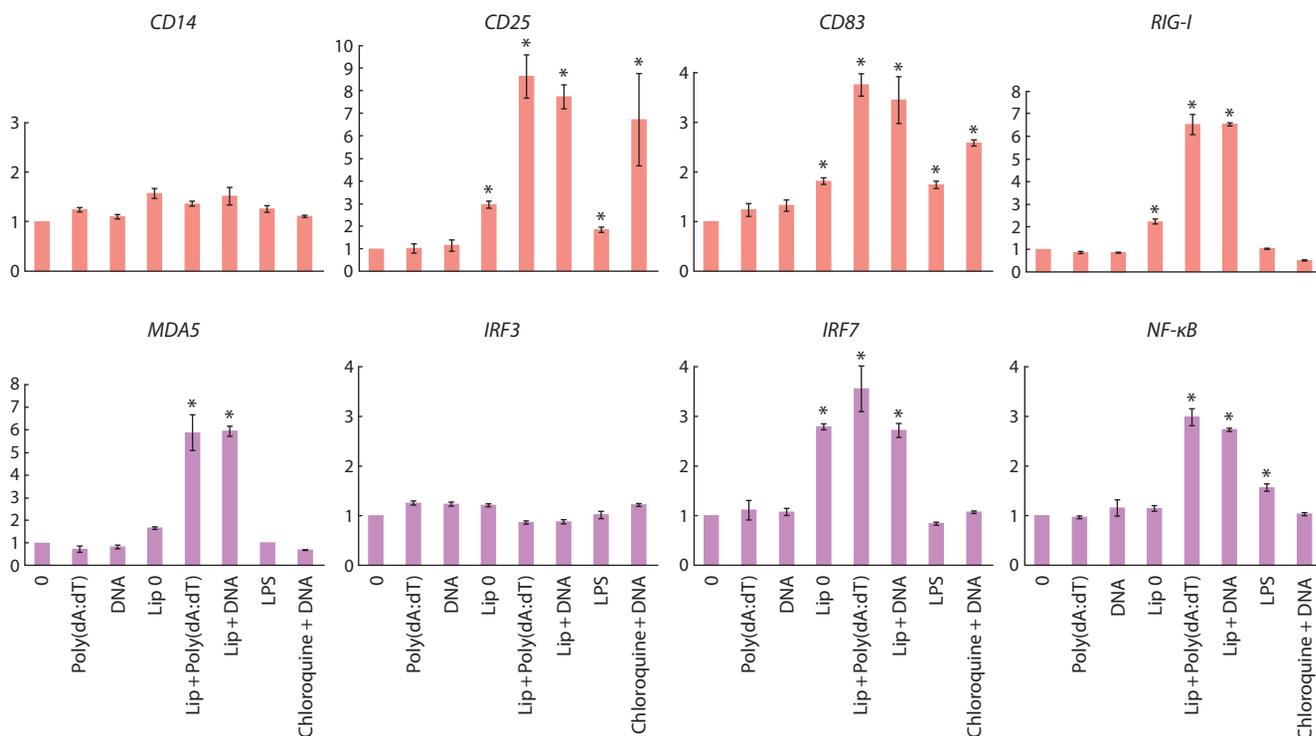


Fig. 2. Relative expression of genes for differentiation antigens (*CD14*, *CD83*), activation antigens (*CD25*), transcription factors (*IRF3*, *IRF7*, *NF-kB*), and transduction of the activation signal (*RIG-I*, *MDA5*) into human DCs. Designations follow Fig. 1.

ренцировки (*CD83*) и активации (*CD25*) в ДК человека без и в условиях обработки хлорохином, после 6- и 24-часовой экспозиции с двуцепочечной ДНК без использования трансфецирующих агентов (липофектамина 2000).

Дендритные клетки были генерированы из моноцитов крови трех доноров в стандартных условиях с использованием ГМ-КСФ и ИФН- α (Alyamkina et al., 2010a). Полученные ДК были обработаны следующим образом: 1) контроль – интактные ДК; 2) ДК, обработанные хлорохином (100 мкМ); 3) ДК + двуцепочечная ДНК (10 мкг/мл); 4) ДК, обработанные хлорохином (100 мкМ), плюс двуцепочечная ДНК (10 мкг/мл). Дендритные клетки с добавлением соответствующих агентов инкубировали в течение 6 и 24 ч, после чего выделялась мРНК и в реакции обратной транскрипции с помощью случайного праймера синтезировалась кДНК. Real-time ПЦР проводили с помощью реагентов SYBR® Green PCR Master Mix на приборе Applied Biosystems®. Для нормирования в качестве внутреннего контроля использовали также ген большой субъединицы Р0 кислого рибосомного фосфорилированного белка (*RPLP0*). Результаты представлены на рис. 3. В этой части работы для ПЦР-анализа были использованы другие, чем в первой части исследования, наборы специфических праймеров. Такой подход позволил в независимом формате оценить сравнительную экспрессию анализируемых генов, что увеличивает достоверность полученных результатов.

Обнаружено, что хлорохин сам по себе вызывает индукцию синтеза мРНК проанализированных цитокинов. Через 6 ч инкубации наблюдалось достоверное увеличение синтеза мРНК *ИЛ-8* и *CD83*. К 24 ч инкубации при

воздействии хлорохина на ДК увеличивался синтез мРНК всех проанализированных генов (см. рис. 3).

Препарат ДНК в виде монопрепарата через 6 ч активирует синтез мРНК *ИФН- α* , *ИФН- β* , *ИФН- γ* , *ИЛ-8*, *ИЛ-10* и *VEGF*. Через 24 ч достоверное увеличение синтеза мРНК сохраняется только для генов *ИФН- α* и *ИЛ-8* (см. рис. 3).

В синергизме ДНК с хлорохином наблюдается увеличение синтеза мРНК *ИФН- α* , *ИФН- β* , *ИЛ-8*, *VEGF* и *CD83* через 6 ч инкубации, продолжающееся до 24 ч. Для генов *ИФН- γ* , *МСР1* и *CD25* достоверное увеличение синтеза мРНК наблюдается только к 24 ч инкубации. Наиболее значительный эффект отмечен для провоспалительного цитокина *ИФН- β* : через 24 ч после индукции в синергизме ДНК с хлорохином у всех трех доноров синтез мРНК вырос до значений, в 140–200 раз превышающих контрольный уровень (см. рис. 3).

Суммируя полученные данные, можно сказать, что обработка ДНК и хлорохином синергично усиливает синтез мРНК проанализированных цитокинов. При синергичном действии наиболее заметно активируются гены провоспалительных цитокинов *ИФН- α* , *ИФН- β* , *ИФН- γ* и *VEGF* к 24 ч индукции.

Обсуждение

В настоящем исследовании первоначально была оценена принципиальная возможность активации дендритных клеток человека, генерированных из моноцитов крови с помощью ГМ-КСФ и ИФН- α , в условиях краткосрочной 6-часовой экспозиции с двуцепочечной ДНК. Об изменении функционального статуса ДК судили по усилению экспрессии генов цитокинов и хемокинов (*ФНО- α* ,

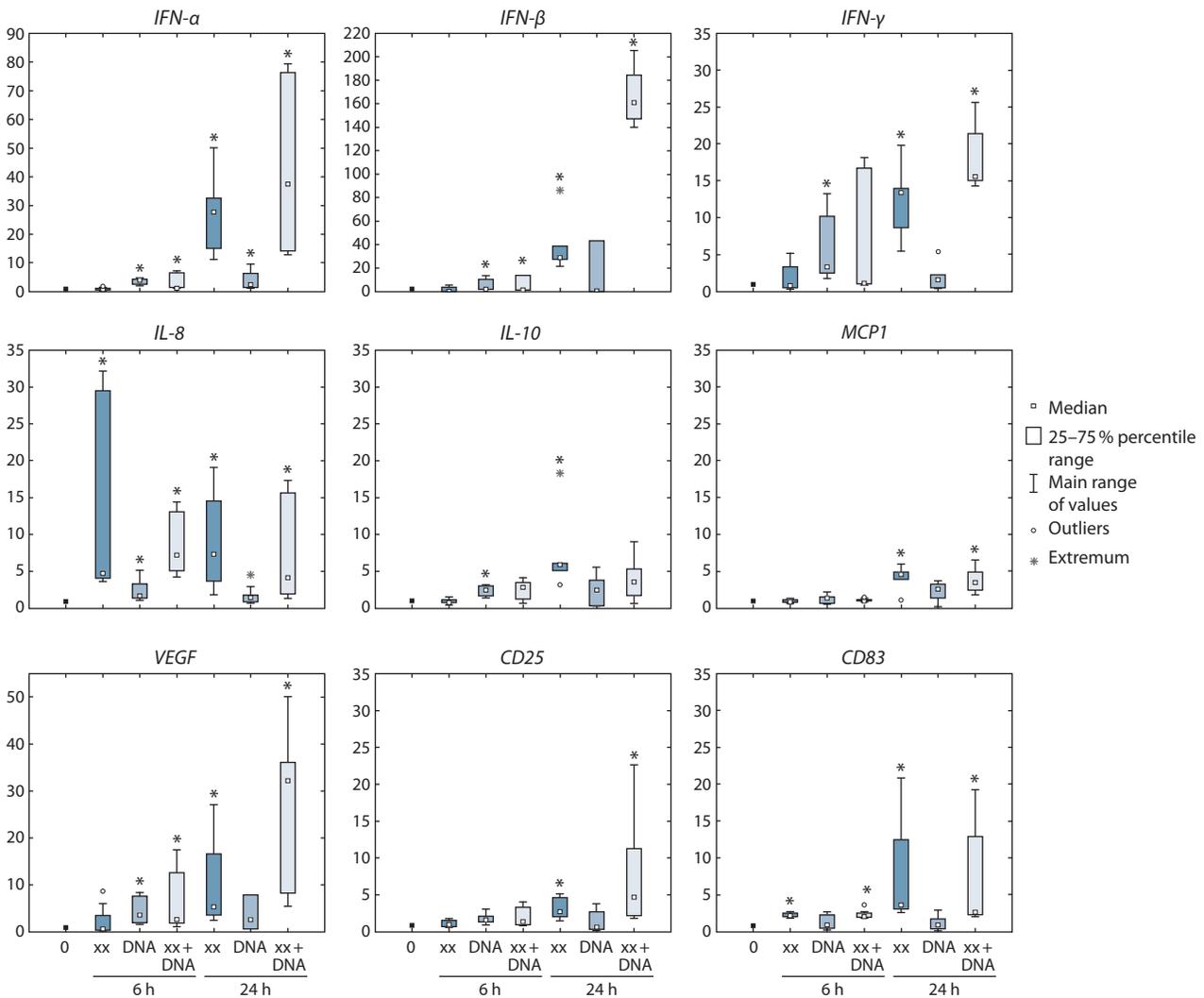


Fig. 3. Relative expression of genes for cytokines and differentiation antigens in human DCs after 6 and 24 hrs of incubation with double-stranded DNA.

(0) Control intact DCs and DCs 6- or 24-h incubation with chloroquine (chq), dsDNA, or dsDNA + chloroquine summarized for three donors. Y-Axis: gene expression in groups studied divided by that in the control group. *Difference from the control group significant at $p < 0.05$.

ИФН- α , ИФН- β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-1РА, ИЛ-18), а также генов, кодирующих антигены дифференцировки (*CD14*, *CD83*), активации (*CD25*), факторы транскрипции (*IRF3*, *IRF7*, *NF- κ B*) и трансдукции активирующего сигнала (*RIG-I*, *MDA5*). Установлено, что за столь короткий временной интервал обработка ДК двуцепочечной ДНК естественным путем (без искусственной интернализации) значимо не влияет на уровень экспрессии проанализированных генов. Полученные данные не вызывают удивления, поскольку 6-часовая инкубация ДК с ЛПС, который является классическим дозревающим стимулом и часто используется в различных протоколах генерации ДК, также сопровождалась лишь незначительным (в 1.5–3.3 раза) усилением экспрессии *CD83*, *CD25*, *NF- κ B* и отдельных цитокинов (ИФН- α , ИЛ-1 α , ИЛ-1 β), тогда как уровень остальных анализируемых генов значимо не менялся. Очевидно, изменения в экспрессии генов и последующая модификация фенотипа и функции ДК

под влиянием двуцепочечной ДНК происходят на более поздних сроках, поскольку ранее нами показано, что в условиях 24-часовой инкубации препарат двуцепочечной ДНК человека (Панаген®) по своему стимулирующему действию на ДК был сопоставим с ЛПС и эффективно индуцировал дифференцировку/созревание ДК, а также усиливал их аллостимуляторную активность в смешанной культуре лимфоцитов (Alyamkina et al., 2010a, b).

Наиболее выраженный стимулирующий эффект ДНК на экспрессию генов в ДК человека в условиях 6-часовой инкубации регистрировался в случае интернализации двуцепочечной ДНК или ее синтетического аналога Poly(dA:dT) с помощью трансфецирующего агента липофектамина 2000 (см. рис. 1 и 2). В результате в ДК значимо повышалась экспрессия интерферонов первого типа (ИФН- α/β), провоспалительных цитокинов (ИФН- α , ИЛ-6) и СХС-хемокинов (ИЛ-8), а также факторов сигналинга (*RIG-I*, *MDA5*, *NF- κ B*). Выявленные изменения

экспрессии генов в ДНК-активированных ДК свидетельствуют об их потенциальной готовности участвовать в качестве «профессиональных» антиген-презентирующих клеток в инициации реакций врожденного иммунитета, в рекрутировании в очаг повреждения/воспаления нейтрофильных гранулоцитов, в индукции острофазового ответа и последующем формировании адаптивного иммунитета в Th1-направлении. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о выраженных иммуностимулирующих свойствах экстраклеточной ДНК.

Другой актуальной биологической задачей в настоящем исследовании была оценка способности фрагментированной двуцепочечной ДНК активировать ДК человека без участия трансфецирующих факторов. При этом представлялось интересным оценить выраженность эффекта в динамике 6- и 24-часовой экспозиции. Дизайн исследования предполагал оценку активирующего влияния двуцепочечной ДНК без и в условиях блокирования TLR9 пути передачи сигнала специфическим ингибитором хлорохином.

Было обнаружено, что препарат двуцепочечной ДНК человека в сочетании с хлорохином имеет сложную картину индукции синтеза мРНК проанализированных цитокинов с явно выраженным синергичным эффектом.

Хлорохин известен прежде всего в качестве антималярийного агента (Schlesinger et al., 1988). Он представляет собой небольшое липофильное, отдающее протон слабое основание, которое способно свободно диффундировать через цитоплазматическую мембрану в депротонизированной форме (Schlesinger et al., 1988). В цитоплазме хлорохин достигает кислых цитоплазматических компарментов – эндосом, лизосом, аккумулируется в них и забирает протон из окружающей среды, становясь протонизированным. При этом происходит увеличение вакуолярной pH, что приводит к защелачиванию внутреннего содержимого эндосом (Krogstad, Schlesinger, 1987). Исследования этого многофункционального агента выявили следующие механизмы его воздействия на эукариотическую клетку. Достигая закисленных внутриклеточных компарментов, и в первую очередь эндосом, хлорохин пертурбирует органеллы, что вызывает нарушение их функций, одной из которых является инактивация TLR9 и связанная с его инактивацией невозможность индукции экспрессии генов провоспалительных цитокинов в ответ на интернализацию бактериальной ДНК, обогащенной метилированными CpG динуклеотидами (Macfarlane, Manzel, 1998). Это свойство хлорохина используется в многочисленных исследованиях при необходимости выключения TLR9 сигнального пути (Huang et al., 2005; von Buttlar et al., 2014). Другое свойство хлорохина было обнаружено при его использовании в низких концентрациях. Оказалось, что стократное снижение концентрации хлорохина, слабо действующее на изменение pH внутриклеточных компарментов, также приводит к нарушению трансдукции сигнала, связанной с формированием TLR9-лиганд комплекса. При этом хлорохин способен напрямую взаимодействовать с чужеродной интернализированной двуцепочечной ДНК, успешно конкурируя в этом с TLR9 (Kuznik et al., 2011).

Анализируя эффекты хлорохина на ДК человека, мы обнаружили его прямое участие в активации экспрессии

генов *ИФН- α/β* , *ИФН- γ* , *ИЛ-10*, *VEGF*, *ИЛ-8*, *МСР1*, а также маркера зрелых ДК (*CD83*), которое наиболее ярко проявлялось после 24-часовой инкубации. Можно предположить, что хлорохин, по-видимому, через механизм генерации ROS, в котором, как предполагается, задействована NOX (и ее активация хлорохином), активирует NF- κ B и последующую экспрессию широкого спектра интерферонов, цитокинов и хемокинов (Park et al., 2003, 2004).

В этой связи наблюдаемое синергичное действие хлорохина и препарата ДНК может быть обусловлено дополнительным собственным воздействием хлорохина на продукцию провоспалительных цитокинов.

Так же, как и в первой серии экспериментов, наблюдается индукция цитокинов первой волны. Активно синтезируется мРНК трех интерферонов *ИФН- $\alpha/\beta/\gamma$* , хемокина *ИЛ-8*. При этом к 24 часам экспозиции достоверно детектируется повышенный синтез мРНК *ИФН- α* и *ИЛ-8*. Оба цитокина – основные участники инициации реакции врожденного иммунного ответа. Именно *ИФН- α* и *ИЛ-8* обеспечивают дифференцировку, созревание и миграцию ДК к поврежденным тканям или очагу воспаления (Zhang et al., 2010).

Следует отметить повышенный синтез мРНК *ИФН- γ* под воздействием препарата ДНК в первые 6 часов эксперимента. Известно, что генная платформа, активируемая *ИФН- γ* , обширна и включает гены многочисленных факторов иммунитета. Предполагается, что ранняя экспрессия гена этого цитокина служит пусковым фактором начала иммуностимулирующей реакции. Аналогичная картина активации гена *ИФН- γ* описана в работе (Huang et al., 2005), где максимально выраженный ответ на стимуляцию ДНК, находящейся в составе НКВА (heat-killed *B. abortus*) в организме экспериментальных животных, развивался к 6–8 часам индукции.

Можно полагать, что в случае наших экспериментов экстраклеточная self ДНК активирует синтез мРНК *ИФН- γ* и последующую ее экспрессию, синтез и секрецию цитокина. Далее по аутокринному и паракринному эффекту происходит кратная автоактивация и активация генов сопряженных факторов иммунитета, что приводит к развитию специфического иммунного ответа.

Так же, как и в первой серии экспериментов, при синергичном действии хлорохина и препарата ДНК значительно усиливается экспрессия генов всех проанализированных цитокинов и костимулирующих молекул, за исключением *ИЛ-10*, что еще раз свидетельствует о сложных внутриклеточных взаимодействиях антималярийного агента и фрагментов self ДНК.

Acknowledgments

The work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0003 and the Russian Foundation for Basic Research, projects 12-04-00954 and 16-34-00007. The authors are grateful to Drs D.E. Ivanoshchuk and P.S. Orlov for valuable advice.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Kiseleva E.V., Orishchenko K.E., Sakhno L.V., Gel'fgat E.L., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous allo-genic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity. *Cell. Immunol.* 2010a;262:120-126. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.01.005.
- Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. *Cell. Immunol.* 2010b; 266: 46-51. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.08.011.
- Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8+ cytotoxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice. *Cell. Immunol.* 2012;276:59-66. DOI 10.1016/j.cellimm.2012.04.004.
- Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Rogachev V.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Intracellular systems for detection of exogenous nucleic acids and mechanisms triggering the immune response to DNA internalization. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2013;15(5):413-430. (in Russian)
- Anker P. Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000;906:5-7.
- Barbalat R., Ewald S.E., Mouchess M.L., Barton G.M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2011;29:185-214. DOI 10.1146/annurev-immunol-031210-101340.
- Barber G.N. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol. Rev.* 2011a;243(1):99-108. DOI 10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x.
- Barber G.N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr. Opin. Immunol.* 2011b;23(1):10-20. DOI 10.1016/j.coi.2010.12.015.
- Choi J.J., Reich C.F. III, Pisetsky D.S. The role of macrophages in the *in vitro* generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*. 2005;115(1):55-62. DOI 10.1111/j.1365-2567.2005.02130.x.
- Decker P., Singh-Jasuja H., Haager S., Kötter I., Rammensee H.G. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J. Immunol.* 2005;174(6): 3326-3334.
- Fernandes-Alnemri T., Yu J.W., Datta P., Wu J., Alnemri E.S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009;458(7237):509-513. DOI 10.1038/nature07710.
- Franco L.H., Wowk P.F., Silva C.L., Trombone A.P., Coelho-Castelo A.A., Oliver C., Jamur M.C., Moretto E.L., Bonato V.L. A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells. *Genet. Vaccines Ther.* 2008;6:3. DOI 10.1186/1479-0556-6-3.
- Giacona M.B., Ruben G.C., Iczkowski K.A., Roos T.B., Porter D.M., Sorenson G.D. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998;17(1):89-97.
- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-745. DOI 10.1038/35047123.
- Holmgren L., Szeles A., Rajnavölgyi E., Folkman J., Klein G., Ernberg I., Falk K.I. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood*. 1999;93(11):3956-3963.
- Huang L.Y., Ishii K.J., Akira S., Aliberti J., Golding B. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *J. Immunol.* 2005;175(6):3964-3970. DOI 10.4049/jimmunol.175.6.3964.
- Ishii K.J., Akira S. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol.* 2006;27(11):525-532. DOI 10.1016/j.it.2006.09.002.
- Ishii K.J., Akira S. Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids. *Curr. Opin. Immunol.* 2008;20(5):524-529. DOI 10.1016/j.coi.2008.07.002.
- Ishii K.J., Coban C., Kato H., Takahashi K., Torii Y., Takeshita F., Ludwig H., Sutter G., Suzuki K., Hemmi H., Sato S., Yamamoto M., Uematsu S., Kawai T., Takeuchi O., Akira S. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* 2006;7(1):40-48. DOI 10.1038/nri1282.
- Ishii K.J., Suzuki K., Coban C., Takeshita F., Itoh Y., Matoba H., Kohn L.D., Klinman D.M. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J. Immunol.* 2001;167(5):2602-2607.
- Jiang W., Reich III C.F., Pisetsky D.S. Mechanisms of activation of the RAW264.7 macrophage cell line by transfected mammalian DNA. *Cell. Immunol.* 2004;229(1):31-40. DOI 10.1016/j.cellimm.2004.06.003.
- Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-650. DOI 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
- Kis-Toth K., Szanto A., Thai T.H., Tsokos G.C. Cytosolic DNA-activated human dendritic cells are potent activators of the adaptive immune response. *J. Immunol.* 2011;187(3):1222-1234. DOI 10.4049/jimmunol.1100469.
- Krieg A.M. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat. Med.* 2003;9(7):831-835.
- Krogstad D.J., Schlesinger P.H. The basis of antimalarial action: non-weak base effects of chloroquine on acid vesicle pH. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987;36(2):213-220.
- Kuznik A., Bencina M., Svajcer U., Jeras M., Rozman B., Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J. Immunol.* 2011;186(8):4794-4804. DOI 10.4049/jimmunol.1000702.
- Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W., Wainscoat J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485-487. DOI 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.
- Macfarlane D.E., Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J. Immunol.* 1998;160(3):1122-1131.
- Martin D.A., Elkon K.B. Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):951-962. DOI 10.1002/art.21677.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-826. DOI 10.1038/nature06246.
- Ngan R.K., Yip T.T., Cheng W.W., Chan J.K., Cho W.C., Ma V.W., Wan K.K., Au J.S., Law C.K. Clinical role of circulating Epstein-Barr virus DNA as a tumor marker in lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004;1022:263-270. DOI 10.1196/annals.1318.041.
- Orishchenko K.E., Ryzhikova S.L., Druzhimina Y.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A., Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Strunov A.A., Kiseleva E.V., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Sidorov S.V., Mayorov V.I., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of human double-stranded DNA preparation on the production of cytokines by dendritic cells and peripheral blood cells from relatively healthy donors. *Cancer Therapy*. 2013;8:191-205.
- Park J., Choi K., Jeong E., Kwon D., Benveniste E.N., Choi C. Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia*. 2004;47(1):9-20. DOI 10.1002/glia.20017.
- Park J., Kwon D., Choi C., Oh J.W., Benveniste E.N. Chloroquine induces activation of nuclear factor-kappaB and subsequent expression of pro-inflammatory cytokines by human astroglial cells. *J. Neurochem.* 2003;84(6):1266-1274.

- Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Sidorov S.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Leplina O.Y., Dvornichenko V.V., Ponomarenko D.M., Soldatova G.S., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Uchakin P.N., Zagrebelniy S.N., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Results of multicenter double-blind placebo-controlled phase II clinical trial of Panagen preparation to evaluate its leukostimulatory activity and formation of the adaptive immune response in patients with stage II–IV breast cancer. *BMC Cancer*. 2015;15(1):122. DOI 10.1186/s12885-015-1142-z.
- Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Potter E.A., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Sidorov S.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Leplina O.Y., Dvornichenko V.V., Ponomarenko D.M., Soldatova G.S., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Uchakin P.N., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Five-year disease-free survival among stage II–IV breast cancer patients receiving FAC and AC chemotherapy in phase II clinical trials of Panagen. *BMC Cancer*. 2016;16:651. DOI 10.1186/s12885-016-2711-5.
- Rogachev V.A., Likhacheva A., Vratskikh O., Mechetina L.V., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Yakubov L.A., Shurdov M.A. Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell. *Cancer Cell Int*. 2006;6:23. DOI 10.1186/1475-2867-6-23.
- Schlesinger P.H., Krogstad D.J., Herwaldt B.L. Antimalarial agents: mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1988;32(6):793-798.
- Sharma S., Fitzgerald K.A. Innate immune sensing of DNA. *PLoS Pathog*. 2011;7(4):e1001310. DOI 10.1371/journal.ppat.1001310.
- Shirota H., Ishii K.J., Takakuwa H., Klinman D.M. Contribution of interferon-beta to the immune activation induced by double-stranded DNA. *Immunology*. 2006;118(3):302-310.
- Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Olson-Sand A., Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta*. 2001;313(1-2):139-142.
- Suzuki K., Mori A., Ishii K.J., Saito J., Singer D.S., Klinman D.M., Krause P.R., Kohn L.D. Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999;96(5):2285-2290.
- Takeshita F., Ishii K.J. Intracellular DNA sensors in immunity. *Curr. Opin. Immunol*. 2008;20(4):383-388. DOI 10.1016/j.coi.2008.05.009.
- Tamkovich S.N., Vlasov V.V., Laktionov P.P. Circulating deoxyribonucleic acids in blood and their using in medical diagnostics. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology (Moscow)*. 2008;42(1):12-23. (in Russian)
- Unterholzner L., Keating S.E., Baran M., Horan K.A., Jensen S.B., Sharma S., Sirois C.M., Jin T., Latz E., Xiao T.S., Fitzgerald K.A., Paludan S.R., Bowie A.G. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol*. 2010;11(11):997-1004. DOI 10.1038/ni.1932.
- von Buttlar H., Siegemund S., Büttner M., Alber G. Identification of Toll-like receptor 9 as parapoxvirus ovis-sensing receptor in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e106188. DOI 10.1371/journal.pone.0106188.
- Wang T., Liang Z.A., Sandford A.J., Xiong X.Y., Yang Y.Y., Ji Y.L., He J.Q. Selection of suitable housekeeping genes for real-time quantitative PCR in CD4(+) lymphocytes from asthmatics with or without depression. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e48367. DOI 10.1371/journal.pone.0048367.
- Würtele H., Little K.C., Chartrand P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther*. 2003;10(21):1791-1799. DOI 10.1038/sj.gt.3302074.
- Yasuda K., Ogawa Y., Yamane I., Nishikawa M., Takakura Y. Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Leukoc. Biol*. 2005;77(1):71-79.
- Yasuda K., Richez C., Uccellini M.B., Richards R.J., Bonegio R.G., Akira S., Monestier M., Corley R.B., Viglianti G.A., Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R. Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic cell activation induced by DNA-containing immune complexes. *J. Immunol*. 2009;183(5):3109-3117. DOI 10.4049/jimmunol.0900399.
- Yoneyama M., Fujita T. Cytoplasmic double-stranded DNA sensor. *Nat. Immunol*. 2007;8(9):907-908. DOI 10.1038/ni0907-907.
- Zhang R., Xing M., Ji X., Gu L., Yang X., Wang H., Jiang P. Interferon-alpha and interleukin-6 in SLE serum induce the differentiation and maturation of dendritic cells derived from CD34+ hematopoietic precursor cells. *Cytokine*. 2010;50(2):195-203. DOI 10.1016/j.cyto.2010.02.017.
- Zhu F.G., Reich C.F., Pisetsky D.S. Effect of cytofectins on the immune response of murine macrophages to mammalian DNA. *Immunology*. 2003;109(2):255-262.