

Динамика экспрессии транскрипционных факторов REL, RELA и IRF1 в макрофагоподобной линии U937 после воздействия диоксина

Е.В. Кашина¹, Д.Ю. Ощепков¹, Е.В. Антонцева¹, М.Ю. Шаманина¹, Д.П. Фурман^{1,2}, В.А. Мордвинов^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия

Арил-гидрокарбонный рецептор (AhR) – это активируемый лигандом транскрипционный фактор, который участвует в широком диапазоне критических клеточных событий в ответ на эндогенные сигналы или ксенобиотики. Одним из наиболее известных лигандов, имеющим максимальное сродство к AhR, является 2,3,7,8-тетрахлордибензо-пара-диоксин (ТХДД, диоксин). Среди диоксиновых ксенобиотиков ТХДД наиболее токсичен и вызывает широкий спектр биологических реакций, включая иммуноотсичность и рак. Комплекс лиганд:AhR:ARNT функционирует как транскрипционный фактор, связываясь со специфической последовательностью в регуляторной области генов-мишеней, называемой dioxin responsive element (DRE). Макрофаги являются ключевыми регуляторами врожденного иммунного ответа и, располагаясь во всех органах и тканях организма, одними из первых встречаются с ксенобиотиками, поэтому изучение влияния диоксина на макрофаги имеет большое значение. Распознавание потенциальных DRE в регуляторных районах генов, кодирующих транскрипционные факторы IRF1, REL, RELA, экспрессирующиеся в макрофагах, проводилось с помощью программного пакета SITECON. Ядерный экстракт и РНК были выделены из макрофагоподобных клеток линии U937, обработанных 10 нМ концентрацией ТХДД (или 0.1 % ДМСО в качестве контроля) в течение 1, 3 и 6 ч. Гель-ретардация с олигонуклеотидами, содержащими потенциально активные DRE, специфичные для промоторных районов *IRF1*, *REL*, *RELA* генов, контрольными олигонуклеотидами и антителами к AhR подтвердила, что AhR вовлечен в образование ДНК/белковых комплексов. Результаты количественной ПЦР-ПВ демонстрируют достоверное повышение уровней экспрессии этих генов при воздействии 10 нМ концентрации на U937 макрофаги через 1 ч (характерное время максимальной транслокации комплекса диоксин:AhR:ARNT в ядро). Совокупность полученных результатов подтверждает функциональную активность выявленных DRE, расположенных в регуляторных районах генов *IRF1*, *REL*, *RELA* через Ah-рецепторный путь передачи сигналов.

Ключевые слова: макрофаг; диоксин; AhR; транскрипционные факторы REL, RELA, IRF1.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кашина Е.В., Ощепков Д.Ю., Антонцева Е.В., Шаманина М.Ю., Фурман Д.П., Мордвинов В.А. Динамика экспрессии транскрипционных факторов REL, RELA и IRF1 в макрофагоподобной линии U937 после воздействия диоксина. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):894-898. DOI 10.18699/VJ16.210

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kashina E.V., Oshchepkov D.Y., Antontseva E.V., Shamanina M.Y., Furman D.P., Mordvinov V.A. Dynamics of REL, RELA and IRF1 transcription factor expression in U937 macrophages after dioxin exposure. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):894-898. DOI 10.18699/VJ16.210

ORIGINAL ARTICLE

Received 03.11.2016

Accepted for publication 14.12.2016

© AUTHORS, 2016

e-mail: alena_kashina@bionet.nsc.ru

Dynamics of REL, RELA and IRF1 transcription factor expression in U937 macrophages after dioxin exposure

E.V. Kashina¹, D.Y. Oshchepkov¹, E.V. Antontseva¹, M.Y. Shamanina¹, D.P. Furman^{1,2}, V.A. Mordvinov^{1,3}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular Biology and Biophysics SB RAMS, Novosibirsk, Russia

The aryl hydrocarbon receptor (AhR), a ligand-activated transcription factor, participates in a wide range of critical cellular events in response to endogenous signals or xenobiotic chemicals. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD) is one of the AhR ligands with a very high binding affinity for the AhR. TCDD is the most toxic among the dioxin xenobiotics and induces a broad spectrum of biological responses, including immunotoxicity and cancer. The complex ligand:AhR:ARNT functions as a transcription factor, binding to the dioxin responsive element (DRE) sequences in the regulatory regions of target genes. Macrophages are key regulators of the innate immune response, as well as one of the first types of cells which respond to chemical stress, so the study of the action of TCDD on these cells is important. Putative DREs were predicted using the SITECON software tool in the regulatory regions of the genes encoding transcription factors REL, RELA and IRF1 expressed in macrophages. Nuclear extract and total RNA were isolated from U937 macrophages treated with 10 nM TCDD (or 0.1 % DMSO as a control) for 1, 3 and 6 hours. The binding of the TCDD:AhR:ARNT transcription complex from the nuclear extract with double-stranded oligonucleotides containing the putative DREs was studied by the EMSA. Isolated RNA was used for the study of the TCDD-mediated alteration of gene expression levels using Real-time PCR with SYBR Green I. Obtained data demonstrate the functional activity of DREs in the *IRF1*, *REL*, *RELA* gene promoters via AhR signaling pathway.

Key words: macrophage; dioxin; AhR; transcription factors REL, RELA, IRF1.

Арил-гидрокарбонный рецептор (AhR) – это транскрипционный фактор, являющийся членом bHLH-PAS семейства белков (Connor, Aylward, 2006). В отсутствие лиганда AhR располагается в цитоплазме клетки в комплексе с димером белков-шаперонов HSP90 и белками-кошаперонами P23 и XAP-2 (Fujii-Kuriyama, Kawajiri, 2010). К лигандам арил-гидрокарбонного рецептора относятся большая группа химических веществ – как эндогенных (билирубин, метаболиты триптофана), так и экзогенных (полиароматические углеводороды, бифенилы) (Denison, Nagy, 2003). 2,3,7,8-Тетрахлордибензо-пара-диоксин (далее ТХДД или диоксин) – это один из наиболее известных лигандов AhR, имеющий максимальное сродство к нему (Mulero-Navarro, Fernandez-Salguero, 2016). После связывания с лигандом цитоплазматический комплекс белков диссоциирует, и AhR, оставшись связанным с лигандом, транслоцируется в ядро, где взаимодействует с белком ARNT. Комплекс лиганд:AhR:ARNT взаимодействует со специфической последовательностью в регуляторной области генов-мишеней, называемой dioxin responsive element (DRE) (Connor, Aylward, 2006), что инициирует транскрипцию соответствующих генов. Коровой консенсусной последовательностью DRE является 5'-TNGCGTG-3' (Boutros et al., 2004). При взаимодействии комплекса диоксин:AhR:ARNT с DRE AhR контактирует с 5'-TNGC, а ARNT – с GTG-3' полусайтами консенсусной последовательности (Sun et al., 2004).

Известно, что воздействие диоксина на организм человека вызывает широкий спектр эффектов, выражающихся в поражении репродуктивной, нервной, эндокринной систем организма (Mandal, 2005). В последнее время все больше внимания уделяется его воздействию и на иммунную систему. Доказано, что ТХДД влияет на дифференцировку CD4+ и CD8+ Т-клеток, дифференцировку дендритных клеток, а также уменьшает их количество, подавляет образование антител В-клетками, изменяет процессы активации полиморфно-ядерных клеток (Kerkvliet, 2012). Опубликованы результаты ряда экспериментальных работ и по воздействию диоксина на макрофаги, особый интерес к которым обусловлен их полифункциональностью (Biswas et al., 2012). Они участвуют в процессах фагоцитоза чужеродных веществ и бактерий, в кооперации с Т- и В-лимфоцитами реализуют и регулируют иммунный ответ, способны проявлять цитотоксическое действие на опухолевые клетки (Gordon, Taylor, 2005). Доказано, что воздействие ТХДД на макрофаги стимулирует экспрессию ряда цитокинов, например ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО- α (Sciullo et al., 2009), а также некоторых транскрипционных факторов, таких как Baff и IRF3 (Esser et al., 2009).

Биоинформатический анализ, проведенный ранее нашей группой, показал, что список цитокинов и транскрипционных факторов, экспрессия которых, вероятно, способна модулироваться под воздействием диоксина, может быть значительно расширен (Furman et al., 2009). В результате экспериментальной проверки нами установлен двойной механизм регуляции экспрессии ИЛ-12 при воздействии диоксина (Oshchepkov et al., 2014). Сначала происходит прямая активация его транскрипции диоксинсодержащим комплексом арил-гидрокарбонного рецептора через DRE в промоторе, а в последующем, вследствие влияния транс-

крипционного фактора ATF3, происходит существенное снижение экспрессии ИЛ-12. Подобная модуляция продукции цитокинов макрофагом может наблюдаться и при воздействии других транскрипционных факторов. Поэтому представляется интересным проанализировать на наличие DRE и их функциональность ряд транскрипционных факторов, влияющих на регуляцию синтеза цитокинов макрофагом, и в особенности на синтез ИЛ-12 и продукцию интерферона гамма, таких как IRF1, REL и RELA.

Материалы и методы

В работе использовались следующие реактивы: [α -32P] ATP (6000 Ci/mM) (Costa Mesa, США); DNase I RNase-free (Fermentas, США); набор для проведения обратной транскрипции HighCapacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, США); реакционная смесь M-436 для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I («Синтол», Россия); этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) («Хеликон», Россия); бромистый этидий, бромфеноловый синий, 4-форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), пенициллин-стрептомицин и среда RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США); агароза (Hybaid-AGS, Германия); ДНК-маркер 100 п. н. (10 фрагментов от 100 до 1000 п. н.) («СибЭнзим», Россия); 2,3,7,8-ТХДД (чистота > 99.99 %) («НПО Экрос», Россия); диметилсульфоксид (ДМСО) (чистота > 99.99 %) и таблетированный препарат натрий-фосфатного буфера (Amresco, США); коктейль ингибиторов протеаз (Pierce, США); фетальная бычья сыворотка с проведенной тепловой декомплементацией (Thermo Fisher Scientific, США).

Поиск потенциальных сайтов связывания арил-гидрокарбонного рецептора. Поиск DRE в регуляторных районах генов проводился с помощью программного пакета SITECON (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/sitecon/>; Oshchepkov et al., 2004), в соответствии с процедурой, описанной нами ранее (Furman et al., 2009). Для идентификации DRE параметры метода были выбраны таким образом, что ошибка первого рода (недопредсказание) была равна нулю, что означает безошибочное распознавание сайтов во всех последовательностях из обучающей выборки. Последовательности были извлечены из базы данных UCSC Genome Browser database (Meyer et al., 2013). Анализировались участки генов от –5000 до +600 относительно старта транскрипции.

Культивирование клеток. Исследования проводились на перевиваемой гистиомоноцитной клеточной линии человека U937, полученной из коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор». С целью получения макрофагального фенотипа клетки инкубировали с 4-форбол-12-миристан-13-ацетатом в концентрации 0.2 мкг/мл в течение 48 ч, затем клетки отмывали стерильным фосфатным буфером и на трое суток помещали в полную среду (RPMI 1640 (10 % FBS)), не содержащую форболового эфира. Полученные макрофагоподобные клетки (далее – U937 макрофаги) обрабатывались 10 нМ/л концентрацией 2,3,7,8-ТХДД (опыт) или 0.1 % (v/v) диметилсульфоксидом (контроль) в течение 1, 3 и 6 ч. По окончании времени воздействия клетки собирали с помощью скребка и использовали для получения суммарной РНК и ядерного экстракта.

Метод задержки ДНК-зонда в геле белками ядерного экстракта. Получение белкового экстракта ядер из U937 макрофагов проводили следующим методом: 10^7 клеток инкубировали с 1 мл лизирующего буфера (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1 mM ДТТ, 0.5 mM спермидина, 0.15 mM спермина, 0.1 mM ЭДТА, 0.1 mM ЭГТА, 0.5 mM ПМСФ, коктейль ингибиторов протеаз Pierce) в течение 15 мин на льду, затем добавляли 62 мкл 10 % NP-40 и центрифугировали в течение 5 мин при 4 °С, 400 g. Осадок ядер лизировали в буфере (20 mM Hepes, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 25 % глицерин, коктейль ингибиторов протеаз Pierce) в течение 20 мин на льду, после чего центрифугировали 10 мин при 4 °С, 10000 g. Супернатант, содержащий суммарный белок ядер, отбирали в чистую пробирку, измеряли концентрацию на спектрофотометре по методу Бредфорда, фасовали на алиquotы и хранили при -72 °С. В качестве ДНК-зондов использовали двуцепочечные олигонуклеотиды, соответствующие районам расположения предсказанных сайтов связывания AhR. Введение метки в ДНК-зонд осуществляли с помощью достройки укороченных 3'-концов фрагментом Клёнова ДНК-полимеразы I. Реакцию вели 5 мин при комнатной температуре в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 0.01 mM олигонуклеотида, 1 мкл 10× буфера для мечения (500 mM трис-HCl pH = 8.0, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, 2 mM dГТФ, 2 mM dТТФ, 2 mM dСТФ), 2 единицы активности фрагмента Клёнова, 10 мкКи (α -32P)dATФ. Для очистки олигонуклеотидов от не включившейся метки реакционную смесь наносили на ионообменную бумагу ДЕАЕ-81 и промывали 0,25 M KN₂PO₄.

Анализ связывания фрагментов ДНК с белками ядерных экстрактов проводили по следующей методике: белковый ядерный экстракт инкубировали с обработанной ультразвуком ДНК спермы лосося (из расчета 1 мкг ДНК на 7 мкг суммарного белка) в течение 10 мин на льду для предотвращения неспецифического связывания белков с ДНК-зондом. После этого 4 мкг экстракта добавляли к пробам, содержащим 50 пМ радиоактивно меченого ДНК-зонда, и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Электрофорез вели в 4.5 % ПААГ в 0.5×TBE при 4 °С. Гель выдерживали в фиксирующем растворе, высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Суммарная РНК выделялась с помощью набора Aurum Total RNA Mini Kit (производство Bio-Rad). Качество и количество выделенной РНК оценивались на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (RIN \geq 7 для всех проб), согласно инструкции производителя. ДНКазную обработку проводили набором DNase I, RNase-free фирмы Fermentas, согласно инструкции производителя. Для синтеза кДНК использовали набор High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Уровень экспрессии генов REL, RELA, IRF1 и CYP1A1 определяли методом количественной ПЦР в реальном времени, используя набор реактивов «M-436» для ПЦР-РВ, в присутствии SYBR Green I («Синтол») на приборе ABI PRISM 7000. Дизайн праймеров для вышеперечисленных генов и гена ACTB (как эндогенного контроля) осуществлялся

с помощью программы Primer Express® Software v2.0 (Applied Biosystems). Последовательности праймеров: CYP1A1 F (5'-CCCAGCTCAGCTCAGTACCT-3'); CYP1A1 R (5'-GAGGCCAGAGAAGAACTCCGT-3'); ACTB F (5'-TGGCATTGCCGACAGGAT-3'); ACTB R (5'-CGGAGTACTTGCGCTCAGGA-3'); REL F (5'-GACCAGGATGGTCTTGAACCTCC-3'); REL R (5'-GACCAGGTCTTGGTCTCTCAGG-3'); RELA F (5'-TCAAGATCTGCCGAGTGACC-3'); RELA R (5'-CACCTCAATGTCCTCTTTCTGC-3'); IRF1 F (5'-GCACCAGTGATCTGTACAACCTCC-3'); IRF1 R (5'-TCATGATGTCCTCAGGTAATTTCC-3'). Условия проведения реакции соответствовали инструкции производителя набора для ПЦР-РВ и были одинаковы для всех пар праймеров.

Статистический анализ. Полученные в результате количественной ПЦР-РВ данные от нескольких независимых экспериментов, проведенных на разных клеточных пассажах, были подвергнуты статистическому анализу с использованием программы Statistica 6.0 (Statsoft, США), визуализированы с помощью Microsoft Office Excel 2007 и Microsoft Office PowerPoint 2007 (Microsoft, США). Достоверность различий между экспериментальными группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программы Statistica 6.0 (Statsoft, США).

Результаты

Результат поиска сайтов связывания. Результаты распознавания потенциальных DRE в регуляторных районах генов транскрипционных факторов IRF1, REL и RELA, экспрессирующихся в макрофаге, суммированы в табл. 1.

Одним из показателей, позволяющих оценить выявленные сайты как потенциальные DRE, являлась их позиция вблизи старта транскрипции (Sun et al., 2004; Fujita et al., 2006). Как видно из приведенных данных, в каждом гене присутствуют DRE, расположенные не далее 500 п. о. от старта транскрипции, что делает их вероятными участниками регуляции этих генов при воздействии диоксина. Для выборочной экспериментальной проверки методом задержки в геле было выбрано по одному DRE для каждого из генов транскрипционных факторов REL, RELA, IRF1.

Метод задержки ДНК-зонда в геле белками ядерного экстракта. Для доказательства AhR-зависимого механизма активации генов транскрипционных факторов IRF1, REL и RELA в U937 макрофагах под действием 10 нМ/л концентрации диоксина использовали метод задержки ДНК-зонда в геле белками ядерного экстракта. В качестве дополнительного контроля был взят функциональный DRE из гена CYP1A1, кодирующего один из ферментов, осуществляющих биотрансформацию ксенобиотиков. Быстрое и длительное повышение экспрессии гена CYP1A1 наблюдается во множестве типов клеток, включая макрофаги, в ответ на обработку диоксином (Sciullo et al., 2009). Появление ДНК-связывающей формы AhR в ядерном экстракте, выделенном из U937 макрофагов, выявляли с помощью добавления антител к арил-гидрокарбонному рецептору. После инкубации ядерного экстракта с антителами к AhR (+) происходит ослабление формирования ДНК-белкового комплекса K, что видно из попарного сравнения дорожек 1 и 2, 3 и 4, 5 и 6, 7 и 8 (рис. 1).

Table 1. DREs predicted in the genes encoding the REL, RELA and IRF1 transcription factors

Gene	Site position relative to the transcription initiation site	Site sequence
<i>IRF1</i>	<u>-145</u>	cggctGCGTGccgt
<i>REL</i>	<u>-207</u> <u>-346</u>	ggggaGCGTGcgcg tagcaGCGTGagaa
<i>RELA</i>	<u>-110</u> <u>-137</u> <u>-199</u>	gcgcgGCGTGcact gctgtGCGTGcagc ggctgGCGTGcccg
Consensus sequence		TNGCGTG

DREs taken into subsequent experimental validation are underlined.

Добавление антител способствует образованию нового комплекса С (суперсдвиг с антителами к AhR), появляющегося на дорожках 4, 6 и 8, что служит дополнительным подтверждением специфичности исследуемого комплекса. Полученные результаты свидетельствуют, что AhR вовлечен в образование ДНК/белковых комплексов с P³² мечеными олигонуклеотидами, содержащими предсказанные DRE, расположенные в промоторных районах генов транскрипционных факторов *IRF1*, *REL* и *RELA*.

Результаты количественной ПЦР в реальном времени. Результаты ПЦР в реальном времени демонстрируют изменение уровней экспрессии исследуемых генов при воздействии 10 нМ/л концентрации диоксина (рис. 2, табл. 2) по сравнению с уровнями экспрессии в контроле (клетки, обработанные 0,1 % ДМСО). Наблюдается увеличение уровня экспрессии исследуемых генов и контрольного гена *CYP1A1* через 1 ч с момента воздействия (см. рис. 2), что соответствует литературным данным о времени максимальной транслокации транскрипционного комплекса диоксин:AhR:ARNT в ядро (Komura et al., 2001).

Однако уже через 3 ч уровень экспрессии мРНК всех трех генов транскрипционных факторов был сопоставим с уровнями экспрессии в контрольной группе (см. табл. 2).

Уровень экспрессии мРНК контрольного гена *CYP1A1* демонстрирует устойчивое нарастание в зависимости от времени воздействия диоксином, что согласуется с литературными данными (Sciullo et al., 2009).

Обсуждение

Гель-ретардация с олигонуклеотидами, содержащими потенциально активные DRE, специфичные для промоторных районов *IRF1*, *REL*, *RELA* генов, контрольным олигонуклеотидом и антителами к AhR подтвердила, что AhR вовлечен в образование ДНК/белковых комплексов.

Результаты количественной ПЦР-РВ демонстрируют достоверное повышение уровней экспрессии генов *IRF1*, *REL*, *RELA* в результате воздействия 10 нМ/л концентрации диоксина на U937 макрофаги по сравнению с контролем (0.1 % ДМСО) через 1 ч, что является характерным временем максимальной транслокации комплекса диоксин:AhR:ARNT в ядро (Komura et al., 2001). Таким

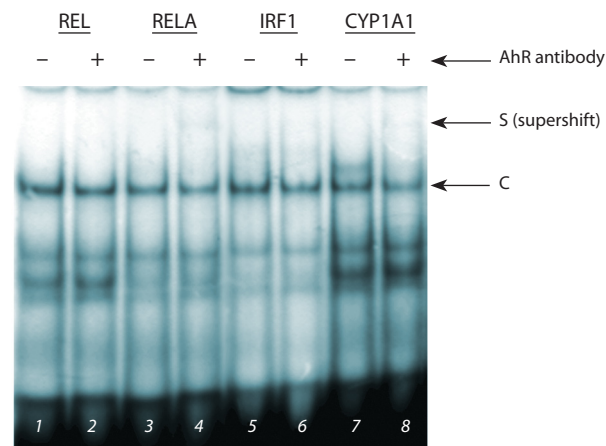


Fig. 1. The binding of nuclear extract proteins obtained from U937 macrophages to α -³²P-end-labeled oligonucleotides containing DREs.

The electrophoretic image of DNA-protein complexes formed by incubation of α -³²P-end-labeled oligonucleotides containing predicted DREs for the *IRF1*, *REL* and *RELA* genes and a control DRE from the *CYP1A1* gene enhancer with nuclear extract proteins obtained from cells treated with 10 nM dioxin for 24 h. C, the retention band corresponding to the dioxin:AhR:ARNT protein complex with the oligonucleotide containing a putative DRE.

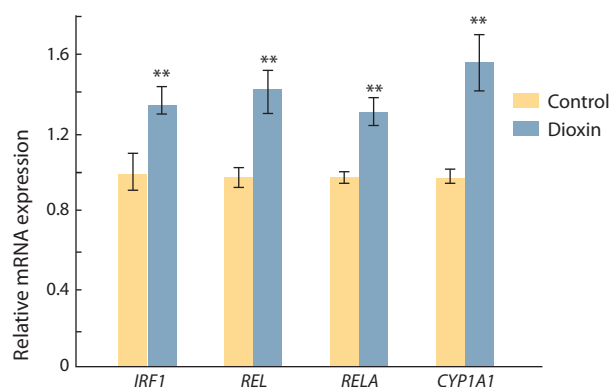


Fig. 2. Effects of 2,3,7,8-TCDD on the mRNA expression of *IRF1*, *REL*, *RELA* and *CYP1A1* genes in U937 macrophages after 1 hour of exposure.

Cells were treated with 10 nM 2,3,7,8-TCDD for 1 hour (dioxin) or 0.1 % DMSO (control). The levels of the mRNA expressions of the genes were measured by qPCR and normalized to the expression of *ACTB*. The Y-axis shows the mean values of the relative mRNA expression and the standard error of the mean. **compared to the control, $p < 0.01$.

образом, совокупность полученных результатов подтверждает функциональную активность предсказанных DRE, расположенных в регуляторных районах генов *IRF1*, *REL*, *RELA*, и позволяет сделать вывод о том, что транскрипционная индукция этих генов опосредуется через Ah-рецепторный путь передачи сигнала.

Наблюдаемые через 3 и 6 ч после воздействия диоксина на U937 макрофаги уровни экспрессии мРНК генов *IRF1* и *RELA* не отличаются от экспрессии этих генов в контроле (см. табл. 2). Это позволяет предположить, что регуляторная сеть компенсирует воздействие диоксина на указанные транскрипционные факторы, однако отклик этой регуляторной сети возможен для других ее компонентов.

Table 2. Early effects of 10nM 2,3,7,8-TCDD on the mRNA expression of the *IRF1*, *REL*, *RELA*, and *CYP1A1* genes in U937 macrophages

Time, h	Relative mRNA expression levels							
	<i>IRF1</i>		<i>REL</i>		<i>RELA</i>		<i>CYP1A1</i>	
	C	D	C	D	C	D	C	D
3	1.002±0.13	1.11±0.26	0.960±0.19	0.99±0.17	0.96±0.12	1.06±0.19	0.95±0.13	3.59±0.45***
6	1.07±0.23	1.10±0.22	0.997±0.06	1.55±0.23**	0.99±0.06	1.14±0.27	0.99±0.1	6.03±0.85***

Cells were treated with 10 nM 2,3,7,8-TCDD for 3 and 6 hours (dioxin, D) or 0.1 % DMSO (control, C). The levels of the mRNA expression of the genes were measured by qPCR and normalized to the expression of the *ACTB* gene. The results are shown as mean values of relative mRNA expression and standard errors of the mean.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to the control.

Интересно, что уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора REL достоверно повышается по сравнению с контролем как через 1 ч, так и через 6 ч с момента воздействия диоксина (см. рис. 2, табл. 2). Таким образом, реализуется сходный с обнаруженным ранее для генов субъединиц ИЛ-12 двухстадийный ответ на воздействие диоксина. Известно, что этот транскрипционный фактор играет ключевую роль в патогенезе ревматоидного артрита и псориаза, в развитии фиброза кожи и миокарда. Его индукция характерна для ряда солидных опухолей (Hunter et al., 2016), поэтому необходимо проведение дополнительных исследований влияния диоксина на экспрессию гена *REL* в макрофагах в зависимости от дозы и времени воздействия.

Закключение

Совокупность полученных результатов подтверждает функциональную активность предсказанных DRE, расположенных в регуляторных районах генов *IRF1*, *REL*, *RELA*, через Ah-рецепторный путь передачи сигналов.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004. The qPCR experiments with U937 macrophages were supported by the Russian Science Foundation, project 14-32-00006. The computer-assisted analysis of the results was supported by the Russian Science Foundation, project 14-24-00123.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Biswas S.K., Chittezhath M., Shalova I.N., Lim J.Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* 2012; 53(1/3):11-24.
 Boutros P.C., Moffat I.D., Franc M.A., Tuomisto J., Okey A.B. Dioxin-responsive AHRE-II gene battery: identification by phylogenetic footprinting. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;321(3):707-715.
 Connor K.T., Aylward L.L. Human response to dioxin: aryl hydrocarbon receptor (AhR) molecular structure, function, and dose-response data for enzyme induction indicate an impaired human AhR. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 2006;9(2):147-171.
 Denison M.S., Nagy S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003;43:309-334.
 Esser C., Rannag A., Stockinger B. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol.* 2009;30(9):447-454. DOI 10.1016/j.it.2009.06.005.

Fujii-Kuriyama Y., Kawajiri K. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2010;86(1):40-53.
 Fujita H., Samejima H., Kitagawa N., Mitsuhashi T., Washio T., Yonemoto J., Tomita M., Takahashi T., Kosaki K. Genome-wide screening of dioxin-responsive genes in fetal brain: bioinformatic and experimental approaches. *Cong. Anom.* 2006;46:135-143.
 Furman D.P., Oshchepkova E.A., Oshchepkov D.Yu., Shamanina M.Yu., Mordvinov V.A. Promoters of the genes encoding the transcription factors regulating the cytokine gene expression in macrophages contain putative binding sites for aryl hydrocarbon receptor. *Comput. Biol. Chem.* 2009;33(6):465-468.
 Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5(12):953-964.
 Hunter J.E., Leslie J., Perkins N.D. c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. *Br. J. Cancer.* 2016;114(1):1-6. DOI 10.1038/bjc.2015.410.
 Kerkvliet N.I. TCDD: an environmental immunotoxicant reveals a novel pathway of immunoregulation – a 30-year odyssey. *Toxicol. Pathol.* 2012;40(2):138-142.
 Komura K., Hayashi S., Makino I., Poellinger L., Tanaka H. Aryl hydrocarbon receptor/dioxin receptor in human monocytes and macrophages. *Mol. Cell Biochem.* 2001;226(1/2):107-118.
 Mandal P.K. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. B.* 2005;175:221-230.
 Meyer L.R., Zweig A.S., Hinrichs A.S., Karolchik D., Kuhn R.M., Wong M., Sloan C.A., Rosenbloom K.R., Roe G., Rhead B., Raney B.J., Pohl A., Malladi V.S., Li C.H., Lee B.T., Learned K., Kirkup V., Hsu F., Heitner S., Harte R.A., Haussler M., Guruvadoo L., Goldman M., Giardine B.M., Fujita P.A., Dreszer T.R., Diekhans M., Cline M.S., Clawson H., Barber G.P., Haussler D., Kent W.J. The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013. *Nucl. Acids Res.* 2013;41:64-69.
 Mulero-Navarro S., Fernandez-Salguero P.M. New trends in Aryl hydrocarbon receptor biology. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016;4(45). DOI 10.3389/fcell.2016.00045.
 Oshchepkov D.Y., Kashina E.V., Antontseva E.V., Oshchepkova E.A., Mordvinov V.A., Furman D.P. Dynamics of IL-12 cytokine expression in human macrophages after dioxin exposure. *Rus. J. Genetics: Appl. Res.* 2014;4(6):568-574.
 Oshchepkov D.Y., Vityaev E.E., Grigorovich D.A., Ignatieva E.V., Khlebodarova T.M. SITECON: a tool for detecting conservative conformational and physicochemical properties in transcription factor binding site alignments and for site recognition. *Nucl. Acids Res.* 2004;32:208-212.
 Sciallo E.M., Dong B., Vogel C.F., Matsumura F. Characterization of the pattern of the nongenomic signaling pathway through which TCDD-induces early inflammatory responses in U937 human macrophages. *Chemosphere.* 2009;74(11):1531-1537.
 Sun Y.V., Boverhof D.R., Burgoon L.D., Fielden M.R., Zacharewski T.R. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucl. Acids Res.* 2004;32:4512-4523.