

АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ ПОЛТОРАК

профессор, заведующий Лабораторией молекулярной генетики врожденного иммунитета, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация), профессор Департамента патологии Центра биомедицины, Тафтский университет (Бостон, Соединенные Штаты Америки)  
alexander.poltorak@tufts.edu

## МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА. ИЗУЧЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ

Установление и изучение многочисленных функций генов человека является одной из главных задач современной иммуногенетики. Вследствие высокой степени гомологии между мышинным и человеческим геномами важная роль в решении этой задачи принадлежит мышинной модели, использование которой возросло в связи с выведением различных инбредных линий мышей. Различия в иммунном ответе в мышинных линиях были неоднократно использованы для нахождения иммунологически компетентных генов. В данном обзоре приведены некоторые из наиболее успешных и известных примеров использования мышей в изучении врожденного иммунитета.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, мышинная модель, геном человека, инфекции, воспаление

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие экспериментальной биологии в конце XX – начале XXI века привело к прорыву в исследованиях клеточных и молекулярных механизмов иммунитета. Это относится в первую очередь к пересмотру ранее сложившихся представлений о роли врожденного иммунитета в общей системе иммунитета организма. Во многом этому способствовало развитие молекулярно-генетических методов исследования. В настоящее время причины развития многих патологий человека интенсивно изучаются. Тем не менее генетическое разнообразие человека осложняет диагностику и лечение различных заболеваний. Так, например, известно, что предрасположенность к сепсису в ходе иммунного ответа на инфекцию находится под строгим генетическим контролем [58]. Более того, хорошо изучена роль полиморфизма в генах, кодирующих белки острой фазы септического шока, таких как TNF (фактор некроза опухоли, ФНО), IL-1, IL-6 [44]. Тем не менее наличия мутантной аллели по одному из этих генов далеко не достаточно для возникновения предрасположенности к сепсису, которая существенно зависит от окружения, расовой и этнической принадлежности [57].

Осознавая проблему индивидуального разнообразия человека, основоположники мышинной генетики использовали инбридинг для выведения генетически однородных мышинных линий (*inbred mouse lines*, или *classical inbred mice*), что позволило изучать экспериментальную инфекцию на строго определенном генетическом фоне [19], [42]. В то же время наличие отличающихся друг от друга инбредных линий позволяет использовать их в генетическом анализе [47]. В результате почти вековой работы было выведено около 200 инбредных линий мышей,

различающихся между собой фенотипическими характеристиками [49]. На рис. 1 представлена фотография мышей двух линий – MSM и MOLF. Различия в фенотипе между двумя инбредными линиями могут быть использованы в классическом (*classical*, или *formal*) генетическом анализе. В дополнение к этому наличие полностью секвенированного и аннотированного мышинного генома, полиморфных маркеров и других информационных ресурсов способствует развитию классической генетики в мышинной модели. В последние десятилетия было установлено, что многие из инбредных линий различаются по предрасположенности к бактериальным, вирусным и паразитарным инфекциям и, следовательно, могут быть использованы в классическом генетическом анализе [26]. Классический генетический подход исторически определяется как прямая (*forward*) генетика [5]. Такой подход основан на знании фенотипа, нахождении двух инбредных линий (в случае мышинной модели), различающихся по этому фенотипу, и определении (с помощью картирования) геномного локуса, отвечающего за фенотип. На последней стадии проводят скрещивание родительских линий с целью определения ассоциации (корреляции) между фенотипом и генотипом в полученном потомстве. Альтернативными прямой генетике являются методы так называемой обратной генетики [2], в соответствии с которыми сначала производится делеция (нокаут – *knockout*) гена с последующим изучением фенотипов, которые могли измениться в животном с нокаутированным геном [15]. Таким образом, в прямой генетике по функциональному тесту (фенотип) находят ген, в то время как в обратной генетике посредством нокаута проверяют предположение о функции гена. Обратная генетика эффектив-

на, если очевидна функция гена; в противном случае предсказать функцию сложно, особенно в отсутствие ярко проявляемого фенотипа [7]. Практическая невозможность предсказания функции многих генов накладывает серьезные ограничения на обратную генетику [64]. Более того, учитывая, что функциональное разнообразие (число фенотипов) в природе значительно превышает число генов в млекопитающих (25 тысяч), можно заключить, что подавляющее большинство генов имеют не одну, а несколько функций, которые чрезвычайно трудно определить с помощью обратной генетики.

Таким образом, поскольку определить все функции с помощью обратной генетики невозможно, классическая генетика представляется единственным и наиболее перспективным подходом для нахождения функций генов [8]. Поэтому в данном обзоре мы ограничимся рассмотрением наиболее удачных примеров использования методов классической генетики для клонирования генов, ответственных за иммунный ответ.

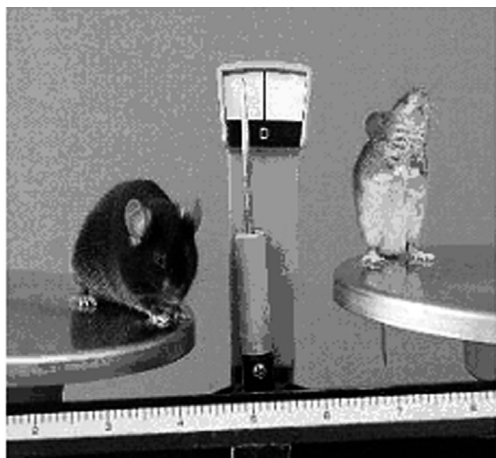


Рис. 1. Мыши линий MOLF/Ei и MSM/Ms

## РОЛЬ ЛПС-ГЕНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

В течение долгого времени считалось, что ЛПС (липополисахарид) – это составная часть бактериального эндотоксина, который был впервые изолирован из грамотрицательных бактерий и идентифицирован К. Пфайфером в начале прошлого века [56]. Структура бактериального ЛПС представлена на рис. 2. В 1947 году Пфайфер доказал, что ЛПС и эндотоксин идентичны, после чего оба термина стали использоваться как синонимы. Чувствительность к ЛПС варьирует в широком диапазоне в различных видах [3]. Так, птицы, рептилии и амфибии почти нечувствительны к ЛПС. В то же время инъекция ЛПС способна вызывать лихорадку, шок и повреждение органов у многих млекопитающих [9]. Тем не менее некоторые из них, например мыши, крысы, павианы, относительно нечувствительны

к ЛПС, а другие виды (человек, кролик) обладают наибольшей чувствительностью к ЛПС. Например, смертельная доза ЛПС для мыши и кролика различается на четыре порядка ( $10^4$ ) и позволяет предположить, что чувствительность к ЛПС генетически обусловлена [68]. Гипотеза о гене, определяющем чувствительность к ЛПС, получила подтверждение в 1968 году после обнаружения ЛПС-резистентной линии мышей (СЗН/HeJ), происходившей из одной линии с ЛПС-чувствительными мышами линии СЗН/HeN [63], которые были разделены на две независимые линии после спонтанной мутации в ЛПС-рецепторе, получившем название ЛПС-ген (LPS-gene, или *Lps*). Наличие двух конгенных инбредных линий, отличающихся между собой только чувствительностью к ЛПС, позволило постулировать наличие специфического рецептора к ЛПС. Мутантный фенотип в СЗН/HeJ линии был описан в 1968 году, а в 1978-м была охарактеризована другая линия ЛПС-резистентных мышей С57BL10/ScCR [14] и был установлен аллельный характер мутации в СЗН/HeJ- и С57BL/10ScCR-мышях (две разные мутантные аллели одного и того же гена ответственны за резистентность к ЛПС). Кроме того, было показано, что мутация в ЛПС-гене напрямую связана со способностью распознавания грамотрицательных бактерий, так как СЗН/HeJ-мыши были нечувствительны к *Salmonella typhimurium* инфекции и умирали от инфекционной дозы, которую ЛПС-чувствительные СЗН/HeN-мыши переносили легко [45]. Таким образом, наличие функционального ЛПС-гена было критично для распознавания ЛПС и борьбы хозяина с патогенными микроорганизмами, а следовательно, его выживания.

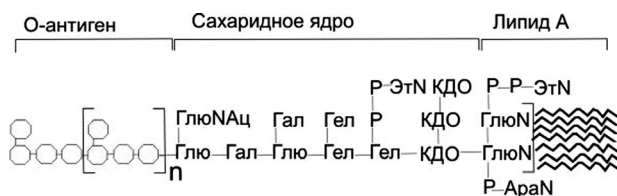


Рис. 2. Структура липополисахарида *Salmonella* spp. Показаны углеводы, входящие в состав липида А: глюкозамин (ГлюN) и 4-аминоарабиноза (АраN), а также углеводы ядра 2-кето-3-дезоксиктоонат (КДО), адаптировано из: <http://www.center-hc.ru/diseases/infection2.htm>

Первые данные по картированию ЛПС-гена на 4-й мышиной хромосоме были опубликованы в 1978 году [69], но потребовалось еще 15 лет для начала работ по позиционному клонированию. За это время были накоплены данные о полиморфных маркерах, необходимых для картирования генов, а также были разработаны методы клонирования больших фрагментов ДНК – YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) и BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), необходимых для установления геномной последовательности. Работы по позиционному клонированию ЛПС-гена нача-

лись в 1993 году независимо в трех лабораториях (Beutler [53], Malo [54] и Shwartz) и успешно завершились в 1998 году публикацией статьи [51], в которой В. Beutler с коллегами охарактеризовали мутацию в мышином TLR4 (*Toll-Like Receptor*) гене, состоявшую в замене эволюционно консервативного пролина на гистидин (P712H) в цитоплазматическом домене рецептора (рис. 3). Важную роль в идентификации TLR4 как ЛПС-рецептора имели генетические исследования *Толл*-рецептора в дрозофиле, где *Толл* (*Toll*) важен не только в эмбриональном развитии [28], но и для защиты от грибковой инфекции [38]. Последнее обстоятельство поддерживало идею об иммунной функции мышиного гомолога *Толла*. Как и ожидалось, TLR4 оказался трансмембранным рецептором, содержащим цитоплазматический домен, способный передавать сигнал от ЛПС внутрь клетки, активируя таким образом транскрипционные факторы, отвечающие за продукцию воспалительных цитокинов и выработку защитных иммунных механизмов.



Рис. 3. Схема расположения мутации в мышином TLR4 (*Toll-Like Receptor*) гене. Мутация приводит к замене эволюционно консервативного пролина на гистидин (P712H) в цитоплазматическом домене рецептора [51]

Обнаруженная мутация P712H препятствовала правильной димеризации рецептора и его активации [71]. Последующие кристаллографические и биохимические исследования подтвердили, что пролин важен для сохранения конформации цитоплазматического домена, участвующего в димеризации рецептора. Рецептор присутствует на мембране в пресобранном состоянии, и добавление ЛПС индуцирует сближение и димеризацию двух соседних молекул рецептора [35]. Важная роль цитоплазматического домена, также называемого TIR-доменом (Толл Интерлейкин-1 Рецептор), состоит в передаче клеточного сигнала, который активирует транскрипционные факторы, участвующие, в свою очередь, в экспрессии и синтезе воспалительных цитокинов [31]. Замена пролина на гистидин препятствует димеризации TIR-домена и его взаимодействию с другими молекулами, такими как MyD88, TIRAP и TRIF [34]. И наконец, в подтверждение гипотезы об аллельном характере дефекта в C3H/HeJ- и C57BL10/ScCR-мышях, было показано, что C57BL10/ScCR-мыши не синтезируют Tlr4 из-за делеции в ЛПС-локусе размером примерно 75 кб [52]. Таким образом, завершилась тридцатилетняя история поиска гена, который стал одним из первых членов хорошо известного в настоящее время семейства *Толл*-подобных

рецепторов, каждый из которых отвечает за узнавание разных компонентов бактерий (грамположительных и грамотрицательных) и вирусов.

После идентификации TLR4 как рецептора к бактериальному эндотоксину стало понятно, что остальные *Толл*-подобные рецепторы тоже могут узнавать различные микробные компоненты. Действительно, функции остальных членов семейства были охарактеризованы с помощью обратной генетики (нокаут генов). Так, TLR2 в комбинации с TLR1 или TLR6 участвует в узнавании липопептидов, пептидогликана, липотейхоевой кислоты и других бактериальных компонентов [20]. TLR3 [4], TLR7 [16], TLR8 и TLR9 [29] локализованы преимущественно в эндосомах, где они распознают нуклеиновые кислоты микробного происхождения [13]. Нокаут каждого из указанных рецепторов приводил к потере защиты мышей от различных бактериальных и вирусных инфекций [30]. Генетические открытия в области мышиных *Толл*-подобных рецепторов способствовали исследованиям полиморфизма гомологичных генов у человека. Несмотря на то что данные об ассоциации между полиморфизмами в TLR4 человека и предрасположенностью к бактериальным инфекциям были опубликованы, в этой области много противоречий. Так, например, предрасположенность к бактериальным инфекциям в детском возрасте в некоторых случаях объясняется мутациями в IRAK4 [50] и MYD88 [11], а некоторые больные вирусным энцефалитом имеют нефункциональные UNC93B1 [12] и TLR3 [72] из-за мутаций в этих генах.

## МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Место проникновения бактерий в организм называется входными воротами инфекции. Здесь на борьбу с бактериями поднимаются фагоцитирующие клетки. Первый сигнал мобилизации эти клетки получают от самих бактерий-аггессоров в виде молекул их токсинов. Одновременно с фагоцитозом бактерий макрофаги начинают синтезировать и выделять воспалительные цитокины — интерлейкин-1, фактор некроза опухолей и др. Под влиянием цитокинов усиливается прилипание циркулирующих лейкоцитов к эндотелию сосудов и мобилизация в очаг инфекции. Те же цитокины усиливают антибактериальную активность фагоцитов. Если фагоцитирующие клетки не справляются с очищением очага инфекции от бактерий, интерлейкин-1 выполняет роль межклеточного сигнала. Он вовлекает в процесс активации Т-лимфоциты и включает механизмы специфического иммунного ответа.

Фагоцитоз является одним из наиболее эффективных методов устранения патогена хозийской клеткой, которая использует низкое рН фагосом и лизосом для разрушения и расщепления микроорганизмов с помощью протеаз и ак-

тивных радикалов. Поэтому среди разнообразных механизмов адаптации к хозяйской клетке некоторые микроорганизмы эволюционировали с целью избежать фагосом или даже изменить свойства самих фагосом. Так, например, упоминавшийся ранее NRAMP является одним из компонентов фагосомы, используемой клеткой для разрушения микроорганизмов. NRAMP локализован на мембране поздних эндосом / лизосом и быстро рекрутируется к мембране фагосом и содержащимся в них микробам. NRAMP способствует оттоку ионов кальция из фагосомы, что приводит к снижению уровня этого важного иона, обедняя микробное микроокружение и затрудняя микробную жизнедеятельность [21]. Таким образом, NRAMP конкурирует с бактериями за возможность модулировать функции фагосом.

Другим примером воздействия бактерий на клеточный аппарат является инфекция внутриклеточной бактерией *Legionella pneumophila*, к которой человеческие макрофаги обычно нечувствительны, а мышинные макрофаги чувствительны и быстро умирают. Исключение составляет линия мышей A/J, которая поддерживает рост бактерий. Этот дефект был картирован на 13-й хромосоме [17], а именно в локусе, содержащем несколько полноразмерных и неполных копий генов семейства *Naip* [6], [61]. Функциональная комплементация с использованием трансгенных мышей подтвердила, что геномом, отвечающим за фенотип, является *NAIP5* [18], [70]. То обстоятельство, что ген принадлежит к NLR (*Nod-Like Receptor*) семейству, отвечающему за узнавание бактериальных компонентов, позволило предположить, что ген может распознавать компоненты *Legionella* [24]. Оказалось, что *NAIP5* взаимодействует с бактериальным флагеллином, попадающим в клетку через секреторную систему 4-го типа [55]. После распознавания флагеллина *NAIP5* активирует *CASP1* каспазу, участвующую в синтезе IL-1 и клеточной смерти посредством пироптозиса. Недавние исследования с использованием *CASP1*<sup>-/-</sup> и *IPAF*<sup>-/-</sup> нокаутных мышей позволили предположить, что после распознавания компонентов *Legionella* *NAIP5* активирует *IPAF-dependent* инфламмасому, что приводит к антибактериальной активности и клеточной смерти [70]. Более того, бактериальные мутанты флагеллина, но не дикие штаммы *Legionella* растут нормально в макрофагах линии C57BL/6, подтверждая таким образом критическую роль флагеллина в иммунном ответе к *Legionella* [55]. Исследования *NAIP5*<sup>-/-</sup> макрофагов пролили свет на механизм действия *NAIP5*. Наличие функционального *NAIP5* ассоциируется с даун-регуляцией маркеров шероховатого эндоплазматического ретикулула и ап-регуляцией лизосомных маркеров, таких как *LAMP-1* и *cathepsin*, что свидетельствует о созревании фагосомы [40]. Эти

изменения протекают очень быстро, в течение нескольких часов после инфекции, что позволяет предположить активацию дополнительных внутриклеточных компонентов, способных бороться с бактерией. Идентификация этих компонентов представляет значительный интерес.

Идентификация так называемого BCG-гена является одним из первых примеров использования прямой генетики для позиционного клонирования генов [62]. Результаты этой работы были опубликованы в 1993 году, задолго до получения сиквенса мышинного генома и широкого распространения Интернета, что затрудняло биоинформатический анализ результатов генетического картирования. До появления этой публикации было показано, что *Bcg* отвечает за защиту от таких микроорганизмов, как *S. typhimurium*, *Mycobacterium bovis* (BCG) [10]. Было также известно, что различные инбредные линии мышей сильно отличаются по своей чувствительности к инфекции *in vivo* и *in vitro* [25], [65]. В ходе предварительного генетического анализа было показано, что защита от внутриклеточной инфекции находится под контролем одного гена, который получил название *Bcg*. Поскольку клонировать *Bcg*-ген приходилось в отсутствие достаточной информации о мышинном геноме и детальной карты генома, группе под руководством Е. Скамене потребовалось самостоятельно клонировать генетические маркеры, строить геномный контиг из искусственных хромосом, заниматься обогащением локус-специфических кДНК и использовать другие молекулярно-биологические методы. Содержащийся в критической геномной области ген получил название *Nramp1* (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1*) и кодировал мембранный гликопротеин, содержащий 12 трансмембранных доменов [66]. Один из нескольких идентифицированных при сравнении различных мышинных линий полиморфизмов Gly169Asp (G169D) полностью коррелировал с устойчивостью к вышеуказанным инфекциям *in vivo* и *in vitro* [67]. Результаты позиционного клонирования *Bcg* подтвердились с помощью его геномного нокаута, который привел к резкому повышению чувствительности мышей 129SV линии к инфекциям *S. typhimurium*, *L. donovani*, *M. bovis* (BCG). Кроме того, перенос резистентной *Nramp1G169* аллели на чувствительную линию мышей C57BL/6J (*NrampD169*) приводил к увеличению устойчивости этих мышей к инфекции [27]. Было также показано, что замена G169D нарушает конформацию белка и его посттрансляционный процессинг, что приводит к отсутствию зрелого пептида на клеточной мембране [23]. Мутации в человеческом гене NRAMP1 ассоциируются с повышенной чувствительностью к туберкулезу в популяции из Африки и Азии, но не из Европы.

Предыдущий пример с *NAIP5* демонстрирует, что апоптоз как результат отношений между хозяином и патогеном является предпочтительным,

выигрышным для хозяина, и потому ассоциируется с устойчивостью к инфекции. Несмотря на то, что клетка умирает, на уровне организма происходит освобождение от патогена. Похожая стратегия используется в туберкулезной инфекции [61]. Важность проблемы туберкулеза трудно переоценить, учитывая глобальный характер заболевания. Согласно современным данным, около 32 % населения инфицировано *Mycobacterium tuberculosis* [39]. Инбредные мышиные линии используются для изучения туберкулеза в течение последних 60 лет. Экспериментальное инфицирование резистентных мышей, таких как C57BL/6, C57BL/10 и BALB, приводит к низким титрам инфекции, в то время как чувствительность к туберкулезу в линиях CBA, DBA, C3H ассоциируется со значительными инфекционными титрами в легких, воспалительной реакцией, приводящей к разрушению легочной ткани и в конечном счете смерти [1]. Действительно, макрофаги резистентных мышей в ходе инфекции более предрасположены к апоптозу, чем макрофаги чувствительных животных [33]. Эти исследования показали, что инфекция находится под контролем нескольких генов, из которых удалось идентифицировать только один локус на 1-й хромосоме. Генетический контроль ответа на *Mycobacterium tuberculosis* подтверждается данными на человеке, а именно: 1) семейной предрасположенностью к болезни; 2) фенотипическим анализом в моно- и дизиготных двойниках; 3) половыми и расовыми различиями в чувствительности к болезни [22]. Несмотря на то что генетические исследования велись исключительно на людях, первый ген был идентифицирован в мышах И. Крамником и сотрудниками. Он вместе с коллегами прокартировал *Sst1* (*Susceptibility to tuberculosis* – чувствительность к туберкулезу) на центральном участке хромосомы 1 [37]. Исследования конгенных C3HeB/FeJ животных с резистентной *B6sst1R* аллелью выявили, что *Sst1* оказывает разнообразный эффект по отношению к различным инфекциям, включая *Listeria monocytogenes*. Более того, экспрессия нормальной аллели этого гена в дефектных C3HeB/FeJ-мышях восстанавливала резистентность к туберкулезной инфекции и к устойчивости макрофагов *in vitro*. В результате многолетней работы был позиционно клонирован ген под названием *Ipr1*, функциональная копия которого присутствовала в резистентной к инфекции линии, но не в чувствительной линии мышей [46]. IPR1 мРНК активируется в ответ на интерферон, а продукт трансляции содержит сигнал ядерной локализации и транскрипционной активности. Человеческий гомолог IPR1 способен взаимодействовать с белками вируса гепатита С и вируса Эпштейна – Барр. Все это позволяет предположить, что IPR1 участвует в транскрипционной активации макрофагов в ответ на инфекцию [36].

## МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Особенность вирусов как паразитов состоит в том, что они предпочитают внутриклеточный паразитизм, то есть жизнь и размножение исключительно внутри клеток хозяина и за их счет. Как в таких условиях бороться против вируса-паразита? Остается два пути: или атаковать и убивать зараженные вирусами клетки вместе с вирусами, или каким-то образом воспрепятствовать внутриклеточному размножению вирусов, если не удалось помешать их внедрению. По первому пути идут разные типы цитотоксических клеток-киллеров, защищающих организм от вирусов. Распознав на поверхности зараженной клетки чужеродные антигены, клетки-киллеры впрыскивают в такую клетку-мишень содержимое своих цитоплазматических гранул (куда входит фактор некроза опухолей и другие молекулы, повреждающие клетку-мишень). Результатом атаки киллера, как правило, является гибель клетки-мишени вместе с внутриклеточными паразитами. Правда, гибель и разрушение собственных клеток организма не безразличны для его жизнедеятельности. При некоторых вирусных инфекциях такого рода защитные реакции приносят больше вреда, чем пользы.

Другой механизм защиты против вирусов – молекулярный. За противовирусную защиту ответственны молекулы интерферонов. Они способны «интерферировать», то есть противодействовать процессам биосинтеза вирусных частиц в клетке хозяина. Интерферон синтезируется клеткой-продуцентом в ответ на заражение вирусом и соединяется с соответствующими рецепторами на поверхности зараженных клеток. Взаимодействие цитокина (в данном случае интерферона) со своим специфическим рецептором влечет за собой передачу внутриклеточного сигнала к ядру клетки. В клетке включаются гены, ответственные за синтез белков и ферментов, препятствующих самовоспроизведению вируса.

Использование мышиной модели в изучении генетики иммунного ответа на вирусные инфекции привело к открытию гена, участвующего в защите от различных флавивирусов, – 2',5'-олигоаденилат-синтазы 1b (*Oas1b*) [48]. Кроме того, эти исследования выявили важный интерферон-зависимый механизм защиты хозяйского организма от вирусной инфекции. Устойчивые к этому вирусу мышиные линии содержат полноразмерную копию *Oas1b*. В отличие от них, чувствительные к вирусу мышиные линии содержат мутацию, приводящую к трансляции неполноразмерного OAS1 полипептида [43]. OAS1 активируется интерфероном и отвечает за синтез олигоаденилатов, активирующих РНКазу, которая деградирует вирусную и клеточную РНК. Анализ человеческой ДНК выявил ряд полиморфизмов, которые коррелируют с активнос-

тью этого фермента, а также с уровнем ответа на вакцинацию против вируса желтой лихорадки. Таким образом, позиционное клонирование *Oas1b* стимулировало изучение полиморфизма у человека и в конечном счете улучшило диагностику этого вирусного заболевания.

В Западном полушарии вирус, вызывающий лихорадку Западного Нила, последний раз был обнаружен в 1999 году, когда он произвел эпидемию вирусного энцефалита в Нью-Йорке [41]. Однако этот и другие флавивirusы, включая вирус желтой лихорадки, Денги и японского энцефалита, представляют значительно большую проблему на всей территории Африки и Ближнем Востоке, где эти вирусы являются постоянными возбудителями заболеваний. Большинство флавивirusов имеют РНК-вый геном размером примерно 10 кб, содержат РНК и реплицируются в клетке через двуцепочечные РНК-интермедиаты преимущественно в антиген-презентирующих клетках. Большинство инфекционных случаев протекают без осложнений, но около 20 % заболевших имеют риск переноса инфекции в нервную систему, что может привести к менингиту, энцефалиту и параличу. Нейроны являются главной мишенью вируса, от репликации и распространения которого защищает интерферон. Было обнаружено, что инбредные линии мышей значительно различаются по своей чувствительности к экспериментальной вирусной инфекции. Большинство лабораторных линий мышей, таких как C57BL/6, C3H/HeJ, BALB/C, CBA, PERA, принадлежащих в основном к подвиду *Mus musculus domesticus*, очень чувствительны к экспериментальной флавивиральной инфекции, в то время как так называемые дикие мыши подвита *Mus musculus musculus* чрезвычайно устойчивы к инфекции [59]. Было также показано, что иммунный ответ на вирусную инфекцию находится под контролем одного локуса, получившего название *Flv* (*Flavivirus*).

Когда устойчивую к инфекции аллель *Flv* перенесли на чувствительную к вирусу линию C3H.PR1, мыши полученной конгенной линии C3H.PR1-*flvR* приобрели резистентность к инфекции и были использованы для точного картирования *Flv* локуса на 5-й мышинной хромосоме с разрешением до 0,5 сМ [60]. Последующий скрининг генов-кандидатов идентифицировал семейство генов, кодирующих 2',5'-олигоаденилат-синтазу (*Oas*), из которых только *Oas1b* был важен в иммунном ответе на вирус лихорадки Западного Нила (WNV – *West Nile Virus*). Все чувствительные к WNV линии мышей содержали замену Т на С, что приводило к замене аргинина на стоп-кодон и потере ферментативной активности. Было также показано, что активированная OAS участвует в синтезе олигоаденилатов, которые активируют РНК-азу L, разрушающую вирусную и клеточную РНК. Важная роль этого фермента в деградации вирусной РНК подтверждается тем, что мыши, дефектные

по протеинкиназе R и РНК-азе L, демонстрируют повышенную летальность при инфицировании WNV и имеют более высокий титр вируса в периферийных тканях в первые часы инфекции. Недавние генетические исследования на пациентах, больных вирусом лихорадки Западного Нила, показали ассоциацию между T210C-полиморфизмом и предрасположенностью к болезни. Эти исследования также показали, что T210C-замена приводит к альтернативному сплайсингу транскрипта OAS и образованию доминант-негативной изоформы фермента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные примеры картирования генов позволяют сделать следующие выводы.

Во-первых, научное познание с точки зрения классической (формальной) генетики начинается с фенотипа и заканчивается «генетическим» объяснением фенотипа. В этом обзоре была рассмотрена лишь небольшая часть примеров таких фенотипов, основанных на взаимодействиях между хозяином и патогеном. Почти все они в течение десятилетий представляли загадку не только для генетиков, но и для инфекционистов, эпидемиологов и, что не менее важно, врачей. В этой связи инбредные линии мышей способствовали значительному прогрессу в понимании механизмов врожденного иммунитета. Поэтому трудно переоценить значение мышинной модели, которая нуждается в дальнейшей популяризации в биологических науках.

Во-вторых, несмотря на то что большинство представленных фенотипов привели к раскрытию функции одного гена, в действительности взаимодействие хозяина с микроорганизмом – многоэтапный процесс, в котором участвует большое количество клеточных и вирусных компонентов. Поэтому выявленные гены были специфичны именно для выбранного фенотипического скрининга, например бактериального титра в макрофагах. Можно предположить, что для другого скрининга разница в фенотипе позволила бы идентифицировать другие гены. Все это расширяет возможности мышинной генетики.

И наконец, фенотипическая разница между инбредными линиями часто может объясняться не одним геном (монокенная характеристика), а несколькими (полигенная характеристика). В таком случае картирование привело бы к идентификации нескольких генов, хотя в реальности картирование комплексных фенотипов бывает затруднено. Можно надеяться, что совершенствование методов картирования, прогресс биоинформатического обеспечения и появление новых мышинных моделей, особенно на основе уже упоминавшихся диких линий мышей, поможет решить эту и другие проблемы генетического изучения различных патологий, в первую очередь опухолевых и аутоиммунных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abel B., Thieblemont N., Quesniaux V. J., Brown N., Mpagi J., Miyake K., Bihl F., Ryffel B. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice // *J. Immunol.* 2002. Vol. 169. P. 3155–3162.
2. Akira S., Takeda K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice // *C. R. Biol.* 2004. Vol. 327. P. 581–589.
3. Alexander C., Rietschel E. T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity // *J. Endotoxin. Res.* 2001. Vol. 7. P. 167–202.
4. Alexopoulou L., Holt A. C., Medzhitov R., Flavell R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 // *Nature.* 2001. Vol. 413. P. 732–738.
5. Appleby M. W., Ramsdell F. A forward genetic approach for analysis of the immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. Vol. 3. P. 463–471.
6. Beckers M. C., Yoshida S., Morgan K., Skamene E., Gros P. Natural resistance to infection with *Legionella pneumophila*: chromosomal localization of the *Lgn1* susceptibility gene // *Mamm. Genome.* 1995. Vol. 6. P. 540–545.
7. Benfey P. N., Mitchell-Olds T. From genotype to phenotype: systems biology meets natural variation // *Science.* 2008. Vol. 320. P. 495–497.
8. Beutler B., Hoebe K., Shamel L. Forward genetic dissection of afferent immunity: the role of TIR adapter proteins in innate and adaptive immune responses // *C. R. Biol.* 2004. Vol. 327. P. 571–580.
9. Beutler B., Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response // *Crit. Care. Med.* 2001. Vol. 29. P. S2–S6.
10. Blackwell J. M., Barton C. H., White J. K., Roach T. I., Shaw M. A., Whitehead S. H., Mock B. A., Searle S., Williams H., Baker A. M. Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the *Lsh/Ity/Bcg* gene story continues // *Immunol. Lett.* 1994. Vol. 43. P. 99–107.
11. Casanova J. L., Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions // *Nat. Rev. Immunol.* 2004. Vol. 4. P. 55–66.
12. Casrouge A., Zhang S. Y., Eidenschenk C. et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency // *Science.* 2006. Vol. 314. P. 308–312.
13. Chuang T. H., Ulevitch R. J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9 // *Eur. Cytokine Netw.* 2000. Vol. 11. P. 372–378.
14. Coutinho A., Meo T. Genetic Basis for Unresponsiveness to Lipopolysaccharide in C57BL/10Cr mice // *Immunogenetics.* 1978. Vol. 7. P. 17–24.
15. Curtis D. J. Modifier screens in the mouse: time to move forward with reverse genetics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101. P. 7209–7210.
16. Diebold S. S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Sousa R. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA // *Science.* 2004. Vol. 303. P. 1529–1531.
17. Dietrich W. F., Damron D. M., Isberg R. R., Lander E. S., Swanson M. S. *Lgn1*, a gene that determines susceptibility to *Legionella pneumophila*, maps to mouse chromosome 13 // *Genomics.* 1995. Vol. 26. P. 443–450.
18. Diez E., Lee S. H., Gauthier S., Yaraghi Z., Tremblay M., Vidal S., Gros P. Bircle is the gene within the *Lgn1* locus associated with resistance to *Legionella pneumophila* // *Nat. Genet.* 2003. Vol. 33. P. 55–60.
19. Dyson A., Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? // *Crit. Care. Med.* 2009. Vol. 37. P. S30–37.
20. Farhat K., Riekenberg S., Heine H., Debarry J., Lang R., Mages J., Buwitt-Beckmann U., Roschmann K., Jung G., Wiesmuller K. H., Ulmer A. J. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling // *J. Leukoc. Biol.* 2008. Vol. 83. P. 692–701.
21. Forbes J. R., Gros P. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane // *Blood.* 2003. Vol. 102. P. 1884–1892.
22. Fortin A., Abel L., Casanova J. L., Gros P. Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2007. Vol. 8. P. 163–192.
23. Frehel C., Canonne-Hergaux F., Gros P., De Chastellier C. Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages // *Cell Microbiol.* 2002. Vol. 4. P. 541–556.
24. Girardin S. E., Sansonetti P. J., Philpott D. J. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens-common concepts in mammals and flies // *Trends Microbiol.* 2002. Vol. 10. P. 193–199.
25. Govoni G., Canonne-Hergaux F., Pfeifer C. G., Marcus S. L., Mills S. D., Hackam D. J., Grinstein S., Malo D., Finlay B. B., Gros P. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7 // *Infect Immun.* 1999. Vol. 67. P. 2225–2232.
26. Gruenheid S., Gros P. Forward genetic dissection of innate response to infection in inbred mouse strains: selected success stories // *Clin. Exp. Immunol.* 2007. Vol. 162. P. 393–401.
27. Gruenheid S., Pinner E., Desjardins M., Gros P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome // *J. Exp. Med.* 1997. Vol. 185. P. 717–730.
28. Hashimoto C., Hudson K. L., Anderson K. V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein // *Cell.* 1988. Vol. 52. P. 269–279.
29. 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. Vol. 408. P. 740–745.
30. Iversen A. C., Steinkjer B., Nilsen N., Bohnhorst J., Moen S. H., Vik R., Stephens P., Thomas D. W., Benedict C. A., Espevik T. A proviral role for CpG in cytomegalovirus infection // *J. Immunol.* 2009. Vol. 182. P. 5672–5681.
31. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 11. P. 373–384.
32. Kaufmann S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? // *Nat. Rev. Immunol.* 2001. Vol. 1. P. 20–30.
33. Kaufmann S. H. Immune response to tuberculosis: experimental animal models // *Tuberculosis.* 2003. Vol. 83. P. 107–111.
34. Kenny E. F., O'Neill L. A. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update // *Cytokine.* 2008. Vol. 43. P. 342–349.
35. Kim H. M., Park B. S., Kim J. I., Kim S. E., Lee J., Oh S. C., Enkhbayar P., Matsushima N., Lee H., Yoo O. J., Lee J. O. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran // *Cell.* 2007. Vol. 130. P. 906–917.
36. Kramnik I. Genetic dissection of host resistance to *Mycobacterium tuberculosis*: the *sst1* locus and the *Ipr1* gene // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. Vol. 321. P. 123–148.

37. Kramnik I., Dietrich W. F., Demant P., Bloom B. R. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97. P. 8560–8565.
38. Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M., Hoffmann J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults // *Cell*. 1996. Vol. 86. P. 973–983.
39. Ling D. I., Zwerling A. A., Steingart K. R., Pai M. Immune-based diagnostics for TB in children: what is the evidence? // *Paediatr. Respir. Rev.* 2011. Vol. 12. P. 9–15.
40. Losick V. P., Stephan K., Smirnova I., Isberg R. R., Poltorak A. A hemidominant *Naip5* allele in mouse strain MOLF/Ei-derived macrophages restricts *Legionella pneumophila* intracellular growth // *Infect Immun.* 2009. Vol. 77. P. 196–204.
41. Mackenzie J. S., Gubler D. J., Petersen L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses // *Nat. Med.* 2004. Vol. 10. P. 98–109.
42. Mannel D. N. Advances in sepsis research derived from animal models // *Int. J. Med. Microbiol.* 2007. Vol. 297. P. 393–400.
43. Mashimo T., Lucas M., Simon-Chazottes D., Frenkiel M. P., Montagutelli X., Ceccaldi P. E., Deubel V., Guenet J. L., Despres P. A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99. P. 11311–11316.
44. Netea M. G., Van Der Meer J. W., Kullberg B. J. Sepsis theory and therapies // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 348. P. 1600–1602.
45. O'Brien A. D., Rosenstreich D. L., Scher I., Campbell G. H., MacDermott R. P., Formal S. B. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene // *J. Immunol.* 1980. Vol. 124. P. 20–24.
46. Pan H., Yan B. S., Rojas M., Shebzukhov Y. V., Zhou H., Kobzik L., Higgins D. E., Daly M. J., Bloom B. R., Kramnik I. *Ipr1* gene mediates innate immunity to tuberculosis // *Nature*. 2005. Vol. 434. P. 767–772.
47. Payseur B. A., Place M. Prospects for association mapping in classical inbred mouse strains // *Genetics*. 2007. Vol. 175. P. 1999–2008.
48. Perelygin A. A., Scherbik S. V., Zhulin I. B., Stockman B. M., Li Y., Brinton M. A. Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99. P. 9322–9327.
49. Peters L. L., Robledo R. F., Bult C. J., Churchill G. A., Paigen B. J., Svenson K. L. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis // *Nat. Rev. Genet.* 2007. Vol. 8. P. 58–69.
50. Picard C., Puel A., Bonnet M. et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency // *Science*. 2003. Vol. 299. P. 2076–2079.
51. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M. Y., Huffel C. V., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene // *Science*. 1998. Vol. 282. P. 2085–2088.
52. Poltorak A., Smirnova I., Clisch R., Beutler B. Limits of a deletion spanning *Tlr4* in C57BL/10ScCr mice // *J. Endotoxin Res.* 2000. Vol. 6. P. 51–56.
53. Poltorak A., Smirnova I., He X., Liu M. Y., Van Huffel C., McNally O., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Du X., Thompson P., Chan E. K., Ledesma J., Roe B., Clifton S., Vogel S. N., Beutler B. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region // *Blood Cells Mol. Dis.* 1998. Vol. 24. P. 340–355.
54. Qureshi S. T., Lariviere L., Sebastiani G., Clermont S., Skamene E., Gros P., Malo D. A High-resolution map in the chromosomal region surrounding the *Lps* locus // *Genomics*. 1996. Vol. 31. P. 283–294.
55. Ren T., Zamboni D. S., Roy C. R., Dietrich W. F., Vance R. E. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1 and *Naip5*-mediated macrophage immunity // *PLoS Pathog.* 2006. Vol. 2. P. 18.
56. Rietschel E. T., Cavillon J. M. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin // *Microbes. Infect.* 2003. Vol. 5. P. 1407–1414.
57. Rittirsch D., Flierl M. A., Ward P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. Vol. 8. P. 776–787.
58. Russell J. A. Management of sepsis // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 355. P. 1699–1713.
59. Sangster M. Y., Helians D. B., MacKenzie J. S., Shellam G. R. Genetic studies of flavivirus resistance in inbred strains derived from wild mice: evidence for a new resistance allele at the flavivirus resistance locus (*Flv*) // *J. Virol.* 1993. Vol. 67. P. 340–347.
60. Sangster M. Y., Urošević N., Mansfield J. P., Mackenzie J. S., Shellam G. R. Mapping the *Flv* locus controlling resistance to flaviviruses on mouse chromosome 5 // *J. Virol.* 1994. Vol. 68. P. 448–452.
61. Scharf J. M., Damron D., Frisella A., Bruno S., Beggs A. H., Kunkel L. M., Dietrich W. F. The mouse region syntenic for human spinal muscular atrophy lies within the *Lgn1* critical interval and contains multiple copies of *Naip* exon 5 // *Genomics*. 1996. Vol. 38. P. 405–417.
62. Skamene E. The *Bcg* gene story // *Immunobiology*. 1994. Vol. 191. P. 451–460.
63. Sultzter B. M. Genetic control of leucocyte responses to endotoxin // *Nature*. 1968. Vol. 219. P. 1253–1254.
64. Suzuki Y., Roth F. P. Systematic genetics swims forward elegantly // *Mol. Syst. Biol.* 2006. Vol. 2. P. 48.
65. Turcotte K., Loredó-Osti J. C., Fortin P., Schurr E., Morgan K., Gros P. Complex genetic control of susceptibility to *Mycobacterium bovis* (Bacille Calmette-Guérin) infection in wild-derived *Mus spretus* mice // *Genes. Immun.* 2006. Vol. 7. P. 684–687.
66. Vidal S. M., Malo D., Vogan K., Skamene E., Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg* // *Cell*. 1993. Vol. 73. P. 469–485.
67. Vidal S. M., Pinner E., Lepage P., Gauthier S., Gros P. Natural resistance to intracellular infections: *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1* D169) mouse strains // *J. Immunol.* 1996. Vol. 157. P. 3559–3568.
68. Warren H. S. Editorial: Mouse models to study sepsis syndrome in humans // *J. Leukoc. Biol.* 2009. Vol. 86. P. 199–201.
69. Watson J., Kelly K., Largen M., Taylor B. A. The genetic mapping of a defective LPS response gene in C3H/HeJ mice // *J. Immunol.* 1978. Vol. 120. P. 422–424.
70. Wright E. K., Goodart S. A., Gowney J. D., Hadinoto V., Endrizzi M. G., Long E. M., Sadigh K., Abney A. L., Bernstein-Hanley I., Dietrich W. F. *Naip5* affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila* // *Current. Biology*. 2003. Vol. 13. P. 27–36.
71. Xu Y., Tao X., Shen B., Horng T., Medzhitov R., Manley J. L., Tong L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains // *Nature*. 2000. Vol. 408. P. 111–115.
72. Zhang S. Y., Jouanguy E., Ugolini S. et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis // *Science*. 2007. Vol. 317. P. 1522–1527.