

РОЛЬ БЕЛКА STAT5 В ЭКСПРЕССИИ АЛЬФА-ЦЕПИ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

© *Е. В. Митюшова, А. Н. Шатрова, В. В. Зенин, Н. Д. Аксенов, И. И. Марахова*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; электронный адрес: elena-mityushova@yandex.ru

Проведено сравнительное исследование динамики активации белков STAT3 и STAT5 и экспрессии рецептора ИЛ-2 на разных этапах пролиферативного ответа лимфоцитов периферической крови (ЛПК). Об активации белков STAT судили по увеличению количества фосфорилированных по тирозину форм, а количество CD25-маркеров α -субъединицы рецептора ИЛ-2 и прохождение стимулированных ЛПК по клеточному циклу оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Выявили различие в динамике активации STAT3 по сравнению со STAT5 при стимуляции свежeweделенных, покоящихся ЛПК с помощью ФГА и компетентных ЛПК с помощью ИЛ-2. Обнаружено, что фосфоформы STAT3 присутствуют и в покоящихся, и в компетентных ЛПК, и их количество практически не меняется в течение 1 сут действия ФГА или ИЛ-2. В отличие от STAT3 фосфоформы STAT5 отсутствуют в покоящихся и компетентных ЛПК, они появляются не ранее чем через 2–5 ч после добавления ФГА, достигая максимального уровня к концу 1-х сут стимуляции. В компетентных клетках фосфорилирование STAT5 возрастает в ответ на ИЛ-2 уже через 0.5 ч и поддерживается на высоком уровне в течение 2 сут. В разных условиях запуска пролиферации в культурах ЛПК выявлена корреляция между повышенным и длящимся во времени уровнем фосфорилирования STAT5 и экспрессией CD25. Показано, что в ЛПК, стимулированных митогенами, WHI-P131 (ингибитор тирозинкиназы JAK3) отменяет возрастание фосфорилирования STAT5, поверхностную экспрессию CD25 и запуск пролиферации. Сделан вывод о решающей роли пути сигнализации JAK3/STAT5 в поддержании высокого уровня экспрессии полноценного, $\alpha\beta\gamma_c$ -рецептора ИЛ-2 по ходу ИЛ-2-регулируемой стадии пролиферативного ответа ЛПК.

Ключевые слова: лимфоциты человека, STAT3, STAT5, рецептор интерлейкина-2, α -субъединица рецептора ИЛ-2, CD25, JAK.

Принятые сокращения: ИЛ-2 — интерлейкин-2, ИЛ-2Р α — α -субъединица рецептора ИЛ-2, ЛПК — лимфоциты периферической крови, ФГА — фитогемагглютинин, JAK — janus tyrosine kinase, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор, STAT — signal transducers and activators of transcription.

Активация Т-лимфоцитов и запуск пролиферативного ответа — многокаскадный процесс, в котором используются все известные пути внутриклеточной сигнализации. По специфике сигнальных путей и их мишеням этот процесс делат на 2 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 в запуске пролиферативного ответа Т-лимфоцитов ключевую роль играет экспрессия рецептора ИЛ-2. В процессе активации лимфоцитов структура и свойства рецептора ИЛ-2 изменяются. В частности, с экспрессией α -цепи и ее появлением в составе рецептора ИЛ-2, состоящего в покоящихся Т-клетках из двух субъединиц — β и γ_c , связывают 100-кратное повышение аффинности рецептора к ИЛ-2, что и обеспечивает способность Т-лимфоцитов отвечать на физиологические концентрации ИЛ-2, продуцируемые клеткой (Robb et al., 1987; Leonard, 1996; Kim et al., 2006). Таким образом, в Т-клетках человека индукция полноценной

функциональной системы, включающей в себя ИЛ-2 и рецептор ИЛ-2, является решающим моментом в запуске пролиферации и иммунного ответа. Известно, что нарушения в регуляции экспрессии ИЛ-2 и его рецептора приводят к развитию лейкозов, аутоиммунных заболеваний и иммунодефицита (Leonard, 2001a; Ross et al., 2007; Rochman et al., 2009; Frank, 2012).

Как показывает молекулярно-генетический анализ, в экспрессии гена ИЛ-2Р α должны участвовать сигнальные пути, которые запускаются как антигеном (митогеном) через Т-клеточный рецептор, так и ИЛ-2 через рецептор ИЛ-2 (Kim et al., 2001; Kim, Leonard, 2002). В последнее время выявляются дополнительные регуляторные зоны гена ИЛ-2Р α , которые активируются трансформирующим фактором TGF β совместно с сигналом с Т-клеточного рецептора (Kim et al., 2005). Таким образом, экспрессия ИЛ-2Р α при активации Т-лимфоцитов является примером того, как в запуск функции конкретной мишени в нативной клетке вовлечено несколько сигнальных путей, которые могут запускаться с разных мембранных рецепторов или с разных точек индуцированного рецептором сигнального каскада.

На лимфоцитах периферической крови (ЛПК) человека нами была охарактеризована динамика поверхностной экспрессии ИЛ-2R α по ходу развития пролиферативного ответа (Зенин и др., 2011; Шатрова и др., 2011). Методом избирательного подавления фармакологическими агентами активности сигнальных белков выявлено участие нерецепторных тирозинкиназ семейства JAK и Src в поверхностной экспрессии CD25 (CD, cluster of differentiation), который служит маркером ИЛ-2R α . Результаты исследования свидетельствуют о том, что при активации Т-лимфоцитов сигнал для запуска экспрессии ИЛ-2R α поступает с Т-рецепторного комплекса через Src-киназный сигнальный путь, тогда как на поздней стадии пролиферативного ответа высокий уровень экспрессии CD25 должен регулироваться через рецептор ИЛ-2 с участием JAK-зависимого сигнального пути. Встает вопрос о том, какие сигнальные белки обеспечивают запуск экспрессии ИЛ-2R α на разных стадиях пролиферативного ответа.

Установлено, что два представителя семейства транскрипционных факторов STAT — STAT3 и STAT5 — участвуют в дифференцировке, пролиферации и выживании Т-лимфоцитов (Moriggl et al., 1999a, 1999b; Akira, 2000; Leonard, 2001b; Lockyer et al., 2007; Ross et al., 2007; Heltemes-Harris et al., 2011; Lin et al., 2012). Большинство исследований, устанавливающих роль белков STAT, выполнено на Т-клетках мышей или на постоянных линиях лимфоидных клеток с соответствующими генетическими дефектами. В таких модельных системах в активации Т-лимфоцитов могут участвовать другие сигнальные пути, компенсирующие выключение путей сигнализации в клетках *in vivo* (Shi et al., 2009). Остается малоизученным вопрос, каким образом в физиологических условиях сигналы, поступающие с Т-рецептора и с рецептора ИЛ-2, интегрируются по ходу пролиферативного ответа нормальных ЛПК человека.

Задача настоящей работы — исследовать механизм регуляции экспрессии ИЛ-2R α , для чего охарактеризовать роль STAT3 и STAT5 в индукции CD25 на ИЛ-2-зависимой стадии активации нормальных ЛПК человека. В работе прослежены степень фосфорилирования по тирозину STAT3 и STAT5 и динамика поверхностной экспрессии CD25 при запуске пролиферации в культуре свежывыделенных и компетентных ЛПК человека фитогемагглютинином (ФГА) или ИЛ-2, а также при действии фармакологических ингибиторов сигнальных путей, функционирующих с участием тирозинкиназ семейств Src и JAK. Сделан вывод о решающей роли пути сигнализации JAK3/STAT5 в поддержании высокого уровня экспрессии полноценного, $\alpha\beta\gamma_c$ -рецептора ИЛ-2 в активированных лимфоцитах человека.

Материал и методика

Выделение и культивирование лимфоцитов. Лимфоциты выделяли по общепринятой схеме из свежей донорской крови (Boyum, 1968). Лейкоцитарную фракцию отбирали после осаждения эритроцитов добавлением в кровь 6 %-го раствора декстрана (мол. масса 500 000). Суспензию лейкоцитов (по 8 мл) наслаивали на 3 мл гистопака и центрифугировали в течение 30 мин при 600 g. После центрифугирования интерфазу переносили в пробирки и 3—4 раза промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) следующего состава (в mM):

137 NaCl, 2.7 KCl, 8 Na₂HPO₄ и 1.5 KH₂PO₄. Для удаления макрофагов (прикрепляющихся к пластику) клеточную суспензию разбавляли средой RPMI, содержащей 10 % сыворотки человека, и помещали в пластиковые матрацы на 40 мин при 37 °C в атмосферу 5 % CO₂. После этого суспензию лимфоцитов разливали во флаконы при концентрации клеток 2 млн/мл, а на следующие сутки использовали для экспериментов. Ингибиторы тирозинкиназ Src (вещество PP2) или JAK (вещество WHI-P131) добавляли в культуру ЛПК за 1.5 ч до митогенной стимуляции.

Приготовление клеточных лизатов. Для электрофоретического разделения белков использовали клеточные лизаты. Для получения тотальных лизатов клетки осаждали центрифугированием при 600 g в течение 10 мин, отмывали холодным PBS и лизировали на льду в лизирующем буфере (pH 7.4), содержащем 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 % Тритона X-100, 0.5 % нонидета P-40 (NP-40), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, ингибиторы протеаз (1 mM PMSF и 1 мкг/мл коктейля ингибиторов протеаз) и ингибиторы фосфатаз (1 mM Na₃VO₄, 5 mM EGTA и 10 mM NaF). Полученную смесь центрифугировали при 15 000 g в течение 15 мин при 4 °C. Супернатант отбирали, 2 мкл брали для определения концентрации белка в пробе. К остальному супернатанту добавляли буфер Лэммли для электрофоретических проб (40 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % SDS, 20 % β -меркаптоэтанол и 40 % глицерина) из расчета 1 часть буфера на 4 части лизата и инкубировали в течение 5 мин при 100 °C. Количество общего белка в пробе оценивали по методу Бредфорд (Bradford, 1976). В качестве стандарта для калибровочной кривой использовали овальбумин.

Электрофорез и иммуноблотинг. Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Концентрирующий гель (pH 6.8) содержал 4 % полиакриламида, а разделяющий (pH 8.8) — 7.5 %. Разделение белков проводили в блоках геля 90×60×1 мм при силе тока 30 mA на пластину в течение 2 ч. Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Электроперенос проводили при силе тока 0.8 mA на 1 см² геля в течение 1 ч в буфере для электропереноса (48 mM Трис, 39 mM глицина, 0.037 % SDS и 15 % метанола).

Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S (Sigma, США). Иммуноблотинг проводили в соответствии с методикой ECL Western blotting protocols (Amersham, Великобритания). Инкубацию с антителами против фосфорилированных по тирозину STAT3 и STAT5 проводили при 4 °C. Все остальные процедуры осуществляли при комнатной температуре. Мембрану промывали TTBS (20 mM Трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl и 0.1 % Tween-20), после чего инкубировали последовательно в 5 %-ном растворе сухого молока в TTBS в течение 1 ч и в растворе первых антител в 5 %-ном растворе BSA в TTBS в течение 10—12 ч, затем промывали TTBS (3 раза по 5 мин). Далее мембрану помещали на 1 ч в раствор вторых антител в 5 %-ном растворе молока в TTBS, после чего промывали TTBS (3 раза по 5 мин).

Для детекции пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP использовали реакцию усиленной хемилюминесценции (ECL). Мембрану промывали водой и инкубировали в темноте 1 мин в свежеприготовленном растворе, содержащем 100 mM Трис-HCl, pH 8.5, 1.25 mM люминола, 0.2 mM кумаровой кислоты и 0.01 % H₂O₂. Хемилюми-

несцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку (CEA AB, Швеция). Для удаления связавшихся с нитроцеллюлозной мембраной антител и повторной окраски ее другими антителами мембрану инкубировали в растворе, содержащем 60 мМ Трис-HCl, pH 6.8, 2 % SDS и 100 мМ 2-меркаптоэтанола, в течение 30 мин при 56 °С.

Антитела. В качестве первых антител использовали поликлональные антитела против STAT3 или STAT3, фосфорилированного по тирозину 705, против STAT5 или STAT5, фосфорилированного по тирозину 694 (Cell Signalling Technology, США). Антитела разводили (1 : 1000) 5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 0.1%-ном TTBS. В качестве вторых антител использовали козы антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, полученные против иммуноглобулинов кролика (Cell Signaling, США), приготовленные на 5%-ном обезжиренном молоке в разведении 1 : 6000. 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.

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 аргонным лазером 488 нм. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии со стандартным протоколом обработки данных EpicsXL.

Для оценки пролиферативного ответа 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 °С). Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter).

Для оценки жизнеспособности лимфоцитов после длительного культивирования в присутствии ингибиторов тирозинкиназ оценивали внутриклеточное содержание катионов с помощью метода пламенной фотометрии (Веренинов и др., 1991). Измерения содержания калия, натрия и рубидия (аналог калия) проводили через 48 ч культивирования ЛПК с ФГА в отсутствие или в присутствии ингибиторов WHI-P131 или PP2. Незменность отношения внутриклеточного содержания калия к содержанию натрия (K_i/Na_i) и высокие убаин-чувствительные потоки рубидия, связанные с активностью натриевого насоса, после инкубации ЛПК с ингибиторами свидетельствовали об отсутствии токсического действия ингибиторов на клетки.

В работе использовали следующие реактивы: ИЛ-2 (Биотех, Россия), ФГА, убаин, гистопак 1.077, декстран 500, сапонин, бромистый этидий, иодид пропидия и WHI-P131 (Sigma, США), PP2 (Calbiochem, США), РНКазы (Serva, Германия), FITC-окрашенные антитела против CD25 (Invitrogen, США), среда RPMI (Биолот, Россия). Растворы ФГА (1 мг/мл) готовили на 0.14 М NaCl, растворы WHI-P131 и PP2 — на диметилсульфоксиде, концентрация которого в тестирующих растворах с клетками не превышала 0.05 %.

Результаты

Динамика активации STAT3 и STAT5 по ходу пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных ФГА. Известный поликлональный митоген для Т-лимфоцитов ФГА, взаимодействуя с поверхностью клетки, 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). Митогенные дозы ФГА индуцируют выход нормальных лимфоцитов из состояния покоя в клеточный цикл, а ЛПК человека, стимулированные ФГА, широко используются в экспериментах в качестве модельной системы при изучении сигнальных механизмов, регулирующих пролиферацию клеток.

Рис. 1 показывает изменения уровня фосфорилирования по тирозину STAT3 и STAT5 в ЛПК через 2 и 24 ч после стимулирования ФГА в митогенной концентрации (10 мкг/мл), здесь же показано влияние специфических ингибиторов тирозинкиназ JAK (WHI-P131) и Src (PP2) на фосфорилирование этих белков. Видно, что в нестимулированных ЛПК фосфорилированные формы STAT5 отсутствуют, они появляются только после 2-часовой стимуляции, а высокий уровень фосфорилирования STAT5 отмечается только через 24 ч действия ФГА. В отличие от STAT5 фосфорилированные формы STAT3 присутствуют в нестимулированных ЛПК, их количество несколько увеличивается в первые часы действия ФГА и подрастает за 24 ч, но не более чем на 15—20 %. За 24 ч стимуляции увеличивается содержание нефосфорилированных форм STAT3 и STAT5 в пробах. Этот результат означает, что в активированной клетке относительная доля белков STAT возрастает, поскольку пробы на электрофоретических дорожках, выравнивали по количеству общего клеточного белка. В этих же условиях за 24 ч относительная доля β -актина в пробах не изменяется (рис. 1, β -actin).

Результаты денситометрии полос иммуноблотов, полученных при анализе активности белков STAT5 и STAT3 в 8 независимых экспериментах на лимфоцитах,

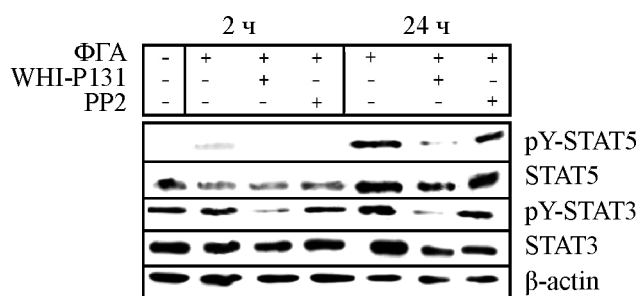


Рис. 1. Изменения уровня фосфорилирования STAT5 (pY-STAT5) и STAT3 (pY-STAT3) на разных стадиях пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных ФГА или ФГА совместно с ингибитором тирозинкиназы JAK3 (WHI-P131) или киназы Lck (PP2).

Типичный иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов человека, обработанных только ФГА (10 мкг/мл) в течение 2 и 24 ч или ФГА на фоне действия WHI-P131 (80 мкМ) или PP2 (0.5 мкМ). Использовали антитела против STAT3, фосфорилированные по тирозину 705, и против STAT5, фосфорилированные по тирозину 694 (Cell Signaling, США). После стрипинга те же мембраны обрабатывали антителами против STAT3 или STAT5 (Cell Signaling, США). Дополнительно проводили иммуноблотинг с использованием антитела против бета-актина (Sigma, США).

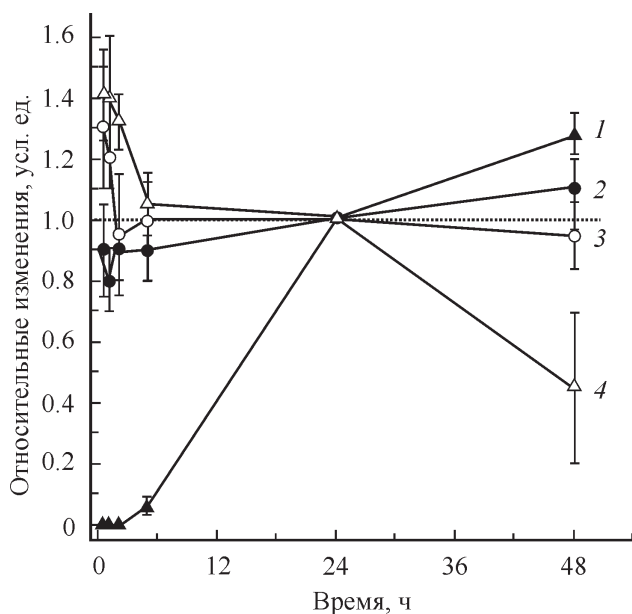


Рис. 2. Динамика фосфорилирования STAT3 и STAT5 в лимфоцитах человека, стимулированных в течение 48 ч ФГА или ИЛ-2.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — относительные изменения оптической плотности полос, соответствующих степени фосфорилирования STAT5 (1, 4) и STAT3 (2, 3). За единицу принята интенсивность полос, соответствующих степени фосфорилирования STAT5 или STAT3 за 24 ч стимуляции. 1, 4 — степень фосфорилирования STAT5 в присутствии ФГА или ИЛ-2 соответственно; 2, 3 — степень фосфорилирования STAT3 в присутствии ФГА или ИЛ-2 соответственно. Приведены средние $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ из 8 экспериментов, полученных на лимфоцитах разных доноров.

выделенных из крови разных доноров, представлены на рис. 2. При построении графиков отношения интенсивности свечения полос фосфорилированных форм белка отнесены к соответствующим значениям для нефосфорилированных форм в той же пробе. За единицу приняты значения в 24 ч активации ЛПК. Отчетливо выявляется различие в динамике активации STAT3 и STAT5, что может указывать на разную функцию этих сигнальных белков в митогенной активации ЛПК.

Динамика активации STAT3 и STAT5 при стимуляции лимфоцитов экзогенным ИЛ-2. По данным литературы, транскрипционные факторы STAT3 и STAT5 участвуют в запуске пролиферативного ответа ЛПК только на ИЛ-2-регулируемой стадии (Berridge, 1997; Leonard, 2001b; Kim et al., 2006). Для оценки роли ИЛ-2 в активации белков STAT3 и STAT5 проводили эксперименты по двум схемам. В первой серии рекомбинантный ИЛ-2 вносили в культуру покоящихся ЛПК на сроки от 0.5 до 24—48 ч и оценивали степень фосфорилирования белков STAT, а также следили за изменениями размеров ЛПК и распределением клеток по фазам клеточного цикла. Во второй серии экспериментов ИЛ-2 добавляли в культуру компетентных ЛПК.

Известно, что в покоящихся ЛПК $\beta\gamma_c$ -рецептор ИЛ-2, несмотря на низкое сродство к ИЛ-2, способен проводить сигнал, индуцируя пострецепторные сигнальные события с участием γ_c -субъединицы (Nakamura et al., 1994; Leonard et al., 1995; Kim et al., 2006). По нашим данным, в покоящихся ЛПК человека экзогенный ИЛ-2 активирует и STAT3, и STAT5. В культурах ЛПК, стимулированных ИЛ-2 (100—250 ед./мл), появление значительных коли-

чество фосфорилированных форм белка STAT5 отмечается уже после 30-минутного действия ИЛ-2 (рис. 3). В течение следующих 4—5 ч уровень фосфорилирования STAT5 продолжает нарастать, но к концу 1-х сут снижается не менее чем наполовину (рис. 2, з). Что касается STAT3, то на фоне его высокой активности в покоящихся ЛПК ИЛ-2 в первые 30 мин увеличивает содержание фосфорилированных форм STAT3 не более чем на 15—30 %, после чего содержание активных форм белка снижается и через 24 ч соответствует содержанию в контроле (рис. 3). В отличие от ФГА ИЛ-2 за 24 ч действия не изменяет содержания неактивных форм белков STAT5 и STAT3 (рис. 3). Этот результат согласуется с результатами, полученными при оценке пролиферативного и ростового статуса культур ЛПК, стимулированных ИЛ-2. Из данных таблицы, следует, что через 48 ч ИЛ-2 не запускает пролиферацию и рост клеток, а нарастание потоков и внутриклеточного содержания калия, характерное для перехода покоящихся культур к пролиферации, отсутствует (Marakhova et al., 1998).

Эксперименты второй серии показали, что инкубация свежесыведенных ЛПК человека в присутствии субмитогенной концентрации ФГА (0.7 мкг/мл) или форболового эфира (10^{-8} М) делает лимфоциты компетентными: добавление ИЛ-2 в культуру таких клеток запускает пролиферативный ответ (Kumagai et al., 1988; Торопова и др., 2001). В наших экспериментах в компетентных ЛПК ИЛ-2 (100 мкг/мл) через 48 ч запускал пролиферативный

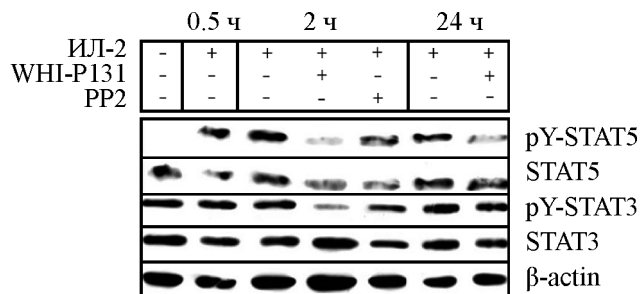


Рис. 3. Изменения степени фосфорилирования STAT5 (pY-STAT5) и STAT3 (pY-STAT3) в лимфоцитах, стимулированных ИЛ-2 или ИЛ-2 совместно с ингибитором WNI-P131 или PP2.

Типичный иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов человека, стимулированных ИЛ-2 (100 ед./мл) в течение 0.5, 2 и 24 ч, или ИЛ-2 на фоне WNI-P131 (80 мкМ), или PP2 (0.5 мкМ). Антитела и условия проведения иммуноблотинга те же, что и на рис. 1.

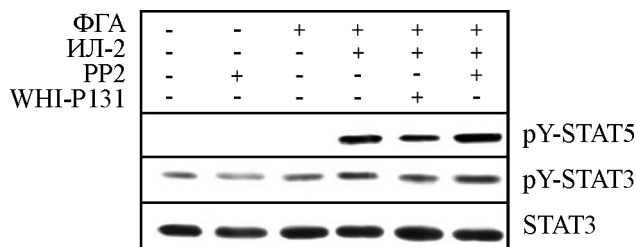


Рис. 4. ИЛ-2 индуцирует фосфорилирование STAT5 в компетентных лимфоцитах крови человека.

Имуноблот тотальных лизатов компетентных лимфоцитов человека, которые получали инкубацией в течение 18 ч в ростовой среде с 0.8 мкг/мл ФГА и далее 2 ч стимулировали ИЛ-2 или перед стимуляцией ИЛ-2 обрабатывали в течение 1.5 ч ингибиторами — WNI-P131 (80 мкМ) или PP2 (0.5 мкМ). Антитела и условия проведения иммуноблотинга те же, что и на рис. 1.

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 ₂ /M, %	Белок, мг на 1 пробу
Контроль	4.3	14.0	0	0.11
ФГА, 10	5.1	50.7	39.7	0.33
ФГА, 10 + WHI-P131, 80	5.3	17.8	5.4	0.14
ФГА, 10 + WHI-P131, 50	4.8	30.7	14.7	0.24
ФГА, 10 + PP2, 0.5	5.4	26.4	6.4	0.13
ФГА, 0.7	4.4	15.7	6.9	0.13
ИЛ-2, 100	4.0	14.4	2.3	0.12
ФГА, 0.7 + ИЛ-2, 100	5.0	44.5	30.6	0.23

Примечание. Контроль — нестимулированные, покоящиеся ЛПК. Концентрации даны в мкг/мл для ФГА, в мкМ для ингибиторов и в ед./мл для ИЛ-2. Представлены результаты 1 эксперимента из 4, выполненных по одной схеме: разные показатели, полученные при действии одного агента и приведенные в соответствующей строке, измерены на культуре ЛПК одного донора.

ответ и бласттрансформацию, которая сопровождалась увеличением массы клеточного белка и характерным ростом внутриклеточного содержания калия и его входных потоков (см. таблицу).

В компетентных ЛПК уровень фосфорилирования STAT3 сравним с уровнем в покоящихся клетках, а

ИЛ-2 не влияет или несколько увеличивает степень фосфорилирования STAT3 только в первые 0.5—2 ч (рис. 4). Напротив, в компетентных лимфоцитах фосфорилированные формы STAT5 отсутствуют, они детектируются в ответ на ИЛ-2 уже через 0.5 ч (рис. 4). Обнаружено, что в компетентных ЛПК в присутствии ИЛ-2 фос-

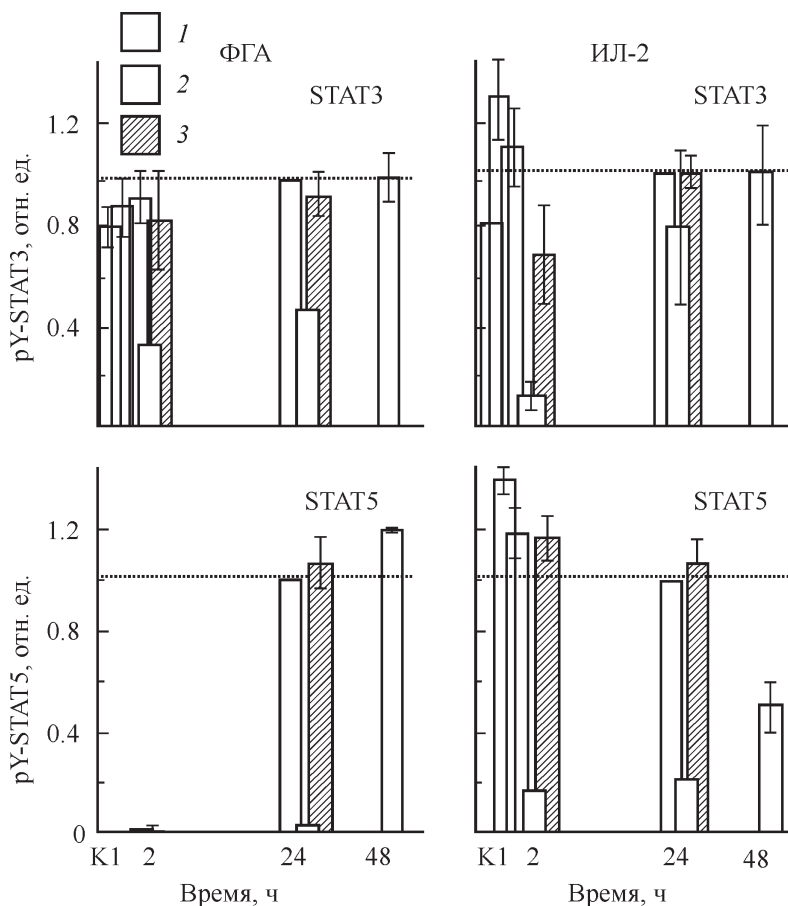


Рис. 5. Влияние WHI-P131 и PP2 на фосфорилирование STAT3 и STAT5 в лимфоцитах, стимулированных ФГА или ИЛ-2.

По горизонтали — время действия ФГА или ИЛ-2, ч; по вертикали — относительные изменения оптической плотности полос, соответствующих фосфорилированным формам STAT3 и STAT5. За единицу принята интенсивность полос, соответствующих степени фосфорилирования STAT через 24 ч стимуляции. Приведены средние $\bar{X} \pm S_x$ из 6 экспериментов, полученных на лимфоцитах разных доноров. 1 — степень фосфорилирования STAT в присутствии ФГА или ИЛ-2, 2 — то же на фоне WHI-P131, 3 — то же на фоне PP2.

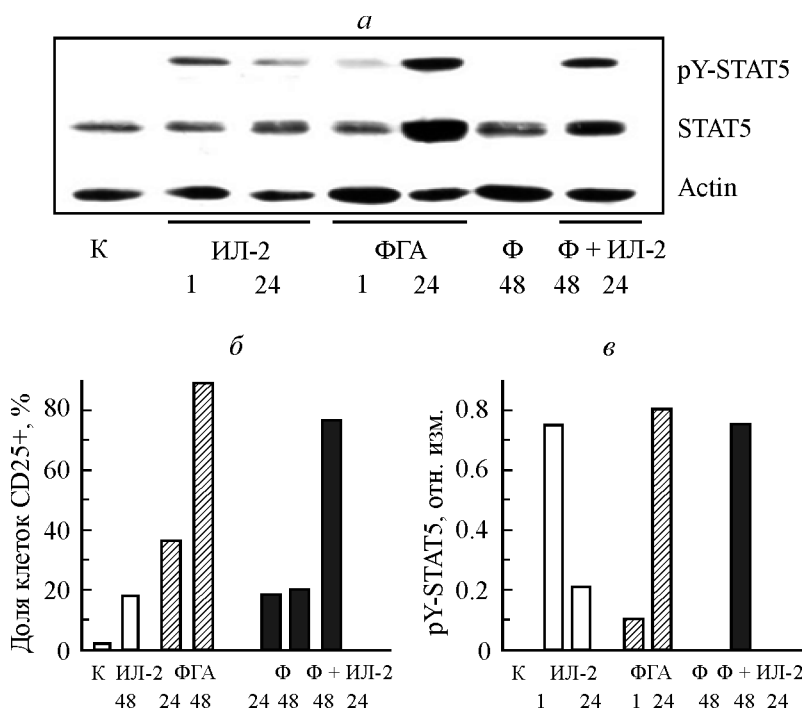


Рис. 6. Изменения уровня фосфорилирования STAT5 и экспрессии рецептора ИЛ-2 в лимфоцитах человека, стимулированных разными митогенами.

а — иммуноблот тотальных лизатов лимфоцитов, стимулированных в течение 1 или 24 ч ИЛ-2 (ед./мл), или ФГА (10 мкг/мл), или с форбол-12,13-дибутиратом (Ф, 10^{-8} М) в ростовой среде в течение 24 ч, а далее ИЛ-2 в течение 24 ч на фоне Ф (Ф, 48 + ИЛ-2, 24). К — контроль, нестимулированные лимфоциты; *б* — количество клеток CD25+ в популяции ЛПК, %; *в* — относительные изменения оптической плотности полос, соответствующих фосфорилированным формам STAT5 на *а*. Антитела и условия проведения иммуноблоттинга те же, что и на рис. 1.

фосфорилирование STAT5 остается высоким в течение 24—48 ч.

Влияние ингибиторов тирозинкиназ JAK и Src на фосфорилирование STAT3 и STAT5 и экспрессию CD25 в активированных ЛПК человека. Для того чтобы выяснить роль длящейся активации STAT5 в экспрессии рецептора ИЛ-2, во всех экспериментах параллельно с оценками активности белков STAT измеряли численность CD25+ -клеток в культурах ЛПК, стимулированных ФГА или ИЛ-2, и исследовали действие WHI-P131 — селективного ингибитора тирозинкиназы JAK3 (Sudbeck et al., 1999). Оказалось, что WHI-P131 препятствует появлению фосфорилированных форм STAT5 на всех сроках действия ФГА (рис. 1). Статистическая обработка данных денситометрии иммуноблотов показала, что WHI-P131 в концентрации 80 мкМ давит практически полностью позднее, чем ФГА-индуцированное фосфорилирование STAT5 (рис. 5). Что касается STAT3, то WHI-P131 ослабляет его фосфорилирование примерно наполовину на всех сроках действия ФГА (рис. 5). Следует отметить, что WHI-P131 не влиял на фосфорилирование STAT3 в покоящихся, свежевыделенных ЛПК человека (данные не представлены).

Как показывает рис. 5, WHI-P131 препятствует тому возрастанию степени фосфорилирования STAT3 и STAT5, которое наблюдается в первые 2 ч влияния ИЛ-2. Однако через 1 сут ингибирующее действие WHI-P131 на фосфорилирование STAT3 ослабляется, а фосфорилирование STAT5 в присутствии WHI-P131 отсутствует. Оказалось также, что WHI-P131 отменяет нарастание содержания нефосфорилированных белков STAT на длинных сроках инкубации клеток с ФГА (рис. 1). При культиви-

ровании ЛПК с ФГА в присутствии WHI-P131 тормозятся запуск пролиферативного ответа и рост клеток, при этом антипролиферативный эффект WHI-P131 является дозозависимым (см. таблицу).

По некоторым данным литературы, дополнительно к JAK-зависимой активации STAT нерецепторные тирозинкиназы семейства Src могут регулировать фосфорилирование белков STAT, индуцированное при активации цитокиновых рецепторов (Zhang et al., 2000; Ingley, Klincken, 2006). В наших экспериментах один из ингибиторов тирозинкиназ семейства Src — PP2, который снижает раннюю экспрессию CD25 при действии ФГА, практически не влиял на количество фосфорилированных STAT3 и STAT5 в ЛПК, стимулированных ФГА или ИЛ-2 (рис. 4). В присутствии PP2 отмечено лишь ослабление фосфорилирования STAT3 на ранних сроках действия ИЛ-2.

Для выявления связи между активностью STAT5 и экспрессией ИЛ-2R α мы сравнили экспериментальные условия, при которых ФГА или ИЛ-2 запускает фосфорилирование STAT5 и повышает уровень экспрессии CD25. На рис. 6, *а* представлен типичный иммуноблот, показывающий, как изменяется уровень фосфорилирования STAT5 через 2 и 24 ч после стимуляции покоящихся ЛПК с помощью ФГА или ИЛ-2 и компетентных ЛПК с помощью ИЛ-2. Во всех экспериментах через 2 ч действия ИЛ-2 отмечается высокий уровень фосфорилирования STAT5. Однако, как показала денситометрия иммуноблотов, в ЛПК, стимулированных только ИЛ-2 активность STAT5 снижается через 24 ч, тогда как при стимуляции покоящихся ЛПК митогенными дозами ФГА или компетентных ЛПК экзогенным ИЛ-2, активность STAT5 за 24 ч нарастает и остается высокой (рис. 6, *в*, *з*). Просле-

живается согласованность изменений степени фосфорилирования STAT5 и уровня экспрессии CD25. В каждом из 3 экспериментов, выполненных по одной схеме, но на ЛПК от разных доноров, в популяции лимфоцитов, стимулированных митогенным ФГА, или в компетентных лимфоцитах, стимулированных экзогенным ИЛ-2, высокая доля CD25⁺-клеток коррелировала с высоким и стойким во времени уровнем фосфорилирования STAT5. В то же время в культуре покоящихся ЛПК ИЛ-2 не индуцировал поверхностную экспрессию CD25, вызывая лишь кратковременное и спадающее во времени возрастание фосфорилирования STAT5. Таким образом, в активированных митогенами ЛПК индукция поверхностной экспрессии CD25 наблюдается лишь на фоне высокого и стойкого во времени уровня активности STAT5.

Обсуждение

Главный результат представленных данных в том, что длящаяся во времени высокая активность STAT5, индуцированная митогенным ФГА в покоящихся ЛПК или экзогенным ИЛ-2 в компетентных ЛПК, является необходимым условием поверхностной экспрессии CD25 и формирования полноценного рецептора ИЛ-2, в состав которого входит α -субъединица.

Применив метод выключения сигнальных белков в нативных лимфоцитах крови человека фармакологическими веществами, мы выделили две стадии в запуске экспрессии CD25, мембранного маркера ИЛ-2R α (Зенин и др., 2011; Шатрова и др., 2011). На ранней стадии митогенной стимуляции лимфоцитов появление маркеров CD25 на поверхности клеток подавляется в присутствии PP2, ингибитора киназы Lck, относящейся к семейству тирозинкиназ Src. Известно, что эти тирозинкиназы играют главную роль в передаче сигнала с мембранного T-рецепторного комплекса непосредственно на каскад сигнальных молекул, участвующих во внутриклеточной передаче информации на генетический аппарат клетки (Berridge, 1997; Lin, Weiss, 2001; Smith-Garvin et al., 2009). Выяснилось, что по мере выхода активированных ЛПК из состояния G₀/G₁ и продвижения по клеточному циклу PP2 не тормозит экспрессию CD25, но появлению на поверхности клеток маркеров CD25 препятствует WHI-P131, селективный ингибитор тирозинкиназы JAK3. Известно, что JAK3 ассоциирована с γ -цепью рецептора ИЛ-2 и участвует в передаче сигнала с рецептора ИЛ-2 на транскрипционные факторы семейства STAT (Kirken et al., 1995; Leonard, Lin, 2000; Ghosh et al., 2009). По данным литературы, и STAT3, и STAT5 вовлечены в процессы выживания и пролиферации T-клеток, но их роль в этих процессах, по-видимому, разная. Так, двойной нокаут по белкам STAT5 полностью подавляет пролиферативный ответ периферических T-клеток мышей независимо от присутствия ИЛ-2 (Moriggl et al., 1999a; Lin, Leonard, 2000). У таких клеток невозможность вступления в клеточный цикл связана с неспособностью экспрессировать циклины D2 и D3, а также киназу Cdk6 (Moriggl et al., 1999b; Leonard, 2001b). У мышей с недостаточностью по STAT3 пролиферация T-клеток тоже тормозится, однако в отличие от STAT5-дефицитных клеток высокая концентрация ИЛ-2 восстанавливает пролиферативный ответ STAT3-дефицитных лимфоцитов (Moriggl et al., 1999a). Общеизвестно, что STAT3 является антиапоптотическим фактором, который действует через Bcl-2 неза-

висимый путь (Moriggl et al., 1999a; Akira, 2000; Ross et al., 2007).

В нашем сравнительном исследовании динамики активации STAT3, STAT5 и экспрессии CD25 в лимфоцитах человека, стимулированных ФГА, выявлены согласованные изменения активности STAT5 и экспрессии ИЛ-2R α . Обнаружено также, что в покоящихся ЛПК рекомбинантный ИЛ-2 в течение 1-х мин индуцирует фосфорилирование STAT5, уровень которого снижается к концу 1-х сут. В этих же условиях в покоящихся ЛПК в течение 2 сут ИЛ-2 не запускает ни экспрессию CD25, ни пролиферацию. Только в компетентных ЛПК, стимулированных экзогенным ИЛ-2, на фоне повышенной и устойчивой во времени активности STAT5 наблюдается высокий уровень поверхностной экспрессии CD25.

Природа компетентного состояния T-лимфоцитов не раскрыта. Свежевыделенные покоящиеся ЛПК приобретают компетентность в процессе их выращивания в среде, содержащей немитогенные концентрации ФГА или флорболовый эфир. Известно, что только при наличии второго сигнала, который создается взаимодействием ИЛ-2 с рецептором ИЛ-2, компетентные клетки способны перейти к пролиферации (Kumagai et al., 1988; Торопова и др., 2001). Как показали наши исследования, в компетентных культурах ЛПК в популяции CD4⁺-клеток около 10—13 % являются клетками CD4⁺CD25⁺, которые экспрессируют α -субъединицу рецептора ИЛ-2. Таким образом, в культуре компетентных ЛПК присутствует некоторый пул клеток, обладающих полноценными $\alpha\gamma$ -рецепторами ИЛ-2 с высокой аффинностью к ИЛ-2. Как показывают результаты нашего исследования, в компетентных ЛПК человека STAT5 (в отличие от STAT3) не активен, но уровень его фосфорилирования резко возрастает в ответ на ИЛ-2 и поддерживается на высоком уровне в течение всего переходного периода к пролиферации. Тот факт, что в этих условиях WHI-P131, селективный ингибитор киназы JAK3, устраняет ИЛ-2-индуцированное фосфорилирование STAT5, указывает на то, что в компетентных клетках ИЛ-2 может запускать сигнальный путь JAK3/STAT5.

Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что длящийся характер активации STAT5 является необходимым условием запуска поверхностной экспрессии CD25. Важность конститутивной активации STAT5 в поддержании пролиферации клеток CD4⁺ выявлена при исследовании трансгенных мышей, экспрессирующих активные формы STAT5: у таких мышей возрастает численность периферических T-клеток, несущих маркеры CD4⁺CD25⁺ (Taylor et al., 2006). Интересно, что ранее на линии мышинных T-клеток PC60 при сравнении ответа гена ИЛ-2R α на стимуляцию ИЛ-2, ИЛ-9 и эритропоэтином было показано, что интерлейкины (но не эритропоэтин) стимулировали экспрессию ИЛ-2R α только на фоне высокой и длящейся во времени активности STAT5 (Imbert, Renaud, 1999). Эти авторы сделали вывод о том, что длительность активации STAT5 определяет тип клеточного ответа на цитокины и ростовые факторы. Хорошо известно, что конститутивная активность транскрипционных факторов STAT3 и STAT5 выявляется в клетках лейкемий и лимфом, а также в трансформированных T-клеточных линиях. Так, трансформированные вирусом клетки линии HTLV-1 характеризуются конститутивно гиперактивными JAK3 и STAT (Kirken et al., 2000; Bunting, 2007; Bhattarai et al., 2012). Активные фосфорилированные формы STAT3 присутствуют во всех src-транс-

формированных клеточных линиях. STAT3 играет ключевую роль в трансформации и онкогенезе, предотвращая апоптотическую гибель клеток и способствуя пролиферации и трансформации клеток (Akira, 2000; Kube et al., 2001; Baus, Pfitzner, 2006).

В нашем исследовании обнаружено присутствие фосфорилированных форм STAT3 в лимфоцитах, выделенных из крови здоровых доноров и культивируемых в стандартных условиях — в среде RPMI, содержащей 5 % инактивированной сыворотки человека без антибиотиков. По данным проточной цитофлуориметрии, покоящаяся культура ЛПК содержала не менее 99 % клеток в состоянии G₀/G₁ и под действием ФГА демонстрировала типичную для нормальных ЛПК динамику перехода в S-фазу. Механизм, обеспечивающий высокую активность STAT3 в покоящихся ЛПК, неясен. Опираясь на сведения о роли STAT3 в других типах клеток, можно предположить, что в нормальных ЛПК человека STAT3 может играть антиапоптотическую роль (Akira, 2000). В последнее время появились исследования, выявляющие особую роль STAT3 в Т-клетках (Oh et al., 2011). Обнаружилось, что STAT3 способствует выживанию покоящихся Т-клеток: STAT3 подавляет продукцию ИЛ-2, регулируя экспрессию FoxO транскрипционных факторов и препятствуя повышению активности NF-κB через FoxO-зависимую гиперэкспрессию белка-ингибитора IκB. Таким образом, в физиологии покоящихся Т-клеток STAT3 может играть роль, отличную от других клеток животных.

Совокупность данных, которые получены при сравнении динамики активации STAT5 и экспрессии CD25 в разных условиях стимуляции нормальных ЛПК человека, свидетельствует о том, что особая роль STAT5 (по сравнению со STAT3) в пролиферации Т-лимфоцитов может быть обусловлена участием STAT5 в запуске экспрессии α-цепи рецептора ИЛ-2. Действительно, индуцированный взаимодействием ИЛ-2 с рецептором переход STAT5 в фосфорилированное состояние, транслокация его в ядро, индукция экспрессии гена ИЛ-2Rα и формирование полноценного трехсубъединичного рецептора ИЛ-2 создает оптимальные условия для запуска клеточного цикла и последующей пролиферации ЛПК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00234-а), программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-4957.2013.4), программы президиума РАН № 7 и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

Веренинов А. А., Гусев Е. А., Казакова О. М., Клименко Е. В., Осипов В. В., Марахова И. И., Торопова Ф. В. 1991. Транспорт и распределение моновалентных катионов при бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека, активированных ФГА. Цитология. 33 (11) : 78—93.

Зенин В. В., Аксенов Н. Д., Шатрова А. Н., Митюшова Е. В., Марахова И. И. 2011. Поверхностная экспрессия CD25 у лимфоцитов человека на разных стадиях запуска пролиферативного ответа. I. Роль тирозинкиназ семейства JAK и Src по данным ингибиторного анализа. Цитология. 53 (8) : 645—651.

Торопова Ф. В., Виноградова Т. А., Марахова И. И. 2001. Сравнительное исследование функциональной экспрессии Na/K-насоса в лимфоцитах человека, активированных фитогеммагглютинином, форболовым эфиром, иономицином и интерлейкином-2. Цитология. 43 (2) : 148—155.

Шатрова А. Н., Зенин В. В., Аксенов Н. Д., Митюшова Е. В., Марахова И. И. 2011. Поверхностная экспрессия CD25 у лимфоцитов человека на разных стадиях запуска пролиферативного ответа. II. Действие интерлейкина-2. Цитология. 53 (8) : 652—658.

Akira S. 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene*. 19 : 2607—2611.

Baus D., Pfitzner E. 2006. Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int. J. Cancer*. 118 : 1404—1413.

Berridge M. J. 1997. Lymphocyte activation in health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* 17 : 155—178.

Bhattacharai N., McLinden J. H., Xiang J., Kaufman T. M., Stapleton J. T. 2012. GB virus C envelope protein E2 inhibits TCR-induced IL-2 production and alters IL-2-signaling pathways. *J. Immunol.* 189 : 2211—2216.

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.

Bunting K. D. 2007. STAT5 signaling in normal and pathologic hematopoiesis. *Front Biosci.* 12 : 2807—2820.

Crabtree G. R. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science*. 243 : 355—361.

Frank D. A. 2012. Targeting STATs for cancer therapy. *JAK/STAT*. 1 : 1—2.

Ghoreschi K., Laurence A., O'Shea J. J. 2009. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol. Rev.* 228 : 273—287.

Heltemes-Harris L. M., Willette M. J., Vang K. B., Farrar M. A. 2011. The role of STAT5 in the development, function, and transformation of B and T lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217 : 18—31.

Imbert V., Renauld P. R. 1999. Duration of STAT5 activation influences the response of interleukin-2 receptor alpha gene to different cytokines. *Eur. Cytokine Netw.* 10 : 71—78.

Ingley E., Klinken S. P. 2006. Cross-regulation of JAK and Src kinases. *Growth Factors*. 24 : 89—95.

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.

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., 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-β. *J. Biol. Chem.* 280 : 34 042—34 047.

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.

Kirken R. A., Erwin R. A., Wang L., Wang Y., Rui H., Farrar W. L. 2000. Functional uncoupling of the Janus kinase 3-Stat5 pathway in malignant growth of human T cell leukemia virus type 1-transformed human T cells. *J. Immunol.* 165 : 5097—5104.

Kirken R. A., Rui H., Malabarba M. G., Howard O. M., Kawamura M., O'Shea J. J., Farrar W. L. 1995. Activation of JAK3, but not JAK1, is critical for IL-2-induced proliferation and STAT5 recruitment by a COOH-terminal region of the IL-2 receptor beta-chain. *Cytokine*. 7 : 689—700.

Kube D., Holtick U., Vockerodt M., Ahmadi T., Haier B., Behrmann I., Heinrich P. C., Diehl V., Tesch H. 2001. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*. 98 : 762—770.

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.

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. 2001a. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 1 : 2000—2008.
- Leonard W. J. 2001b. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int. J. Hematol.* 73 : 271—277.
- 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., Lin J. X. 2000. Cytokine receptor signaling pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 : 877—888.
- Leonard W. J., Shores E. W., Love P. E. 1995. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol. Rev.* 148 : 97—114.
- Lin J., Leonard W. J. 2000. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene.* 19 : 2566—2576.
- Lin J., Li P., Liu D., Jin H. T., He J., Ata Ur Rasheed M., Rochman Y., Wang L., Cui K., Liu C., Kelsall B. L., Ahmed R., Leonard W. J. 2012. Critical role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity.* 36 : 586—599.
- Lin J., Weiss A. 2001. T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.* 114 : 243—244.
- 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.
- Lord J. D., McIntosh B. C., Greenberg P. D., Nelson B. H. 2000. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the transactivation domain of Stat5. *J. Immunol.* 164 : 2533—2541.
- Marakhova I. I., Vereninov A. A., Toropova F. V., Vinogradova T. A. 1998. Na,K-ATPase pump in activated human lymphocytes: on the mechanisms of rapid and long-term increase in K influxes during the initiation of phytohemagglutinin-induced proliferation. *Biochim. biophys. acta.* 1368 : 61—72.
- Moriggl R., Sexl V., Piekorz R., Topham D., Ihle J. N. 1999a. Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signaling in peripheral T cells. *Immunity.* 11 : 2252—2230.
- Moriggl R., Topham D. J., Teglund S., Sexl V., McKay C., Wang D., Hoffmeyer A., van Deursen J., Sangster M. Y., Bunting K. D. 1999b. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity.* 10 : 249—259.
- 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.
- Oh H. M., Yu C. R., Golestaneh N., Amadi-Obi A., Lee Y. S., Ezeonu A., Mahdi R. M., Egwuagu C. E. 2011. STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *J. Biol. Chem.* 286 : 30 888—30 897.
- O'Shea J. J., Park H., Pesu M., Borie D., Changelian P. 2005. New strategies for immunosuppression: interfering with cytokines by targeting the Jak/Stat pathway. *Curr. Opin. Rheumatol.* 17 : 305—311.
- Robb R. J., Rusk C. M., Yodoi J., Greene W. C. 1987. Interleukin 2 binding molecule distinct from the Tac protein: analysis of its role in formation of high-affinity receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 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 : 221 622—221 623.
- 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.
- 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 : 24 935—24 944.

Поступила 22 II 2013

THE STAT5 SIGNALING IN THE EXPRESSION OF ALPHA-SUBUNIT OF INTERLEUKIN-2 RECEPTOR IN HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES

E. V. Mityushova,¹ A. N. Shatrova, V. V. Zenin, N. A. Aksenov, I. I. Marakhova

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

The comparative study of the STAT3 and STAT5 activity (as assessed by tyrosine phosphorylation level) and the expression of a α -subunit of interleukin-2 receptor (as examined by cytophotometric evaluation of the number of CD25⁺ cells) during the phytohemagglutinin (PHA)-induced proliferation of human blood lymphocytes (HBL) have been made. It has been revealed that the level of STAT3 phosphorylation is high in both resting and competent HBL and remains unchanged in the presence of PHA or interleukin-2 (IL-2). In contrast to STAT3, phosphorylation of STAT5 was not seen in both resting and competent HBL. We observed phosphorylation of STAT5 no earlier than 5 h after PHA stimulation and the maximum phosphorylation was detected following 24 h. Exogenous IL-2 induced high level of STAT5 phosphorylation in the competent HBL as early as at 30 min and this level of STAT5 phosphorylation kept in the next 24—48 h. The correlation between alterations in tyrosine phosphorylation level of STAT5 and the expression of CD25 has been established. WHI-P131, an inhibitor of JAK3 kinase, prevents STAT5 activation, cell surface expression of CD25 and lymphocyte proliferation. It has been concluded that JAK3/STAT5 signaling via IL-2 receptor is necessary to maintain the long-term expression of the high-affinity $\alpha\beta\gamma_c$ -receptor of IL-2 and optimal proliferation of HBL.

Key words: human lymphocytes, STAT3, STAT5, interleukin-2 receptor, α -subunit of the interleukin-2 receptor, CD25, JAK.