

На правах рукописи

ОЖЕГОВА

Диана Сергеевна

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ
ПОДВЕРЖЕННОСТИ ИНФЕКЦИОННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении Высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Росздрава» и в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте медицинской генетики Сибирского отделения РАМН, г. Томск

Научный руководитель: академик РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
Пузырёв Валерий Павлович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
Сазонов Алексей Эдуардович

кандидат медицинских наук
Масленников Аркадий Борисович

Ведущая организация:
Учреждение Российской Академии медицинских наук Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН

Защита состоится «_____» декабря 2009 года в _____ час. _____ мин. на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 001.045.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук НИИ медицинской генетики СО РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии медицинских наук НИИ медицинской генетики СО РАМН

Автореферат разослан «_____» _____ 2009 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Кучер А.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы:

Одной из проблем современной медицины является изучение механизмов возникновения и персистенции внутриклеточных бактериальных инфекций, вызванных *Mycobacterium tuberculosis* и *Salmonella enteritidis* [Воробьев, 2001; Ottenhoff, 2002; Schnappinger, 2006]. Несмотря на многочисленные исследования в области генетики инфекционных заболеваний, многие аспекты функционирования генов, определяющих развитие защитных реакций при внедрении патогена, остаются до конца не установленными [López-Maderuelo, 2003; Alcaïs, 2005].

К настоящему времени получены данные, свидетельствующие о том, что, такие инфекционные заболевания, как туберкулез и сальмонеллез, с генетической точки зрения, являются полигенными [Hunter, 2000; Kaufmann, 2001; Qiao, 2003, Коненков, 2008]. Выявление спектра генов и их полиморфизмов, влияющих на риск развития туберкулеза и сальмонеллеза, заболеваний со схожими начальными этапами патогенеза, представляет особый интерес.

Имеющиеся на сегодняшний день данные о фенотипическом проявлении полиморфных вариантов генов носят противоречивый характер и не позволяют сделать однозначных выводов об их вкладе в развитие инфекционных заболеваний [Cooke, 2006; Malik, 2006]. Совместное использование молекулярно-генетических, эпидемиологических и биоинформационных подходов для оценки функциональной значимости полиморфных вариантов генов, позволяет обеспечить высокую воспроизводимость и точность полученных ассоциаций между генотипами и заболеванием.

В настоящее время существуют десятки биоинформационных ресурсов, которые позволяют проводить отбор генов-кандидатов и их полиморфных вариантов, влияющих на восприимчивость к инфекционным заболеваниям [Cartharius, 2003; Berezikov, 2005; Chorley, 2008]. Предполагаемый вклад однонуклеотидных полиморфных замен в изменение уровня экспрессии генов может быть оценен посредством использования специальных компьютерных программ: MatInspector, MATRIX SEARCH, SignalScan и др. [GuhaThakurta, 2006].

Важную роль в изучении функционирования генов, несущих в своей структуре SNPs с предполагаемым фенотипическим эффектом, и их вклада в развитие инфекционных заболеваний, играет экспрессионное профилирование [Bussemaker, 2001; Lazarus, 2005]. К настоящему времени разработан ряд экспериментальных моделей, представляющих собой культуры клеток человека, которые позволяют получить информацию об экспрессии изучаемых генов и уточнить многие патофизиологические процессы *in vitro*, происходящие при введении в культуру клеток бактериальных агентов [Пичугина, 2003; Cliff, 2004].

Известно, что фенотипический эффект полиморфного варианта гена может зависеть от контекста, в котором он действует, то есть от вида

стимулятора, вводимого в культуру клеток. В связи с этим представляет интерес изучение влияния компонентов клеточной стенки *M. tuberculosis* и *S. enteritidis*, иммуномодуляторов IFN- γ и IL-4 и их комбинаций с микробными агентами на уровень экспрессии генов иммунного ответа в культурах мононуклеарных клеток человека.

Таким образом, исследование экспрессии генов, несущих полиморфные варианты различных регуляторных молекул, которые обеспечивают начальные этапы развития иммунного ответа, таких как ген интерферона гамма (*IFNG*), ген субъединицы 2 рецептора интерферона гамма (*IFNGR2*), ген трансдуктора и активатора транскрипции (*STAT1*), ген Toll-like рецептора 2 (*TLR2*) и ген моноцитарного хемотаксического протеина (*MCP1*) в условиях воздействия бактериальных компонентов на клетки иммунной системы человека является перспективным.

Цель исследования:

Изучить функциональную вариабельность генов *MCP1*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1* и *IFNGR2*, вовлеченных в формирование подверженности инфекционным заболеваниям.

Задачи исследования:

1. Сформировать на основе биоинформационных данных панель потенциально функциональных однонуклеотидных полиморфизмов в промоторной и интронной областях генов *MCP1*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1* и *IFNGR2*.
2. Определить частоту однонуклеотидных полиморфизмов исследуемых генов у здоровых жителей г. Томска.
3. Оценить базальный и стимулированный различными факторами (неспецифический индуктор РНА, микробные продукты TDM и LPS, иммуномодуляторы IFN- γ и IL-4) уровень экспрессии генов в краткосрочных культурах мононуклеарных клеток периферической крови здоровых людей.
4. Провести анализ связи уровня экспрессии генов *MCP1*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1* и *IFNGR2* с их полиморфными вариантами.

Научная новизна:

Предложен алгоритм поиска функционально значимых полиморфизмов генов с помощью биоинформационных методов и последующего экспрессионного профилирования. Впервые изучена функциональная значимость полиморфизмов С-2508Т гена *MCP1*, Т-1488С гена *IFNG*, G/Т гена *TLR2*, А-1831С гена *STAT1*, G-1704del гена *IFNGR2*, влияющих на развитие и течение инфекционных заболеваний (туберкулеза и сальмонеллеза). Впервые получены данные о распределении частот аллелей полиморфного варианта rs56000463: Т>G в интронной области гена *TLR2* в популяции европеоидов. Впервые установлено, что изученные варианты промоторных областей генов *MCP1*, *IFNG* и *IFNGR2* являются функционально значимыми и влияют на уровень экспрессии генов.

Научно-практическая значимость:

Полученные данные об уровне экспрессии генов иммунного ответа в культурах мононуклеарных клеток крови здоровых людей при стимуляции их индукторами микробного и немикробного происхождения дополняют фундаментальные сведения о генетической компоненте запуска и реализации защитных механизмов клеток иммунной системы при инфицировании их *M. tuberculosis* и *S. enteritidis*. Данные о функциональной значимости полиморфных вариантов промоторной области генов *MCP1*, *IFNG* и *IFNGR2* могут служить основой для дальнейшего изучения их ассоциации с риском развития внутриклеточных инфекционных заболеваний. Основываясь на программе MatInspector, представлен алгоритм поиска полиморфизмов генов, влияющих на генную экспрессию, который может быть использован в дизайне исследований, направленных на установление функционально- и патогенетически значимых вариантов генов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Полиморфные варианты С-2508Т гена *MCP1*, Т-1488С гена *IFNG*, G-1704del гена *IFNGR2*, выбранные с помощью биоинформационной программы MatInspector, являются функционально значимыми: уровень экспрессии генов по этим полиморфным вариантам существенно меняется в зависимости от генотипа.
2. У носителей одних и тех же генотипов по исследуемым полиморфизмам разные виды стимуляторов с неизменной концентрацией вызывали разные экспрессионные ответы в культурах клеток.
3. Гомозиготные генотипы -2508СС и -2508ТТ гена *MCP1* обладают протективной ролью в развитие туберкулеза и сальмонеллеза, так как ассоциированы с более высоким уровнем экспрессии гена по сравнению с гетерозиготами. Аллель -1488С гена *IFNG* играет протективную роль в развитии иммунитета против *M. tuberculosis*, а аллель -1488Т развитию иммунного ответа при инфицировании *S. enteritidis*.

Апробация работы:

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2007), VIII научном конгрессе молодых ученых «Науки о человеке» (Томск, 2007), XII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2007), на Ежегодной Европейской конференции по генетике человека (Барселона, 2008), семинаре по биоинформатике в ГОУ ВПО Сибирском государственном медицинском университете Росздрава (Томск, 2008), межлабораторных научных семинарах НИИ медицинской генетики СО РАМН (Томск, 2007, 2009), межлабораторном научном семинаре на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории (Томск, 2008).

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 1 статья в рецензируемом журнале списка ВАК, 1 статья в сборнике, 2 тезиса в материалах отечественных конференций, 1 – в зарубежных.

Структура и объем диссертации:

Диссертационная работа изложена на 185 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и приложения. Данные проиллюстрированы 78 таблицами (72-в приложение), 23 рисунками. Библиографический указатель включает 143 источника, из них 16 работ отечественных авторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования.

Для проведения исследования была сформирована выборка здоровых доноров, в количестве 91 человек, на базе лечебно-профилактических и научно-исследовательских учреждений г. Томска: областного туберкулезного диспансера (врачи, медсестры, обслуживающий персонал), МПУ поликлиники №2 (врачи, медсестры, обслуживающий персонал), Учреждение РАМН НИИ Фармакологии СО РАМН. Все обследованные были русские по национальности, 69 женщин (76%) и 22 мужчин (24%). Средний возраст пациентов составил $34,4 \pm 7,45$ года. Условием включения в выборку было отсутствие ранее перенесенных заболеваний туберкулеза, сальмонеллеза и вирусного гепатита. В исследование были включены только индивидуумы, подписавшие добровольное информированное согласие.

В работе был последовательно использован комплекс методических подходов: биоинформационных, молекулярно-генетических, культуральных и методы экспрессионного анализа.

Биоинформационные программы для поиска и оценки фенотипической значимости SNPs.

Поиск однонуклеотидных полиморфных замен (SNPs) с предполагаемым фенотипическим эффектом в промоторных и интронных областях исследуемых генов с помощью методов биоинформатики был осуществлен по алгоритму, представленному на рис. 1

Было проанализировано 31 SNPs, из них выбрано пять SNPs: rs1024611, rs2069705, rs4853455, rs17880053 и rs56000463.

Молекулярно-генетические методы исследования.

Выделение ДНК проводили из венозной крови стандартным методом с использованием фенол-хлороформной очистки. Анализ генетического полиморфизма осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, полученных с помощью программы VectorNTI, с последующим анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ). Всего исследовано 5 полиморфных вариантов 5 кандидатных генов подверженности туберкулезу и сальмонеллезу (табл. 1).

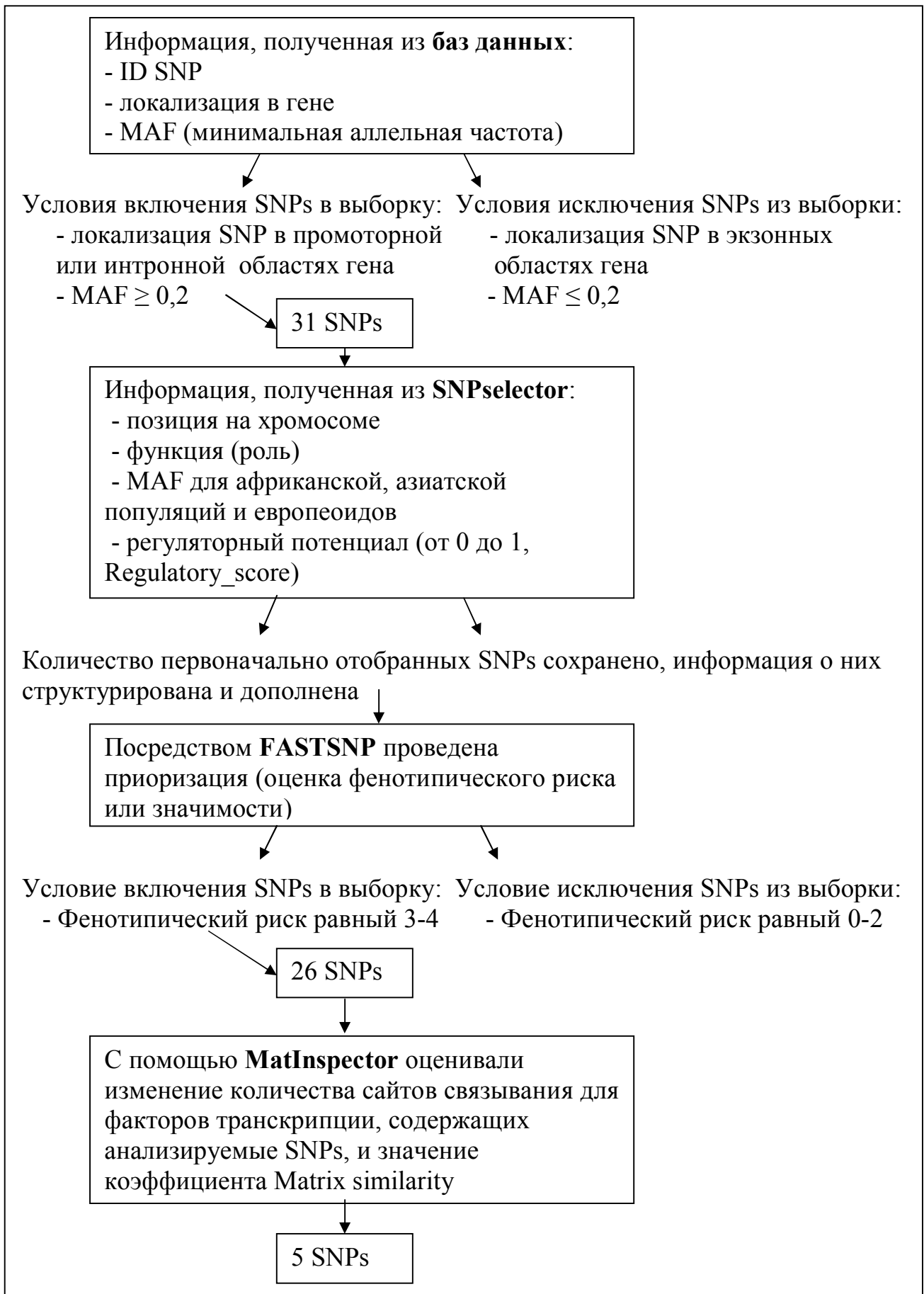


Рис. 1. Алгоритм поиска и оценки SNPs с предполагаемым фенотипическим эффектом.

Характеристика исследуемых полиморфизмов

Ген	Локализация на хромосоме	Полиморфизм	Локализация в гене	Фермент рестрикции
<i>IFNG</i>	12g14	<i>T-1488C</i>	промотор	HpaI
<i>IFNGR2</i>	21g22.11	<i>G-1704del</i>	промотор	Msp20I
<i>STAT1</i>	2g32.2	<i>A-1831C</i>	промотор	BstC8I
<i>MCP1</i>	17q11.2-q12	<i>C-2508T</i>	5'-UTR	PvuII
<i>TLR2</i>	4g32	<i>G/T</i>	интрон	SmaI

Культивирование мононуклеарных клеток венозной крови.

На следующем этапе работы была сформирована группа (n=14), которая представляла разнообразные аллельные сочетания каждого из исследуемых генов. У выбранных индивидуумов осуществлялся повторный забор венозной крови, проводилось выделение мононуклеарных клеток крови путем центрифугирования и их культивирование с индукторами микробной и не микробной природы: РНА (фитогемагглютинин, 10 мкг/мл), TDM (трехалозе 6,6'-димиколат компонент клеточной стенки *M. tuberculosis*, 100 нг/мл), LPS (липополисахарид, компонент клеточной стенки *S. enteritidis*, 100 нг/мл), IFNg (100 нг/мл), IL-4 (20 нг/мл), и их комбинации. Затем осуществляли выделение мРНК, с использованием набора TRI-Reagent (Mrcgene), из культур клеток и венозной крови индивидуумов (контроль). Для получения кДНК из мРНК для каждого образца проводили реакцию обратной транскрипции.

Анализ уровня экспрессии генов.

Полимеразная цепная реакция (RT-PCR) в реальном времени и учет уровня экспрессии каждого исследуемого гена в 126 культурах мононуклеарных клеток, осуществлялись на завершающем этапе работы. Для каждого исследуемого образца реакцию RT-PCR проводили в трех повторах одновременно. Кроме исследуемых генов, оценивали уровень экспрессии гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Образцы изучаемого гена и гена *GAPDH* ставили в одном планшете – для достижения одного и того же уровня эффективности амплификации гена мишени и эндогенного контроля.

Статистическая обработка данных

Были проведены: проверка частот генотипов на соответствие ожидаемым при равновесии Харди-Вайнберга, оценки частот аллелей и генотипов исследуемых генов у здоровых жителей г. Томска. Расчет среднего арифметического значений n-кратных различий между уровнем экспрессии РНК специфического гена в стимулированных и не стимулированных культурах осуществляли с использованием сравнительного $\Delta\Delta C_t$ метода [руководство Applied Biosystems]. Оценивали изменение уровня экспрессии исследуемых генов в зависимости от генотипа по выбранным полиморфным

вариантам. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$ и меньше. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы «Statistica 6.0.».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование включало три этапа. Первый – выбор функционально значимых SNPs и проверка с помощью комплекса компьютерных программ. На втором этапе – изучены изменения уровня экспрессии генов *MCPI*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1*, *IFNGR2* в культурах мононуклеарных клеток крови здоровых людей при стимуляции РНА, TDM, LPS, IFN- γ , IL-4, и их комбинациями. В третьем сравнивали уровни экспрессии генов в культурах клеток носителей различных генотипов по выбранным полиморфным вариантам генов.

Поиск функционально значимых SNPs с помощью биоинформационных ресурсов

Поиск и оценку SNPs с предполагаемым фенотипическим эффектом осуществляли по алгоритму представленному в части Материал и методы. На заключительном этапе биоинформационной части работы была использована компьютерная программа MatInspector. Программа позволяла оценивать влияние полиморфизмов, выбранных с помощью различных баз данных и биоинформационных комплексов SNPselector и FASTSNP, на структуру и количество сайтов связывания для факторов транскрипции в промоторных и интронных областях генов иммунного ответа. Для дальнейшего анализа были выбраны следующие полиморфные варианты: rs1024611 гена *MCPI*, rs2069705 гена *IFNG*, rs56000463 гена *TLR2*, rs4853455 гена *STAT1* и rs17880053 гена *IFNGR2*.

Оценка уровня экспрессии генов *MCPI*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1*, *IFNGR2* при стимуляции РНА, TDM, LPS, IFNg, IL-4 и их комбинациями

В культурах мононуклеарных клеток крови стимулированных РНА, TDM, LPS, IFNg, IL-4, и их комбинациями TDM+IL-4, TDM+IFNg, LPS+IL-4, LPS+IFNg была изучена экспрессия генов *MCPI*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1*, *IFNGR2* (табл. 2) и *GAPDH*. С помощью сравнительного $\Delta\Delta C_t$ метод уровень экспрессии специфических генов сначала нормализовали относительно количества мРНК гена домашнего хозяйства *GAPDH*, а затем уровень экспрессии генов в стимулированных клеточных культурах нормализовали относительно соответствующих показателей из не стимулированных культур (контроль). Результаты представлены как n-кратные различия между количеством мРНК специфического гена в стимулированных и не стимулированных культурах и ошибкой среднего для каждой группы. Для гена *GAPDH* значение C_t в группах варьировало от 26,65 до 31,25. Достоверных отличий в уровне экспрессии гена *GAPDH* между стимулированными и не стимулированными культурами обнаружено не было.

Для генов *MCP1*, *IFNG*, *TLR2* наблюдалось увеличение уровня экспрессии по сравнению с не стимулированной культурой. **Уровень экспрессии гена *MCP1*** в исследуемых группах был повышен в два и более раза в клеточных культурах стимулированных всеми видами индукторов, а наибольший уровень экспрессии был отмечен при использовании индуктора LPS ($4,95 \pm 2,50$) (рис. 2).

Таблица 2

N-кратные различия уровня экспрессии генов *MCP-1*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1*, *IFNGR2* при стимуляции РНА, TDM, LPS, IFNg, IL-4, и их комбинациями по сравнению с не стимулированными культурами

Стимуляторы	Гены				
	<i>MCP1</i>	<i>IFNG</i>	<i>TLR2</i>	<i>STAT1</i>	<i>IFNGR2</i>
TDM	$2,66 \pm 1,92$	$1,25 \pm 1,03$	$1,11 \pm 0,98$	$0,65 \pm 0,49$	$0,74 \pm 0,51$
LPS	$4,95 \pm 2,50$	$2,26 \pm 1,74$	$1,65 \pm 1,47$	$1,00 \pm 0,65$	$0,36 \pm 0,43$
IFN- γ	$3,54 \pm 2,88$	$1,34 \pm 0,98$	$1,02 \pm 1,10$	$0,83 \pm 0,70$	$0,53 \pm 0,57$
IL-4	$3,23 \pm 2,44$	$2,46 \pm 1,51$	$1,20 \pm 1,16$	$0,69 \pm 0,43$	$0,63 \pm 0,94$
TDM+IFN- γ	$4,11 \pm 2,33$	$1,39 \pm 1,20$	$1,91 \pm 1,74$	$0,68 \pm 0,54$	$0,40 \pm 0,56$
TDM+IL-4	$3,99 \pm 2,21$	$2,34 \pm 1,80$	$2,04 \pm 1,76$	$0,72 \pm 0,71$	$0,53 \pm 0,72$
LPS+IFN- γ	$3,41 \pm 2,49$	$1,63 \pm 1,34$	$1,38 \pm 0,96$	$0,64 \pm 0,42$	$0,48 \pm 0,65$
LPS+IL-4	$3,22 \pm 2,67$	$1,78 \pm 1,40$	$1,31 \pm 0,83$	$0,87 \pm 0,63$	$0,66 \pm 0,68$
РНА	$2,46 \pm 2,18$	$2,30 \pm 1,45$	$1,04 \pm 0,80$	$0,70 \pm 0,63$	$0,38 \pm 0,44$

Примечание. Представлены средние значения и ошибка средней показателя $2^{-\Delta\Delta Ct}$, характеризующего кратность изменения уровня экспрессии генов в стимулированных культурах по сравнению с не стимулированными.

Стимулирующее влияние IL-4 на продукцию MCP1 ($3,23 \pm 2,44$), показанное в данном исследовании, доказано в работе И.С. Фрейдлин (2005). Установленное индуцирующее влияние IFN- γ на экспрессию гена *MCP1* ($3,54 \pm 2,88$) подтверждают данные литературы: в культуре кератиноцитов после стимуляции IFN- γ наблюдалось увеличение уровня экспрессии мРНК гена *MCP1* и секреция его белкового продукта [Белова, 2008].

Наиболее выраженное повышение **уровня экспрессии гена *IFNG*** наблюдалось при стимуляции бактериальным продуктом LPS ($2,26 \pm 1,74$), индуктором иммунного ответа IL-4 ($2,46 \pm 1,51$), РНА ($2,30 \pm 1,45$) и комбинацией TDM+IL-4 ($2,34 \pm 1,80$) (табл. 2, рис. 2). Стимулирующее влияние РНА на экспрессию гена *IFNG* подтверждают работы отечественных и зарубежных исследователей [Lang, 1998; Fan, 1998; Пичугина, 2003]. Активирующее воздействие антигенов сальмонеллы на продукцию IFN- γ показано в работе Воробьева А.А. (2001). В данном исследовании был использован LPS-компонент клеточной стенки *S. enteritidis*.

Обнаружено повышение уровня экспрессии генов провосполительных цитокинов *MCP1* и *IFNG* при введении в культуру клеток

противовоспалительного цитокина IL-4 или его комбинаций с микробными продуктами TDM и LPS (рис. 2). IL-4 рассматривают как цитокин противовоспалительного действия [Ohmori, 1994; Levings, 1999; Zhou, 1994], супрессирующего генную экспрессию провосполительных цитокинов в ответ на стимуляцию LPS и IFN- γ . Однако имеется ряд исследований, обнаруживших, что стимуляция IL-4 *in vitro* или *in vivo* ассоциирована с провосполительными ответами по I типу [Bell, 1999; Fort, 2001], т.е. в некоторых случаях IL-4 может способствовать экспрессии генов провосполительных цитокинов. Данные литературы [Major, 2002] свидетельствуют о том, что IL-4 самостоятельно или в комбинации с LPS способен к потенциальной продукции провосполительных цитокинов.

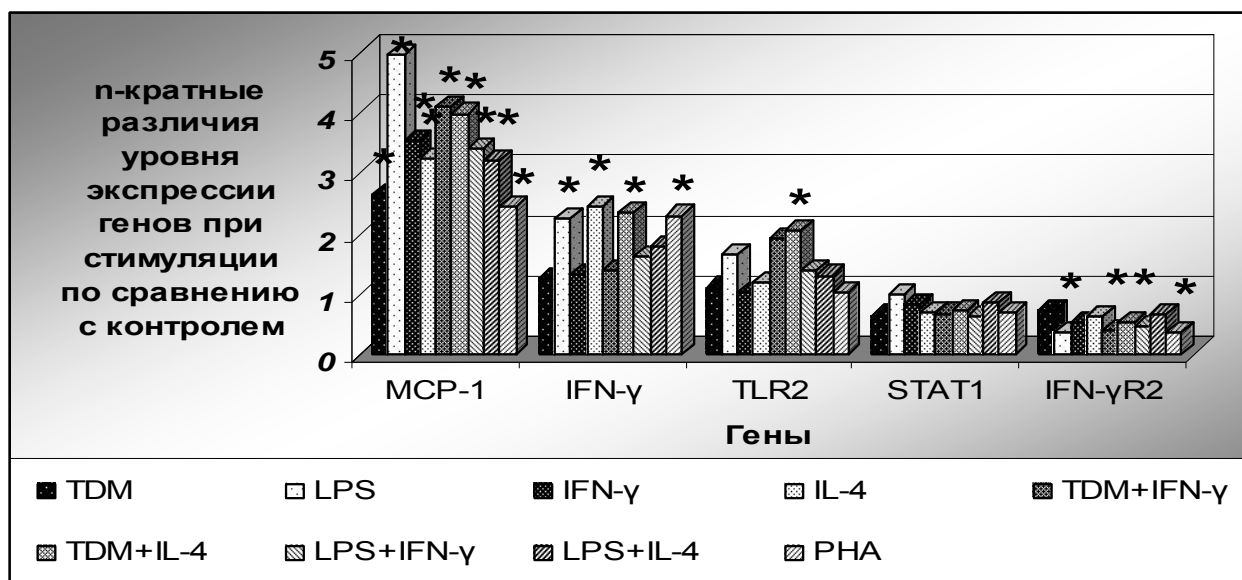


Рис. 2. Уровень экспрессии генов *MCP1*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1*, *IFNGR2* при стимуляции TDM, LPS, IFN- γ , IL-4, PHA, TDM+IFN- γ , TDM+IL-4, LPS+IFN- γ , LPS+IL-4. За единицу принят уровень экспрессии генов при отсутствии стимуляции. * - Уровень экспрессии генов достигший не менее двукратных изменений значений относительно базального уровня (контроль).

Для гена *TLR2* стимулирующее воздействие, в виде повышения уровня экспрессии до $2,04 \pm 1,76$ (табл. 2, рис. 2), показано только при использовании комбинации TDM+IL-4. Активирующее действие компонента клеточной стенки *M. tuberculosis* LAM (микобактериальный гликолипидный липоарабиноманнан) на экспрессию молекул TLR2 на поверхности иммунокомпетентных клеток согласуются с данными литературы [Means, 1999].

Для генов *STAT1* и *IFNGR2* отмечено снижение уровня экспрессии по сравнению с контролем. Уровень экспрессии гена *STAT1* не достигал 2 – кратных изменений, поэтому эти результаты в дальнейший анализ не включались.

Уровень экспрессии гена *IFNGR2* при стимуляции индукторами микробной природы LPS, TDM+IFN- γ и LPS+IFN- γ , а также не

специфическим индуктором РНА снижался в 2 и более раза по сравнению с уровнем экспрессии в не стимулированной культуре (табл. 2, рис 2). Ингибирующее влияние микробных компонентов на экспрессию гена *IFNGR2* было подтверждено в ряде исследований [Sakatsume, 1996; Stoiber, 1999; Hussain, 1999; Crespo, 2002; Fortune, 2004; Regis, 2005].

Сравнение уровней генной экспрессии в культурах клеток носителей различных генотипов по выбранным полиморфным вариантам С-2508Т гена *MCPI*, Т-1488С гена *IFNG*, А-1831С гена *STAT1*, G/T гена *TLR2*, G-1704del гена *IFNGR2*

Анализ частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов проведен у 91 здоровых жителей г. Томска русской национальности (табл. 3). Во всех случаях частоты генотипов в исследованной группе соответствовали ожидаемым при РХВ.

Таблица 3
Частоты аллелей и генотипов для генов *MCPI*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1* и *IFNGR2*

Ген	Генотип / редкий аллель	%	Критерий χ^2	p*
<i>MCPI</i> , С-2508Т, (n = 88)	СС	6,8	0,1898	p>0,05
	ТС	42,0		
	ТТ	51,2		
	С	28,0		
<i>IFNG</i> , Т-1488С, (n = 95)	ТТ	35,8	0,0286	p>0,05
	СТ	47,4		
	СС	16,8		
	С	40,5		
<i>TLR2</i> , интрон G/T (n=74)	ТТ	89,0	2,1857	p>0,05
	TG	9,5		
	GG	1,5		
	Т	6,3		
<i>STAT1</i> , А-1831С, (n = 98)	СС	12,2	1,7938	p>0,05
	АС	36,7		
	АА	51,1		
	С	30,5		
<i>IFNGR2</i> , G-1704del (n=97)	GG	74,2	0,6483	p>0,05
	G-	22,7		
	--	3,1		
	G	14,4		

Примечание. p* - уровень значимости, полученный при оценке равновесия Харди-Вайнберга тестом χ^2 .

Для выявления наличия ассоциации между полиморфными вариантами промоторной области и экспрессией соответствующих генов проведено сравнение уровней генетической экспрессии в культурах клеток у носителей различных генотипов по выбранным полиморфным вариантам.

Оценка средних значений уровня экспрессии гена *MCP1* между генотипами выявила статистически значимые отличия в уровнях экспрессии при стимуляции LPS, IFN- γ и PHA (рис. 3). Самый высокий уровень экспрессии гена *MCP1* выявлен при стимуляции индуктором LPS для генотипа -2508C/C ($8,9\pm 0,42$, $p<0,007$) относительно -2508T/C ($3,34\pm 2,0$) и -2508T/T ($5,0\pm 0,88$). При стимуляции культуры клеток IFN- γ наблюдали повышение уровня экспрессии гена *MCP1* в зависимости от доли аллеля -2508T в генотипе обследуемых: $0,65\pm 0,49$ для генотипа -2508C/C, $2,05\pm 0,29$ для -2508T/C и $6,5\pm 1,97$ для генотипа -2508T/T. При экспозиции клеток PHA ($p<0,05$) уровень экспрессии гена *MCP1* повышался более чем в четыре раза для генотипа -2508T/T ($4,47\pm 2,38$) по сравнению с носителями других генотипов -2508T/C ($1,31\pm 1,02$) и -2508C/C ($1,3\pm 0,85$).

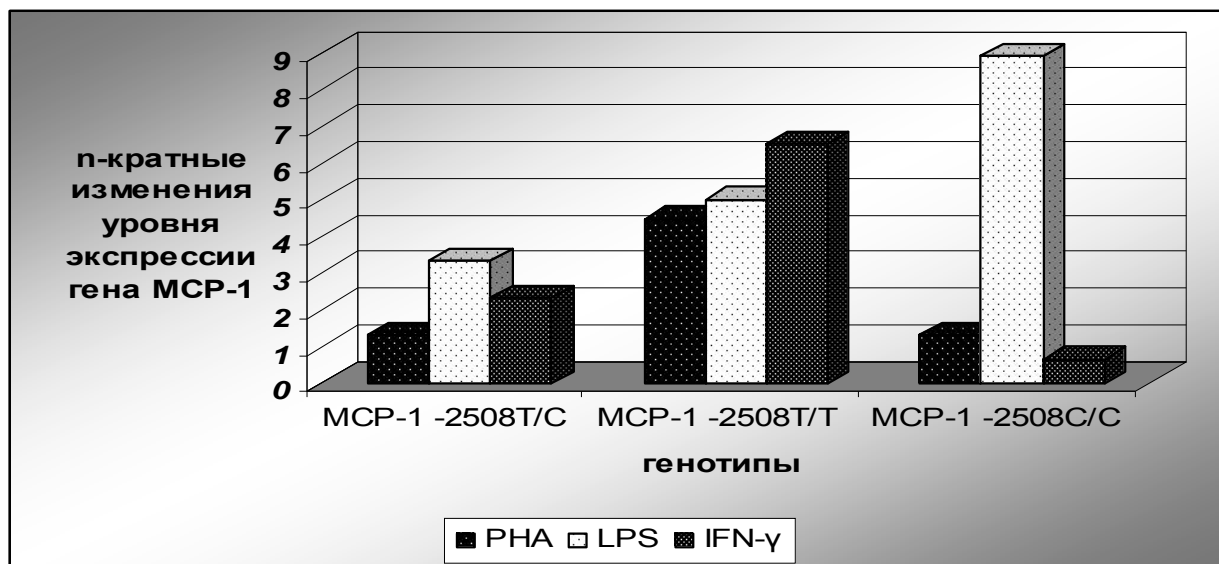


Рис. 3. Уровень экспрессии у носителей генотипов -2508C/C, -2508T/C и -2508T/T полиморфного варианта T-2508C гена *MCP1* при стимуляции LPS, IFN- γ и PHA

Гомозиготные состояния генотипов -2508C/C и -2508T/T ($6,3\pm 2,14$) по полиморфному варианту T-2508C промоторной области гена *MCP1* при индукции LPS коррелирует ($p<0,04$) с более высоким уровнем экспрессии гена по сравнению с гетерозиготами ($3,34\pm 2,0$).

Уровень экспрессии гена *MCP1* у носителей аллелей -2508C и -2508T достоверно отличался при стимуляции индуктором LPS ($p<0,002$), IFN- γ ($p<0,002$) и PHA ($p<0,01$). Стимуляция культур мононуклеарных клеток крови здоровых людей специфическим индуктором LPS сопровождается высокими значениями уровня экспрессии гена *MCP1* у носителей аллеля -2508C ($8,9\pm 0,42$) по сравнению со значениями уровня экспрессии гена для

обладателей аллеля -2508Т ($4,08 \pm 1,75$). Присутствие аллеля -2508Т в генотипах обследуемых приводило к повышению уровня экспрессии гена от $4,48 \pm 2,38$ до $6,5 \pm 1,97$ при индукции РНА и IFN- γ по сравнению с не стимулированной культурой соответственно. Соотнося эти данные с полученными ранее, можно предположить, что аллель -2508С гена *MCP1* обладает протективной ролью в развитие инфекционных заболеваний в большей степени, чем аллель -2508Т.

Анализ средних значений n-кратных различий между уровнем экспрессии мРНК в стимулированных культурах для гена *IFNG* в группах, сформированных по генотипу, показал статистически значимые отличия при стимуляции LPS+IL-4, TDM+IFN- γ и LPS+IFN- γ (рис. 4). У лиц с генотипом -1488Т/Т ($3,0 \pm 1,53$) при стимуляции культуры клеток LPS+IL-4 ($p < 0,003$) уровень экспрессии в 2,3 раза выше по сравнению с уровнем экспрессии, полученным для лиц с генотипом -1488Т/С ($1,28 \pm 0,73$) и в 4,0 раза выше, чем у носителей генотипа -1488С/С ($0,75 \pm 0,74$). При воздействии TDM+IFN- γ ($p < 0,008$) наблюдалось постепенное снижение уровня экспрессии гена в зависимости от дозы аллеля -1488С. Для генотипа -1488С/С уровень экспрессии составил $3,07 \pm 1,25$, а для вариантов -1488Т/С и -1488Т/Т – $1,08 \pm 0,88$ и $0,76 \pm 0,47$ соответственно. Уровень экспрессии гена *IFNG* при стимуляции комбинацией LPS+IFN- γ ($p < 0,003$) для гетерозигот -1488Т/С по изучаемому полиморфизму имел значение $0,57 \pm 0,40$, что статистически значимо ниже уровня экспрессии гена для гомозигот -1488С/С в четыре раза ($2,3 \pm 0,53$) и для -1488Т/Т в 4,4 раза ($2,48 \pm 1,62$).

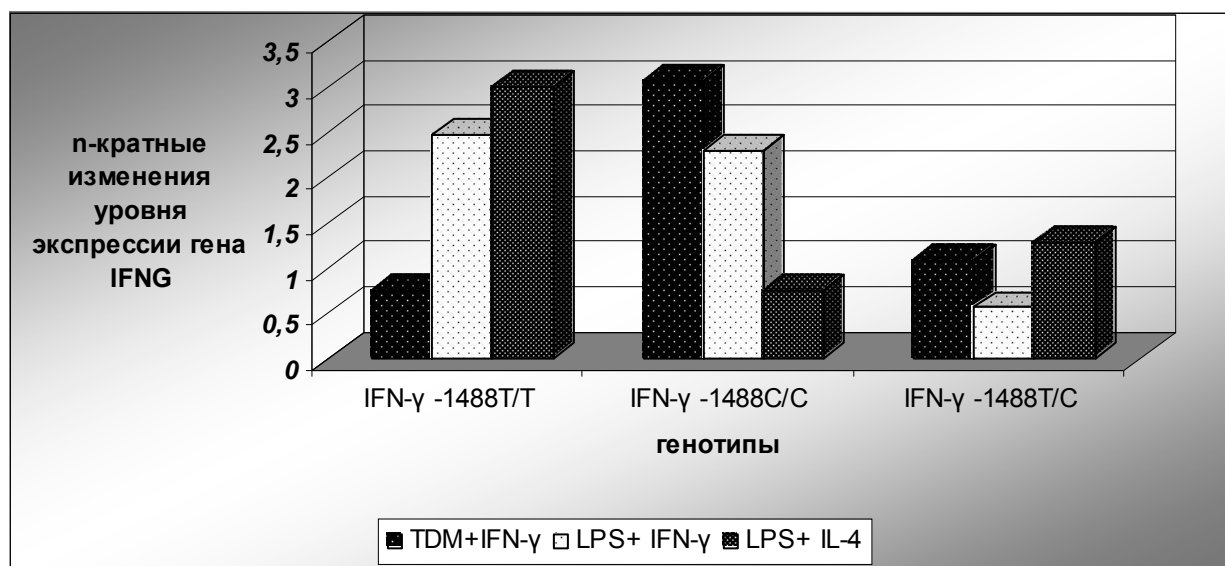


Рис. 4. Уровень экспрессии у носителей генотипов -1488С/С, -1488Т/С и -1488Т/Т полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG* при стимуляции TDM+IFN- γ , LPS+IFN- γ , LPS+IL-4

Анализ различий в уровне экспрессии гена *IFNG* в группах, сформированных по гомо- или гетерозиготному носительству выявил статистически значимые различия при стимуляции LPS+IFN- γ ($p < 0,005$) и

TDM+IL-4 ($p < 0,03$). Гетерозиготное состояние генотипа -1488T/C по полиморфному варианту T-1488C промоторной области гена *IFNG* при индукции LPS+IFN- γ коррелирует с низким уровнем экспрессии гена ($0,58 \pm 0,4$), т.е. с отсутствием ответа на микробный продукт LPS, по сравнению с гомозиготами ($2,41 \pm 1,26$). При экспозиции культуры клеток TDM+IL-4 наблюдается обратная картина уровня экспрессии изучаемого гена у обладателей гомозигот и гетерозигот. Стимуляция культуры мононуклеарных клеток корд-фактором *M. tuberculosis* TDM в сочетании с IL-4 приводит к повышению уровня экспрессии гена *IFN- γ* у лиц гетерозиготных по полиморфному варианту T-1488C в 3,5 раза ($3,52 \pm 0,56$) по сравнению с контролем, а у гомозиготных носителей только в 1,4 раза ($1,46 \pm 0,36$). Такое явление можно объяснить не одинаковым воздействием стимуляторов различного микробного происхождения на исследуемый полиморфный вариант гена *IFNG*.

Экспозиция культуры клеток индукторами различной природы характеризуется корреляцией уровня экспрессии исследуемого гена с дозой аллеля -1488T при стимуляции LPS+IL-4, или с дозой аллеля -1488C при индукции комбинацией TDM+IFN- γ соответственно. Использование стимуляторов, полученных от двух филогенетически различных микроорганизмов, не вызывает однонаправленного экспрессионного ответа гена *IFN- γ* у носителей генотипов -1488T/T и -1488C/C.

Известно, что *M. tuberculosis* выживает в макрофагах с помощью ингибирования IFN- γ -сигнала. Поскольку гетерозиготный генотип -1488T/C характеризуется пониженным уровнем экспрессии гена *IFNG* по сравнению с контролем, можно сделать предположение, что в ответ на попадание *M. tuberculosis* в организм человека замена цитозина на тимидин в позиции T-1488C в промоторной области изучаемого гена только в одной хромосоме будет способствовать синтезу IFN- γ в недостаточных количествах. Снижение уровня IFN- γ является одним из механизмов выживания микобактерий в макрофагах и их сопротивлению иммунной системе. Носителями генотипа -1488T/C по изучаемому полиморфизму является около 47% населения г. Томска (табл. 3). Окончательные выводы о возможном вкладе полиморфного варианта T-1488C промоторной области гена *IFNG* в возникновение и развитие иммунного ответа при инфицировании *M. tuberculosis*, можно будет сделать при проведении подобного эксперимента на культурах мононуклеарных клеток из венозной крови больных туберкулезом.

Оценка средних значений уровня экспрессии между генотипами полиморфного варианта A-1831C промоторной области гена *STAT1* не показала статистически значимых различий в уровнях экспрессии при стимуляции TDM, LPS, IFN- γ , IL-4, РНА, TDM+IFN- γ , TDM+IL-4, LPS+IFN- γ и LPS+IL-4.

Оценка значений между генотипами полиморфизма G/T интронной области гена *TLR2* выявила статистически значимые отличия в уровне экспрессии при стимуляции TDM ($p < 0,01$) (рис. 5). При стимуляции TDM уровень экспрессии гена *TLR2* в культурах клеток лиц с генотипом G/T

($2,21 \pm 1,23$) был в 1,3 раза выше по сравнению с уровнем экспрессии, полученным для генотипа T/T ($1,70 \pm 0,0$) и в 3,2 раз выше, чем у носителей генотипа G/G ($0,69 \pm 0,56$). Активирующее влияние TDM на экспрессию изучаемого гена подтверждено в опубликованных исследованиях [Means, 1999]. Однако полученные данные не позволяют сделать однозначные выводы о влиянии полиморфного варианта rs56000463: T>G интронной области на поведение гена *TLR2* при воздействии компонентов клеточной стенки микобактерий в условиях *in vitro*.

Анализ средних суммы n-кратных различий между уровнем экспрессии мРНК в стимулированных культурах для гена *IFNGR2* в группах, сформированных по генотипу, показал статистически значимые отличия ($p < 0,005$) при стимуляции TDM+IFN- γ (рис. 5). Уровень экспрессии гена *IFNGR2* при стимуляции клеточных культур TDM+IFN- γ резко снижается у носителей генотипов -1704G/G ($0,21 \pm 0,23$) и -1704-/- ($0,17 \pm 0,03$), а уровень экспрессии гена у обладателей генотипа -1704G/- ($1,21 \pm 0,27$) приближается к значению контроля.

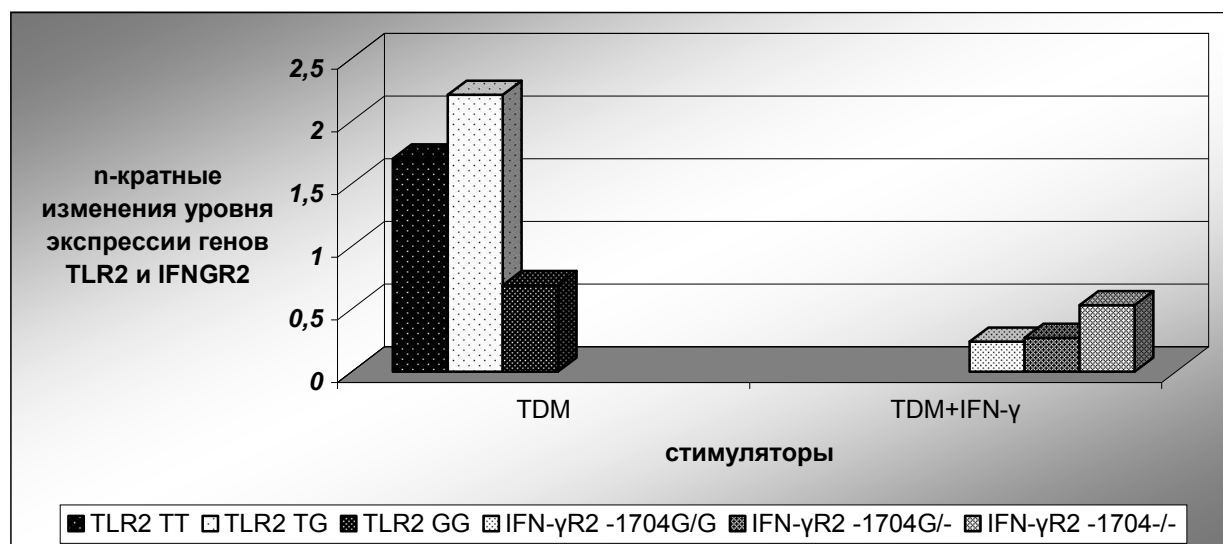


Рис. 5. Уровень экспрессии у носителей генотипов G/G, G/T и T/T полиморфного варианта rs56000463: T>G интронной области гена *TLR2* при стимуляции TDM и уровень экспрессии у носителей генотипов -1704G/G, -1704G/- и -1704-/- при наличии делеции в положении G-1704del промоторной области гена *IFNGR2* при стимуляции TDM+IFN- γ

Уровень экспрессии гена *IFNGR2* гомозиготных носителей делеции в положении -1704 статистически значимо ($p < 0,02$) ниже в 4,3 при индукции LPS+IFN- γ относительно уровня экспрессии гена обладателей гетерозиготных генотипов.

Присутствие делеции в позиции -1704 обследуемых приводило к статистически значимому ($p < 0,03$) снижению уровня экспрессии гена *IFNGR2* при индукции TDM+IFN- γ до $0,17 \pm 0,16$, что было в 4,8 раза ниже, чем уровень экспрессии гена для индивидуумов с аллелем -1704G ($0,81 \pm 0,19$). То есть присутствие делеции в позиции -1704 приводит к

резкому снижению уровня экспрессии исследуемого гена при экспозиции с микробным антигеном.

Наиболее благоприятным сочетанием для индивидуумов при инфицировании микобактериями будет присутствие аллеля -1704G в гетерозиготном состоянии по полиморфному варианту -1704 G/- промоторной области гена *IFNGR2*. Супрессирующее влияние TDM в присутствии иммунномодулятора IFN- γ на экспрессию изучаемого гена исследовано в ряде работ [Hussain, 1999; Fortune, 2004]. Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что исследуемая делеция в позиции -1704 промоторной области гена *IFNGR2* обладает функциональной значимостью и оказывает влияние на риск возникновения туберкулеза, но не сальмонеллеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачи проведенного исследования включали в себя формирование, посредством биоинформационных методов панели потенциально функциональных однонуклеотидных полиморфных вариантов в промоторной и интронной областях генов *MCPI*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1* и *IFNGR2* и оценку влияния полиморфизмов на экспрессию исследуемых генов в культурах мононуклеарных клеток крови при стимуляции их индукторами микробного и не микробного происхождения у здоровых русских жителей г. Томска.

С помощью биоинформационной программы MatInspector проведен анализ 26 полиморфизмов промоторной области генов *MCPI*, *IFNG*, *STAT1*, *IFNGR2* и пяти SNPs интронной области гена *TLR2*, из которых для дальнейшего анализа выбрано только пять SNPs: rs1024611, rs2069705, rs4853455, rs17880053 и rs56000463. Остальные 21 SNPs при оценке их предполагаемого фенотипического эффекта, не вызывали изменений в качестве и количестве ССФТ регуляторного региона каждого из исследуемых генов. Идентификация потенциальных сайтов связывания для факторов транскрипции в промоторных областях генов *MCPI*, *IFNG*, *STAT1*, *IFNGR2* и в интронной области гена *TLR2* позволила значительно сократить пространство поиска кандидатных SNPs, т.е. подойти к их выбору более целенаправленно.

Выявлено, что присутствие нуклеотида «С» в позиции T-2508C гена *MCPI* и в положении T-1488C гена *IFNG* формирует сайты связывания для фактора транскрипции MyoD в гене *MCPI* и для HNF1 в гене *IFNG*. С помощью базы данных IIG-TRRD показана непосредственная роль этих сайтов связывания для факторов транскрипции MyoD и HNF1 в осуществлении процессов транскрипции генов иммунного ответа. Возможно, что именно эти сайты связывания являются необходимыми для обеспечения функциональности, рассмотренных участков, промоторных регионов этих генов.

Анализ изменений уровня экспрессии генов *MCPI*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1*, *IFNGR2* в культурах клеток стимулированных различными индукторами показал, что экспрессия исследуемых генов может быть, как индуцирована, так и супрессирована. Микробные продукты LPS и TDM, индукторы

иммунного ответа IL-4 и IFN- γ , неспецифический индуктор РНА, а также комбинации TDM+IFN- γ , TDM+IL-4, LPS+IFN- γ и LPS+IL-4 индуцировали экспрессию генов *MCPI*, *IFNG* и *TLR2*, и снижали уровень экспрессии генов *STAT1* и *IFNGR2*.

Одна и та же доза стимулятора оказывала разное воздействие на экспрессию разных генов. Сравнение профилей генной экспрессии в исследуемых группах, показало, что это характерно для всех используемых индукторов. Также выявлено, что уровень экспрессии различных генов варьировал в зависимости от вида используемого стимулятора, т.е. оказался стимул-специфическим.

Уровень экспрессии гена *MCPI* увеличивался в два и более раза в клеточных культурах стимулированных всеми видами индукторов. Индуктор LPS оказывал значительное стимулирующее воздействие на экспрессию гена *MCPI*, так как из всех опробованных стимуляторов он увеличивал уровень экспрессии этого гена более чем в 4,9 раза. Возможно, активирующее действие LPS на ген *MCPI*, объясняется наличием ARE (adenosine-uridine-rich element) – элемента в пределах 3'-UTR мРНК, который играет значительную роль в осуществлении посттранскрипционных механизмов проведения сигнала LPS. LPS-сигнал стабилизировал мРНК, блокируя ее деградацию, что ведет к быстрому накоплению соответствующего белкового продукта.

Двух- и более кратное повышение экспрессии гена *IFNG* наблюдалось при стимуляции бактериальным продуктом LPS, индуктором иммунного ответа IL-4, РНА и комбинацией TDM+IL-4. Во всех остальных случаях уровень экспрессии этого гена не достигал порога регистрации значений.

Экспрессия гена *TLR2* в культурах мононуклеарных клеток крови здоровых людей повышалась только при использовании комбинации TDM+IL-4. Стимуляция культур клеток индукторами микробного и не микробного происхождения приводила к снижению уровня экспрессии генов *STAT1* и *IFNGR2*. Регистрируемое снижение экспрессии гена *IFNGR2* наблюдалось при добавлении в культуры клеток не специфического индуктора РНА, микробного антигена LPS или LPS в сочетании с IFN- γ и компонента микобактериальной стенки TDM в комбинации с IFN- γ .

Анализ уровня экспрессии обладателей полиморфных вариантов генов *MCPI*, *IFNG*, *TLR2*, *STAT1* и *IFNGR2* в условиях стимуляции культур мононуклеарных клеток крови различными индукторами показал зависимость их от генотипа.

Гомозиготные состояния гена *MCPI* -2508C/C и -2508T/T по полиморфному варианту T-2508C при индукции LPS коррелировали с более высоким уровнем экспрессии гена по сравнению с гетерозиготами. Кроме того, стимуляция культур мононуклеарных клеток крови здоровых людей специфическим индуктором LPS сопровождалась высокими значениями уровня экспрессии гена *MCPI* у носителей аллеля -2508C, а при индукции клеток модулятором иммунного ответа IFN- γ и РНА – у обладателей аллеля -2508T. Скорее всего, аллель -2508C гена *MCPI* обладает протективной

ролью в развитие инфекционных заболеваний в большей степени, чем аллель -2508Т.

Для полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG* показана предположительная протективная роль аллеля -1488С, связанная с повышением уровня экспрессии гена, в развитии иммунитета против *M. tuberculosis*, и протективная роль аллеля -1488Т в развитии иммунного ответа при инфицировании *S. enteritidis*, при использовании соответствующих индукторов микробного происхождения. Гомозиготные состояния -1488Т/Т и -1488С/С исследуемого полиморфного варианта гена *IFNG* являлись более благоприятными для их носителей, чем гетерозиготное -1488Т/С.

Показано, что, возможно, присутствие аллеля -1704G в гетерозиготном состоянии по делеции G-1704del промоторной области гена *IFNGR2* будет наиболее благоприятным сочетанием для индивидуумов при инфицировании микобактериями. При этом полученные данные позволили сделать предположение о том, что исследуемый полиморфизм гена *IFNGR2* обладает функциональной значимостью и оказывает влияние на риск возникновения туберкулеза, но не сальмонеллеза.

На основе проведенных исследований можно утверждать, что полиморфные варианты промоторной области гена *MCP1* в позиции С-2508Т, гена *IFNG* в позиции Т-1488С и гена *IFNGR2* в положении G-1704del обладают функциональной значимостью и, возможно, влияют на риск развития Тб и сальмонеллеза.

Изученные полиморфные замены в промоторной области гена *STAT1* и интронной области гена *TLR2*, скорее всего, не имеют влияния на уровень экспрессии этих генов.

В целом, полученные результаты свидетельствуют, что использование биоинформационных методов в сочетании с экспериментальной проверкой является эффективным методом установления функциональной значимости полиморфизма генов.

ВЫВОДЫ

1. Частоты полиморфных вариантов генов (*MCP-1*, *IFNG*, *IFNGR2* и *STAT1*) у здоровых русских находились в границах величин, характерных для популяций европеоидного происхождения. Частота редкого аллеля Т полиморфного варианта rs56000463: Т>G интронной области гена *TLR2* составила 6,3%.
2. Различные индукторы имеют разнонаправленное влияние на экспрессию генов *IFNG*, *IFNGR2*, *STAT1*, *MCP1*, *TLR2*: корд-фактор *M. tuberculosis* (ТДМ) и иммуномодулятор IL-4 повышают экспрессию генов *MCP1* и *IFNG*; компонент клеточной стенки *S. enteritidis* LPS и неспецифический стимулятор РНА повышают уровень экспрессии генов *MCP1* и *IFNG* и снижают уровень экспрессии гена *IFNGR2*; иммуномодулятор IFN-γ и сочетание LPS+IL-4 повышают уровень экспрессии гена *MCP1*; комбинация индукторов ТДМ+IL-4 способствует экспрессии генов *MCP1*, *IFNG* и *TLR2*; сочетание стимуляторов ТДМ+IFN-γ и LPS+IFN-γ

индуцирует экспрессию гена *MCP1* и супрессирует экспрессию гена *IFNGR2*.

3. Полиморфные варианты С-2508Т гена *MCP1*, Т-1488С гена *IFNG*, G-1704del гена *IFNGR2*, выбранные с помощью биоинформационной программы MatInspector, являются функционально значимыми: уровень экспрессии генов по этим полиморфным вариантам существенно меняется в зависимости от генотипа.
4. У носителей одних и тех же генотипов по исследуемым полиморфизмам разные виды стимуляторов с неизменной концентрацией вызывали разные экспрессионные ответы в культурах клеток.
5. Аллели -2508Т и -2508С гена *MCP1* обладают протективной ролью в развитие туберкулеза и сальмонеллеза – гомозиготные генотипы -2508СС и -2508ТТ ассоциированы с более высоким уровнем экспрессии гена по сравнению с гетерозиготами. Аллель -1488С гена *IFNG* играет протективную роль в развитии иммунитета против *M. tuberculosis*, а аллель -1488Т в развитии иммунного ответа при инфицировании *S. enteritidis*.
6. Установлена вовлеченность в патогенез туберкулеза гена *IFNGR2*, делеция области -1704 которого приводит к снижению уровня экспрессии гена при экспозиции клеток с микробными антигенами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Ожегова Д.С.**, Фрейдин М.Б., Пузырев В.П. Биоинформационные подходы к изучению регуляторных последовательностей ДНК: программы, базы данных, алгоритмы / Сборник научных трудов. Генетика человека и патология. – Томск. – 2007. – Выпуск №8. – С.320 – 323.
2. **Ожегова Д.С.**, Фрейдин М.Б. Анализ функциональных вариантов промоторных регионов генов-кандидатов подверженности внутриклеточным инфекционным заболеваниям / Сборник тезисов по материалам XII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань. – 2007. – С. 101 – 102.
3. **Ozhegova D.S.**, Freidin M.B., Pusyrev V.P. Using the bioinformatic tools to choose the SNPs with highly possible phenotypic effect / European Journal of Human Genetics. – 2008. – Vol. 16. – P. 397.
4. **Ожегова Д.С.**, Фрейдин М.Б., Гончарова И.А., Пузырев В.П. Уровень экспрессии генов иммунного ответа *IFNG*, *STAT1* и *MCP1* в условиях различной антигенной нагрузки / Якутский медицинский журнал. – 2009. – №2. – С.118-121.
5. **Ожегова Д.С.**, Фрейдин М.Б. Биоинформационный подход для оценки регуляторных мотивов промоторных областей генов подверженности к инфекционным заболеваниям / Сборник тезисов по материалам VIII

конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке».
Томск. – 2007. – С. 135-136.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
РХВ – равновесие Харди-Вайнберга
ССФТ – сайт связывания факторов транскрипции
С_т - время выхода кривой на плато и пересечение ее с базовой линией.
Тб - туберкулез
IFN – интерферон
IFNG – ген интерферона гамма
IFNGR2 – ген субъединицы 2 рецептора интерферона гамма
ИЛ4 – интерлейкин 4
GAPDH – ген глицеральдегид-3 фосфат дегидрогеназы
FASTSNP – **F**unction **A**nalysis and **S**election **T**ool for **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphisms (функциональный анализ и инструменты выбора однонуклеотидных полиморфизмов)
LAM – липоарабиноманнан
LPS – липополисахарид
MCP1 (CCL2) – ген моноцитарного хемотаксического протеина
MyoD – **Myoblast Determining factors** (детерминирующий фактор миобластомы)
РНА – фитогемагглютинин
RT-PCR – полимеразная цепная реакция в реальном времени
SNP – single nucleotide polymorphisms (однонуклеотидные полиморфизмы)
STAT1 (ISGF-3, STAT91) – ген трансдуктора и активатора транскрипции
TDM – трехалозе 6,6'-димиколат, корд-фактор *Mycobacterium tuberculosis*
TLR2 – ген Toll-like рецептора 2