

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ STAT5 И STAT3 ПРИ ЗАПУСКЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНЫМИ МИТОГЕННЫМИ АГЕНТАМИ

© И. А. Карицкая,¹ Н. Д. Аксенов, В. В. Зенин, А. Л. Хайдукова, И. И. Марахова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹электронный адрес: inkar74@mail.ru

В сигнальных каскадах, инициирующихся при запуске интерлейкин-2-зависимой пролиферации Т-лимфоцитов, активация близкородственных транскрипционных факторов STAT5 α и STAT5 β является одним из центральных событий. В настоящей работе исследована динамика активации белков семейства STAT5 α и STAT3 на разных этапах пролиферативного ответа Т-клеток в ответ на действие различных митогенных стимулов. Об активации STAT-белков судили по увеличению количества их фосфорилированных по тирозину форм. Лимфоциты периферической крови стимулировали митогенным лектином фитогемагглютинином (ФГА), или форбол-12,13-дибутириловым эфиром (ФДБ) совместно с иономицином (ИМ), или добавлением экзогенного ИЛ-2 к лимфоцитам, предварительно обработанным ФГА в субмитогенной концентрации. Показано, что при активации Т-лимфоцитов как ФГА, так и смесью ФДБ и ИМ фосфорилированные формы STAT5 начинают появляться через 5 ч после стимуляции, максимум фосфорилирования (превышающий в 10 раз и более уровень фосфорилирования в контроле) наблюдается через 1 сут культивирования в присутствии митогенов. В «компетентных» лимфоцитах ИЛ-2 увеличивает фосфорилирование STAT5 уже через 10 мин, и высокий уровень фосфорилирования сохраняется в последующие 24 ч культивирования Т-клеток. В отличие от STAT5 фосфорилированные формы STAT3 присутствуют в покоящихся и в «компетентных» Т-клетках, и на этом фоне динамика фосфорилирования STAT3 выглядит «сглаженной». Циклоспорин А в концентрации, подавляющей пролиферативный ответ, снижает уровень фосфорилирования и STAT5, и STAT3 в среднем в 1.5—2.0 раза как на раннем, так и на позднем этапах пролиферативного ответа. Показана корреляция между увеличением количества фосфорилированных форм STAT5 и экспрессией высокоаффинного рецептора ИЛ-2. Сделан вывод о том, что резкое увеличение (в 10 раз и более) уровня фосфорилирования пула STAT5 может служить маркером вхождения Т-лимфоцитов в обусловленный ИЛ-2 этап пролиферации независимо от типа митогенного агента и способа активации клеток.

Ключевые слова: транскрипционные факторы STAT5 и STAT3, рецепторы ИЛ-2 со средней и высокой аффинностью, пролиферативный ответ, лимфоциты человека.

Принятые сокращения: STAT — signal transducer and activators of transcription, ИЛ-2 — интерлейкин-2, ФГА — фитогемагглютинин, ФДБ-форбол-12,13-дибутириловый эфир, ИМ — иономицин, ЦА — циклоспорин А.

Белки семейства STAT (signal transducers and activators of transcription) выполняют функции передачи сигнала с рецепторов клеточной мембраны в ядро и в то же время являются транскрипционными факторами. Известно 7 типов белков STAT, которые активируются в ответ на действие ростовых факторов и цитокинов и инициируют разные биологические ответы (Никольский, Василенко, 2000; Bromberg, Darnell, 2000). Согласно существующим представлениям, активация белков STAT подразумевает их фосфорилирование по тирозиновым и сериновым остаткам в С-концевой части молекул, димеризацию молекул по SH₂-доменам, транслокацию димеров в ядро и их связывание с ДНК. Фосфорилирование по тирозину, являющееся необходимым условием активации белков STAT, может осуществляться тирозинкиназами рецепторов факторов роста (EGF и PDGF) или нерецепторными тирозинкиназами (семейства JANUS-

киназ — JAK), нековалентно связанными с рецепторами цитокинов. Есть сведения об участии в этом процессе киназ семейств Src и Tec (Frank et al., 1995; Lin, Leonard, 1997; Tkaczuk et al., 2002; Benczik, Gaffen, 2004). Для активации транскрипции генов-мишеней в ряде случаев необходимо последующее фосфорилирование STAT по серину, однако этот вопрос в настоящее время изучен недостаточно (Darnell et al., 1997; Akira, 2000; Nagy et al., 2002; Xue et al., 2002; Fung et al., 2003).

В запуске пролиферативного ответа Т-лимфоцитов одну из ключевых ролей играют близкородственные транскрипционные факторы STAT5 α и STAT5 β (Moriggl et al., 1999; Lin, Leonard, 2000; Fulop et al., 2001; Buitenhuis et al., 2004). Поскольку STAT5 α и STAT5 β кодируются tandemно сцепленными генами, имеют 95%-ную гомологию, а их функции зачастую перекрываются, иногда в работах их объединяют под общим названием

STAT5 (Benczik, Gaffen, 2004). Двойной нокаут по этим белкам полностью подавляет пролиферативный ответ и препятствует запуску в клеточный цикл периферических Т-клеток мышей как в присутствии, так и в отсутствие интерлейкина-2 (ИЛ-2) (Moriggl et al., 1999; Lin Leonard, 2000). У таких клеток невозможность вступления в клеточный цикл связана с неспособностью экспрессировать циклины D2 и D3, а также циклинзависимую киназу Cdk6 (Moriggl et al., 1999). По ходу ИЛ-2-индуцированной пролиферации Т-клеток также активируется STAT3, но его функции, по-видимому, отличаются от функций STAT5. У мышей с недостаточностью по STAT3 наблюдается дефект ИЛ-2-зависимой пролиферации Т-клеток, в основе которого лежит нарушение экспрессии IL-2R α , однако в отличие от STAT 5 высокая концентрация ИЛ-2 восстанавливает нормальный пролиферативный ответ таких лимфоцитов (Moriggl et al., 1999; Akira, 2000). Предполагают, что STAT3 главным образом является антиапоптотическим фактором, который действует через Bcl-2-независимый путь (Takeda et al., 1998; Moriggl et al., 1999). К настоящему времени в литературе нет полных сведений о динамике активации белков семейства STAT на всем протяжении пролиферативного ответа нормальных Т-лимфоцитов человека. Активацию STAT3 и STAT5 изучали главным образом на клетках лимфоидных линий и на лимфоцитах, преактивированных в течение 48—72 ч фитогемагглютинином (ФГА) в субмитогенной концентрации с последующим добавлением ИЛ-2.

В цели настоящей работы входило исследование динамики активации белков STAT5 и STAT3 в процессе развертывания ИЛ-2-зависимого пролиферативного ответа Т-клеток периферической крови человека при использовании разных схем запуска покоящихся лимфоцитов в клеточный цикл. Для решения поставленных задач определяли степень фосфорилирования белков STAT по тирозину как после активации Т-клеточного рецептора свежeweделенных лимфоцитов, так и минуя начальную стадию его активации, стимулируя нижележащую протеинкиназу С, и наконец, с момента запуска ИЛ-2-зависимого этапа пролиферативного ответа человека. Мы показали разницу в профилях активации STAT5 и STAT3. Динамика активации STAT3 выглядела более сглаженной по сравнению с резким нарастанием количества фосфорилированных форм STAT5, коррелирующим по времени с экспрессией высокоаффинного рецептора ИЛ-2. Таким образом, резкое увеличение (в 10 раз и более) уровня фосфорилирования пула STAT5 может служить маркером вхождения Т-лимфоцитов в ИЛ-2-зависимый этап пролиферации.

Материал и методика

Выделение и культивирование лимфоцитов периферической крови человека. Лимфоциты выделяли по общепринятой схеме (Voym, 1968) из свежей донорской крови. Лейкоцитарную фракцию отбирали после осаждения эритроцитов, добавляя в кровь 6%-ный раствор декстрана (Т500). Суспензию лейкоцитов (пробы по 8 мл) наслаивали на 3 мл гистопака и центрифугировали в течение 30 мин при 600 г. После центрифугирования интерфазу переносили в пробирки объемом сначала 50 мл, затем 10 мл и 3—4 раза промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) следующего состава

(в мМ): NaCl — 137, Na₂HPO₄ — 8, KCl — 2.7, KH₂PO₄ — 1.5. Для удаления макрофагов клеточную суспензию после отмычки разбавляли средой RPMI-1640 без антибиотиков и помещали в пластиковые матрацы, предварительно обработанные 10%-ной сывороткой человека группы крови 0 (1), и оставляли на 40 мин при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Далее полученную суспензию лимфоцитов разливали во флаконы по 40—50 мл с концентрацией клеток 2 млн/мл, а на следующие сутки суспензию переносили во флаконы по 10—15 мл с концентрацией 1.5—2.0 млн/мл.

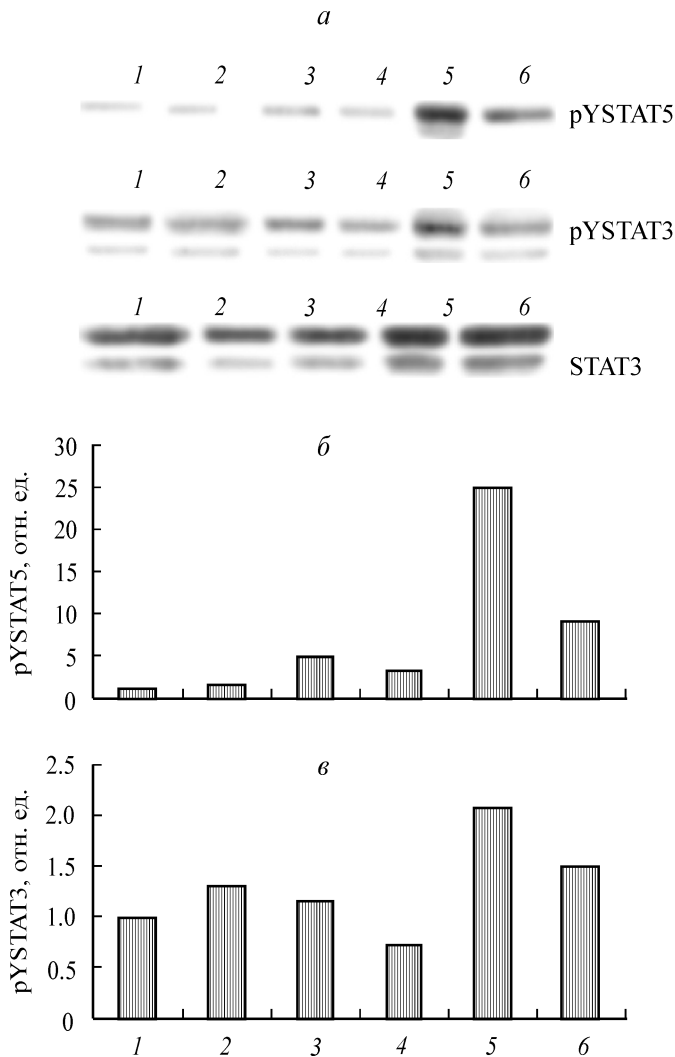
Схемы активации лимфоцитов. Использовали три схемы запуска пролиферативного ответа лимфоцитов человека: 1) покоящиеся лимфоциты (находящиеся в фазе G₀ клеточного цикла) активировали добавлением митогенного лектина — фитогемагглютинаина (ФГА, 10 мкг/мл), который взаимодействует с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) и индуцирует вхождение Т-лимфоцитов в фазу G₁ клеточного цикла; 2) Т-лимфоциты стимулировали активатором протеинкиназы С форбол-12,13-дибутириловым эфиром (ФДБ, 10—8 М) в сочетании с кальциевым ионофором иономицином (ИМ, 5 · 10⁻⁷ М); 3) лимфоциты активировали экзогенным цитокином ИЛ-2; цитокин (100 ед./мл) добавляли к суспензии Т-клеток, предварительно обработанных в течение 24 ч ФГА в субмитогенной концентрации (0.8—1.0 мкг/мл). Такая преактивация дает возможность получить «компетентные» клетки, которые способны в ответ на действие ИЛ-2 начать клеточный цикл.

Иммунопрессор циклоспорин А (ЦА) добавляли в культуральную среду в концентрации 2 мкг/мл одновременно с добавлением митогенов.

Оценка экспрессии высокоаффинного рецептора ИЛ-2. Лимфоциты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в присутствии FITC-окрашенных моноклональных антител против CD25, который является маркером экспрессии α -цепи рецептора ИЛ-2, необходимой для сборки полного комплекса высокоаффинного рецептора ИЛ-2. Образцы анализировали с помощью метода проточной цитометрии (FACStar, Becton Dickinson).

Электрофорез и иммуноблотинг. Общие клеточные лизаты получали из свежeweделенных, покоящихся лимфоцитов и лимфоцитов, активированных соответствующими митогенами. Лимфоциты осаждали центрифугированием при 600 g в течение 10 мин, осадки промывали 3 раза холодным PBS и лизировали на льду 20 мин в лизирующем буфере (pH 7.4), содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 1 % Тритона X-100, 0.5 % нонидета Р-40 (NP-40), 0.5 % дезоксихолата, 150 мМ NaCl, по 1 мМ EDTA, EGTA и PMSF, по 1 мкг/мл лейпептина, апротинина и пепстатина, по 1 мМ Na₃VO₄ и NaF. Полученную смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант отбирали, 2 мкл брали для определения концентрации белка. К остальному супернатанту добавляли буфер Лэммли для электрофоретических проб (40 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 20 % SDS, 20 % β -меркаптоэтанола и 40 % глицерина) из расчета 1 часть буфера на 4 части лизата.

Количество общего белка в пробе оценивали по методу Бредфорд (Bradford, 1976). В качестве стандарта для калибровочной кривой использовали овальбумин. На дорожку электрофорезного геля загружали по 50 мкг белка. Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза в 7.5%-ном полиакри-



ламидном геле в присутствии SDS с последующим полусухим электропереносом (0.8 mA/cm^2 , 1 ч 15 мин) на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra, Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Для визуализации белковых полос использовали краситель Понсо S (Sigma, США). Мембрану отмывали раствором 0.05 % TTBS, pH 7.4 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl и 0.05 % Tween-20) и инкубировали в растворе 5%-ного обезжиренного молока, приготовленного на TTBS, в течение 1 ч при комнатной температуре с целью избежания неспецифического связывания антител. Для выявления активированных белков семейства STAT мы использовали антитела, специфически узнающие STAT3, фосфорилированный по тирозину 705, и STAT5 (STAT5 α), фосфорилированный по тирозину 694. Инкубацию с антителами проводили в течение ночи при 4 °C. От несвязавшихся антител мембрану отмывали раствором TTBS 4 раза по 5 мин и инкубировали с вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембрану снова четырежды промывали раствором TTBS. Визуализацию блотов проводили путем усиленной хемилюминесценции (ECL, Western blotting protocol, Amersham, США), которую регистрировали при экспонировании мембраны на пленку для рентгеновских снимков Fujifilm Super RX. Пленку сканировали с помощью сканера ARCUS 11 (AGFA) для оценки относительных изменений плотности проявленных полос.

Рис. 1. Изменения уровня фосфорилирования STAT5 (pYSTAT5) и STAT3 (pYSTAT3) по ходу пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных ФГА (10 мкг/мл).

Здесь и на рис. 2, 4 приведены иммуноблоты, окрашенные антителами против STAT5 (STAT5 α), фосфорилированного по тирозину 694, и STAT3, фосфорилированного по тирозину 705. Для оценки равномерности нанесения лизатов мембрану инкубировали в специальном буфере для удаления антител и подвергали повторной окраске с антителами против STAT3. *а* — иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов человека. *б, в* — изменения оптической плотности полос, соответствующих фосфорилированным формам STAT5 и STAT3, отн. ед.; за единицу принята интенсивность полос, соответствующих степени фосфорилирования STAT5 и STAT3 в покоящихся лимфоцитах; результаты денситометрии скорректированы с учетом ошибки нанесения, рассчитанной после анализа оптической плотности полос, соответствующих тотальному пулу STAT3. *а–в*: 1 — покоящиеся лимфоциты; 2 — ФГА, 1 ч; 3 — ФГА, 5 ч; 4 — ФГА в присутствии ЦА (2 мкг/мл), 5 ч; 5 — ФГА, 24 ч; 6 — ФГА в присутствии ЦА, 24 ч.

Fig. 1. Alteration in tyrosine phosphorylation level of STAT5 (pYSTAT5) and STAT3 (pYSTAT3) during PHA-induced proliferation of human T-lymphocytes.

Antiphosphotyrosine (Y694) STAT5 immunoblot (*upper panel*) and antiphosphotyrosine (Y705) STAT3 immunoblot (*middle panel*) are shown here and in figs. 2 and 4. The membrane was stripped and reprobed with anti-panSTAT3 antibody to verify equivalent loading of samples (indicated in the lower panel). Figures represent a characteristic example of STAT5 and STAT3 Tyr-phosphorylation analysis repeated with similar result. *а* — immunoblot of total lysates; *б, в* — densitometry analyses of bands corresponding to Tyr-phosphorylated STAT (pYSTAT5) and STAT3 (pYSTAT3). Optical density of Tyr-phosphorylated STAT5 and Tyr-phosphorylated STAT3 bands in resting lymphocytes was taken for one unit. Densitometry of STAT5 and STAT3 phosphorylation was corrected for the amount of total STAT3 protein. Ratio of Tyr-phosphorylated STAT5 and STAT3 to total STAT3 protein was analyzed by densitometry and plotted on the diagram in arbitrary units. *а–в*: line 1 — control resting lymphocytes; line 2 — PHA (10 $\mu\text{g/ml}$), 1 h; line 3 — PHA, 5 h; line 4 — PHA in the presence of cyclosporine A (2 $\mu\text{g/ml}$), 5 h; 5 — PHA, 24 h; 6 — PHA in the presence of cyclosporine A (2 $\mu\text{g/ml}$), 24 h.

Для оценки равномерности нанесения лизатов мембрану инкубировали в специальном буфере для удаления антител (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS и 100 mM β -меркаптоэтанола) в течение 40 мин при 50 °C и подвергали повторной окраске с антителами против STAT3.

Антитела. Поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированных форм STAT3 и STAT5 (Cell Signaling, США) разводили (1 : 1000) 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина в 0.1%-ном TTBS. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика, — GAR-HRP (Cell Signaling, США), приготовленные на 5%-ном обезжиренном молоке в разведении 1 : 6000. Моноклональные мышьиные антитела против STAT3 (Transduction Laboratories, США) и вторичные козы антитела, полученные против иммуноглобулинов мыши, — GAM-HRP (Sigma, США), готовили на обезжиренном 5%-ном молоке в разведениях 1 : 1000 и 1 : 20 000 соответственно.

В работе использовали ФГА, иономицин, форбол-12,13-дибутириловый эфир, гистопак-1.077 (Sigma, США), декстран Т500 (Pharmacia, Швеция), рекомбинантный ИЛ-2 (Amersham, Англия), среду RPMI-1640 (Flow, Англия), циклоспорин А (ЦА, Sandoz, Швейцария), а также реактивы отечественного производства квалификации «хч» или «осч». Растворы ФГА готовили на 0.14 M NaCl, раствор ЦА — на этиловом спирте, растворы иономицина и форболового эфира — на DMSO. Концентрация спирта и DMSO в тестирующих растворах клетками не превышала 0.05 %.

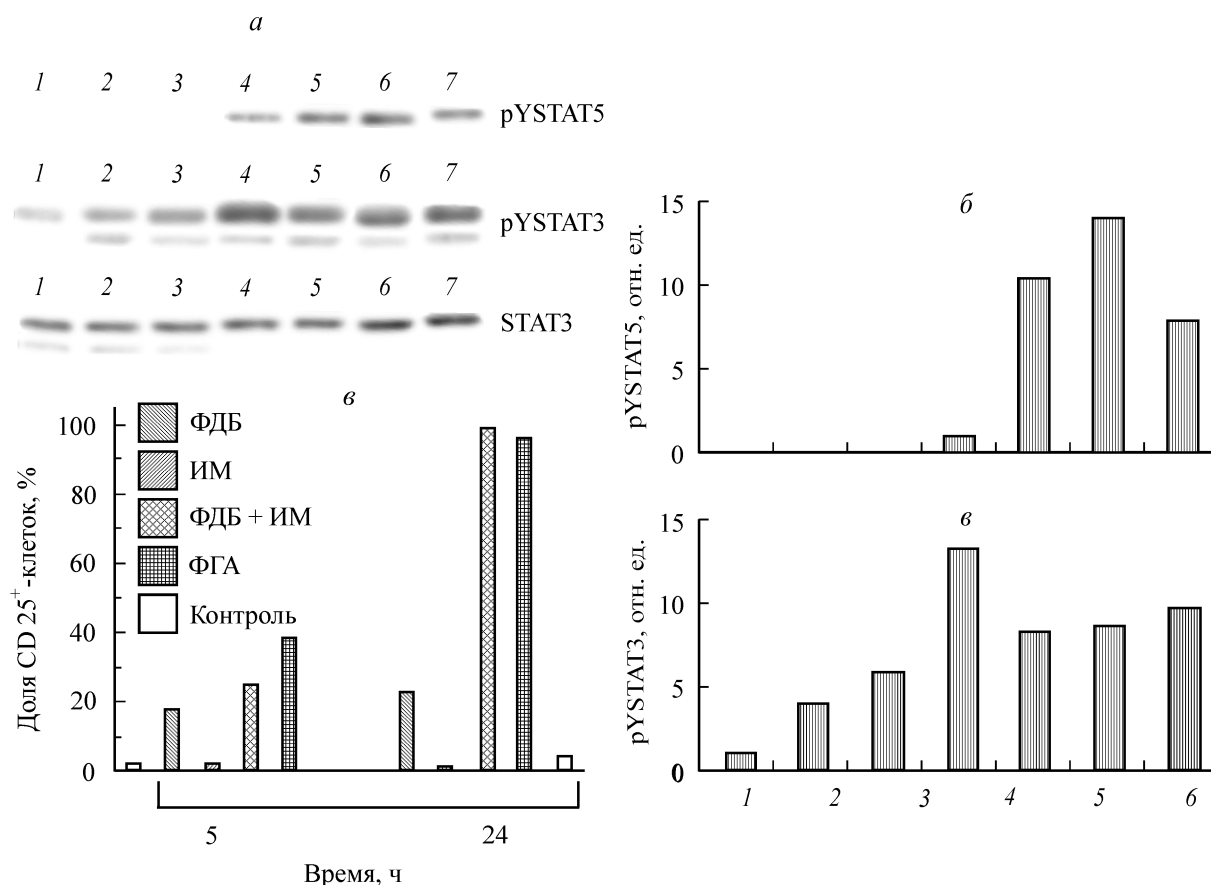


Рис. 2. Изменения уровня фосфорилирования STAT5 (pYSTAT5) и STAT3 (pYSTAT3) и экспрессия высокоаффинного рецептора ИЛ-2 в лимфоцитах, активированных различными митогенами.

а — иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов человека. *б, в* — изменения оптической плотности полос, соответствующих фосфорилированным формам STAT5 и STAT3, отн. ед.; за единицу принята интенсивность полос, соответствующих степени фосфорилирования STAT5 и STAT3 в покоящихся лимфоцитах; результаты денситометрии скорректированы с учетом ошибки нанесения, рассчитанной после анализа оптической плотности полос, соответствующих тотальному пулу STAT. *г* — экспрессия высокоаффинного рецептора ИЛ-2 (CD25⁺-клетки) в лимфоцитах, активированных различными митогенами. *а, б, в, г*: 1 — покоящиеся лимфоциты; 2 — ФБД (10^{-8} М), 5 ч; 3 — ИМ ($5 \cdot 10^{-7}$ М), 5 ч; 4 — ФБД и ИМ совместно, 5 ч; 5 — ФГА (10 мкг/мл), 5 ч; 6 — ФБД и ИМ совместно, 24 ч; 7 — ФГА, 24 ч.

Fig. 2. Alteration in tyrosine phosphorylation level of STAT5 (pYSTAT5) and STAT3 (pYSTAT3) and expression of high affinity IL-2 receptor in human T-lymphocyte activated by different mitogens.

а — immunoblot of total lysates; *б, в* — densitometry analyses of bands corresponding to Tyr-phosphorylated STAT5 (pYSTAT5) and STAT3 (pYSTAT3). Optical density of Tyr-phosphorylated STAT5 and Tyr-phosphorylated STAT3 bands in resting lymphocytes was taken for one unit. Densitometry of STAT5 and STAT3 phosphorylation was corrected for the amount of total STAT3 protein. Ratio of Tyr-phosphorylated STAT3 and STAT3 to total STAT3 protein was analyzed by densitometry and plotted on the diagram in arbitrary units; *г* — expression of high affinity IL-2 receptor (CD25⁺-cells) in lymphocyte activated by different mitogens. *а, б, в, г*: line 1 — control resting lymphocytes; line 2 — PDBu (10^{-8} M), 5 h; line 3 — ionomycin ($5 \cdot 10^{-7}$ M), 5 h; line 4 — PDBu with ionomycin, 5 h; line 5 — PHA (10 μ g/ml), 5 h; line 6 — PDBu with ionomycin, 24 h; line 7 — PHA, 24 h.

Результаты и обсуждение

Динамика активации STAT5 по ходу пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных ФГА или смесью ФБД и ИМ. На рис. 1 показано изменение количества фосфорилированного STAT5 при стимуляции свежвыделенных Т-лимфоцитов ФГА в концентрации 10 мкг/мл. Взаимодействие ФГА с комплексом Т-клеточного рецептора инициирует выход покоящихся клеток из фазы G₀ и их вступление в клеточный цикл. На иммуноблоте (рис. 1, *а*) видно, что в течение 4—5 ч стимуляции фосфорилирование STAT5 практически не детектируется, но становится значительным через 1 сут культивирования с митогенным лектином (рис 1, *а*, дорожки 3, 5). По результатам денситометрии иммуноблотов из 6 опытов, про-

веденных на лимфоцитах, выделенных из крови разных доноров, следует, что фосфорилированные формы STAT5 появляются через 5 ч стимуляции ФГА, в то время как на поздней стадии активации (после 1 сут культивирования с цитокином) степень фосфорилирования увеличивается более чем в 10 раз (рис. 1, *б*).

Известно, что активаторы протеинкиназы С и кальциевые ионофоры способны вызвать пролиферацию Т-клеток, минуя стадию активации Т-клеточного рецептора (Berridge, 1997; Kumagai et al., 1998a). Согласно литературным данным, при обработке клеток смесью ФБД и ИМ максимум экспрессии мРНК ИЛ-2 (через 3 ч) достигается в 4 раза быстрее, чем при стимуляции одним ФГА (через 12 ч). Однако динамика экспрессии мРНК рецептора ИЛ-2 при активации ФБД совместно с ИМ не отличается от таковой при инкубации клеток с ФГА, а

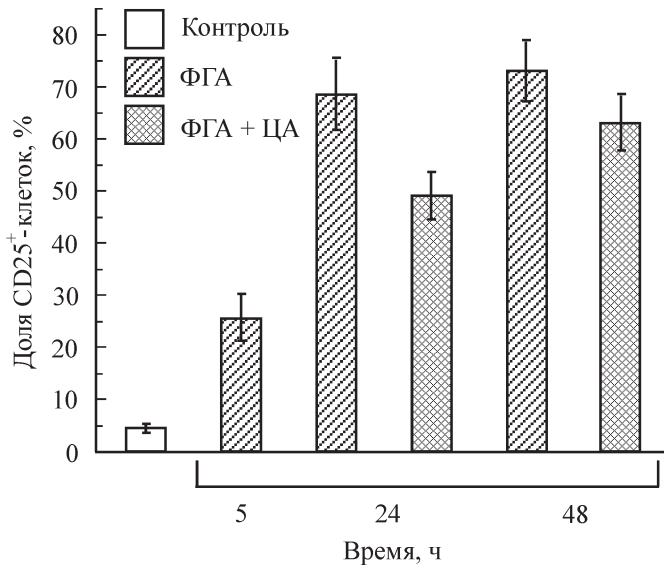


Рис. 3. Влияние иммуносупрессора циклоспорина А (ЦА, 2 мкг/мл) на экспрессию высокоаффинного рецептора ИЛ-2 в лимфоцитах, стимулированных ФГА (10 мкг/мл).

Приведены средние значения ($\bar{x} \pm s_x$) из шести экспериментов.

Fig. 3. Effect of the immunosuppressant cyclosporine A (2 μ g/ml) on the expression of high affinity IL-2 receptor in PHA (10 μ g/ml) stimulated lymphocytes.

The mean values and standard error ($\bar{x} \pm s_x$) for 6 experiments are given.

максимальный уровень наблюдается между 12-м и 48-м ч после стимуляции (Kumagai et al., 1998b; McCrady et al., 1988).

По нашим данным, через 48 ч совместного действия ФДБ (10^{-8} М) и ИМ ($5 \cdot 10^{-7}$ М) доля клеток, находящихся в фазах S, G₂ и М, составляет более 46 % (Марахова и др., 2003).

Как показывает рис. 2, отдельное действие ФДБ или ИМ не вызывает ни пролиферативного ответа, ни фосфорилирования STAT5 (рис. 2, а, дорожки 2, 3). Динамика увеличения степени фосфорилирования сходна с таковой при запуске клеточного цикла под действием ФГА: фосфорилированные формы STAT5 обнаруживали через 5 ч совместного действия ФДБ и ИМ, а максимум фосфорилирования достигается через 24 ч.

Увеличение количества фосфорилированных форм STAT5 по ходу пролиферативного ответа коррелирует с динамикой экспрессии высокоаффинного рецептора ИЛ-2, которую оценивали по количеству CD25⁺-клеток в популяции лимфоцитов на разных сроках стимуляции митогенными агентами (рис. 2, в). Результаты 7 экспериментов показали, что при культивировании лимфоцитов в присутствии ФГА в митогенной концентрации количество CD25⁺-клеток через 5 ч стимуляции составляет 31.0 ± 3.8 %, через 24 ч — 60.8 ± 5.6 , а через 48 ч — 82.9 ± 4.7 %.

Следует заметить, что динамика и уровень пролиферативного ответа зависят не только от способа активации и концентрации митогена, но также от индивидуальных особенностей донора, в частности от его иммунологического статуса. При этом максимальный уровень экспрессии высокоаффинного рецептора может быть достигнут как через 24, так и через 48 ч после добавления митогена к суспензии Т-клеток. Можно заметить, что в случае индивидуального донора, когда темп сборки высокоаффин-

ного рецептора ИЛ-2, по-видимому, превышает средне-статистический (рис. 2, в), степень фосфорилирования STAT5 (рис. 2, а, б) была максимальной через 5 ч культивирования с ФГА и несколько понизилась через 1 сут.

Влияние митогенных агентов на фосфорилирование STAT3. STAT3 вовлечен во множество важнейших клеточных процессов, таких как пролиферация, рост, трансформация клеток и клеточная подвижность. В зависимости от типа клеток он может обладать как апоптотическим, так и антиапоптотическим действием в зависимости от типа клеток и способен активироваться в ответ на действие широкого ряда гормонов, ростовых факторов и цитокинов, в том числе ИЛ-2 (Akira, 2000; Bromberg, Darnell, 2000). В покоящихся лимфоцитах мы, как правило, наблюдали определенный базальный уровень фосфорилирования STAT3, на фоне которого динамика фосфорилирования STAT3 после стимуляции ФГА была менее отчетливо выражена, чем в случае STAT5 (рис. 1, а, б; 2, а, б). При стимуляции клеток смесью ФДБ и ИМ фосфорилирование STAT3 повышалось через 5 ч не только в ответ на действие митогенной смеси, но также и при добавлении в культуральную среду ФДБ и ИМ порознь (рис. 2, а, дорожки 2, 3).

Снижение уровня фосфорилирования STAT5-белков при подавлении пролиферативного ответа лимфоцитов. Подавление пролиферации нормальных лимфоцитов человека достигается добавлением иммуносупрессора циклоспорина А (ЦА). Известно, что механизм действия ЦА заключается в ингибировании Ca²⁺/кальмодулинзависимой серин/треониновой фосфатазы (кальцинейрина), которая индуцирует транслокацию в ядро цитоплазматического компонента NFAT-содержащего комплекса — транскрипционного фактора, отвечающего за синтез ИЛ-2 (Liu et al., 1992; Shaw et al., 1995; Rao et al., 1997). Неполное подавление пролиферативного ответа объясняется существованием ЦА-независимого пути активации NFAT (Ghosh et al., 1996).

Приведенные на рисунках иммуноблоты и диаграммы, отражающие экспрессию высокоаффинного рецептора ИЛ-2 показывают, что ЦА уменьшает степень фосфорилирования как STAT5, так и STAT3 в 1.5—2.0 раза (рис. 1, дорожки 4, б). При этом уровень CD25⁺-клеток снижается не более чем на 20 % (рис. 3).

Динамика фосфорилирования STAT-белков при стимуляции лимфоцитов экзогенным ИЛ-2. Мы исследовали участие транскрипционных факторов STAT в ИЛ-2-регулируемой стадии запуска пролиферативного ответа Т-лимфоцитов в экспериментах, проводимых по следующей схеме: экзогенный ИЛ-2 добавляли к преактивированным «компетентным» лимфоцитам. Показано, что инкубация лимфоцитов периферической крови человека в присутствии субмитогенных концентраций ФГА (0.8—1.0 мкг/мл) приводит к покоящимся лимфоцитам в «компетентное состояние»: добавление экзогенного ИЛ-2 (100 ед./мл) к таким преактивированным клеткам вызывает бласттрансформацию и запускает пролиферативный ответ (Kumagai et al., 1998a; Торопова и др., 2001). На рис. 4, а, б (дорожка 7) видно, что увеличение более чем в 15 раз количества фосфорилированных форм STAT5 наблюдается уже в первые 10 мин стимуляции преактивированных лимфоцитов ИЛ-2. Высокий уровень фосфорилирования поддерживается на протяжении последующих 24 ч. В отличие от STAT5 в «компетентных» лимфоцитах уровень фосфорилирования STAT3, как правило, несколько повышен

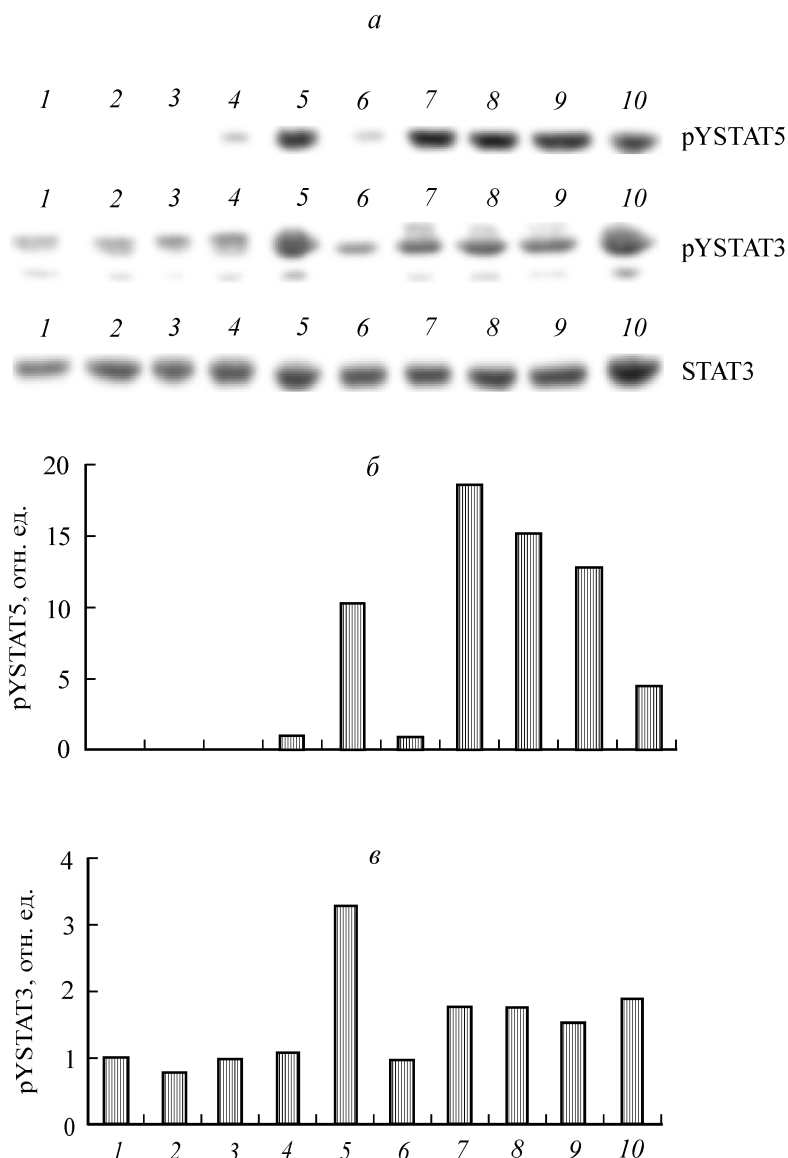


Рис. 4. Изменения уровня фосфорилирования STAT5 (pYSTAT5) и STAT3 (pYSTAT3) по ходу пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных ФГА в митогенной концентрации (10 мкг/мл), и лимфоцитов, преактивированных ФГА в субмитогенной концентрации (0.8 мкг/мл) с последующей стимуляцией экзогенным ИЛ-2 (100 ед./мл).

а — иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов человека. *б, в* — изменения оптической плотности полос, соответствующих фосфорилированным формам STAT5 и STAT3; за единицу принята интенсивность полос, соответствующих степени фосфорилирования STAT5 и STAT3 в покоящихся лимфоцитах; результаты денситометрии скорректированы с учетом ошибки нанесения, рассчитанной после анализа оптической плотности полос, соответствующих тотальному пулу STAT3. *а–в*: 1 — покоящиеся лимфоциты; 2 — ФГА (10 мкг/мл), 1 ч; 3 — ФГА (10 мкг/мл), 5 ч; 4 — ФГА (10 мкг/мл) в присутствии ЦА (2 мкг/мл), 5 ч; 5 — ФГА (10 мкг/мл), 24 ч; 6 — ФГА (0.8 мкг/мл), 24 ч; 7–10 — ФГА (0.8 мкг/мл) в течение 24 ч с последующей стимуляцией ИЛ-2 в течение 10 мин (7), или 30 мин (8), или 1 ч (9), или 24 ч (10).

Fig. 4. Alteration in tyrosine phosphorylation level of STAT5 (pYSTAT5) and STAT3 (pYSTAT3) during proliferation induced by PHA at mitogen concentration (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or exogenous IL-2 stimulation. Freshly isolated lymphocytes were cultivated with PHA at submitogen concentration (0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then activated by exogenous IL-2 (100 U/ml).

а — immunoblot of total lysates; *б, в* — densitometry analyses of bands corresponding to Tyr-phosphorylated STAT5 (pYSTAT5) and STAT3 (pYSTAT3). Optical density of Tyr-phosphorylated STAT5 and Tyr-phosphorylated STAT3 bands in resting lymphocytes was taken for one unit. Densitometry of STAT5 and STAT3 phosphorylation was corrected for the amount of total STAT3 protein. Ratio of Tyr-phosphorylated STAT5 and STAT3 to total STAT3 protein was analyzed by densitometry and plotted on the diagram in arbitrary units. *а–в*: line 1 — control resting lymphocytes; line 2 — PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1 h; line 3 — PHA, 5 h; line 4 — PHA in the presence of cyclosporine A (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5 h; line 5 — PHA, 24 h; line 6 — pre-treatment with PHA (0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 24 h; lines 7–10 — pre-treatment with PHA (0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 24 h with further stimulation by IL-2 during 10 (7), or 30 (8) min, or 1 (9), or 24 (10) h.

по сравнению с покоящимися лимфоцитами, а ИЛ-2 через 10 мин увеличивает степень фосфорилирования STAT3 не более чем в 2.0–2.5 раза (рис. 4, *а, в*). Далее в течение 1 сут высокий уровень фосфорилирования STAT3 в присутствии ИЛ-2 сохраняется. По данным на-

ших исследований, именно экзогенный ИЛ-2 в «компетентных» лимфоцитах индуцирует экспрессию высокоаффинного рецептора ИЛ-2, что обеспечивает вхождение Т-клеток в клеточный цикл и запускает собственно пролиферативный ответ (Марашова и др., 2004).

Известно, что рецептор ИЛ-2 состоит из трех субъединиц: IL-2R α (α -цепь рецептора ИЛ-2), IL-2R β (β -цепь рецептора ИЛ-2) и субъединица γ_c (общая γ -цепь цитокиновых рецепторов). Только в активированных лимфоцитах обнаруживаются высокоаффинные рецепторы, содержащие все три цепи, необходимые для запуска максимального пролиферативного сигнала (Lin, Leonard, 1997, 2000). При этом ген IL-2R α является мишенью для димеров STAT5 (Lin, Leonard, 2000; Buitenhuis et al., 2004). Появление в среде ИЛ-2 (в результате предшествующих этапов активации лимфоцитов) ведет к гетеродимеризации цитоплазматических доменов IL-2R β и γ_c и сборке на мембране рецепторного комплекса со средней аффинностью. Следствием гетеродимеризации является активация сигнальных молекул, ассоциированных с IL-2R β и γ_c , к числу которых относятся и нерецепторные тирозинкиназы, такие как JAK1 и JAK3 (единственная из известных киназ, специфически и конститутивно ассоциированная с проксимальным и дистальным регионами цитоплазматического домена γ_c). Предполагается, что JAK1 (ассоциированная с проксимальным регионом цитоплазматического домена IL-2R β) вовлечена главным образом в фосфорилирование тирозиновых остатков в докинг-сайтах для STAT5 на IL-2R β -цепи, в то время как JAK3 необходима для фосфорилирования Tyr-694 STAT5 α и Tyr-699 STAT5 β в их SH2-доменах (Lin, Leonard, 2000). Фосфорилированные STAT-белки высвобождаются из докинг-сайтов рецептора ИЛ-2, димеризуются и приобретают способность к транслокации в ядро (Lin, Leonard, 1997, 2000; Bromberg, Darnell, 2000; Imbert et al., 2002; Tkaczuk et al., 2002; Benczik, Gaffen, 2004; Buitenhuis et al., 2004).

Можно предположить, что при стимуляции лимфоцитов по нашим схемам повышение уровня фосфорилирования транскрипционных факторов STAT предшествует экспрессии высокоаффинного рецептора ИЛ-2 и сопряжено с его дальнейшей активацией. Существенно, что в «компетентных» лимфоцитах ИЛ-2-зависимая активация STAT5 выражена значительно по сравнению со STAT3. Таким образом, резкое увеличение фосфорилированных форм STAT5 может служить маркером вхождения Т-клеток в стадию пролиферации, обусловленную ИЛ-2, независимо от способа их активации.

Список литературы

- Марахова И. И., Виноградова Т. А., Карицкая И. А., Епифанцева И. В., Аксенов Н. Д., Зенин В. В. 2004. Регулируемая экспрессия Na⁺, K⁺-насоса при активации лимфоцитов человека. Биол. мембраны. 21 (5) : 406—415.
- Марахова И. И., Карицкая И. А., Виноградова Т. А., Аксенов Н. Д., Мошков А. В., Хайдукова А. Л. 2003. Изменение транспортной активности натриевого насоса и уровня экспрессии Na⁺, K⁺-АТФазы в активированных лимфоцитах человека. Цитология. 45 (11) : 1149—1157.
- Никольский Н. Н., Васilenko К. П. 2000. STAT-путь внутриклеточной сигнализации. Журн. эволюц. биохим. физиол. 36 (6) : 504—508.
- 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.
- Akira Sh. 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. Oncogene. 19 : 2607—2611.
- Benczik M., Gaffen S. L. 2004. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. Immunol. Invest. 33 : 109—142.
- 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.
- Bromberg J., Darnell J. E., Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. Oncogene. 19 : 2468—2473.
- Buitenhuis M., Coffey P. J., Koenderman L. 2004. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 : 2120—2124.
- Darnell J. E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. Science. 277 : 1630—1635.
- Frank D., Robertson M. J., Bonni A., Ritz J., Greenberg M. E. 1995. Interleukin 2 signalling involves the phosphorylation of Stat proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 7779—7783.
- Fulop T., Jr., Douzich N., Goulet A-Ch., Desgeorges S., Lin-teau A., Lacombe G., Dupuis G. 2001. Cyclodextrin modulation of T lymphocyte signal transduction with aging. Mech. Ageing Develop. 122 : 1413—1430.
- Fung M. M., Rohwer F., McGuire K. L. 2003. IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. Cellular Signalling. 15 : 625—636.
- Ghosh A., Sica A., Cipetelli M., Subleski J., Lahesmaa R., Young H. A., Rice N. R. 1996. Activation of nuclear factor of activated T cells in a cyclosporine A-resistant pathway. J. Biol. Chem. 271 : 7700—7704.
- Imbert V., Rezzonico R., Reichenbach P., Nabholz M. 2002. Induction of interleukin-2 receptor α (IL-2R α) expression by interleukin-2: important role of the interleukin-2 receptor β chain region between the two Stat5 docking sites. Eur. Cytokine Netw. 13 : 331—339.
- Kumagai N., Benedict S. N., Mills G. B., Gelfand E. W. 1988a. Induction of competence and progression signals in human T lymphocytes by phorbol esters and calcium ionophores. J. Cell. Physiol. 137 : 329—336.
- Kumagai N., Benedict S. N., Mills G. B., Gelfand E. W. 1988b. Comparison of phorbol ester/calcium ionophore and phytohemagglutinin-induced signaling in human T lymphocytes. Demonstration of interleukin 2-independent transferrin receptor gene expression. J. Immunol. 140 : 37—43.
- Lin J.-X., Leonard W. J. 1997. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. Cytokine Growth Factor Rev. 7 : 313—332.
- Lin J.-X., Leonard W. J. 2000. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. Oncogene. 19 : 2566—2576.
- Liu J., Farmer J. D., Lane W. S., Friedman J., Weissman I., Schreiber S. L. 1992. Calcineurin is a common target of cyclophilin—cyclosporin A and FKBR—FK506 complex. Cell. 66 : 807—815.
- McCrary C. W., Ely C. M., Westin E., Carchman R. A. 1988. Coordination and reversibility of signals for proliferative activation and interleukin-2mRNA production in resting human T lymphocytes by phorbol ester and calcium ionophore. J. Biol. Chem. 263 : 18 537—18 544.
- Moriggl R., Topham D. J., Teglund S., Sxcl V., McKay C., Wang D., Hoffmeyer A., van Deursen J., Sangster M. Y., Bunting K. D., Grosveld G. C., Ihle J. N. 1999. Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signaling in peripheral T cells. Immunity. 11 : 225—230.
- Nagy Z. S., Wang Y., Erwin-Cohen R. A., Aradi J., Monia B., Wang L. H., Stepkovski S. M., Rui H., Kirken R. A. 2002. Interleukin-2 family cytokines stimulate phosphorylation of the Pro-Ser-Pro motif of Stat5 transcription factors in human T cells: resistance to suppression of multiple serine kinase pathways. J. Leukocyte Biol. 72 : 819—828.
- Rao A., Luo C., Hogan P. G. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu. Rev. Immunol. 15 : 707—747.
- Shaw K. T. Y., Ho A. M., Raghavan A., Kim J., Jain J. N., Park J. C., Sharma S., Rao A., Hogan P. G. 1995. Immunosuppressive

drugs prevent a rapid dephosphorylation factor NFAT1 in stimulated immune cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 11 205—11 208.

Takeda K., Kaisho Ts., Yoshida N., Takeda J., Kishimoto T., Akira Sh. 1998. Stat3 activation is responsible for IL6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. J. Immunol. 161 : 4652—4660.

Tkaczuk J., Yu C. L., Baksh S., Milford E. L., Carpenter C. B., Burakoff S. J., McKay D. B. 2002. Effect of anti-IL-2Ralpha antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling. Amer. J. Transplant. 2 : 31—40.

Xue H., Fink D. W., Zhang J. X., Qin J., Turck C. W., Leonard W. J. 2002. Serine phosphorylation of Stat5 proteins in lymphocytes stimulated with IL-2. Int. Immunol. 14 : 1263—1271.

Поступила 26 VI 2005

ACTIVATION OF TRANSCRIPTIONAL FACTORS STAT5 AND STAT3
DURING HUMAN T-LYMPHOCYTE PROLIFERATION INDUCED
BY DIFFERENT MITOGENIC STIMULI

I. A. Karitskaya,¹ N. D. Aksenov, V. V. Zenin, A. L. Khaidukova, I. I. Marakhova

Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg; ¹e-mail: inkar74@mail.ru

The activation of closely related transcription factors STAT5 α and STAT5 β is one of the key signalling events during interleukin-2-dependent stage of T-lymphocyte proliferation. Here, we investigate the activation of STAT5 and STAT3 family proteins on different stages of T-cell proliferative response to various mitogenic stimuli. The activation of STAT proteins was estimated according to their tyrosine phosphorylation. Isolated peripheral blood lymphocytes were stimulated by phytohemagglutinin (PHA), or by phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) with calcium ionophore — ionomycin, or by exogenous interleukin-2 (IL-2). After activation of T-cells by PHA as well as by PDBu with ionomycin we observed phosphorylation of STAT5 not earlier than in 5 h. The maximum phosphorylation (by 10 times and more, as compared to control resting lymphocytes) was detected following 24 h of mitogen stimulation. In the lymphocytes pretreated by PHA in submitogenic concentration, exogenous IL-2 induces a proliferative response. High phosphorylation level of STAT5 was determined 10 min after addition of IL-2 and kept for the next 24 h. In contrast to STAT5, some basal phosphorylation of STAT3 was found in resting and PHA-pretreated T-cells. The profile of phosphorylation STAT3 during mitogen-induced activation is more leveled. An immunosuppressant cyclosporine A taken at antiproliferative concentration decreased phosphorylation of both STAT5 and STAT3 by 1.5—2.0 times at early stages, as well as at late stages of activation. A correlation between alteration in tyrosine phosphorylation level of STAT5 and the expression of the high affinity IL-5 receptor was established. Taken together, we report that the increased STAT5 phosphorylation can serve as a marker of T-lymphocyte entrance into IL-2-dependent stage of proliferation after T-cell activation by different mitogens.