

**МИТЮШОВА**

**Елена Викторовна**

**РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И JAK/STAT СИГНАЛИЗАЦИИ В ЭКСПРЕССИИ  
РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА**

**03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург**

**2013**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

***Научный руководитель:***

доктор биологических наук, старший  
научный сотрудник

**Марахова Ирина Ильинична**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт цитологии  
Российской академии наук, ведущий  
научный сотрудник

***Официальные оппоненты:***

доктор биологических наук, старший  
научный сотрудник

**Шпаков Александр Олегович**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт эволюционной  
физиологии и биохимии имени И.М.  
Сеченова Российской академии наук, зав.  
лабораторией

доктор биологических наук, старший  
научный сотрудник

**Веренинов Алексей Андреевич**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт цитологии  
Российской академии наук, зав. лабораторией

***Ведущая организация:***

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение Петербургский институт  
ядерной физики имени  
Б.П.Константинова, Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «18» октября 2013 года в 14 часов на заседании Диссертационного  
совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Адрес электронной почты института: [cellbio@incras.ru](mailto:cellbio@incras.ru)

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8(812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан « » сентября 2013 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Вопрос взаимодействия пострецепторных сигнальных путей, которые инициируются в клетке при действии внешних стимулов, является одним из наиболее актуальных в проблеме внутриклеточной сигнализации. Исследования последних лет показывают, что специфика клеточного ответа определяется как типом индуцированных сигнальных белков, так и скоординированным сочетанием отдельных элементов разных сигнальных каскадов. Активация Т лимфоцитов и запуск пролиферативного ответа – многозвенный процесс, в котором используются основные известные пути внутриклеточной сигнализации. По специфике сигнальных путей и их мишеням этот процесс делят на две стадии – первая начинается с активации Т-клеточного рецептора антигеном и условно заканчивается синтезом Т-клеточного ростового фактора интерлейкина-2 (ИЛ-2), тогда как следующая стадия индуцируется взаимодействием ИЛ-2 с его рецептором (Crabtree, 1989; Berridge, 1997; Leonard et al., 1999). Наряду с продукцией ИЛ-2 ключевую роль в запуске пролиферативного ответа Т лимфоцитов играет экспрессия рецептора ИЛ-2. В процессе активации лимфоцитов структура и свойства рецептора ИЛ-2 изменяются. В частности, с экспрессией  $\alpha$ -цепи (ИЛ-2R $\alpha$ ) и появлением ее в составе рецептора ИЛ-2, который в покоящихся Т клетках состоит из двух субъединиц –  $\beta$  и  $\gamma_c$ , связывают 100-кратное повышение аффинности рецептора к ИЛ-2, что и обеспечивает способность Т лимфоцитов отвечать на физиологические концентрации ИЛ-2, продуцируемые клеткой (Leonard, 1996; Robb et al., 1997; Wang et al., 1999; Kim et al., 2006). Таким образом, индукция полноценной функциональной системы – ИЛ-2/рецептор ИЛ-2 – является решающим моментом в запуске пролиферации Т лимфоцитов и иммунного ответа. Известно, что нарушения в регуляции экспрессии ИЛ-2 и его рецептора приводят к развитию лейкозов, аутоиммунных заболеваний, иммунодефицита (Leonard, 2001; Ross et al., 2007; Rochman et al., 2009; Frank, 2012).

Полученные ранее данные показывают, что в экспрессии гена ИЛ-2R $\alpha$  должны участвовать сигнальные пути, которые запускаются как антигеном через Т-клеточный рецептор, так и действием ИЛ-2 на рецептор ИЛ-2 (Kim et al., 2001; Kim, Leonard, 2002). В последнее время были выявлены дополнительные зоны регуляции экспрессии ИЛ-2R $\alpha$  трансформирующим фактором TGF $\beta$  совместно с Т-клеточным рецептором (Kim et al., 2005). Таким образом, экспрессия ИЛ-2R $\alpha$  при активации Т лимфоцитов является примером того, как в запуск функции вовлечены несколько сигнальных путей, которые связаны с разными мембранными рецепторами или с разными степенями рецептор-индуцированного сигнального каскада.

Вопрос о том, каким образом в физиологических условиях при активации Т лимфоцитов соотносятся во времени сигнальные события, которые инициируются с Т-клеточного рецептора, с теми событиями, которые контролируют экспрессию ИЛ-2R $\alpha$  в процессе продвижения Т-лимфоцитов в клеточном цикле, изучен недостаточно.

Требуется уточнить, какие именно сигнальные белки обеспечивают экспрессию ИЛ-2R $\alpha$  на разных стадиях активации клеток. Многими исследованиями показано участие белков семейства STAT, в частности, STAT3 и STAT5, в активации Т клеток (Zorn et al., 2006; Yao et al., 2007; Taylor et al., 2006). Двойной нокаут по белкам STAT5 полностью подавляет пролиферативный ответ периферических Т клеток мышей независимо от присутствия ИЛ-2 (Moriggl et al., 1999b; Lin, Leonard, 2000). У мышей с недостаточностью по STAT3 пролиферация Т клеток также тормозится, однако, в отличие от STAT5-дефицитных клеток, высокая концентрация ИЛ-2 восстанавливает пролиферативный ответ STAT3-дефицитных лимфоцитов (Moriggl et al, 1999a). Не раскрыто, с чем связана решающая роль STAT5 по сравнению со STAT3 в запуске и поддержании пролиферации Т лимфоцитов. Базовые сведения о сигнальных функциях белков STAT получены в экспериментах, которые выполнены на Т клетках мышей или постоянных линиях лимфоидных клеток с генетическими дефектами в экспрессии белков. В таких модельных системах в активации лимфоцитов могут участвовать другие сигнальные пути, компенсирующие выключение путей сигнализации в клетках *in vivo* (Shi et al., 2009).

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы – охарактеризовать сигнальные пути и роль интерлейкина-2 в экспрессии ИЛ-2R $\alpha$  при запуске пролиферативного ответа, индуцированного фитогемагглютинином (ФГА), в лимфоцитах периферической крови человека (ЛПК). В задачи исследования входило:

1. Охарактеризовать динамику поверхностной экспрессии CD25 (маркер альфа-цепи рецептора интерлейкина-2) по ходу пролиферативного ответа в нормальных ЛПК человека.
2. Оценить участие тирозинкиназ семейства Src и JAK в поверхностной экспрессии CD25.
3. Охарактеризовать роль интерлейкина-2 в экспрессии CD25 при запуске пролиферации ЛПК человека.
4. Сравнить уровень фосфорилирования белков STAT3 и STAT5 и экспрессии CD25 на разных стадиях активации лимфоцитов с помощью ФГА и ИЛ-2.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. В лимфоцитах крови человека поверхностная экспрессия CD25 и формирование популяции клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> в ответ на митоген – длящийся процесс, приуроченный к ИЛ-2-регулируемой стадии пролиферативного ответа.

2. Длящийся характер поверхностной экспрессии CD25 обеспечивается согласованным во времени сочетанием сигнальных путей с Т-рецептора и с рецептора ИЛ-2: на начальной стадии митогенной активации сигнал на экспрессию CD25 поступает через Src-киназный путь, а длящееся нарастание уровня экспрессии CD25 регулируется с рецептора ИЛ-2 через JAK3-зависимый сигнальный путь.

3. Способность ИЛ-2 запускать пролиферативный ответ в компетентных (но не в покоящихся) Т лимфоцитах обусловлена присутствием в популяции «подпорогового» пула клеток CD4+CD25+. В формировании компетентности Т лимфоцитов и «подпороговой» экспрессии CD25 участвует Src-зависимая сигнализация с Т-клеточного рецептора.

4. JAK/STAT-путь сигнализации, запускаемый ИЛ-2, участвует в поддержании устойчивой во времени, функционально значимой экспрессии CD25 по ходу ИЛ-2-регулируемой стадии пролиферативного ответа лимфоцитов человека.

5. Решающая роль STAT5 в запуске пролиферации нормальных ЛПК человека обусловлена его участием в экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2 и формировании полноценного рецептора ИЛ-2.

**Научная новизна работы.** В настоящей работе впервые на нативных лимфоцитах человека, стимулированных к пролиферации фитогемагглютинином, исследована динамика поверхностной экспрессии CD25, мембранного маркера  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2, и установлен длящийся (2 сут) характер экспрессии CD25 и формирования популяции клеток CD4+CD25+. С помощью фармакологического анализа выявлен двухкомпонентный характер индукции CD25 при митогенной активации ЛПК человека. Показано, что на ранней стадии сигнал к экспрессии поступает с Т-клеточного рецептора через Src-киназный сигнальный путь, а длящееся нарастание уровня поверхностной экспрессии CD25 регулируется с рецептора ИЛ-2 с участием JAK-зависимого сигнального пути. Установлено, что ИЛ-2 не индуцирует пролиферацию, рост и экспрессию CD25 в нормальных, покоящихся ЛПК человека. Впервые отмечено, что способность ИЛ-2 запускать пролиферативный ответ компетентных Т лимфоцитов обусловлена присутствием в популяции «подпорогового» пула клеток CD4+CD25+. Выявлено, что в формировании компетентности Т лимфоцитов и «подпороговой» экспрессии CD25 участвует Src-зависимая сигнализация с Т-клеточного рецептора, тогда как JAK/STAT-путь сигнализации участвует в поддержании высокого и устойчивого уровня экспрессии CD25 по ходу ИЛ-2-регулируемой стадии. Установлено, что решающая роль STAT5 в запуске пролиферации нормальных ЛПК человека обусловлена его участием в экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2 и формировании полноценного рецептора ИЛ-2.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные результаты имеют фундаментальное значение для понимания механизмов, посредством которых формируется Т-клеточный ответ на действие митогена. Выявленный в работе двухкомпонентный характер поверхностной экспрессии CD25 свидетельствует о необходимой координации сигнальных путей с разных мембранных рецепторов (с Т-клеточного рецепторного комплекса и с рецептора ИЛ-2) для функционально значимой экспрессии ИЛ-2R $\alpha$ . На данные, полученные при анализе длящегося характера поверхностной экспрессии CD25 при запуске пролиферативного ответа Т-клеток в физиологических условиях, можно опираться при исследовании конкретных механизмов

взаимодействия сигнальных путей, контролирующего формирование высокоаффинного рецептора ИЛ-2. Эти данные имеют принципиальное значение при разработке лекарственных препаратов для лечения аутоиммунных болезней и онкологических заболеваний крови, поскольку указывают на возможность избирательного воздействия на отдельные стадии запуска экспрессии рецептора ИЛ-2.

**Личный вклад автора.** Основные экспериментальные процедуры, описанные в работе, и обработка результатов выполнены автором лично. Выделение лимфоцитов из цельной донорской крови, которую получали из СПГУЗ «Городская Мариинская больница», проводила Егорова Л.И. (ИНЦ РАН). Анализ подготовленных автором проб на проточном цитофлуориметре проводили в Группе проточной цитометрии ИНЦ РАН в.н.с. Зенин В.В., ст.н.с. Аксенов Н.Д., ст.н.с. Шатрова А.Н.

**Апробация работы.** По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых журналах и 8 тезисов.

Материалы диссертации были представлены на 11-й международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века» (Пушино, 2007), Международных конференциях «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2009, 2011), II конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012), II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2013), FEBS Congress 2013 “Mechanisms in Biology” (St.-Petersburg), X Int. Congress “Cell volume regulation” (Moscow, 2013).

**Финансовая поддержка работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (2008-2012, 2013-2018), Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4, НШ-4957.2012.4), Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры России» (2009-2011), Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 09-04-00492, 13-04-00234), Правительства Санкт-Петербурга (грант ПСП № 10455(2.6/31-05/007)).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего \_\_\_ источников. Диссертация изложена на \_\_\_ страницах машинописного текста. Иллюстративный материал содержит \_\_\_ схем, \_\_\_ рисунков и \_\_\_ таблиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение и культивирование лимфоцитов.** Лимфоциты выделяли по общепринятой схеме из свежей донорской крови (Woyum, 1968). Лейкоцитарную фракцию отбирали после

осаждения эритроцитов добавлением в кровь 6 %-ного раствора декстрана (мол. масса 500000, Sigma). Суспензию лейкоцитов (по 8 мл) наслаивали на 3 мл гистобака (Sigma) и центрифугировали (30 мин, 600 g), интерфазу переносили в пробирки и промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Для удаления макрофагов клеточную суспензию разбавляли средой RPMI (Биолот) с 10 % сыворотки человека и помещали в пластиковые матрацы на 40 мин при 37 °С в атмосферу 5 % CO<sub>2</sub>. После этого суспензию разливали во флаконы с концентрацией клеток 2 млн/мл, а на следующие сутки стимулировали фитогемагглютинином (ФГА, 10 мкг/мл, Sigma). ФГА, известный поликлональный митоген для Т лимфоцитов, вызывает структурные изменения Т-рецепторного комплекса и запускает тот же каскад пострецепторных сигналов, который характеризует раннюю стадию активации Т клетки антигеном (Weiss et al., 1986; Smith-Garvin et al., 2009). Ингибиторы тирозинкиназ Src (PP2, Calbiochem) или JAK (WHI-P131, Sigma) добавляли в культуру ЛПК за 1–1.5 ч до митогенной стимуляции.

**Оценка экспрессии CD25.** Лимфоциты метили FITC-конъюгированными антителами против CD25 или PE-конъюгированными антителами против CD4 (Coltag Labor) в течение 30 мин в PBS при комнатной температуре. Проточную цитофлуориметрию проводили, используя цитофлуориметр Epics XL (Beckman Coulter). На линейной цитограмме FS/SS (прямое светорассеяние против бокового) выделяли популяцию лимфоцитов в отдельную зону. Изменения численности популяции Т-клеток CD25(+) оценивали по перераспределению проанализированных клеток, выделенных в зоне лимфоцитов, в верхние квадраты цитограмм, а изменения размера клеток и образование крупных клеток-бластов CD4(+)CD25(+) оценивали по числу клеток в верхнем правом квадрате цитограмм. Число проанализированных лимфоцитов было не менее 10<sup>4</sup>. Исследовали распределения logCD25/FS, logCD4/FS, logCD25/CD4. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии со стандартным протоколом обработки данных EpicsXL и строили индивидуальные графики для каждого эксперимента, выполненного на лимфоцитах одного донора.

**Оценка пролиферативного статуса культуры лимфоцитов.** Для оценки уровня пролиферации культур использовали метод проточной ДНК-цитометрии. Перед измерением клетки инкубировали 30 мин в PBS, содержащем 0.02 % сапонины (Sigma). После отмывки от сапонины клетки окрашивали в растворе PBS, содержащем 50 мкг/мл иодида пропидия (Sigma) и 250 мкг/мл рибонуклеазы (30-40 мин, 37 °С, Serva). Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter).

**Оценка жизнеспособности лимфоцитов.** Измерения содержания калия и натрия в ЛПК и потоков рубидия (физиологический аналог калия) проводили через 24-48 ч культивирования ЛПК с ФГА в отсутствие или в присутствии ингибиторов тирозинкиназ Src или JAK. Содержание катионов в надосадочной жидкости определяли с помощью эмиссионного анализа в воздушно-

пропановом пламени на атомно-абсорбционном фотометре Perkin-Elmer AA-306. После измерений в растворенных пробах измеряли общее количество клеточного белка по методу Лоури (Lowry et al., 1951) с сывороточным альбумином человека в качестве стандарта. Концентрацию в клетках катионов рассчитывали на 1 г клеточного белка для каждой пробы.

**Приготовление клеточных лизатов.** Для получения тотальных лизатов клетки лизировали на льду в лизирующем буфере (рН 7.4), содержащим 50 мМ Tris-HCl, рН 7.4, 1 % тритона X-100, 0.5 % нонидета P-40 (NP-40), 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, ингибиторы протеаз (1 мМ PMSF, 1 мкг/мл коктейля ингибиторов протеаз), ингибиторы фосфатаз (1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 мМ EGTA, 10 мМ NaF), затем добавляли буфер Лэммли (Laemmli, 1970) для электрофоретических проб. Количество общего белка в пробе оценивали по методу Бредфорда (Bradford, 1976).

**Электрофорез и иммуноблотинг.** Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Концентрирующий гель (рН 6.8) содержал 4 %, разделяющий (рН 8.8) – 7.5 % полиакриламида. Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (Amersham). Иммуноблотинг проводили в соответствии с методикой ECL Western blotting protocols (Amersham). Для детекции пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP использовали реакцию усиленной хемолуминесценции (ECL). Поликлональные антитела против STAT5 (STAT5a/b), фосфорилированного по тирозину 694 (Cell Signalling Technology, США), и моноклональные антитела против STAT3, фосфорилированного по тирозину 705, а также моноклональные антитела против нефосфорилированного STAT3 (Cell Signalling, США) и поликлональные антитела против нефосфорилированного STAT5 (Cell Signalling, США) разводили (1:1000) 5 %-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 0.1 %-ном TTBS. В качестве вторичных использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика - GAR-HRP (Cell Signalling, США), приготовленные на 5 %-ном обезжиренном молоке в разведении 1:5000. Моноклональные антитела, опознающие нефосфорилированные формы β-актина (Sigma-Aldrich, США), в разведении 1:2000 готовили на 1 %-ном BSA и в качестве вторых антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, полученные против иммуноглобулинов мыши.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **1. Поверхностная экспрессия CD25 в лимфоцитах крови человека на разных стадиях пролиферативного ответа.**

*Динамика экспрессии CD25 в ЛПК, стимулированных ФГА* (Зенин В.В., Аксенов Н.Д., Шатрова А.Н., Митюшова Е.В. и др., 2011). В покоящихся ЛПК человека CD25 - маркер гликопротеина, формирующего α-субъединицу рецептора ИЛ-2, на цитограммах не выявляется



(рис. 1, К). После стимуляции ФГА в митогенной концентрации (10 мкг/мл), CD25 обнаруживается на поверхности клеток через 4–5 ч (рис. 1, ФГА 5), в интервале 5–24 ч численность клеток, экспонирующих CD25, возрастает, и к 48 ч в разных опытах доля клеток CD25(+) составляет от 70 до 81 % ( $71.5 \pm 3.2$  %,  $n=11$ ) от всей популяции лимфоцитов (рис. 1, ФГА 24, ФГА 48).

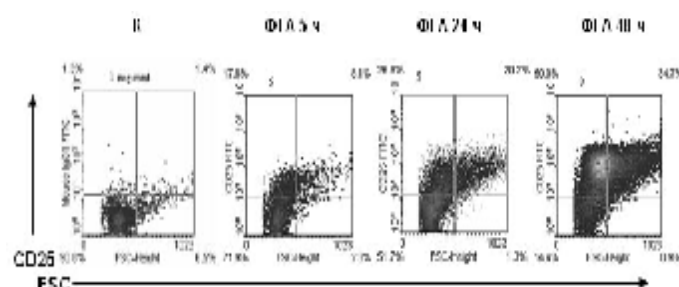


Рис. 1. Изменение численности клеток CD25+ в культуре лимфоцитов человека, стимулированных ФГА в течение 48 ч. По горизонтали – FS, малоугловое светорассеяние, усл. ед.; по вертикали – флуоресценция лимфоцитов, связавших FITC-меченые антитела против CD25, логарифмическая шкала, К – покоящиеся культуры в отсутствие ФГА. Приведены репрезентативные данные одного эксперимента из 11.

Возрастание численности клеток CD25(+) происходит за счет увеличения субпопуляции Т-лимфоцитов CD4(+)CD25(+) (рис. 2), т.е. Т-хелперов, которые при активации экспрессируют полноценный  $\alpha\beta\gamma_c$ -рецептор ИЛ-2, продуцируют цитокины и обеспечивают пролиферативный ответ. К 48 ч стимуляции в культуре ЛПК доля клеток CD4(+) в общем пуле клеток CD25(+) составила  $56.8 \pm 3.1$  % ( $n=8$ ). Клетки CD4(-)CD25(+) образуют ту фракцию мононуклеарных клеток, которые также имеют рецептор ИЛ-2 и отвечают на ИЛ-2 (Kim et al., 2006). К ним относятся натуральные киллеры, В-клетки, а также моноциты, незначительное количество которых (до 5 %) присутствует в суспензии лимфоцитов, изолированных из свежей периферической крови человека.

В культурах ЛПК, стимулированных ФГА в течение 2 сут, наблюдается характерное изменение численности мелких и крупных клеток. В типичном эксперименте на рис. 1 к концу 1-х суток действия ФГА 69.8 % клеток в культуре экспрессируют CD25,

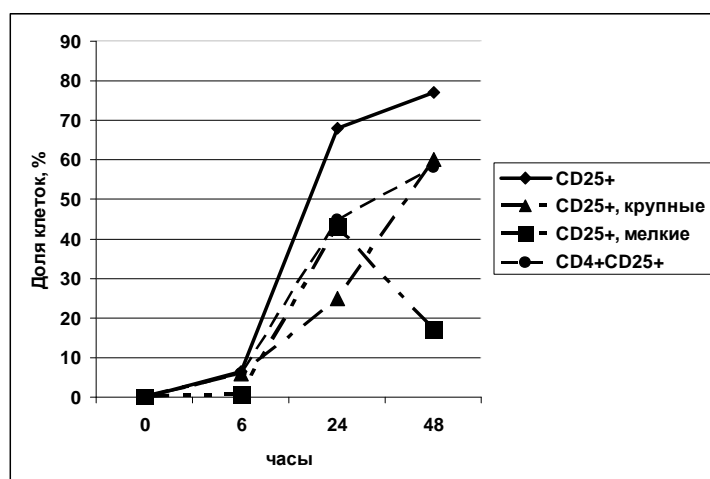


Рис. 2. Динамика численности мелких и крупных клеток CD25(+) в культуре лимфоцитов человека, стимулированных ФГА в течение 48 ч.

Приведены репрезентативные данные одного эксперимента из 9, выполненных на культурах лимфоцитов из крови 9 разных доноров.

при этом 44.3 % популяции клеток CD25(+) остаются мелкими (левая верхняя часть цитограммы ФГА 24 ч), а 25.5 % уходят в зону крупных по размеру клеток (правая верхняя часть цитограммы ФГА 24 ч). К концу 48-го часа активации численность мелких клеток CD25(+) снижается до 18.6 % и одновременно возрастает до 58.8 % численность крупных клеток CD25(+)

(рис. 2). Следствием такого перераспределения в популяции клеток CD25(+) является то, что к концу 2 сут активации маркер CD25 присутствует в основном на крупных клетках.

**Роль тирозинкиназ семейств JAK и Src по данным ингибиторного анализа.** Для характеристики сигнальных путей, регулирующих экспрессию CD25 в ЛПК человека, использовали фармакологические агенты, избирательно подавляющие активность ключевых тирозинкиназ, участвующих в активации ЛПК. Для подавления активности JAK3, тирозинкиназы, ассоциированной с  $\gamma_c$ -цепью рецептора ИЛ-2, использовали высокоспецифичный ингибитор – тирфостин WHI-P131 (Sudbeck et al., 1999; Marzec et al., 2005).

WHI-P131 тормозит поверхностную экспрессию CD25 (рис. 4, цитограммы). В типичном эксперименте на рис. 3 через 48 ч в культуре лимфоцитов, стимулированных ФГА в присутствии WHI-P131 (80 мкМ), численность клеток CD25(+) составляла 19.1 % вместо 77.4 % в отсутствие WHI-P131.

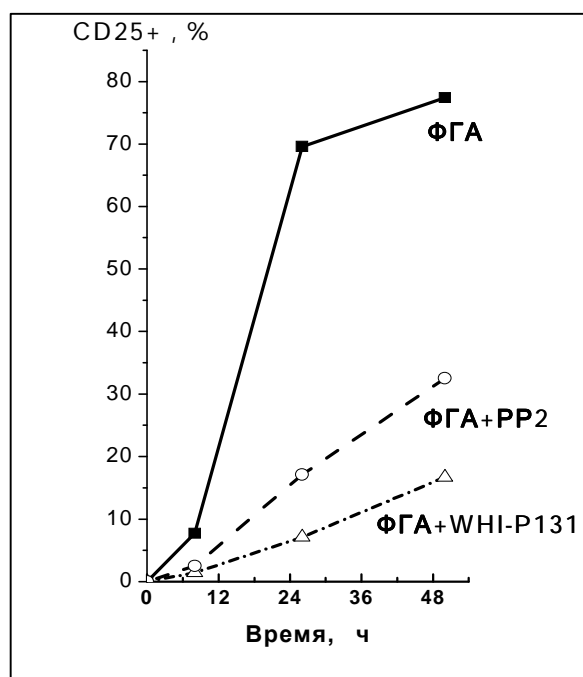


Рис. 3. Тирфостин WHI-P131 (треугольники) и пиразолпиримидин PP2 (кружки) тормозят поверхностную экспрессию CD25 в лимфоцитах человека, стимулированных ФГА. Приведены репрезентативные данные одного эксперимента из 5.

WHI-P131 снижает уровень экспрессии CD25 как на крупных, так и на мелких клетках, при этом доля крупных клеток CD25(+), образованию которых препятствует WHI-P131 (рис. 4, темные столбики), практически совпадает по величине с долей бластов CD4(+)CD25(+), образовавшихся к 48 ч в присутствии ФГА без ингибитора (рис. 4, кривая CD4+CD25+). Таким образом, WHI-P131 тормозит не только поверхностную экспрессию CD25, но и образование бластов.

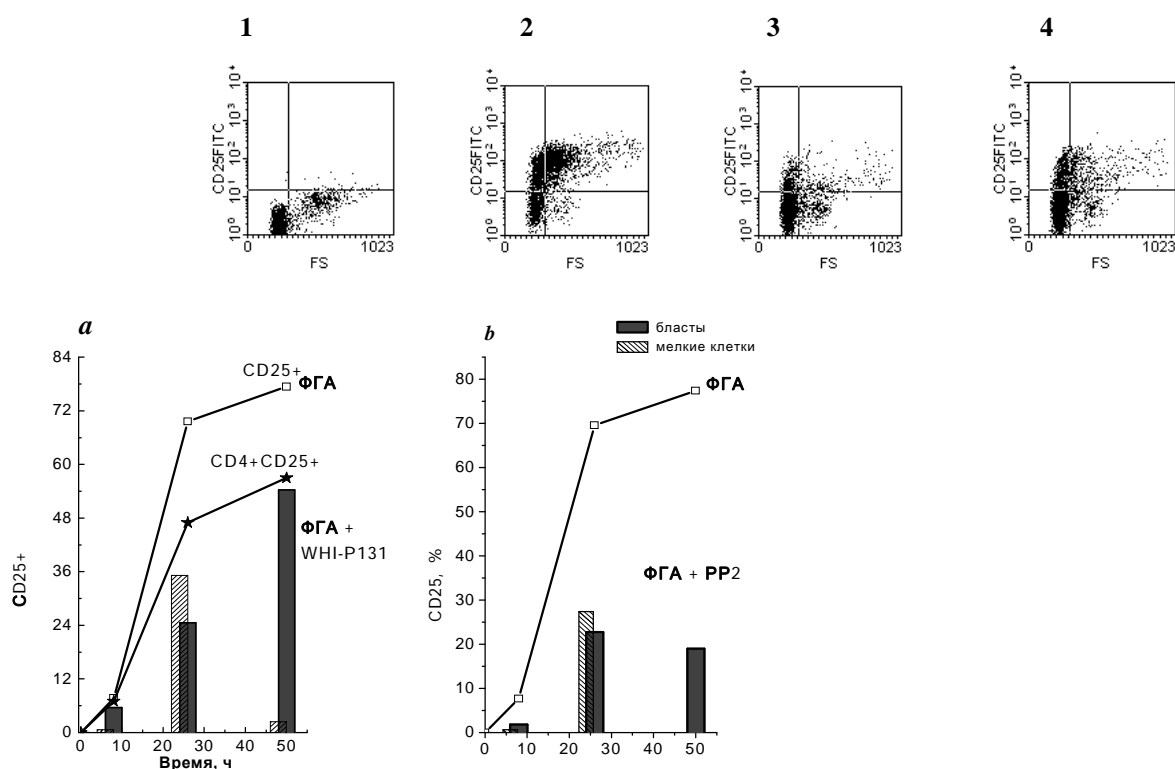


Рис. 4. Динамика численности мелких и крупных клеток CD25+ в культуре лимфоцитов человека, стимулированных ФГА в течение 48 ч с добавлением WHI-P131 или PP2. Цитограммы: 1 – контроль, 2 – ФГА 24 ч, 3 – ФГА+WHI-P131, 4 – ФГА+PP2. Столбики – доля мелких и крупных клеток CD25+, ингибируемая в присутствии WHI-P131 (а) или PP2 (б). Даны цитограммы и графики, полученные в одном эксперименте из 6, выполненных по одной схеме.

WHI-P131 тормозит переход  $G_0/G_1 \rightarrow S$ , индуцированный приложением ФГА, и снижает долю клеток в фазе S; при этом антипролиферативное действие WHI-P131 зависит от его концентрации (рис. 5).

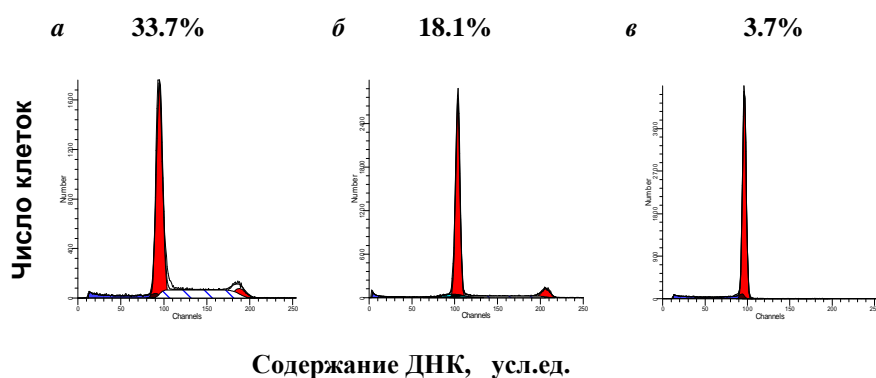


Рис. 5. Запуск синтеза ДНК в лимфоцитах человека, стимулированных в течение 48 ч ФГА (а), ФГА с WHI-P131, 50 мкМ (б), ФГА с WHI-P131, 80 мкМ (в). Приведены данные одного эксперимента из 7, выполненных на культурах лимфоцитов из крови разных доноров.

Длительное культивирование ЛПК в присутствии WHI-P131 не сказывается на жизнеспособности клеток, которую оценивали по результатам измерений содержания главных внутриклеточных моновалентных катионов. При инкубации лимфоцитов в течение 2 сут в присутствии WHI-P131 (в концентрации до 80 мкМ) ионный гомеостаз клеток не нарушается:

внутриклеточное содержание калия в обработанных тирфостином лимфоцитах сохраняется высоким, а содержание натрия – низким (таблица).

Таблица. Влияние ингибиторов WHI-P131 и PP2 на отношение внутриклеточного содержания калия ( $K_i$ ) к натрию ( $Na_i$ ), убаин-чувствительный вход Rb, уровень пролиферации и массу белка в ЛПК человека, стимулированных ФГА или ИЛ-2 в течение 48 ч.

Агент и его концентрация	$K_i/Na_i$	Вход Rb, мкмоль на 1 г белка за 30 мин	S + G <sub>2</sub> /M, %	Белок, мг/проба
Контроль	4.3±0.5	14.0±1.7	0.7±0.01	0.11±0.03
ФГА, 10	5.1±0.3	50.7±1.7	39.7±2.5	0.33±0.07
ФГА, 10 + WHI-P131, 80	4.5±0.6	17.8±2.7	11.0±1.5	0.14±0.05
ФГА, 10 + PP2, 0.5	4.7±0.5	26.4±3.0	6.4±0.1	0.13±0.08
ФГА, 0.7	4.4±0.9	15.7±2.0	4.9±0.03	0.13±0.02
ИЛ-2, 100	4.0±0.1	14.4±2.0	2.3±0.02	0.12±0.05
ФГА, 0.7+ ИЛ-2, 100	5.0±0.9	44.5±3.6	30.6±5.4	0.23±0.05

Примечание. Контроль – нестимулированные, покоящиеся ЛПК. Концентрации даны в мкг/мл для ФГА, в мкМ для ингибиторов, в ед/мл для ИЛ-2. Приведены средние ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ) из 6 экспериментов, полученных на лимфоцитах разных доноров. В каждом эксперименте разные показатели, полученные при действии одного агента и приведенные в соответствующей строке, измерены на культуре ЛПК одного донора.

Таким образом, при выключении JAK3-зависимых сигнальных путей сохраняются механизмы, поддерживающие клетку в нативном состоянии, при этом тормозятся процессы, связанные с переходом клеток из состояния покоя к пролиферации, такие как рост клеток и повышение транспортной активности натриевого насоса (Marakhova et al., 2005; Karitskaya et al., 2010).

Участие тирозинкиназ семейства Src в регуляции экспрессии ИЛ-2R $\alpha$  оценивали с помощью PP2 – ингибитора из группы пирозолпиримидинов с высокой специфичностью к киназе Lck<sup>56</sup>, которая участвует непосредственно в передаче сигнала с T-клеточного рецептора (Hanke et al., 1996). Мы обнаружили, что PP2 (0.6–1.0 мкМ) подавляет поверхностную экспрессию CD25: в типичном эксперименте, представленном на рис. 3, к 48 ч митогенной стимуляции ЛПК в присутствии PP2 доля клеток CD25(+) составила 32.5 % вместо 77.4 % без ингибитора. PP2 подавляет пролиферативный ответ ЛПК на ФГА, тормозит рост клеток, но не нарушает ионный гетерогенитет клетки по моновалентным катионам и, соответственно, её жизнеспособность в течение 48 ч (таблица). Особенность PP2 в сравнении с WHI-P131 состоит в том, что его ингибирующее действие на экспрессию CD25 проявляется значительно в первые сутки развития пролиферативного ответа, тогда как WHI-P131 эффективно подавляет экспрессию CD25 в стимулированных ЛПК в течение всего переходного периода к пролиферации.

Чтобы сравнить роль тирозинкиназ JAK и Src в экспрессии CD25 на поздних стадиях развития пролиферативного ответа, ингибиторы WHI-P131 или PP2 добавляли в культуру ЛПК в конце первых суток митогенной активации ЛПК. В первые сутки действия ФГА, когда общая численность клеток CD25(+) увеличивается за счет как мелких, так и крупных клеток, PP-ингибируемая доля клеток CD25(+) сравнима по величине с WHI-P131-ингибируемой. Напротив, введение ингибиторов после 19 ч, когда общая численность клеток CD25(+) возрастает незначительно (с 56.4 до 65.6 %), а главным событием является рост мелких лимфоцитов до размеров крупных бластов, PP2-ингибируемая компонента мала (7.3 %) или не выявляется. В этом же интервале (24–48 ч) WHI-P131 продолжает препятствовать появлению CD25 на поверхности клеток, тогда как PP2 не влияет на экспрессию этого маркера (рис. 6).

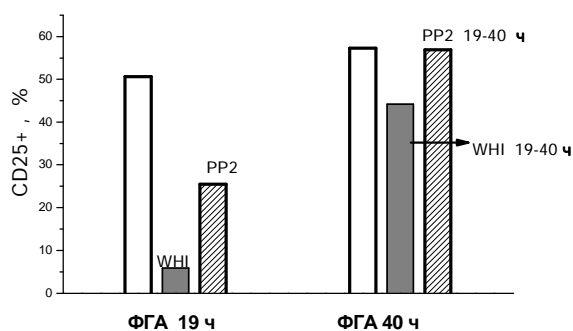


Рис. 6. PP2 не тормозит экспрессию CD25 на поздних сроках митогенной активации ЛПК. Приведены результаты одного эксперимента из 3, проведенных по однотипной схеме.

Из этих данных можно заключить, что PP2 отменяет экспрессию CD25 преимущественно в первые сутки митогенной активации ЛПК, тогда как WHI-P131 тормозит экспрессию CD25 по ходу всего пролиферативного ответа.

Анализ результатов, полученных при использовании фармакологических веществ, избирательно подавляющих в клетке активность тирозинкиназ JAK и Src, свидетельствует о двухкомпонентном запуске экспрессии CD25 в нормальных ЛПК человека, стимулированных к пролиферации с помощью ФГА.

**2. Действие ИЛ-2 на экспрессию CD25 в покоящихся и компетентных ЛПК.** ИЛ-2 играет решающую роль в экспрессии ИЛ-2R $\alpha$  в Т-лимфоцитах (Nourse et al., 1994; Ellery, Nicholls, 2002; Kim et al., 2006). Мы исследовали условия, при которых экзогенный ИЛ-2 индуцирует поверхностную экспрессию CD25 в ЛПК человека (Шатрова А.Н., Зенин В.В., Аксенов Н.Д., Митюшова Е.В. и др., 2011). ИЛ-2 (150–200 ед/мл) вносили в культуру покоящихся ЛПК и обнаружили, что в свежевыделенных ЛПК рекомбинантный ИЛ-2 за 48 ч действия не способен индуцировать такую поверхностную экспрессию CD25, которая была бы сопоставима с экспрессией, инициируемой митогенным ФГА, а также не способен запустить пролиферативный ответ (рис. 7, столбики ИЛ-2 и ФГА, таблица).

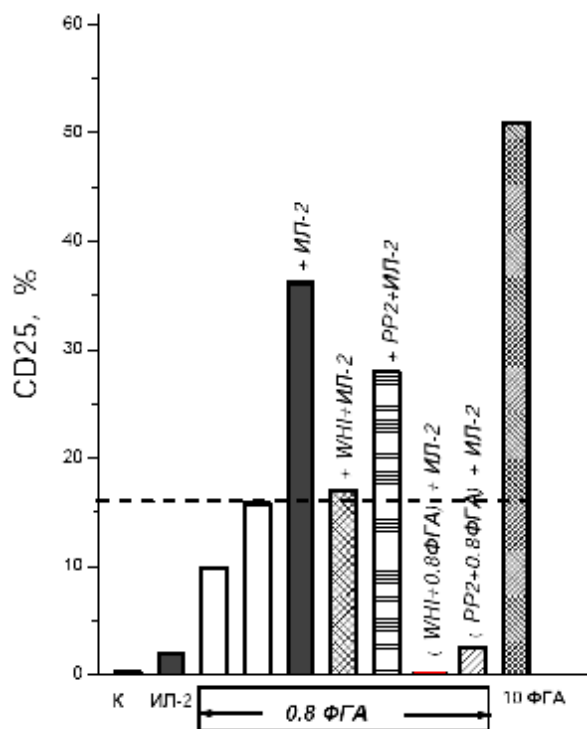


Рис. 7. Изменения поверхностной экспрессии CD25 в нормальных ЛПК человека, стимулированных ФГА или ИЛ-2, и в компетентных ЛПК, стимулированных ИЛ-2 в присутствии ингибиторов тирозинкиназ JAK (WHI-P131) или Src (PP2). По вертикальной оси – число клеток CD25(+), %. Концентрация ИЛ-2 – 150 ед/мл, WHI-P131 – 80 мкМ, PP2 – 1 мкМ. Штриховая линия – уровень экспрессии CD25 в компетентных ЛПК, инкубируемых в среде с ФГА 0.8 мкг/мл 24 и 48 ч. Приведены репрезентативные данные для одного эксперимента из 3, проведенных с лимфоцитами разных доноров по однотипной схеме.

В присутствии низких концентраций ФГА (0.7–1 мкг/мл), которые не индуцируют пролиферативный ответ, покоящиеся ЛПК переходят в компетентное состояние и приобретают способность в присутствии ИЛ-2 вступать в клеточный цикл (Kumagai et al., 1988; Торопова и др., 2001). Мы нашли, что через 48 ч культивирования ЛПК с 0.8 мкг/мл ФГА в культуре появляются клетки CD25(+) (рис. 7, светлые столбики). Доля клеток CD25(+) у разных доноров в компетентных культурах может составлять от 5 до 16 % (по данным 9 экспериментов), тогда как в культуре покоящихся ЛПК доля клеток CD25(+) не превышала 3 %. Следовательно, у незначительной части популяции клеток, обработанных немитогенным ФГА, может присутствовать рецептор ИЛ-2, содержащий  $\alpha$ -субъединицу и обладающий высокой аффинностью к ИЛ-2. Следует отметить, что в культуре компетентных ЛПК бласты не образуются.

Мы показали, что в компетентных ЛПК ИЛ-2 индуцирует не только дополнительную экспрессию CD25, но и рост клеток и пролиферативный ответ, сравнимый по величине с ответом на ФГА в митогенной концентрации (рис. 7, темный столбик ИЛ-2, таблица).

Действие ингибиторов тирозинкиназ JAK и Src на ИЛ-2-индуцированную экспрессию CD25 в компетентных ЛПК исследовали в экспериментах, проводимых по 2 схемам: ингибиторы вводили в культуру покоящихся ЛПК одновременно с немитогенной дозой ФГА либо добавляли их в культуру компетентных ЛПК одновременно с ИЛ-2. Оказалось, что WHI-P131 отменяет ИЛ-2-зависимую экспрессию CD25, не затрагивая экспрессию этого маркера в компетентных ЛПК (рис. 7, столбик WHI+ИЛ-2). PP2 тормозит индукцию CD25 в компетентных клетках в ответ на ИЛ-2 не более чем на 20 %, но ингибирующее действие PP2 на экспрессию CD25 отчетливо

проявляется, если ингибитор давать одновременно с немитогенным ФГА: PP2 отменяет появление CD25 на компетентных клетках (рис. 7, столбик (PP2+ФГА)+ИЛ-2). Последнее дает повод предполагать, что PP2-ингибируемая тирозинкиназа семейства Src контролирует запуск экспрессии CD25 в компетентных ЛПК и участвует в экспрессии ИЛ-2R $\alpha$  на ранней стадии митогенной активации, которая предшествует ИЛ-2-зависимой прогрессии Т-лимфоцитов в клеточном цикле.

### 3. STAT3 и STAT5 в экспрессии CD25 в нормальных лимфоцитах человека.

**Динамика активации STAT3 и STAT5 по ходу пролиферативного ответа ЛПК, стимулированных ФГА.** Для оценки роли JAK/STAT-сигнализации и выявления участия STAT3 и STAT5 в экспрессии CD25 исследовали изменения уровня фосфорилирования этих белков при митогенной стимуляции ЛПК (Митюшова Е.В. и др., 2013). Мы обнаружили, что в лизатах свежeweделенных, покоящихся ЛПК отсутствуют фосфорилированные формы STAT5, они начинают обнаруживаться между 2 и 5 ч инкубации с ФГА, а высокий уровень фосфорилирования STAT5 отмечается только к 24 ч стимуляции (рис. 8, слева, pY-STAT5). В отличие от STAT5, фосфорилированные формы STAT3 присутствуют в лизатах нестимулированных ЛПК, и их количество при внесении в культуру ФГА существенно не изменяется (рис. 8, слева, pY-STAT3). В лизатах активированных в течение 24-48 ч ЛПК нарастает содержание нефосфорилированных белков STAT, что указывает на возрастание относительной доли белков STAT3 и STAT5 в пробах.

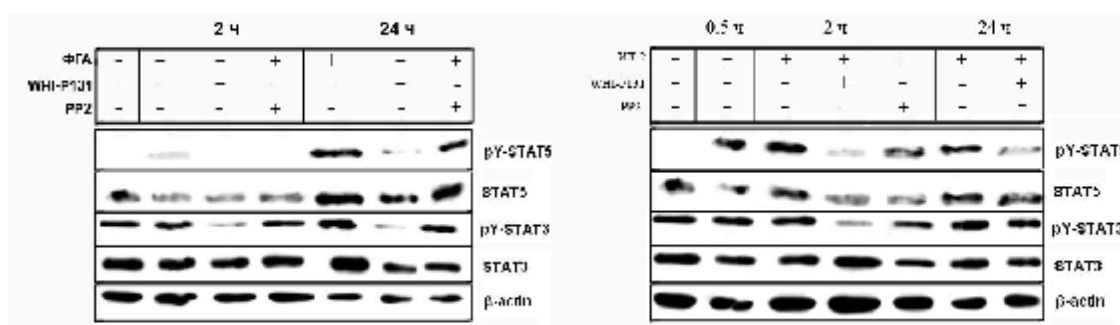


Рис. 8. Изменения уровня фосфорилирования STAT5 (pY-STAT5) и STAT3 (pY-STAT3) на разных стадиях пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных ФГА (слева) или ИЛ-2 (справа). Типичные иммуноблоты тотальных лизатов лимфоцитов человека, обработанных ФГА (10 мкг/мл) или ИЛ-2 (200 ед/мл) в течение 2 и 24 ч.

Данные о динамике активации STAT3 и STAT5 в ЛПК, стимулированных ФГА, суммированы на рис. 9 (светлые столбики).

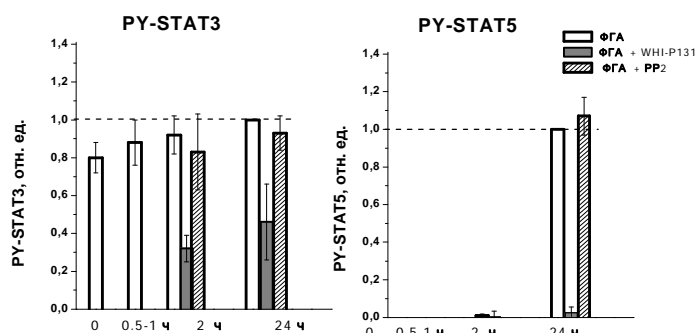


Рис. 9. Динамика фосфорилирования STAT3 и STAT5 в лимфоцитах крови человека, обработанных ФГА, а также в присутствии WHI-P131 или PP2. Отношения интенсивности свечения полос для фосфорилированных форм белка, нормированы на соответствующие значения для нефосфорилированных форм в той же пробе и нормированы к значениям на 24 ч активации ЛПК. Приведены средние ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ) из 8 экспериментов, полученных на лимфоцитах разных доноров.

Выявленное различие в поведении STAT3 и STAT5 в ответ на ФГА может указывать на разную функцию этих сигнальных белков в митогенной активации ЛПК.

**Динамика активации STAT3 и STAT5 в ЛПК, стимулированных ИЛ-2.** В покоящихся ЛПК  $\beta\gamma_c$ -рецептор ИЛ-2, обладающий низким сродством к ИЛ-2, способен проводить сигнал с участием  $\gamma_c$ -субъединицы (Nakamura et al., 1994; Leonard et al., 1999; Kim et al., 2006). Для оценки роли ИЛ-2 в активации STAT3 и STAT5 проводили эксперименты по двум схемам: рекомбинантный ИЛ-2 вносили в культуру покоящихся ЛПК на сроки от 0.5 до 24-48 ч или ИЛ-2 добавляли в культуру компетентных лимфоцитов.

В покоящихся ЛПК экзогенный ИЛ-2 активирует и STAT3, и STAT5, но в разной степени. Уже после получасовой инкубации с ИЛ-2 (100-250 ед/мл) в лизатах ЛПК отмечается высокий уровень фосфорилирования STAT5 (рис. 8, справа, PY-STAT5). Однако к концу вторых суток действия ИЛ-2 уровень фосфорилирования STAT5 снижается более чем наполовину (рис. 10, справа).

На фоне высокой активности STAT3 в покоящихся ЛПК в первые 30 мин ИЛ-2 также увеличивает содержание фосфорилированных форм STAT3, но не более, чем на 15-30 %, после чего содержание активных форм белка снижается и через сутки соответствует содержанию в контроле (рис. 8, справа, PY-STAT3; рис. 10, слева). В течение 2 сут относительное количество белков STAT в лизатах ИЛ-2-стимулированных ЛПК не изменяется.

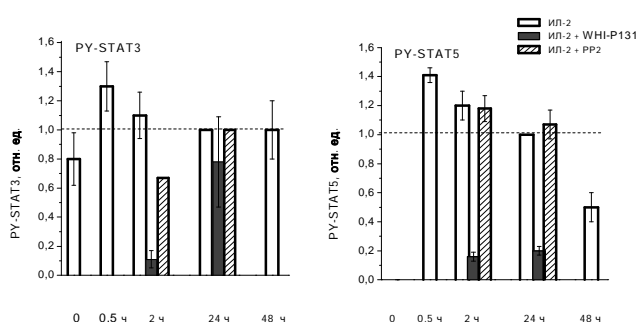


Рис. 10. Динамика фосфорилирования STAT3 и STAT5 в ЛПК человека, обработанных ИЛ-2, а также в присутствии WHI-P131 или PP2. Отношения интенсивности свечения полос для фосфорилированных форм белка, нормированы на соответствующие значения для нефосфорилированных форм в той же пробе и нормированы к значениям на 24 ч активации ЛПК. Приведены средние ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ) из 8 экспериментов, полученных на лимфоцитах разных доноров.

В компетентных ЛПК уровень фосфорилирования STAT3 сравним с уровнем в покоящихся клетках, при этом ни ИЛ-2, ни ингибиторы не оказывают существенного влияния на количество



фосфорилированных форм этого белка (рис. 11, pY-STAT3). Напротив, фосфорилированные формы STAT5 в компетентных лимфоцитах отсутствуют, но в ответ на ИЛ-2 уже через 0.5 ч уровень фосфорилирования STAT5 возрастает и остается высоким в течение всего опыта (рис. 11, pY-STAT5).

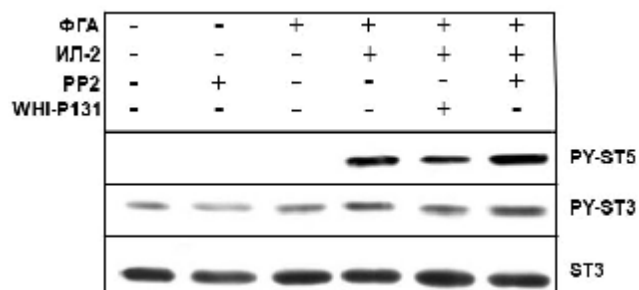


Рис. 11. ИЛ-2 индуцирует фосфорилирование STAT5 в компетентных ЛПК человека.

Иммуноблот тотальных лизатов компетентных лимфоцитов человека, которые получали инкубацией в течение 18 ч в ростовой среде с 0.8 мкг/мл ФГА (ФГА) и далее 2 ч стимулировали ИЛ-2, или перед стимуляцией ИЛ-2 обрабатывали в течение 1.5 ч ингибиторами – WHI-P131 (80 мкМ) или PP2 (0.5 мкМ).

Таким образом, ИЛ-2 индуцирует появление активных форм STAT5 в покоящихся лимфоцитах, но только в компетентных клетках функциональная активность STAT5 поддерживается на высоком уровне в течение переходного периода к пролиферации.

**Влияние ингибиторов тирозинкиназ JAK и Src на фосфорилирование STAT3 и STAT5 и экспрессию CD25 в активированных ЛПК человека.** Для выявления роли киназы JAK3, которая обеспечивает передачу сигнала с  $\gamma_c$ -цепи рецептора ИЛ-2, в активации STAT3 и STAT5 исследовали действие тирфостина WHI-P131. WHI-P131 препятствует появлению фосфорилированных форм STAT5 в ответ на ФГА и подавляет практически полностью позднее, ФГА-индуцированное фосфорилирование STAT5. Что касается STAT3, то WHI-P131 не влияет на высокий уровень его фосфорилирования в покоящихся ЛПК, но в ФГА-стимулированных ЛПК WHI-P131 ослабляет фосфорилирование STAT3 на 30-50 % на всех сроках действия митогена (рис. 8, слева, pY-STAT5 и pY-STAT3; рис. 10).

В ЛПК, стимулированных ИЛ-2, в первые 2 ч WHI-P131 препятствует возрастанию степени фосфорилирования и STAT3 и STAT5, но через сутки ингибирующее действие WHI-P131 на фосфорилирование STAT3 ослабляется, а фосфорилирование STAT5 в присутствии WHI-P131 не детектируется (рис. 8, справа; рис. 10).

Данные, полученные при анализе действия WHI-P131 на активацию STAT3 и STAT5, указывают на то, что (1) «включение» STAT5 при активации ЛПК как через T-рецептор (ФГА), так и через рецептор ИЛ-2 осуществляется с участием киназы JAK3; (2) высокий уровень активности (фосфорилирования) STAT3 в покоящихся и митоген-стимулированных ЛПК достигается без участия киназы JAK3. Механизм, обеспечивающий высокую активность STAT3 в покоящихся ЛПК, не ясен. В трансформированных лимфоидных клетках STAT3 находится в гиперактивном состоянии, являясь диагностическим маркером лейкоemий разного вида. В частности, в пролиферирующих культурах клеток лейкоemии K562 и T-клеток Jurkat нами выявлен высокий уровень фосфорилирования STAT3 (Митюшова и др., 2010). Последние исследования показывают,

что в физиологии покоящихся Т-клеток STAT3 может играть иную роль, чем в других клетках животных: обнаружено, что STAT3 подавляет продукцию ИЛ-2, регулируя экспрессию FoxO транскрипционных факторов (Oh et al., 2011).

По некоторым данным в литературе нерецепторные тирозинкиназы семейства Src могут регулировать фосфорилирование белков STAT, индуцированное при активации цитокиновых рецепторов (Zhang et al., 2000; Ingley, Klinken, 2006). В наших экспериментах PP2, один из ингибиторов тирозинкиназ семейства Src, не влиял на количество фосфоформ STAT3 и STAT5 в ЛПК, стимулированных ФГА или ИЛ-2 (рис. 9 и рис. 10).

Сравнение динамики активации STAT3, STAT5 и поверхностной экспрессии CD25 в лимфоцитах человека, стимулированных ФГА или ИЛ-2, выявляет согласованные изменения активности STAT5 и экспрессии CD25 (рис. 12). В экспериментах, выполненных по одной схеме, но на ЛПК от разных доноров, высокий процент CD25+ клеток коррелировал с высоким и стойким во времени уровнем фосфорилирования STAT5. В покоящихся ЛПК рекомбинантный ИЛ-2 в течение первых минут индуцирует фосфорилирование STAT5, уровень которого снижается к концу первых суток, и в этих же условиях ИЛ-2 не запускает ни экспрессию CD25, ни пролиферацию ЛПК (рис. 12, б и в). Только в компетентных ЛПК, стимулированных экзогенным ИЛ-2, или в ФГА-активированных ЛПК на фоне повышенной и устойчивой во времени активности STAT5 наблюдается высокий уровень поверхностной экспрессии CD25.

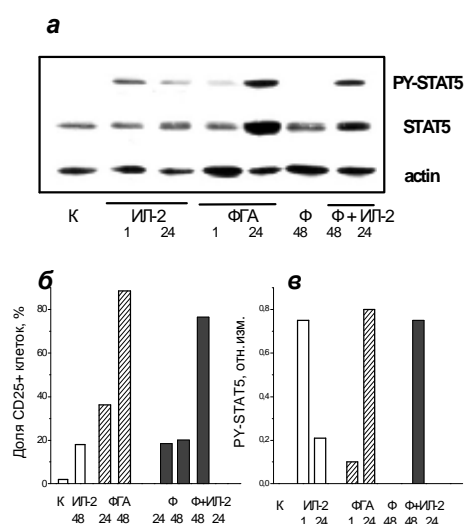


Рис. 12. Изменения уровня фосфорилирования STAT5 и экспрессии рецептора ИЛ-2 в лимфоцитах человека, стимулированных разными митогенами. *а* – иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов, стимулированных в течение 1 или 24 ч ИЛ-2 (100 ед/мл) или ФГА (10 мкг/мл), или культивируемых с форбол-12,13-дибутиратом (Ф,  $10^{-8}$  М) в ростовой среде в течение 24 ч, а далее стимулированных ИЛ-2 в течение 24 ч на фоне Ф (Ф, 48+ИЛ-2, 24). К – контроль, нестимулированные лимфоциты; *б*, – количество CD25(+) клеток в популяции ЛПК, %; *в* – относительные изменения оптической плотности полос, соответствующих фосфорилированным формам STAT5 на *а*.

В совокупности результаты, полученные при использовании разных схем митогенной активации лимфоцитов крови человека и при действии фармакологических ингибиторов сигнальных киназ, подтверждают разную роль STAT3 и STAT5 в пролиферации Т лимфоцитов и показывают, что длящаяся во времени, высокая активность STAT5 является необходимым условием экспрессии CD25 и формирования полноценного рецептора ИЛ-2, в состав которого входит  $\alpha$ -субъединица.

Т-клеточный ответ инициируется антигеном через Т-рецепторный комплекс, а конкретная программа ответа, его интенсивность и тип дифференцировки определяется спецификой второго сигнала, который инициируется через цитокиновый рецептор. Результаты нашего исследования динамики поверхностной экспрессии CD25, проведенного на лимфоцитах крови человека, свидетельствуют о двухступенчатом механизме запуска экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2, в основе которого лежит согласованная во времени сигнализация с Т-клеточного рецептора и с рецептора ИЛ-2. На начальной стадии активации в запуск экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2 вовлечены тирозинкиназы семейства Src и запускаемые с их участием пути внутриклеточной сигнализации, а ИЛ-2, продуцируемый антиген-активированной клеткой, усиливает и продлевает экспрессию ИЛ-2R $\alpha$  через JAK3-зависимый путь внутриклеточной сигнализации. В данном контексте особая роль STAT5 (по сравнению со STAT3) в пролиферации Т лимфоцитов, может быть обусловлена участием STAT5 в запуске экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2 и в формировании полноценного трехсубъединичного рецептора ИЛ-2, что создает оптимальные условия для запуска покоящихся Т лимфоцитов в клеточный цикл и последующей пролиферации.

### ВЫВОДЫ

1. В лимфоцитах крови человека поверхностная экспрессия CD25<sup>+</sup> и формирование популяции клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> – длящийся процесс, приуроченный к ИЛ-2-регулируемой стадии пролиферативного ответа.
2. На ранней, антиген-зависимой стадии активации сигнал к экспрессии ИЛ-2R $\alpha$  поступает с Т-клеточного рецептора через Src-киназный сигнальный путь, а длящееся нарастание уровня экспрессии ИЛ-2R $\alpha$  регулируется с рецептора ИЛ-2 с участием JAK-зависимого сигнального пути.
3. Способность ИЛ-2 индуцировать поверхностную экспрессию CD25, рост и пролиферацию в компетентных (но не в покоящихся) Т лимфоцитах обусловлена присутствием в популяции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток. В формировании компетентности Т лимфоцитов и «подпороговой» экспрессии CD25 участвует Src-зависимая сигнализация с Т-клеточного рецептора.
4. Индуцированный интерлейкином-2 JAK3/STAT5-путь сигнализации участвует в поддержании высокого и устойчивого во времени уровня экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2 по ходу пролиферативного ответа.
5. Решающая роль STAT5 (по сравнению со STAT3) в запуске пролиферации Т лимфоцитов человека обусловлена его участием в экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2 и в формировании полноценного рецептора ИЛ-2.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### СТАТЬИ

1. **Митюшова Е.В.**, Аксенов Н.Д., И.И. Марахова. Роль STAT5 в пролиферации культур клеток хронической лейкемии K562: анализ ингибирующего действия WHI-P131 // Цитология. – 2010. Т. 52, вып. 2. – С. 184-190.

2. Зенин В.В., Аксенов Н.Д., Шатрова А.Н., **Митюшова Е.В.**, Марахова И.И. Поверхностная экспрессия CD25 у лимфоцитов человека на разных стадиях запуска пролиферативного ответа. I. Роль тирозинкиназ семейства JAK и Src по данным ингибиторного анализа // Цитология. – 2011. Т. 53, вып.11. – С. 876-887.

3. Шатрова А.Н., Зенин В.В., Аксенов Н.Д., **Митюшова Е.В.**, Марахова И.И. Поверхностная экспрессия CD25 у лимфоцитов человека на разных стадиях запуска пролиферативного ответа. II. Действие интерлейкина-2 // Цитология. – 2011. Т. 53, вып. 12. – С. 990-998.

4. **Митюшова Е.В.**, Шатрова А.Н., Зенин В.В., Аксенов Н.Д., Марахова И.И. Роль белка STAT5 в экспрессии альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в лимфоцитах человека // Цитология. – 2013. Т. 55, вып. 6. – С. 421-429.

### ТЕЗИСЫ

1. Епифанцева И. В., **Митюшова Е.В.**, Марахова И.И. Транскрипционные факторы STAT3 и STAT5 в активации Т лимфоцитов человека // 11-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука XXI века". Тезисы докладов. – Пушино. 2007. – С.79.

2. **Митюшова Е.В.**, Аксенов Н.Д., Марахова И.И. Роль белков семейства STAT в пролиферации лимфоцитов человека, клеток эритроидной лейкемии K562 и Т-клеток Jurkat // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Сборник тезисов. – Пушино. 2009. – Т. 1. – С.77-81.

3. **Митюшова Е.В.**, Зенин В.В., Аксенов Н.Д., Шатрова А.Н., Марахова И.И. Роль тирозинкиназ семейства JAK и Src в поверхностной экспрессии CD25 при митогенной активации лимфоцитов человека (данные ингибиторного анализа) // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Сборник тезисов. – Пушино. – 2011. Т. 1. – С. 23-29.

4. **Митюшова Е.В.**, Марахова И.И. Роль белка STAT5 в экспрессии рецептора интерлейкина-2 при активации лимфоцитов человека // II конференция молодых ученых Института цитологии РАН. – Санкт-Петербург. 2012. – Цитология. Т. 54, вып.4. – С. 348.

5. **Митюшова Е.В.** Роль белков семейства STAT3 и STAT5 в экспрессии рецептора интерлейкина-2 в лимфоцитах крови человека // II Всероссийская научная конференция молодых ученых “Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия”. – Санкт-Петербург. 2012. – Медицинский академический журнал. Т. 12, вып. 3. – С. 75-77.

6. **Митюшова Е.В.**, Шатрова А.Н., Зенин В.В., Аксенов Н.Д., Марахова И.И. Роль белка STAT5 в экспрессии α-цепи рецептора интерлейкина-2 в лимфоцитах человека // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник тезисов. – Пушино. – 2013. Т. 1. – С. 76-80.

7. **Elena Mityushova**, Alla Shatrova, Vsevolod Zenin, Irina Marakhova. Constitutive STAT5 phosphorylation is critical for interleukin-2 receptor alpha expression in human blood T lymphocytes. // The FEBS Journal.– St.-Petersburg. – 2013. V. 280 (1) – P. 465.

8. Marakhova I.I., **Mityushova E.V.** Regulated expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump during human blood lymphocyte proliferation. X Int.Congress “Cell volume regulation”. – Moscow.–2013.– P.49.

### Список цитируемой литературы:

*Торопова Ф.В., Виноградова Т.А., Марахова И.И. 2001. Сравнительное исследование функциональной экспрессии Na/K насоса в лимфоцитах человека, активированных фитогемагглютинином, форболовым эфиром, иономицином и интерлейкином-2. Цитология. 43 (2) : 148-155. – Berridge M.J. 1997. Lymphocyte activation in health and disease. Crit. Rev. Immunol. 17 : 155-178. – Boyum A. 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. J. Clin. Lab. Invest. 21 : 9-29. – Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye*

binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254. – *Crabtree G.R.* 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 243: 355-361. – *Ellery J.M., Nicholls P.J.* 2002. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13 : 27-40. – *Frank D.A.* 2012. Targeting STATs for cancer therapy. *JAK/STAT.* 1 : 1-2. – *Hanke J.H., Gardner J.P., Dow R.L., Changelian P.S., Brissette W.H., Weringer E.J., Pollok B.A., Connelly P.A.* 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem.* 271 : 695-701. – *Ingley E., Klinken S.P.* 2006. Cross-regulation of JAK and Src kinases. *Growth Factors.* 24 : 89-95. – *Karitskaya I., Aksenov N., Vassilieva I., Zenin V., Marakhova I.* 2010. Long-term regulation of Na,K-ATPase pump during T-cell proliferation. *Eur. J. Physiol.* 460 : 777-789. – *Kim H.P., Kelly J., Leonard W.J.* 2001. The basis for IL-2-induced IL-2 receptor alpha chain gene regulation: importance of two widely separated IL-2 response elements. *Immunity.* 15 : 159-172. – *Kim H.P., Leonard W.J.* 2002. The basis for TCR-mediated regulation of the IL-2 receptor alpha chain gene: role of widely separated regulatory elements. *EMBO J.* 21 : 3051-3059. – *Kim H.P., Kim B.G., Letterio J., Leonard W.J.* 2005. Smad-dependent Cooperative Regulation of Interleukin 2 Receptor {alpha} Chain Gene Expression by T Cell Receptor and Transforming Growth Factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 280 : 34042-34047. – *Kim H.P., Imbert J., Leonard W.J.* 2006. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17 : 349-366. – *Kumagai N., Benedict S.N., Mills G.B., Gelfand E.W.* 1988. Induction of competence and progression signals in human T lymphocytes by phorbol esters and calcium ionophores. *J. Cell. Physiol.* 137 : 329-336. – *Laemmli U.K.* 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680-685. – *Leonard W.J., Imada K., Nakajima H., Puel A., Soldaini E., John S.* 1999. Signaling via the IL-2 and IL-7 receptors from the membrane to the nucleus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 64 : 417-424. – *Leonard W.J.* 1996. The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Med.* 47 : 229-239. – *Leonard W.J.* 2001. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 1 : 2000-2008. – *Lin J., Leonard W.J.* 2000. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene.* 19 : 2566-2576. – *Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R.* 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-270. – *Marakhova I.I., Karitskaya I.A., Aksenov N.D., Zenin V.V., Vinogradova T.A.* 2005. Interleukin-2-dependent regulation of Na/K pump in human lymphocytes. *FEBS Letters.* 579 : 2773-2780. – *Marzec M., Kasprzycka M., Ptasznik A., Wlodarski P., Zhang Q., Odum N., Wasik M.A.* 2005. Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3. *Lab Invest.* 85 : 1544-1554. – *Moriggl R., Topham D.J., Teglund S., Sexl V., McKay C., Wang D., Hoffmeyer A., van Deursen J., Sangster M.Y., Bunting K.D.* 1999a. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity.* 10 : 249-259. – *Moriggl R., Sexl V., Piekorz R., Topham D., Ihle J.N.* 1999b. Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signaling in peripheral T cells. *Immunity.* 11 : 2252-2230. – *Nakamura Y., Russell S.M., Mess S.A.* 1994. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta and gamma chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature.* 369 : 330-333. – *Nourse J., Firpo E., Flanagan W.M., Coats S., Polyak K., Lee M.H., Massague J., Crabtree G.R., Roberts J.M.* 1994. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature.* 372 (6506) : 570-573. – *Robb R.J., Rusk C.M., Yodoi J., Greene W.C.* 1997. Interleukin 2 binding molecule distinct from the Tac protein: analysis of its role in formation of high-affinity receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84 : 2002-2006. – *Rochman Y., Spolski R., Leonard W.J.* 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 9 : 480-490. – *Ross J. A., Nagy Z. S., Cheng H., Stepkowski S.M., Kirken R. A.* 2007. Regulation of T cell homeostasis by JAKs and STATs. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 55 : 231-245. – *Shi M., Lin T.H., Appell K.C., Berg L.J.* 2009. Cell cycle progression following naive T cell activation is independent of JAK3/common gamma-chain cytokine signals. *J. Immunol.* 183 : 4493-4501. – *Smith-Garvin J.E., Koretzky G.A., Jordan M.S.* 2009. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27 : 591-619. – *Sudbeck E.A., Liu X.-P., Narla R.K., Mahajan S., Ghosh S., Mao C., Uckun F.M.* 1999. Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. *Clin. Cancer Res.* 5 : 1569-1582. – *Taylor D.K., Walsh P.T., LaRosa D.F., Zhang J., Burchill M.A., Farrar M.A., Turka L.A.* 2006. Constitutive activation of STAT5 supersedes the requirement for cytokine and TCR engagement of CD4+ T cells in steady-state

homeostasis. *J. Immunol.* 177 : 221622-221623. – Wang L.H., Kirken R.A., Erwin R.A., Yu C.R., Farrar W.L.J. 1999. JAK3, STAT, and MAPK signalling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J Immunol* 162 : 3897-3904. – Weiss A., Imboden J., Hardy K., Manger B., Terhorst C., Stobo J. 1986. The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 4 : 593-619. – Yao Z., Kanno Y., Kerenyi M., Stephens G., Durant L., Watford W.T., Laurence A., Robinson G.W., Shevach E.M., Moriggl R., Hennighausen L., Wu C., O'Shea J.J. 2007. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood.* 109 : 4368-4375. – Zhang Y., Turkson J., Carter-Su C., Smithgall T., Levitzki A., Kraker A., Krolewski J.J. Medveczky P., Jove R. 2000. Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of JAK1 kinase activity. *J. Biol. Chem.* 275 : 24935-24944. – Zorn E., Nelson E.A., Mohseni M., Porcheray F., Kim H., Litsa D., Bellucci R., Raderschall E., Canning C., Soiffer R.J., Frank D.A., Ritz J. 2006. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood.* 108 :1571-1579.