

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ СУРФАКТАНТА В ПАТОБИОЛОГИИ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

В.В. Еремеев, Л.Е. Поспелов, А.Л. Поспелов, С.Ю. Кордичева
ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Легочный сурфактант был выделен и описан J.A. Clements в 1957 году [6]. Установлено, что основная функция сурфактанта заключается в снижении поверхностного натяжения в альвеолах, что препятствует их спаданию и стабилизирует структуру легочной ткани [23]. Кроме того, сурфактант формирует барьер на пути проникновения патогенов [25], улучшает мукоцилиарный транспорт [5] и ингибирует выход компонентов сыворотки в дыхательные пути [23]. Биологическая роль сурфактанта, как интегрального компонента защитной системы хозяина, обладающего, в том числе, иммуномодуляторными свойствами, исследована в целом ряде современных работ с использованием экспериментальных моделей легочной инфекции [3, 19].

Легочный сурфактант представляет собой сложную смесь липидов и белков, формирующих мономолекулярную пленку на границе контакта альвеолярного воздуха с тканью легких [3]. Сурфактант состоит из приблизительно 90% липидов, 80-85% из которых приходится на фосфолипиды, а еще 5-10% – на нейтральные липиды [16], и 10% белков-апопротеинов, получивших название протеины сурфактанта (*surfactant proteins*, SP) [29]. Несмотря на то, что белки составляют лишь незначительную часть сурфактанта, все четыре известные на сегодня SP-A, SP-B, SP-C и SP-D [3] играют важную роль в регуляции его функций.

SP-A и SP-D – довольно большие гидрофильные гликопротеины, которые наряду с другими молекулами, обладающими важными иммунологическими свойствами, относятся к семейству лектинов C-типа (коллектины). Для них характерно наличие доменов, распознающих коллаген-подобные и карбогидратные структуры (CRD, от англ. *collagen-like and carbohydrate recognition domains*). В соответствии с современными представлениями, механизм действия молекул этого семейства основан на присоединении к специфическим углеводным последовательностям бактерий, простейших, грибов и вирусов

[17, 10], опсонизации и ускорении защитных иммунных реакций [35].

Белки SP-B и SP-C существенно меньше, резко гидрофобны и являются важным компонентом сурфактантного монослоя, стабилизируя поверхности контакта воздух-жидкость [7]. Крайняя гидрофобность SP-B и SP-C достигается преимущественно за счет посттрансляционных модификаций. Так, например, гидрофобность SP-C повышается за счет присоединения остатка пальмитиновой кислоты [4].

Локусы SP-A и SP-D человека кодируют три гена (*SFTPA1*: SP-A1, *SFTPA2*: SP-A2 и *SFTPD*: SP-D), расположенные в середине длинного плеча 10-й хромосомы (10q21–q23) [18]. Локус SPA человека содержит два функциональных высокоомологичных гена (*SP-A1* и *SP-A2*), находящихся в оппозитной по направлению транскрипции ориентации, и один псевдоген между ними. В одном кластере с ними расположен ген SP-D. Установлено, что все три гена – *SP-A1*, *SP-A2* и *SP-D* – полиморфны [26]. Локус считается полиморфным если наиболее редкий аллель встречается в популяции с частотой не менее 1%, а количество гетерозигот равно или превосходит 2%. Менее распространенные нуклеотидные замены называют аллельными вариантами, а совсем редкие – мутациями [14]. Гены *SP-A1* и *SP-A2* находятся в неравновесном сцеплении и обладают сходной геномной организацией. Белки SP-A1 и SP-A2 состоят из 248 аминокислот каждый и различаются по следующим аминокислотным остаткам: Met66, Asp73, Ile81 и Cys85 для SP-A1, Thr66, Asn73, Val81 и Arg85 для SP-A2 [12]. Для экзона гена *SP-A1* известны пять полиморфизмов, соответствующих аминокислотным позициям 19, 50, 62, 133 и 219 кодируемого белка. Два из них молчащие (62 и 133), а остальные приводят к неконсервативным аминокислотным заменам (Ala19→Val, Leu50→Val and Arg219→Trp) [8]. Для экзона гена *SP-A2* описаны четыре полиморфизма (Thr9→Asn, Pro91→Ala and Lys223→Gln); полиморфизм в позиции 140 – молчащий. Для экзона гена *SP-D*

известны два полиморфизма, приводящие к заменам: Thr11→Met and Thr160→Ala [8].

Гены, картируемые на хромосомах 2p12-p11.2 и 8p21 человека, детерминируют гидрофобные белки SP-B и SP-C соответственно. Идентифицирован целый ряд относительно часто встречающихся вариаций гена *SP-B*, в том числе ряд аллелей, связанных с вариабельностью tandemных повторов в четвертом интроне [11]. Обнаружены также однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs, от англ. *single-nucleotide polymorphisms*) гена *SP-B*. Четыре из них, расположенные в 5' фланкирующем регионе, интроне 2, экзоне 4 и 3' нетранслируемом регионе гена, потенциально способны влиять на функцию белка [20]. Экзонный полиморфизм приводит к замене аминокислоты на позиции 131 (Thr→Ile). Этот полиморфизм может иметь функциональное значение, поскольку изменяется потенциальный сайт гликозилирования. Предположительно ген *SP-C* также имеет несколько SNPs, поскольку существует ряд известных вариаций его последовательностей [15].

Продуктируемый альвеолярными клетками легких тубулярный миелин (ТМ) представляет собой высокоорганизованную структуру сурфактанта, формирование и функциональная активность которой определяются в основном SP-A, SP-D и насыщенными фосфолипидами. В эксперименте, с применением методов электронной микроскопии, было показано, что у крыс (резистентных к туберкулёзной инфекции) по сравнению с морскими свинками (чувствительными к туберкулёзу) значительно сильнее развита сеть ТМ сурфактанта. Помимо этого, морфологическими методами было продемонстрировано неодинаковое развитие ТМ сурфактанта у мышей с разной чувствительностью к туберкулёзу. Так, у чувствительных к туберкулёзу мышей линии I/St обнаружено слабое (как у морских свинок), по сравнению с резистентными к туберкулёзу мышами линии A/Sp, у которых выявлено очень хорошее (как у крыс) развитие структур ТМ сурфактанта [1].

Механизм взаимодействия SP-A и SP-D с микобактериями исследовали в ряде лабораторий. Было показано, что оба эти белка связывают липоарабиноманнаны микобактериальной стенки [32, 31]. Кроме того, SP-A реагирует с Ара – богатым серином и пролином гликопротеином клеточной стенки *M. tuberculosis* [28]. Связывание SP-D способствует формированию фаголизосом в макрофагах, усиливая тем самым инактивацию *M. tuberculosis* [9]. Роль SP-A менее изучена, известно, однако, что SP-A усиливает поглощение и инактивацию *M. bovis* BCG макрофагами, а также усиливает поглощение (но не влияет на инактивацию) *M. avium* [34, 21]. Кроме того, было показано, что опосредованное SP-A взаимодействие *M. tuberculosis* с макрофагами ведет к супрессии продукции оксида азота (NO), что косвенно свидетельствует о супрессивном влиянии SP-A на микобактерицидную функцию макрофагов [27]. Описано также влияние SP-A на адаптивный антимикобактериальный иммунитет.

Было показано, что моноклональные антитела к рецептору SP-A SP-R210 подавляют индуцированную антигеном микобактериальной стенки пролиферацию ИФНγ-супрессирующих лимфоцитов через механизм, опосредованный противовоспалительными цитокинами ИЛ-10 и TGFβ [30]. Таким образом, плеiotропное действие SP-A и SP-D, в том числе, оказывает влияние на проявление врожденного и адаптивного антимикобактериального иммунного ответа *in vivo*.

Учитывая тот факт, что протеин SP-A участвует в антимикробной защите, были предприняты популяционные исследования по выявлению ассоциаций различных аллелей гена *SP-A* с заболеванием туберкулёзом. Одной из первых работ, посвященных данной проблеме, была публикация группы J. Floros [13]. В мексиканской популяции изучали маркеры SP-A, SP-B, SP-D и SP-B-связанные микросателлитные маркеры. При сравнении больных туберкулёзом (107 пациентов) и здоровых туберкулинположительных лиц из группы контактов (71 чел.), аллель SP-D DA11_C и микросателлитный аллель GATA_3 ассоциировались с повышенным риском, в то время как микросателлитный аллель AAGG_2 – с пониженным риском заболеть туберкулёзом. При сравнении больных туберкулёзом с контрольной группой (101 здоровый донор) выяснилось, что такие маркеры как 1A3, 6A4 и B1013_A ассоциировались с чувствительностью к туберкулёзу, а аллели AAGG_1, and AAGG_7 – с пониженным риском заболеть туберкулёзом [13].

В эфиопской популяции были изучены полиморфизмы (A19V (177C/T), V50L (269G/C), R219W (776G/A), 62P (307G/A), 33T (520G/A) в гене *SP-A1* и N9T (110A/C), P91A (355C/G), K223Q(751A/C) и 140S (504T/C) в гене *SP-A2*) на предмет ассоциации с туберкулёзом. В гене *SP-A1* аллели 307A ($p = 0.00008$) и 776T ($p = 0.019$), а в гене *SP-A2* аллели 751C ($p = 0.042$) и 355C ($p = 0.029$) ассоциировались с туберкулёзом. При этом в зависимости от таких показателей как тяжесть болезни, пол и возраст с туберкулёзом легких ассоциировались различные вариации *SP-A* [24].

При исследовании взаимосвязи между аллельными вариантами в коллагеновом регионе генов *SP-A1* и *SP-A2* и туберкулёзом легких, в индийской популяции была показана значительная ассоциация полиморфизмов SP-A1C1416T, SP-A2C1382G, SP-A2A1660G с этим заболеванием [22]. Следует отметить, что в этом исследовании было обследовано всего 17 больных туберкулёзом и 19 здоровых лиц. В другом исследовании (также в индийской популяции – 30 больных туберкулёзом и 30 здоровых доноров) была продемонстрирована существенная ассоциация полиморфизма G459A в седьмом экзоне *SP-D* с туберкулёзом [33]. В то же время, в индийской популяции ассоциация полиморфизма DA11_C в первом экзоне *SP-D* с заболеванием туберкулёзом.

Многие генетические вариации лектинов С-типа ассоциированы с различными инфекционными заболеваниями, однако механизмы, приводящие к возникновению этих ассоциаций, все еще остаются мало изученными. А. К. Azad и соавт. [2], применив относительно новую технологию определения нарушения баланса экспрессии аллельной mRNA (AEI, от англ. *allelic mRNA expression imbalance*), исследовали экспрессию ряда генов врожденного иммунного ответа, в том числе SP-A1, SP-A2 и SP-D в макрофагах и ткани легких человека. В результате был идентифицирован интронный SNP rs1650232, стабильно ассоциированный с двукратным изменением аллельной экс-

прессии mRNA и, в результате альтернативного сплайсинга, приводящий к появлению трех дополнительных остатков в стартовом экзоне 3 SP-A2. Таким образом, регуляторный элемент rs1650232 находится в неравновесном сцеплении с известным SNP-маркером SP-A2, для которого ранее была показана ассоциация с повышенным риском респираторных заболеваний, включая туберкулёз. В перспективе, использование вариантов функциональной ДНК, а не SNP-маркеров, для изучения клинических ассоциаций, способно «продвинуться» на пути понимания механизмов генетической чувствительности к инфекциям.

Литература

1. Ерохин В.В., Ленеха Л.Н. Сурфактант и инфекция. – 2004; М. «Алла Принт». – 131 с.
2. Azad A.K., Curtis A., Papp A. et al. Allelic mRNA expression imbalance in C-type lectins reveals a frequent regulatory SNP in the human surfactant protein A (SP-A) gene // *Genes. Immun.* – 2013. – Vol. 14. – P. 99-106.
3. Barreira E.R., Precioso A.R., Bousso A. Pulmonary surfactant in respiratory syncytial virus bronchiolitis: the role in pathogenesis and clinical implications // *Pediatr. Pulmonol.* – 2010. –
4. Beers M.F., Mulugeta S. Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease // *Annu. Rev. Physiol.* – 2005. – Vol. 67. – P. 663–696.
5. Blanco O., Perez-Gil J., Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat respiratory distress syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 568. – P. 1-15.
6. Clements J.A. Surface tension of lung extracts // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1957. – Vol. 95. – P. 170-172.
7. Curstedt T., Johansson J. Different effects of surfactant proteins B and C – implications for development of synthetic surfactants // *Neonatology.* – 2010. – Vol. 97. – P. 367-372.
8. DiAngelo S., Lin Z., Wang G. et al. Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles // *Dis. Markers.* – 1999. – Vol. 15. – P. 269-281.
9. Ferguson J.S., Martin J.L., Azad A.K. et al. Surfactant protein D increases fusion of Mycobacterium tuberculosis containing phagosomes with lysosomes in human macrophages // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol. 74. – P. 7005–7009.
10. Ferguson J.S., Voelker D.R., McCormack F.X., Schlesinger L.S. Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages1 // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163. – P. 312–321.
11. Floros J., Veletza S.V., Kotikalapudi P. et al. 1995. Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory distress syndrome // *Biochem. J.* – 1995. – Vol. 305. – P. 583–590.
12. Floros J., Wang G., Mikerov A. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function // *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* – 2009. – Vol. 19. – P. 125–137.
13. Floros J., Lin H-M., Garcia A. et al. Surfactant protein genetic marker Alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 182. – P. 1473–1478.
14. Gelehrter T.D., Collins F.S. Population genetics and multifactorial inheritance. In: *Principles of Medical Genetics, Intern. Ed.*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1990. – P. 49-68.
15. Glasser S.W., Korfhagen T.R., Perme C.M. et al. Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 10326-10331.
16. Haagsman H.P., Hogenkamp A., van Eijk M., Veldhuizen E.J. Surfactant collectins and innate immunity // *Neonatology.* – 2008. – Vol. 93. – P. 288-294.
17. Hartshorn K.L., Crouch E., White M.R. et al. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274. – P. L958–969.
18. Katyal S.L., Singh G., Locker J. Characterization of a second pulmonary surfactant-associated protein SP-A gene // *Am. J. Cell Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 6. – P. 446-452.
19. Ledford J.G., Pastva A.M., Wright J.R. Review: collectins link innate and adaptive immunity in allergic airway disease // *Innate Immun.* – 2010. – Vol. 16. – P. 183-190.
20. Lin Z., deMello D.E., Batanian J.R. et al. Aberrant SP-B mRNA in lung tissue of patients with congenital alveolar proteinosis (CAP) // *Clin. Genet.* – 2000. – Vol. 57. – P. 359-369.
21. Lopez J.P., Clark E., Shepherd V.L. Surfactant protein A enhances Mycobacterium avium ingestion but not killing by rat macrophages // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – Vol. 74. – P. 523–530.
22. Madan T., Saxena S., Murthy K. et al. Association of polymorphisms in the collagen region of human SP-A1 and SP-A2 genes with pulmonary tuberculosis in Indian population // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2005. – Vol. 53. – P. 399-417.

23. Maina J.N., West J.B., Orgeig S. et al. Recent advances into understanding some aspects of the structure and function of mammalian and avian lungs // *Physiol. Biochem. Zool.* – 2010. – Vol. 83. – P. 792-807.
24. Malik S., Greenwood C.M.T., Egale T. et al. Variants of the SFTPA1 and SFTPA2 genes and susceptibility to tuberculosis in Ethiopia // *Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 118. – P. 752-759.
25. Mingarro I., Lukovic D., Vilar M., Perez-Gil J. Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15. – N. 4. – P. 393-403.
26. Pantelidis P., Lagan A.L., Davies J.C. et al. A single round PCR method for genotyping human surfactant protein (SP)-A1, SP-A2 and SP-D gene alleles // *Tissue Antigens.* – 2003. – Vol. 61. – P. 317-321.
27. Pasula R., Wright J.R., Kachel D.L., Martin 2nd W.J. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 103. – P. 483-490.
28. Ragas A., Roussel L., Puzo G., Riviere M. The *Mycobacterium tuberculosis* cell surface glycoprotein apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A // *J. Biol. Chem.* – 2007. Vol. 282. – P. 5133-5142.
29. Rooney S.A., Young S.L., Mendelson C.R. Molecular and cellular processing of lung surfactant // *FASEB J.* – 1994. – Vol. 8. – P. 957-967.
30. Samten B., Townsend J.C., Sever-Chroneos Z. et al. An antibody against the surfactant protein A (SP-A)-binding domain of the SP-A receptor inhibits T cell-mediated immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 84. – P. 115-123.
31. Sidobre S., Nigou J., Puzo G., Riviere M. Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 2415-2422.
32. Torrelles J.B., Azad A.K., Henning L.N. et al. Role of C-type lectins in mycobacterial infections // *Curr. Drug Targets.* – 2008. – Vol. 9. – P. 102-112.
33. Vaid M., Kaur S., Taruna M. et al. Association of SP-D, MBL and I-NOS genetic variants with pulmonary tuberculosis // *Indian J. Human Genetics.* – 2006. – Vol. 12. – P. 105-110.
34. Weikert L.F., Lopez J.P., Abdolrasulnia R. et al. Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. 216-223.
35. Wright J.R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5. – P. 58-68.

Сведения об авторах

Еремеев Владимир Витальевич – заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий отдела иммунологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Адрес: Москва 107564, Яузская аллея, д. 2.

Телефон/факс: (499) 785-90-19

e-mail: office_cniit@mail.ru

Поспелов Лев Евгеньевич [04.03.1951-29.03.2012] – заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий отдела иммунологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, до 2012 г., доктор биологических наук

Поспелов Алексей Львович – младший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Адрес: Москва 107564, Яузская аллея, д. 2.

Телефон/факс: (499) 785-90-19

e-mail: office_cniit@mail.ru

Кордичева Светлана Юрьевна – старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Адрес: Москва 107564, Яузская аллея, д. 2.

Телефон/факс: (499) 785-90-19

e-mail: office_cniit@mail.ru