

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

На правах рукописи

Юрова Кристина Алексеевна

**РОЛЬ ЦИТОКИНОВ, ИМЕЮЩИХ ОБЩУЮ  $\gamma$ -ЦЕПЬ РЕЦЕПТОРОВ  
(IL-2, IL-7, IL-15) В РЕГУЛЯЦИИ МЕХАНИЗМОВ МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК**

03.03.01 – физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,  
Л.С. Литвинова

Калининград - 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	13
1.1. Механизмы формирования и поддержания иммунной памяти	13
1.2. Семейство цитокинов с общей гамма ( $\gamma$ ) цепью	15
1.2.1. IL-2 и его рецептор: строение, функции, влияние на гомеостаз Т-клеток	16
1.2.2. IL-7 и его рецептор: строение, функции, влияние на гомеостаз Т-клеток	19
1.2.3. IL-15 и его рецептор: строение, функции, влияние на гомеостаз Т-клеток	20
1.3. Роль CD4 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> лимфоцитов в генерации иммунной памяти	22
1.4. Общий лейкоцитарный рецептор - молекула CD45: строение и функциональные особенности	25
1.5. Альтернативный сплайсинг молекулы CD45	28
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	38
2.1. Объект и материал исследования	38
2.2. Методы исследования	38
2.2.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови	40
2.2.2. Выделение «наивных» (CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> ) и «примированных» (CD45RO <sup>+</sup> ) Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации	40
2.2.3. Культивирование Т-клеток разной степени дифференцировки (CD45RO <sup>+</sup> и CD45RA <sup>+</sup> )	43
2.2.4. Определение общего числа клеток (в мл) и количества жизнеспособных лимфоцитах в культурах CD45RA и CD45RO <sup>+</sup> Т-клеток методом проточной цитометрии	45
2.2.5. Определение поверхностных молекул - CD4, CD8 и CD28 на Т-клетках разной степени дифференцировки методом проточной цитометрии	46
2.2.6. Определение поверхностных маркеров конверсии наивных Т-клеток в Т-клетки иммунной памяти (CD45RA/CD45RO) методом проточной цитометрии	47
2.2.7. Выделение тотальной РНК	47
2.2.8. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК	49
2.2.9. Определение уровня относительной экспрессии генов методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени	50
2.2.10. Методы статистического анализа данных	53
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	55
3.1. Оценка эффектов иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\gamma$ цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на жизнеспособность и общее количество клеток ( $10^6$ /мл) в	55

культурах Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки и разный активационный статус	
3.2. Оценка эффектов иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\square$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на мембранную экспрессию молекулы позитивной костимуляции (CD28) в CD4 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> субпопуляциях культур Т-лимфоцитов (CD4; CD8), имеющих разную степень дифференцировки и разный активационный статус	58
3.3. Оценка влияния иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\square$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на экспрессию генов <i>Gfi1</i> и <i>U2afll4</i> в культурах Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки и разный активационный статус	62
3.4. Оценка влияния иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\square$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на экспрессию гена <i>hnRNPLL</i> в культурах активированных и неактивированных Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки и разный активационный статус	66
3.5. Оценка влияния иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\square$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на конверсию фенотипа наивных Т-клеток в Т-клетки памяти.	70
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	<b>75</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>109</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>110</b>

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
кДНК – копияная дезоксирибонуклеиновая кислота  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
ARS- активационно-ответная последовательность (*activation-responsive sequence*)  
Bcl – антиапоптотический фактор  
CD – кластер дифференцировки (*cluster of differentiation*)  
Fas – апоптотический антиген  
Gfi1 (*Gfi1*) – фактор транскрипции (*growth factor independent 1*)  
hnRNPL – гетерогенный ядерный нуклеопротеин (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like*)  
IL - интерлейкин  
Jak - тирозинкиназа  
МНС – главный комплекс гистосовместимости (*major histocompatibility complex*)  
NK – натуральные киллеры  
PTPBC – белок тирозиновая фосфатаза, рецепторный тип (*Protein Tyrosine-Phosphatase, Receptor Type*).  
qPCR – количественная полимеразная цепная реакция (*Quantitative polymerase chain reaction*)  
STAT – фактор транскрипции эукариот  
TCR – Т-клеточный рецептор (*T-cell receptor*)  
Th – Т-хелперы  
U2AF26 (U2af114) – вспомогательный фактор сплайсинга (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4*)

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Для нормального функционирования иммунной системы требуется как значительное разнообразие составляющих ее клеток, так и быстрая способность клеточного звена адаптироваться и реагировать на изменение условий окружающей среды. Цикл функциональных преобразований иммунокомпетентных клеток в ответ на их антигенную стимуляцию требует изменения экспрессии множества белков. В связи с этим, приоритетной задачей физиологии иммунного ответа является выяснение механизмов регуляции генной активности клеток врожденного и адаптивного иммунитета (Mustelin T., Tasken K., 2003; De Arras L., Alper S., 2013). Одним из таких механизмов является альтернативный сплайсинг. Современные исследования показывают, что первичные транскрипты почти 95% всех генов человека подвергаются альтернативному сплайсингу, причем с уклоном в сторону генов, экспрессирующихся в нервной и иммунной системах (Evsyukova I. et al., 2010). Сплайсинг мРНК предполагает точное удаление интронов и присоединение экзонов для получения белок-кодирующих мРНК (Ip Y.J. et al., 2007). У высших эукариот последовательности сайта сплайсинга сильно вырождены, и, как правило, не содержат достаточной информации для точного определения места расщепления и лигирования (Motta-Mena B.L. et al., 2010). Несмотря на то, что изучение механизмов альтернативного сплайсинга в иммунокомпетентных клетках находится на начальных стадиях исследований, поиск литературы в интернет базе данных NCBI по ключевым словам «альтернативных сплайсинг» и «иммунная система» выдает почти две тысячи работ. Однако только сейчас научное сообщество начало осознавать важность альтернативного сплайсинга в регуляции функций иммунной системы (Heyd F. et al., 2006, 2010; Whistler T. et al., 2010; Martinez M.N., Lynch W.K., 2013; Rodrigues R. et al., 2013).

**Степень проработанности темы.** В последнее десятилетие удалось выявить некоторые механизмы, посредством которых сплайсинг генов может изменяться в ответ на антигенную стимуляцию (Ip Y. J. et al., 2007; Melton A.A. et al., 2007; Rodrigues R. et al., 2013). Показано, что сходные или перекрывающиеся механизмы могут определять сплайсинг множества генов, координируя регуляцию функционально близких белков. В частности, сплайсинг транскриптов,

кодирующих молекулу CD45, значительно изменяется в ответ на продолжительную активацию Т-клеток (Hess K. et al., 2004; Motta-Mena B.L. et al., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Важность регуляции альтернативного сплайсинга у человека иллюстрируется геном *Ptprc*, пре-мРНК которого состоит из 33 экзонов. *Ptprc* кодирует лейкоцитарный рецептор CD45, крайне важный для функциональной активности Т-клеток человека (Wu Z. et al., 2010). В частности, молекула CD45 - трансмембранная тирозиновая протеинфосфатаза, на иммунокомпетентных клетках признана критическим регулятором сигнализации, опосредованной Т-клеточным рецептором (TCR) (Mustelin T. et al., 2003; McNeill L. et al., 2007).

В настоящее время выявлено три гена (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*), продукты которых, взаимодействуя, регулируют процесс дифференцировки иммунокомпетентных клеток (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W. K., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Известны мутации в гене *Ptprc*, вносящие вклад в эффективность альтернативного сплайсинга молекулы CD45, и как следствие, в процесс дифференцировки Т-клеток (Tong A. et al., 2005; Topp D.J. et al., 2008; Evsyukova I. et al., 2012).

Цитокины семейства I типа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), имеющие общую  $\gamma$ -цепь рецепторов, способны оказывать комплексное воздействие на клеточный гомеостаз Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки (Schluns K. S., Lefrançois L., 2003; Ma A. et al., 2006; Tanel A. et al., 2009; Литвинова Л.С. и соавт., 2013). Мы предполагаем, что одним из механизмов, посредством которого цитокины, имеющие общую  $\beta$ -цепь (IL-2, IL-7 и IL-15) принимают непосредственное участие в дифференцировке Т-клеток, может быть регуляция альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, что может определять исход как первичных, так и вторичных иммунных реакций.

В связи с вышесказанным, **целью исследования** явилось установление роли цитокинов, имеющих общую  $\beta$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) в регуляции механизма молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток, сопряженного с альтернативным сплайсингом гена *Ptprc*, кодирующего общелейкоцитарный рецептор - CD45.

### **Задачи исследования:**

1. Оценить влияние цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7 и IL-15) на уровни относительной экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) в Т-клетках, имеющих разную степень дифференцировки, в моделях гомеостатической и антигеннезависимой CD2/CD3/CD28 – стимуляции.

2. Исследовать влияние иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на взаимосвязь между транскрипцией мРНК гена *hnRNPLL* и мембранной экспрессией костимуляторной молекулы - CD28 в Т-клетках, имеющих разную степень дифференцировки, на фоне гомеостатической и антигеннезависимой CD2/CD3/CD28 – стимуляции.

3. Изучить влияние цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на взаимосвязь между изменением уровней экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и данными, характеризующими конверсию фенотипа наивных Т-лимфоцитов (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток иммунной памяти на фоне гомеостатической и антигеннезависимой CD2/CD3/CD28 – стимуляции.

4. Установить общие закономерности и особенности влияния цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7 и IL-15) на молекулярно-генетические аспекты дифференцировки Т-клеток, ассоциированные с механизмом альтернативного сплайсинга рецептора CD45 в условиях гомеостатической и активационной модели клеточного культивирования.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что процессы созревания и дифференцировки наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток, опосредованные действием цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), осуществляются за счет изменения экспрессии генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45). Приоритетными являются данные, что изменения активности генов, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, фенотипически сопровождаются увеличением числа CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток и снижением

количества CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Впервые продемонстрировано, что влияние цитокинов, имеющих общую  $\alpha$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) на созревание и дифференцировку наивных (CD45<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов *in vitro* носит дозозависимый характер и зависит от функционального состояния Т-клеток. Впервые установлено, что в культурах наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток, эффекты IL-2 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и IL-15 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл) в условиях гомеостатической активации *in vitro*, сопровождаются повышением уровней экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, что фенотипически выражается ростом числа дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток и CD28<sup>-</sup> Т-лимфоцитов и свидетельствует о созревании и дифференцировке наивных Т-клеток. Доказано, что действие IL-7, напротив, ограничивает активацию и дифференцировку наивных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии гена *U2af114*, и напротив, повышения экспрессии гена *Gfi1*. Влияние IL-2 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и IL-7 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл) на дифференцировку примированных Т-клеток в гомеостатической модели ассоциировано с увеличением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, с угнетением - мРНК гена *hnRNPLL*; эффекты IL-15 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) сопряжены с повышением уровней экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* и угнетением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*.

Впервые показано, что цитокины, имеющие общую  $\alpha$ -цепь рецепторов, IL-2 и IL-15 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и IL-7 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл) при действии *in vitro* на TCR-активированные наивные (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоциты, способствуют их дифференцировке и созреванию за счет угнетения экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, активации - *hnRNPLL*. Низкие концентрации IL-2 и IL-15 (0,1 и 0,5x10<sup>-9</sup> г/мл) и максимальные IL-7 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл), ограничивают дифференцировку Т-клеток, индуцированную TCR-активацией.

Впервые продемонстрировано, что эффекты rIL-2 на дифференцировку активированных CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток сопряжены с угнетением экспрессии гена *U2af114* и повышением транскрипции генов *Gfi1* и *hnRNPLL*. Напротив, влияние IL-15 (0,1; 0,5x10<sup>-9</sup> г/мл) ассоциировано с однонаправленным повышением экспрессии генов *hnRNPLL* и *U2af114* и не затрагивает экспрессию гена *Gfi1*. На фоне CD2/CD3/CD28-активации *in vitro*, IL-7 ограничивает дифференцировку



примированных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные знания фундаментального характера раскрывают новые, молекулярно-генетические аспекты цитокинопосредованной дифференцировки Т-клеток, ассоциированные с механизмом альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) и могут быть востребованы для создания общей модели дифференцировки иммунокомпетентных клеток с выяснением участия альтернативного сплайсинга в механизмах регуляции функций иммунной системы.

**Практическая значимость** полученных данных о роли иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) в регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего общий лейкоцитарный антиген CD45), может представлять интерес для расшифровки механизмов, ассоциированных с перестройкой иммунной системы (иммунный ответ на патогены инфекционной и неинфекционной природы, возрастные перестройки и т.д.) а также для разработки патогенетически обоснованных технологий коррекции иммунных нарушений при лечении целого ряда социально значимых заболеваний. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедрах фундаментальной медицины медицинского института БФУ им. И. Канта и кафедре молекулярной физиологии и биофизики химико-биологического института БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

### **Методология и методы исследования**

Согласно поставленным задачам выбраны высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современной научно-исследовательской лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка БФУ им. И. Канта. В качестве материала исследования использовали первичные культуры  $CD45RA^+CD62L^+$  и  $CD45RO^+$  Т-лимфоцитов, полученные (методом иммуномагнитной сепарации) из взвеси мононуклеарных клеток периферической венозной крови здоровых доноров.

### **Основные методы исследования:**

1. Иммуномагнитная сепарация (получение монокультур CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов из взвеси мононуклеарных клеток здоровых доноров);
2. Культуральные методы исследования *in vitro*;
3. Оценка жизнеспособности наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеточных культур; определение поверхностных маркеров CD4, CD8, CD28 на Т-клетках разной степени дифференцировки методом проточной цитометрии;
4. Определение уровней относительной экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
5. Статистический анализ результатов.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) регулируется цитокинами, имеющими общую  $\beta$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) за счет изменения активности генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*.
2. Цитокин-опосредованная регуляция альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) определяется степенью дифференцировки Т-клеток и их активационным статусом.
3. Фенотипическим проявлением эффектов цитокинов, имеющих общую  $\beta$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) на процессы созревания и дифференцировки наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток является конверсия фенотипа (рост числа дубль-позитивных CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток) и увеличение содержания CD28 - негативных Т-лимфоцитов.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов (*иммуномагнитная сепарация, культуральные методы*

*исследования, проточная цитофлуориметрия, полимеразная цепная реакция*) и методических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XVIII-ой межгородской научной конференции молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии 2013», (г. Санкт-Петербург, 2013 г.); Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013 г.); Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования» (г. Москва, 2013, 2015 гг.); XX международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины» (г. Москва, 2013, 2015 гг.); III-ей Международной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Fundamental and applied research in biology 3<sup>rd</sup> international scientific conference) (Украина, г. Донецк, 2014 г.); Международной научно-практической конференции «Современные направления развития медицины-2014» (г. Брянск, 2014 г.); III-ей Европейской конференции по биологии и медицинским наукам (III European Conference on Biology and Medical Sciences) (Австрия, г. Вена, 2014 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы образования и науки» (г. Тамбов, 2014 г.), а также на научно-образовательных семинарах на базе Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского Федерального Университета им. И. Канта (г. Калининград, 2012-2015).

В работе приводятся результаты научно-исследовательских работ «Исследование молекулярно-биологических механизмов модуляции иммунологической памяти в норме и при аутоиммунной патологии» (ГК №П1252 от 27 августа 2009 г.); "Стероидная регуляция иммунной памяти» (Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (МД-4999.2012.7); «Разработка технологии дозозависимого управления процессами клеточного гомеостаза и функциональным состоянием Т-клеток памяти с применением биомолекул (цитокинов)» (Соглашение 14.132.21.1778 от 01.10.12 г.); «Роль стероидных гормонов в дифференцировке Т-клеток памяти: молекулярно-генетический и иммуноморфологический аспекты» (Соглашение № 14.А18.21.1121 от 14.09.2012 г.).

### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 6 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и 9 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель включает 249 источников (28 - отечественных и 221 - иностранных).

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Механизмы формирования и поддержания иммунной памяти

Важнейшим условием иммунологической адаптации организма к изменяющимся условиям антигенного окружения является формирование иммунной памяти (Ярилин А.А., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; Гуцол А.А. и соавт., 2012). Эффективность иммунной системы на различные антигены (бактериальные, опухолевые, вирусные и т. д.) обусловлена активацией и последующей пролиферацией клонов антиген-специфических лимфоцитов (Литвинова Л.С. и соавт., 2011; Amsen D. et al., 2013). Оценивая экспрессию поверхностных маркеров и анализируя структурно-функциональные свойства антигенспецифических Т-лимфоцитов, выделяют непримированные (наивные) лимфоциты и примированные клетки памяти (Хайдуков С.В., 2008). Интересно, что в клетки иммунной памяти дифференцируется лишь малая доля непримированных Т-лимфоцитов, принимавших участие в первичном иммунном ответе (Хайдуков С.В., 2008; Harrington L.E. et al., 2008; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; Russ V.E. et al., 2013).

Различают позитивную и негативную иммунную память. Благодаря позитивной памяти, при повторном введении антигена развивается быстрый и эффективный иммунный ответ (Бурместер Г.Р., 2009; Хаитов Р.М., 2009; Литвинова Л.С. и соавт., 2011). В результате развития адаптивного иммунного ответа, генерируются антиген-специфические эффекторные лимфоциты, большая часть которых, в конечном итоге, подвергается апоптозу. Оставшиеся в живых антиген-реактивные лимфоциты формируют иммунную память, которая необходима для обеспечения ускоренной иммунной реакции в ответ на повторное антигенное воздействие. Несмотря на гибель части антиген-реактивных клеток, общее количество лимфоцитов, чувствительных к антигенному воздействию вследствие первичного иммунного ответа, возрастает. Самоподдержание, реализующееся за счет того, что в результате клеточного деления только одна дочерняя клетка дифференцируется, тогда как другая в полной мере сохраняет свойства материнской клетки, является важной характерологической особенностью

лимфоцитов, ответственных за иммунологическую память. Эта особенность роднит их со стволовыми кроветворными клетками. Все методы вакцинации, используемые в настоящее время, базируются на феномене иммунной памяти (Селедцов В.И. и соавт., 2010). Уровень образовавшихся Т-клеток памяти служит показателем эффективности первичного иммунного ответа на введение антигенов разной природы (Achiron A. et al., 2004; Селедцов В.И. и соавт., 2010).

Антиген-индуцированная иммунная память может быть как краткосрочной, так и пожизненной (Crotty S. et al., 2004; Radbruch A. et al., 2004; Elyaman W. et al., 2008; Селедцова Г.В. и соавт., 2008; Литвинова Л.С. и соавт., 2011). Длительность иммунной памяти зависит от чужеродности и дозы антигена, а также от состояния иммунной системы на момент проникновения антигена в организм. Предполагают, что значимую роль в поддержании иммунологической памяти играют повторные проникновения антигенов в организм, иммуностропные цитокины, присутствующие в тканевых жидкостях, а также антиген-индуцированные идиотип-антиидиотипические взаимодействия (Tanel A. et al., 2009; Селедцов В.И. и соавт., 2010). Иммунная память проявляется при интенсивной воспалительно-некротической реакции при повторном введении микробного антигена внутрикожно, при отторжении аллотрансплантата. Механизм возникновения аллергических реакций также базируется на феномене позитивной иммунной памяти (Хайтов Р.М., 2009; Бурместер Г.Р., 2009; Литвинова Л.С. и соавт., 2011).

В результате формирования негативной иммунной памяти снижается интенсивность иммунного ответа, либо он полностью отсутствует при первичном и последующем введении антигена. Этот механизм опосредован регуляторными клетками; нарушения могут привести к возникновению аутоиммунных состояний. Вероятно, формирование негативной иммунной памяти - наиболее перспективный подход для предотвращения развития иммунологической несовместимости при трансплантации органов и тканей (Crotty S. et al., 2004; Radbruch A. et al., 2004; Elyaman W. et al., 2008; Селедцова Г.В. и соавт., 2008; Литвинова Л.С. и соавт., 2011). Накопленные знания способствуют пониманию и поиску эффективных механизмов контроля иммунной памяти, которые нацелены на ее усиление в случаях инфекционных и опухолевых заболеваний, либо на подавление при различных аутоиммунных патологиях и аллергиях (Литвинова Л.С. и соавт., 2011).

## 1.2. Семейство цитокинов с общей гамма ( $\gamma$ ) цепью

На гомеостаз Т-лимфоцитов влияют множество факторов, действующих на клетки-мишени как паракринно, так и аутокринно. Ключевыми звеньями в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза Т-лимфоцитов являются цитокины семейства I типа, имеющие общую  $\gamma$ -цепь: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21 (Бойчук С.В. и соавт., 2008; Tanel A. et al., 2009; Markley J.C. et al., 2010). В процессе пролонгации иммунной памяти, упомянутые факторы способны потенцировать действие друг друга. В частности показано, что IL-2 способен усиливать действие IL-7 на Т-клетки памяти за счет усиления мембранной экспрессии рецептора к IL-7 (Селедцов В.И. и соавт., 2010; Elyaman W. et al., 2008). Т-клетки памяти продуцируют ростовые факторы и экспрессируют на своей поверхности их рецепторы. Это подразумевает возможность участия Т-клеток памяти как в сохранении иммунной памяти, так и в аутокринной Т-клеточной регуляции (Van Leeuwen E.M. et al., 2009; Селедцов В.И. и соавт., 2010). Сохранение Т-клеток памяти *in vivo* в отсутствие антигенного стимула регулируется процессами их гомеостатической пролиферации и апоптотической гибели, которые зависят от экспрессии IL-7 и IL-15. Вместе с тем, важной характерологической особенностью лимфоцитов, ответственных за иммунологическую память, является обеспечение ускоренной иммунной реакции в ответ на повторное антигенное воздействие (Luckey C.J. et al., 2006). В современной медицине одним из перспективных подходов к терапии широкого круга заболеваний является разработка технологий управления опосредованными цитокинами механизмами межклеточной кооперации, процессами пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели (Tanel A. et al., 2009).

Регуляция величины и качества иммунного ответа зависит от интеграции нескольких сигналов, которые обычно работают через позитивные и негативные циклы обратной связи. Характер и сила цитокиновых сигналов, принимаемых клетками, определяют степень клональной экспансии и дифференцировки клеток памяти (Ярилин А.А., 2010). Однако механизмы, определяющие продукцию

цитокинов, контроль экспрессии рецепторов и внутриклеточные регуляторы сигнализации до конца не изучены.

### **1.2.1. IL-2 и его рецептор: строение, функции, влияние на гомеостаз Т-клеток**

IL-2 представляет собой гликопротеин, имеющий массу 14-17 кДа (Joly M. et al., 2013). Этот цитокин известен как фактор роста Т-клеток. IL-2 экспрессируется активированными CD4<sup>+</sup> Т-клетками в ответ на митогенную или антигенную стимуляцию, но также может продуцироваться и другими клетками иммунной системы, включая активированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки (Kristensen N.N. et al., 2002; Fichna M. et al., 2013)

Впервые IL-2 был описан как интерлейкин, способствующий пролиферации эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток во время первичного иммунного ответа, и необходимый для экспансии и выживания CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Wilson E.V. et al., 2008; Coventry B.J. et al., 2012; Márquez A. et al., 2013; Sayad A. et al., 2014). Кроме того, было показано, что IL-2 способствует пролиферации NK-клеток; индуцирует цитолитическую активность CD8<sup>+</sup> Т-клеток и вовлечен в активацию В-клеток через CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты (Diaz-Gallo L.M. et al., 2013). IL-2 способствует генерации Т-эффекторных клеток, в том числе - Th1- и Th2-линий, ингибируя дифференцировку Th17-клеток (Laurence A. et al., 2007; Russell S.E. et al., 2012). Присутствие IL-2 является необходимым условием для развития долгоживущих клеток памяти (Williams M.A. et al., 2006).

IL-2 связывается с высокоафинным рецептором, который состоит из трех субъединиц: IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) и  $\gamma_{\text{common}}$ (CD132) и не является стабильной гетеротримерной структурой (Wang X. et al., 2005; Stauber D.J. et al., 2006; Goudy K. et al., 2013). IL-2 сначала захватывается IL-2R $\alpha$  через большой участок связывания гидрофобной поверхности, что приводит к относительно слабому взаимодействию (Huse M. et al., 2006; Sabatos C.A. et al., 2008). IL-2R $\alpha$  присутствует как в мембраносвязанной форме, так и в качестве растворимого белка (Nakamura H. et al., 2000).

IL-2R $\alpha$ /IL-2 бинарный комплекс приводит к незначительным конформационным изменениям в IL-2, что способствует ассоциации с IL-2R



посредством полярного взаимодействия между IL-2 и IL-2R $\beta$ . Следует отметить, что внеклеточный домен IL-2R $\alpha$  не взаимодействует с IL-2R $\beta$ , а бинарный комплекс IL-2R $\alpha$ /IL-2 появляется, чтобы представить цис-изоформу IL-2 субъединице IL-2R $\beta$ . Тройной комплекс IL-2R $\alpha$ -IL-2R $\beta$ -IL-2 затем связывается с  $\gamma\epsilon$  для получения стабильного четырехкомпонентного высокоаффинного IL-2R (Huse M. et al., 2006; Sabatos C.A. et al., 2008).

Отдельно,  $\beta$  и  $\gamma\epsilon$  не связываются с IL-2. Однако при связывании ( $\beta/\gamma\epsilon$ ) этот комплекс имеет промежуточное сродство к IL-2, что может опосредовать IL-2 сигналы, хотя и неэффективно. В присутствии IL-2R $\alpha$ , аффинность комплекса  $\beta/\gamma\epsilon$  увеличивается. Предполагают, что IL-2 сначала связывается с  $\beta/\gamma\epsilon$  комплексом, а затем с IL-2R $\alpha$ , для формирования гетеротримерного комплекса высокой аффинности. Получены данные, что IL-2R $\alpha$  может связываться с IL-2R $\beta$  без  $\gamma\epsilon$  (Stauber D.J. et al., 2006; Huang X. et al., 2012). Таким образом, несмотря на то, что IL-2R $\alpha$  не участвует в IL-2 сигнализации, эта субъединица необходима для формирования высокого сродства гетеротримерных комплексов IL-2R (Stauber D.J. et al., 2006).

Связывание IL-2/IL-2R $\alpha$  играет важную роль для функционирования цитокинового рецептора *in vivo*. Для IL-2-зависимых ответов, продукция IL-2 и экспрессии IL-2R должны временно происходить в той же среде. В соответствии с этой идеей, IL-2 направленно секретируется в иммунологических синапсах для использования IL-2R-экспрессирующими клетками (Huse M. et al., 2006; Sabatos C.A. et al., 2008). Кроме того, продукция IL-2 и IL-2R $\alpha$  в значительной степени зависят от TCR стимуляции. IL-2-зависимые ответы регуляторных клеток (Treg) и Т-клеток-эффекторов в естественных условиях находятся под жестким физиологическим и антиген-зависимым контролем. Субъединицы IL-2R не случайно связаны с клеточной мембраной - это облегчает IL-2R-зависимую олигомеризацию и сигнализацию. Повышенная экспрессия IL-2R $\beta$  сохраняется на большинстве CD8<sup>+</sup> Т-клеток на пике ответа, что обеспечивает их реакцию на действие IL-15, который также использует IL-2R $\beta$  и  $\gamma\epsilon$  для передачи сигнала. Однако, возможна и IL-2-независимая клональная экспансия и эффективный первичный иммунный ответ, хотя присутствие значительного

количества IL-2 увеличивает уровень клональной экспансии (Malek T.R. et al., 2010).

Многими авторами было описано, что дефицит IL-2 приводит к формированию аутоиммунной патологии, вследствие нарушения регуляции Treg (Bayer A.L. et al., 2008; O'Gorman W.E. et al., 2009; Russell S.E. et al., 2012; Garg G. et al., 2012). Недостаток IL-2, CD25 или IL-2R $\beta$  приводит к полиорганному воспалению и системному аутоиммунитету у мышей и человека (Yamanouchi J. et al., 2007; C nit M.C. et al., 2013). Геномные исследования выявили связь между локусом IL-2 и несколькими аутоиммунными заболеваниями, в том числе при рассеянном склерозе, диабете 1 типа (Yamanouchi J. et al., 2007), аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, болезни Грейвса и ревматоидном артрите (Brand O.J. et al., 2007; Hafler D.A. et al., 2007; Zeitlin A.A. et al., 2008).

У дефицитных по гену IL-2 мышей, несмотря на отсутствие одного из ростовых факторов лимфоцитов, отмечалась гиперплазия лимфоидных органов, повышение количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, развитие мультиорганной воспалительной реакции, аутоиммунной гемолитической анемии и аутоиммунного язвенного колита, то есть явные признаки активации иммунной системы. Опыты с животными, дефицитными по генам отдельных цепей рецептора IL-2 подтверждают эти наблюдения. В настоящее время считается, что описанные фенотипические изменения у мышей, дефицитных по генам IL-2 или альфа цепи рецептора IL-2, связаны с нарушением функционирования Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) (Almeida A.R. et al., 2002; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). Эти данные свидетельствуют, что уникальная роль IL-2 в регуляции иммунитета связана скорее не с выполнением функции ростового фактора лимфоцитов, где его действие дублируется другими цитокинами, а больше с контролем за гиперактивацией иммунной системы или индукцией толерантности за счет стимуляции дифференцировки Treg лимфоцитов *in vivo* (Malek T.R., Bayer A.L., 2004; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008).

### 1.2.2. IL-7 и его рецептор: строение, функции, влияние на гомеостаз Т-клеток

IL-7 - гликопротеин молекулярной массой 25 кДа. Первоначально, IL-7 был охарактеризован как гемопоэтический фактор роста, способный стимулировать пролиферацию лимфоидных клеток-предшественниц (Schluns K.S. et al., 2000; Surh C.D., Voymann O. et al., 2006; Venet F. et al., 2012). В настоящее время IL-7 рассматривается в качестве фактора роста и выживания для популяций наивных клеток-предшественниц и Т-клеток памяти (Schluns K.S. et al., 2000; Tan J.T. et al., 2001; Surh C.D., Voymann O. et al., 2006; Mengus C. et al., 2011). IL-7 продуцируют, преимущественно, стромальные клетки лимфоидной ткани (Barata J.T. et al., 2005; Mazzucchelli R. et al., 2007; De Bock M. et al., 2013). Рецептор IL-7 представлен на поверхности клетки в виде белков внеклеточного матрикса. Циркулирующая форма IL-7, необходимая для поддержания популяции Т-клеток при гомеостатической пролиферации, также продуцируется и высвобождается стромальными клетками в костном мозге, лимфатических узлах, коже, кишечнике и печени (Janot-Sardet C., 2010; Ponchel F. et al., 2011; Sammicheli S. et al., 2011; Silva A. et al., 2011).

Рецептор IL-7 (IL-7R) состоит из двух компонентов: уникальной цепи IL-7R $\alpha$  (CD127) и  $\gamma$ с-цепи (Kovanen P.E. et al., 2004; Grenningloh R. et al., 2011; Haas J. et al., 2011; Lévy Y. et al., 2012). После связывания рецептора, JAK1 и JAK3, ассоциированные с IL7R $\alpha$  и  $\gamma$ с, соответственно, гетеродимеризуются и становятся фосфорилированными, создавая сайты стыковки для STAT5a/5b (Leonard W.J., 2001; Chehtane M. et al., 2010; Catalfamo M. et al., 2011).

Показано, что IL-7 играет важную роль в выживании CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Эффекты IL-7, наряду с IL-15, обусловлены регуляцией Bcl-2 семейства: IL-7 индуцирует экспрессию антиапоптотических факторов Bcl-2 и Mcl-1 и, напротив, инактивацию факторов апоптоза - Bax и Bad (Jiang Q. et al., 2004; Cai K. et al., 2013). В сочетании с сигналами TCR, IL-7 является ключевым цитокином, необходимым для выживания наивных Т-клеток и для поддержания Т-клеток памяти (Kondrack R.M. et al., 2003; Li J. et al., 2003; Dooms H. et al., 2007). IL-7

также является важным фактором в генерации и поддержании функционального эффекторного ответа. IL-7R-дефицитные мыши испытывают тяжелые лимфопении и утрачивают Т-клеточные функции, что может быть скорректировано избыточной экспрессией Vcl-2 (Kondrack R.M. et al., 2003; Li J. et al., 2003).

IL-2 и IL-7 влияют на функции друг друга. IL-2<sup>-/-</sup> Т-клетки экспрессируют более высокие уровни IL-7R (Hoyer K.K. et al., 2007) и блокируют IL-2R цепи CD25, что индуцирует увеличение экспрессии IL-7, который опосредует гомеостатическую пролиферацию Т-клеток путем повышения образования IL-7R (Monti P. et al., 2009). С другой стороны, IL-2 положительно влияет на формирование IL-7R<sup>hi</sup> клеток памяти (Dooms H. et al., 2007; Kameyama K. et al., 2010). Кроме того, эти цитокины играют важную роль в формировании Tregs в тимусе и развитии IL-7R сигнализации, способствующей поддержанию периферического гомеостаза (Bayer A.L. et al., 2008; Katzman S.D. et al., 2011. )

Система IL-2/IL-7 действует как переменный цикл подавления и активации Т-клеточных ответов для поддержания баланса между иммунитетом и толерантностью. Нарушение равновесия способствует развитию иммунопатологических состояний. Разработка способов локального восстановления баланса цитокинов может нести терапевтический эффект.

### **1.2.3. IL-15 и его рецептор: строение, функции, влияние на гомеостаз Т-клеток**

IL-15 - цитокин, важный для развития, гомеостаза и функционирования CD8<sup>+</sup> Т-клеток, НК-клеток, NKT-клеток и CD8 $\alpha$  интраэпителиальных лимфоцитов (Nishimura H. et al., 2000, Fehniger T.A. et al., 2001; Chen J. et al., 2013; Marçais A. et al., 2014; Lee N. et al., 2014). За счет общности строения рецепторов, IL-15 во многом обладает биологическими активностями, свойственными IL-2: усиливает пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов и соавт. Оба рецептора имеют по три субъединицы, две из которых общие для IL-2 и IL-15. Специфичность действия связана с разными альфа субъединицами рецепторных комплексов и различиями в экспрессии всех компонентов рецепторов на разных типах клеток. Опыты с knockout мышами позволили более точно определить роль IL-15 в регуляции иммунитета. Анализ

отдельных субпопуляций клеток показал, что у таких животных значительно снижено содержание зрелых НК-клеток с маркерами  $NK1/1^+CD3^-$  в селезенке, но костномозговые предшественники НК-клеток есть в достаточном количестве. Введение IL-15 дефицитным по данному гену мышам приводило к восстановлению числа НК-клеток. Т.е., в отсутствие IL-15 происходит нормальное развитие предшественников НК-клеток, но он абсолютно необходим для финальной стадии их дифференцировки. IL-15 также важен для блокирования процессов апоптоза и поддержания жизнеспособности дифференцированных НК-клеток (Cooper M.A. et al., 2002; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). IL-15 синтезируется стромой костного мозга, возможно, участвуя в созревании и выходе на периферию функционально зрелых НК-клеток, а в дальнейшем поддерживает их жизнеспособность и стимулирует функциональную активность (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008).

Как уже упоминалось ранее, сигналы IL-15 передаются через IL-2/15R $\beta$  и общую  $\gamma$ -цепь. Однако механизм доставки IL-15 к этим сигнальным компонентам – транспрезентация - уникален. Теория *транспрезентации* предполагает, что внутриклеточный IL-15 с высокой афинностью связывается с IL-15-связывающим белком - IL15R $\alpha$ , курсирует к клеточной поверхности, где он стимулирует IL-15 сигнальные компоненты на соседних клетках через межклеточные взаимодействия. Транспрезентация интересна тем, что IL-15 разделяет рецепторы субъединиц цитокинов с IL-2 и является более выгодной по сравнению с обычной секрецией цитокинов, так как позволяет осуществлять более тщательный контроль доставки в чувствительные к IL-15 клетки. Поскольку повышенное содержание IL-15 вызывает лимфоцитоз, преимущественно за счет увеличения НК-клеток и  $\gamma\delta$ T-клеток (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008), транспрезентация может быть одной из основных причин эволюции этого механизма (Nishimura H. et al., 2000; Fehniger T.A. et al., 2001).

IL-15R $\alpha$  отличается от IL-2R $\alpha$ , и имеет высокое сродство к IL-15, независимое от компонентов  $\beta/\gamma$ C. После связывания с IL-15 было продемонстрировано, что IL-15R $\alpha$  подвергается некоторым конформационным изменениям, степень и последствия которых неизвестны. При отсутствии IL-15R $\alpha$ , комплекс  $\beta/\gamma$ C связывается с IL-15 со средней афинностью (Lorenzen I. et al.,

2006; Hanick N.A. et al., 2007). Важность IL-15R $\alpha$  в формировании IL-15-сигналинга была подтверждена изучением моделей дефицитных мышей. Подобно IL-15 - / - мышам, IL-15R $\alpha$  - / - мыши, как правило, были здоровы, но имели специфические недостатки в функционировании CD8<sup>+</sup> Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток и CD8 $\alpha$ -интраэпителиальных лимфоцитов (Becker T.C. et al., 2002; Ranson T. et al., 2003).

Изучение эффектов IL-15 показало, что он может индуцировать многие из тех реакций, которые опосредуются IL-2 *in vitro*, например, пролиферацию Т-клеток (Waldmann T.A., 2006). Однако механизм действия IL-15 существенно отличается от такового у IL-2. В естественных условиях характер экспрессии IL-15R $\alpha$  гораздо шире, чем у IL-2R $\alpha$  и перекрывается с экспрессией IL-15, по крайней мере, на уровне транскриптов. В то время как экспрессия IL-2R $\alpha$ , в основном, ограничивается Т-клетками, IL-15R $\alpha$  экспрессируется практически каждой ядродержащей клеткой разных типов тканей. Однако исследования с нокаутом IL-15 показали, что главной мишенью IL-15 являются лимфоциты (Kennedy M.K. et al., 2000; Stonier S.W. et al., 2008). Кроме того, для ответа на IL-15 *in vitro*, присутствие IL-15R $\alpha$  необязательно. Это может свидетельствовать о том, что IL-15R $\alpha$  лишь усиливает сигнализацию, но не приводит к увеличению аффинности IL-15 для комплекса  $\beta/\gamma$ C (Mortier E. et al., 2006).

Изоформы белка IL-15R $\alpha$ , образующиеся путем альтернативного сплайсинга различных экзонов, кодирующих зрелый белок, идентифицированы, однако их экспрессия описана недостаточно (Vulanova E. et al., 2007). Экспрессия белка IL-15 на поверхности клетки, в отличие от IL-15R $\alpha$  ограничена, что является естественным для молекулы, функционирующей в онтогенезе, в основном, для поддержания гомеостаза иммунокомпетентных клеток. Обнаружение на клеточной поверхности комплекса *IL-15-IL-15R $\alpha$*  является наиболее значимым для идентификации активно транспрезентирующих клеток (Stoniera S.W. et al., 2010).

### **1.3. Роль CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в генерации иммунной памяти**

Активация наивных CD8 Т-лимфоцитов завершается их трансформацией в клетки с биоагрессивным потенциалом – Т-киллеры или цитотоксические Т-

лимфоциты (O'Connor A.M. et al., 2010). Они приобретают способность к экспрессии факторов, вызывающих апоптоз и цитоллиз клеток-мишеней. Фактически, цитотоксические Т-лимфоциты дублируют функции естественных киллеров, но Т-клетки реализуют контактный цитоллиз на основе специфического распознавания конкретных антигенов возбудителя и обладают способностью формировать иммунологическую память. Презентация антигенного пептида CD8<sup>+</sup> Т-клеткам происходит практически так же, как и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам. Отличие заключается в том, что в распознавании комплекса антиген-МНС-I, в качестве корецептора участвует молекула CD8. Сигнальные пути, приводящие к активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, идентичны таковым для CD4<sup>+</sup> Т-клеток, поскольку оба типа корецепторов (CD4 и CD8) ассоциированы с тирозинкиназами Lck (Ярилин А.А., 2010).

Как ни парадоксально, IL-2 не является необходимым медиатором для пролиферации Т-клеток *in vivo*. У мышей, дефицитных по IL-2 или IL-2R $\alpha$ , наблюдалась поликлональная экспансия Т- и В клеток. Экспериментальные данные позволяют предположить, что IL-2 является необязательным при первичном ответе CD8<sup>+</sup> Т-клеток, но требуется на начальном этапе их активации - для создания эффективной популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (Williams M.A. et al., 2006).

Wallace D.L. также показал, что IL-15 индуцирует экспансию наивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток только после длительного культивирования (Wallace D.L. et al., 2006). Интересно, что IL-15 стимулирует позднюю экспансию наивных CD8<sup>+</sup> клеток, в основном, без изменения фенотипа наивных клеток. Этот процесс тесно ассоциирован с повышением активности фермента теломеразы. Возможно, это связано с резким увеличением числа делящихся клеток, начиная примерно с 1 недели культивирования, достигая пика  $\approx$  на 14 день; более медленная реакция наблюдалась у клеток, обработанных IL-7. Значимость этих результатов для Т-клеточного гомеостаза активно обсуждаются (Wallace D.L. et al., 2006).

Одним из фенотипических изменений в IL-15-стимулированных наивных CD8<sup>+</sup> Т-клетках, является повышенная экспрессия молекулы апоптоза - CD95 (Krueger A. et al., 2003). Апоптоз, опосредованный рецептором CD95 играет значительную роль в сокращении пула наивных и центральных CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток при старении организма (Gupta S., Gollapudi S., 2008). Интересно, что Т-клетки памяти устойчивы к Fas/FasL апоптозу, что, вероятно может быть связано с

высоким уровнем экспрессии в этих клетках митохондриальных белков Bcl-X (L) и Bcl-2. IL-15 является мощным ингибитором Fas/FasL-индуцированного апоптоза эффекторных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (Mueller Y.M. et al., 2003; Fas S.C. et al., 2006; Strasser A. et al., 2009).

CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти остаются менее изученными, чем CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты (Seder R.A. et al., 2003; Leeuwen E.M.M. et al., 2009). Играя важнейшую роль в адаптивном иммунитете, CD4<sup>+</sup> Т-клетки оказывают содействие остальным субпопуляциям лимфоцитов, определяя дальнейшую ориентацию/поляризацию иммунного ответа, формируя соответствующий фон за счет продукции цитокинов и хемокинов (Swain S.L. et al., 2006; Leeuwen E.M.M. et al., 2009). В процессе формирования иммунного ответа, антиген-специфичные наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки. Получены доказательства, что сильная стимуляция TCR при первичном ответе имеет важное значение для поколения долгоживущих CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти. Гомеостаз покоящихся CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти зависит от контакта с IL-7 и IL-15 (Swain S.L. et al., 2006; Leeuwen E.M.M. et al., 2009).

Дифференциальная экспрессия различных субъединиц рецепторов цитокинов на Т-клетках, вероятно, коррелирует с их чувствительностью к цитокинам с общей  $\gamma$ -цепью. Компоненты IL-7R ( $\gamma$  с -цепь и IL-7R $\alpha$ ) конститутивно экспрессируются на наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках. IL-7R также экспрессируется на клетках памяти в соответствии с их способностью реагировать на IL-7 (Lenz D.C. et al., 2004; Kim H.R. et al., 2006). Низкие уровни экспрессии IL-2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$  и цепи IL-2/IL-15R $\beta$  наблюдаются на наивных Т-клетках, но индуцируются при активации Т-клеток. CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти экспрессируют повышенные уровни IL-2/IL-15R $\beta$  цепи, по сравнению с их наивными предшественниками (Alves N.L. et al., 2003; Schluns K.S. et al., 2003). Тем не менее, экспрессия цепи IL-2/IL-15R $\beta$  увеличивается на наивных CD8 Т-клетках при IL-15 активации, что повышает чувствительность наивных клеток к этому цитокину (Alves N.L. et al., 2003). Таким образом, в то время как  $\gamma$  с и IL-7R $\alpha$  цепи экспрессируются на разных стадиях дифференцировки Т-клеток, экспрессия других компонентов рецепторов цитокинов, таких как IL-2R $\alpha$ , IL-2/IL-15R $\beta$  и IL-21R $\alpha$ , по-видимому, связана с активацией Т-клеток (Alves N.L. et al., 2007).



Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что IL-7 способствует выживанию и пролиферации наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, в то время как IL-15 действует преимущественно на субпопуляции наивных CD8<sup>+</sup> клеток (Alves N.L. et al., 2005; Wallace D.L. et al., 2006; Shou C. et al., 2011; Osborne L.C. et al., 2011). CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти чувствительны к действию как IL-15, так и IL-7 (Mueller Y.M. et al., 2003). Тогда как CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти пролиферируют только в ответ на IL-7 (Geginat J., 2001; Schonland S.O., 2003; Shou C. et al., 2011), а IL-15 способствует их выживанию *in vivo* (Mueller Y.M. et al., 2003). В отличие от наивных Т-лимфоцитов, примированные Т-клетки экспрессируют на своей мембране рецепторы для IL-7 (IL-7Ra; CD127) и IL-15 (IL-15Ra). Наличие на поверхности фактора некроза опухоли (CD95L) и его рецептора (CD95), а также маркера CD56, относящегося к семейству иммуноглобулин-подобных молекул, - еще один отличительный признак Т-клеток памяти (Селедцов В.И. и соавт., 2010).

#### **1.4. Общий лейкоцитарный рецептор - молекула CD45: строение и функциональные особенности**

В изучении феномена иммунной памяти особого внимания заслуживают молекулярно-генетические механизмы дифференцировки наивных Т-клеток-предшественниц в Т-клетки иммунной памяти (Heyd F. et al., 2006). Т-клетки претерпевают многочисленные физические и биохимические изменения при взаимодействии с антигеном. Такие функциональные изменения, в том числе реорганизация цитоскелета, индуцированная экспрессия и секреция цитокинов или цитотоксинов, должны происходить в определенные моменты времени при иммунном ответе. Кроме того, индуцированные клеточные изменения должны быть ослаблены после того, как антиген элиминируется, чтобы предотвратить нерегулируемый рост клеток и потерю толерантности к собственным клеткам организма. Логично, что цикл функциональных изменений, которые происходят в ответ на антигенную стимуляцию Т-клеток, требует изменения экспрессии множества белков (Ip Y.J. et al., 2007).

На поверхности наивных Т-лимфоцитов находится трансмембранная тирозинфосфатаза CD45 (общий лейкоцитарный рецептор), которую кодирует ген *Ptprc*. CD45 (LCA, leukocyte common antigen) является основным

гликопротеином мембраны лимфоцитов, занимая до 10% внешней мембраны клетки (Fang K.S. et al., 1994).

Молекулярная масса CD45 варьирует от 180 до 240 кДа, полипептидная цепь состоит из 1281 аминокислоты. Молекула CD45 экспрессируется на поверхности всех кроветворных клеток, за исключением зрелых эритроцитов. Рецептор CD45 должен быть гликозилирован для экспрессии на поверхностной мембране, а для оптимального функционирования - иметь фосфолипидное окружение и быть специфично ориентированным на поверхности клетки. Современные исследования доказали, что молекула CD45 структурно близка к Т-клеточному рецептору, так как Т-лимфоциты, не экспрессирующие CD45 не способны передавать сигнал, опосредованный через TCR. Это происходит из-за ослабления сопряжения TCR/CD3-сигнального пути с кальциевыми сигналами (Julenius K. et al., 2004).

Ген CD45 находится в хромосоме 1 человека. CD45 относится к 1 типу трансмембранных гликопротеинов, молекула которого имеет два тандема внутрицитоплазматических каталитических домена белка тирозина, одиночный трансмембранный сегмент и внеклеточный домен. Цитоплазматическая часть состоит из белка тирозин фосфатазы (PTPase) и С-концевого хвоста, содержащего 80 аминокислот. Ферментативно активным является только проксимальный мембранный домен PTPase, хотя для функционирования необходимы оба домена. Активный домен представляет собой тирозинфосфатазу, которая катализирует реакцию фосфорилирования тирозинкиназ p56 и p59, приводя тем самым антигенраспознающий комплекс лимфоцита в активированное состояние. Внеклеточная часть молекулы состоит из пяти структурных регионов. N-концевой участок довольно длинный, несет O-связанные гликаны цепи и не участвует в формировании доменной структуры. Именно эта область молекулы определяет образование разных изоформ белков. Основные различия определяются в длине O-гликозилированного региона и цистеин-богатых областях. Мембранная часть является каналом для потока ионов кальция через мембрану (Bilwes A.M. et al., 1996).

Домен, находящийся внутри клетки на 95% гомологичен у всех млекопитающих, тогда как внеклеточный домен гомологичен только на 35%. Таким образом, CD45 является членом семейства белковых тирозинфосфатаз

(PTP) и именуется как PTPRC (Protein Tyrosine-Phosphatase, Receptor Type). Белковые тирозин-фосфатазы - это сигнальные молекулы, регулирующие различные клеточные процессы: митотический цикл, дифференцировку клеток, клеточный рост и онкогенез (Woollett G.R. et al., 1985; Symons A. et al., 1999).

Представленная тирозин-фосфатаза либо непосредственно взаимодействует с компонентами комплексов антиген-рецептор, либо активирует различные киназы, которые необходимы для сигнализации рецептора антигена. Кроме того, CD45 ингибирует JAK-киназы, функционируя как негативный регулятор рецепторов цитокиновой сигнализации (Woollett G.R. et al., 1985).

Эксперименты, проведенные на CD45-дефицитных мышах показали, что этот антиген играет важнейшую роль в регуляции Т- и В-клеток. Кроме того, CD45 участвует в передаче сигналов через Т- и В-клеточные рецепторы антигена. У CD45-дефицитных людей и мышей развивается тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID фенотип). CD45-дефицитные мыши имеют серьезные дефекты в развитии вилочковой железы за счет увеличения апоптоза и неадекватной сигнализации через TCR. В результате чего абсолютное число тимоцитов DP снижается в два раза, а количество одного положительного отбора (SP) тимоцитов уменьшается в пять раз. Также исследования с использованием TCR трансгенных мышей и культур эмбрионального тимуса обнаружили дополнительный дефект – негативный отбор, зависящий от силы негативных раздражителей. Дальнейшие исследования показали, что большинство периферических Т-клеток с фенотипом CD45 являются самореактивными. Эти Т-клетки являются гипореспонсивными к антигенной стимуляции (Symons A. et al., 1999).

Появление на поверхности клетки изоформы CD45RO<sup>+</sup> вместо CD45RA<sup>+</sup>, принято считать фенотипическим признаком дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти. В периферической крови обнаруживается три субпопуляции Т-клеток: CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> — наивные Т-клетки; CD45RA<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup> — Т-клетки памяти и CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> — переходные Т-лимфоциты (Хайдуков С.В., 2008; Селедцов В.И. и соавт., 2010; Ярилин А.А., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2011).

### 1.5. Альтернативный сплайсинг молекулы CD45

В процессе дифференцировки Т-клеток памяти важная роль принадлежит альтернативному сплайсингу гена *Ptpnc*, кодирующего трансмембранную тирозиновую протеинфосфатазу CD45 (Heyd F. et al., 2006, Литвинова Л.С. и др, 2013). Альтернативный сплайсинг является основным механизмом регуляции экспрессии генов, позволяющий получить несколько уникальных мРНК из одного гена с помощью избирательного включения или исключения экзонов (Tong A. et al., 2005). Более 90% человеческих генов регулируются посредством альтернативного сплайсинга (Evsyukova I. et al., 2010). Его контроль происходит с помощью изменения концентрации регуляторных белков (Stamm S., 2002).

Важность регуляции альтернативного сплайсинга у человека иллюстрируется геном CD45 (Tong A. et al., 2005). Вероятно, что различные изоформы по-разному влияют на функцию Т-клеток за счет разницы в их способности взаимодействовать с лигандом, между собой или с TCR (Lynch W.K. et al., 2000). Изоформы молекулы CD45 индивидуальны у разных видов. Альтернативный сплайсинг экзонов 4, 5 и 6 может генерировать, по меньшей мере, восемь различных изоформ (Alexander D.R., 2000). Несмотря на многочисленные исследования, было довольно трудно установить четкие различия в функциях существующих изоформ. Однако точно известно, что уровень экспрессии CD45 является критическим параметром, и что различные уровни экспрессии необходимы на разных этапах Т-клеточного развития. Гликозилирование CD45 варьирует в зависимости от происхождения и стадии дифференцировки клеток. Большинство исследований показало, что CD45RO участвует в более эффективной передаче сигнала Т-клеточного рецептора, чем изоформы, имеющие больший молекулярный вес (CD45RABC и CD45RBC) (Sato T. et al., 1993). Некоторые полинуклеотидные последовательности РНК в некоторых случаях выступают в качестве экзона, в других – в качестве интрона. Благодаря этому, сплайсинг РНК может быть реализован посредством альтернативных путей. Зрелые РНК, которые образовались в процессе альтернативного сплайсинга, отличаются первичной структурой: они имеют как идентичные, так и свои уникальные фрагменты полинуклеотидных последовательностей (Nam H.-J. et al., 1999).

Предварительный сплайсинг мРНК предполагает точное удаление интронов и присоединение экзонов для получения белок-кодирующих мРНК (Ip Y.J. et al., 2007). Вариабельные экзоны богаты O-связанными сайтами гликозилирования, таким образом, изменение включения этих экзонов в мРНК приводит к резкому изменению размера и структуры полученных белков CD45 (Lynch W.K. et al., 2000).

Катализ пре-мРНК сплайсинга опосредует "сплайсосома" - макромолекулярный аппарат, состоящий из пяти небольших ядерных РНК (U1, U2, U4, U5, U6 snРНК) и связанных белков, которые взаимодействуют с последовательностями на границах экзон/интрон ("сайтов сплайсинга"), чтобы направить удаление интронов и лигирование экзонов. Каталитическая сплайсосома (С комплекс) не является предварительно сформированным ферментом: он собирается на пре-мРНК поэтапно, включая в себя несколько различных промежуточных E-A-B комплексов. У высших эукариот последовательности сайта сплайсинга сильно вырождены и, как правило, не содержат достаточной информации для точного определения места расщепления и лигирования (Motta-Mena B. L. et al., 2010).

Важно отметить, что специфичность сплайсинга может регулироваться в процессе альтернативного сплайсинга так, что одна пре-мРНК способна привести к образованию множества независимых мРНК, каждая из которых потенциально кодирует функционально различные изоформы белка. В Т-клетках известно несколько генов, экспрессирующих множество мРНК и изоформ белка посредством альтернативного сплайсинга, в том числе и ген *Ptprc*. Кроме того, было показано, что картина альтернативного сплайсинга для этого гена изменяется в ответ на антигенную стимуляцию, результатом чего являются важные функциональные изменения в экспрессии белка. Однако несмотря на доказательства того, что изменения регуляции альтернативного сплайсинга значимы во время иммунного ответа и могут критически влиять на клеточную функцию, до сих пор нет систематического исследования, позволяющего определить, какие гены регулируются на уровне альтернативного сплайсинга в ответ на воздействие антигенной и не антигенной природы (Ip Y.J. et al., 2007).

Альтернативный сплайсинг обычно контролируется связыванием регуляторных белков сплайсинга вблизи переменных экзонов. Как правило, такие регуляторные белки попадают в одну из двух категорий: SR (серин-аргинин-богатые)-белки содействуют включению экзонов, в то время как *hnRNPLL*, наоборот, способствуют пропуску экзонов. Также существует дополнительная возможность регуляции белков, например, с помощью РТВ-ассоциированного фактора сплайсинга (PSF), который может участвовать в качестве основного компонента сплайсосомы, или же в регулировании других многочисленных ядерных процессов, таких как локализация мРНК, транскрипция и раскручивание ДНК (Melton A.A. et al., 2007). Исследования показали, что в покоящихся Т-клетках PSF напрямую фосфорилируется GSK3, способствуя тем самым взаимодействию PSF с TRAP150, что предотвращает PSF от связывания пре-мРНК CD45. После активации Т-клеток снижение активности GSK3 приводит к снижению фосфорилирования PSF, освобождая PSF от TRAP150, что позволяет связать регуляторные элементы сплайсинга CD45 и подавить включение экзона. Известно, что PSF и hnRNP L-типа (hnRNP LL) связываются с элементом регулирования ESS1 в стимулированных клетках и опосредуют повышенный пропуск переменных экзонов CD45, наблюдаемых при активации Т-клеток. Ядерного белка PSF достаточно много, и он выполняет различные функции от сплайсинга до экспорта ядерных материалов. Экспрессия ядерного PSF остается неизменной при активации. Интересно, что GSK3 (киназа 3 гликогенсинтазы) была первоначально описана как фермент, регулирующий метаболизм глюкозы. Однако установлено ее участие во многих других клеточных процессах. Выявлено, что активность GSK3 снижена при антигенной стимуляции, опосредованной CD28 сигналингом, необходимым для оптимального ответа Т-клеток (Heyd F. et al., 2010).

Активация наивных Т-клеток инициируется на поверхности с помощью вовлечения Т-клеточных (TCR) и костимулирующих рецепторов (CD28), и управляется комплексом транскрипционных изменений многих генов (Hess K. et al., 2004). Как уже упоминалось, CD28 является основным костимулирующим рецептором, необходимым для активации наивных Т-клеток. Butte J.M и коллеги продемонстрировали, что костимуляция CD28 приводит к серьезным изменениям альтернативного сплайсинга во время активации наивных Т-клеток, по сравнению

с активацией только TCR (Butte J.M. et al., 2012). Области белка CD45, кодируемые переменными экзонами, сильно гликозилированы, и, тем самым, предотвращают гомодимеризацию CD45. После активации Т-клеток, пропуск переменных экзонов CD45 приводит к гомодимеризации на клеточной поверхности, что приводит к образованию неактивной формы фосфатазы и снижению сигнализации через TCR. Таким образом, альтернативный сплайсинг CD45 является механизмом обратной связи для поддержания Т-клеточного гомеостаза (Martinez M.N. et al., 2013).

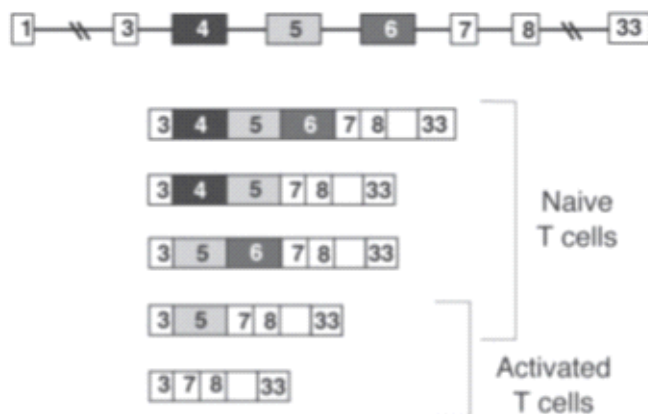
О физиологической важности пропуска переменных экзонов свидетельствует тот факт, что встречающиеся в природе полиморфизмы в гене CD45 коррелируют с восприимчивостью к широкому спектру аутоиммунных заболеваний и вирусных инфекций в организме человека, в частности, к рассеянному склерозу и ВИЧ-инфекции. Кроме того, ВИЧ-инфекция сама вызывает пропуск экзонов в CD45 (Lynch W.K., 2004).

Экспрессия гена *hnRNPLL* зависит от стимуляции CD28, запуская механизм, посредством которого CD28 может регулировать сплайсинг в Т-клетках (Butte J.M. et al., 2012). Исследования показали, что избыточная экспрессия *hnRNPLL* в клетках дикого типа вызывает пропуск экзона 4, в то время как снижение экспрессии *hnRNPLL* вызывает включение экзона, в первую очередь, в активированных клетках (Topp D.J. et al., 2008). Мутации в белке hnRNPL могут влиять на экспрессию изоформ CD45 (Lynch K.W. et al., 2001; Tong A. et al., 2005).

Пять изоформ белка CD45 экспрессируются в организме человека в результате альтернативного включения экзонов 4-6 (**рисунок 1**). Известно, что переменные экзоны 4 и 6 экспрессируются только в 40-60% покоящихся клеток памяти, тогда как экзон 5 присутствует практически во всех мРНК. При антигенной стимуляции включение экзонов 4 и 6 становится едва уловимым, однако, экзон 5 входит в состав практически половины мРНК (Lynch W.K., 2004)

Изоформы трансмембранной тирозинфосфатазы имеют отличия в своих внеклеточных доменах. Экспрессия изоформ CD45 жестко регулируется в периферических Т-клетках. Так, покоящиеся клетки экспрессируют преимущественно изоформы CD45 с большим молекулярным весом, которые кодируются мРНК, содержащей два или три переменных экзона. В

противоположность этому, активированные Т-клетки экспрессируют низкомолекулярные изоформы CD45, кодируемые мРНК с отсутствием большинства или же всех - переменных экзонов. Наивные Т-клетки, экспрессирующие значительное количество высокомолекулярных изоформ CD45, имеют высокую фосфатазную активность и поддерживают Т-клеточный рецептор в премированном состоянии для распознавания антигена (Tong A. et al., 2005).



**Рисунок 1.** Схематичное изображение экзонов гена, кодирующего CD45. Переменные экзоны 4-6 обозначаются черными, светло-серыми и темно-серыми ячейками соответственно. Определяющие экзоны обозначены белыми ячейками. Преимущественная экспрессия изоформ в наивных и активированных Т-клетках обозначена на рисунке (Tong A. et al., 2005).

После антигенной стимуляции переменные экзоны, преимущественно, исключены, в результате чего экспрессируются изоформы CD45 с меньшим молекулярным весом (Lynch K.W. et al., 2000). Низкомолекулярные изоформы CD45 более склонны к гомодимеризации, чем крупные (Xu Z. et al., 2002). Важно отметить, что в димерном состоянии внутриклеточная фосфатазная активность CD45 ингибируется посредством пространственной организации. Таким образом, переход к низкомолекулярным изоформам CD45 при активации Т-клеток снижает фосфатазную активность CD45 и, как полагают, способствует ослаблению Т-клеточной сигнализации (Hermiston M.L. et al., 2002; Xu Z. et al., 2002). Чтобы в полной мере понять и предсказать дифференциальную экспрессию изоформ CD45 в Т-клетках, нужна полная характеристика детерминант, регулирующих сплайсинг CD45. Вероятно, решающую роль в определении эффективности связывания сплайсосомы и получения экзона включения играют вспомогательные

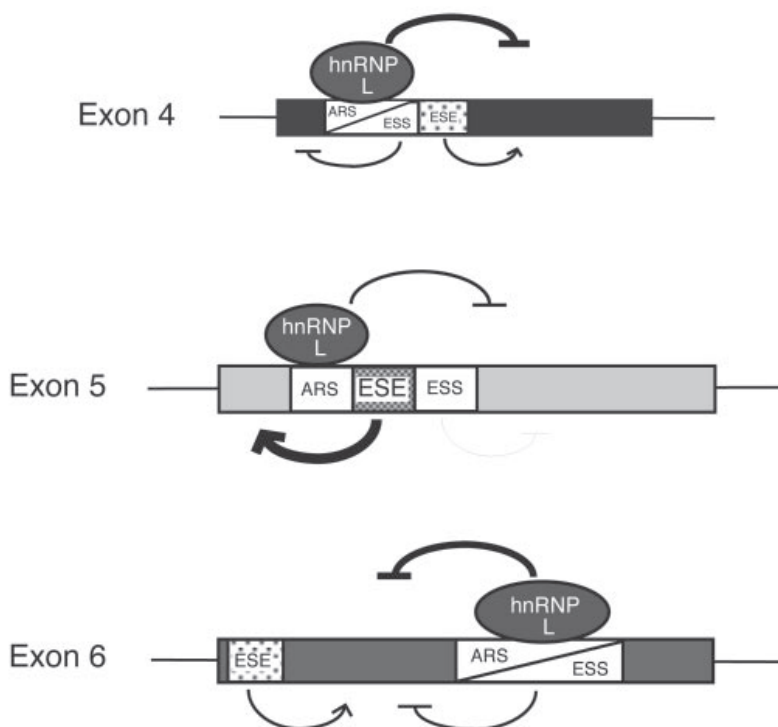


последовательности (то есть усилители или глушители) переменных экзонов (Black D.L., 2003; Fu X.D., 2004). Для идентификации регулирующих мотивов, влияющих на экспрессию изоформ CD45 необходима экспериментальная диссекция переменных экзонов. Ранее исследователи определили регуляторные последовательности, которые контролируют включение переменного экзона 4, в том числе мотива, именуемого как *активационно-ответная* последовательность (activation-responsive sequence; ARS) (Lynch K.W. et al., 2001; Rothrock C. et al., 2003).

В соответствии с физиологическим распределением изоформ CD45, экзон 5 содержит сильный энхансер (усилитель) (ESE) и слабый глушитель (ESS), в то время как экзон 6 содержит два сильных глушителя ESSs и слабый энхансер ESE. Было показано, как и в экзоне 4, экзоны 5 и 6 содержат последовательности, которые необходимы для активации экзона репрессии, который связывает hnRNPL и обязательно содержит мотив ARS. Таким образом, экспрессия изоформ CD45 определяется комбинацией эффектов основной и индуцибельной регуляторной активности, закодированной в каждой из трех переменных экзонов (Tong A. et al., 2005). Каждый из трех переменных экзонов CD45 содержит несколько регуляторных последовательностей сайта сплайсинга, которые контролируют окончательное решение о включении или пропуске экзона (**рисунок 2**).

Экзоны 4 и 6 содержат богатую пуриновыми основаниями последовательность ESE, что способствует включению, а экзон 5 - уникальную последовательность, которая действует как надежный энхансер включения экзона. Кроме того, все три экзона содержат ESS элементы, которые противодействуют включению экзона и содействуют пропуску экзона. Для экзонов 4 и 6, последовательность, которая дает пропуск экзонов в покоящихся клетках, содержит последовательность ARS, и функционирует, позволяя осуществлять увеличение репрессии экзона при клеточной стимуляции (Rothrock C.R. et al., 2005; Tong A. et al., 2005). Последовательность ARS дополнительно присутствует в экзоне 5 и необходима для стимуляции, вызванной репрессиями этого экзона, так как мутации E5: R2 вызывает невосприимчивость сплайсинга экзона 5 к РМА (Форбол 12-миристан-13-ацетата). Важно отметить, что РНК-регуляторный фактор hnRNPL связывает каждый из трех переменных экзонов CD45 ARS-зависимым

образом и вовлечен в базальную репрессию экзона 6. Таким образом, не только переменные экзоны CD45 имеют общие регуляторные последовательности и паттерны экспрессии, но каждый из них также является мишенью, по крайней мере, для одного общего регуляторного белка.



**Рисунок 2.** Включение экзонов 4-6 CD45 независимо управляется аналогичной внутренней комбинацией базальных и индуцибельных регуляторных мотивов. Схематически показаны ESEs, ESSs и ARSs в экзонах 4, 5 и 6 CD45. Богатые пуриновыми основаниями ESEs обозначаются точками, в то время как ESE для экзона 5 показаны в форме ромба. Стрелки обозначают энхансерную активность (т.е. содействие экзона включения), в то время как полосы изображают функцию глушителя (т.е. подавление экзона включения). Ширина полосок и стрелок намекают на относительную силу деятельности. *hnRNPLL* указывает на связывание с консенсус-мотивами ARS в каждом экзоне (Tong A. et al., 2005).

Несмотря на многочисленные сходства в регуляции переменных экзонов CD45, есть несколько заметных различий. Во-первых, в отличие от экзонов 4 и 6, изолированная ARS-содержащая последовательность экзона 5 вызывает лишь небольшую репрессию экзонов в покоящихся клетках. Причина различий между деятельностью ARS в трех экзонах неясна, и, вероятно, указывает на дополнительные эффекты, которые еще предстоит определить. В связи с этим, стоит отметить, что ARS мотив в E6: R5 и E6: R7, также как и в экзоне 4 CD45,

находится в окружении вышестоящего участка из 4-5 пиримидинов, в то время как E5: R2 не содержит такой последовательности. Кроме того, любая ARS-опосредованная активность базального глушителя, которая может существовать в E5: R1-5, вероятно, маскируется сильной энхансерной деятельностью, предоставляемой от E5: R3. Таким образом, очевидно, что ядро ARS-мотива необходимо для сигнал-индуцированных изменений в сплайсинге. Кроме того, нельзя исключить возможность того, что интронные последовательности, обычно окружающие экзон 5 (и даже, возможно, экзоны 4 и 6), влияют на сплайсинг этих экзонов (Tong A. et al., 2005).

Очевидна важность последовательности экзонов в регуляции экспрессии изоформ CD45. В частности, регуляторные последовательности, охарактеризованные в каждом из варибельных экзонов CD45, соответствуют наблюдаемой физиологической экспрессии белка CD45. Деятельность ESS внутри экзонов 4 и 6 является очень прочной, а экзон 5 имеет относительно слабую ESS, но достаточно сильную ESE. Эта разница в балансе регуляторных механизмов объясняет тот факт, что экзон 5 включен в подавляющее большинство транскриптов, продуцирующихся в покоящихся клетках и даже во многие из экспрессированных транскриптов после активации, в то время как включение экзонов 4 и 6 наблюдается гораздо реже.

Детальное понимание регуляторных компонентов сплайсинга имеет решающее значение для интерпретации биологических эффектов полиморфизмов и мутаций в гене CD45. По крайней мере, в человеческой популяции были описаны два полиморфизма в экзонах 4 и 6 - они изменяли экспрессию изоформ CD45 и были потенциально связаны с восприимчивостью к аутоиммунным заболеваниям (Vogel A. et al., 2003; Voxall S. et al., 2004; Tong A. et al., 2005).

В дополнение к *hnRNPLL*, выявлены гены (*U2af114*, *Gfi1*), продукты которых, взаимодействуя, отчасти, регулируют процесс дифференцировки иммунокомпетентных клеток, в частности, Т-лимфоцитов (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W.K., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Предполагают, что альтернативный сплайсинг CD45 регулируется совместными действиями вспомогательного фактора сплайсинга *U2AF26* (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4, *U2af114*) и фактора транскрипции *Gfi1* (growth factor

independent 1). Сложные транскрипционные схемы, способствующие дифференциации и пролиферации Т-лимфоцитов, непосредственно связаны с *Gfi1*. При усилении или потере функции *Gfi1*, развиваются тяжелая врожденная нейтропения, неиммунная хроническая идиопатическая нейтропения взрослых и другие иммунные расстройства (Phelan D.J. et al., 2010).

Антагонистические взаимодействия этих факторов могут определять соотношение вариантов рецептора CD45, регулирующего активность Т-клеток во время иммунного ответа. *U2AF26* способствует формированию менее активных форм CD45RO путем содействия экзона исключения. Тогда как наличие *Gfi1* приводит к формированию более активной формы CD45RB. Вероятно, относительное содержание *U2AF26* и *Gfi1* определяет отношение CD45 изоформ, тем самым регулируя дифференцировку Т-клеток (Heyd F. et al., 2006; Литвинова Л.С. и соавт., 2013).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, резюмируя вышесказанное, следует отметить, что альтернативный сплайсинг является ключевым этапом формирования всего разнообразия белков организма. Многие гены, относящиеся к функционированию иммунной системы, также подвергаются альтернативному сплайсингу. Тем не менее, все еще недостаточно данных для построения модели активации этого процесса в ходе дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Реорганизация молекул пре-мРНК является ключевым процессом в ходе такой дифференцировки: на поверхности Т-клеток памяти появляется рецептор CD45RO, который является результатом альтернативного сплайсинга мРНК гена *Ptprc*. Выявлены основные регуляторные факторы (*U2AF26* и *Gfi1*), на антагонистических эффектах которых, предположительно, базируется антиген-зависимая активация Т-клеток. Все больше внимания начинают уделять изучению функционирования гена *hnRNPLL*, который координирует работу множества транскрипционных факторов в процессе альтернативного сплайсинга Т-лимфоцитов. Сообщения в научной периодике все больше ориентированы на поиск альтернативных путей дифференцировки Т-лимфоцитов и выявление новых «игроков» в этом сложном процессе.

Участие цитокинов, основных медиаторов межклеточной кооперации в регуляции сложного механизма первичного и вторичного иммунного ответа, является доказанным. Особое внимание уделено цитокинам семейства I типа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), имеющим общую  $\gamma$ -цепь, в связи с их способностью оказывать комплексное воздействие на клеточный гомеостаз Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки. Вероятно, что действие некоторых цитокинов на Т-клетки носит дозозависимый характер, определяется типом клеток-мишеней и их функциональным статусом (степенью дифференцировки, функциональной активностью, состоянием рецепторного аппарата клетки).

Учитывая вышесказанное, мы предполагаем, что одним из механизмов, посредством которого цитокины, имеющие общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7 и IL-15) принимают непосредственное участие в дифференцировке Т-клеток *in vivo* и *in vitro*, может быть регуляция альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, что может определять исход как первичных, так и вторичных иммунных реакций.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объект и материал исследования

В основу работы положены результаты комплексного исследования 58 здоровых доноров (29 мужчин и 29 женщин в возрасте от 22 до 35 лет).

**Критериями исключения** из исследования являлись: возраст моложе 18 и старше 35 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости.

Материалом для исследования служила венозная кровь (20 мл), взятая из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER ТМ" («Greiner-bio-one», Австрия), стабилизированная К<sub>3</sub>ЭДТА.

Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (*№ 5 от 5 ноября 2013 г.*).

Все экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка БФУ им. И.Канта (зав. лабораторией – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова).

### 2.2. Методы исследования

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования, нами был предложен алгоритм экспериментального блока, позволяющий оценить влияние цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15), на регуляцию механизмов молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток.

В зависимости от условий культивирования были сформированы 2 модели:

– **I модель (гомеостатическая)**, предполагает создание *in vitro* условий гомеостатического влияния цитокинов семейства I типа (IL-2, IL-7 и IL-15), имеющих общую  $\gamma$ -цепь, на Т-клетки разной степени дифференцировки.

– **II модель (активационная)**, отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с антиген-презентирующими клетками (активация клеток через CD2, CD3 и CD28), в комбинации с разными концентрациями цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15). Дизайн исследования схематично представлен на рисунке 3.

# ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

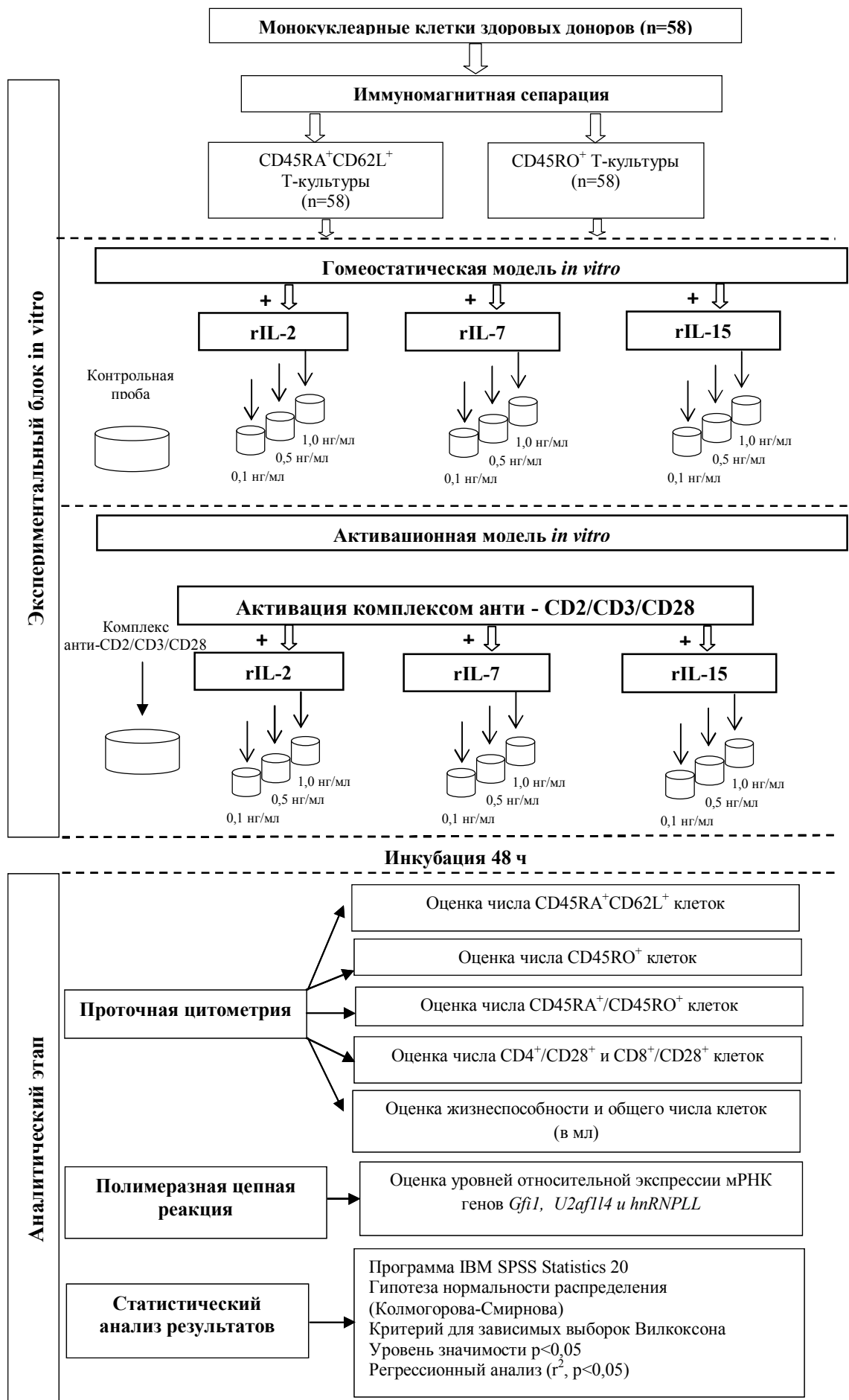


Рисунок 3. Схема дизайна исследования

### **2.2.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови**

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>). Венозную гепаринизированную кровь (20 ЕД/мл) смешивали с 0,9% физ. раствором (NaCl) в соотношении 1:1. Полученную разведенную кровь наслаивали на градиент фиколл-урографина (1,077 г/см<sup>3</sup>) в соотношении 1:3 и центрифугировали при 1500 об/мин 45 мин на мультифункциональной центрифуге с охлаждением Thermo Jouan CR3i (Thermo Fisher Scientific, США). Образовавшееся интерфазное кольцо из мононуклеарных клеток собирали автоматической пипеткой с раздела фаз в стерильную пробирку и дважды отмывали 0,9% раствором NaCl, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 15 мин при 1500 об/мин.

Тщательно слив надосадочную жидкость, полученную взвесь мононуклеарных клеток доводили фосфатно-солевым буфером (с 0,5% BSA «Miltenyi Biotec», Германия) до 1 мл и в дальнейшем использовали для выделения фракций CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

### **2.2.2. Выделение «наивных» (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и «примированных» (CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации**

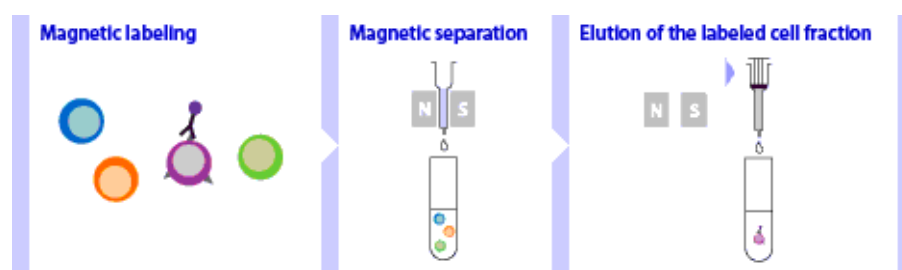
**Принцип метода:** Для получения монокультур наивных Т-клеток (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и Т-клеток памяти (CD45RO<sup>+</sup>) из МНК был использован метод иммуномагнитной сепарации (ИМС), в основе которого лежит технология MACS® («Miltenyi Biotec» Германия). Технология MACS основана на использовании суперпарамагнитных частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с высокоспецифичными моноклональными антителами (МАТ). Добавленные к взвеси клеток MicroBeads, в течение короткого промежутка времени связываются с их мембранами, несущими соответствующие рецепторы к антителам. Диаметр частиц значительно меньше порога разрешения светового микроскопа и составляет 50 нм. MACS MicroBeads биodeградируемы и не вызывают реакции со стороны



клеток. Колонки MACS, заполненные не токсичным для клеток ферромагнитным матриксом, помещённые в сепаратор MACS, позволяют генерировать сильное магнитное поле для фиксации клеток, нагруженных MicroBeads, сохраняя их жизнеспособность.

Клетки, не связавшие MicroBeads, удаляются промыванием колонки буфером, как *негативная фракция*. Это процедура представляет собой *негативную селекцию*.

После изъятия колонки из магнитного поля, с помощью поршня, под давлением столба жидкости (MACS-буфер) элюируется высокообогащённая фракция клеток, связавших магнитные частицы (*позитивная фракция*) - *позитивная селекция клеток* (рисунок 4).



**Рисунок 4.** Позитивная иммуномагнитная селекция

Для избавления смеси мононуклеаров от CD14<sup>+</sup>-клеток (моноцитов) был использован метод позитивной иммуномагнитной селекции с применением автоматического магнитного сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument («Miltenyi Biotec», Германия) и моноклональных антител к CD14<sup>+</sup> с парамагнитными частицами (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Для этого к выделенной ранее суспензии мононуклеарных клеток (80 мкл взвеси содержала не менее 10<sup>7</sup> кл), добавляли 20 мкл магнитных частиц к CD14<sup>+</sup> (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия), согласно протоколу производителя. Суспензию с магнитными частицами инкубировали 15 мин в темноте при +4<sup>0</sup>С. После инкубации клетки отмывали в 2 мл буфера PBS (с 0,5% BSA, «Miltenyi Biotec», Германия) и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Затем сливали надосадочную жидкость и добавляли 500 мкл буфера в

клеточную суспензию, тщательно ресуспендируя. Далее переходили к автоматической иммуномагнитной сепарации, следуя протоколу производителя.

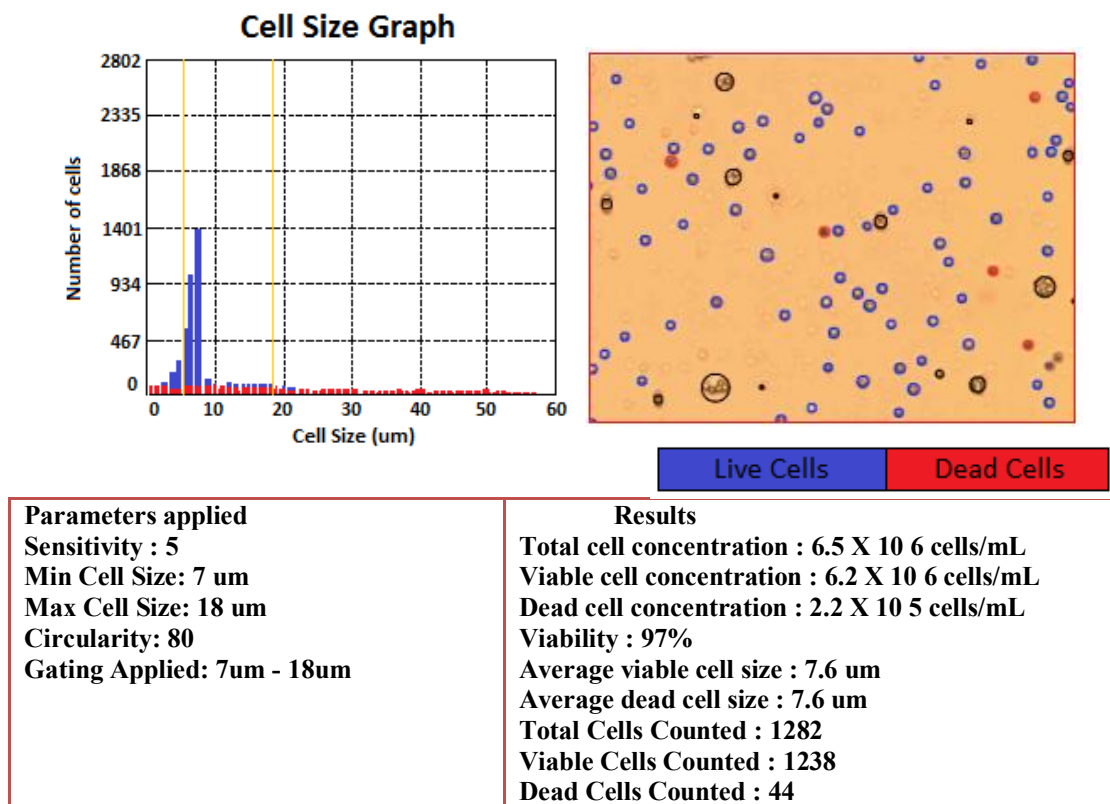
После проведенной селекции, для получения популяций наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) и примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-клеток, в дальнейшем, использовали *негативную фракцию*, которую центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Далее сливали надосадочную жидкость и добавляли в пробирку 80 мкл буфера и 20 мкл магнитных частиц к  $CD45RO^+$  (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия). Для позитивной селекции  $CD45RO^+$  Т-лимфоцитов повторяли процедуру, аналогичную для  $CD14^+$  клеток.

Полученные пробирки с позитивной фракцией, содержащей  $CD45RO^+$  и негативной фракцией, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Сливали надосадочную жидкость и добавляли в пробирку, содержащую  $CD45RO^+$ -лимфоциты среду Искова, а в пробирку с негативной клеточной фракцией - 80 мкл буфера и микс магнитных частиц к  $CD45RA^+$  и  $CD62L^+$  (20 мкл) (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия). Для позитивной селекции  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоцитов повторяли процедуру, аналогичную для  $CD45RO^+$  Т-клеток.

Выделенные методом автоматической иммуномагнитной сепарации клетки с фенотипом  $CD45RA^+CD62L^+$  и  $CD45RO^+$ , помещали в бессывороточную культуральную среду Искова, объемом 1 мл. Подсчёт клеточности в культурах Т-клеток разной степени дифференцировки проводили с помощью автоматического счётчика клеток (Countess™ Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% («Invitrogen», США). Жизнеспособность составляла не менее 95-98% от общего числа клеток (**рисунок 5**).

Отсутствие моноцитов ( $CD14^+$ ) и В-лимфоцитов ( $CD19^+$ ) в культурах  $CD45RA^+$ - и  $CD45RO^+$  Т-клеток до культивирования подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PE-Cy7 и PerCP («Abcam», Великобритания и «e-Bioscience», США). Анализ поверхностных маркеров проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия), согласно

протоколам производителей. Использовали культуры, содержание в которых  $CD3^+CD45RA^+CD62L^+CD14^-CD19^-$  и  $CD3^+CD45RO^+CD14^-CD19^-$  Т-клеток, составляло, в среднем  $97.5 \pm 2.12\%$ .



**Рисунок 5.** Количество живых и мёртвых клеток в культуре  $CD45RO^+$  Т-лимфоцитов

### 2.2.3. Культивирование Т-клеток разной степени дифференцировки ( $CD45RO^+$ и $CD45RA^+$ )

$CD45RA^+CD62L^+$  и  $CD45RO^+$ -клетки ( $1 \times 10^6$  кл/мл) культивировали в 48-луночном планшетах в бессывороточной среде Искова («Sigma-Aldrich», США), содержащей 0.5% сывороточного альбумина человека («Микроген», Россия),  $5 \times 10^{-5}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанола («Acros Organics», США) и 30 мкг/мл гентамицина в течение 48 ч при  $37^\circ C$ , во влажной атмосфере, содержащей 5%  $CO_2$ .

В эксперименте были использованы разные концентрации рекомбинантных форм цитокинов – IL-2, IL-7, IL-15 и клеточный активатор («Miltenyi Biotec», Германия).

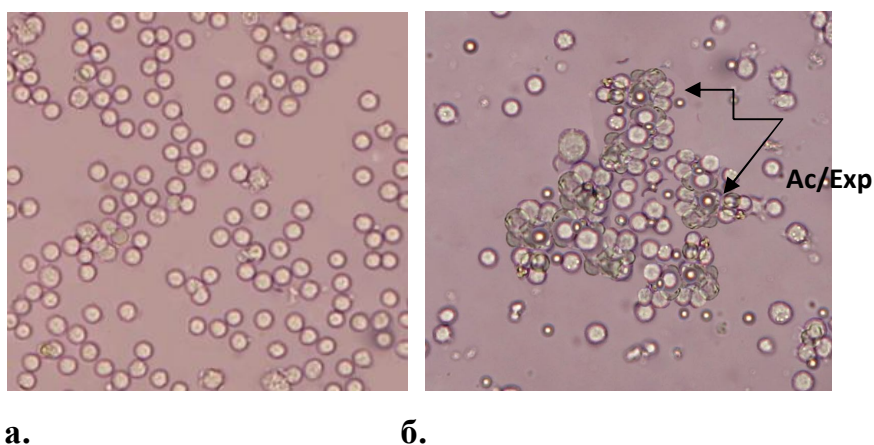
В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия) - антибиотиновые частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> человека. Нагруженные антителами анти-биотиновые частицы MACSiBead™ используются в качестве имитации АПК и активации покоящихся Т-клеток. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали -  $0,5 \cdot 10^6$  анти-биотиновых MACSiBead™ частиц. Соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1:2.

В зависимости от условий культивирования, экспериментальный блок исследований, выполненный на Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки, включал в себя 2 модели.

### **I модель (гомеостатическая) (рисунки 3, 6):**

Для реализации были использованы следующие варианты культивирования:

- 1) интактная проба;
- 2) пробы с добавлением rIL-2 ( $0,1 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $0,5 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $1,0 \cdot 10^{-9}$  г/мл);
- 3) пробы с добавлением rIL-7 ( $0,1 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $0,5 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $1,0 \cdot 10^{-9}$  г/мл);
- 4) пробы с добавлением rIL-15 ( $0,1 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $0,5 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $1,0 \cdot 10^{-9}$  г/мл).



**Рисунок 6.** Культуры CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов без (а) и с добавлением (б) Т-клеточного активатора (Ac/Exp).

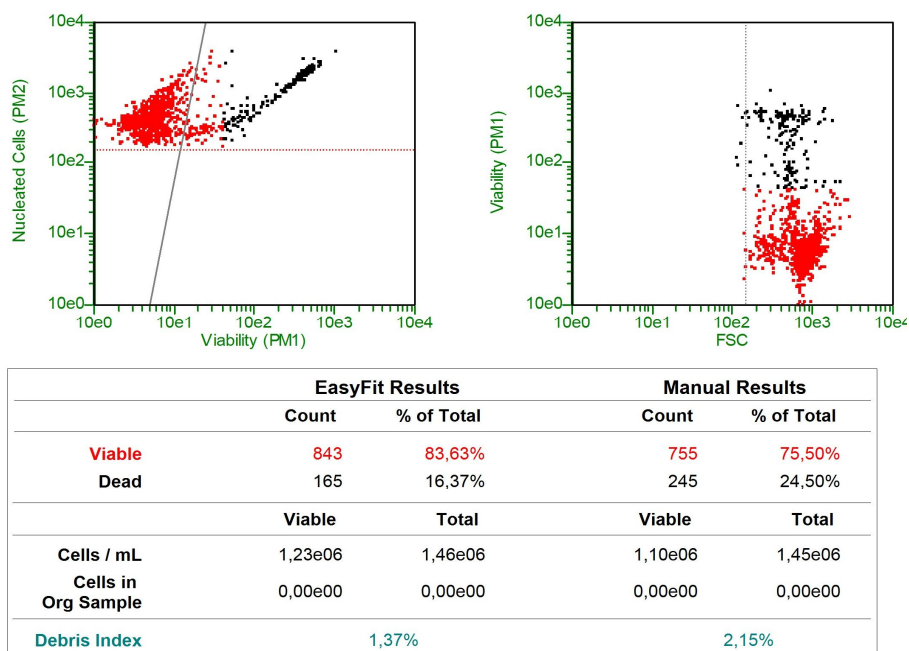
**II модель (активационная)**, отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с антиген-презентирующими клетками (**рисунок 6**).

Для реализации были использованы следующие варианты культивирования

- 1) интактная проба;
- 2) проба с добавлением Ас/Ехр;
- 3) пробы с добавлением Ас/Ехр и rIL-2 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл);
- 4) пробы с добавлением Ас/Ехр и rIL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл);
- 5) пробы с добавлением Ас/Ехр и rIL-15 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл).

#### 2.2.4. Определение общего числа клеток (в мл) и количества жизнеспособных лимфоцитов в культурах CD45RA<sup>+</sup>62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток методом проточной цитометрии

**Принцип метода.** Дифференциальная проницаемость для ДНК-связывающих красителей позволяет разграничивать живые и мертвые клетки в любых клеточных суспензиях (**рисунок 7**).



**Рисунок 7.** Стандартный протокол с использованием реагента и одноименной программы «GuavaViacount» (Millipore, США).

Для подсчёта количества клеток в мл в культурах Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки, а также для определения их жизнеспособности, после культивирования, клеточные образцы тщательно ресуспендировали и отбирали 12,5 мкл, добавляли 125 мкл ViaCount Reagent (фактор разведения 10), тщательно ресуспендировали и оставляли на 5 минут в темном месте.

Регистрацию жизнеспособности и подсчёт числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили с использованием программы «Guava ViaCount» (Millipore, США), методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «Guava EasyCite Plus» (Millipore, США), согласно протоколу производителя.

### **2.2.5. Определение поверхностных молекул - CD4, CD8 и CD28 на Т-клетках разной степени дифференцировки методом проточной цитометрии**

**Принцип метода** заключается в определении рассеивания света лазерного луча при прохождении через него клеток, окрашенных моноклональными антителами, меченными флуоресцентными метками.

Иммунофенотипирование клеток проводили с использованием коктейля моноклональных антител к CD4 (FITC), CD8 (PerCPy5.5) и CD28 (PECy7) («eBioscience», USA), приготовленного *ex tempore*.

После культивирования, образцы тщательно ресуспендировали. 50 мкл клеточной взвеси переносили в микроцентрифужные пробирки (типа эппендорф) и вносили 9 мкл коктейля моноклональных антител (pH=7,4). Инкубирование осуществляли в течение 30-45 мин в темноте при температуре 4<sup>0</sup>С. После инкубации добавляли 200 мкл фосфатно-солевого буфера и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем удаляли надосадочную жидкость. Доводили общий объем клеточной пробы до 200 мкл фосфатно-солевым буфером, тщательно ресуспендировали автоматическим дозатором и переносили в лунки иммунологического планшета. Измерение образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (“Miltenyi Biotec”, Германия).

Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США).

Вычисляли процентное число  $CD4^+CD28^+$  и  $CD8^+CD28^+$  - лимфоцитов от общего числа  $CD45RO^+$  и  $CD45RA^+$  клеток и в гейтах от  $CD45^+CD4^+$  и  $CD45^+CD8^+$  Т-лимфоцитов.

#### **2.2.6. Определение поверхностных маркеров конверсии наивных Т-клеток в Т-клетки иммунной памяти ( $CD45RA/CD45RO$ ) методом проточной цитометрии**

Имунофенотипирование клеток проводили с использованием коктейля моноклональных антител к  $CD45RAPE/CD45ROFITC$  («eBioscience», USA). Процедура описана ранее в (пп 2.2.5). В культурах  $CD45RA^+CD62L^+$  и  $CD45RO^+$  Т-клеток определяли процентное число клеток, позитивных по молекулам:  $CD45RA$ ,  $CD45RO$  и содержание дубль-позитивных -  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-клеток.

#### **2.2.7. Выделение тотальной РНК**

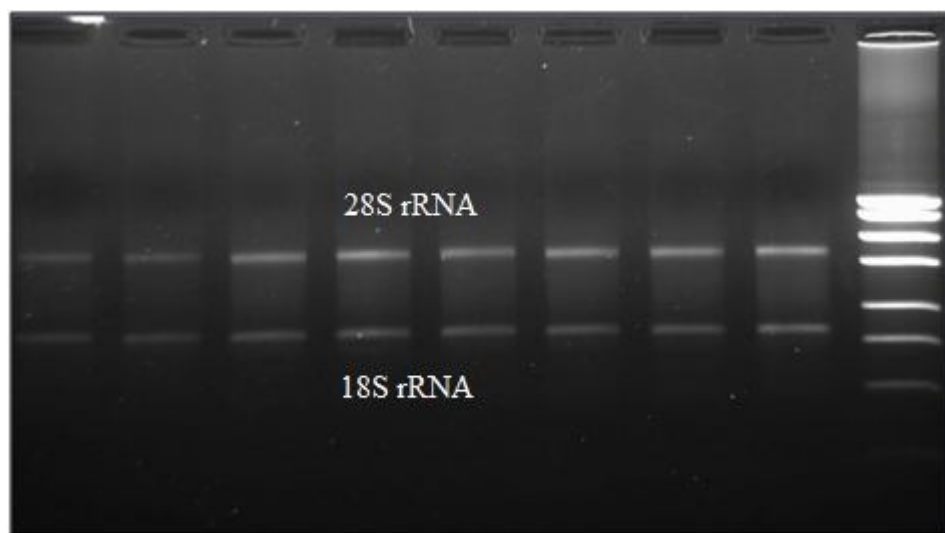
После инкубации клеточные культуры центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, оставляя 100 мкл, тщательно ресуспендировали клеточный осадок. Для выделения тотальной РНК в образцы добавляли по 1 мл ExtractRNA (водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата) (ExtractRNA kit «Евроген», Россия) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. После инкубации центрифугировали 10 минут при 15000g («Eppendorf», Centrifuge 5804R, Германия). Отбирали лизат и переносили его в подготовленный заранее эппендорф. Затем в полученный лизат добавляли 0,2 мл хлороформа («Вектон», Россия) и активно перемешивали содержимое (вручную) в течение 15 секунд. Инкубировали смесь 5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая образец. Затем центрифугировали 15 минут при 15000g при 4°C. Из полученной трехфазной смеси аккуратно отбирали водную фазу, содержащую тотальную РНК и добавляли 0,5 мл 100% изопропанола.

Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре 10 мин, затем центрифугировали при 12000g в течение 10 мин при комнатной температуре. Тщательно отбирали супернатант, оставив осадок РНК на дне

пробирки. Затем добавляли 2 мл 75% этанола и центрифугировали в течение 5 мин при 15000g при комнатной температуре. Затем удаляли супернатант и высушивали осадок на воздухе в эппендорфе с открытой крышкой в течение 7 мин. Растворяли полученную РНК в 100 мкл воды, свободной от РНКаз и ДНКаз.

Чистоту препаратов выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра (Nanovue Plus, GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция). Анализировали результат отношения значений поглощения на длинах волн 260 нм и 280 нм ( $A_{260} \text{ нм}/A_{280} \text{ нм}$ ). Значения варьировали в диапазоне 2,7-2,9 усл.ед.

Качество (целостность) выделенных образцов тотальной РНК определяли методом электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле и трис-ацетатном буфере (ТАЕ) по соотношению плотности бэндов, соответствующих большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам рРНК. Образцы выделенной РНК считали пригодными для последующего аналитического этапа, если плотность бэнда, соответствующего малой субъединице не превышала плотность бэнда, соответствующего большой субъединице (индекс **RIN (RNA Integrity Number)** был равным 1:2) (**рисунок 8**).



**Рисунок 8.** Определение качества клеточной РНК по соотношению плотности бэндов, соответствующих большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам.

Для получения 1,5 %-ого агарозного геля 150 мг сухой агарозы помещали в 100 мл буфера ТАЕ (x1) и прогревали в микроволновой печи до полного



растворения. Затем давали остыть до 50-60°C, добавляли 2мкл бромистого этидия (10%) и заливали планшетки с гребенкой. После застывания гель использовали для проведения электрофореза. Затем 2 мкл раствора анализируемой РНК смешивали с буфером для нанесения образцов и помещали в карманы геля. Горизонтальный электрофорез вели в TAE (x1) буфере при напряженности поля 60В/см. Результаты электрофореза фиксировали при помощи CCD камеры GelDoc XR ("Bio-Rad", США) в УФ-свете.

Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus («GE Healthcare», США).

Полученные образцы были заморожены при -80°C до дальнейшего использования.

### **2.2.8. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК**

Концентрации полученных образцов РНК были приведены к одному значению для получения одинакового количества кДНК. Для этого в имеющиеся пробы добавляли очищенную воду, доводя концентрацию РНК до 10 мкг/мл. Затем готовили по 13,5 мкл реакционной смеси в стерильной пробирке на каждый образец из следующих компонентов: 9 мкл РНК матрицы (10 мкг) смешивали с 4,5 мкл праймера oligo(dT)23-primer (20 мкМ) («Beagle», Россия). Аккуратно ресуспендировали смесь, сбрасывая капли со стенок на микроцентрифуге («ELMI SkyLine», Латвия), и помещали пробирки с образцами в ДНК-амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). По окончании реакции переносили образцы на лед. Далее добавляли по 16,5 мкл предварительно подготовленной смеси: 6 мкл пятикратного буфера для синтеза первой цепи, 3 мкл смеси dNTP (20 мМ), 3 мкл DTT (20 мМ) и 4,5 мкл MMLV ревертазы. Так же аккуратно перемешивая смесь и сбрасывая капли со стенок на микроцентрифуге («ELMI SkyLine», Латвия). Помещали пробирки в ДНК-амплификатор T100 Thermal Cycler («Bio-Rad»,

США). По окончании реакции пробирки с образцами замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего использования.

### **2.2.9. Определение уровня относительной экспрессии генов методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени**

Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили мультиплексный анализ ПЦР с использованием реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМ («Beagle», Россия). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген *GAPDH*.

**Принцип метода** реализуется за счет добавления в реакционную смесь, флуоресцирующих зондов комплементарных внутренней последовательности амплифицируемых фрагментов. Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, несущий на 5'-конце флуорофор, и на 3'-конце, так называемый «гаситель» - флуорофор подобранный таким образом, чтобы его диапазон поглощения совпадал с диапазоном эмиссии флуорофора связанного с 5'-концом. Подобная комбинация обеспечивает полноценное гашение флуоресценции 5'-концевого флуорофора 3'-концевым флуорофором за счет флуоресцентно-резонансного переноса энергии (FRET). Таким образом, флуоресценция 5'-концевого флуорофора при условиях целостности первичной структуры зонда оказывается близкой к нулю. Полимеразная цепная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификации) фрагмента ДНК ограниченного участками посадки праймеров. На каждом цикле амплификации происходит гибридизация олигонуклеотидного зонда к комплементарному участку ампликона с последующим разрушением (гидролизом) зонда ферментом – термостабильной ДНК полимеразой (благодаря ее 5'-экзонуклеазной активности). При гидролизе зонда происходит пространственное разобщение 5' и 3' концевых

флуорофоров, что делает невозможным гашение флуоресценции посредством FRET взаимодействия. Регистрируемое при этом увеличение значений флуоресценции 5'-флуорофора прямо пропорционально увеличению числа синтезированных ампликонов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице.

Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью on-line программы BLAST.

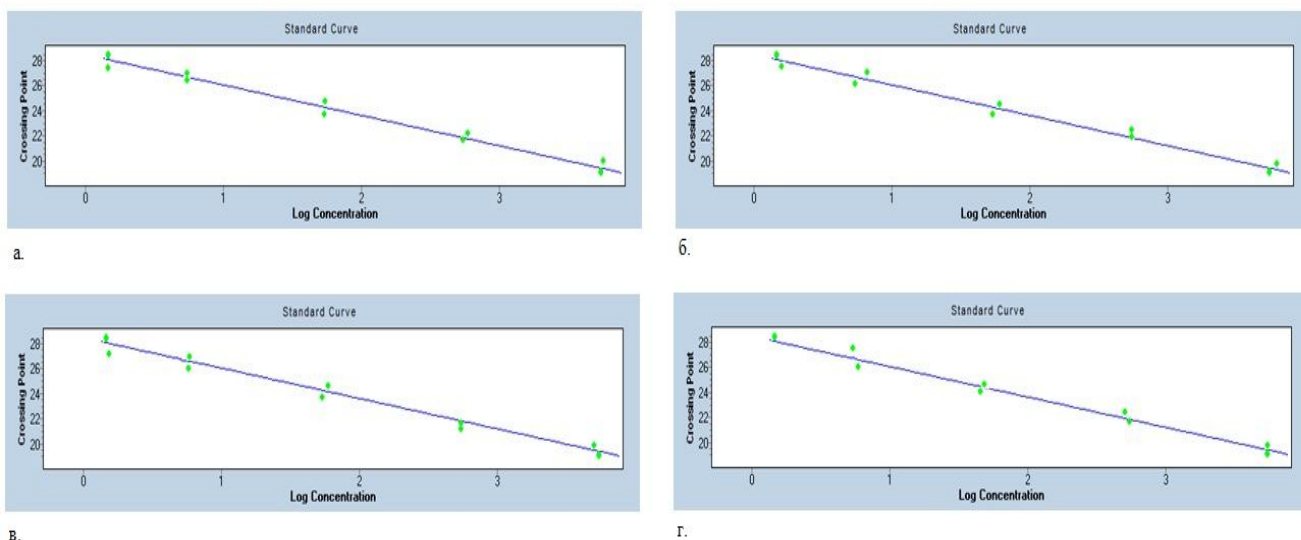
Последовательность олигонуклеотидных праймеров указана в *таблице 1*.

**Таблица 1**

Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте

GFI1_for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
GFI1_rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
U2af114_for 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3'
U2af114_rev 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3'
hnRPLL_for 5'-CTCTCAATTCAGAATCCGCTTTATC-3'
hnRPLL_rev 5'-CCATTGCTTGTATCCCATTCTC-3'
GAPDH_for 5'-GAAGGTGAAGGTCCGGAGTC-3'
GAPDH_rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
GFI1_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1
U2af114_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1
hnRPLL_probe FAM-5'-TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC-3'~BHQ-1
GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'-BHQ-1

Для каждой пары праймеров была подобрана оптимальная температура отжига с использованием градиентной ПЦР (Bio-Rad T-100, Bio-Rad C-1000, США). Оптимизация условий полимеразной цепной реакции проводилась при амплификации пяти последовательных 2-х кратных разведений кДНК, каждая точка была представлена в двойном повторе (**рисунок 9**).



**Рисунок 9.** Проекция значений  $C_t$  серии двукратных разведений для построения калибровочной кривой генов: а) *GAPDH*; б) *hnRNPLL*; в) *Gfi1*; г) *U2af114*.

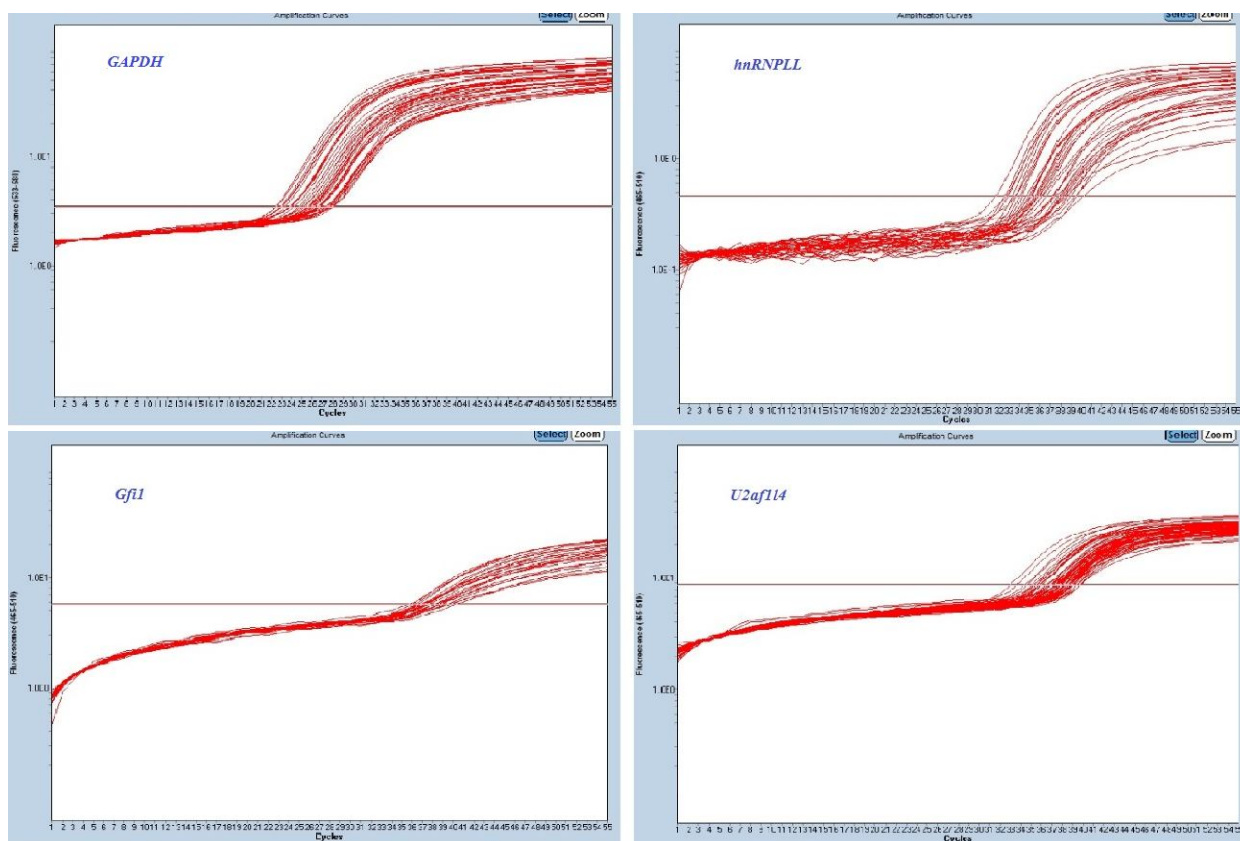
ПЦР-реакцию проводили в трех повторах. Для проведения ПЦР использовали амплификатор LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария).

Протокол амплификации:

- первичная денатурация – 5 мин при 95 °С;
- амплификационный цикл (x 45):
  - денатурация – 20 с при 95 °С;
  - отжиг праймеров - 30 с при 60 °С ( $58C^0$  для гена *hnRPLL*);
  - элонгация - 60 с при 72 °С;
- постинкубация - 5 мин при 72 °С;
- построение кривой плавления – нагревание амплификационной смеси с 65 до 95 °С, с шагом 5 °С.

Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной (Second Derivative Maximum method), т.е. определения значения некоторой характеристической точки  $C_p$  (Crossing point) на графике накопления ДНК по форме кривой (**рисунок 10**).

Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффла для разных эффективностей амплификации.



$$\text{Относительный уровень экспрессии} = \frac{E_{\text{иссл}}^{\Delta C_{P_{\text{иссл}}(\text{контр-иссл})}}}{E_{\text{реф}}^{\Delta C_{P_{\text{реф}}(\text{контр-иссл})}}}$$

Относительный уровень экспрессии исследуемого гена вычисляется, исходя из его эффективности ПЦР в реальном времени (E) и разности ( $\Delta$ ) точек пересечения ( $C_P$ ) неизвестного образца по сравнению с контрольным ( $\Delta C_P = C_{P_{\text{контрольного образца}}} - C_{P_{\text{исследуемого образца}}}$ ).

Используемый относительный количественный анализ (Relative Quantification) основан на отношении экспрессий исследуемого к экспрессии референсного гена и является достаточным для большинства целей исследовать физиологические изменения в уровнях экспрессии генов.

**Рисунок 10.** Графическое представление кинетики накопления продукта ПЦР исследуемых генов при амплификации экспериментальных образцов.

Полученные в ходе анализа результаты зависят от референсного гена и применяемой процедуры нормализации. Некоторые математические модели уже разработаны для расчета относительных уровней экспрессии в одних образцах, с или без коррекции эффективности. Данная формула показывает наиболее удобную

математическую модель, которая включает в себя коррекцию эффективности для эффективности ПЦР в реальном времени отдельных транскриптов.

Распределение экспериментальных клеточных моделей *in vitro* в соответствии с использованными методами исследования (число культур/число проб) представлено в **таблице 2**.

### 2.2.10. Методы статистического анализа данных

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез (Кремер Н.Ш., 2004). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневыборочные характеристики: медиану (M), первый и третий квартили ( $Q_1$ ,  $Q_3$ ). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий для зависимых выборок Вилкоксона. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r$ )) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии –  $r^2$ ) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  (Кремер Н.Ш., 2004).

**Таблица 2**

Распределение экспериментальных клеточных моделей *in vitro* в соответствии с использованными методами исследования (число культур/число проб)

Методы исследования	Условия культивирования	Экспериментальные клеточные модели	
		CD45RA <sup>+</sup>	CD45RO <sup>+</sup>
Определение общего числа клеток (в мл) и количества жизнеспособных лимфоцитах в культурах Т-клеток методом проточной цитометрии	Интактная проба + rIL-2 0,1x10 <sup>-9</sup> г/мл 0,5x10 <sup>-9</sup> г/мл 1,0x10 <sup>-9</sup> г/мл + rIL-7 0,1x10 <sup>-9</sup> г/мл 0,5x10 <sup>-9</sup> г/мл 1,0x10 <sup>-9</sup> г/мл	58/1218	58/1218
Определение числа CD45RO/CD45RA - позитивных клеток методом		58/1218	58/1218

проточной цитометрии	<b>+ rIL-15</b> 0,1x10 <sup>-9</sup> г/мл 0,5x10 <sup>-9</sup> г/мл 1,0x10 <sup>-9</sup> г/мл		
Определение числа CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> клеток методом проточной цитометрии		58/1218	58/1218
Оценка уровней относительной экспрессии мРНК генов <i>Gfi1</i> , <i>U2af114</i> и <i>hnRNPLL</i> методом полимеразно-цепной реакции	Интактная проба + Ac/Exp <b>Ac/Exp + rIL-2</b> 0,1x10 <sup>-9</sup> г/мл 0,5x10 <sup>-9</sup> г/мл 1,0x10 <sup>-9</sup> г/мл <b>Ac/Exp + rIL-7</b> 0,1x10 <sup>-9</sup> г/мл 0,5x10 <sup>-9</sup> г/мл 1,0x10 <sup>-9</sup> г/мл <b>Ac/Exp + rIL-15</b> 0,1x10 <sup>-9</sup> г/мл 0,5x10 <sup>-9</sup> г/мл 1,0x10 <sup>-9</sup> г/мл	58/1218	58/1218

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Оценка эффектов иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\alpha$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на жизнеспособность и общее количество клеток (10<sup>6</sup>/мл) в культурах Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки и разный активационный статус

В интактных культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов после окончания времени инкубации (48 ч), общее количество клеток, в среднем составило (1.08 ± 0.09)×10<sup>6</sup> кл/мл. Внесение в культуру примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток rIL-2, независимо от концентрации, сопровождалось статистически значимым увеличением количества клеток в мл (в среднем, на 20%) (**рисунок 11**), при этом эффект цитокина не был обнаружен при добавлении его в культуру наивных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> лимфоцитов.

Внесение в среду инкубации rIL-7 в различных концентрациях не приводило

к статистически достоверному изменению общего числа лимфоцитов разной степени дифференцировки.

Эффект  $\text{rIL-15}$  был выявлен лишь в его максимальной концентрации ( $1 \times 10^9$  /мл) и приводил к статистически достоверному повышению количества примированных ( $\text{CD45RO}^+$ ) Т-клеток, при этом он не оказывал влияния на наивные ( $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$ ) Т-клетки (**рисунок 11**).

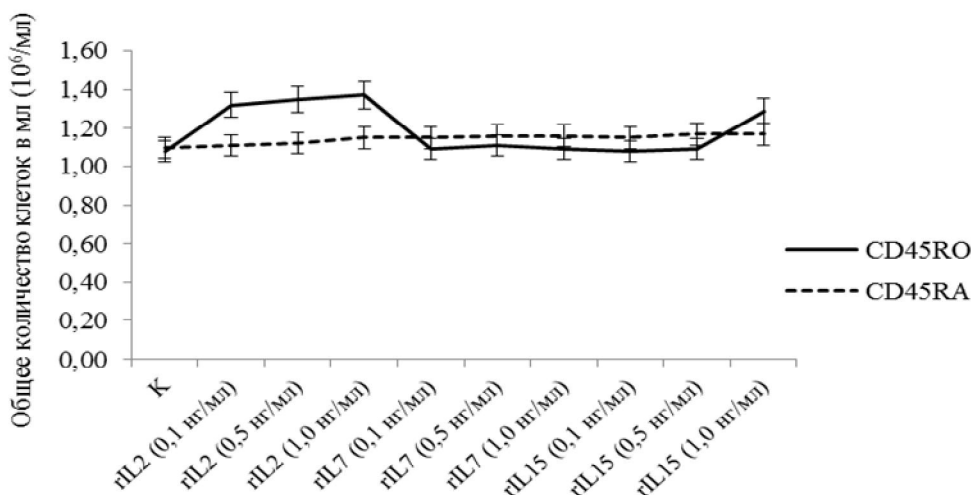
При оценке жизнеспособности Т-клеток разной степени дифференцировки в гомеостатической модели пролиферации при добавлении иммунорегуляторных цитокинов ( $\text{rIL-2}$ ,  $\text{rIL-7}$  и  $\text{rIL-15}$ ) в среду инкубации не удалось выявить значимых различий с контрольными значениями (**рисунок 12**).

Культивирование Т-лимфоцитов с активирующим *анти-CD2/CD3/CD28* - комплексом, имитирующим действие антиген-презентирующих клеток (АПК), приводило к достоверному увеличению числа клеток в культурах Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки, в среднем, на 22% (**рисунок 13**).

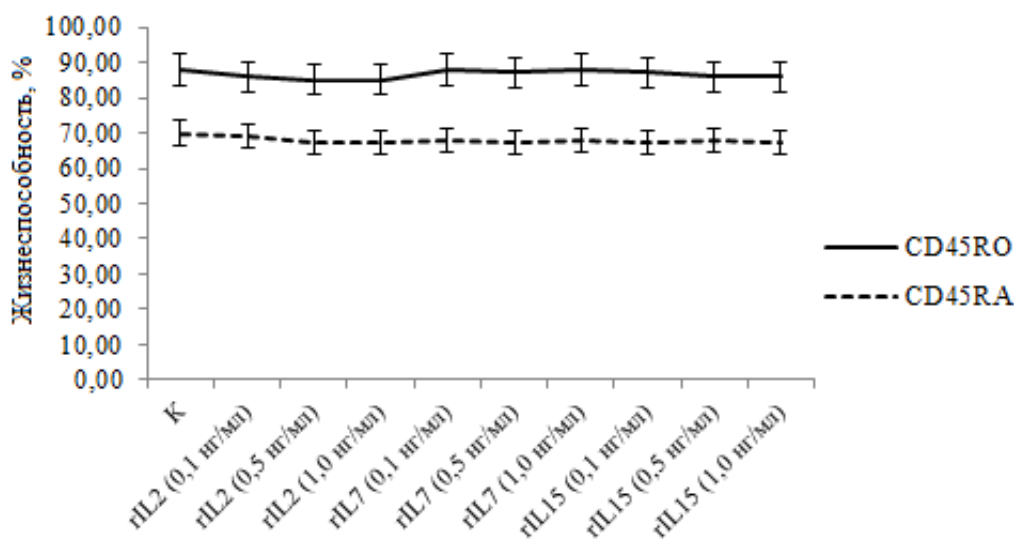
Анализ жизнеспособности позволил выявить, что культивирование  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  и  $\text{CD45RO}^+$  Т-клеток с комплексом *анти-CD2/CD3/CD28* сопровождалось статистически значимым уменьшением количества живых Т-клеток в сравнении с интактной пробой. Более чувствительными к его проапоптогенному действию оказались  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  Т-клетки (**рисунок 14**).

$\text{rIL-7}$  на фоне активирующего действия анти-CD2/CD3/CD28-частиц не влиял на изменение общего количества клеток (в мл) в культурах  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  и  $\text{CD45RO}^+$  Т-лимфоцитов.

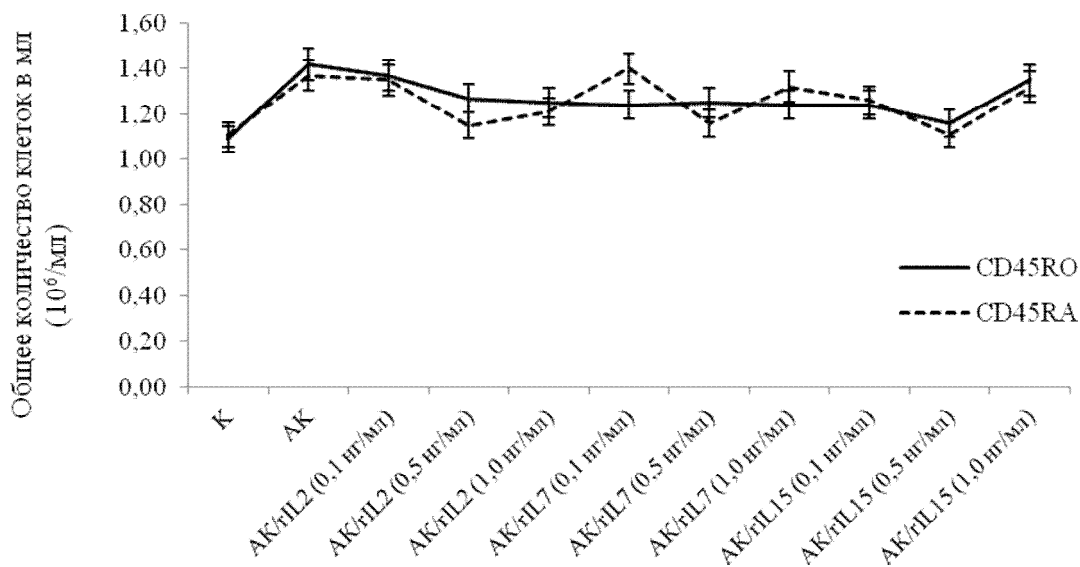




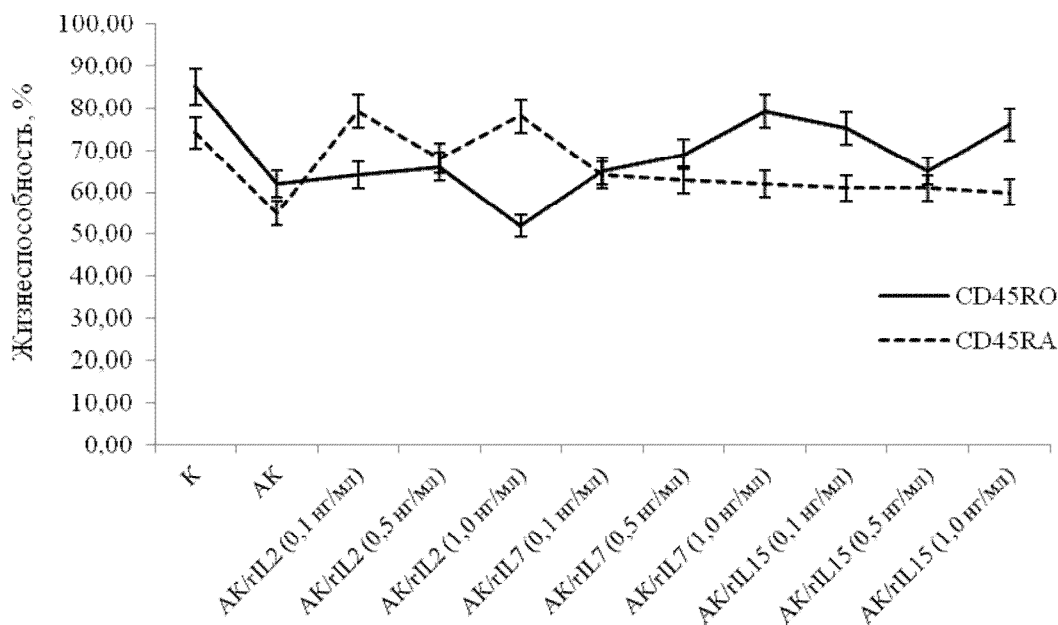
**Рисунок 11.** Общее количество клеток ( $10^6/\text{мл}$ ) в культурах  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  и  $\text{CD45RO}^+$  Т-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации. К – количество живых клеток в контрольной пробе; IL2-0,1–0,5-1,0 - в клеточных культурах rIL-2 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл); IL7-0,1–0,5-1,0 - в клеточных культурах с rIL-7 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл); IL15-0,1–0,5-1,0 - в клеточных культурах с rIL-15 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл).



**Рисунок 12.** Содержание живых клеток (%) в культурах  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  и  $\text{CD45RO}^+$ -лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации. Обозначения как в рисунке 11.



**Рисунок 13.** Общее количество клеток ( $10^6/\text{мл}$ ) в культурах  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  - и  $\text{CD45RO}^+$ -лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации. К – количество живых клеток в контрольной пробе; АК – с Т-клеточным CD2/CD3/CD28-активатором; АК IL2-0,1–0,5-1,0 - в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и rIL-2 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл); АК IL7-0,1–0,5-1,0 - в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и rIL-7 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл); АК IL15-0,1–0,5-1,0 - в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и rIL-15 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл).



**Рисунок 14.** Содержание живых клеток (%) в культурах  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  и  $\text{CD45RO}^+$ -лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации. Обозначения как в рисунке 13.

Выявлено разнонаправленное действие rIL-2 ( $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл) на жизнеспособность активированных комплексом анти-CD2/CD3/CD28

CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток. Показано повышение количества живых наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов (в среднем, в 1,5 раза), и напротив, снижение числа жизнеспособных CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток (в среднем, на 20%) в сравнении с таковыми в пробе с добавлением только анти-CD2/CD3/CD28 – частиц (рисунок 14). Иммунорегуляторные цитокины rIL-7 и rIL-15 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл), на фоне CD2/CD3/CD28-стимуляции, повышали (в среднем на 20%) число жизнеспособных примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток, по сравнению с пробами только с добавлением активатора (рисунок 14).

**3.2. Оценка эффектов иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую  $\alpha$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на мембранную экспрессию молекулы позитивной костимуляции (CD28) в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляциях культур Т-лимфоцитов (CD4; CD8), имеющих разную степень дифференцировки и разный активационный статус**

**CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup>**

Согласно полученным данным, представленным в таблице 3, количество Т-клеток, несущих молекулу позитивной костимуляции CD28, в культурах наивных клеток составило 92,05 (85,02 – 97,31)%. Число CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток было равным 66,56 (58,81 – 69,21) и 26,49 (22,51 – 29,52)% соответственно (таблица 3).

Добавление rIL-2 в максимальной концентрации (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) приводило к статистически достоверному снижению количества как CD4/28, так и CD8/28 лимфоцитов. rIL-7 не изменял число наивных лимфоцитов, несущих на своей мембране молекулу позитивной костимуляции CD28<sup>+</sup> (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>). Внесение в среду культивирования наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток rIL-15 в минимальных концентрациях (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл, 0,5x10<sup>-9</sup> г/мл) приводило к уменьшению количества цитотоксических (CD8<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD28<sup>+</sup>. CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клетки были нечувствительны к действию rIL-15.

Таблица 3

Содержание CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток (%) в культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в условиях инкубации с цитокинами, имеющими общую  $\alpha$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) с использованием гомеостатической модели (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Варианты культивирования	CD45RA			CD45RO		
	CD28	CD4/28	CD8/28	CD28	CD4/28	CD8/28
<b>Интактная проба</b>	92,05 (85,02-97,31)	66,56 (58,81-69,21)	26,49 (22,51-29,52)	60,19 (56,89-65,56)	44,39 (38,05-48,56)	15,80 (10,38-17,18)
<b>IL-2 (0,1 нг/мл)</b>	91,31 (86,30-95,44)	64,62 (59,13-68,81)	28,71 (23,21-31,31)	56,36 (52,87-58,14)	44,24 (34,77-45,64)	12,34 (11,91-17,25)
<b>IL-2 (0,5 нг/мл)</b>	93,12 (89,13-98,36)	66,78 (61,11-71,17)	27,38 (22,12-29,66)	58,98 (56,49-61,90)	44,26 (39,45-46,06)	13,12 (10,90-14,57)
<b>IL-2 (1,0 нг/мл)</b>	70,34 (69,52-81,21) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	53,37 (48,17-59,29) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	17,44 (12,27-21,21) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	48,36 (38,37-56,03) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	41,01 (35,20-43,72) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	6,47 (5,11-12,62) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
<b>IL-7 (0,1 нг/мл)</b>	94,56 (91,35-96,18)	67,32 (59,85-71,18)	27,09 (23,31-32,18)	52,77 (49,19-54,61) p <sub>0</sub> <0,05	42,62 (37,45-43,03)	10,15 (9,46-10,91) p <sub>0</sub> <0,05
<b>IL-7 (0,5 нг/мл)</b>	90,02 (88,15-94,91)	61,34 (58,15-67,03)	29,32 (23,87-34,14)	57,88 (52,44-62,45)	43,47 (39,91-46,74)	12,19 (11,53-15,53)
<b>IL-7 (1,0 нг/мл)</b>	92,34 (88,15-95,43)	66,54 (61,23-69,43)	26,43 (23,75-29,59)	57,82 (50,58-62,30)	43,42 (36,30-44,71)	12,14 (11,34-16,19)
<b>IL-15 (0,1 нг/мл)</b>	75,32 (72,34-78,23) p <sub>0</sub> <0,05	58,34 (53,45-62,12)	17,43 (14,32-19,23) p <sub>0</sub> <0,05	55,17 (51,38-56,69)	41,71 (37,58-42,51)	12,38 (11,71-15,90)
<b>IL-15 (0,5 нг/мл)</b>	71,04 (54,98-77,18) p <sub>0</sub> <0,05	43,69 (38,13-48,25)	18,37 (16,28-22,34) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05	54,95 (48,49-58,70)	42,18 (37,96-45,82)	12,16 (10,12-13,79)
<b>IL-15 (1,0 нг/мл)</b>	91,72 (85,34-93,29)	66,59 (59,24-74,14)	23,13 (11,95-28,05)	49,32 (45,85-57,22) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05	41,98 (36,91-47,58)	8,15 (6,54-10,29) p <sub>0</sub> <0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05

**Примечание:** здесь и в таблице 5: p<sub>0</sub> - достоверность различий по сравнению с интактной пробой

p<sub>1</sub> - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением rIL-2 (0,1 нг/мл)/rIL-7(0,1 нг/мл)/rIL-15 (0,1 нг/мл)

p<sub>2</sub> - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением rIL-2 (0,5 нг/мл)/rIL-7(0,5 нг/мл)/rIL-15 (0,5 нг/мл)

p<sub>3</sub> - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением rIL-2 (1,0 нг/мл)/rIL-7(1,0 нг/мл)/rIL-15 (1,0 нг/мл)

Содержание CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток (%) в культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в условиях инкубации с цитокинами, имеющими общую  $\alpha$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) с использованием активационной модели (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Варианты культивирования	CD45RA			CD45RO		
	CD28	CD4/28	CD8/28	CD28	CD4/28	CD8/28
<b>Интактная проба</b>	92,05 (85,02-97,31)	66,56 (58,81-69,21)	26,49 (22,51-29,52)	60,19 (56,89-65,56)	44,39 (38,05-48,56)	15,80 (10,38-17,18)
<b>Ас/Ехр</b>	72,72 (68,38-77,85) p <sub>0</sub> <0,05	56,47 (48,19-62,12) p <sub>0</sub> <0,05	15,97 (13,32-19,47) p <sub>0</sub> <0,05	51,09 (48,52-54,33) p <sub>0</sub> <0,05	42,02 (41,97-51,67)	10,49 (7,35-12,91) p <sub>0</sub> <0,05
<b>Ас/Ехр / IL-2 (0,1 нг/мл)</b>	74,79 (69,02-78,18)	55,02 (49,97-61,92)	18,39 (15,58-23,45)	54,73 (51,96-56,59)	43,80 (42,16-45,60)	12,10 (9,87-17,76)
<b>Ас/Ехр / IL-2 (0,5 нг/мл)</b>	71,70 (68,28-79,02)	55,63 (49,67-62,65)	16,91 (14,93-21,24)	61,05 (53,97-62,08)	45,28 (43,42-47,26)	12,00 (9,61-17,61)
<b>Ас/Ехр / IL-2 (1,0 нг/мл)</b>	58,87 (47,12-63,62) p <sub>1</sub> <0,05	46,94 (34,38-49,62) p <sub>1</sub> <0,05	10,01 (9,19-12,67) p <sub>1</sub> <0,05	45,10 (41,07-59,77) p <sub>1</sub> <0,05	38,03 (34,58-41,52)	7,95 (6,05-8,29) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ас/Ехр / IL-7 (0,1 нг/мл)</b>	63,44 (57,28-68,54)	47,37 (42,98 - 51,27) p <sub>1</sub> <0,05	16,68 (11,03-18,78)	57,25 (55,40-58,95)	46,12 (41,63-49,17)	12,22 (8,99-17,09)
<b>Ас/Ехр / IL-7 (0,5 нг/мл)</b>	73,50 (68,86-78,08)	56,29 (51,13-61,80)	17,31 (14,67-21,98)	57,24 (53,04-58,19)	45,45 (43,49-50,03)	11,33 (7,46-16,72)
<b>Ас/Ехр / IL-7 (1,0 нг/мл)</b>	73,14 (69,14-78,24)	57,32 (51,58-66,91)	16,37 (14,99-18,44)	55,28 (52,26-56,69)	42,61 (42,06-46,95)	13,84 (10,05-15,06)
<b>Ас/Ехр / IL-15 (0,1 нг/мл)</b>	75,18 (68,50-78,62)	58,00 (54,38-60,66)	17,57 (16,74-20,16)	45,33 (38,78-49,57)	38,41 (35,15-42,92)	7,17 (6,62-10,07) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ас/Ехр / IL-15 (0,5 нг/мл)</b>	71,08 (67,79-76,49)	55,35 (49,39-59,65)	16,18 (12,51-18,63)	46,77 (44,34-48,82) p <sub>1</sub> <0,05	39,51 (43,04-45,47)	8,20 (7,24-14,69) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ас/Ехр / IL-15 (1,0 нг/мл)</b>	62,97 (58,88-77,81) p <sub>1</sub> <0,05	53,46 (48,32-64,88)	9,17 (8,58-11,04) p <sub>1</sub> <0,05	55,26 (52,55-58,11)	43,23 (41,97-46,52)	12,59 (9,51-16,96)

Примечание: здесь и в таблице 6: p<sub>0</sub> - достоверность различий по сравнению с интактной пробой

p<sub>1</sub> - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением активатора Ас/Ехр

p<sub>2</sub> - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ас/Ехр + rIL-2 (0,1 нг/мл) / + rIL-7(0,1 нг/мл) / + rIL-15 (0,1 нг/мл)

p<sub>3</sub> - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ас/Ехр + rIL-2 (0,5 нг/мл) / + rIL-7(0,5 нг/мл) / + rIL-15 (0,5 нг/мл)

p<sub>4</sub> - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ас/Ехр + rIL-2 (1,0 нг/мл) / + rIL-7(1,0 нг/мл) / + rIL-15 (1,0 нг/мл)

Добавление в культуру наивных Т-клеток *комплекса анти-CD2/CD3/CD28*, приводило к достоверному снижению числа CD28<sup>+</sup> - позитивных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток (в среднем, на 21 и 40%).

Сочетанное использование CD2/CD3/CD28-комплекса и rIL-2 и rIL-15 в максимальных концентрациях ( $1,0 \times 10^{-9}$ /мл) приводило к достоверному снижению числа CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток, причем, действие rIL-15 было направлено лишь на изменение цитотоксических лимфоцитов CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, тогда как эффекты rIL-2 затронули как субпопуляцию CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток.

Минимальная концентрация rIL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл), на фоне активации наивных (CD45RA<sup>+</sup>) Т-клеток *комплексом анти-CD2/CD3/CD28* приводила к уменьшению количества CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, не оказывая влияние на цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (**таблица 4**).

### ***CD45RO<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup>***

При исследовании культур примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов, содержание CD45RO<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток в культуре оказалось равным 60,19 (56,89-65,56)%. Количество CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток составило 44,39 (38,05-48,56) и 15,80 (10,38-17,18)% соответственно (**таблица 3**).

Инкубация Т-клеток памяти с rIL-2 и rIL-15 в максимальной концентрации ( $1 \times 10^{-9}$ /мл) приводила к статистически значимому уменьшению числа Т-клеток с фенотипом CD45RO<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> в сравнении со значениями, полученными при исследовании интактных культур ( $p < 0,05$ ) (**таблица 3**). Снижение числа CD45RO<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> также как и в случае с RA происходило за счет CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Добавление в среду культивирования примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток активирующего *CD2/CD3/CD28*-комплекса, сопровождалось изменением количества CD45RO<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, преимущественно за счет снижения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>Т-клеток (**таблица 4**).

Инкубация активированных CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток с rIL-2 в максимальной концентрации ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и с rIL-15 в минимальных концентрациях ( $0,1 \times 10^{-9}$

г/мл и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) приводила к статистически значимому снижению количества  $CD8^+CD45RO^+CD28^+$  Т-лимфоцитов ( $p \leq 0,05$ ) (таблица 4).

### 3.3. Оценка влияния иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\alpha$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на экспрессию генов *Gfi1* и *U2af114* в культурах Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки и разный активационный статус

Один из возможных механизмов регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, кодирующего общий лейкоцитарный рецептор – CD45, базируется на антагонистических эффектах вспомогательного фактора сплайсинга *U2AF26* и фактора транскрипции *Gfi1*, вовлеченных в регуляцию антигензависимой активации Т-клеток (Heyd F. et al., 2006; Heyd F., Lynch K.W., 2010).

Инкубация  $CD45RA^+CD62L^+$  клеток с  $\alpha$ IL-2, приводила к дозозависимому усилению экспрессии мРНК обоих генов *U2af114* и *Gfi1* ( $r^2=0,83$ ,  $r^2=0,77$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ) (рисунок 15). Действие  $\alpha$ IL-7 на экспрессию мРНК изучаемых генов в наивных Т-лимфоцитах носило разнонаправленный характер. Увеличение действующей концентрации  $\alpha$ IL-7 сопровождалось дозозависимым снижением транскрипции мРНК *U2af114* ( $r^2= -0,81$ ,  $p \leq 0,05$ ) при одновременном повышении экспрессии *Gfi1* ( $r^2=0,78$ ,  $p \leq 0,05$ ). При добавлении  $\alpha$ IL-15 в среду культивирования наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток было обнаружено дозопосредованное снижение транскрипции мРНК *U2af114* при увеличении действующей концентрации цитокина ( $r^2= -0,86$ ,  $p \leq 0,05$ ), тогда как экспрессия мРНК гена *Gfi1* равномерно повышалась (в среднем, в 2 раза) при добавлении IL-15 в широком диапазоне концентраций (рисунок 15).

Культивирование  $CD45RO^+$  клеток (как и в случае с  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-клетками) в присутствии широкого диапазона концентраций  $\alpha$ IL-2 приводило к дозозависимому усилению экспрессии мРНК обоих генов - *U2af114* и *Gfi1* ( $r^2=0,85$ ,  $r^2=0,76$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ) (рисунок 16).

Добавление в среду культивирования Т-клеток памяти  $\alpha$ IL-7, аналогично наивным Т-лимфоцитам, приводило к снижению уровней экспрессии мРНК гена *U2af114* с увеличением действующей дозы цитокина ( $r^2= -0,82$ ,  $p \leq 0,05$ ). Относительный уровень транскрипции мРНК гена *Gfi1* незначительно

увеличивался (в среднем, в 1,5 раза) (**рисунок 16**). Эффекты  $\text{rIL-15}$  на  $\text{CD45RO}^+$  Т-клетки сопровождались дозозависимым снижением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* с увеличением концентрации цитокина ( $r^2 = -0,78$ ,  $r^2 = -0,76$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ) (**рисунок 16**).

Особый интерес представляла оценка действия рекомбинантных форм цитокинов ( $\text{IL-2}$ ,  $\text{IL-7}$ ,  $\text{IL-15}$ ) на Т-клетки разной степени дифференцировки, активированные анти- $\text{CD2/CD3/CD28}$ -частицами.

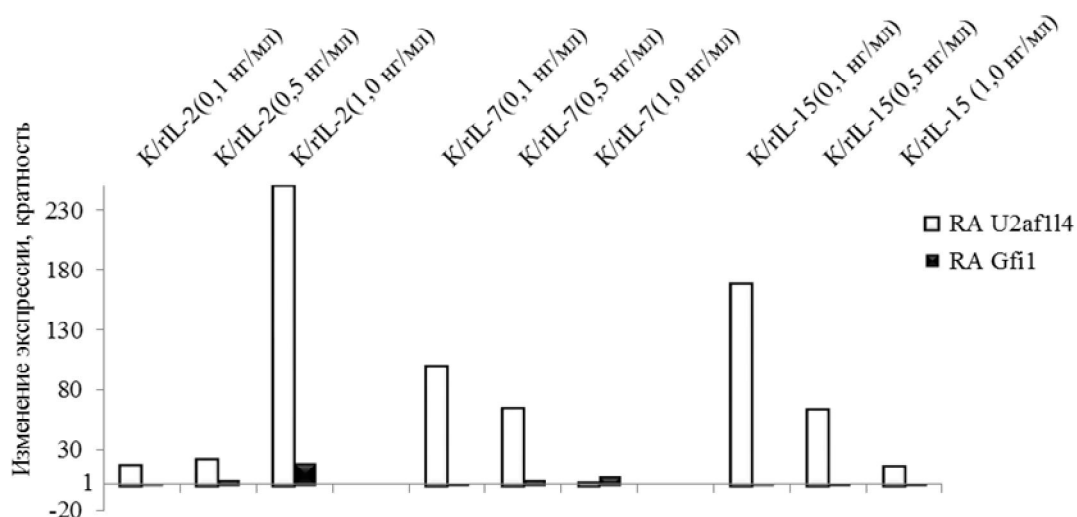
Добавление в культуру  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$ -лимфоцитов Т-клеточного активатора, сопровождалось снижением экспрессии мРНК обоих генов по сравнению с интактной пробой. Сочетанное действие анти- $\text{CD2/CD3/CD28}$ -частиц и  $\text{rIL-2}$  оказывало супрессивное действие на транскрипцию мРНК исследуемых генов в  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  лимфоцитах. Уровень экспрессии мРНК гена *U2af114* снижался пропорционально увеличению дозы  $\text{rIL-2}$  ( $r^2 = -0,82$ ,  $p \leq 0,05$ ) в культурах Т-лимфоцитов на фоне активации: минимальный уровень экспрессии был зафиксирован при максимальной концентрации  $\text{rIL-2}$  ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл). При этом минимальная экспрессия гена *Gfi1* была зафиксирована при действии минимальной дозы  $\text{rIL-2}$  ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) ( $r^2 = 0,89$ ,  $p \leq 0,05$ ).

При добавлении в среду культивирования наивных Т-клеток  $\text{CD2/CD3/CD28}$ -комплекса и  $\text{rIL-7}$ , наблюдалось дозозависимое снижение уровней экспрессии генов *U2af114* и *Gfi1* ( $r^2 = -0,81$ ,  $r^2 = -0,79$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ): минимальные значения экспрессии мРНК *U2af114* были зафиксированы при инкубации с  $\text{rIL-7}$  в максимальной концентрации ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл), при этом указанная концентрация цитокина вызвала также максимальное угнетение транскрипции гена *Gfi1* (**рисунок 17**).

Минимальная концентрация  $\text{rIL-15}$  ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) вызывала наибольшее угнетение экспрессии мРНК гена *U2af114* в  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  Т-клетках по сравнению с контрольными значениями, полученными при добавлении в среду культивирования только активатора Ас/Ехр ( $r^2 = 0,83$ ;  $p \leq 0,05$ ). Снижение экспрессии мРНК гена *Gfi1* также оказалось максимальным при добавлении минимальной концентрации цитокина ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл)  $\text{rIL-15}$  в культуре наивных  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  лимфоцитах ( $r^2 = 0,77$ ;  $p \leq 0,05$ ) (**рисунок 17**).

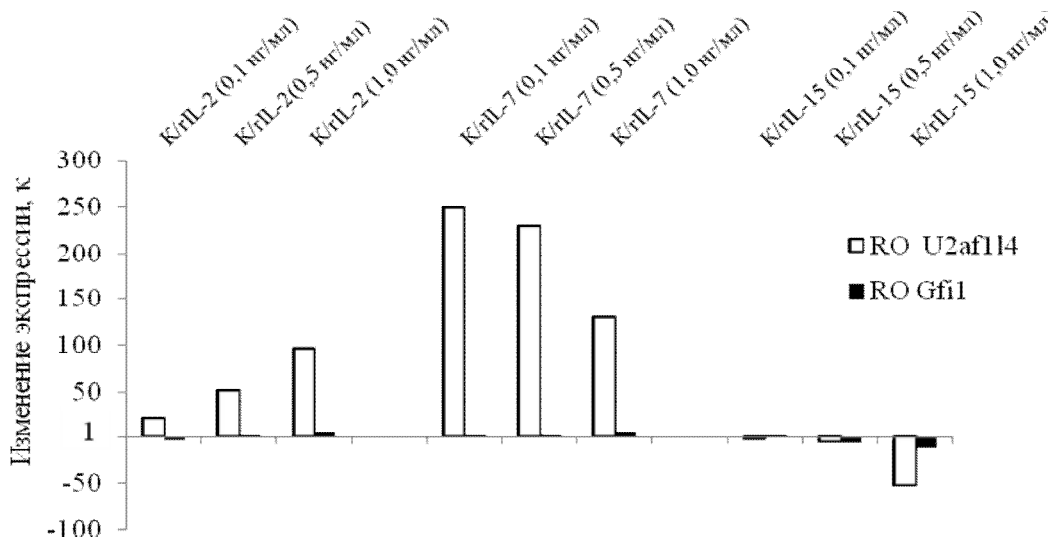


Добавление в культуру CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток CD2/CD3/CD28-активатора, (аналогично CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеткам), приводило к значительному снижению уровня экспрессии мРНК гена фактора сплайсинга *U2af114*, тогда как транскрипция мРНК гена *Gfi1* не отличалась от контрольных значений (**рисунок 16**).

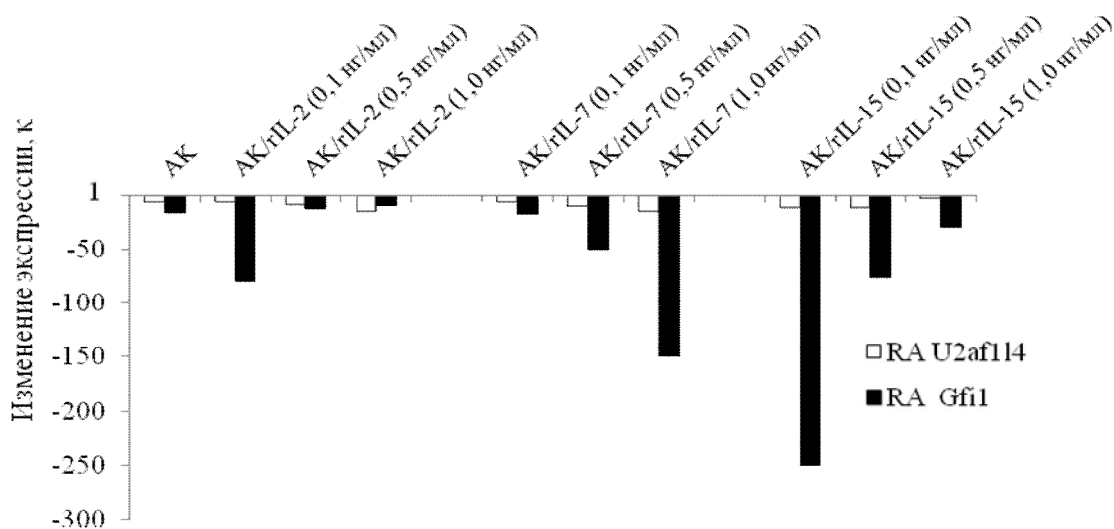


**Рисунок 15.** Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (к-кратность); к IL2-0,1–0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и пробах с добавлением rIL-2 (0.1x10<sup>-9</sup> г/мл; 0.5x10<sup>-9</sup> г/мл; 1.0x10<sup>-9</sup> г/мл); к IL7-0,1–0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и пробах с добавлением rIL-7 (0.1x10<sup>-9</sup> г/мл; 0.5x10<sup>-9</sup> г/мл; 1.0x10<sup>-9</sup> г/мл); к IL15-0,1–0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и пробах с добавлением rIL-15 (0.1x10<sup>-9</sup> г/мл; 0.5x10<sup>-9</sup> г/мл; 1.0x10<sup>-9</sup> г/мл).

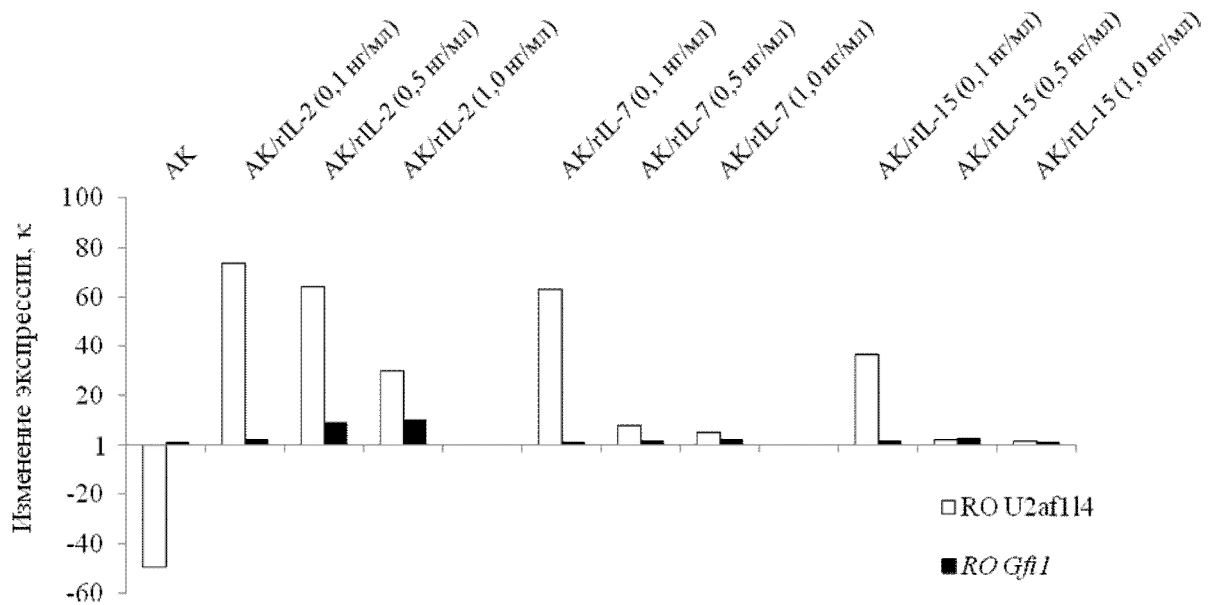
При культивировании Т-клеток памяти в присутствии комбинаций CD2/CD3/CD28-активатора и rIL-2 был выявлен обратный дозозависимый эффект ( $r^2 = -0,81$ ,  $p \leq 0,05$ ): с увеличением концентрации rIL-2 в среде инкубации, экспрессия мРНК гена *U2af114* снижалась, достигая минимальных значений в присутствии максимальной дозы цитокина (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) (**рисунок 18**). Экспрессия мРНК гена *Gfi1*, напротив, увеличивалась, в среднем, в 7 раз при действии максимальных концентраций (0,5 и 1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) цитокина ( $r^2 = 0,83$ ,  $p \leq 0,05$ ).



**Рисунок 16.** Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RO<sup>+</sup> Т-клетках под влиянием цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) (кратность). Обозначения как в рисунке 15.



**Рисунок 17.** Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (кратность); АК – отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и образцах с Т-клеточным CD2/CD3/CD28-активатором; АК IL2-0,1–0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с Т-клеточным активатором и пробах с добавлением rIL-2 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл); АК IL7-0,1–0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с Т-клеточным активатором и пробах с добавлением rIL-7 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл); АК IL15-0,1–0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с Т-клеточным активатором и пробах с добавлением rIL-15 ( $0.1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0.5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1.0 \times 10^{-9}$  г/мл).



**Рисунок 18.** Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в  $CD45RO^+$  Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (кратность). Обозначения как в рисунке 17.

Сочетанное действие  $CD2/CD3/CD28$ -комплекса и цитокинов - rIL-7 и rIL-15 на  $CD45RO^+$  Т-клетки было аналогичным rIL-2. Наиболее выраженное увеличение уровней экспрессии мРНК гена *U2af114* (более чем в 60 и 37 раз, соответственно) отмечалось при добавлении rIL-7 и rIL-15 в минимальной концентрации ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл). Цитокины - IL-7 и rIL-15 во всем спектре исследуемых концентраций существенно не изменяли уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора *Gfi1* (рисунок 18).

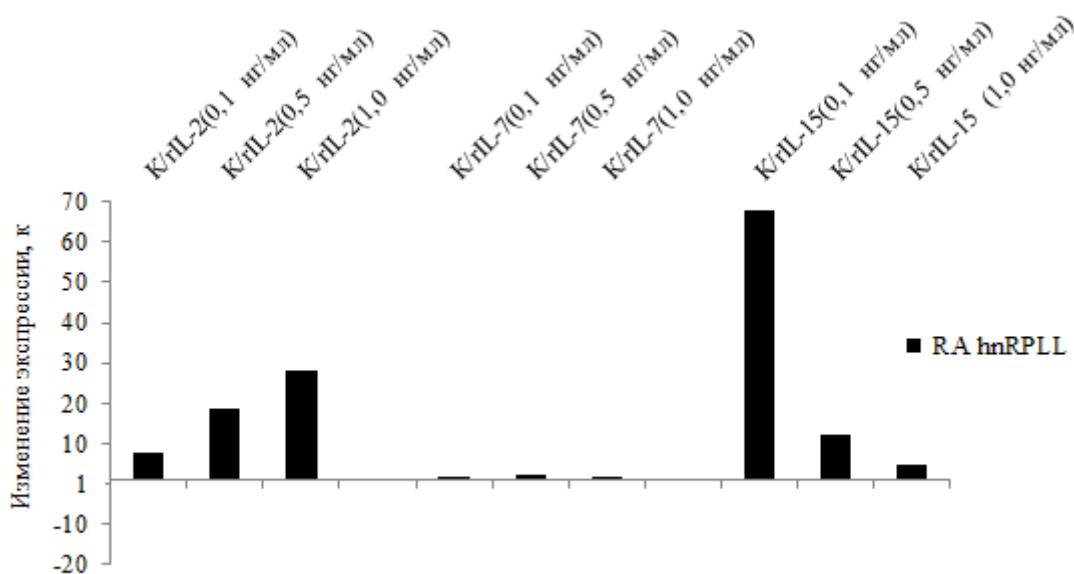
### 3.4. Оценка влияния иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\alpha$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на экспрессию гена *hnRNPLL* в культурах активированных и неактивированных Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки и разный активационный статус

Культивирование наивных  $CD45RA^+CD62L^+$  лимфоцитов с rIL-2 сопровождалось дозозависимым усилением транскрипции гена *hnRNPLL*: экспрессия мРНК исследуемого гена увеличивалась пропорционально повышению действующей концентрации rIL-2 ( $r^2=0,83$ ,  $p \leq 0,05$ ) (рисунок 19).

Добавление в среду культивирования  $\text{rIL-7}$  (независимо от концентрации) не оказывало влияния изучаемый параметр: транскрипция мРНК гена *hnRNPLL* оставалась на одном уровне с интактными значениями (**рисунок 19**).

Действие  $\text{rIL-15}$  на наивные ( $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$ ) лимфоциты зависело от концентрации цитокина ( $r^2 = -0,88$ ,  $p \leq 0,05$ ) и было противоположным эффекту  $\text{rIL-2}$ : повышение действующей дозы  $\text{rIL-15}$  сопровождалось снижением транскрипции *hnRNPLL* (самый высокий уровень экспрессии мРНК исследуемого гена был зафиксирован при добавлении минимальной концентрации  $\text{rIL-15}$  ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл)) (**рисунок 19**).

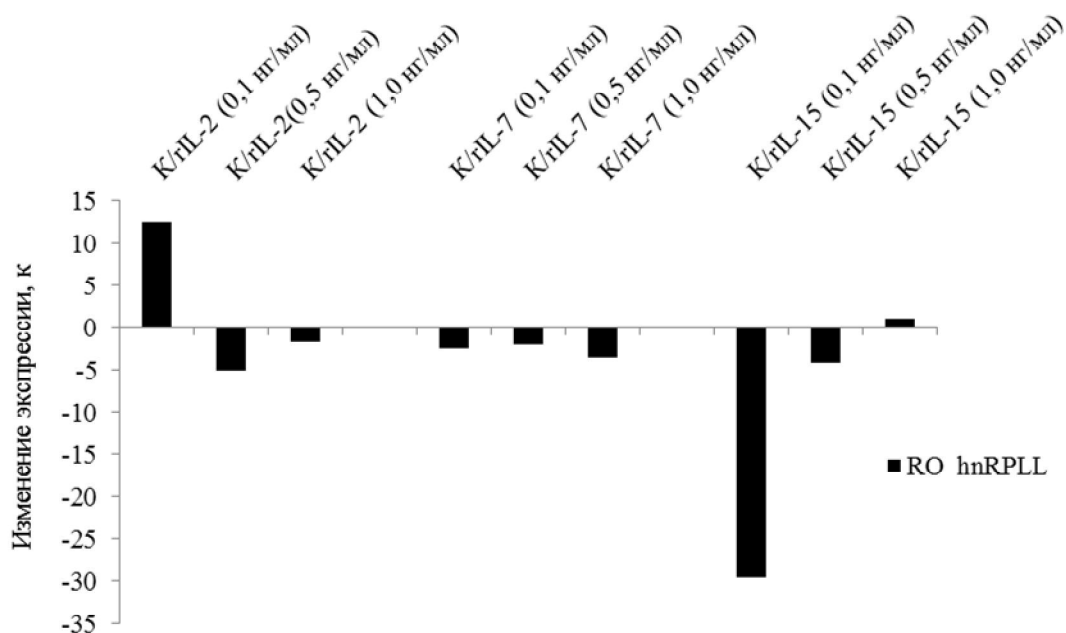
При добавлении  $\text{rIL-2}$  в среду культивирования примированных  $\text{CD45RO}^+$  лимфоцитов минимальная концентрация ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) исследуемого цитокина усиливала транскрипцию мРНК *hnRNPLL*, тогда как повышение дозы приводило к угнетению экспрессии мРНК исследуемого гена (**рисунок 20**).



**Рисунок 19.** Изменение относительных уровней транскрипции гена *hnRNPLL* в  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (к-кратность). Обозначения как в **рисунке 15**.

$\text{rIL-7}$ , в целом, равномерно угнетал транскрипцию мРНК гена *hnRNPLL* в примированных ( $\text{CD45RO}^+$ ) Т-клеток (в среднем, в 2,5 раза) (**рисунок 20**).

Культивирование Т-клеток памяти ( $CD45RO^+$ ) с IL-15, в целом, сопровождалось положительной динамикой изменения экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* (в сторону увеличения): несмотря на глубокое угнетение транскрипции при действии минимальной дозы исследуемого цитокина ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл), добавление rIL-15 в максимальной действующей концентрации ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) восстанавливало экспрессию матричной РНК до контрольных значений.



**Рисунок 20.** Относительное изменение уровня транскрипции гена *hnRNPLL* в  $CD45RO^+$  Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (к-кратность). Обозначения как в **рисунке 15**.

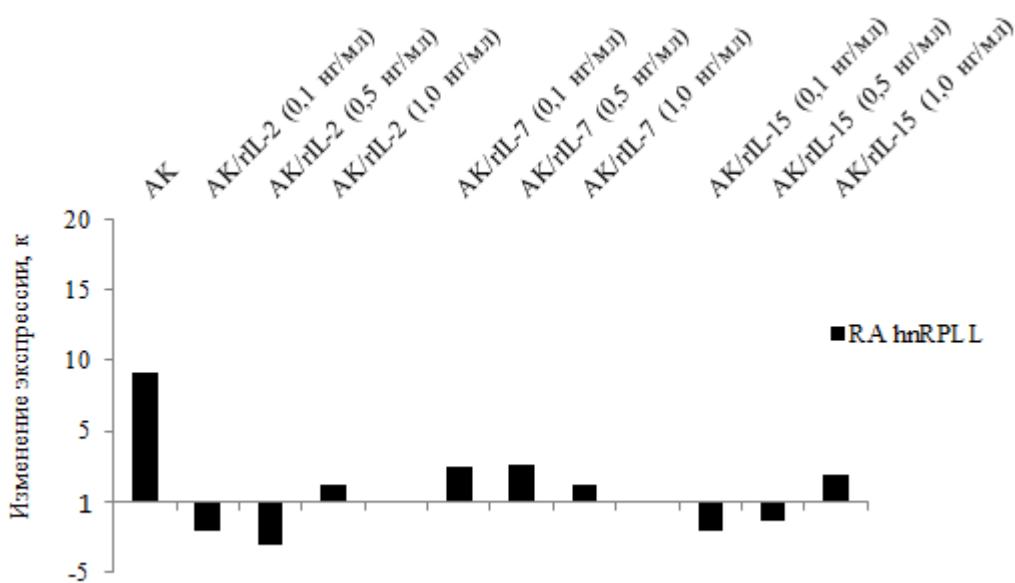
Внесение в культуру наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-лимфоцитов *анти-CD2/CD3/CD28-частиц*, сопровождалось усиленной экспрессией мРНК гена *hnRNPLL*. Однако сочетанное действие активирующего анти-*CD2/CD3/CD28*-комплекса и rIL-2 в минимальных концентрациях ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл,  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) приводило к угнетению транскрипции мРНК указанного гена. Действие максимальной дозы исследуемого цитокина ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) незначительно усиливало экспрессию *hnRNPLL* по сравнению с интактной пробой (с добавлением только клеточного активатора).

Культивирование наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) лимфоцитов с  $rIL-7$  и  $rIL-15$  в сочетании с дополнительной активацией анти- $CD2/CD3/CD28$ -комплексом, в целом, повышало уровень транскрипции мРНК гена *hnRNPLL*.

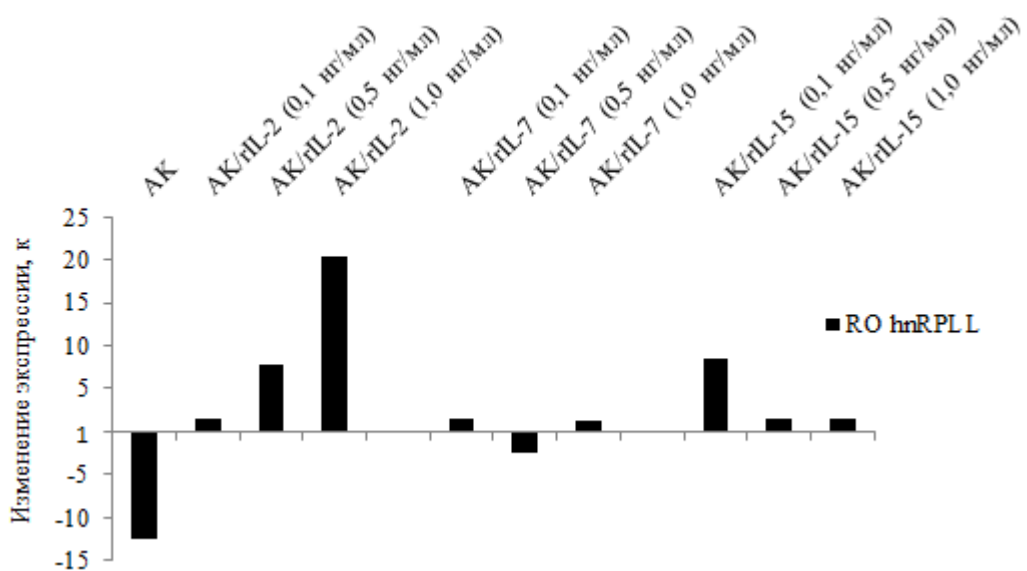
$rIL-7$  во всех концентрациях и максимальная действующая доза  $rIL-15$  способствовали стимуляции транскрипции матричной РНК, тогда как минимальная и промежуточная концентрации ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл,  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл)  $rIL-15$  угнетали экспрессию мРНК гена *hnRNPLL* (рисунок 21).

Добавление в культуру примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-лимфоцитов анти- $CD2/CD3/CD28$ -частиц приводило к резкому угнетению транскрипции мРНК гена *hnRNPLL* (более чем в 12 раз).

Действие активирующего комплекса и  $rIL-2$  на примированные  $CD45RO^+$  лимфоциты сопровождалось дозозависимым усилением экспрессии исследуемого гена ( $r^2 = 0,85$ ,  $p \leq 0,05$ ): уровень транскрипции мРНК *hnRNPLL* повышался пропорционально действующей концентрации цитокина (рисунок 22).



**Рисунок 21.** Изменение относительных уровней транскрипции гена *hnRNPLL* в  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (кратность). Обозначения как в рисунке 17.



**Рисунок 22.** Изменение относительных уровней транскрипции гена *hnRNPLL* в CD45RO<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (кратность). Обозначения как в **рисунке 17**.

Сочетанное воздействие анти-CD2/CD3/CD28-частиц и rIL-7 в Т-клетках памяти не оказывала влияние на экспрессию мРНК изучаемого гена (**рисунок 22**).

Присутствие в среде культивирования комбинаций активирующего комплекса и rIL-15 сопровождалось снижением транскрипции мРНК изучаемого гена: минимальный уровень экспрессии был зафиксирован при максимальной концентрации ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) rIL-15 (**рисунок 22**).

### 3.5. Оценка влияния иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую $\alpha$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) на конверсию фенотипа наивных Т-клеток в Т-клетки памяти.

На момент окончания инкубации, число клеток в интактной пробе CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> лимфоцитов, несущих на своей поверхности молекулу - CD45RO, составило 9,87 (5,55-12,58)%, число переходных лимфоцитов (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) было равным - 6,07 (4,03-8,36)%.

Инкубация наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток с rIL-2 в максимальной концентрации ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) сопровождалась ростом числа клеток, несущих двойную метку CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (**таблица 5**).

Разнонаправленное действие  $\text{IL-7}$  на конверсию фенотипа наивных Т-клеток в Т-клетки памяти зависело от концентрации цитокина: в минимальной концентрации  $\text{IL-7}$  повышал число  $\text{CD45RO}^+$  и  $\text{CD45RA}^+/\text{CD45RO}^+$  Т-клеток, в минимальной, напротив – снижал (по сравнению со значениями контрольных проб) ( $r^2 = -0,80$ ,  $p \leq 0,05$ ).

$\text{IL-15}$  в минимальной концентрации, как и  $\text{IL-7}$ , способствовал увеличению содержания как  $\text{CD45RO}^+$ , так и количества дубль-позитивных клеток  $\text{CD45RA}^+/\text{CD45RO}^+$  Т-клеток (таблица 5).

**Таблица 5**

Число  $\text{CD45RO}^+$  и содержание дубль-позитивных  $\text{CD45RA}^+/\text{CD45RO}^+$  Т-клеток (%) в культурах  $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$  Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с цитокинами, имеющими общую  $\alpha$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) с использованием гомеостатической модели (Me ( $Q_1$ - $Q_3$ ))

Варианты культивирования	Содержание клеток, %		
	CD45RA/CD62L	CD45RO	CD45RA/RO
Интактная проба	94,42 (90,22-96,01)	9,87 (5,55-12,58)	6,07 (4,03-8,36)
IL-2 (0,1 нг/мл)	92,94 (89,45-95,98)	9,11 (8,01-10,12)	8,09 (7,69-8,35)
IL-2 (0,5 нг/мл)	89,98 (87,85-93,45)	10,04 (9,30-11,01)	7,99 (6,90-8,91)
IL-2 (1,0 нг/мл)	72,82 (70,27-86,01) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	32,45 (28,84-36,15) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	27,75 (24,30-31,86) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
IL-7 (0,1 нг/мл)	86,52 (83,10-89,21) $p_0 < 0,05$	15,68 (8,93-16,84) $p_0 < 0,05$	13,91 (8,72-15,55) $p_0 < 0,05$
IL-7 (0,5 нг/мл)	93,81 (89,52-98,17) $p_1 < 0,05$	8,22 (7,15-9,73) $p_1 < 0,05$	6,94 (5,39-7,53) $p_1 < 0,05$
IL-7 (1,0 нг/мл)	96,76 (92,14-97,63)	4,85 (3,04-6,06) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	3,40 (2,03-4,86) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
IL-15 (0,1 нг/мл)	85,95 (82,81-87,15)	16,97 (5,49-18,35)	15,79 (13,95-16,27)



		$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$
<b>IL-15 (0,5 нг/мл)</b>	89,81 (87,95-93,57)	11,32 (9,88-12,12) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$	10,23 (6,64-12,64) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$
<b>IL-15 (1,0 нг/мл)</b>	92,70 (90,44-94,99) $p_1 < 0,05$	9,07 (5,80-11,27) $p_1 < 0,05$	7,22 (3,84-8,81) $p_1 < 0,05$

**Таблица 6**

Число CD45RO<sup>+</sup> и содержание дубль-позитивных CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток (%) в культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в в условиях инкубации *in vitro* с цитокинами, имеющими общую  $\alpha$ -цепь (IL-2, IL-7, IL-15) с использованием активационной модели (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Варианты культивирования	Содержание клеток, %		
	CD45RA/CD62L	CD45RO	CD45RA/RO
<b>Интактная проба</b>	94,42 (90,22-96,01)	9,87 (5,55-12,58)	6,07 (4,03-8,36)
<b>Ac/Exp</b>	89,79 (86,23-91,70) $p_0 < 0,05$	13,59 (9,35-14,89) $p_0 < 0,05$	11,40 (8,14-14,29) $p_0 < 0,05$
<b>Ac/Exp / IL-2 (0,1 нг/мл)</b>	80,18 (78,79-83,34) $p_1 < 0,05$	20,21 (18,23-22,67) $p_1 < 0,05$	17,56 (16,97-19,29) $p_1 < 0,05$
<b>Ac/Exp / IL-2 (0,5 нг/мл)</b>	73,23 (70,67-75,35) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	27,36 (25,33-29,61) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	23,74 (21,59-24,92) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
<b>Ac/Exp / IL-2 (1,0 нг/мл)</b>	66,12 (62,85-68,33) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	34,21 (30,70-38,29) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	31,78 (28,74-33,13) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
<b>Ac/Exp / IL-7 (0,1 нг/мл)</b>	79,40 (73,94-88,70)	21,94 (9,84-28,70) $p_1 < 0,05$	19,99 (7,21-23,01) $p_1 < 0,05$
<b>Ac/Exp / IL-7 (0,5 нг/мл)</b>	90,61 (86,04-98,85)	10,63 (7,88-11,17)	9,20 (8,17-10,43)
<b>Ac/Exp / IL-7</b>	95,62	5,05	3,62

<b>(1,0 нг/мл)</b>	(89,45-98,70)	(3,49-7,36) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05	(2,11-5,07) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
<b>Ас/Ехр / ИЛ-15 (0,1 нг/мл)</b>	97,39 (83,43-98,48)	4,05 (3,68-6,32) p <sub>1</sub> <0,05	3,62 (3,21-5,52) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ас/Ехр / ИЛ-15 (0,5 нг/мл)</b>	91,13 (84,78-97,85)	12,21 (9,21-14,17)	10,61 (6,38-13,77) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
<b>Ас/Ехр / ИЛ-15 (1,0 нг/мл)</b>	78,81 (72,34-83,01)	21,48 (19,94-24,05) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05	18,12 (15,79-23,16) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05

Количество дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов в интактных пробах примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток было равным 6,45(5,57-7,21)%. Культивирование CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти с rIL-2 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) приводило к достоверному увеличению числа дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов (в среднем, в 2 раза) по сравнению с контрольной пробой и составило 14,56(12,34-16,21)% (p<0,05).

При добавлении в среду инкубации Т-клеток памяти (CD45RO<sup>+</sup>) цитокинов - rIL-7 и rIL-15, количество лимфоцитов, несущих двойную метку (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) было сопоставимо с контрольным.

Добавление к наивным (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитам *CD2/CD3/CD28-активирующих частиц*, приводило к достоверному повышению количества клеток, экспрессирующих короткий вариант молекулы CD45 - CD45RO, в среднем, в 1,5 раза, за счет увеличения лимфоцитов с маркерами переходных клеток (p<0,05) (**таблица 6**).

В процессе инкубации наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов с использованием активационной модели клеточного культивирования с rIL-2, значительный рост количества лимфоцитов, несущих мембранные маркеры переходных клеток (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) и, соответственно, Т-клеток памяти (CD45RO<sup>+</sup>), регистрировался при добавлении всех концентраций цитокина (**таблица 6**). Эффекты rIL-2 на наивные Т-клетки имели дозозависимый характер

( $r^2 = 0,87$ ,  $p \leq 0,05$ ). На фоне активации CD2/CD3/CD28-комплексом, инкубация наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток с rIL-7 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и rIL-15 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) приводила к снижению количества Т-клеток с фенотипом CD45RO<sup>+</sup> и переходных форм - CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (таблица 6). Напротив, инкубация Т-клеток с минимальной концентрацией rIL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) и максимальной rIL-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) сопровождалась увеличением числа клеток, несущих фенотип переходных форм - CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> (таблица 6). Эффекты rIL-7 и rIL-15 на изменение числа дубль-позитивных клеток были дозопосредованы ( $r^2 = -0,83$ ,  $r^2 = 0,86$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ).

В культуре примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток, активированных анти-CD2/CD3/CD28 частицами, наблюдалось повышение количества дубль-позитивных CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (в среднем, в 3,5 раза), и составило 23,45(20,32-28,23). Присутствие в среде культивирования комбинации *активирующего комплекса* (CD2<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup>) и rIL-2 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) сопровождалось достоверным (на 33% по сравнению с пробами только с добавлением активатора) увеличением числа Т-клеток, несущих двойную метку (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>).

Аналогичный эффект на примированные Т-клетки регистрировался при добавлении rIL-15 ( $0,1$  и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) на фоне активирующего TCR-воздействия. rIL-7 не оказывал значимого влияния на изменение содержания дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>)Т-клеток в культурах примированных (CD45RO<sup>+</sup>) лимфоцитов, активированных CD2/CD3/CD28-комплексом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполненного исследования были получены данные, характеризующие действие иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15), имеющих общую  $\alpha$ -цепь рецепторов на изменение уровней транскрипции мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, определяющих соотношение вариантов рецептора CD45 в культурах клеток с разной степенью дифференцировки и разным функциональным статусом. Результаты изменения уровней экспрессии изучаемых генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* были сопоставлены с данными, характеризующими мембранную экспрессию костимуляторной молекулы - CD28 и конверсию фенотипа Т-клеток.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исход иммунного ответа на антигены различной природы определяется генерацией антигенспецифических клеток иммунной памяти (Селедцов В.И. и соавт., 2010; Ярилин А.А., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; Amsen D. et al., 2013). Важно отметить, что вторичный иммунный ответ, как правило, более выражен в сравнении с первичной иммунной реакцией (Галактионов В.Г. 1998; Хаитов Р.М. 2009; Селедцов В.И. и соавт., 2010; Ярилин А.А., 2010). В изучении феномена иммунной памяти особого внимания заслуживают молекулярно-генетические механизмы дифференцировки наивных Т-клеток-предшественниц в Т-клетки иммунной памяти во время иммунного ответа (Heyd F. et al., 2006; Litvinova L.S. et al., 2013).

Исследования последних лет доказали исключительную важность механизма альтернативного сплайсинга в реализации ключевых функций иммунной системы (Heyd F. et al., 2006, 2010; Whistler T. et al., 2010; Martinez M.N., Lynch W.K., 2013; Rodrigues R. et al., 2013). В частности, альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, кодирующего рецептор CD45 является краеугольным камнем в процессе дифференцировки наивных Т-клеток (Lynch W.K., Weiss A. A., 2000; Heyd F. et al., 2006; Литвинова Л.С. и соавт., 2013). Альтернативный сплайсинг 4, 5 и 6 экзонов способен генерировать по меньшей мере 5 изоформ этого рецептора (Alexander D.R., 2000), которые определяют этапы дифференцировки Т-лимфоцитов (Sato T. et al., 1993; Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W. K., 2010; Butte J.M. et al., 2012).

Однако несмотря на весомые доказательства того, что изменения альтернативного сплайсинга многих генов значимы во время иммунного ответа и могут критически влиять на клеточную функцию, до сих пор нет систематического исследования, позволяющего определить многообразие экзо- и эндогенных факторов, регулирующих активность генов на уровне альтернативного сплайсинга в ответ на воздействие стимулов антигенной и не антигенной природы.

Одними из важнейших факторов гомеостаза Т-клеток являются цитокины, в том числе, цитокины семейства I типа, имеющие общую  $\alpha$ -цепь: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21. Оказывая паракринное и/или аутокринное действие на клетки-

мишени и потенцируя действие друг друга, цитокиновые молекулы способны регулировать процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза Т-лимфоцитов (Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008; Tanel A. et al., 2009; Markley J.C. et al, 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2013). В современной медицине разработка технологий управления процессами межклеточной кооперации, пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели с помощью биологически активных молекул - цитокинов, является одним из перспективных подходов в терапии широкого круга заболеваний (Romano F. et. al., 2006). Безусловно, действие некоторых цитокинов на Т-клетки иммунной памяти носит дозозависимый характер и определяется типом клеток-мишеней и их функциональным статусом (степенью дифференцировки, функциональной активностью, состоянием рецепторного аппарата клетки). Учитывая это обстоятельство, одни и те же медиаторы могут проявлять разнонаправленные эффекты на «наивные» предшественники и «примированные» клетки памяти.

Мы предполагаем, что одним из механизмов, посредством которого цитокины, имеющие общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7 и IL-15) принимают непосредственное участие в дифференцировке Т-клеток, может быть регуляция альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, что может определять исход как первичных, так и вторичных иммунных реакций. В связи с вышесказанным, целью исследования явилось установление роли цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) в регуляции механизма молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток, сопряженного с альтернативным сплайсингом гена *Ptprc*, кодирующего общелейкоцитарный рецептор - CD45.

Очевидно, что исследование механизмов дифференцировки Т-лимфоцитов предполагает как использование клеточных линий/культур (в данном случае, первичных культур Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки), так и подбор соответствующих экспериментальных условий. Совокупность этих составляющих делает возможным анализ каскада ключевых событий и реакций.

На основании вышесказанного, нами были использованы **гомеостатическая и активационная** экспериментальные модели. Первая модель предназначена для исследования механизмов дифференцировки Т-лимфоцитов в условиях гомеостатического влияния цитокинов семейства I типа (IL-2, IL-7 и IL-

15), имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов *in vitro*; вторая - отражает процесс взаимодействия наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) и примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-лимфоцитов *in vitro* с активирующим  $CD2/CD3/CD28$ -комплексом в присутствии исследуемых рекомбинантных форм цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15).

В первой и второй моделях клеточного культивирования *in vitro* нами были использованы Т-клетки разной степени дифференцировки: наивные –  $CD45RA^+CD62L^+$  и примированные -  $CD45RO^+$ .

Для нормального функционирования иммунной системы необходимо сохранение равновесия между пролиферацией иммунокомпетентных клеток и их гибелью. Сдвиг этого равновесия считается одним из факторов, приводящих к развитию патологических процессов (Elmore S., 2007). Чувствительность Т-лимфоцитов к цитокинам (rIL-2, rIL-15, rIL-7), имеющим общую  $\gamma$ -цепь рецепторов зависит от стадии их дифференцировки (Geginat J. et al., 2002). Согласно многочисленным источникам, выживание и гомеостатическая пролиферация наивных Т-клеток и примированных Т-лимфоцитов памяти после элиминации патогена *in vivo*, определяется наличием в микроокружении цитокинов: IL-2, IL-7 и IL-15 (Ma A. et al., 2006) и не зависит от взаимодействия их рецепторных структур с продуктами ГКГ I (для  $CD8^+$ ) и ГКГ II (для  $CD4^+$ ) класса (Geginat J. et al., 2002; Krawczyk C.M. et al., 2007; Purton J.F. et al., 2007; Singh M. et al., 2008; Tanel A. et al., 2009).

Нами было выявлено отсутствие эффектов цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на общее число  $CD45RA^+CD62L^+$ -клеток (в мл), а также изменение их жизнеспособности (по сравнению с контролем). Для гомеостатической пролиферации наивных  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоцитов, в отличие от примированных Т-клеток памяти, требуется костимуляция цитокинами (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 и IL-12) дендритных клеток, которые положительно регулируют экспрессию IL-2/15R $\beta$  и  $\gamma$ с-цепи (Geginat J. et al., 2001; 2002; Cantrell D.A., Smith K.A., 1983; Nakarai T. et al., 1994; Schluns K.S. et al., 2000; Surh C.D. et al., 2006; Tan J.T. et al., 2001; Mengus C. et al., 2011), опосредуя, тем самым пролиферацию наивных Т-клеток и увеличение Т-клеток памяти в ответ на действие цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-4, IL-7 и IL-15).

При этом наивные Т-клетки избирательно реагируют на IL-4 (Geginat J. et al., 2001; 2002). Такая дифференциальная чувствительность наивных клеток к цитокиновым стимулам зависит от экспрессии и модуляции соответствующих рецепторов. Авторы демонстрируют, что CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоциты, количество которых увеличено под влиянием цитокинов, поддерживают «наивный» фенотип, тогда как Т-клетки памяти дифференцируются, приобретая эффекторные функции и изменяя экспрессию хемокиновых рецепторов (Geginat J. et al., 2001; 2002).

В отношении наивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток выявлено, что IL-15 индуцирует их экспансию без изменения фенотипа наивных клеток только после длительного культивирования (Wallace D.L. et al., 2006; Alves N.L. et al., 2006). Этот процесс авторы тесно ассоциируют с повышением активности фермента теломеразы, что, возможно, связано с резким увеличением числа пролиферирующих клеток, начиная примерно с 1 недели культивирования, достигая пика  $\approx$  на 14 день. У клеток, обработанных IL-7, регистрировалась более медленная реакция (Wallace D.L. et al., 2006). Значимость этих результатов для Т-клеточного гомеостаза активно обсуждаются.

Напротив, выявленное нами повышение числа CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток при добавлении rIL-2 (во всем спектре используемых концентраций цитокина, в среднем на 20% по сравнению с контролем) и при инкубации с rIL-15 ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл), в целом, не противоречит данным литературы (**рисунок 11**) (Шатрова А.Н., 2009; Letourneau S. et al., 2009; Liao W. et al., 2011; 2013).

Добавление IL-7 в культуры CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток сопровождалось лишь тенденцией к увеличению их общей численности. Жизнеспособность примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток при действии цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) не изменялась на протяжении всего срока культивирования (48 ч) (**рисунок 12**).

IL-2 - плеiotропный цитокин, играет важную и сложную роль в регуляции функций иммунокомпетентных клеток. Выступая в качестве основного фактора роста Т-лимфоцитов, IL-2 поддерживает *антигензависимую* дифференцировку и пролиферацию разных клеточных субпопуляций, а также является регулятором апоптотической гибели клеток, опосредованной активацией, ограничивая, тем самым, чрезмерные иммунные реакции (Letourneau S. et al., 2009; Шатрова А.Н., 2009; Liao W. et al., 2011; 2013; Yang Q. et al., 2013). Показано, что в отсутствии

антигенного стимула, IL-2 значительно усиливает апоптоз (Ku C.C. et al., 2000) и подавляет пролиферацию CD8<sup>+</sup>-Т-клеток памяти, преимущественно за счет его опосредованного влияния на другие субпопуляции клеток, включая CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты (Kamimura D. et al., 2004). В то же время, IL-2 в условиях *in vitro* является необходимым фактором роста для CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти. Противоположным IL-2 действием обладает IL-15, имеющий с IL-2 одинаковые рецепторные компоненты β- и γ-цепей и высокую степень гомологии α-цепей, что приводит к перекрываемости биологических эффектов данных цитокинов (Kanegane H., Tosato G., 1996; Ku C.C. et al., 2000; Kamimura D. et al., 2004; Moniuszko M. et al., 2004; Симбирцев А.С., 2004; Waldmann T.A., 2006; Ярилин А.А., 2010). Долгоживущие Т-клетки памяти, в частности - CD8<sup>+</sup>, в естественных условиях характеризуются низкой пролиферативной активностью, которая регулируется IL-15 (Moniuszko M. et al., 2004; Ramanathan S. et al., 2009). В то же время, CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти менее чувствительны к IL-15 из-за низкой экспрессии IL-15R (Moniuszko M. et al., 2004).

IL-7 (наряду с IL-2 и IL-15) является одним из цитокинов, оказывающих влияние на гомеостаз антиген-специфичных Т-клеток, регулируя процессы апоптотической гибели, а также уровень их фоновой (т. е. не связанной с антигенной стимуляцией) пролиферации, поддерживая, тем самым, численное постоянство этих популяций (Schluns K.S. et al., 2000; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008). IL-7 *in vivo* также способен поддерживать выживание наивных Т-клеток путем передачи сигналов через Jak3 и Stat5 и предотвращения митохондриального пути апоптоза за счет индукции экспрессии Bcl-2 и MCL-1 (Surh C.D., Sprent J., 2008).

Существуют данные, что IL-2 и IL-15 с высокой эффективностью увеличивают число эффекторных Т-клеток (ЕМ), менее чувствительны к ним - центральные Т-клетки (СМ), а наивные Т-лимфоциты вовсе не реагируют (Geginat J. et al., 2001; 2002). Это связано, прежде всего, с высоким уровнем экспрессии CD122 (общей β-цепи рецептора для IL-2 и IL-15) на клетках СМ и ЕМ популяций, тогда как его экспрессия на «наивных» лимфоцитах не обнаруживается (Alves N.L. et al., 2003).



Таким образом, добавление иммунорегуляторных цитокинов (rIL-2, rIL-7, rIL-15) в среду культивирования наивных и примированных лимфоцитов не влияло на изменение их жизнеспособности в течение всего срока культивирования (48 часов). Аналогичный эффект исследуемые цитокины оказывали и на пролиферативную активность наивных Т-лимфоцитов. При этом добавление в среду инкубации примированных лимфоцитов rIL-2 и rIL-15 приводило к достоверному увеличению числа клеток, что согласуется с исследованиями зарубежных авторов. При внесении rIL-7 наблюдалась лишь тенденция к увеличению, что вполне объяснимо, так как указанный цитокин регулирует процессы фоновой пролиферации, для поддержания постоянного числа Т-лимфоцитов.

При добавлении в среду инкубации наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) и примированных лимфоцитов ( $CD45RO^+$ )  $CD2/CD3/CD28$ -комплекса наблюдалось выраженное увеличение числа клеток (в мл) в обеих исследуемых культурах, что укладывается в рамки эффектов активатора. Имитируя действие антиген-презентирующих клеток,  $CD2/CD3/CD28$ -частицы стимулируют Т-клеточный рецептор (TCR) и корецепторные молекулы (CD28, CD58), что способствует формированию иммунного синапса, активации клетки и экспрессии многих генов, способствующих пролиферации лимфоцитов, в частности, IL-2 и его рецептора – IL-2-IL-2R (Ивашкин В.Т., 2008; Хайтов Р.М. и соавт., 2009; Хоченков Д.А., 2010; Ярилин А.А., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2014).

Активация наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) и примированных ( $CD45RO^+$ ) лимфоцитов  $CD2/CD3/CD28$ -комплексом, наряду с увеличением общего числа клеток (в мл), приводила к росту числа мертвых клеток. Очевидно, что эти изменения являются следствием усиления активационно-индуцированного апоптоза, в процессе которого наблюдается повышение экспрессии молекулы CD95 на активированных Т-клетках и обуславливает дальнейшее развитие запрограммированной клеточной гибели (Норкин М.Н. и соавт., 2002; Krueger A. et al., 2003; Elmogre S., 2007; Литвинова Л.С. и соавт., 2013). Согласно данным литературы, Т-клетки памяти более устойчивы к Fas/FasL апоптозу, чем наивные  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоциты, что может быть связано с высоким уровнем экспрессии митохондриальных белков Bcl-X (L) и Bcl-2 (Mueller Y.M. et al., 2003;

Fas S.C. et al., 2006; Strasser A. et al., 2009). Однако в наших экспериментах *in vitro* было выявлено отсутствие значимой разницы между чувствительностью  $CD45RA^+CD62L^+$  и  $CD45RO^+$  Т-клеток к активационным  $CD2/CD3/CD28$ -стимулам.

Действие  $IL-2$  на жизнеспособность  $CD2/CD3/CD28$ -активированных Т-лимфоцитов оказалось разнонаправленным: число живых примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-клеток снижалось, тогда как количество жизнеспособных наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-лимфоцитов оказалось выше, по сравнению с пробой только с добавлением *анти- $CD2/CD3/CD28$ -частиц* (рисунок 14), что может свидетельствовать о протекторном эффекте  $IL-2$  на активированные наивные Т-клетки.  $IL-2$  в максимальной концентрации увеличивал общее число Т-клеток (в мл), имеющих разную степень дифференцировки (рисунок 13).

Взаимодействие  $IL-2$  с высокоаффинным рецептором на Т-лимфоцитах обеспечивает запуск сигнальных событий *после антигенной стимуляции*, непосредственно регулирующих вступление покоящихся Т-лимфоцитов в клеточный цикл (Leonard W.J., Lin J.X., 2000; Ellery J.M., Nicholls P.J., 2002; Benczik M., Gaffen S.L., 2004). Сведения, касающиеся роли  $IL-2$  в клональной экспансии примированных  $CD4^+$ -и  $CD8^+$ - Т-лимфоцитов в условиях *in vivo* носят весьма разнородный характер (Kneitz B. et al., 1995; Khoruts A. et al., 1998; Lantz O. et al., 2000; Leung D.T. et al., 2000; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003).

Установлено, что разнонаправленное действие  $IL-2$  на Т-клетки зависит от стадии их дифференцировки. Так, введение  $IL-2$  во время клональной экспансии Т-клеток при вирусной инфекции весьма негативно для быстроделющихся эффекторных Т-клеток и является вполне своевременным при фазе контракции – приводит к увеличению пролиферации и выживанию вирус-специфических Т-клеток (Blattman J.N. et al., 2003).

В то же время доказано, что для реализации апоптозиндуцирующего эффекта  $IL-2$  на лимфоциты крови в условиях *in vitro* необходим определенный порог концентрации цитокина. Почти десятилетие назад D.J.Stauber и соавт. (2006) высказывали гипотезу о наличии определенного количества активированных  $IL-2R$  на поверхности лимфоцитов, необходимых для индукции пролиферации клеток, что вполне согласуется со строением его рецептора и работой внутриклеточных

сигнальных путей (Boytim M.L. et al., 2000; Lindemann M.J. et al., 2003; Stauber D.J. et al., 2006). Показано, что в реализации проапоптотического эффекта IL-2 основную роль играет  $\beta$ -цепь и сигнальный путь белков STAT5 в то время как  $\gamma$ -цепь, индуцируя PKB/PI3K-путь, напротив, ингибируют IL-2-зависимую индукцию апоптоза (Dai Z. et al., 1999; Van Parijs L. et al., 1999; Cheng L.E. et al., 2002).

Добавление rIL-7 и rIL-15 в максимальной концентрации ( $1,0 \times 10^{-9}$ /мл) в культуру активированных Т-клеток, увеличивало число живых CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти (по сравнению с пробами только с добавлением активатора, в среднем, на 20%), что согласуется биологическим действием этих медиаторов (Schluns K.S. et al., 2000; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008). Наивные (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоциты оказались нечувствительными к протективным эффектам данных цитокинов (rIL-7 и rIL-15).

В литературе широко представлены данные о цитокинопосредованной регуляции гомеостатических механизмов генерации и выживания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток памяти *in vivo* (Marsden V.S., Strasser A., 2003; Ma A. et al., 2006; Van Leeuwen E.M. et al., 2009; D'Cruz L.M. et al., 2009). В частности, IL-7 и IL-15 способны усиливать в Т-клетках экспрессию антиапоптотических молекул, таких как Bcl-2 и Mcl-1 (Marsden V.S., Strasser A., 2003) и, напротив, ингибировать проапоптотические факторы - Вах и Bad (Kondrack R.M. et al., 2003; Li J. et al., 2003; Jiang Q. et al., 2004; Dooms H. et al., 2007; Cai K. et al., 2013; Ярилин А.А., 2010). Относительно недавно были получены данные, свидетельствующие, что цитокины, в частности IL-15, обладает дуалистической способностью, как индуцировать экспрессию проапоптотического белка Bim в примированных Т-клетках, так и предотвращать апоптоз в этих клетках путем стабилизации Mcl-1 (myeloidcellleukemia-1) через JAK/STAT и PI3K/AKT сигнальные пути (Тяжелова В.Г., 2013; Shenoy A.R. et al., 2014).

Таким образом, действие активатора сопровождалось выраженным повышением общего количества лимфоцитов, наряду с одновременным снижением жизнеспособности как наивных, так и примированных лимфоцитов, в связи с формированием иммунного синапса, клеточной активацией и активационно-индуцированным апоптозом. В активационной модели клеточного культивирования *in vitro* IL-2 обладал разнонаправленным действием: повышал

жизнеспособность наивных лимфоцитов и уменьшал количество живых примированных Т-клеток. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что влияние исследуемого цитокина на Т-лимфоциты зависят от стадии их дифференцировки. Противоположным гIL-2 эффектом обладали гIL-7 и гIL-15. Таким образом, цитокины, имеющие общую  $\alpha$ -цепь рецепторов регулируют процессы пролиферации и клеточной гибели Т-клеток. При этом реакция клеток определяется степенью их дифференцировки и функциональным статусом.

Адаптивная иммунная система наделяет организм способностью идентифицировать чужеродный антиген и эффективно отвечать на него. Логично, что цикл функциональных изменений, которые происходят в ответ на антигенную стимуляцию Т-клеток, требует изменения экспрессии множества белков. Как уже упоминалось ранее, альтернативный сплайсинг является одним из важнейших механизмов регуляции генной активности клеток врожденного и адаптивного иммунитета (Mustelin T., Tasken K., 2003; De Arras L., Alper S., 2013).

Альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, кодирующего лейкоцитарный рецептор CD45 - трансмембранную тирозин-фосфатазу, крайне важен для функциональной активности Т-клеток человека (Wu Z. et al., 2010). CD45, являясь основным гликопротеином, занимает до 10% внешней мембраны лимфоцита (Fang K.S. et al., 1994). Структурно, молекула CD45 на иммунокомпетентных клетках близка к Т-клеточному рецептору и признана критическим регулятором TCR-сигнализации (Mustelin T., Tasken K., 2003; Lynch K.W., 2004; McNeill L. et al., 2007). Т-лимфоциты, не экспрессирующие CD45, не способны передавать сигнал, опосредованный TCR, что обусловлено ослаблением сопряжения TCR-пути с кальциевыми сигналами (McNeill L. et al., 2007).

Биологическое значение этого рецептора изучено не до конца. Являясь достаточно крупной молекулой с отрицательным зарядом, CD45 препятствует тесному контакту АПК и Т-клетки, так как ее длина составляет примерно 40 нм, а для передачи сигнала клетки должны находиться на расстоянии 5-15 нм (Ярилин А.А., 2010). В связи с этим, тирозин-фосфатаза – молекула CD45, выполнив дефосфорилирование киназ, обеспечив, тем самым, контакт TCR с молекулами CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup>, временно выводится из зоны иммунного синапса (Ярилин А.А., 2010).

Изоформы молекулы CD45, генерированные путем альтернативного сплайсинга экзонов, отражают процесс дифференцировки Т-клеток во время антигензависимой активации иммунокомпетентных клеток и обладают разными свойствами при взаимодействии с лигандом (Lynch W.K., Weiss A, 2000, Alexander D.R., 2000).

Наивные Т-лимфоциты на высоком уровне экспрессируют длинные, высокомолекулярные изоформы CD45 (CD45RA), тогда как активированные антигеном (примированные) Т-клетки, преимущественно, короткий сплайс-вариант CD45 (CD45RO) (Tong A. et al., 2005; Литвинова Л.С. и соавт., 2013).

Области белка CD45, кодируемые переменными экзонами сильно гликозилированы и тем самым предотвращают гомодимеризацию CD45. После активации Т-клеток, пропуск варибельных экзонов CD45 приводит к гомодимеризации рецептора на клеточной поверхности и образованию неактивной формы фосфатазы со снижением сигнализации через TCR. Таким образом, альтернативный сплайсинг CD45 является механизмом обратной связи для поддержания Т-клеточного гомеостаза (Martinez M.N. et al., 2013). Установлено, что встречающиеся в природе полиморфизмы в гене CD45 коррелируют с восприимчивостью к широкому спектру аутоиммунных заболеваний и вирусных инфекций в организме человека, в частности, к рассеянному склерозу и ВИЧ-инфекции (Evsyukova I. et al., 2010).

В периферической крови, как правило, можно обнаружить три основные субпопуляции Т-клеток:  $CD45RA^+CD45RO^-$  — наивные Т-клетки;  $CD45RA^-CD45RO^+$  — Т-клетки памяти и  $CD45RA^+CD45RO^+$  — переходные Т-лимфоциты (Хайдуков С.В., 2008; Селедцов В.И. и соавт., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2011).

Как уже упоминалось ранее, на роль потенциальных регуляторов процессов дифференцировки иммунокомпетентных клеток, в частности Т-лимфоцитов, претендуют три гена (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*), продукты которых, взаимодействуя, регулируют процесс дифференцировки Т-лимфоцитов во время иммунного ответа (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W. K., 2010; Butte J.M. et al., 2012).

Многочисленными исследованиями установлено, что продукты гена *hnRNPLL* (семейство гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (Heterogeneous

nuclear ribonucleoprotein, *hnRNPLL*-типа)) координируют работу множества транскрипционных факторов в процессе альтернативного сплайсинга Т-лимфоцитов. В частности, повышенная экспрессия гена *hnRNPLL* вызывает пропуск 4 экзона, тогда как снижение функциональной активности этого гена сопровождается включением экзона, в первую очередь, в активированных Т-лимфоцитах (Торр D.J. et al., 2008).

Помимо участия продуктов гена *hnRNPLL* в регуляции альтернативного сплайсинга молекулы CD45, важную роль в этом процессе отводят совместным действиям вспомогательного фактора сплайсинга *U2AF26* (U2 smallnuclear RNA auxiliary factor 1 like 4, *U2af114*) и фактора транскрипции *Gfi1* (growth factor independent 1). Предполагают, что антагонистические взаимодействия *U2AF26* и *Gfi1* определяют соотношение изоформ CD45: аналогично механизму действия гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов, *U2AF26* также способствует исключению 4 экзона, что приводит к формированию коротких изоформ - CD45RO, тогда как *Gfi1* способствует образованию более активной, высокомолекулярной формы рецептора - CD45RB или RA (Heyd F. et al., 2006).

В ходе проведенного исследования нами было проанализировано действие иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на динамику уровней транскрипции мРНК генов *hnRNPLL*, *U2af114* и *Gfi1*, определяющих соотношение вариантов рецепторов CD45 в культурах клеток с разной степенью дифференцировки и разным функциональным статусом. Закономерным этапом исследования явилось сопоставление результатов изменения уровней экспрессии изучаемых генов *hnRNPLL*, *U2af114* и *Gfi1* с данными, характеризующими конверсию фенотипа наивных Т-лимфоцитов (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток иммунной памяти.

Культивирование наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток в присутствии гIL-2 сопровождалось однонаправленным (разной степени выраженности) дозопосредованным увеличением экспрессии мРНК изучаемых генов - *U2af114* и *Gfi1* ( $r^2=0,83$ ,  $r^2=0,77$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ). Добавление IL-2 в среду инкубации примированных лимфоцитов также индуцировало транскрипцию мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*, причем эффекты цитокина носили дозозависимый характер ( $r^2=0,85$ ,  $r^2=0,76$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ) (рисунок 15).

гIL-2 оказывал разнонаправленное влияние на изменение экспрессии гена *hnRNPLL* в Т-клетках разной степени дифференцировки: повышая транскрипцию мРНК изучаемого гена в наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ), и напротив, угнетая - в примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-клетках. Следует отметить дозозависимый характер действия гIL-2 на Т-клетки разной степени дифференцировки.

Как уже упоминалось, IL-2 рассматривается в качестве активатора подавляющего большинства генов, нежели супрессора (Stittrich E.T. et al., 2010; Lin P. et al., 2012). Появляются весомые доказательства того, что IL-2 участвует в регуляции процессов *антигензависимой дифференцировки* Т-лимфоцитов, за счет модуляции мембранной экспрессии цитокиновых рецепторов, способствуя дифференцировке наивных  $CD4^+$ Т-клеток в Т-хелперы-1 (Th1) и Th2- типов, развитию и поддержанию Т-регуляторных клеток (Treg) клеток, напротив, предотвращая формирование Th17 и TFH (фолликулярных хелперов) – субпопуляций Т-лимфоцитов (Malek T.R., 2008; Liao W. et al., 2011).

Наивные Т-клетки, экспрессирующие высокомолекулярные изоформы CD45, имеют высокую фосфатазную активность, что является необходимым фактором для поддержания Т-клеточного рецептора в примированном состоянии для распознавания антигена (Hess K. et al., 2004). Одновременное резкое повышение экспрессии мРНК всех изучаемых генов *hnRNPLL*, *U2af114* и *Gfi1* в наивных Т-клетках, ассоциированное с увеличением действующей концентрации IL-2 (*на фоне отсутствия пролиферации*), может свидетельствовать об усилении образования активных переходных форм Т-лимфоцитов. Подтверждением вышесказанному явилось гIL-2-индуцированное увеличение количества дубль-позитивных  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-клеток (**таблица 5**).

Функциональную активность гена *hnRNPLL* ассоциируют с экспрессией мембранной костимулирующей молекулы CD28 (Butte J.M. et al, 2012). Предполагают, что это является дополнительным механизмом регуляции альтернативного сплайсинга CD45 (Butte J.M. et al, 2012).

Конститутивно экспрессируясь *на всех наивных* ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клетках, CD28 является первичным корецептором, опосредующим их позитивную костимуляцию и играет важную и сложную роль в контроле иммунного гомеостаза (лиганды на АПК - CD80 и CD86) (Ярилин А.А., 2010). Установлено, что процессы

активации, созревания и дифференцировки наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток сопровождаются потерей экспрессии поверхностных молекул, в частности, CD27 и CD28, что, по сути, означает утрату пролиферативной активности этих клеток (Кудрявцев И.В., 2014).

Выявленное нами снижение числа  $CD28^+$  Т-клеток в культурах наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток, ассоциированное с дозопосредованным повышением экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* ( $r^2=0,83$ ,  $p\leq 0,05$ ), наряду с эффективной конверсией их фенотипа (с увеличением переходных изоформ  $CD45RA^+/CD45RO^+$ ) может свидетельствовать о созревании и дифференцировке наивных Т-клеток под действием высоких концентраций  $rIL-2$ . При этом изменения равномерно затрагивали  $CD4^+$  и  $CD8^+$  популяции наивных Т-клеток.

В литературе встречаются работы, свидетельствующие о цитокин-индуцированной дифференцировке наивных Т-клеток в клетки центральной ( $CD45RA^-CD45RO^+CD62L^+CCR7^+CD27^+CD28^+$ ) и/или эффекторной ( $CD45RA^-CD45RO^+CD62L^-CCR7^-$ ) памяти (Manjunath N. et al., 2001; Surh C.D., Sprent J., 2008). В частности, речь идет о прайминге *in vitro* наивных Т-клеток в присутствии высоких концентраций IL-2 или IL-15, который может привести к формированию как эффекторных Т-клеток памяти (TEM), так и Т-клеток центральной памяти в популяциях  $CD8^+$  Т-лимфоцитов (Surh C.D., Sprent J., 2008).

Как уже упоминалось, переход к низко-молекулярным изоформам CD45 при цитокиновой активации Т-клеток снижает фосфатазную активность рецептора CD45 и, как полагают, способствует ослаблению Т-клеточной сигнализации (Martinez M.N. et al., 2013): с Т-клетками, несущими укороченный вариант молекулы CD45 - CD45RO, связывают более быструю и эффективную антигензависимую активацию, тогда как лимфоциты с фенотипом CD45RA с большей вероятностью подвергаются апоптозу при воздействии активирующих стимулов (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W.K., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Кроме того, индукция альтернативного сплайсинга с активным образованием изоформы CD45RO угнетает пролиферацию Т-клеток по принципу отрицательной обратной связи (Heyd F. et al., 2006).

В контексте данной тематики особого внимания заслуживает образование пула «суррогатных» Т-клеток иммунной памяти без предварительной активации



наивных Т-клеток антигеном, поликлонально. Эти клетки пополняют пул эффекторных Т-лимфоцитов памяти. Однако такая поликлональная реакция лишена функциональной целесообразности и в ряде случаев имеет отрицательные последствия (например, аутоиммунные процессы) (Kincade P.W. et al., 2000; Ярилин А.А., 2010). Стоит подчеркнуть, что выявленные нами эффекты иммунорегуляторных цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на наивные Т-клетки, направленные на образование коротких вариантов рецептора CD45, могут иметь важное значение при перестройке иммунной системы (иммунный ответ на патогены инфекционной и неинфекционной природы, возрастные перестройки и т.д.).

Противоположным эффектом на наивные Т-клетки обладали rIL-7 и rIL-15. Снижение транскрипции мРНК гена *U2af114*, регистрируемое после окончания срока инкубации, в культурах наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток коррелировало с повышением концентраций IL-7 ( $r^2 = -0,81$ ,  $p \leq 0,05$ ) и IL-15 ( $r^2 = -0,86$ ,  $p \leq 0,05$ ) в среде инкубации. Экспрессия гена *Gfi1* увеличивалась пропорционально возрастанию дозы IL-7 в среде культивирования ( $r^2 = 0,78$ ,  $p \leq 0,05$ ) и равномерно повышалась (в среднем, в 2,5 раза) при добавлении IL-15 в широком диапазоне концентраций.

Повышение числа Т-лимфоцитов, несущих двойную позитивную метку  $CD45RA^+/CD45RO^+$  регистрировалось в культурах наивных Т-клеток при инкубации с минимальными концентрациями rIL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) и rIL-15 ( $0,1$  и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл).

Возможно, что рост числа дубль-позитивных  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-клеток при добавлении rIL-7 и rIL-15 может быть обусловлен способностью этих цитокинов увеличивать синтез IL-2 и экспрессию его рецептора, преимущественно IL-2Ra (CD25) на поверхности Т-лимфоцитов, что способствует повышению восприимчивости клеток к активационным сигналам (Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008), и, как следствие, приводит к повышению их функциональной активности (Литвинова Л.С., 2013). Высокие концентрации rIL-7 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл), но не rIL-15, наряду с подавлением экспрессии гена *U2af114* и увеличением *Gfi1*, способствовали снижению числа дубль-позитивных  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-клеток ( $r^2 = -0,80$ ,  $p \leq 0,05$ ). Выявленные изменения могут быть обусловлены биологическим действием IL-7, в

большей степени направленным на поддержание фоновой (гомеостатической) пролиферации и жизнеспособности наивных Т-клеток.

Одним из механизмов действия цитокина, направленного на ограничение активации наивных Т-клеток может быть  $\text{IL-7}$ -опосредованная индукция экспрессии гена *Gfi1*. Как уже упоминалось ранее, значение *Gfi1* в регуляции гомеостаза иммунокомпетентных клеток многогранно (van der Meer L.T. et al., 2010; Möry T., Khandanpour C., 2011). *Gfi1*, регулируя сложные транскрипционные схемы, связанные с дифференцировкой и пролиферацией Т-лимфоцитов, необходим для нормального развития и гомеостаза гемопоэтических стволовых клеток, а также миелоидных и лимфоидных предшественников (van der Meer L.T. et al., 2010; Möry T., Khandanpour C., 2011). Относительно недавно группой авторов было установлено, что экспрессия *Gfi1* индуцируется цитокинами, участвующими в регуляции адаптивного и врожденного иммунного ответов. *Gfi1* обладает способностью подавлять экспрессию генов, вовлеченных в выживаемость клеток и пролиферацию (van der Meer L.T. et al., 2010). Возможно, что  $\text{IL-7}$ -индуцированное повышение экспрессии гена *Gfi1*, наряду с угнетением *U2af114* - ограничивает активацию наивных Т-клеток, препятствуя их дифференцировке. Доказательством вышесказанному служит отсутствие влияния  $\text{IL-7}$  на экспрессию молекулы  $\text{CD28}^+$  и уровни транскрипции гена *hnRNPLL* в культурах наивных Т-клеток, а также снижение числа дубльпозитивных Т-клеток.

*In vivo*, наивные покоящиеся Т-клетки получают сигналы низкого уровня через контакт с  $\text{IL-7}$  и молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), которые позволяют клеткам выживать в течение длительного времени в состоянии покоя, *не подвергаясь антигеннезависимой дифференцировке* (Sprent J., Surh C.D., 2002; Boymann O. et al., 2007; Ярлин А.А., 2010; Le Campion A. et al., 2012).

Действие экзогенного  $\text{IL-15}$  на транскрипцию мРНК гена *hnRNPLL* наивными ( $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$ ) Т-клетками носило дозозависимый характер ( $r^2 = 0,88$ ,  $p \leq 0,05$ ) и было противоположным относительно эффектов  $\text{IL-2}$ : добавление минимальной концентрации цитокина в среду инкубации сопровождалось максимальным повышением экспрессии гена *hnRNPLL*.  $\text{IL-15}$ -индуцированное повышение экспрессии гена *hnRNPLL* имело четкую ассоциацию со снижением

содержанием числа  $CD28^+$  - наивных Т-клеток (**таблица 3**). Следует отметить однонаправленный характер изменений экспрессии генов *hnRNPLL* и *U2af114* и разнонаправленный с *Gfi1*. Возможно, аналогично IL-7, высокие концентрации IL-15 препятствуют дифференцировке наивных Т-клеток за счет угнетения экспрессии мРНК генов *hnRNPLL* и *U2af114*, и напротив, повышения *Gfi1*.

Эффекты rIL-15 на культуры наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток опосредованы его биологическими эффектами. Доказано, что IL-15 может индуцировать *in vitro* многие реакции, опосредованные IL-2 (Waldmann T.A., 2006). Как уже упоминалось, схожесть эффектов IL-2 и IL-15 обусловлена аналогичной структурой рецепторов: на наивных Т-клетках регистрируются низкие уровни экспрессии IL-15R $\alpha$  и цепи IL-2/15R $\beta$ , которые индуцируются при активации Т-клеток, в том числе, добавлением экзогенного IL-15, что повышает чувствительность наивных клеток к этому цитокину (Alves N.L. et al., 2003). Кроме того, доказана способность экзогенного IL-15 стимулировать секрецию Т-клетками IL-2, что потенцирует действие обоих медиаторов, что было выявлено нами при инкубации наивных Т-клеток с низкой дозой rIL-15. Однако добавление высокой концентрации rIL-15 в среду инкубации наивных Т-клеток, по всей видимости, по принципу обратной связи, блокирует выработку IL-2, и, соответственно, экспрессию генов *hnRNPLL* и *U2af114*, ответственных за наработку коротких изоформ рецептора – CD45RO.

В тоже время снижение числа  $CD8^+CD28^+$  Т-клеток, индуцируемое rIL-15 (0,1;  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл), может служить доказательством созревания и дифференцировки наивных Т-лимфоцитов (Geginat J. et al., 2003). Geginat J. и соавт. (2003) установили, что при активации, индуцированной *in vitro* IL-15, уровень экспрессии молекул - CD28, CCR7 и CD62L на «наивных» клетках после прохождения 3–4 последовательных митотических циклов начинал снижаться (Geginat J. et al., 2003). Кроме того показано, что действие IL-15 на «наивные» Т-клетки сопровождается увеличением в них уровней перфорина и гранзима В, активности клеток в отношении клеток-мишеней линии P815 (Alves N.L. et al., 2003). Коллектив других авторов выявил, что большая часть клеток после индукции IL-15 сохраняла «наивный» фенотип и была способна к секреции IL-2 при полном отсутствии экспрессии эффекторных молекул (IFN $\alpha$ , гранзим А и

перфорин), высокий уровень экспрессии которых наблюдался в более дифференцированных популяциях клеток (Alves N.L. et al., 2003; Cieri N. et al., 2013).

В отношении примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток, IL-2-индуцированное увеличение экспрессии мРНК обоих генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, снижение *hnRNPLL* вполне согласуются с биологическим действием цитокина на зрелые Т-клетки.

На наш взгляд, в отсутствие антигена, высокие концентрации экзогенного IL-2, наряду с фоновой пролиферацией Т-клеток (CD45RO<sup>+</sup>) памяти *in vitro*, поддерживают экспрессию основных, коротких изоформ рецептора - CD45RO, и в меньшей степени - высокомолекулярных вариантов молекулы CD45 – CD45RA. Следует отметить, что после инкубации с IL-2, содержание дубль-позитивных CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов увеличивалось (в среднем, в 2 раза) по сравнению с контролем.

В тоже время снижение экспрессии мРНК гена *hnRNPLL*, коррелирующее с уменьшением числа CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток в культурах примированных (CD45RO<sup>+</sup>) лимфоцитов может свидетельствовать о цитокининдуцированной дифференцировке примированных Т-клеток.

Выявленные изменения могут быть обусловлены тем, что примированные (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клетки менее чувствительны к цитокиновой и мембранной стимуляции, нежели наивные (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоциты. Как уже упоминалось ранее, одной из ключевых функций продуктов гена *hnRNPLL* является исключение 4 экзона при альтернативном сплайсинге рецептора CD45, что приводит к формированию коротких изоформ - CD45RO. Однако в отсутствие стимуляции молекулы CD28 на Т-клетках, тесно ассоциированной с функционированием гена *hnRNPLL*, поддержание экспрессии основных коротких изоформ рецептора CD45RO - выполняет фактор сплайсинга *U2af114*.

Феномен дифференцировки примированных Т-лимфоцитов в эффекторные Т-клетки памяти и терминально-дифференцированные CD45RA-позитивные Т-клетки (TEMRA) под действием цитокинов широко представлен в мировой литературе. Так, CD8<sup>+</sup> Т-клетки центральной памяти с фенотипом – CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, в присутствии цитокинов, имеющих общую  $\square$ -цепь

рецепторов, формировали популяцию *эффекторных клеток*, для которых характерна потеря экспрессии молекул - CD62L, CD28 и CD27.

Небольшой пул Т-клеток, наряду с утратой поверхностных молекул костимуляции, начинал экспрессировать - высокомолекулярный вариант рецептора CD45RA, что свойственно уже для пула терминально-дифференцированных CD45RA-позитивных Т-клеток (TEMRA) (Кудрявцев И.А., 2014). Последние рассматриваются в качестве финальной стадии созревания Т-лимфоцитов: отсутствие на этих клетках ко-стимулирующих молекул CD27 и CD28 свидетельствует о том, что активация этих клеток может происходить под действием не-профессиональных АПК или клетками-мишенями (Кудрявцев И.А., 2014). В литературе также встречаются сведения, что изоформа CD45RO со временем может замещаться исходным вариантом CD45RA; и лишь при повторной стимуляции клеток антигеном происходит образование устойчивых конечных изоформ CD45RO (Селедцов В.И. и соавт., 2010; Ярилин А.А, 2010).

Аппликация в среду культивирования Т-клеток памяти гIL-7, аналогично как в случае наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток, приводила к снижению уровней экспрессии мРНК гена *U2af114* с увеличением действующей дозы цитокина ( $r^2 = -0,82$ ,  $p \leq 0,05$ ) при незначительном повышении транскрипции *Gfi1*. Инкубация CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток с гIL-7, в целом, равномерно угнетала экспрессию мРНК гена *hnRNPLL* (**рисунок 16**); число CD28<sup>+</sup> Т-клеток снижалось только при инкубации CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток с минимальной концентрацией гIL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл), в основном, за счет популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Дозозависимая динамика изменений экспрессии гена *U2af114* была противоположной *hnRNPLL* и *Gfi1*. Как уже упоминалось, низкие концентрации гIL-7 обладают способностью активировать синтез Т-клетками IL-2, который, действуя аутокринно, может способствовать дифференцировке примированных Т-клеток в «зрелые эффекторы», для которых характерна потеря экспрессии молекулы костимуляции CD28. Тогда как более высокие дозы гIL-7, блокируя экспрессию генов системы IL-2, проявляют свое протективное биологическое действие в отношении гомеостаза Т-клеток.

Эффекты гIL-15 на CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки сопровождались дозозависимым снижением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* с увеличением концентрации цитокина ( $r^2 = -0,78$ ,  $r^2 = -0,76$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ) (**рисунок 16**).

Культивирование примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток памяти с IL-15, в целом, сопровождалось положительной динамикой изменения экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* (в сторону увеличения): несмотря на глубокое угнетение транскрипции при действии минимальной дозы исследуемого цитокина (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл), добавление rIL-15 в максимальной концентрации (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) восстанавливало экспрессию мРНК гена до уровня контрольных значений. Достоверное снижение числа цитотоксических CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов регистрировалось при добавлении rIL-15 в концентрации - 1,0x10<sup>-9</sup> г/мл, что также может свидетельствовать о дифференцировке Т-клеток в зрелые эффекторные лимфоциты.

Следует отметить, что эффекты rIL-7 и IL-15 на примированные Т-клетки не сопровождались изменением числа лимфоцитов, несущих маркеры - CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и дубль-позитивных - CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>.

Полученные нами в условиях *in vitro* экспериментальные данные находят частичное подтверждение в литературе. Как уже упоминалось, выживание и гомеостатическая пролиферация Т-клеток памяти *in vivo* после элиминации патогена, определяется наличием в микроокружении цитокинов: IL-2, IL-7 и IL-15 (Ma A. et al., 2006) и не зависит от взаимодействия их рецепторных структур с продуктами ГКГ I (для CD8<sup>+</sup>) и ГКГ II (для CD4<sup>+</sup>) класса (Krawczyk S.M. et al., 2007; Purton J.F. et al., 2007; Singh M. et al., 2008; Tanel A. et al., 2009).

Необходимо отметить, что эффекты IL-15 на Т-клетки разной степени дифференцировки имели разную степень выраженности: относительные значения уровней транскрипции генов *U2af114*, *hnRNPLL* и *Gfi1* у *наивных Т-клеток* *значимо превышали контрольные цифры, тогда как у примированных Т-клеток* *величины, выражающие* относительное изменение уровней транскрипции исследуемых генов имели отрицательные значения. На наш взгляд, выявленные изменения вполне логичны: в сравнении с *наивными Т-лимфоцитами*, функциональная активность Т-клеток памяти менее чувствительна к цитокиновой и мембранной стимуляции (Nijhuis E.W. et al., 1995; Williams M.A., Bevan M.J., 2004; Селедцов В.И. и соавт., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2013). Тем не менее, следует подчеркнуть строгую зависимость эффектов цитокинов от концентрации.

Таким образом, в гомеостатической модели активации *in vitro*, инкубация наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток с цитокинами, имеющими общую  $\alpha$ -цепь рецепторов (IL-2 - 1,0x10<sup>-9</sup> г/мл; IL-15 - 0,1x10<sup>-9</sup> г/мл), приводит к однонаправленному повышению экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и сопровождается ростом числа дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток и CD28<sup>-</sup> Т-лимфоцитов, что свидетельствует о цитокинопосредованном созревании и дифференцировке наивных Т-клеток.

Данный тезис подтверждается фактами позитивной корреляции между уровнями относительной экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и числом дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток ( $r=0,549$ ;  $r=0,620$ ;  $r=0,661$ ,  $p<0,05$  во всех случаях при действии IL-2 (IL-2 - 1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и  $r=0,631$ ;  $r=0,569$ ;  $r=0,554$ ,  $p<0,05$  во всех случаях при действии IL-15 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл), соответственно) и отрицательной и содержанием CD28<sup>+</sup> ( $r=-0,623$ ;  $r=-0,540$ ;  $r=-0,451$ ,  $p<0,05$  во всех случаях при действии IL-2 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и  $r=-0,456$ ;  $r=-0,720$ ;  $r=-0,591$   $p<0,05$  во всех случаях при действии IL-15 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл), соответственно).

IL-7 в гомеостатической модели *in vitro* ограничивает активацию и дифференцировку наивных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии гена *U2af114* ( $r^2= -0,81$ ,  $p\leq 0,05$ ), и напротив, повышения мРНК гена транскрипционного фактора *Gfi1* и не влияет на экспрессию гена *hnRNPLL*. IL-7-индуцированные изменения ассоциированы со снижением числа CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток на фоне неизменного количества CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Действие IL-2 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и IL-7 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл) *in vitro* на культуры примированных Т-клеток (в гомеостатической модели клеточного культивирования *in vitro*) ассоциировано с увеличением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, с угнетением - мРНК гена *hnRNPLL* и сопровождается снижением числа CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. В подтверждение вышесказанному, нами были выявлены отрицательные ассоциации между уровнями экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и числом CD28<sup>+</sup> Т-клеток ( $r=-0,450$ ;  $r=-0,620$ ;  $p<0,05$  при действии IL-2 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и  $r=-0,480$ ;  $r=-0,540$ ;  $p<0,05$  при действии IL-7 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл)), и, напротив, положительные между транскрипцией гена *hnRNPLL* с

содержанием CD28<sup>+</sup> Т-клеток ( $r=0,650$ ;  $p<0,05$  при действии IL-2 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и  $r=0,440$ ;  $p<0,05$  при действии IL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл), соответственно).

Влияние IL-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) на дифференцировку примированных Т-лимфоцитов, сопряжено с повышением мРНК гена *hnRNPLL* и, напротив, угнетением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*, что подтверждается существованием зависимости, выявленной при проведении корреляционного анализа, между уровнями относительной экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и числом CD28<sup>+</sup> Т-клеток (соответственно  $r=0,736$ ;  $r=0,561$  и  $r=-0,651$ ,  $p<0,05$  во всех случаях).

Многочисленными исследованиями продемонстрировано, что сплайсинг транскриптов, кодирующих молекулу CD45, значительно изменяется в ответ на продолжительную активацию Т-клеток (Hess K. et al., 2004; Motta-Mena B.L. et al., 2010; Butte J.M. et al., 2012).

Используемая нами в эксперименте *активационная модель* отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с антиген-презентирующими клетками (АПК) (активация Т-клеток через **CD2**, **CD3** и **CD28**). Ключевым моментом в запуске иммунного ответа является образование *иммунного синапса* между АПК и лимфоцитом, что обусловлено наличием соответствующих поверхностных молекул на обеих клетках. В результате образования иммунного синапса осуществляется обмен информацией между иммунокомпетентными клетками, а также контролируются такие процессы, как *активация, дифференцировка и пролиферация лимфоцитов* (Ярилин А.А., 2010).

Для активации наивных Т-клеток требуется получение двух сигналов от профессиональных АПК: первый – информация об антигене, производится за счет распознавания TCR-рецептором Т-лимфоцитов комплекса антигена и молекул HLA. Второй и немаловажный внутриклеточный сигнал осуществляется за счет костимуляторных молекул со стороны АПК, которые необходимы для полноценной активации Т-лимфоцитов, их дифференцировки и секреции цитокинов. Этот сигнал поступает в результате взаимодействия костимулирующих молекул семейства B7, в частности B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86) на поверхности АПК с рецептором CD28 на поверхности Т-лимфоцита. Эти два сигнала



формируют основу теории активации лимфоцитов (Ивашкин В.Т., 2008; Хаитов Р.М., 2009; Хоченков Д.А., 2010).

Как уже упоминалось ранее, сигнализация через CD28 усиливает активацию наивных Т-клеток, их пролиферацию и выживаемость. Как было показано в экспериментах с CD28<sup>-</sup> - дефицитными мышами, CD28-костимуляция необходима для развития первичного CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа на большинство патогенных микроорганизмов (Lumsden J.M. et al., 2000; Mittrucker H.-W. et al., 2001; Bertram E.M. et al., 2002; Halstead E.S. et al., 2002; Shedlock D.J. et al., 2003). Так, в ходе первичного Т-клеточного ответа, CD28амплифицирует/усиливает сигнал через TCR, снижая тем самым, порог активации и увеличивая выживаемость Т-клеток с помощью позитивной регуляции таких антиапоптотических белков, как Bcl-XL и C-FLIP, защищая клетки от активационного апоптоза (Sperling A.I. et al., 1996; Kirchhoff S. et al., 2000).

В нашем эксперименте, добавление Т-клеточного активатора, имитирующего действие АПК, в культуры CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток, на фоне резкого сокращения числа живых Т-клеток, и напротив, усиления пролиферативной активности, сопровождалось выраженным, особенно в популяции CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (более чем в 50 раз), угнетением экспрессии гена *U2af114*. Уровень транскрипции гена *Gfily* примированных Т-клеток (CD45RO<sup>+</sup>) был сопоставим с контролем, а у наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток, напротив, снижался более чем в 16 раз (**рисунки 17, 18**).

Изменения экспрессии гена *hnRNPLL* в культурах Т-клеток, имеющих разный дифференцировочный статус, носили разнонаправленный характер. *CD2/CD3/CD28-активация* наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов сопровождалась резким снижением числа CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток и усилением транскрипции мРНК гена *hnRNPLL*.

CD2/CD3/CD2-активация CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, аналогично наивным Т-клеткам, приводила к значимому снижению числа CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> - лимфоцитов, и напротив, к угнетению экспрессии мРНК гена *hnRNPLL*.

Возможно, разнонаправленное действие активирующих частиц на Т-лимфоциты разной степени дифференцировки, обусловлено разобщенностью процессов активации Т-клеток разной степени дифференцировки в зависимости от временного фактора. Многие работы констатируют, что для реализации вторичного иммунного ответа Т-клеток костимуляция не обязательна, в связи с чем требуется много меньше времени на активацию (Ярилин А.А., 2010).

Один из механизмов угнетения экспрессии гена *Gfi1* на фоне активации может быть связан с длительностью культивированием Т-клеточных культур. Выявлено, что через 24–72 ч после антигенной стимуляции в Т-клетках существенно активируется экспрессия гена фактора сплайсинга *U2AF26 - U2af114*, в то время как максимальная индукция синтеза белка *Gfi1* (с образованием различных изоформ) наблюдается через 6–12 ч и полностью отсутствует на третьи сутки (Heyd F. et al., 2006). Полученные нами ранее результаты на 48ч культуре мононуклеарных лейкоцитов крови (МНК) также демонстрируют активацию транскрипции *U2af114*, и, напротив, подавление его антагониста – *Gfi1* (Литвинова Л.С. и соавт., 2013).

С другой стороны, значимое угнетение экспрессии обоих генов: *Gfi1* и *U2af114* в наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клетках под действием *CD2/CD3/CD28*-активатора, ассоциированное с повышенной гибелью Т-клеток, может свидетельствовать о дисбалансе, развивающемся на фоне многообразия иницирующих *CD2/CD3/CD28*-сигналов, следствием которых является синтез клеткой новых рецепторов, хемокинов, цитокинов и т.д., что, по всей вероятности, приводит к истощению резервного потенциала клетки.

Другие исследователи предполагают, что регуляция гена *Ptpnc* после антигенной активации Т-клеток не является первостепенной, поскольку молекула *CD45* - трансмембранная тирозинфосфатаза, выполнив свою основную функцию по дефосфорилированию киназ, выводится из зоны иммунного синапса (Ярилин А.А., 2010).

Интересно отметить тот факт, что эффективная конверсия фенотипа наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток, сопряженная с мембранной экспрессией короткого варианта *CD45*, происходила на фоне угнетения экспрессии генов - *U2af114* и *Gfi1*, и напротив, повышенной транскрипции мРНК гена *hnRNPLL*, тесно ассоциированного с молекулой *CD28*, что может свидетельствовать о

дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в клетки эффекторной и/или центральной памяти. Показано, что в нестимулированных наивных Т-клетках экспрессия мРНК гена *hnRNPLL* и содержание белка hnRNPLL регистрируются на фоновом уровне, значительно повышаясь при стимуляции клеток комплексом CD3-CD28 (Butte J.M., 2012). В тоже время существуют данные, что индукция *hnRNPLL* во время активации и дифференцировки гемопоэтических клеток предотвращает их гибель и увеличивает пролиферативную активность (Oberdoerffer S. et al., 2008).

В отношении примированных Т-клеток, индуцированное активацией снижение числа CD28<sup>+</sup> Т-клеток на фоне протекающих противоположных процессов: повышенной гибели и пролиферации, может свидетельствовать о дифференцировке примированных Т-клеток в зрелые эффекторы и терминально-дифференцированные Т-клетки, о чем свидетельствует повышение числа дубль-позитивных CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток (в среднем, в 3 раза). Ряд авторов свидетельствуют, что активация примированных Т-клеток моноклональными антителами к CD28 может играть определенную роль в антиген-независимой активации и пролиферации примированных Т-клеток (Siefken R. et al., 1997; Singh M. et al., 2008).

Кроме того, одной из причин снижения числа CD28<sup>+</sup> Т-клеток в культурах примированных Т-лимфоцитов в условиях их активации может быть повышенная гибель CD28-негативных Т-клеток, крайне чувствительных к дисбалансу иницирующих сигналов, усиленных продукцией IL-2. Согласно данным литературы, стимуляция TCR антителами против CD3 в условиях *in vitro*, сопровождается массовой гибелью терминально-активированных эффекторов - TEMRA CD4<sup>+</sup> клеток (Libri V. et al., 2011), поскольку для них характерна сниженная экспрессия белков семейства Bcl-2, обладающих антиапоптотической активностью, а также высокая экспрессия gH2AX и уровень фосфорилирования p38, что также может рассматриваться в качестве факторов, влияющих на высокий уровень апоптоза в активированных клетках данной популяции (Di Mitri D. et al., 2011).

До недавнего времени придерживались парадигмы, что примированные Т-клетки для экспансии во время вторичного иммунного ответа не нуждаются в дополнительной костимуляции. Однако относительно недавно стали появляться

работы, свидетельствующие, что антигензависимая активация примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-клеток невозможна без молекулы CD28 (Boesteanu A.C., Katsikis P.D., 2009).

На наш взгляд, *CD2/CD3/CD2-индуцированное* повышение числа CD28 – негативных Т-клеток с одновременным угнетением экспрессии мРНК гена *hnRNPLL*, предотвращает спонтанную пролиферацию антиген-специфических Т-клеток памяти ( $CD45RO^+$ ) в отсутствии *антигенной* стимуляции.

Таким образом, активация наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-лимфоцитов анти-*CD2/CD3/CD2- комплексом*, сопровождается угнетением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* с одновременной индукцией транскрипции мРНК гена *hnRNPLL*, что приводит к увеличению числа дубль-позитивных ( $CD45RA^+/CD45RO^+$ ) и  $CD28^-$  негативных Т-клеток, и сопровождается, в конечном итоге, формированием эффекторных клеток или лимфоцитов центральной памяти.

При этом иницирующие ( $CD2/CD3/CD28$ ) сигналы на примированные ( $CD45RO^+$ ) Т-лимфоциты характеризуются угнетением транскрипции мРНК генов *U2af114* и *hnRNPLL* с сохранением экспрессии мРНК транскрипционного фактора *Gfi1*, отвечающего за образование активных изоформ рецептора CD45. Наряду с уменьшением количества лимфоцитов, экспрессирующих на поверхности молекулу позитивной костимуляции  $CD28^+$ , эти процессы свидетельствуют о дифференцировке примированных Т-клеток в зрелые эффекторы и терминально-дифференцированные Т-клетки. Кроме того, подобные механизмы способствуют предотвращению спонтанной активации антиген-индуцированных примированных лимфоцитов.

Весьма интересные, на наш взгляд, данные были получены при инкубации клеток разной степени дифференцировки с комбинациями активатора и рекомбинантных форм цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15).

Культивирование наивных  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоцитов с *CD2/CD3/CD28-активатором* и  $IL-2$ , наряду с ростом количества клеток (в мл) и увеличением их жизнеспособности, сопровождалось дозозависимым, но разнонаправленным угнетением экспрессии мРНК обоих генов - *U2af114* и *Gfi1*: транскрипция гена *U2af114* снижалась с повышением действующей концентрации цитокина ( $r^2 = -0,82$ ,  $p \leq 0,05$ ), и, напротив, *Gfi1* – повышалась ( $r^2 = 0,89$ ,  $p \leq 0,05$ )

(рисунок 17). Следует отметить, что все полученные значения имели отрицательный характер и не достигали уровней контрольных значений. Исследование конверсии фенотипа в культурах наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток продемонстрировало, что ИЛ-2 на фоне *CD2/CD3/CD28-активации* дозозависимым образом увеличивал число дубль-позитивных  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-лимфоцитов ( $r^2=0,87$ ,  $p\leq 0,05$ ) (таблица 6).

В тоже время добавление в среду инкубации наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-лимфоцитов комбинации *анти-CD2/CD3/CD2-частиц* и  $rIL-2$  ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) сопровождалось снижением процентного содержания  $CD4^+CD28^+$  и  $CD8^+CD28^+$  Т-клеток и увеличением экспрессии гена *hnRNPLL*, что может свидетельствовать о созревании и дифференцировке наивных лимфоцитов в Т-клетки эффекторной и центральной памяти в условиях антигеннезависимой активации.

Минимальные концентрации  $rIL-2$  ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл,  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) на фоне активации не изменяли экспрессию рецептора CD28 и значимо угнетали транскрипцию мРНК изучаемого гена *hnRNPLL*.

Согласно модели прогрессивной дифференцировки Т-клеток, главным фактором для определения судьбы клетки после активации является величина сигнала/стимула, который включает в себя комбинированное воздействие антигена, костимуляции и воспалительных факторов (сигналы 1, 2 и 3). Высокие или чрезмерно сильные сигналы, наряду с увеличением клональной экспансии способствуют дифференцировке клеток в направлении терминально-дифференцированных эффекторов (TEMRA); средней силы – клеток-эффекторов памяти (Tem), а слабый – способствует образованию Т-клеток центральной памяти (Tcm) (Kaech S.M., Wherry E.J., 2007).

ИЛ-2 оказывал противоположные эффекты на *CD2/CD3/CD28-*активированные примированные ( $CD45RO^+$ ) Т-клетки: дозопосредованные эффекты ИЛ-2 на  $CD45RO^+$  Т-клетки были ассоциированы с их повышенной гибелью и сопровождались угнетением экспрессии *U2af114* ( $r^2= -0,81$ ,  $p\leq 0,05$ ) с одновременным повышением транскрипции гена *Gfi1* ( $r^2= 0,83$ ,  $p\leq 0,05$ ) (рисунок 18). Динамика изменений экспрессии гена *hnRNPLL* имела четкую зависимость от концентрации цитокина в среде культивирования: повышалась с увеличением дозы  $rIL-2$  ( $r^2= 0,85$ ,  $p\leq 0,05$ ).

Рост числа мертвых Т-клеток на фоне активации и сочетанного действия  $\text{rIL-2}$ , наряду с действием активатора, может быть обусловлен уникальной ролью  $\text{IL-2}$  в регуляции иммунных клеточных реакций, ассоциированной больше с контролем за гиперактивацией иммунной системы или индукцией толерантности за счет стимуляции дифференцировки Treg лимфоцитов *in vivo*, и в меньшей степени с выполнением функции ростового фактора лимфоцитов, где его действие дублируется другими цитокинами (Lin J.-X., Leonard W.J., 2000; Симбирцев А.С., 2004; Malek T.R., Bayer A.L., 2004).

Как уже упоминалось, многие авторы указывают на участие  $\text{IL-2}$  в клональной экспансии примированных  $\text{CD4}^+$ -и  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитов *in vivo* за счет индукции апоптотической гибели примированных  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  клеток (Kneitz B. et al., 1995; Khoruts A. et al., 1998; Lantz O. et al., 2000; Leung D.Y. et al., 2000; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003). Показано, что  $\text{IL-2}$  способен усиливать экспрессию таких проапоптотических белков как TRAIL, каспаза-3, DAP (death-associated protein) и STK 17B (серин/треониновая киназа 17B) (Kovanen P.E. et al., 2005). В то же время, для реализации апоптоз-индуцирующего эффекта  $\text{IL-2}$  на лимфоциты крови в условиях *in vitro*, необходим определенный порог концентрации цитокина (Сазонова Е. В., 2010).

Одним из механизмов, опосредующих повышенную гибель примированных Т-клеток, при действии высоких концентраций  $\text{IL-2}$ , и напротив, увеличения содержания живых наивных ( $\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$ ) Т-клеток на фоне активации может быть изменение функциональной активности гена *Gfi1* (van der Meer L.T. et al., 2010; Mörgöy T., Khandanpour C., 2011). *Gfi1* подавляет экспрессию генов, вовлеченных в выживаемость клеток и пролиферацию (van der Meer L.T. et al., 2010). В то же время Mörgöy T. и соавт. (2011) показано, что *Gfi1* усиливает дифференцировку  $\text{CD8}^+$  Т-клеток в тимусе и участвует в созревании и дифференцировке  $\text{CD4}^+$  эффекторных и регуляторных Т-клеточных субпопуляций на периферии (Mörgöy T., Khandanpour C., 2011).

Возможно, что разнонаправленные эффекты  $\text{IL-2}$  на экспрессию генов, регулирующих альтернативный сплайсинг молекулы  $\text{CD45}$  в активированных Т-клетках, а также их гомеостаз, определяются степенью их дифференцировки, и в большей степени, связаны с биологическим действием самого цитокина.

Добавление в среду культивирования наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток комбинаций анти- $CD2/CD3/CD28$ -частиц и  $IL-7$ , сопровождалось дозозависимым угнетением уровней экспрессии обоих генов *U2af114* и *Gfi1* ( $r^2 = -0,81$ ,  $r^2 = -0,79$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ) – все полученные значения имели отрицательный характер. Закономерным явилось достоверное увеличение числа дубль-позитивных лимфоцитов ( $CD45RA^+/CD45RO^+$ ) в пробах с минимальной концентрацией  $IL-7$ , тогда как максимальная концентрация ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) изучаемого цитокина приводила к статистически значимому снижению числа клеток, несущих на своей поверхности маркеры дубль-позитивных  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-клеток ( $r^2 = -0,83$ ;  $p \leq 0,05$ ) (таблица 6). Сочетанное действие активирующих частиц и  $IL-7$  в отношении экспрессии *hnRNPLL* и числа  $CD28^+$  - Т-клеток было противоположно эффектам  $IL-2$ : низкие концентрации цитокина ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) снижали число клеток, экспрессирующих мембранную молекулу позитивной костимуляции, в основном, за счет  $CD4^+$  Т-клеток. Однако уровень транскрипции матричной РНК гена *hnRNPLL* оказался выше по сравнению со значениями, полученными при исследовании пробы только с добавлением анти- $CD2/CD3/CD28$ -частиц, вероятно, именно это обстоятельство приводило к увеличению числа дубль-позитивных лимфоцитов  $CD45RA^+/CD45RO^+$ , на фоне глубоко подавления транскрипции мРНК генов *Gfi1* и *U2af11*.

Возможный механизм действия экзогенного  $IL-7$  на  $CD2/CD3/CD28$ -активированные наивные Т-клетки может быть тесно ассоциирован с изменениями, индуцируемыми Т-клеточным активатором (Ярилин А.А., 2010). Усиленная экспрессия  $IL-2$  приводит к подавлению мембранной экспрессии на поверхности клетки  $IL-7R\alpha$ -субъединицы ( $CD127$ ) (Хуе Н.-Н. et al., 2002), что может снижать восприимчивость Т-клеток к экзогенному  $IL-7$ : экспрессия  $CD127$  отсутствует на активированных Т-лимфоцитах. Этот факт закономерен и логично вытекает из основной биологической роли исследуемого цитокина, который позиционируют больше как ключевой фактор поддержания жизнеспособности лимфоцитов (Schluns K.S. et al., 2000; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Surh C.D., Sprent J., 2008; Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008). Кроме того, как уже упоминалось,  $IL-7$  может вызывать увеличение экспрессии  $IL-2$   $IL-2R$ , что, возможно, объясняет дифференцировку наивных Т-клеток, сопряженную с эффективной конверсией

фенотипа и потерей экспрессии CD28 при добавлении минимальных концентраций цитокина.

На фоне активации наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток, высокие концентрации  $IL-7$  ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл), по принципу обратной связи, напротив, способствуют глубокому подавлению экспрессии мРНК обоих генов, что получило свое отражение в конверсии фенотипа наивных Т-клеток (**рисунок 17**). В связи с эти вызывают интерес данные о взаимном влиянии  $IL-2$  и  $IL-7$ :  $IL-2$ -/- Т-клетки экспрессируют более высокие уровни  $IL-7R$  (Hoyer K.K. et al., 2007) и блокируют  $IL-2R$  цепи CD25, что индуцирует увеличение экспрессии  $IL-7$ , который опосредует гомеостатическую пролиферацию Т-клеток путем повышения чувствительности к  $IL-7R$  (Monti P. et al, 2009).

Действие  $IL-15$  на активированные наивные ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клетки было аналогичным эффектам  $IL-2$ : наблюдалось глубокое угнетение экспрессии мРНК обоих генов (относительные значения уровней транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* у наивных Т-клеток были значимо ниже контрольных цифр и имели отрицательные значения) (**рисунок 17**).

С ростом концентрации  $IL-15$ , экспрессия обоих генов увеличивалась, не достигая, однако значений активированных контрольных проб (только с добавлением активатора) (**рисунок 17**). Действие  $IL-15$  на изменение транскрипции мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* было дозозависимо ( $r^2 = 0,83$ ,  $r^2 = 0,77$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ). Минимальная концентрация  $IL-15$  индуцировала снижение количества дубль-позитивных  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-клеток в культурах наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-лимфоцитов, тогда как максимальная – обладала противоположным действием, увеличивая число дубль-позитивных  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-клеток ( $r^2 = 0,86$ ;  $p \leq 0,05$ ). Экспрессия гена *hnRNPLL* носила однонаправленный характер с изменениями транскрипции *U2af114* и *Gfi1*, повышаясь лишь при добавлении высокой концентрации  $IL-15$ , что имело взаимосвязь со снижением содержания  $CD8^+CD28^+$  Т-клеток ( $r = -0,580$ ,  $p < 0,05$ ) и, напротив, повышением числа  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-клеток ( $r = 0,760$ ,  $p < 0,05$ ). Выявленные нами изменения могут быть следствием антигеннезависимой,  $IL-15$ -индуцированной дифференцировки Т-клеток. Как уже упоминалось ранее,  $IL-15$  во многом обладает биологическими активностями, свойственными  $IL-2$ ; рецепторы



обоих цитокинов имеют по три субъединицы, две из которых общие для IL-2 и IL-15, а сигналы IL-15 передаются через IL-2/15R $\beta$  и общую с IL-2  $\gamma$ -цепь (Nishimura H. et al., 2000; Fehniger T.A. et al., 2001).

В целом, значимое угнетение экспрессии обоих генов: *Gfi1* и *U2af114* в CD2/CD3/CD28-активированных наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клетках под действием цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь может свидетельствовать о дисбалансе, развивающемся на фоне многообразия иницирующих CD2/CD3/CD28-сигналов. Кроме того, следует учитывать эффекты самих цитокинов, оказывающих протекторное влияние на поддержание жизнеспособности и гомеостатической пролиферации, нежели на активацию наивных Т-клеток (Heud F. et al., 2006), нивелируя, тем самым, действие активатора.

Эффекты IL-7 и IL-15 на активированные CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки сопровождалось, в целом, снижением уровней экспрессии *U2af114* с увеличением концентрации цитокинов: максимальные уровни экспрессии гена *U2af114* регистрировались при добавлении минимальных концентраций цитокинов; динамика изменений транскрипции мРНК гена *Gfi1* была незначительной по сравнению с контрольными образцами (**рисунок 18**). Максимальные концентрации rIL-7 и IL-15, наряду со снижением экспрессии *U2af114*, оказывали протекторный эффект на культуру примированных Т-клеток, отменяя проапоптогенный эффект активатора, что сопровождалось увеличением числа живых клеток.

Кроме того, во всем диапазоне концентраций, IL-7 нивелировал угнетающий эффект активирующих частиц на транскрипцию мРНК гена *hnRNPLL*. При этом число Т-клеток, несущих мембранную молекулу костимуляции CD28<sup>+</sup> и содержание дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток в CD45RO<sup>+</sup> - культурах - не изменялось.

Комбинация *анти-CD2/CD3/CD2-частиц* и rIL-15, в целом, оказывала стимулирующее действие на экспрессию мРНК гена *hnRNPLL*: самый высокий уровень регистрировался при добавлении минимальной и средней концентраций цитокина (0,1 и 0,5x10<sup>-9</sup> г/мл) и был ассоциирован со снижением числа CD28<sup>+</sup> Т-клеток. Выявленные изменения сопровождалось увеличением числа дубль-позитивных CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток, что может свидетельствовать о

дифференцировке примированных Т-лимфоцитов, индуцированной ИЛ-15 на фоне активации.

Таким образом, цитокины, имеющие общую  $\alpha$ -цепь рецепторов, ИЛ-2 и ИЛ-15 -  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл и ИЛ-7 -  $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл, при действии *in vitro* на активированные наивные ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-лимфоциты, способствуют их дифференцировке и созреванию за счет угнетения экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, активации - *hnRNPLL*, что выражается увеличением числа переходных, дубль-позитивных форм -  $CD45RA^+/CD45RO^+$  Т-лимфоцитов и CD28-негативных Т-клеток. Это положение подтверждается существованием отрицательных взаимосвязей между уровнями относительной экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и числом дубль-позитивных ( $CD45RA^+/CD45RO^+$ ) Т-клеток ( $r=-0,430$ ;  $r=-0,590$ ;  $p<0,05$  во всех случаях при действии ИЛ-2 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл);  $r=-0,450$ ;  $r=-0,430$ ;  $p<0,05$  во всех случаях при действии ИЛ-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл);  $r=-0,560$ ;  $r=-0,420$   $p<0,05$  во всех случаях при действии ИЛ-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл), соответственно) и между транскрипцией гена *hnRNPLL* и содержанием  $CD28^+$  Т-лимфоцитов ( $r=-0,760$ ,  $p<0,05$  при действии ИЛ-2 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл);  $r=-0,550$ ;  $p<0,05$  при действии ИЛ-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и  $r=-0,445$ ,  $p<0,05$  при действии ИЛ-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл), соответственно).

Более низкие концентрации ИЛ-2 и ИЛ-15 -  $0,1$  и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл и максимальные - ИЛ-7 -  $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл, ограничивают дифференцировку Т-клеток, индуцированную активацией.

Эффекты  $rIL-2$  на дифференцировку активированных *in vitro* примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-клеток сопряжены с угнетением экспрессии гена *U2af114* и повышением транскрипции генов *Gfi1* и *hnRNPLL*. Напротив, влияние ИЛ-15 ( $0,1$  и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) на дифференцировку активированных  $CD45RO^+$  Т-клеток ассоциировано с однонаправленным изменением экспрессии генов *hnRNPLL* и *U2af114* и не затрагивает транскрипционный фактор *Gfi1*.

На фоне активации *in vitro*, ИЛ-7 (во всем спектре действующих концентраций) ограничивает дифференцировку примированных Т-клеток за счет угнетения экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, что согласуется с его биологическим действием на гомеостаз Т-клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, можно выделить ряд закономерностей цитокинопосредованной регуляции механизма молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток, сопряженного с альтернативным сплайсингом гена *Ptprc* (кодирующего общелейкоцитарный рецептор - CD45).

Наше исследование позволило выявить, что цитокининдуцированные процессы созревания и дифференцировки наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) и примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-клеток осуществляются за счет изменения активности генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и фенотипически выражаются увеличением числа  $CD45RA^+CD45RO^+$  Т-клеток и снижением количества  $CD28^+$  Т-лимфоцитов. Продемонстрировано, что дозозависимый характер влияния цитокинов, имеющих общую  $\beta$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на созревание и дифференцировку наивных ( $CD45^+CD62L^+$ ) и примированных ( $CD45RO^+$ ) Т-лимфоцитов *in vitro* зависит от функционального состояния Т-клеток (**рисунок 23**).

В культурах наивных ( $CD45RA^+ CD62L^+$ ) Т-клеток, в условиях гомеостатической активации *in vitro*, эффекты IL-2 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и IL-15 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) направлены на повышение уровней экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*. Эти изменения сопровождаются ростом числа дубль-позитивных ( $CD45RA^+/CD45RO^+$ ) Т-клеток и  $CD28^+$  Т-лимфоцитов, что свидетельствует о созревании и дифференцировке наивных Т-клеток в Т-клетки центральной или эффекторной памяти. Доказано, что действие IL-7 ограничивает активацию и дифференцировку наивных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии гена *U2af114*, и напротив, повышения экспрессии гена *Gfi1* (**рисунок 23**).

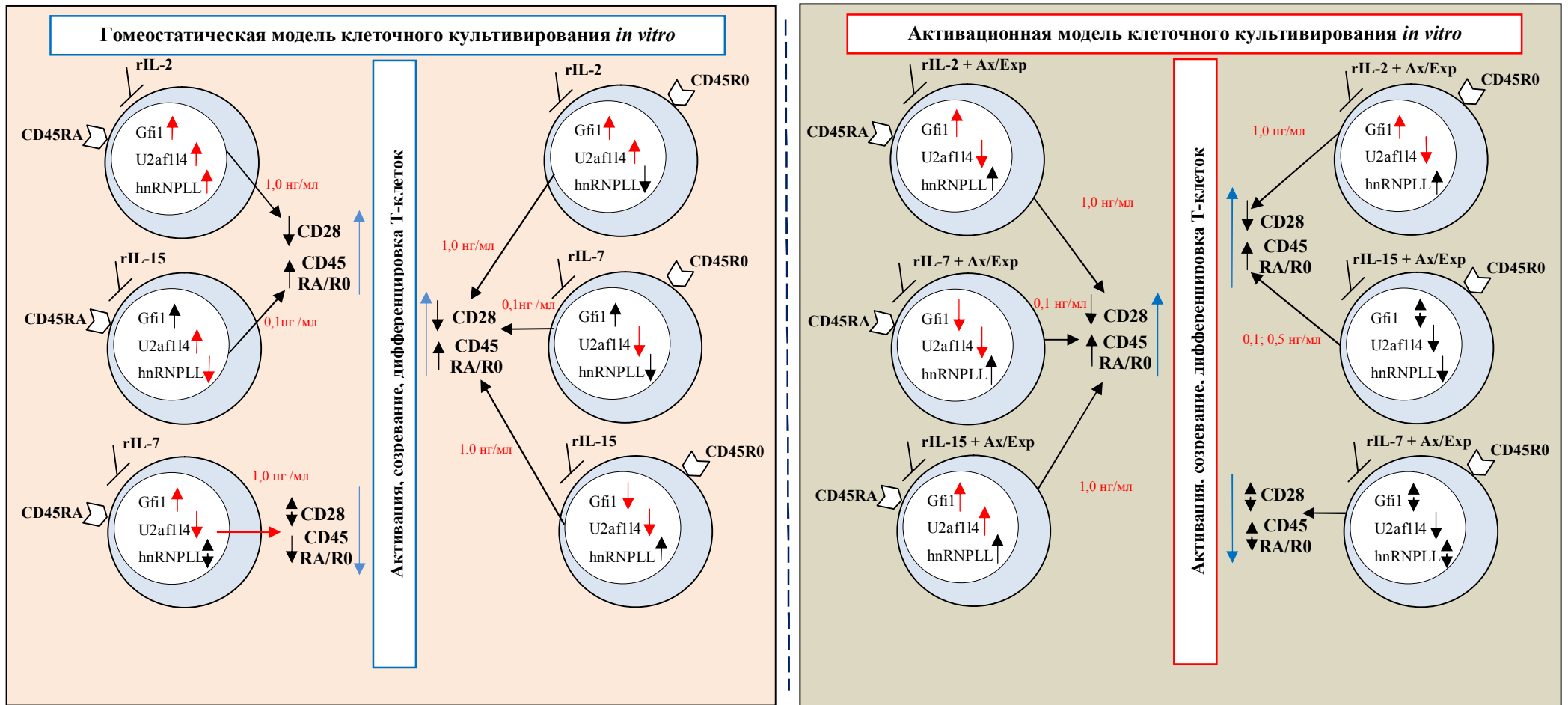
Эффекты IL-2 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и IL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) на дифференцировку примированных Т-клеток в гомеостатической модели клеточного культивирования *in vitro* ассоциировано с увеличением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, с угнетением - мРНК гена *hnRNPLL*; действие IL-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) сопряжено с повышением уровней экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* и угнетением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*. Показано, что цитокины, имеющие общую  $\beta$ -цепь рецепторов, IL-2 и IL-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и IL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) при действии *in vitro* на TCR-активированные наивные ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-лимфоциты,

способствуют их дифференцировке и созреванию за счет угнетения экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, активации - *hnRNPLL*.

Низкие концентрации IL-2 и IL-15 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) и максимальные IL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл), ограничивают дифференцировку Т-клеток, индуцированную TCR-активацией (**рисунок 23**).

Продемонстрировано, что эффекты rIL-2 на дифференцировку активированных CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток сопряжены с угнетением экспрессии гена *U2af114* и повышением транскрипции генов *Gfi1* и *hnRNPLL*. Напротив, влияние IL-15 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) ассоциировано с однонаправленным повышением экспрессии генов *hnRNPLL* и *U2af114* и не затрагивает экспрессию транскрипционного фактора *Gfi1*. На фоне CD2/CD3/CD28-активации *in vitro*, IL-7 ограничивает дифференцировку примированных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* (**рисунок 23**).

Полученные нами результаты, безусловно, нуждаются в дальнейшем изучении. В целом, исследование механизмов молекулярно-генетического контроля, обеспечивающих процессы гомеостаза Т-клеток в ответ на воздействие антигенной и не антигенной природы, может иметь актуальность при создании общей модели дифференцировки и самоподдержания иммунокомпетентных клеток.



**Рисунок 23.** Влияние цитокинов, имеющих общую  $\square$ -цепь рецепторов на активацию, дифференцировку и созревание Т-клеток, имеющих разную степень дифференцировки (по результатам собственных исследований). **Обозначения:**

↑↓ положительное или отрицательное действие цитокинов на активацию, созревание и дифференцировку Т-клеток;

↑↓ дозозависимые эффекты цитокинов;

↕ отсутствие изменений;

□ мембранные рецепторы.

## ВЫВОДЫ

1. Цитокины, имеющие общую  $\alpha$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) *in vitro* оказывают дозозависимое, разнонаправленное влияние на гомеостаз, созревание и дифференцировку наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток, путем изменения экспрессии мРНК генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45), что выражается эффективной конверсией фенотипа (увеличение числа CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток) и снижением числа CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.
2. Эффекты цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на созревание и дифференцировку наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток определяются их функциональным состоянием.
3. В гомеостатической модели активации *in vitro*, инкубация наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток с цитокинами (IL-2 -  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл; IL-15 -  $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл), приводит к однонаправленному повышению экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и сопровождается ростом числа дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) Т-клеток и CD28<sup>-</sup> Т-лимфоцитов. IL-7 в гомеостатической модели *in vitro* ограничивает активацию и дифференцировку наивных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии гена *U2af114*, и напротив, повышения мРНК гена транскрипционного фактора *Gfi1* и не влияет на экспрессию гена *hnRNPLL*.
4. Действие IL-2 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и IL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) на дифференцировку примированных Т-клеток в гомеостатической модели *in vitro* ассоциировано с увеличением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, с угнетением мРНК гена *hnRNPLL*. Влияние IL-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) сопряжено с повышением уровней экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* и угнетением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*.
5. Цитокины, имеющие общую  $\alpha$ -цепь рецепторов, IL-2 и IL-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и IL-7 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл) при действии *in vitro* на активированные наивные (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоциты, способствуют их дифференцировке и созреванию за счет угнетения экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, активации - *hnRNPLL*. Низкие концентрации IL-2 и IL-15 ( $0,1$  и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) и максимальные - IL-7 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл), ограничивают дифференцировку Т-клеток, индуцированную TCR-активацией.
6. Эффекты IL-2 на дифференцировку активированных CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток сопряжены с угнетением экспрессии гена *U2af114* и повышением транскрипции генов *Gfi1* и *hnRNPLL*. Напротив, влияние IL-15 ( $0,1$  и  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) ассоциировано с однонаправленным повышением экспрессии генов *hnRNPLL* и *U2af114* и не затрагивает экспрессию гена *Gfi1*. На фоне активации *in vitro*, IL-7 ограничивает дифференцировку примированных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бойчук, С.В. Роль интерлейкина 7 в патогенезе и терапии ВИЧ-инфекции / С.В. Бойчук, П.Д. Дунаев // Цитокины и воспаление. - 2008. - № 7 (1). - С. 3-7.
2. Бурместер, Г. Р. Наглядная иммунология / Г. Р. Бурместер, А. Пецуто. - М.: БИНОМ. Лаб. знаний, 2009. – 320 с.
3. Гуцол, А.А. Влияние дексаметазона на активацию Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов / А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич, Л.С. Литвинова // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2012. - № 4 (41). - С. 29.
4. Динамика экспрессии CD25 в лимфоцитах периферической крови человека, стимулированных фитогемагглютинином или интерлейкином-2 / А.Н. Шатрова, Н.Д. Аксенов, В.В. Зенин и соавт. // Цитология. – 2009. - №6. – С. 506-510.
5. Дозозависимые эффекты стероидных гормонов на экспрессию генов GFI и U2AF1L4 в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки / Л.С. Литвинова, И.О. Мазунин, А.А. Гуцол и соавт. // Молекулярная биология. - 2013. - Т. 47, № 4. - С. 656 – 667.
6. Ивашкин, В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии / В.Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2008. – № 4. – С. 4–14.
7. Кремер, Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика / Н.Ш. Кремер. – М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2004. – 573 с.
8. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти / В. И. Селедцов, Л. С. Литвинова, А. Г. Гончаров и соавт. // Цитокины и воспаление. - 2010. - Т. 9, № 4. - С. 9-15.
9. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти / Селедцов В.И., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г. и соавт. // Цитокины и воспаление. - 2010. – V. 4. – P. 9–15.
10. Кудрявцев, И. В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал. - 2014. - Т. 8, № 4. - С. 947-964.

11. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л. С. Литвинова, А. А. Гуцол, Н. А. Сохоневич и соавт. // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7-26.
12. Потапнев, М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами: Обзор. / М.П. Потапнев // Иммунология. - 2002. – Т. 23, № 4. - С. 237-243.
13. Роль апоптоза и анергии Т-клеток в патогенезе гнойно-септических заболеваний / М.Н. Норкин, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова и соавт. // Медицинская иммунология. - 2000. - Т. 2, № 1. - С. 35-42.
14. Сазонова, Е.В. Механизмы реализации регуляторного влияния интерлейкина-2 на апоптоз лимфоцитов крови. автореферат дис. ... кандидата медицинских наук / Е.В. Сазонова. – Кемерово, 2010. - 24 с.
15. Селедцова, Г.В. Т-клеточная вакцинация в лечении рассеянного склероза / Г.В. Селедцова, И.П. Иванова, В.И. Селедцов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2008. - Т. 3, № 4. - С. 31—35.
16. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2004. - №2. - С. 16 – 21.
17. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. - С-Пб.: Фолиант, 2008. - 552 с.
18. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Гуцол А.А., Хазиахматова О.Г., Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию генов Gfi1 и U2af1l4 в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. - Т.159 (№ 2). - С. 196-200.
19. Стероидная регуляция иммунной памяти / Л.С. Литвинова, В.И. Селедцов, В.В. Шуплецова и соавт. // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. - 2011. - № 1. - С. 77-87.
20. Тяжелова, В.Г. Закономерности регулирования митохондриального апоптоза нейтрофилов / В.Г. Тяжелова // Фундаментальные исследования. – 2013. - №8. – С. 108-113.
21. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник для студ. мед. вузов / Р.М. Хаитов. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 320 с.



22. Хаитов, Р.М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р.М. Хаитов, М.В. Пащенко, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 66–74.
23. Хайдуков, С.В. Ионицин-резистентная субпопуляция CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов периферической крови человека. Функциональная характеристика / С.В. Хайдуков, И.С. Литвинов // Биологические мембраны. - 2003. - Т. 20, № 4. - С. 333—340.
24. Хайдуков, С.В. Многоцветный анализ в проточной цитометрии для медико-биологических исследований. автореф. дис. ... д-ра биол. наук / С.В. Хайдуков. – Санкт-Петербург, 2008. – 52 с.
25. Хоченков, Д.А. Роль дендритных клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены типа 2. / Д.А. Хоченков // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 4. – С. 307–313.
26. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток иммунной памяти *in vitro* / Литвинова Л.С., Сохоневич Н.А., Гуцол А.А. и соавт. // Цитология. – 2013. - Т. 55. – С. 566–571.
27. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток иммунной памяти *in vitro* / Литвинова Л.С., Сохоневич Н.А., Гуцол А.А. и соавт. // Цитология. – 2013. - Т. 55. – С. 566–571.
28. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. - М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 752 с.
29. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4 / D.J. Topp, J. Jackson, A.A. Melton et al. // RNA. - 2008. – V. 14. – P. 2038-2049.
30. A conserved signal-responsive sequence mediates activation-induced alternative splicing of CD45 / C. Rothrock, B. Cannon, B. Nahm et al. // Mol. Cell. – 2003. – V. 12 (5). – P. 1317-1324.
31. A function for IL-7R for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells / A.L. Bayer, J.Y. Lee, A. de la Barrera et al. // J. Immunol. – 2008. – V. 181 (1). – P.225-234.
32. A human class II MHC-derived peptide antagonizes phosphatidylinositol 3-kinase

- to block IL-2 signaling / M.L. Boytim, P. Lilly, K. Drouvalakis et al. // *J Clin Invest.* – 2000. – V. 105(10). – P. 1447-1453.
33. A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin(IL)-2-independent mechanism / A. Khoruts, A. Mondino, K.A. Pape et al. // *J Exp Med.* – 1998. – V. 187(2). – P. 225-236.
34. A synaptic basis for paracrine interleukin-2 signaling during homotypic T cell interaction / C.A. Sabatos, J. Doh, S. Chakravarti et al. // *Immunity.* – 2008. – V. 29 (2). – P. 238-248.
35. A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain / K.S. Fang, K. Barker, M. Sudol, et al. // *Biol. Chem.* - 1994. – V. 269 (19). – P. 14056-14063.
36. A validated assay to measure soluble IL-7 receptor shows minimal impact of IL-7 treatment / C. Janot-Sardet, B. Assouline, R. Cheynier et al. // *J. Immunol. Methods.* - 2010. - V. 353 (1-2). - P. 115-123.
37. Alexander, D.R. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function / D.R. Alexander // *Semin. Immunol.* – 2000. - V. 12. - P. 349 - 359.
38. Altered IL-7R $\alpha$  expression with aging and the potential implications of IL-7 therapy on CD8<sup>+</sup> T cell immune responses / H.R. Kim, M.S. Hong, J.M. Dan et al. // *Blood.* – 2006. - V. 107. - P. 2855–2862.
39. Alternative splicing in multiple sclerosis and other autoimmune diseases / I. Evsyukova, A.J. Somarelli, G. S. Gregory et al. // *RNA Biology.* – 2010. – V. 7 (4). – P. 462-473.
40. Alves, N.L. Common  $\gamma$  chain cytokines: dissidence in the details / N.L. Alves, F.A. Arosa, R.A.W. van Lier // *Immunology Letters.* – 2007. - V. 108 (2). – P. 113–120.
41. Alves, N.L. IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8<sup>+</sup> T cells / N.L. Alves, F.A. Arosa, R.A.W. van Lier // *J. Immunol.* – 2005. – V. 175. – P. 755–762.
42. Amsen, D. Decisions on the road to memory / D. Amsen, R.A. Backer, C. Helbig // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – V. 785. – P. 107-20.
43. Antigen-specific immunotherapy regulates B cell activities in the intestine / Q.

- Yang, Y. Liang, L. Si et al. // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V.288(23). – P. 16383-16390.
44. Antiviral CD4<sup>+</sup> memory T cells are IL-15 dependent / J.F. Purton, J.T. Tan, M.P. Rubinstein et al. // *J Exp Med.*- 2007.- V. 204.- P. 951–961.
45. Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs / O.J. Brand, C.E. Lowe, J.M. Heward et al. // *Clin. Endocrinol (Oxf)*. – 2007. – V. 66. – P. 508–512.
46. Barata, J.T. Interleukin-7 in T-cell acute lymphoblastic leukemia: an extrinsic factor supporting leukemogenesis? / Barata, J.T., A.A. Cardoso, V.A. Boussiotis // *Leuk. Lymphoma.* – 2005. – V. 46 (4). – P. 483-95.
47. Benczik, M. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes / M. Benczik, S.L. Gaffen // *Immunol Invest.* – 2004. - V. 33(2). – P. 109-142.
48. Bertram, E.M. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection / E.M. Bertram, P. Lau, T.H. Watts // *J. Immunol.* - 2002.- V. 168. – P. 3777-3785.
49. Black, D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing / D.L. Black // *Annu. Rev. Biochem.* – 2003. – V. 72. – P. 291-336.
50. Boesteanu, A.C. Memory T cells need CD28 costimulation to remember / A.C. Boesteanu, P.D. Katsikis // *Semin Immunol.* – 2009. – V. 21 (2). – P. 69-77.
51. Butte, J.M. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing [Electronic resource] / J.M. Butte, J.S. Lee, J. Jesneck // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7 (6). - Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0040032>
52. Cai, K. Interleukin-7 expression in tears and orbital tissues of patients with Graves' ophthalmopathy / K. Cai, R. Wei // *Endocrine.* - 2013. - V. 44 (1). - P. 140-144.
53. Cantrell, D.A. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth / D.A. Cantrell, K.A. Smith // *J. Exp. Med.* - 1983. – V. 158. –P.

- 1895–1911.
54. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation / A.I. Sperling, J.A. Auger, B.D. Ehst et al. // *J. Immunol.* - 1996. - V. 157. – P. 3909-3917.
  55. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7 / M. Catalfamo, C. Wilhelm, L. Tcheung et al. // *J. Immunol.* - 2011. - V. 186 (4). - P. 2106-2116.
  56. CD4<sup>+</sup> T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4<sup>+</sup> T cells in protective immunity to influenza / S.L. Swain, J.N. Agrewala, D.M. Brown et al. // *Immunol Rev.* – 2006. – V. 211. – P. 8-22.
  57. Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival / A. Tanel, S.G. Fonseca, B. Yassine-Diab et al. // *Expert Rev. Vaccines.* - 2009. – V. 8. – P. 299-312.
  58. Chehtane, M. Interleukin-7 mediates glucose utilization in lymphocytes through transcriptional regulation of the hexokinase II gene / M. Chehtane, A.R. Khaled // *Am J. Physiol. Cell Physiol.* - 2010. - V. 298 (6). – P. 1560-1571.
  59. Combinatorial control of signal-induced exon repression by hnRNP L and PSF / A.A. Melton, J. Jackson, J. Wang et al. // *Molecular and cellular biology.* - 2007. – V. 27 (19). – P. 6972–6984.
  60. Consequences of increased CD45RA and RC isoforms for TCR signaling and peripheral T cell deficiency resulting from heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like mutation / Z. Wu, A.L. Yates, G.F. Hoyne et al. // *J. Immunol.* - 2010. - V. 185 (1). - P. 231–238.
  61. Control of homeostasis of CD8<sup>+</sup> memory T cells by opposing cytokines / C.C. Ku, M. Murakami, A. Sakamoto et al. // *Science.* – 2000. - 288(5466). – P. 675-678.
  62. Coventry, B.J. The 20th anniversary of interleukin-2 therapy: bimodal role explaining longstanding random induction of complete clinical responses / B.J. Coventry, M.L. Ashdown // *Cancer Manag. Res.* - 2012. - V. 4. - P. 215-221.
  63. Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity* / J.X. Lin, P. Li, D. Liu et al. // *Immunity.* – 2012. – V.36(4). – P. 586 –599.
  64. Crotty, S. Immunological memory in humans / S. Crotty, R. Ahmed // *Seminars*

- in Immunology. - 2004. - Vol. 16. - P. 197-203.
65. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor / D.J. Stauber, E.W. Debler, P.A. Horton et al. // Proc. Natl. Acad. Sci U S A. – 2006. – V. 103 (8). – P. 2788-2793.
  66. Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR / H.J. Nam, F. Poy, N.X. Kreuger et al. // Cell. - 1999. - V. 97 (4). - P. 449 - 457.
  67. Cytokine synergy in antigen-independent activation and priming of naive CD8+ T lymphocytes / S. Ramanathan, J. Gagnon, S. Dubois et al. // Crit Rev Immunol. – 2009. – V. 29(3). – P. 219-239.
  68. Cytokines and T-cell homeostasis / O. Boyman, J.F. Purton, C.D. Surh et al. // J. Curr Opin Immunol. – 2007. – V. 19(3). – P. 320-326.
  69. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4+CD45RA+CD27+ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process / V. Libri, R.I. Azevedo, S.E. Jackson et al. // Immunology. – 2011. – V. 132. – P. 326–339.
  70. D'Cruz, L.M. Surviving the crash: transitioning from effector to memory CD8+ T cell / L.M. D'Cruz, M.P. Rubinstein, A.W. Goldrath // Semin Immunol. - 2009. – 21. – P. 92-98.
  71. De Arras, L. Limiting of the innate immune response by SF3A-dependent control of MyD88 alternative mRNA splicing [Electronic resource] / L. De Arras, S. Alper // PLoS Genet. – 2013. – V. 9(10). - Mode of access: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003855>.
  72. Dendritic cells drive memory CD8 T cell homeostasis via IL-15 trans-presentation / S.W. Stonier, L.J. Ma, E.F. Castillo et al. // Blood. – 2008. - V. 23. – P. 4546–4554.
  73. Detailed characterization of gamma delta T cells within the organs in mice: classification into three groups» / K. Sato, K. Ohtsuka, H. Watanabe et al. // Immunology. -1993. – V. 80(3). – P. 380–387.
  74. Differential requirement for CD80 and CD80/CD86-dependent costimulation in the lung immune response to an influenza virus infection / J.M. Lumsden, J.M. Roberts, N.L. Harris et al. // J. Immunol. - 2000. – V. 164. – P. 79-85.
  75. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative

- splicing in immune responses in vivo / H. Nishimura, T. Yajima, Y. Naiki et al. // *Exp. Med.* – 2000. – V. 191 (1). – P. 157-170.
76. Differential sensitivity of human naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells for dexamethasone / E.W. Nijhuis, B. Hinloopen, R.A. van Lier et al // *Int Immunol.* – 1995. - V. 7(4). – P. 591-595.
77. Disease associations and altered immune function in CD45 138G variant carriers / S. Boxall , T. Stanton , K. Hirai et al. // *Human Molecular Genetics.* - 2004. - V. 13 (20). - P. 2377-2384.
78. Disengaging the IL-2 receptor with daclizumab enhances IL-7-mediated proliferation of CD4(+) and CD8(+) T cells / P. Monti, C. Brigatti, A.K. Heninger et al. // *Am J. Transplant.* - 2009. - V. 9 (12). – P. 2727-2735.
79. Distinct functions of autoreactive memory and effector CD4<sup>+</sup> T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis / W. Elyaman, P. Kivisäkk, J. Reddy et al. // *Am J. Pathol.* - 2008. - V. 173 (2). - P. 411—422.
80. Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members / Q. Jiang, W.Q. Li, R.R. Hofmeister et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – V. 24 (14). – P. 6501-6513.
81. Doms, H. Revisiting the role of IL-2 in autoimmunity / H. Doms, A.K. Abbas // *Eur. J. Immunol.* – 2010. –V. 40 (6). – P.1538-1540.
82. Doses-response effect of steroid hormones on Gfi1 and U2af114 gene expression in T lymphocytes at different stages of differentiation / L.S. Litvinova, I.O. Mazunin, A.A. Gutsol et al. // *Molecular Biology.* – 2013. – V. 47(4). – P. 656–666.
83. Effect of interleukin-2 level and genetic variants on coronary artery disease / R. Ding, W. Gao, D.H. Ostrodczi et al. // *Inflammation.* - 2013. - V. 36 (6). - P. 1225-1231.
84. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes / N. Manjunath, P. Shankar, J. Wan et al. // *J. Clin. Invest.* – 2001. – V. 108. – P. 871–878.
85. Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study / Y. Lévy, I. Sereti, G.

- Tambussi et al. // Clin. Infect. Dis. - 2012. - V. 55 (2). - P. 291-300.
86. Elevated IL-7 availability does not account for T cell proliferation in moderate lymphopenia / L.C. Osborne, D.T. Patton, J.H. Seo et al. // J. Immunol. - 2011. - V. 186 (4). - P. 1981-1988.
87. Elevated levels of circulating IL-7 and IL-15 in patients with early stage prostate cancer [Electronic resource] / C. Mengus, C. Le Magnen, E. Trella et al. // J Transl Med. - 2011. - V. 9 (162). - Mode of access: <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/162>.
88. Ellery, J.M. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction / J.M. Ellery, P.J. Nicholls // Immunol Cell Biol. - 2002. - V. 80(4). - P. 351-357.
89. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // Toxicol Pathol. - 2007. - V. 35. - P. 495-516.
90. Elucidation of the interleukin-15 binding site on its alpha receptor by NMR / N.A. Hanick, M. Rickert, L. Varani et al. // Biochemistry. - 2007. - V. 46 (33). - P. 9453-9461.
91. Enhanced signaling through the IL-2 receptor in CD8+ T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8+ T cells rather than promotion of cell death / L.E. Cheng, C. Ohlén, B.H. Nelson et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2002. - V. 99(5). - P. 3001-3006.
92. Ets-1 maintains IL-7 receptor expression in peripheral T cells / R. Grenningloh, T.S. Tai, N. Frahm et al. // J. Immunol. - 2011. - V. 186 (2). - P. 969-976.
93. Evaluation of the IL2/IL21, IL2RA and IL2RB genetic variants influence on the endogenous non-anterior uveitis genetic predisposition [Electronic resource] / M.C. Cénit, A. Márquez, M. Cordero-Coma et al. // BMC Med Genet. - 2013. - V. 14. - Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/14/52>.
94. Evidence of a novel IL-2/15R beta-targeted cytokine involved in homeostatic proliferation of memory CD8+ T cells / D. Kamimura, N. Ueda, Y. Sawa et al. // J Immunol. 2004. - V. 173(10). - P. 6041-6049.
95. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells / T.A. Fehniger, K. Suzuki, A.

- Ponnappan et al. // *Exp. Med.* – 2001. – V. 193 (2). – P. 219-231.
96. Fu, X.D. Towards a splicing code / X.D. Fu // *Cell.* – 2004. – V. 119 (6). – P. 736-738.
97. Geginat, J. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory, and effector memory CD4<sup>+</sup> T cells / J. Geginat, F. Sallusto, A. Lanzavecchia // *J. Exp. Med.* - 2001. – V. 194. – P. 1711–1719.
98. Geginat, J. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines / J. Geginat, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Blood.* – 2003. – V. 101. – P. 4260–4266.
99. Gfi1—Cells & Circuits: Unraveling transcriptional networks of development and disease / D.J. Phelan, F.N. Shroyer, T. Cook et al. // *Curr. Opin. Hematol.* - 2010. – V. 17 (4). – P. 300–307.
100. Global analysis of alternative splicing during T-cell activation / Y.J. Ip, A. Tong, Q. Pan et al. // *RNA.* - 2007. – V. 13. – V. 4. – P. 563-572.
101. Global analysis of IL-2 target genes: identification of chromosomal clusters of expressed genes / P.E. Kovanen, L. Young, A. Al-Shami et al. // *Int Immunol.* – 2005. - V. 17(8). – P. 1009-1021.
102. Gupta, S. CD95-mediated apoptosis in naïve, central and effector memory subsets of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in aged humans / S. Gupta, S. Gollapudi // *Exp. Gerontol.* – 2008. - V. 43 (4). - P. 266-274.
103. Heyd, F. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing / F. Heyd, G. ten Dam, T. Möröy // *Nat. Immunol.* – 2006. – V. 7 (8). – P. 859-867.
104. Heyd, F. Phosphorylation-Dependent Regulation of PSF by GSK3 Controls CD45 Alternative Splicing / F. Heyd, W.K. Lynch // *Molecular Cell.* – 2010. – V. 40. – P. 126–137.
105. Homeostasis of memory T cells / C.D. Surh, O. Boyman, J.F. Purton et al. // *Immunol Rev.* – 2006. V. 211. – P. 154-163.
106. Homeostasis of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4<sup>+</sup> T cell numbers / A.R. Almeida, N. Legrand, M. Papiernik et al. // *J Immunol.* - 2002. - V. 169 (9). - P. 4850-4860.
107. Homeostatic control of T-cell generation in neonates / S.O. Schonland, J.K.



- Zimmer, C.M. Lopez-Benitez et al. // *Blood*. – 2003. – V. 102. – P. 1428–1434.
108. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity / K. Goudy, D. Aydin, F. Barzaghi et al. // *Clin. Immunol.* - 2013. - V. 146 (3). - P. 248-261.
109. Human monocytes have increased IFN- $\gamma$ -mediated IL-15 production with age alongside altered IFN- $\gamma$  receptor signaling / N. Lee, M.S. Shin, K.S. Kang et al. // *Clin. Immunol.* - 2014. - V. 152 (1-2). - P. 101-110.
110. Hyoung, P.K. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system / P.K. Hyoung, I. Jean, J.L. Warren // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2006. – V. 17. – P. 349–366.
111. IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8<sup>+</sup> T cells in vitro / Y. Li, W. Zhi, P. Wareski et al. // *J. Immunol.* – 2005. – V. 174. – P. 4019–4024.
112. IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells / T. Ranson, C.A. Vosshenrich, E. Corcuff et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2003. – V. 100 (5). – P. 2663–2668.
113. IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells / Y.M. Mueller, P.M. Bojczuk, E.S. Halstead et al. // *Blood*. – 2003. – V. 101. – P. 1024–1029.
114. IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector-memory T cells / Y.M. Mueller, V. Makar, P.M. Bojczuk et al. // *Int. Immunol.* – 2003. - V. 15 (1). - P. 49-58.
115. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8<sup>+</sup> T cells in vitro / N.L. Alves, B. Hooibrink, F.A. Arosa et al. // *Blood*. – 2003. – V. 102. – P. 2541–2546.
116. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis / T. Ranson, C.A. Vosshenrich, E. Corcuff et al. // *Blood*. – 2003. – V. 101 (12). – P. 4887–4893.
117. IL-2 and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets / S. Letourneau, C. Krieg, G. Pantaleo et al. // *J Allergy Clin Immunol.* - 2009. - V. 123(4). - P. 758-762.
118. IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory

- and conventional CD4<sup>+</sup> T cell compartments during peripheral T cell reconstitution / A. Le Campion, A. Pommier, A. Delpoux et al. // *J Immunol.* – 2012. – V. 189(7). – P. 3339-3346.
119. IL-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4<sup>+</sup> IL-7R alpha high memory T cells in chronic colitis / K. Kameyama, Y. Nemoto, T. Kanai et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – V. 40 (9). – P. 2423-2436.
120. IL2/IL21 region polymorphism influences response to rituximab in systemic lupus erythematosus patients / A. Márquez, C.L. Dávila-Fajardo, G. Robledo et al. // *Mol Biol Rep.* - 2013. - V. 40 (8). - P. 4851-4856.
121. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naïve precursors / N. Cieri, B. Camisa, F. Cocchiarella et al. // *Blood.* – 2013. – V. 121. – P. 573–584.
122. IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias / A. Silva, A.B. Laranjeira, L.R. Martins et al. // *Cancer Res.* - 2011. - V. 71 (14). - P. 4780-4789.
123. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells / J.T. Tan, E. Dudl, E. LeRoy et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2001. - V. 98 (15). – P. 8732-8737.
124. IL-7 promotes CD95-induced apoptosis in B cells via the IFN- $\gamma$ /STAT1 pathway [Electronic resource] / S. Sammiceli, V.P. Dang, N. Ruffin et al. // *PLoS One.* - 2011. - Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0028629>
125. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4<sup>+</sup> T cell memory / D.C. Lenz, S.K. Kurz, E. Lemmens et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. - P. 9357–9362.
126. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients / F. Venet, A.P. Foray, A. Villars-Méchin et al. // *J. Immunol.* - 2012. - V. 189 (10). - P. 5073-5081.
127. Implication of IL-2/IL-21 region in systemic sclerosis genetic susceptibility / L.M. Diaz-Gallo, C.P. Simeon, J.C. Broen et al. // *Ann. Rheum. Dis.* - 2013. - V. 72 (7). - P. 1233-1238.

128. In vitro generated human memory-like T cells are CD95 type II cells and resistant towards CD95-mediated apoptosis. / S.C. Fas, S. Baumann, A. Krueger et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2006. – V. 36 (11). - P. 2894-2903.
129. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells / M.A. Cooper, J.E. Bush, T.A. Fehniger et al. // *Blood.* - 2002. - V. 100 (10). - P. 3633-3638.
130. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses / E.S. Halstead, Y.M. Mueller, J.D. Altman et al. // *Nat. Immunol.* - 2002. - V. 3. – P.536-541.
131. Insulin-dependent diabetes induced by pancreatic beta cell expression of IL-15 and IL-15R $\alpha$  / J. Chen, L. Feigenbaum, P. Awasthi et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2013. - V. 110 (33). - P. 13534-13539.
132. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells / T.C. Becker, E.J. Wherry, D. Boone et al. // *J. Exp. Med.* – 2002. – V. 195 (12). – P. 1541–1548.
133. Interleukin 2 receptor  $\gamma$  chain expression on resting and activated lymphoid cells / T. Nakarai, M.J. Robertson, M. Streuli et al. // *J. Exp. Med.* - 1994.- V. 180. – P. 241–251
134. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells / R.M. Kondrack, J. Harbertson, J.T. Tan et al. // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 198 (12). – P. 1797-1806.
135. Interleukin-2 enhances CD4<sup>+</sup> T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells / H. Doms, K. Wolslegel, P. Lin et al. // *J. Exp. Med.* – 2007. - V. 204 (3). – P.547-557.
136. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity / J. Yamanouchi, D. Rainbow, P. Serra et al. // *Nat Genet.* – 2007. – V. 39. – P. 329–337
137. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease / K.K. Hoyer, H. Doms, L. Barron et al. // *Immunol. Rev.* – 2008. - V. 226. – P. 19-28.
138. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation / A. Laurence, C.M. Tato, T.S. Davidson et al. // *Immunity.* – 2007. – V. 26. – P.

- 371–381.
139. Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival / W.Q. Li, Q. Jiang, A.R. Khaled et al. // *J Biol Chem.* – 2004. - V. 279(28). – P. 29160-29166.
  140. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo / K.S. Schluns, W.C. Kieper, S.C. Jameson et al. // *Nat. Immunol.* – 2000. – V. 1 (5). – P. 426-432.
  141. In-vitro characterization of novel and functional regulatory SNPs in the promoter region of IL2 and IL2R alpha in a Gabonese population [Electronic resource] / X. Huang, V. Kühne, J.F. Kun et al. // *BMC Med Genet.* - 2012. - V. 13. - Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/13/117>.
  142. Joly, M. Modeling interleukin-2-based immunotherapy in AIDS pathogenesis / M. Joly, D. Odloak // *J. Theor. Biol.* - 2013. - V. 335. - P. 57-78.
  143. Kaech, S.M. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection / S.M. Kaech, E.J. Wherry // *Immunity.* – 2007. – V. 27(3). – P. 393-405.
  144. Kanegane, H. Activation of naïve and memory T cells by interleukin-15 / H. Kanegane, G. Tosato // *Blood.* – 1996. - V. 88(1). – P. 230-235.
  145. Kincade, P.W. Estrogen regulates lymphopoiesis / P.W. Kincade, K.L. Medina, K.J. Payne // *Menopause at the Millennium.* - 2000. – V. 2. – P.171–174.
  146. Kinetic assessment of general gene expression changes during human naive CD4+ T cell activation / K. Hess, Y. Yang, S. Golech et al. // *International Immunology.* – 2004. - V. 16 (12). - P. 1711–1721.
  147. Kinetics of IL-7 and IL-15 levels after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation following nonmyeloablative conditioning [Electronic resource] / M. De Bock, M. Fillet, M. Hannon et al. // *PLoS One.* - 2013. - V. 8 (2). - Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055876>.
  148. Kovanen, P.E. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways / P.E. Kovanen, W.J. Leonard // *Immunol. Rev.* – 2004. – V.

202. – P. 67-83.
149. Krawczyk, C.M. Functional plasticity in memory T helper cell responses / C.M. Krawczyk, H. Shen, E.J. Pearce // *J Immunol.* - 2007. - V.178. - P.4080–4088.
150. Kristensen, N.N. High numbers of IL-2-producing CD8<sup>+</sup> T cells during viral infection: correlation with stable memory development / N.N. Kristensen, J.P. Christensen, A.R. Thomsen // *J. Gen. Virol.* – 2002. – V. 83. – P. 2123–2133.
151. Leeuwen, E.M. Generation and maintenance of memory CD4<sup>+</sup> T cells / E.M. Leeuwen, J. Sprent, C.D. Surh // *Curr. Opin. Immunol.* - 2009. - V. 21 (2). - P. 167–172.
152. Leonard, W.J. Cytokine receptor signaling pathways / W.J. Leonard, J.X. Lin // *J Allergy Clin Immunol.* – 2000. – V. 105(5). – P. 877-888.
153. Leonard, W.J. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction / W.J. Leonard // *Int. J. Hematol.* - 2001. – V. 73 (3). – P. 271-277.
154. Leung, D. T. Regulation of lymphoid homeostasis by IL-2 receptor signals in vivo / D.T. Leung, S. Morefield, D.M. Willerford // *J. Immunol.* – 2000. - V.164. – P. 3527–3534.
155. Li, J. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells / J. Li, G. Huston, S.L. Swain // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 198(12). – P. 1807-1815.
156. Liao, W. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation / W. Liao, J.X. Lin, W.J. Leonard // *Curr Opin Immunol.*- 2011 - V. 23(5) - P. 598-604.
157. Liao, W. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy / W. Liao, J.X. Lin, W.J. Leonard // *Immunity.* – 2013. – V. 38(1). – P. 13-25.
158. Lin, J.-X. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines / J.-X. Lin, W. J. Leonard // *Oncogene.* – 2000. – V. 19 (21). – P. 2566-2576.
159. Lindemann, M.J. Anti-apoptotic signaling by the interleukin-2 receptor reveals a function for cytoplasmic tyrosine residues within the common gamma (gamma c) receptor subunit / M.J. Lindemann, M. Benczik, S.L. Gaffen // *J Biol Chem.* – 2003. - V. 278(12). – P. 10239-10249.

160. Lynch, K.W. A CD45 Polymorphism Associated with Multiple Sclerosis Disrupts an Exonic Splicing Silencer / K.W. Lynch, A. Weiss // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 24341 – 24347.
161. Lynch, K.W. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system / K.W. Lynch // *Nat. Rev. Immunol.* - 2004. – V. 12. – P. 931–940.
162. Lynch, W.K. A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras / K.W. Lynch, A. Weiss // *Molecular and cellular biology.* - 2000. – V. 20 (1). - P. 70–80.
163. Ma, A. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis / A. Ma, R. Koka, P. Burkett // *Annu Rev Immunol.* - 2006. – V. 24. – P. 657–679.
164. Malek, T.R. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity / T.R. Malek, I. Castro // *Immunity.* - 2010. – V. 33 (2). – P. 153 – 165.
165. Malek, T.R. The biology of interleukin-2 / T.R. Malek // *Annu Rev Immunol.* -2008 - V. 26 - P. 453-479.
166. Malek, T.R. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2 / T.R. Malek, A.L. Bayer // *Nat. Rev. Immunol.* - 2004. - V. 4 (9). - P. 665-674.
167. Markley, J.C. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice / J.C. Markley, M. Sadelain // *Blood.* - 2010. - V. 115 (17). - P. 3508-3519.
168. Marsden, V.S. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more / V.S. Marsden, A. Strasser // *Annu Rev Immunol.* – 2003. – V. 21. P. 71-105.
169. Martinez, M.N. Control of alternative splicing in immune responses: many regulators, many predictions, much still to learn / M.N. Martinez, W.K. Lynch // *Immunological Reviews.* - 2013. - V. 253. – P. 216–236.
170. Mazzucchelli, R. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design / R. Mazzucchelli, S.K. Durum // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – V. 7 (2). – P. 144-154.
171. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors / L.E. Harrington, K.M. Janowski, J.R. Oliver et al. // *Nature.* - 2008. - V. 452. - P. 356-360.
172. Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-

- renewal with long-term hematopoietic stem cells / C.J. Luckey, D. Bhattacharya, A.W. Goldrath et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 2006. – V. 103. – P. 3304—3309.
173. Möröy, T. Growth factor independence 1 (Gfi1) as a regulator of lymphocyte development and activation / T. Möröy, C. Khandanpour // *Semin Immunol.* – 2011. – V. 23(5). – P. 368-378.
174. Motta-Mena, B.L. Context-dependent regulatory mechanism of the splicing factor hnRNP LL / B.L. Motta-Mena, F. Heyd, W.K. Lynch // *Mol. Cell.* – 2010. – V. 37 (2). – P. 223-234.
175. Mustelin, T. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases / T. Mustelin, K. Tasken // *Biochem. J.* - 2003. - V. 371. - P. 15–27.
176. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice / B. Kneitz, T. Herrmann, S. Yonehara et al. // *Eur J Immunol.* – 1995. – V. 25 (9). – P. 2572-2577.
177. O'Connor, A.M. Interleukin-7 enhances memory CD8(+) T-cell recall responses in health but its activity is impaired in human immunodeficiency virus infection / A.M. O'Connor, A.M. Crawley, J.B. Angel // *Immunology.* - 2010. - V. 131 (4). - P. 525-536.
178. Opposing functions of IL-2 and IL-7 in the regulation of immune responses / S.D. Katzman, K.K. Hoyer, H. Dooms et al. // *Cytokine.* – 2011. – V. 56 (1). – P. 116–121.
179. Polymorphic variant at the IL2 region is associated with type 1 diabetes and may affect serum levels of interleukin-2 / M. Fichna, M. Zurawek, P. Fichna et al. // *Mol. Biol. Rep.* - 2013. - V. 40 (12). - P. 6957-6963.
180. Ponchel, F. IL-7 and lymphopenia / F. Ponchel, R.J. Cuthbert, V. Goëb // *Clin. Chim. Acta.* – 2011. – V. 412 (1-2). – P. 7-16
181. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites / K. Julenius, A. Mølgaard, R. Gupta et al. // *Glycobiology.* - 2005. – V. 15 (2). – P. 153 - 164.
182. Preoperative IL-2 immunotherapy enhances tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in gastric cancer patients / F. Romano, G. Cesana, R. Caprotti et al. //

- Hepatogastroenterology. – 2006. – V. 53 (70). – P. 634-638.
183. Prolonged exposure of naïve CD8<sup>+</sup> T cells to interleukin-7 or interleukin-15 stimulates proliferation without differentiation or loss of telomere length / D.L. Wallace, M. Bérard, M.V. Soares et al. // Immunology. – 2006. – V. 119(2). – P. 243-253.
184. Radbruch, A. Cell therapy for autoimmune diseases: does it have a future? / A. Radbruch, A. Thiel // Ann. Rheum. Dis. - 2004. - V. 63. - P. 96—101.
185. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases / M.L. Hermiston, Z. Xu, R. Majeti et al. // J. Clin. Invest. – 2002. – V. 109 (1). – P. 9-14.
186. Recombinant interleukin-7 induces proliferation of naïve macaque CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in vivo / M. Moniuszko, T. Fry, W.P. Tsai et al. // J Virol. – 2004. – V. 78(18). – P. 9740-9749.
187. Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL / S. Oberdoerffer, L.F. Moita, D. Neems et al. // Science. – 2008. – V. 321. – P. 686–691.
188. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice / M.K. Kennedy, M. Glaccum, S.N. Brown et al. // J. Exp. Med. – 2000. – V. 191 (5). – P. 771–780.
189. Reversible senescence in human CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>–</sup> memory T cells / D. Di Mitri, R.I. Azevedo, S.M. Henson et al.// J. Immunol. – 2011. – V. 187. – P. 2093–2100.
190. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study / D.A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer et al. // N. Engl. J. Med. – 2007. – V. 357. – P. 851–862.
191. Rodrigues, R. Genome-wide analysis of alternative splicing during dendritic cell response to a bacterial challenge [Electronic resource] / R. Rodrigues, A.R. Grosso, L. Moita // PLoS One. – 2013. – V. 8 (4). - Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061975>.
192. Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes* / H.-W. Mittrucker, M. Kursar, A. Kohler et al. // J. Immunol. – 2001. – V. 167. – P. 5620-5627.



193. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection / D.J. Shedlock, J.K. Whitmire, J. Tan et al. // *J. Immunol.* - 2003. – V. 170. – P. 2053-2063.
194. Rothrock, C.R. HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer / C.R. Rothrock, A.E. House, K.W. Lynch // *EMBO J.* - 2005. - V. 24 (15). - P. 2792-2802.
195. Saunders, A.E. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45 / A.E. Saunders, P. Johnson // *Cell Signal.* - 2010. - V. 3. - P. 339 – 348.
196. Sayad, A. The association of -330 interleukin-2 gene polymorphism with its plasma concentration in Iranian multiple sclerosis patients [Electronic resource] / A. Sayad, A. Movafagh // *Scientifica (Cairo).* - 2014. – Mode of access: <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/724653/>.
197. Schluns, K.S. Cytokine control of memory T-cell development and survival / K.S. Schluns, L. Lefrancois // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – V. 3. – P. 269–279.
198. Seder, R.A. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation / R.A. Seder, R. Ahmed // *Nat. Immunol.* – 2003. – V. 4 (9). – P. 835-842.
199. Selective expansion of memory CD4(+) T cells by mitogenic human CD28 generates inflammatory cytokines and regulatory T cells / M. Singh, S. Basu, C. Camell et al. // *Eur J Immunol.* – 2008. – V. 38 (6). – P. 1522-1532.
200. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN-gamma in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation / H. Nakamura, K. Komatsu, M. Ayaki et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2000. – V. 106. - S45–50.
201. Shenoy, A.R. IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells / A.R. Shenoy, S. Kirschnek, G. Häcker // *Eur J Immunol.* - 2014. – V. 44(8). – P. 2500-2507.
202. Siefken, R. CD28-mediated activation of resting human T cells without costimulation of the CD3/TCR complex / R. Siefken, R. Kurrle, R. Schwinzer // *Cell Immunol.* – 1997. - V. 176(1). – P. 59-65.

203. Soluble IL-2R $\alpha$  (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice [Electronic resource] / S.E. Russell, A.C. Moore, P.G. Fallon et al. // PLoS One. - 2012. - V. 7 (10). - Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0047748>
204. Soluble Interleukin IL-15R alpha is generated by alternative splicing or proteolytic cleavage and forms functional complexes with IL-15 / E. Bulanova, V. Budagian, E. Duitman et al. // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282 (18). – P. 13167–13179.
205. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins / E. Mortier, A. Quéméner, P. Vusio et al. // J. Biol. Chem. - 2006. - V. 281 (3). - P. 1612-1619.
206. Sprent, J. T cell memory / J. Sprent, C.D. Surh // Annu Rev Immunol. – 2002. – V. 20. – P. 551-579.
207. Stamm, S. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome / S. Stamm // Human Molecular Genetics. – 2002. – V. 11. - №20. – P. 2409 – 2416.
208. Stoniera, S.W. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses / S.W. Stoniera, K.S. Schlunsa // Immunol. Lett. - 2010. - V. 127 (2). - P. 85 – 92.
209. Strasser, A. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system / A. Strasser, P.J. Jost, S. Nagata // Immunity. – 2009. - V. 30 (2) - P. 180-192.
210. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization / A.M. Bilwes, J. den Hertog, T. Hunter et al. // Nature. - 1996. - V. 382. - P. 555-559.
211. Structural study of the sugar chains of human leukocyte common antigen CD45 / T. Sato, K. Furukawa, M. Autero et al. // Biochemistry. - 1993. - V. 32 (47). - P. 12694 - 12704.
212. Study of T cell subsets and IL-7 protein expression in HIV-1-infected

- patients after 7 years HAART / C. Shou, N. Weng, Y. Jin et al. // *Eur. J. Med. Res.* - 2011. - V. 16 (11). - P. 473-479.
213. Surh, C.D. Homeostasis of Naive and Memory T Cells / C.D. Surh, J. Sprent // *Immunity*. - 2008. - V. 29 (6). - P. 848 - 862.
214. Symons, A. Domain organisation of the extracellular region of CD45 / A. Symons, A.C. Willis, A.N. Barclay // *Protein Eng.* - 1999. - V. 12. - P. 885 - 892.
215. Targeting T cell-specific costimulators and growth factors in a model of autoimmune hemolytic anemia / K.K. Hoyer, K. Wolslegel, H. Doms et al. // *J. Immunol.* - 2007. - V. 179. - P. 2844-2850.
216. T-cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation [Electronic resource] / B.E. Russ, J.E. Prier, S. Rao et al. // *Front Genet.* - 2013. - V. 4. - Mode of access: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fgene.2013.00218/full>.
217. T-cell vaccination in multiple sclerosis relapsing-remitting nonresponders patients / A. Achiron, G. Lavie, I. Kishner et al. // *Clin. Immunol.* - 2004. - V. 113 (2). - P. 155-160.
218. T-cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion / M. Huse, B.F. Lillemeier, M.S. Kuhns et al. // *Nat. Immunol.* - 2006. - V. 7 (3). - P. 247-255.
219. TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4+ T cell subsets induced by cytokines. / J. Geginat, S. Campagnaro, F. Sallusto et al. // *Adv Exp Med Biol.* - 2002. - V. 512. - P. 107-112.
220. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses / L. McNeill, R.J. Salmond, J.C. Cooper et al. // *Immunity*. - 2007. - V. 27 (3). - P. 425-437.
221. The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells / W.E. O'Gorman, H. Doms, S.H. Thorne et al. // *J. Immunol.* - 2009. - V. 183 (1). - P. 332-339.
222. The interleukin-7 receptor  $\alpha$  chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis / J. Haas, M. Korporal, A. Schwarz et al. // *Eur. J. Immunol.* - 2011. - V. 41 (3). - P. 845-853.
223. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling

- during the development and activation of NK cells / A. Marçais, J. Cherfils-Vicini, C. Viant et al. // *Nat. Immunol.* - 2014. – V. 15 (8). - P. 749-757.
224. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes / A.B. Stittrich, C. Haftmann, E. Sgouroudis et al. // *Nat Immunol.* – 2010. – V. 11(11). – P. 1057-1062.
225. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells / N.L. Alves, I.A. Derks, E. Berk et al. // *Immunity.* – 2006. – V. 24(6). – P. 703-716.
226. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis / A. Krueger, S.C. Fas, S. Baumann et al. // *Immunol Rev.* – 2003. - V. 193. – P. 58-69.
227. The role of the common cytokine receptor gamma-chain in regulating IL-2-dependent, activation-induced CD8+ T cell death / Z. Dai, A. Arakelov, M. Wagener et al. // *J Immunol.* – 1999. – V. 163(6). – P. 3131-3137.
228. The structure of the interleukin-15 alpha receptor and its implications for ligand binding / I. Lorenzen, A.J. Dingley, Y. Jacques et al. // *Biol. Chem.* – 2006. – V. 281 (10). - P. 6642-6647.
229. Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo / J.N. Blattman, J.M. Grayson, E.J. Wherry et al. // *Nat Med.* – 2003. – V. 9(5). – P. 540-547.
230. Tong, A. Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons / A. Tong, J. Nguyen, K.W. Lynch // *The journal of biological chemistry.* – 2005. - V. 280 (46) – P. 38297–38304.
231. Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4+CD25+ regulatory T cell function / G. Garg, J.R. Tyler, J.H. Yang et al. // *J. Immunol.* - 2012. - V. 188 (9). - P. 4644-4653.
232. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death / L. Van Parijs, Y. Refaeli, J.D. Lord et al // *Immunity.* – 1999. – V. 11(3). – P. 281-288.
233. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death / L. Van Parijs, Y. Refaeli, J.D. Lord et al.

- // Immunity. – 1999. – V. 11 (3). – P. 281-288.
234. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells / S. Kirchhoff, W.W. Muller, M. Li-Weber et al. // Eur. J. Immunol. – 2000. – V. 30. – P. 2765-2774.
235. Van der Meer, L.T. Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis / L.T. van der Meer, J.H. Jansen, B.A. van der Reijden // Leukemia. – 2010. – V. 24(11). – P. 1834-1843.
236. Van Leeuwen, E.M. Generation and maintenance of memory CD4(+) T cells / E.M. Van Leeuwen, J. Sprent, C.D. Surh // Curr. Opin. Immunol. — 2009. — Vol. 21 (2). — P. 167–172.
237. Vogel, A. 77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link / A. Vogel, C.P. Strassburg, M.P. Manns // Genes Immun. - 2003. - V. 4 (1). - P. 79-81.
238. Waldmann, T.A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design / T.A. Waldmann // Nat Rev Immunol. – 2006. – V. 6 (8). – P. 595–601.
239. Wang, X. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma c receptors / X. Wang, M. Rickert, K.C. Garcia // Science. – 2005. – V. 310 (5751). – P. 1159-1163.
240. Whistler, T. The comparison of different pre- and post-analysis filters for determination of exon-level alternative splicing events using Affymetrix arrays / T. Whistler, C.F. Chiang, J.M. Lin // Journal of Biomolecular Techniques. – 2010. – V. 21 (1). – P. 44-53.
241. Williams, M.A. Shortening the infectious period does not alter expansion of CD8 T cells but diminishes their capacity to differentiate into memory cells / M.A. Williams, M.J. Bevan // J Immunol. – 2004. - V. 173(11). – P. 6694-6702.
242. Williams, M.A. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells / M.A. Williams, A.J. Tyznik, M.J. Bevan // Nature. – 2006. – V. 441. – P. 890–893.
243. Wilson, E.B. Cutting edge: CD4+ T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8+ T cell responses / E.B. Wilson, A.M. Livingstone // J. Immunol. – 2008. – V. 181. – P. 7445–7448.

244. Woollett, G.R. Visualization by low angle shadowing of the leucocyte-common antigen. A major cell surface glycoprotein of lymphocytes / G.R. Woollett, A.F. Williams, D.M. Shotton // *EMBO J.* - 1985. - V. 4. - P. 2827 - 2830.
245. Xu, Z. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms / Z. Xu, A. Weiss // *Nat. Immunol.* – 2002. – V. 3 (8). – P. 764-771.
246. Xue, H.-H. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor  $\alpha$  chain expression in activated T lymphocytes / H.-H. Xue, P. E. Kovanen, C. A. Pise-Masison // *PNAS.* – 2002. – V.99 (21). – P.13759-13764.
247. Zeitlin, A.A. Genetic developments in autoimmune thyroid disease: an evolutionary process / A.A. Zeitlin, M.J. Simmonds, S.C. Gough // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 2008. – V. 68. – P. 671–682.
248.  $\gamma$ -chain required for naive CD4<sup>+</sup> T-cell survival but not for antigen proliferation / O. Lantz, I. Grandjean, P. Matzinger et al. // *Nature Immunol.* – 2000. - V.1. – P. 54–58.
249.  $\gamma$ -chain required for naive CD4<sup>+</sup> T-cell survival but not for antigen proliferation / O. Lantz, I. Grandjean, P. Matzinger et al. // *Nature Immunol.* - 2000. – V. 1. – P. 54–58.