

## ПОВЕРХНОСТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ CD25 В КЛЕТКАХ ЛИМФОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ Jurkat

© А. Н. Шатрова, Е. В. Митюшова, Н. В. Аксенов, И. И. Марахова<sup>1</sup>

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>1</sup>*электронный адрес: iim@mail.cytspb.rssi.ru*

Методом проточной цитофлуориметрии по изменению числа клеток, несущих маркер CD25, выявлена поверхностная экспрессия  $\alpha$ -цепи рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2) в Т-клетках лимфоидной лейкемии Jurkat. Показано, что в пролиферирующих культурах ИЛ-2-независимой линии Jurkat фитогемагглютинин (ФГА, 5 мкг/мл) или ФГА совместно с форболовым эфиром (ФДБ, 10<sup>-8</sup> М) индуцирует появление клеток, несущих маркер CD25. Через 1 сут число клеток CD25<sup>+</sup> в культуре с ФГА или с ФГА совместно с ФДБ возрастает до 32.3 ± 3.4 (n = 11) и 44.8 ± 8.6 % (n = 6) соответственно. ИЛ-2 (200 ед./мл) или ФДБ совместно с ИЛ-2 не индуцирует поверхностную экспрессию CD25. Все испытанные вещества, регулирующие уровень пролиферации нормальных Т-лимфоцитов человека, не влияют на уровень пролиферации и рост культур клеток Jurkat. Исследовано влияние тирфостина WHI-P131 — ингибитора JAK/STAT-сигнального пути с рецептором ИЛ-2 — на экспрессию CD25 в клетках Jurkat. Обнаружено, что в отличие от нормальных лимфоцитов крови человека WHI-P131 не уменьшает число индуцированных клеток CD25<sup>+</sup>, но тормозит рост культур, вызывая остановку клеточного цикла на границе фаз G<sub>2</sub>/M. Сделан вывод о том, что трансформированные Т-клетки Jurkat, способные к пролиферации в среде без ИЛ-2, не утратили механизм индукции  $\alpha$ -субъединицы рецептора ИЛ-2, а WHI-P131 — ингибитор тирозинкиназы JAK3, ассоциированной с рецептором ИЛ-2, в трансформированных Т-клетках вызывает остановку клеточного цикла и имеет помимо JAK3 иные мишени.

**Ключевые слова:** Т-клетки Jurkat, клеточный цикл, CD25, JAK3, WHI-P131.

**Принятые сокращения:** ИЛ-2 — интерлейкин-2, ФГА — фитогемагглютинин, ФДБ — форбол 12,13-дигутириловый эфир, PI — иодистый пропидий, JAK — janus tyrosine kinase, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор, STAT — signal transducers and activators of transcription.

Экспрессия  $\alpha$ -цепи рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2) и формирование рецептора ИЛ-2 с высоким сродством к ИЛ-2 являются решающим моментом в цепи событий, регулирующих пролиферацию и иммунный ответ Т-лимфоцитов. Нарушение механизмов, контролирующих экспрессию рецептора ИЛ-2, лежит в основе ряда аутоиммунных заболеваний и иммунодефицита (Leonard, 2001a; Ross et al., 2007; Rochman et al., 2009; Frank, 2012). Установлено, что непосредственной причиной нарушений регуляции пролиферации в этих случаях являются изменения, связанные с дефектами JAK/STAT-сигнализации с рецептором ИЛ-2 (Leonard, 2001b).

В то же время при развитии разных форм лейкозов в Т-клетках появляются конститутивно активные формы белков STAT (в первую очередь STAT3 и STAT5), что приводит к транскрипции генов, ответственных за трансформацию клеток (Frank, 1999). Показано, что сигнализация с участием белков-транскрипционных факторов STAT является критичной при развитии острых и хронических лейкемий у человека (Lin et al., 2000). Высказывается предположение о том, что белки STAT в зависимости от типа Т-клетки — нормальная или трансформированная — могут иметь разные мишени и играть разную роль в судьбе клетки. Так, в лимфоцитах периферической крови человека высокая активность STAT5, характеризу-

ющая ИЛ-2-зависимую стадию клеточного ответа на антиген, является необходимым условием экспрессии  $\alpha$ -субъединицы рецептора ИЛ-2, формирования высокоаффинного рецептора и вступления в цикл размножения, что и обеспечивает клональную экспансию и формирование полноценного иммунного ответа.

Т-клеточная линия Jurkat была получена на основе клеток острого лимфобластного лейкоза (Schneider et al., 1977). Как и в нормальных покоящихся Т-лимфоцитах человека, в клетках Jurkat на поверхности не экспрессируется CD25 — маркер  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2, указывающий на присутствие в мембране высокоаффинного рецептора ИЛ-2.

Цель настоящего исследования — выяснить возможность индукции CD25 в клетках Jurkat и оценить роль JAK/STAT-сигнализации как в поддержании пролиферации этих клеток, так и в экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-2. Результаты проведенного нами исследования показывают, что лимфоидные клетки Jurkat не утратили механизм индукции  $\alpha$ -субъединицы рецептора ИЛ-2, а WHI-P131 — ингибитор тирозинкиназы JAK3, ассоциированной с рецептором ИЛ-2, в неограниченно пролиферирующих трансформированных Т-клетках вызывает остановку клеточного цикла и имеет помимо JAK3, иные мишени.

## Материал и методика

Культивирование клеток и обработка ингибитором. Клетки лимфоидной лейкемии человека Jurkat E6-1, полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), культивировали в среде RPMI, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия), при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °C. Клетки пересевали из расчета 300 тыс./мл по мере роста культуры, обычно 3 раза в неделю, и культивировали до плотности 1 млн/мл. Ингибитор киназ семейства JAK, обладающий повышенной селективностью в отношении протеинкиназы JAK3, — WHI-P131 (Sudbeck et al., 1999) — вносили в среду культивирования на 2-е сут после посева. Через 24—48 ч в обработанных ингибитором клетках оценивали уровень экспрессии CD25 и пролиферации, а также жизнеспособность клеток с помощью проточной цитометрии, используя цитометр Coulter Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter), снабженный аргоновым лазером 488 нм.

Для оценки экспрессии CD25 клетки метили FITC-конъюгированными антителами против CD25 в течение 30 мин в PBS при 4 °C. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии со стандартным протоколом обработки данных EpicsXL.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла (пролиферативный ответ). Лимфоциты перед измерением инкубировали 30 мин в PBS, содержащем 0.02 % сапонина. После отмычки от сапонина клетки окрашивали в растворе PBS, содержащем 50 мкг/мл иодистого пропидия (PI) и 250 мкг/мл рибонуклеазы (30—40 мин, 37 °C), и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Жизнеспособность клеток после культивирования в присутствии WHI-P131 оценивали по количеству «живых» и «мертвых» клеток с использованием флуоророма PI. PI проникает через мембрану погибших клеток и интеркалирует в ДНК. К супензии необработанных и обработанных WHI-P131 клеток добавляли 50 мкг/мл PI, перемешивали в течение 30 с и анализировали с помощью цитометра при максимальной скорости подачи образца (1 мкл/с) в течение 100 с. Сбор данных осуществляли на основе оптических характеристик — флуоресценция PI против прямого светорассеяния (FSLOG/FL4LOG) в логарифмической шкале. Для определения доли погибших клеток в каждом образце «живые» и «мертвые» (PI-негативные и PI-позитивные) клетки выделяли в отдельные окна. Для построения цитограмм использовали программу WinMDI версия 2.8. Для проверки окрашиваемости клеток Jurkat после инкубирования с WHI-P131 или без него в суспензии клеток добавляли PI в концентрации 50 мкг/мл.

В работе использовали следующие реактивы: интерлейкин-2 (Биотех, Россия); ФГА-М, форбол 12,13-дибутириловый эфир, сапонин, иодистый пропидий и WHI-P131 (Sigma, США); РНКаза (Serva, Германия); FITC-окрашенные антитела против CD25 (Invitrogen, США); среда RPMI (Биолот, Россия). Растворы ФГА (1 мг/мл) готовили на 0.14 М NaCl, раствор WHI-P131 — на диметилсульфоксиде, концентрация которого в тестирующих растворах с клетками не превышала 0.05 %.

## Результаты и обсуждение

Использованные в настоящей работе пролиферирующие культуры клеток лимфоидной лейкемии человека линии Jurkat содержали до 73 % клеток, экспрессирующих на поверхности Т-клеточный маркер CD3. Как показали цитометрические данные, Т-клетки Jurkat не экспрессируют CD25 — маркер альфа-цепи рецептора ИЛ-2 — и, следовательно, не обладают высокоаффинным рецептором ИЛ-2, присутствие которого в поверхностной мембране является необходимым для поддержания пролиферации нормальных Т-клеток человека. Из литературы известно, что культивируемые лимфоидные клетки Jurkat производят собственный ИЛ-2 и поддерживают высокий пролиферативный потенциал в отсутствие экзогенного ИЛ-2 (Pawelec et al., 1982; Uittenbogaart et al., 1983).

Лектин ФГА, являясь митогеном для Т-лимфоцитов, индуцирует полный комплекс пострецепторных сигнальных событий, опосредованный активацией Т-клеточного рецепторного комплекса (Smith-Garvin et al., 2009). Как видно на гистограммах рис. 1, *a*, после культивирования клеток Jurkat в присутствии ФГА (10 мкг/мл) в популяции появляются клетки, несущие на поверхности CD25+. В присутствии ФГА через 1 сут число клеток CD25+ в культуре составляло 34.3 ± 3.4 % (n = 8), что сравнимо с числом клеток CD25+, индуцированных ФГА в покоящихся Т-лимфоцитах крови человека (Зенин и др., 2011).

Известно, что в Т-лимфоцитах форболовые эфиры, активируя зависимые от протеинкиназы С сигнальные пути, усиливают митогенное действие ФГА (Kumagai et al., 1988; McCrady et al., 1988; Marakhova et al., 2005). В клетках Jurkat форболовый эфир (форбол 12,13-дибутириловый эфир, ФДБ) сам по себе незначительно увеличивал уровень экспрессии CD25, но заметно усиливал действие ФГА (рис. 1, *a*). Через 1 сут в культуре с ФГА и ФДБ число клеток CD25+ возрастало до 46.8 ± 8.6 % (n = 6) (рис. 1, *b*). К концу 1-суточной инкубации клеток Jurkat с ФГА или с ФГА совместно с ФДБ в части популяции отмечали также увеличение размеров клеток, регистрируемое по появлению FITC-окрашенных клеток в правом верхнем квадрате гистограмм (рис. 1, *a*).

Мы увидели, что в присутствии ФДБ (10—20 нМ) на поверхности клеток происходит постепенное снижение уровня экспрессии CD4 (маркер Т-хелперов) (данные не приводятся). Данное явление, отмеченное ранее в литературе при активации Т-клеток форболовыми эфирами, связывают с интернализацией молекул CD4 (Taurine et al., 1992; Sleckman et al., 1992). Поверхностный гликопротеин CD4 ассоциирован с тирозинкиназой p56lck, которая участвует как в активации Т-рецепторного комплекса при взаимодействии клетки с антигеном, так и в необратимой интернализации молекул CD4 при действии форболовых эфиров (Yoshida et al., 1992). В связи с таким свойством ФДБ в нашей работе для индукции CD25 использовали преимущественно ФГА, что позволяло оценивать изменения численности клеток CD25+, относящихся к популяции Т-хелперов, т. е. клеток CD4+ CD25+.

ФГА и ФГА совместно с ФДБ не влияли на уровень пролиферации клеток Jurkat и их распределение по фазам клеточного цикла (рис. 2).

ИЛ-2, ростовой фактор Т-клеток, не стимулирует экспрессию CD25 в покоящихся Т-лимфоцитах человека, но способен индуцировать ее в компетентных Т-лимфоцитах, которые предварительно активированы слабыми ми-

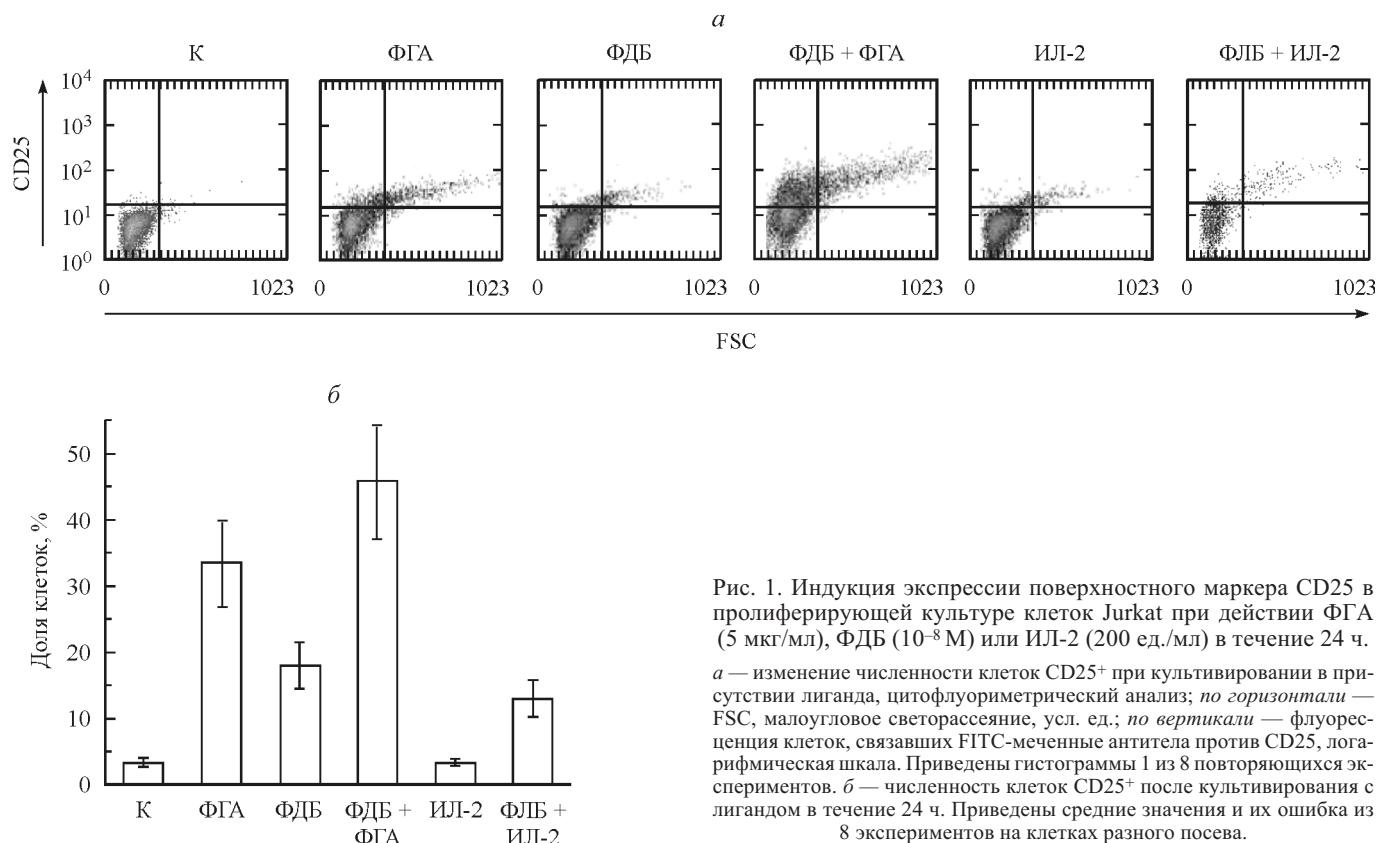


Рис. 1. Индукция экспрессии поверхностного маркера CD25 в пролиферирующей культуре клеток Jurkat при действии ФГА (5 мкг/мл), ФДБ ( $10^{-8}$  М) или ИЛ-2 (200 ед./мл) в течение 24 ч.

*a* — изменение численности клеток CD25<sup>+</sup> при культивировании в отсутствии лиганда, цитофлуориметрический анализ; по горизонтали — FSC, малоугловое светорассеяние, усл. ед.; по вертикали — флуоресценция клеток, связавших FITC-меченные антитела против CD25, логарифмическая шкала. Приведены гистограммы 1 из 8 повторяющихся экспериментов. *б* — численность клеток CD25<sup>+</sup> после культивирования с лигандом в течение 24 ч. Приведены средние значения и их ошибка из 8 экспериментов на клетках разного посева.

тогенами (ФДБ, немитогенные концентрации ФГА) (Митюшова и др., 2013). Оказалось, что в отличие от нормальных лимфоцитов ИЛ-2 (50—200 ед./мл), внесенный в пролиферирующую культуру Jurkat в сочетании с ФДБ или без ФДБ, не индуцировал поверхностную экспрессию CD25 (рис. 1). ИЛ-2 также не влиял на уровень пролиферации Jurkat (данные не приводятся). Эти результаты подтверждают, что Т-клеточная линия Jurkat способна поддерживать высокий уровень пролиферации в культуре в отсутствие экзогенного ИЛ-2 — одного из цитокинов, который необходим для запуска и поддержания пролиферации нормальных Т-лимфоцитов, стимулированных антигеном. Считается, что у клеток Jurkat функционирует механизм аутокринной стимуляции с участием того ИЛ-2, который продуцируется самой клеткой (Pawelec et al., 1982). В этом случае в отсутствие CD25 ( $\alpha$ -цепи рецептора) стимулирующее влияние ИЛ-2 на пролиферацию клеток Jurkat должно осуществляться через receptor ИЛ-2, образованный двумя субъединицами ( $\beta$  и  $\gamma$ ) и обладающий низкой аффинностью в отношении ИЛ-2.

В нормальных Т-лимфоцитах действие ИЛ-2 опосредуется через ассоциированные с рецептором ИЛ-2 тирозинкиназы JAK1 и JAK3 и транскрипционные факторы STAT (Lin, Leonard, 2000; Leonard, 2001a; Hennighausen, Robinson, 2008). Как показано в опытах на мышах с нокаутом по STAT3 и STAT5, в нормальных Т-лимфоцитах крови STAT5 регулирует ИЛ-2-зависимую экспрессию в клеточном цикле (Moriggl et al., 1999). Ранее мы нашли, что в Т-лимфоцитах человека высокое содержание фосфорилированных форм STAT5 сопряжено с индукцией CD25 и формированием полноценного высокоаффинного рецептора ИЛ-2, в состав которого кроме  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц входит  $\alpha$ -субъединица (Митюшова и др., 2013).

Для ответа на вопрос о том, участвует ли JAK3/STAT5-сигнализация в экспрессии CD25, индуцированной ФГА у Т-клеток Jurkat, мы использовали ингибитор киназ JAK тирфостин WHI-P131, который обладает селективностью в отношении киназы JAK3 (по сравнению с JAK1) и способен выключать JAK/STAT-сигнализацию в нормальных Т-клетках (Sudbeck et al., 1999). В серии экспериментов, выполненных на культуре Jurkat одного происхождения (одной разморозки), мы увидели, что WHI-P131 в одной и той же концентрации (50 мкМ), которая соответствует IC<sub>50</sub> для этого ингибитора, снижал или не влиял, а в подавляющем числе экспериментов увеличивал число клеток CD25<sup>+</sup> в культуре Jurkat, стимулированной ФГА (рис. 3). Число клеток CD25<sup>+</sup> нарастало с увеличением концентрации WHI-P131 (рис. 3, б). При одной и той же концентрации ингибитора число клеток CD25<sup>+</sup> увеличивалось также с увеличением времени инкубации культур с WHI-P131 (данные не приводятся). Замечено, однако, что во всех экспериментах WHI-P131 уменьшал количество мелких клеток CD25<sup>+</sup>, а общее количество индуцированных клеток CD25<sup>+</sup> увеличивалось за счет возрастания доли крупных клеток CD25<sup>+</sup> (рис. 3, в). Складывается впечатление, что WHI-P131 препятствует не только запуску экспрессии CD25, но и в его присутствии со временем происходят увеличение размеров клеток и накопление клеток CD25<sup>+</sup> в популяции.

Наблюдения за ростом культур клеток Jurkat обнаружили, что WHI-P131 тормозит пролиферацию, вызывая остановку клеточного цикла в фазах G<sub>2</sub> и M. Цитограммы, представленные на рис. 2, а, показывают, что через 20 ч в культуре Jurkat, которая поддерживалась в присутствии ФГА и WHI-P131 в разных концентрациях (30, 50 и 80 мкМ), число клеток на границе фаз G<sub>2</sub>/M возрастало с

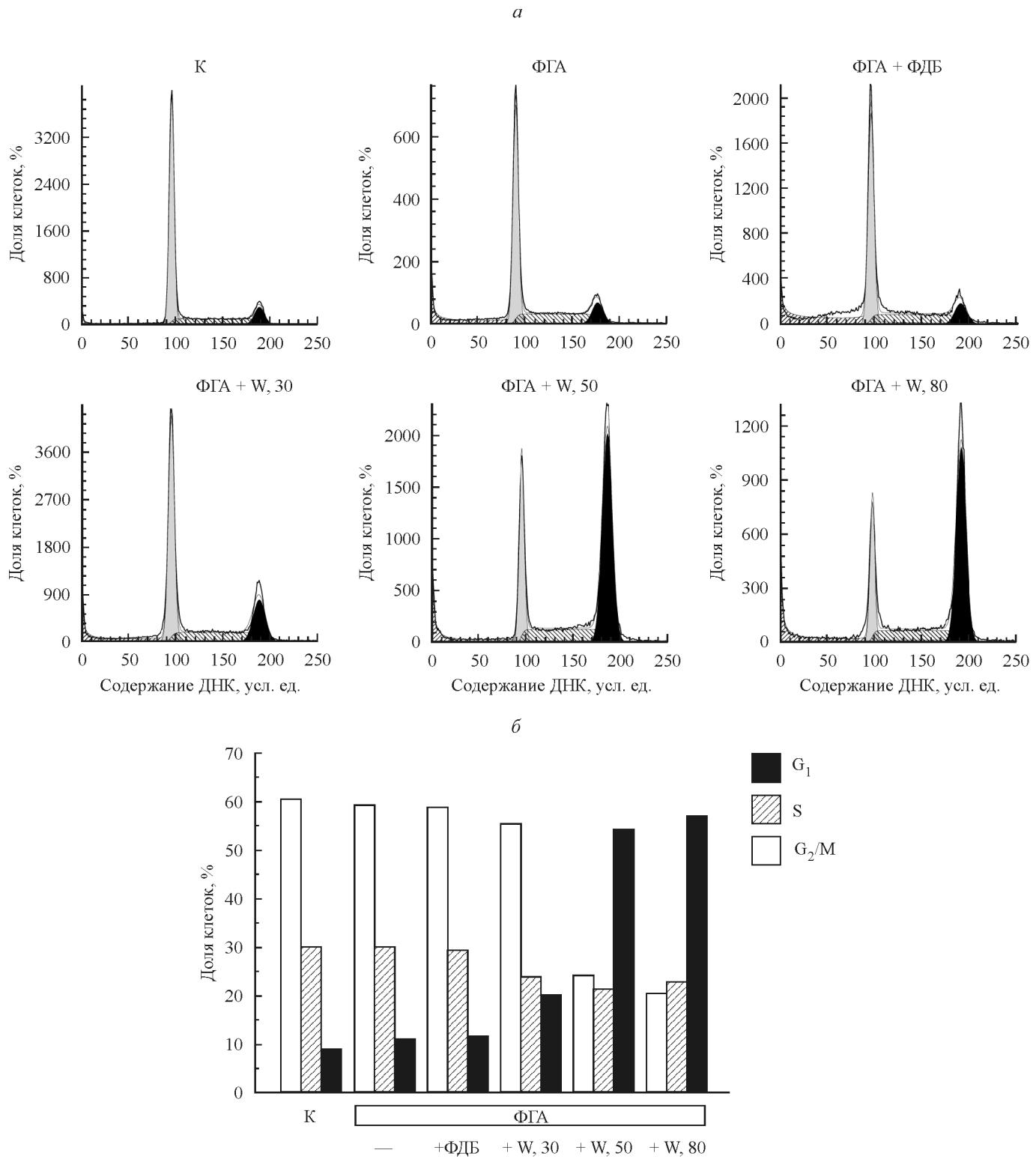


Рис. 2. Распределение клеток Jurkat по фазам клеточного цикла при 20-часовой стимуляции одним ФГА или ФГА совместно с WHI-P131 или с ФДБ. ФГА не влияет на пролиферацию клеток Jurkat, а WHI-P131 останавливает клетки на границе фаз G<sub>2</sub>/M клеточного цикла.

Данные проточной цитометрии (*a*) и гистограммы (*b*), построенные по этим данным в 1 из 3 повторяющихся экспериментов. К — контроль, концентрации агентов: ФГА — 5 мкг/мл, ФДБ — 10<sup>-8</sup> М, WHI-P131 (W) — 30, 50 или 80 мкМ.

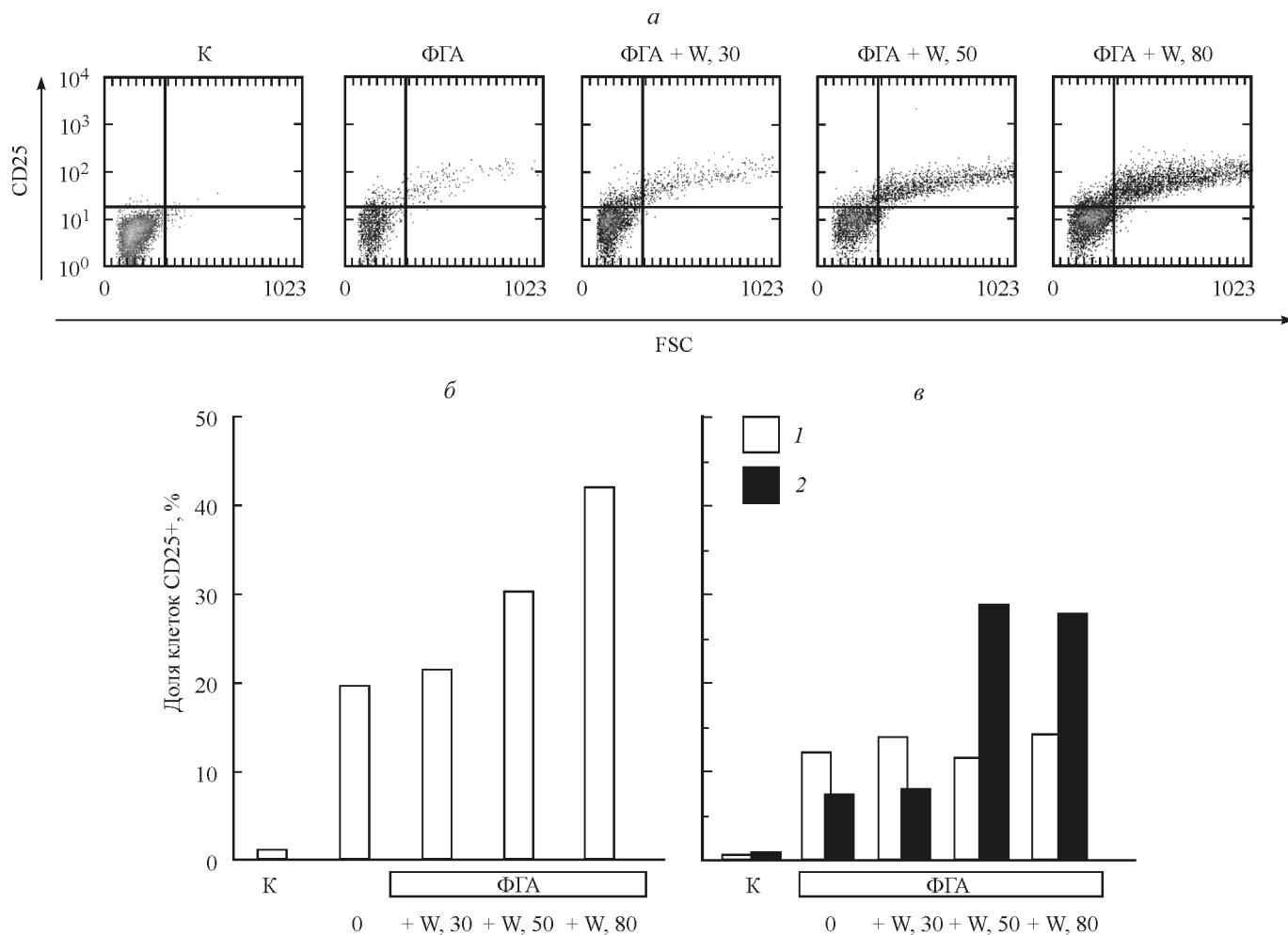


Рис. 3. Поверхностная экспрессия CD25 в клетках Jurkat при культивировании в течение 20 ч в присутствии ФГА (5 мкг/мл) или ФГА совместно с WHI-P131 (W) в концентрации 30, 50 или 80 мкМ.

Показано изменение численности клеток CD25+. *a*—данные цитофлуориметрии (*по оси*—то же, что и на рис. 1, *a*); *б*, *в*—гистограммы на ее основе. 1 и 2 (*в*)—соответственно доля мелких и крупных клеток CD25+. Приведены репрезентативные гистограммы 1 из 4 экспериментов.

9.1 до 20.4, 54.3 и 56.9 % соответственно (рис. 2, *б*). Следует отметить, что одновременно с нарастанием числа клеток на границе фаз G<sub>2</sub>/M заметно уменьшалось число клеток в фазе G<sub>1</sub>, при этом за 1 сут действия ингибитора численность клеток в фазе S оставалась практически без изменений.

Выяснилось далее, что WHI-P131 вызывает характерные изменения в структуре клеточного цикла и в том случае, если присутствует в культуре Jurkat без ФГА. Как показано на рис. 4, при культивировании с WHI-P131 (50 мкМ) через 20 ч число клеток в фазах G<sub>2</sub> и M клеточного цикла возрастало с 9.9 до 53.0 % (без ФГА) и с 12.0

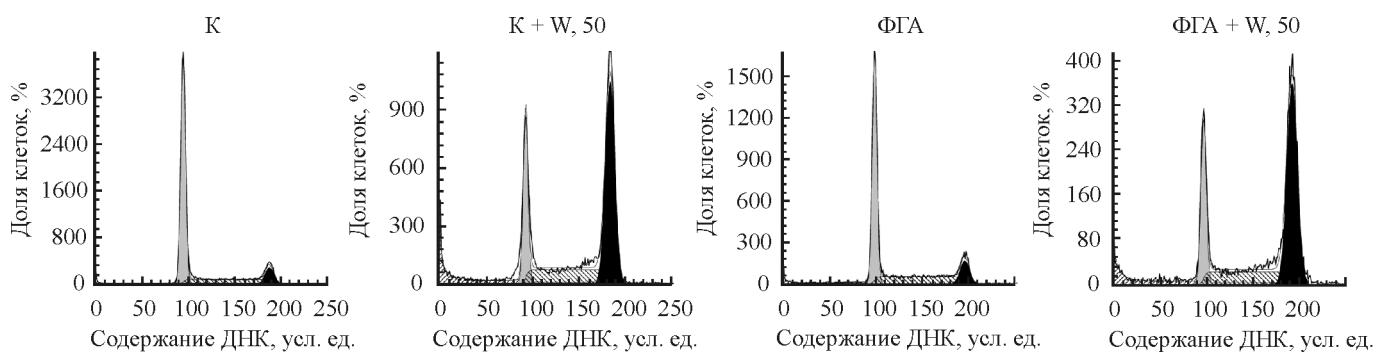


Рис. 4. Изменение распределения по фазам клеточного цикла клеток Jurkat, растущих в присутствии 50 мкМ WHI-P131 (W) в течение 20 ч без ФГА или с ФГА (5 мкг/мл). Цитофлуориметрический анализ.

WHI-P131 тормозит пролиферацию, вызывая остановку клеток на границе фаз G<sub>2</sub>/M клеточного цикла. Приведены гистограммы 1 из 3 экспериментов.

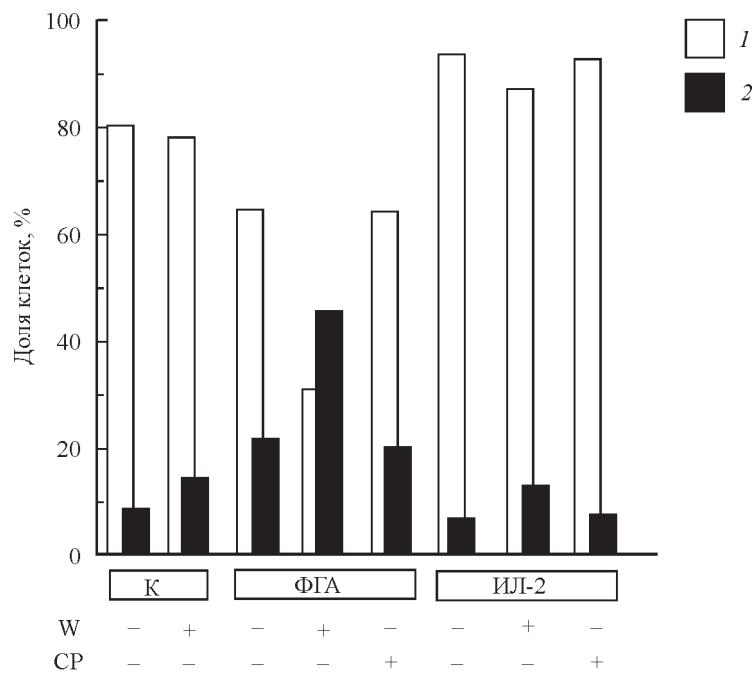


Рис. 5. Влияние WHI-P131 и CP-690550 на жизнеспособность клеток Jurkat.

Изменение численности клеток, не окрашенных (1) и окрашенных (2) PI после культивирования в течение 20 ч с ФГА или ИЛ-2 в присутствии или в отсутствие ингибиторов WHI-P131 (W, 50 мкМ/мл) или CP-690550 (CP, 0,5 мкМ). К — контроль. Приведены результаты 1 из 4 экспериментов, проведенных по одной схеме.

до 53,3 % (с ФГА). В совокупности полученные данные позволили сделать вывод, что WHI-P131 в пролиферирующих клетках лимфоидной лейкемии Jurkat оказывает антитрополиферативное действие, вызывая блок клеточного цикла на границе фаз G<sub>2</sub>/M.

Для оценки возможного влияния WHI-P131 на жизнеспособность клеток Jurkat провели цитометрические измерения доли клеток, окрашенных PI. Оказалось, что в культурах, которые в течение 20 ч поддерживались в полноценной ростовой среде с добавками активирующих агентов (ФГА и ФДБ) или без них, WHI-P131 всегда снижал число не окрашенных PI живых клеток и одновременно увеличивал число окрашенных, погибших клеток. Как следует из данных на рис. 5, после инкубации клеток Jurkat с WHI-P131 (50 мкМ) доля окрашенных клеток возросла в 1,7—1,8 раза (ростовая среда с сывороткой или с ИЛ-2) и в 2,5 раза (на фоне ФГА), при этом сам по себе ФГА (без WHI-P131) вызывал также гибель клеток: после действия ФГА в митогенной концентрации число клеток, окрашенных PI, возрастало в 2—2,3 раза по сравнению с нестимулированными культурами. Число погибших клеток увеличивалось с увеличением концентрации WHI-P131 и с увеличением продолжительности эксперимента (данные не приводятся). Как свидетельствуют данные на рис. 5, CP-690 550, другой ингибитор тирозинкиназы JAK3, уже применяемый в медицинской практике в качестве лекарственного средства, не увеличивал число клеток, окрашенных PI в присутствии ФГА или ИЛ-2 (Vijayakrishnan et al., 2011).

Из совокупности полученных данных можно сделать вывод о том, что WHI-P131, известный ингибитор JAK/STAT-сигнального пути, применяемый в экспериментах для подавления активности тирозинкиназы JAK3, тормозит пролиферацию Т-клеток линии Jurkat, вызывая G<sub>2</sub>/M-остановку клеточного цикла. Тот факт, что WHI-P131 проявляет антитрополиферативное действие в

условиях культивирования клеток без ФГА или ИЛ-2, дает основание предполагать, что в клетках этот ингибитор может иметь в качестве мишени не только ассоциированные с рецептором ИЛ-2 тирозинкиназы JAK, но также подавлять пролиферацию трансформированных Т-клеток, используя иные сигнальные пути. В связи с этим следует отметить, что ранее остановку размножения клеток в культуре в присутствии WHI-P131 вследствие блока клеточного цикла на границе фаз G<sub>2</sub>/M мы описали для клеток хронической лейкемии K562 (Митюшова и др., 2010). Эта клеточная линия является представителем эритроидного ряда клеток крови.

В последние годы активно проводится поиск специфичных и эффективных ингибиторов JAK/STAT-сигнализации, которые могут использоваться при лечении аутоиммунных и лимфоидных заболеваний (Frank, 2012). Установлено, что белок-транскрипционный фактор STAT можно «выключить» в клетках без значительных токсических последствий, в связи с чем становится привлекательным использовать его в качестве терапевтической мишени (Walker, Frank, 2012). Следует отметить, что тестирование фармакологических веществ-ингибиторов часто проводится на нормальных клетках. Необходимо, однако, принимать во внимание, что по сравнению с нормальными Т-клетками в процессах поддержания пролиферации трансформированных Т-клеток могут участвовать одни и те же сигнальные молекулы, но в разных сочетаниях. Как показывают результаты проведенного исследования, ингибирование протеинкиназ JAK в присутствии WHI-P131 приводит к разным последствиям в нормальных Т-лимфоцитах крови человека и неограниченно пролиферирующими трансформированными Т-клеточными линиями. В нормальных Т-лимфоцитах человека WHI-P131 тормозит запуск пролиферативного ответа, останавливая клеточный цикл в фазе G<sub>1</sub> и не оказывая токсического действия (Karytskaya et al., 2010; Митюшо-

ва и др., 2013). Причина отмены запуска пролиферативного ответа в нормальных Т-клетках состоит в выключении JAK/STAT-сигнализации, подавлении экспрессии высокоаффинного рецептора ИЛ-2 и неспособности поддержать ИЛ-2-зависимую стадию пролиферативного ответа. По результатам нашего исследования, WHI-P131 нельзя считать фармакологическим агентом, антипролиферативное действие которого в трансформированных Т-лимфоцитах Jurkat ограничивается выключением JAK/STAT-сигнального пути. Какие именно сигнальные пути оказываются дополнительно вовлечеными у этих клеток в процесс остановки клеточного цикла в присутствии WHI-P131, предстоит выяснить.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00234-а) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

### Список литературы

- Zenin B. B., Aksенов Н. Д., Шатрова А. Н., Митюшова Е. В., Марахова И. И. 2011. Поверхностная экспрессия CD25 на разных стадиях запуска пролиферативного ответа лимфоцитов человека. I. Роль тирозинкиназ семейства JAK и Src по данным ингибиторного анализа. Цитология. 53 (8) : 645—651. (Zenin V. V., Aksenov N. A., Shatrova A. N., Mityushova E. V., Marakhova I. I. 2011. The surface expression of CD25 in human lymphocytes at different stages of proliferative response. I. The role of JAK and Src tyrosine kinases as revealed by inhibitory analysis. Tsitologiya. 53 (8) : 645—651.)
- Митюшова Е. В., Аксенов Н. Д., Марахова И. И. 2010. Роль STAT5 в пролиферации культур клеток хронической лейкемии K562 : анализ ингибирующего действия WHI-P131. Цитология. 52 (2) : 184—190. (Mityushova E. V., Aksenov N. D., Marakhova I. I. 2010. STAT5 in regulation of chronic leukemia K562 cell proliferation: inhibitory effect of WHI-P131. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 4 (1) : 63—69.)
- Митюшова Е. В., Шатрова А. Н., Зенин В. В., Аксенов Н. Д., Марахова И. И. 2013. Роль белка STAT5 в экспрессии альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в лимфоцитах человека. Цитология. 55 (6) : 421—429. (Mityushova E. V., Shatrova A. N., Zenin V. V., Aksenov N. A., Marakhova I. I. 2013. The STAT5 signaling in the expression of alpha-subunit of interleukin-2 receptor in human blood lymphocytes. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 7 : 397—406.)
- Frank D. A. 1999. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. Mol. Med. 5 : 432—456.
- Frank D. A. 2012. Targeting STATs for cancer therapy. JAK-STAT. 1 : 1—2.
- Hennighausen L., Robinson G. W. 2008. Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. Genes Develop. 22 : 711—721.
- Karitskaya I., Aksenov N., Vassilieva I., Zenin V., Marakhova I. 2010. Long-term regulation of Na,K-ATPase pump during T-cell proliferation. Eur. J. Physiol. 460 : 777—789.
- 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. 2001a. Role of JAK kinases and STATs in cytokine signal transduction. Int. J. Hematol. 73 : 271—277.
- Leonard W. J. 2001b. Cytokines and immunodeficiency diseases. Nat. Rev. Immunol. 1 : 200—208.
- Lin J. X., Leonard W. J. 2000. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. Oncogene. 19 : 2566—2576.
- Lin T. S., Mahajan S., Frank D. A. 2000. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. Oncogene. 19 : 2496—2504.
- 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.
- McCrady C. W., Ely C. M., Westin E., Carchman R. A. 1988. Coordination and reversibility of signals for proliferative activation and interleukin-2 mRNA 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., Teqlund S., Sexl 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 signalling in peripheral T cells. Immunity. 11 : 225—230.
- Pawelec G., Borowitz A., Krammer P. H., Wernet P. 1982. Constitutive interleukin 2 production by the Jurkat human leukemic T cell line. Eur. J. Immunol. 12 : 387—392.
- 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.
- Schneider U., Schwenk H. U., Bornkamm G. 1977. Characterization of EBV-genome negative «null» and «T» cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. Int. J. Cancer. 19 : 621—626.
- Sleckman B. P., Shin J., Igras V. E., Collins T. L., Strominger J. L., Burakoff S. J. 1992. Disruption of the CD4-p56lck complex is required for rapid internalization of CD4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 : 7566—7570.
- 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.
- Touraine J. L., Sanhadji K., Benard I. 1992. Phorbol ester induces down-regulation of CD4 molecule expression and resistance to *in vitro* infection by HIV1. Thymus. 20 : 239—248.
- Uittenbogaart C. H., Cantor Y., Fahey J. L. 1983. Growth of human malignant lymphoid cell lines in serum-free medium. In Vitro. 19 : 67—72.
- Yoshida H., Koga Y., Nakamura K., Kimura G., Nomoto K. 1992. A lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, p56lck, regulates the PMA-induced internalization of CD4. Biochim. biophys. acta. 1137 : 321—330.
- Vijayakrishnan L., Venkataraman R., Gulati P. 2011. Treating inflammation with the Janus kinase inhibitor CP-690,550. Trends Pharmacol. Sci. 32 : 25—34.
- Walker S. R., Frank D. A. 2012. Screening approaches to generating STAT inhibitors: Allowing the hits to identify the targets. JAK/STAT. 14 : 292—299.

## THE INDUCTION OF CD25 EXPRESSION IN Jurkat T CELLS

*A. N. Shatrova, E. V. Mityushova, N. V. Aksakov, I. I. Marakhova<sup>1</sup>*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: iim@mail.cytspb.rssi.ru

The expression of an  $\alpha$ -subunit of interleukin-2 receptor (IL-2R $\alpha$ ) was assessed by quantifying activation-induced upregulation of CD25 in IL-2-independent Jurkat leukemic cell line. It has been found that in growing Jurkat culture within 24 h, phytohemagglutinin (PHA, 5  $\mu$ g/ml) or PHA in combination with 12,13-phorbol dibutyrate (PDBu, 10 $^{-8}$ M) increase the number of CD25 $^{+}$  cells to 32.3  $\pm$  3.4 % (n = 11) and 44.8  $\pm$  8.6 % (n = 6) respectively. Interleukin-2 (IL-2, 200 U/ml) alone or in combination with PDBu did not induce CD25 expression in Jurkat cells. All the tested stimulatory agencies affected neither the proliferation status nor the growth of Jurkat cell cultures. In contrast to human blood T cells, WHI-P131, a selective pharmacological inhibitor of JAK/STAT signaling and CD25 expression, did not decrease the number of induced CD25 $^{+}$  cells in Jurkat culture. Flow cytometry analysis revealed a dose-dependent decrease in the proportion of cells in G<sub>1</sub> phase and an increase in the proportion of cells in G<sub>2</sub>/M phase in WHI-P131-treated Jurkat cultures. It has been also found that WHI-P131 induces G<sub>2</sub>/M arrest in the absence of PHA or PDBu. We have concluded that (1) the IL-2-independent T cells of Jurkat line had not lost the mechanism for IL-2R $\alpha$  expression in response to T cell receptor activation, (2) in the transformed T cells, WHI-P131 can arrest cell cycle at G<sub>2</sub>/M phase and has effects on targets other than IL-2 receptor-associated tyrosine kinase JAK3.

**Key words:** Jurkat T cells, CD25, JAK3, WHI-P131.