

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ CD25 В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, СТИМУЛИРОВАННЫХ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНОМ ИЛИ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-2

© В. В. Зенин, Н. Д. Аксенов, А. Н. Шатрова, И. И. Марахова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

¹ электронный адрес: iim@mail.cytspb.rssi.ru

Динамика экспрессии высокоаффинного рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2) исследована методом проточной цитофлуориметрии по изменению численности клеток, экспонирующих маркер CD25. Объектом служили лимфоциты периферической крови человека. Показано, что в культуре покоящихся лимфоцитов фитогемагглютинин (ФГА, 10 мкг/мл) или сочетание форболового эфира (10^{-8} М) и иономицина ($5 \cdot 10^{-7}$ М) вызывает делящееся в течение 48 ч нарастание числа клеток, несущих маркер CD25 (клетки CD25+). Установлено, что только в компетентных (но не в покоящихся) лимфоцитах, предварительно обработанных в течение 1 сут немитогенными концентрациями ФГА (до 1 мкг/мл), ИЛ-2 способен индуцировать экспрессию CD25. Сопоставление динамики численности CD25+-клеток и бласттрансформации показало, что на поверхности стимулированных лимфоцитов CD25 выявляется еще на мелких клетках, а на поздних сроках активации, соответствующих стадии роста клеток и переходу к синтезу ДНК, подавляющее большинство blastов являются CD25+-клетками и обладают высокоаффинным рецептором ИЛ-2, в составе которого присутствует α -субъединица. Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что экспрессия α -субъединицы рецептора ИЛ-2 приурочена к ИЛ-2-зависимой стадии ответа Т-лимфоцитов и может индуцироваться непосредственно через рецептор ИЛ-2 с участием ИЛ-2.

Ключевые слова: лимфоциты человека, интерлейкин-2, рецептор интерлейкина-2, α -субъединица рецептора ИЛ-2, CD25.

Принятые сокращения: ИЛ-2 — интерлейкин-2, ИМ — иономицин, ФДБ — форбол-12, 13-дибутириловый эфир, ФГА — фитогемагглютинин, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Запуск пролиферативного ответа Т-лимфоцитов — многокаскадный процесс, в котором ключевую роль играет экспрессия Т-клеточного ростового фактора интерлейкина-2 (ИЛ-2) и его рецептора (Berridge, 1997; Lin, Weiss, 2001). В нормальных покоящихся лимфоцитах крови человека рецептор ИЛ-2 является димером, он состоит из субъединиц β и γ_c , способен к проведению сигнала, который индуцируется после связывания ИЛ-2, но обладает низким сродством к ИЛ-2 (Leonard, Lin, 2000; Gaffen, 2001; Lindenmann et al., 2003). В процессе активации антигеном в Т-клетках формируется гетеродимерный комплекс, в состав которого кроме β -цепи (CD122) и γ_c -цепи (CD132) входит α -цепь (CD25) (Waldmann, 1994; Gaffen, 2001; Eicher et al., 2002). Появление этой субъединицы в составе $\beta\gamma_c$ рецептора ИЛ-2 нормальных лимфоцитов человека приводит к возрастанию сродства рецептора к ИЛ-2 на два порядка, и именно взаимодействие ИЛ-2 с высокоаффинным рецептором ИЛ-2 в Т-лимфоцитах человека является тем ключевым моментом, который обеспечивает запуск сигнальных событий, непосредственно регулирующих вступление покоящихся Т-лимфоцитов в клеточный цикл (Leonard, Lin, 2000; Ellery, Nicholls, 2002a; Benczik, Gaffen, 2004). С нарушением механизмов, контролирующих экспрессию α -субъединицы в Т-лимфоцитах, связано развитие ряда аутоиммунных заболеваний,

а антитела против α -субъединицы рецептора применяются при лечении онкологических заболеваний крови человека (Tkaczuka et al., 2002; Koon et al., 2006; Waldmann, 2007; Morris et al., 2008).

Экспрессия α -цепи рецептора ИЛ-2 интенсивно исследуется на уровне транскрипции. В гене α -субъединицы выявлено несколько (до 6) регуляторных элементов (Kim, Leonard, 2002). На основании детальных исследований на постоянных линиях Т-клеток мышей сделан вывод о том, что экспрессия α -белка может запускаться как антигеном через Т-клеточный рецептор, так и цитокином через рецептор ИЛ-2 (Imbert et al., 2002). Действительно, в индукцию экспрессии этой субъединицы оказываются вовлеченными такие сигнальные белки, как AP-1, NF- κ B, NFAT, которые участвуют в передаче сигнала на первой, антигензависимой, стадии активации Т-клетки и которые причастны к индукции экспрессии в клетках ИЛ-2, далее секретируемого в среду. Вопрос же о прямой роли экзогенного ИЛ-2 в запуске экспрессии α -субъединицы в лимфоцитах человека не решен.

Об участии ИЛ-2 в экспрессии α -субъединицы рецептора ИЛ-2 свидетельствуют данные, полученные в последнее время на регуляторных Т-клетках крови человека (CD4+/CD25+/Foxp), которые не запускаются экзогенным ИЛ-2 в клеточный цикл и не пролиферируют в ответ на

ИЛ-2 (Nelson, 2004; Burchill et al., 2007; Yao et al., 2007; Passerine et al., 2008). Обнаружено, что при дифференцировке этих клеток в тимусе ключевую роль в экспрессии CD25 играют ИЛ-2 и запускаемый через рецептор ИЛ-2 сигнальный путь JAK/STAT (Bensinger et al., 2004; Zorn et al., 2006; Lockyer et al., 2007). В связи с анализом механизмов, контролирующих запуск экспрессии α -субъединицы, привлекают внимание также данные, которые свидетельствуют о существовании связи между экспрессией в Т-клетках собственного ростового фактора ИЛ-2 и α -цепи рецептора для ИЛ-2 (Ellery, Nicholls, 2002b). Цель данной работы — охарактеризовать динамику экспрессии α -субъединицы рецептора ИЛ-2 в нормальных лимфоцитах человека, оценивая методом проточной цитофлуориметрии изменение численности клеток, экспонирующих на поверхности маркер CD25. Применяя митогенные факторы, запускающие пролиферативный ответ с Т-клеточного рецептора или с рецептора ИЛ-2, мы получили данные, свидетельствующие о том, что экспрессия CD25 приурочена к ИЛ-2-зависимой стадии ответа Т-лимфоцитов и может индуцироваться непосредственно через рецептор ИЛ-2 с участием ИЛ-2.

Материал и методика

Выделение и культивирование лимфоцитов. Использовали лимфоциты периферической крови человека. Лимфоциты выделяли по общепринятой схеме (Woum, 1968) из свежей донорской крови. Лейкоцитарную фракцию отбирали после осаждения эритроцитов добавлением в кровь 6%-го раствора декстрана (T500). Суспензию лейкоцитов (по 8 мл) наслаивали на 3 мл гистопак-1 и центрифугировали в течение 30 мин при 600 g. После центрифугирования интерфазу переносили в пробирки объемом сначала 50 мл, а затем 10 и 3—4 раза промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) следующего состава (в mM): NaCl — 137, KCl — 2.7, Na₂HPO₄ — 8, KH₂PO₄ — 1.5. Для удаления макрофагов клеточную суспензию разбавляли средой RPMI, содержащей 10 % сыворотки человека, и помещали в пластиковые матрицы на 40 мин при 37 °C в атмосферу 5 % CO₂. Полученную суспензию лимфоцитов разливали во флаконы по 20—40 мл с концентрацией клеток 2 млн/мл, а на следующие сутки суспензию переносили в пенициллиновые флаконы по 1.5 мл (для последующих измерений пролиферативного ответа и экспрессии CD25) и стимулировали соответствующими митогенами.

Оценка экспрессии CD25. Лимфоциты метили FITC-конъюгированными антителами против CD25 в течение 30 мин в PBS при комнатной температуре. Проточную цитофлуориметрию проводили, используя цитофлуориметр Epics XL (Beckman Coulter), снабженный аргоновым лазером 488 нм. На линейной цитограмме FS/SS (прямое светорассеяние против бокового) выделяли популяцию лимфоцитов (включая бласттрансформированные) в отдельную зону. Изменения размера субпопуляции Т-хелперных лимфоцитов (CD4+) и уровня экспрессии рецепторов к интерлейкину-2 (CD25+) оценивали по перераспределению проанализированных клеток, выделенных в зоне лимфоцитов. Число проанализированных лимфоцитов было не менее 10⁴. Исследовали распределения logCD25/FS, log CD4/FS и logCD25/CD4. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии со стандартным протоколом обработки данных EpicsXL.

Оценка пролиферативного ответа лимфоцитов. Для оценки уровня пролиферации в культуре активированных лимфоцитов использовали метод проточной ДНК-цитометрии. Перед измерением клетки инкубировали 30 мин в PBS, содержащем 0.02 % сапонина. После отмывки от сапонина клетки окрашивали в растворе PBS, содержащем 50 мкг/мл иодида пропидия и 250 мкг/мл рибонуклеазы (30—40 мин, 37 °C). Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на двухлазерном проточном цитометре-сортировщике АТС 3000 (Bruckner) при скорости анализа 1000 клеток в 1 с. Численную обработку гистограмм и определение долей клеток, соответствующих по количеству ДНК фазам цикла (G₀/G₁, S и G₂+M), проводили согласно модели Дина (Dean, 1985).

В работе использовали следующие реактивы: ФГА, убаин, иономицин, форбол-12,13-дибутириловый эфир, гистопак-1.077, сапонин, бромистый этидий, иодид пропидия (Sigma, США), РНКазу (Serva, Германия), декстран T500 (Pharmacia, Швеция), рекомбинантный ИЛ-2 (Биотех, Санкт-Петербург), FITC-окрашенные антитела против CD25 (Coltag Labor), среду RPMI (Биолот, Россия), а также реактивы отечественного производства квалификации «хч» или «осч». Растворы ФГА (1 мг/мл) готовили на 0.14 M NaCl, растворы иономицина (ИМ, 2 mM), форбол-12,13-дибутирилового эфира (ФДБ, 2 mM) — на диметилсульфоксиде, концентрация которого в тестируемых растворах с клетками не превышала 0.05 %.

Результаты и обсуждение

Присутствие в культуре лимфоцитов периферической крови человека клеток, несущих маркер CD25 (клетки CD25+), свидетельствует о том, что в поверхностной мембране лимфоцитов экспонирована α -субъединица рецептора ИЛ-2. В популяции лимфоцитов, изолированных из крови здоровых доноров, доля клеток, несущих маркер CD25, составляет не более 1—5 %. Как видно на цитограммах, полученных на лимфоцитах, меченных антителами против CD25 (рис. 1, а), внесение в культуру покоящихся лимфоцитов ФГА в митогенной концентрации (10 мкг/мл) увеличивает численность клеток, экспонирующих на поверхности маркер CD25. Существенное возрастание числа клеток CD25+ (до 20 %) выявляется к 5-му ч действия ФГА, через 1 сут доля таких клеток составляет не менее 60 % и к 48-му ч в популяции стимулированных ФГА лимфоцитов доля клеток CD25+ вырастает до 81.5 ± 3.2 % (рис. 1, б, столбцы 1). Из этих данных следует, что в нормальных лимфоцитах человека экспрессия α -субъединицы и процесс появления ее на поверхности клеток являются долговременными, так что лишь к концу 2-х сут ФГА-индуцированной активации Т-лимфоциты обладают полноценным рецептором ИЛ-2, который кроме β - и γ -субъединиц имеет в своем составе и α -субъединицу.

Сочетание форболового эфира и кальциевого ионофора используется в экспериментах для запуска пролиферативного ответа лимфоцитов человека. Минутный рецептор плазматической мембраны, эти агенты включают в покоящихся Т-клетках два главных внутриклеточных сигнальных тракта — кальциевый сигнал и протеинкиназу С, которые играют ключевую роль в активации транскрипционного фактора NFAT и в экспрессии как ростового фактора ИЛ-2, так и его рецептора (Crab-

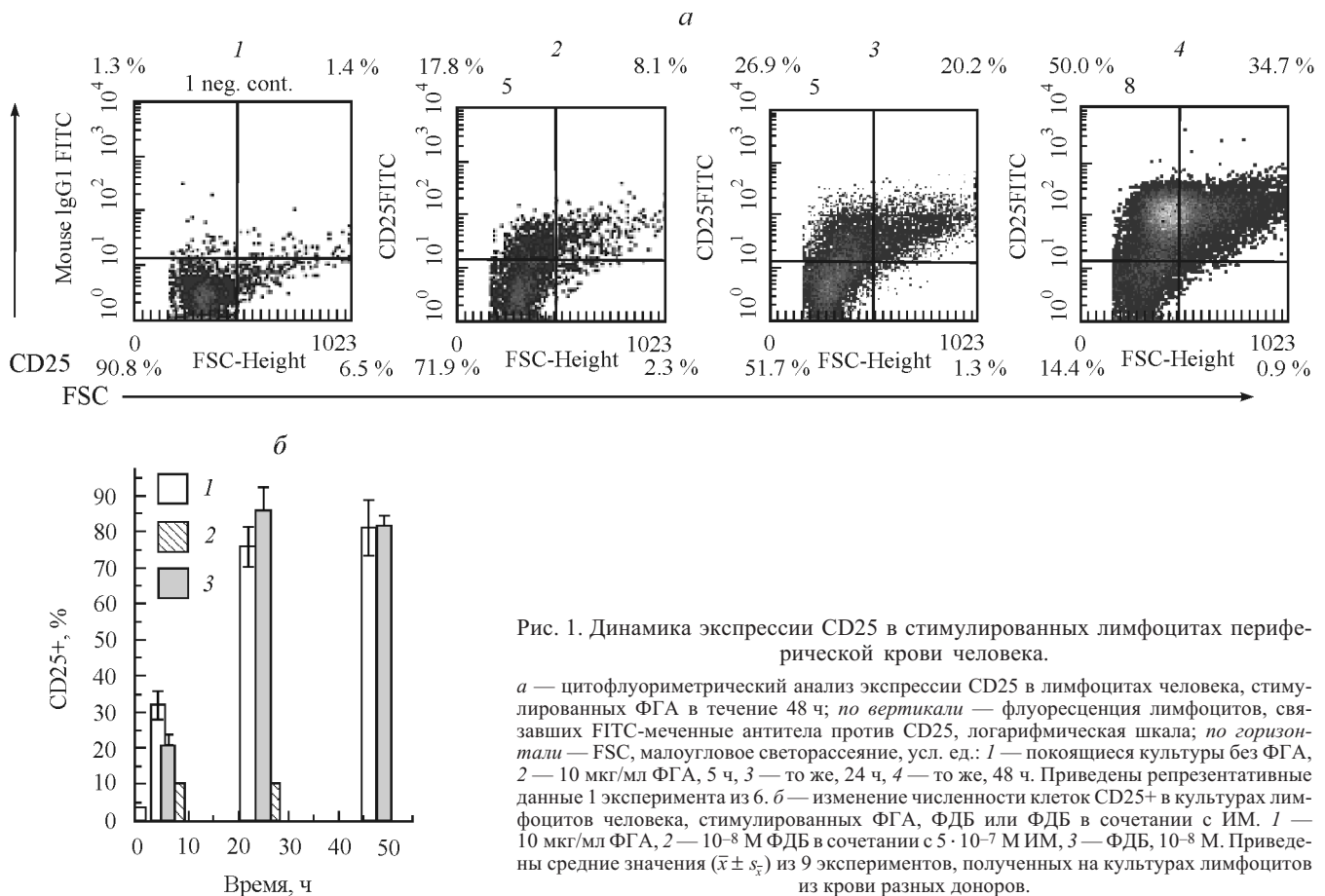


Рис. 1. Динамика экспрессии CD25 в стимулированных лимфоцитах периферической крови человека.

а — цитофлуориметрический анализ экспрессии CD25 в лимфоцитах человека, стимулированных ФГА в течение 48 ч; по вертикали — флуоресценция лимфоцитов, связавших FITC-меченные антитела против CD25, логарифмическая шкала; по горизонтали — FSC, малоугловое светорассеяние, усл. ед.: 1 — покоящиеся культуры без ФГА, 2 — 10 мкг/мл ФГА, 5 ч, 3 — то же, 24 ч, 4 — то же, 48 ч. Приведены репрезентативные данные 1 эксперимента из 6. *б* — изменение численности клеток CD25⁺ в культурах лимфоцитов человека, стимулированных ФГА, ФДБ или ФДБ в сочетании с ИМ. 1 — 10 мкг/мл ФГА, 2 — 10⁻⁸ М ФДБ в сочетании с 5 · 10⁻⁷ М ИМ, 3 — ФДБ, 10⁻⁸ М. Приведены средние значения ($\bar{x} \pm s_x$) из 9 экспериментов, полученных на культурах лимфоцитов из крови разных доноров.

tree, Clipstone, 1994; Berridge, 1997). При стимуляции лимфоцитов ФДБ (10⁻⁸ М) в сочетании с ИМ (5 · 10⁻⁷ М) число CD25⁺-клеток в культуре лимфоцитов нарастает во времени и динамика экспрессии CD25 сходна с динамикой численности CD25⁺-клеток при ФГА-индуцированной стимуляции (рис. 1, *б*, столбцы 2). ФДБ в концентрации 10⁻⁸ М, внесенный в культуру покоящихся лимфоцитов без ИМ, в течение 1 сут практически не влияет на численность клеток, несущих маркер CD25 (рис. 1, *б*, столбцы 3).

Характерный признак успешной активации лимфоцитов, финальным событием которой является пролиферативный ответ, — увеличение размеров клеток и превращение мелких покоящихся Т-клеток в крупные клетки — бласты. По нашим данным, в течение 2 сут диаметр нормального Т-лимфоцита крови человека, стимулированного ФГА, увеличивается с 7.6 ± 0.3 до 12.9 ± 0.8 мкм, что соответствует более чем двукратному увеличению объема клетки (Marakhova et al., 2005). Цитограммы, получаемые в результате измерений флуоресценции клеток, окрашенными FITC-мечеными антителами против CD25, позволяют проследить динамику перехода мелких покоящихся лимфоцитов в бласты и охарактеризовать процесс экспрессии CD25 на поверхности Т-клеток по ходу бласттрансформации. Как показывает рис. 2, через 1 сут после добавления в культуру лимфоцитов ФГА доля крупных клеток составляет около 68 % и к 48-му ч стимуляции крупные клетки образуют основную часть клеточной популяции (до 75—80 %), при этом численность популяции мелких клеток снижается параллельно с увеличением доли крупных клеток в культуре. В стиму-

лированных ФГА лимфоцитах в 1-е ч количество FITC-меченных CD25-маркеров растет как на мелких, так и на крупных клетках, однако после 16—20-го ч численность мелких клеток CD25⁺ снижается и к 48-му ч пул мелких CD25⁺-клеток составляет не более 5 %, а подавляющее большинство клеток (до 92.5 %), экспонирующих маркер CD25, — это крупные клетки. Такой характер динамики клеток CD25⁺ свидетельствует в пользу того, что экспрессия α -субъединицы рецептора ИЛ-2 запускается в лимфоцитах, которые еще не вступили в фазу роста, т. е. предшествует бласттрансформации.

Для понимания механизма индукции α -субъединицы рецептора ИЛ-2 и исследования сигнальных процессов, контролирующих ее экспрессию, важно выделить ту стадию в многоступенчатом процессе активации нормальных Т-лимфоцитов, на которой на поверхности клеток начинает появляться маркер CD25. Данные литературы и наши наблюдения свидетельствуют о том, что нормальные, выделенные из крови здоровых доноров лимфоциты не отвечают на экзогенный ИЛ-2 запуском пролиферации (Kumagai et al., 1988; Marakhova et al., 2005). ИЛ-2 запускает пролиферативный ответ только в «компетентных» лимфоцитах, т. е. в таких лимфоцитах, которые до стимуляции экзогенным ИЛ-2 инкубировали не менее 18—20 ч в среде, содержащей неимитогенные концентрации ФГА (не более 1 мкг/мл) или ФДБ (10⁻⁸ М). Следует заметить, что природа состояния «компетентности» до настоящего времени не раскрыта и механизмы, которые обеспечивают способность преактивированных клеток отвечать на ИЛ-2, не идентифицированы. Вместе с тем эта схема активации лимфоцитов человека широко используется при

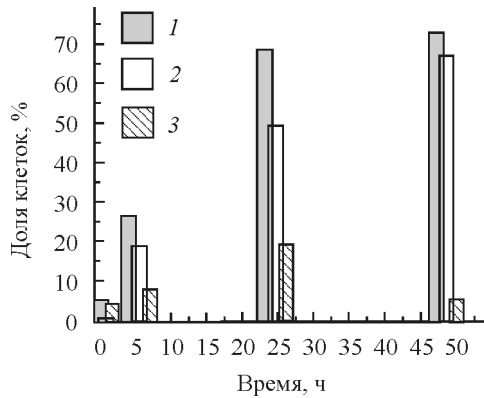


Рис. 2. Динамика появления маркера CD25 на мелких и крупных клетках культуры лимфоцитов человека, стимулированной ФГА.

1 — общая доля клеток CD25+, 2 и 3 — соответственно доля крупных и мелких клеток CD25+. Приведены репрезентативные данные 1 эксперимента из 7.

исследовании сигнальных событий, инициируемых в клетках с участием ИЛ-2 и его рецептора.

На рис. 3 представлены данные, характеризующие динамику экспрессии CD25 при запуске пролиферации в культуре компетентных лимфоцитов экзогенным ИЛ-2 (150 ед./мл). В популяции компетентных лимфоцитов доля клеток CD25+ увеличивается с 1—2 до 2—8 %, что указывает на возрастание числа клеток, экспонирующих α -цепь рецептора ИЛ-2 (рис. 3, столбцы 2). Вместе с тем основная часть популяции лимфоцитов, которые обрабатывали в течение 1 сут немитогенными концентрациями ФГА, не экспрессируют CD25 и являются клетками CD25-. После внесения в культуру компетентных лимфоцитов ИЛ-2 количество CD25+-клеток начинает нарастать уже через 3—5 ч, постепенно увеличивается в течение следующих 24 ч, и к концу 2-х сут стимуляции их доля в культуре составляет более 70 %. Максимальное количество CD25+-клеток в присутствии ИЛ-2 и ФГА, наблюдаемое к 48-му ч стимуляции, оказывается практически одинаковым. Через 48 ч в ИЛ-2-индуцированных культурах подавляющее большинство клеток CD25+ становятся бластами (рис. 3, столбцы 4). Своевременно отметить, что в культурах покоящихся лимфоцитов крови человека ИЛ-2 (150—250 ед./мл) в течение 1 сут не увеличивает численность клеток CD25+ (рис. 3, столбцы 3). Результаты экспериментов, выполненных на компетентных лимфоцитах, которые стимулировали экзогенным ИЛ-2, свидетельствуют о том, что экспрессия α -субъединицы рецептора развивается во времени, носит длящийся характер и приурочена к ИЛ-2-зависимой стадии ответа Т-лимфоцитов.

Транскрипционная регуляция гена α -субъединицы рецептора ИЛ-2 в Т-лимфоцитах интенсивно изучается. В гене α -субъединицы имеется несколько (до 6) регуляторных элементов, и в индукцию экспрессии этой субъединицы вовлечены такие сигнальные белки, как AP-1, NF- κ B, NFAT, которые активируются на первой, антиген-зависимой, стадии запуска ответа Т-клеток и которые имеют прямое отношение к экспрессии собственного ростового фактора Т-клеток (ИЛ-2) и его высокоаффинного рецептора (Kim, Leonard, 2002). Предполагается, что экспрессия α -субъединицы рецептора ИЛ-2 может индуцироваться как антигеном через Т-клеточный рецептор, так и цитокином через рецептор ИЛ-2.

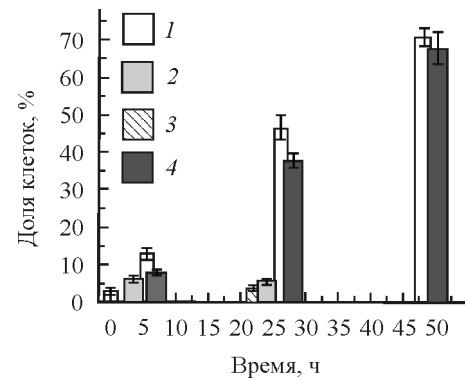


Рис. 3. Изменение численности клеток CD25+ в культуре покоящихся и компетентных лимфоцитов периферической крови человека, стимулированных ИЛ-2.

1 — лимфоциты, проинкубированные в течение 20 ч с 1 мкг/мл ФГА (компетентные лимфоциты) и далее стимулированные ИЛ-2 (150 ед./мл); 2 — ФГА, 1 мкг/мл; 3 — покоящиеся лимфоциты с ИЛ-2 (150 ед./мл); 4 — доля крупных клеток CD25+ в культуре компетентных лимфоцитов, стимулированных ИЛ-2 (1). Приведены средние значения ($\bar{x} \pm s_x$) из 5 экспериментов.

Следует отметить, что представление о регуляции экспрессии α -субъединицы рецептора ИЛ-2 сформировалось на основе анализа данных, полученных с использованием молекулярно-биологических подходов, которые дают возможность диссекции отдельных элементов сигнальных путей и устанавливают участие этих элементов в регуляции. Значительная часть данных получена на Т-клетках, стимулированных через Т-рецептор, или на постоянных линиях Т-клеток мышей. Известно, однако, что эти клетки отличаются от нормальных, покоящихся лимфоцитов крови человека по уровню экспрессии сигнальных молекул, таких как c-myc, c-ras и др. (Crabtree, 1999). Вместе с тем сведений о том, как функционируют сигнальные элементы в нативной клетке, крайне мало, и механизм кооперации сигнальных событий, запускаемых в клетке через Т-клеточный рецептор и через рецептор ИЛ-2, остается невыясненным. В отношении α -субъединицы рецептора ИЛ-2 принципиально установить роль Т-рецептора и рецептора ИЛ-2 в индукции экспрессии. Встает вопрос: не является ли ключевым событием для запуска экспрессии α -белка взаимодействие ИЛ-2 с его рецептором, а причастность таких белков, как NF- κ B, NFAT, которые характерны для первой, TCR-индуцированной, стадии активации, обусловлена тем, что в нативной клетке они участвуют в экспрессии собственного ростового фактора Т-клеток, каким является ИЛ-2? Результаты, полученные в настоящем исследовании при сопоставлении динамики CD25+-клеток в культурах Т-лимфоцитов человека, стимулированных разными митогенами и с разных точек активационного процесса, позволяют выдвинуть предположение о том, что на начальных этапах активации Т-клеток запуск экспрессии α -субъединицы должен осуществляться с «неполноценного», $\beta\gamma$ -рецептора, который не имеет в составе α -субъединицы и характеризуется низким сродством к ИЛ-2. Для подтверждения выдвинутого предположения необходимо выяснить возможность индукции мРНК α -белка с $\beta\gamma$ -рецептора ИЛ-2 в нормальных покоящихся Т-лимфоцитах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект

06-04-48445-а, 09-04-00492-а), программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-774.2008.4) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

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.

Bensinger S. J., Walsh P. T., Zhang J., Carroll M., Parsons R., Rathmell J. C., Thompson C. B., Burchill M. A., Farrar M. A., Turka L. A. 2004. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 172 : 5287—5296.

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.

Burchill M. A., Yang J., Vang K. B., Farrar M. A. 2007. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol. Lett.* 114 : 1—8.

Crabtree G. R. 1999. Generic signals and specific outcomes: signalling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell.* 96 : 611—614.

Crabtree G. R., Clipstone N. A. 1994. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 63 : 1045—1083.

Eicher D. M., Damjanovich S., Waldmann T. A. 2002. Oligomerization of IL-2R α . *Cytokine.* 17 : 82—90.

Ellery J. M., Kempshall S. J., Nicholls P. J. 2000. Activation of the interleukin 2 receptor: a possible role for tyrosine phosphatases. *Cell. Signal.* 12 : 367—373.

Ellery J. M., Nicholls P. J. 2002a. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunol. Cell Biol.* 80 : 351—359.

Ellery J. M., Nicholls P. J. 2002b. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13 : 27—40.

Gaffen S. L. 2001. Signaling domains of the interleukin-2 receptor. *Cytokine.* 14 : 63—77.

Imbert V., Rezzonico R., Reichenbach P., Nabholz M. 2002. Induction of interleukin-2 receptor alpha (IL-2R α) expression by interleukin-2: important role of the interleukin-2 receptor beta chain region between the two Stat5 docking sites. *Eur. Cytokine Netw.* 13 : 331—339.

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.

Koon H. B., Severy P., Hagg D. S., Butler K., Hill T., Jones A. G., Waldmann T. A., Junghans R. P. 2006. Antileukemic ef-

fect of daclizumab in CD25 high-expressing leukemias and impact of tumor burden on antibody dosing. *Leuk. Res.* 30 : 190—203.

Kumagai N., Benedict S. H., Mills G. B., Gelfand E. M. 1988. Comparison of phorbol ester/calcium ionophore and phytohemagglutinin-induced signalling in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 140 : 37—43.

Leonard W. J., Lin J. X. 2000. Cytokine receptor signaling pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 : 877—888.

Lin J., Weiss A. 2001. T cell receptor signaling. *J. Cell Sci.* 114 : 243—244.

Lindenmann M. J., Benczik M., Gaffen S. L. 2003. Anti-apoptotic signaling by the interleukin-2 receptor reveals a function for cytoplasmic tyrosine residues within the common γ (γ_c) receptor subunit. *J. Biol. Chem.* 278 : 10239—10249.

Lockyer H. M., Tran E., Nelson B. H. 2007. STAT5 is essential for Akt/p70S6 kinase activity during IL-2-induced lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 179 : 5301—5308.

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 Lett.* 579 : 2773—2780.

Nelson B. H. 2004. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J. Immunol.* 172 : 3983—3988.

Passerini L., Allan S. E., Battaglia M., Di Nunzio S., Alstad A. N., Levings M. K., Roncarolo M. G., Bacchetta R. 2008. STAT5-signalling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- effector T cells. *Int. Immunol.* 20 : 421—431.

Morris J. C., Waldmann T. A., Janik J. E. 2008. Receptor-directed therapy of T-cell leukemias and lymphomas. *J. Immunotoxicol.* 5 : 235—248.

Tkaczuka J., Yua C. L., Baksha S., Milford E. L., Carpen-terb C. B., Burakoff S. J., McKaya D. B. 2002. Effect of anti-IL-2R α antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling. *Amer. J. Transplantation.* 2 : 31—40.

Waldmann T. A. 1994. The interleukin-2 receptor. *J. Biol. Chem.* 266 : 2681—2684.

Waldmann T. A. 2007. Daclizumab (anti-Tac, Zenapax) in the treatment of leukemia/lymphoma. *Oncogene.* 26 : 3699—3703.

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.

Yao Z., Kanno Y., Kerenyi M., Stephens G., Durant L., Watford W. T., Lawrence 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.

Поступила 22 I 209

THE EXPRESSION OF CD25 IN PHYTOHEMAGGLUTININ- OR INTERLEUKIN-2-STIMULATED HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

V. V. Zenin, N. A. Aksenov, A. N. Shatrova, I. I. Marakhova¹

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

The timely expression of a high affinity receptor for interleukin-2 (IL-2R) in human peripheral blood lymphocytes stimulated by various mitogens was examined by cytophotometric evaluation of the number of CD25 bearing cells (CD25+). In resting lymphocyte culture both phytohemagglutinin (PHA, 10 (μ g/ml) and 12,13-phorbol dibutirate (PDBu, 10⁻⁸ M) and ionomycin (IM, 5 · 10⁻⁷ M) induce the long-lasting increase (during 48 h) in the number of CD25+ cells. Only in competent (not in resting) lymphocytes, pretreated by submitogenic doses of PHA (1 μ g/ml), interleukin-2 (IL-2) is capable to induce the time-dependent CD25 expression. When comparing the time course of CD25+ expression and the blasttransformation it was found that the CD25 markers were revealed on small stimulated lymphocytes and all the large blasts were the CD+ cells with high-affinity $\alpha\beta\gamma_c$ receptor for IL-2. In conclusion, the expression of α -subunit of IL-2R takes place during the IL-2-dependent stage of T cell proliferation and may be directly induced by IL-2 via IL-2R.

Key words: human lymphocytes, interleukin-2, α -subunit, interleukin-2 receptor, CD25.