

## ГЕНОМИКА

УДК 577.218

### ЦИТОКИНОПОСРЕДОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ Gf1 и U2af114 АКТИВИРОВАННЫМИ Т-КЛЕТКАМИ С РАЗНЫМ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫМ СТАТУСОМ *IN VITRO*

К.А. Юрова, Н.А. Сохоневич, О.Г. Хазиахматова, Л.С. Литвинова\*

Балтийский федеральный университет имени И. Канта,  
236016, Калининград, ул. Боткина, 3; тел.: 8(4012)-595595/6631; эл. почта: larisalitvinova@yandex.ru

На рестимулированные CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки, подвергнутые антиген-независимой активации, эти цитокины в целом оказывали однонаправленное действие. Дозозависимое подавление экспрессии гена U2af114 и увеличение экспрессии Gf1 может свидетельствовать об образовании активных форм рецептора CD45 и ограничении формирования низкомолекулярных коротких сплайс-вариантов рецептора CD45RO. В условиях антиген-независимой стимуляции наивных CD45RA<sup>+</sup>-клеток, действие rIL-7 и IL-15 на экспрессию генов U2af114 и Gf1 носит разнонаправленный характер. Увеличение концентрации IL-7 в среде инкубации наивных клеток сопровождается снижением экспрессии обоих генов. Эффекты IL-15 противоположны действию IL-7. Цитокины, имеющие общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7 и IL-15), предотвращают антиген-независимую дифференцировку наивных Т-клеток, препятствуя образованию поликлональных “суррогатных” клеток. В целом, исследование механизмов молекулярно-генетического контроля, обеспечивающих процессы гомеостаза Т-клеток в ответ на воздействие антигенной и не антигенной природы, может иметь важное значение при построении общей модели дифференцировки и самоподдержания иммунокомпетентных клеток.

**Ключевые слова:** цитокины, экспрессия генов, Т-клетки, активация, альтернативный сплайсинг

**DOI:** 10.18097/PBMC20166202180

## ВВЕДЕНИЕ

Цикл функциональных изменений, происходящих в ответ на антигенную стимуляцию Т-клеток, требует изменения экспрессии множества белков. Альтернативный сплайсинг является основным механизмом регуляции экспрессии генов, посредством которого можно получить несколько уникальных мРНК из одного гена с помощью избирательного включения или исключения экзонов [1]. Современные исследования показывают, что первичные транскрипты почти 95% всех генов человека подвергаются альтернативному сплайсингу; среди них преобладают транскрипты генов, экспрессирующиеся в клетках нервной и иммунной систем [2, 3]. Важность регуляции альтернативного сплайсинга у человека наглядно иллюстрирует ген Prrc, пре-мРНК которого состоит из 33 экзонов и кодирует общий лейкоцитарный рецептор CD45 [4, 5]. Молекула CD45 – трансмембранная тирозиновая протеинфосфатаза, признана критическим регулятором сигнализации, опосредованной Т-клеточным рецептором (TCR) [6, 7]. Встречающиеся в природе полиморфизмы в гене CD45 коррелируют с восприимчивостью к широкому спектру аутоиммунных заболеваний, вирусных инфекций и тяжелых иммунодефицитов человека, в частности, к рассеянному склерозу и ВИЧ-инфекции [8]. Один из механизмов, регулирующих альтернативный сплайсинг гена Prrc, основан на противоположном действии факторов сплайсинга U2af114 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4, U2af114) и транскрипции Gf1 (growth factor independent 1). Это, в конечном итоге, определяет образование

разных изоформ молекулы CD45 и активацию Т-клеток во время иммунного ответа [9, 10]. Различные изоформы CD45 по-разному влияют на функцию Т-клеток за счёт разницы в их способности взаимодействовать с лигандом, между собой или с TCR [11].

Цитокины семейства I типа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), имеющие общую  $\gamma$ -цепь, способны оказывать комплексное воздействие на клеточный гомеостаз Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки [12-14]. В представленной работе изучено влияние цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7 и IL-15), на изменение уровней мРНК генов Gf1 и U2af114, которые определяют соотношение основных вариантов рецептора CD45 в клеточных культурах, имеющих разную степень дифференцировки: наивных Т-лимфоцитах (CD45RA<sup>+</sup>) и Т-клетках памяти (CD45RO<sup>+</sup>), полученных от здоровых доноров.

## МЕТОДИКА

Материалом для исследования служила венозная кровь 20 условно-здоровых доноров (9 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 19 до 39 лет. Кровь забирали с помощью стандартных вакуумных систем “Vacurette” (“Greiner-bio-one”, Австрия) с гепарином.

Популяцию наивных и примированных лимфоцитов получали из выделенных ранее мононуклеарных клеток (МНК) методом иммуномагнитной сепарации с использованием парамагнитных частиц с моноклональными антителами

к CD45RO+ и CD45RA+ (MACS CD45RO Microbeads, human, "Miltenyi Biotec", Германия) и сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument ("Miltenyi Biotec") в соответствии с протоколом производителя.

Чистоту выделенных клеток (CD45RA+, CD45RO+) определяли с помощью моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE) ("Abcam", Великобритания). Процент позитивных клеток определяли на проточном цитофлуориметре "MACSQuantAnalyzer" ("MiltenyiBiotec"). Содержание целевой фракции CD45RA+ и CD45RO+-клеток в исследуемых образцах составляло не менее 98%.

Отсутствие примесей моноцитов (CD14+) и В-лимфоцитов (CD19+) в культурах CD45RA+- и CD45RO+-клеток до и после культивирования подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PE-Cy7 и PerCP ("Abcam" и "e-Bioscience", США). Анализ поверхностных маркеров проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant ("Miltenyi Biotec"), согласно протоколам производителей. Использовали клеточные культуры, содержание CD3+CD45RA+CD14-CD19- и CD3+CD45RO+CD14-CD19-клеток в которых составляло в среднем 98,1±1,12%.

Количество живых и мертвых клеток в культурах CD45RO+ и CD45RA+ лимфоцитов, а также динамику изменения количества клеток в мл до и после культивирования определяли методом проточной лазерной двухцветной цитометрии, на проточном цитофлуориметре Guava EasyCite Plus с использованием реагента и программы Guava ViaCount ("Millipore", США).

CD45RA+- и CD45RO+-клетки ( $1 \times 10^6$  кл/мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова ("Sigma", США), содержащей 0,5% сывороточный альбумин человека ("Микроген", Россия),  $5 \times 10^{-5}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанола ("Acros Organics", США) и 30 мкг/мл гентамицин, в присутствии различных концентраций рекомбинантных форм цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) ("Miltenyi Biotec") в разных концентрациях или без них (контроль) в течение 48 ч при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) ("Miltenyi Biotec"), который представляет собой анти-биотиновые MACSiBead™ частицы с биотинилированными антителами против CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> человека. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали  $0,5 \times 10^6$  анти-биотиновых MACSiBead™ частиц. Соотношение клеток и активирующих частиц составило 1:2.

Использовали следующие варианты культивирования: 1) интактная проба; 2) проба с добавлением Ac/Exp; 3) пробы с добавлением Ac/Exp 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 Ac/Exp 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 Ac/Exp и rIL-15  $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл).

После инкубации клеточных культур выделяли тотальную РНК с использованием водного раствора фенола и гуанидин-изотиоцианата (ExtractRNA kit "Евроген", Россия), согласно протоколу производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus ("GE Healthcare", США). Степень очистки препаратов РНК оценивали спектрофотометрически по соотношению оптических плотностей, измеренных при длинах волн 260 нм и 280 нм ( $A_{260}/A_{280}$ ). 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. Обратную транскрипцию проводили на полученных образцах проводили с использованием набора реагентов MMLV RT kit ("Евроген"). кДНК синтезировали согласно протоколу производителя. В качестве затравки использовали олигонуклеотидный праймер (oligo(dT23), 20 мкМ).

Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили мультиплексный анализ ПЦР с использованием специфичного зонда TaqMan ("Евроген"). ПЦР проводили с использованием реагентов qPCRmixHS ("Евроген") и 10 пМ праймеров. В качестве матрицы использовали 3 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген GAPDH.

Олигонуклеотидные праймеры синтезировали с помощью фосфорамидитного метода на синтезаторе ДНК/РНК модели AMS2000 ("Биоссет", Россия) с использованием реагентов компании "Glen Research" (США). Праймеры очищали методом обращено-фазовой хроматографии на установке для очистки олигонуклеотидов (модель OPS1000, "Биоссет"). В работе также использовали зонды TaqMan ("Евроген") и следующие олигонуклеотидные праймеры:

GFI1\_for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'  
GFI1\_rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'  
GFI1\_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTG-  
ACTGTA-3'~BHQ-1 (зонд)  
U2af114\_for 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3'  
U2af114\_rev 5'-CAAGGTTGTGCGACACATTC-3'  
U2af114\_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTCA-  
GAACTGCA-3'~BHQ-1 (зонд)  
GAPDH\_for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'  
GAPDH\_rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'  
GAPDH\_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCA-  
GCC-3'~BHQ-1 (зонд)

Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью on-line программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

ПЦР-реакцию проводили в трёх повторах с использованием амплификатора LightCycler 480 Real-Time PCR ("Roche", Швейцария) в следующем режиме: 95°C, 5 мин; 95°C, 20 с; 60°C, 30 с; 72°C, 60 с – 55 циклов, 72°C, 5 мин. При анализе кривой плавления температуру плавления продукта амплификации определяли индивидуально для каждой пары праймеров, при анализе кривой плавления.

Расчёты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации. В нашем случае эффективность реакции (E) была равна 2.

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

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

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием пакета статистических программ SPSS\_20. Для количественных показателей рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Сравнительный анализ выполняли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

Все здоровые доноры (добровольцы) дали информированное согласие на исследование; авторы декларируют отсутствие двойственности (конфликта) интересов, связанных с рукописью.

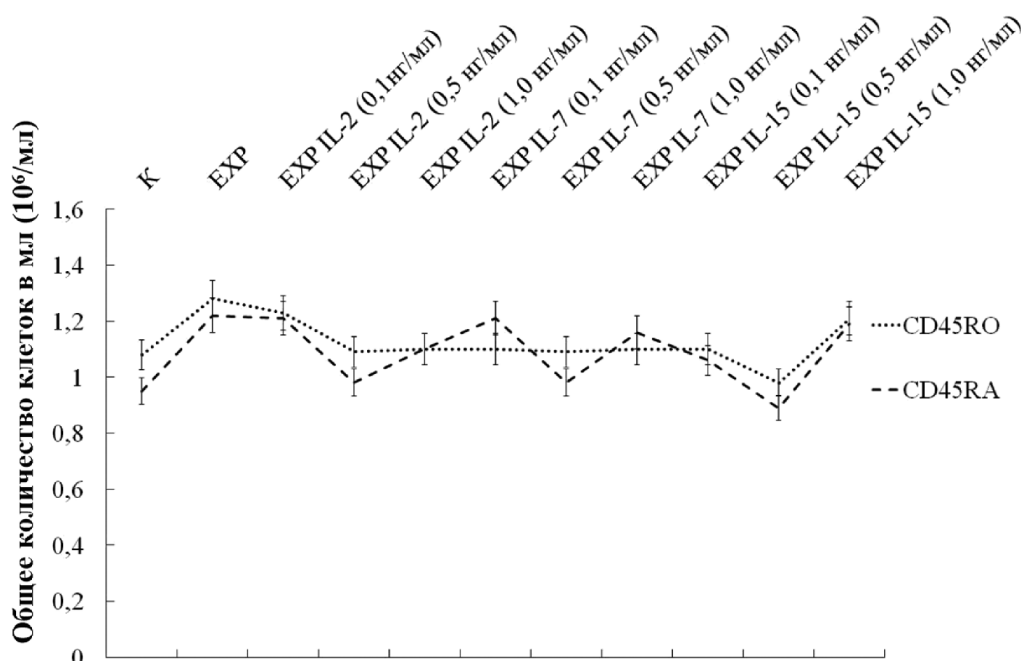
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общее количество клеток в интактных культурах CD45RA<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов после окончания срока культивирования (48 ч) составляло

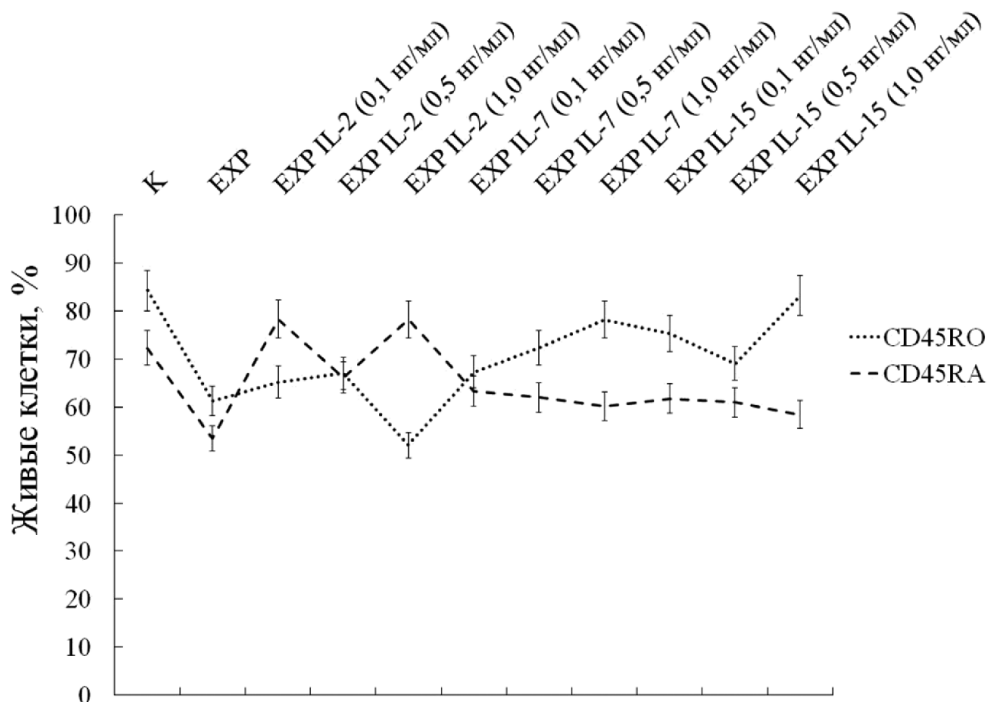
в среднем  $(1,08 \pm 0,09) \times 10^6$  кл/мл. Инкубация Т-лимфоцитов с активатором Ас/Ехр, имитирующим действие антиген-презентирующих клеток (АПК), сопровождалась повышением числа клеток в культурах CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, в среднем на 22% (рис. 1). Анализ жизнеспособности лимфоцитов показал, что инкубация культур CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток с активатором Ас/Ехр приводила к статистически значимому уменьшению числа живых лимфоцитов по сравнению с интактной пробой. В большей степени активатор снижал жизнеспособность CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток (в среднем на 25%) (рис. 2). Такое снижение может быть следствием активационного апоптоза, развивающегося наряду с усилением пролиферативной реакции [10, 15, 16].

Максимальная концентрация rIL-2 обладала разнонаправленным действием на жизнеспособность активированных Ас/Ехр CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток: снижала количество CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток (на 20%) и повышала число живых CD45RA<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (в 1,5 раза) по сравнению с пробой только с добавлением активатора.

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 [17]. Сведения, касающиеся роли IL-2 в клональной экспансии примированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в условиях *in vivo* неоднозначны [11, 13]. В основном авторы указывают на участие IL-2 в этом процессе за счёт индукции апоптотической



**Рисунок 1.** Общее количество клеток (в мл) в культурах CD45RA<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации. К - количество клеток в мл в контрольной пробе; EXP - с Т-клеточным активатором; EXP IL-2-0,1-0,5-1,0 - 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); EXP IL-7-0,1-0,5-1,0 - 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); EXP IL-15-0,1-0,5-1,0 - 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 2.** Содержание живых клеток (%) в культурах CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации. К - количество клеток в мл в контрольной пробе; Exp - с Т-клеточным активатором; Exp IL2-0,1-0,5-1,0 - в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и rIL-2 (0,1×10<sup>-9</sup> г/мл; 0,5×10<sup>-9</sup> г/мл; 1,0×10<sup>-9</sup> г/мл); Exp IL7-0,1-0,5-1,0 - в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и rIL-7 (0,1×10<sup>-9</sup> г/мл; 0,5×10<sup>-9</sup> г/мл; 1,0×10<sup>-9</sup> г/мл); Exp IL15-0,1-0,5-1,0 - в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и rIL-15 (0,1×10<sup>-9</sup> г/мл; 0,5×10<sup>-9</sup> г/мл; 1,0×10<sup>-9</sup> г/мл).

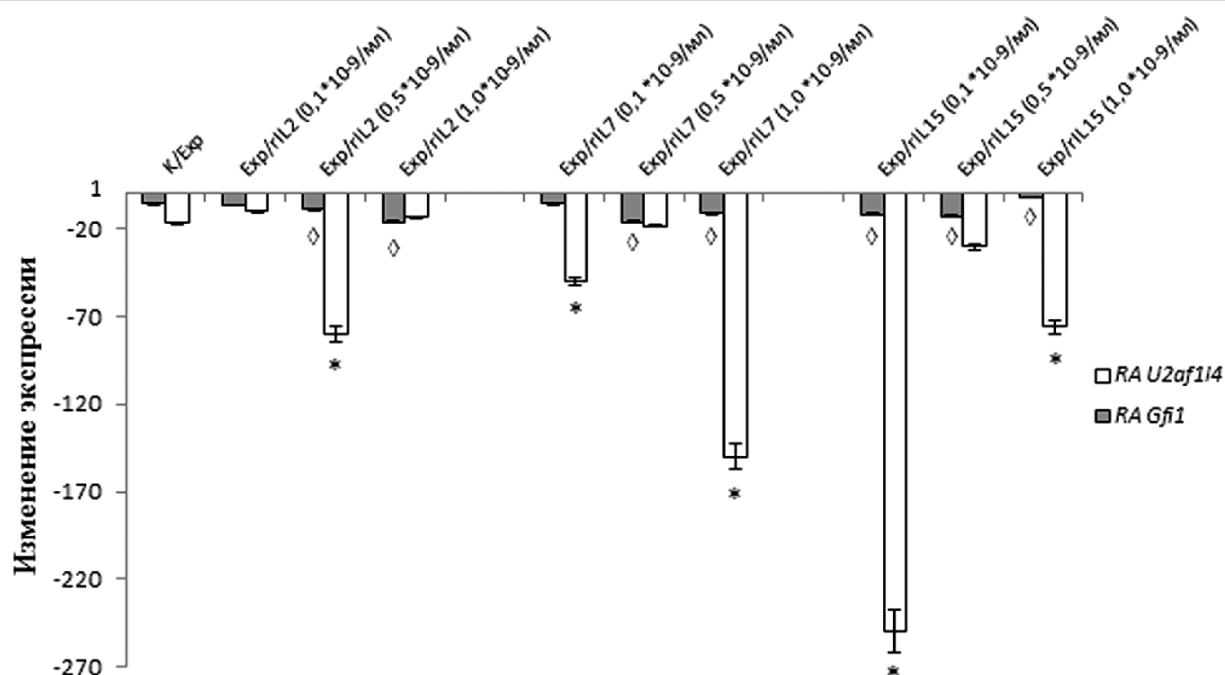
гибели примированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток [13]. Установлено, что для реализации индуцирующего апоптоз эффекта rIL-2 на лимфоциты крови в условиях *in vitro* необходим определённый порог концентрации цитокина. IL-2 обладает способностью усиливать экспрессию таких проапоптотических белков как TRAIL, каспаза-3, DAP (death-associated protein) и STK 17B (серин/треониновая киназа 17B) [18].

Добавление rIL-7 и rIL-15 в максимальной концентрации (1×10<sup>-9</sup> г/мл) в культуру активированных Т-клеток разной степени дифференцировки, увеличивало количество живых CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (по сравнению с пробами, в которые добавляли только активатор, в среднем на 20%). Полученные результаты согласуются с биологической ролью IL-7 и IL-15 в гомеостазе Т-клеток и находят частичное подтверждение в литературе. Выживание и гомеостатическая пролиферация Т-клеток памяти *in vivo* после элиминации патогена, определяется наличием в микроокружении цитокинов: IL-2, IL-7 и IL-15 [19] и не зависит от взаимодействия их рецепторных структур с продуктами главного комплекса гистосовместимости МНС I (для CD8<sup>+</sup>) и МНС II (для CD4<sup>+</sup>) класса [20-22]. Наивные покоящиеся Т-клетки получают сигналы низкого уровня через контакт с IL-7 и молекулами МНС, которые позволяют клеткам выживать в течение длительного времени в состоянии покоя, не подвергаясь антигеннезависимой дифференцировке [13, 15, 20, 23].

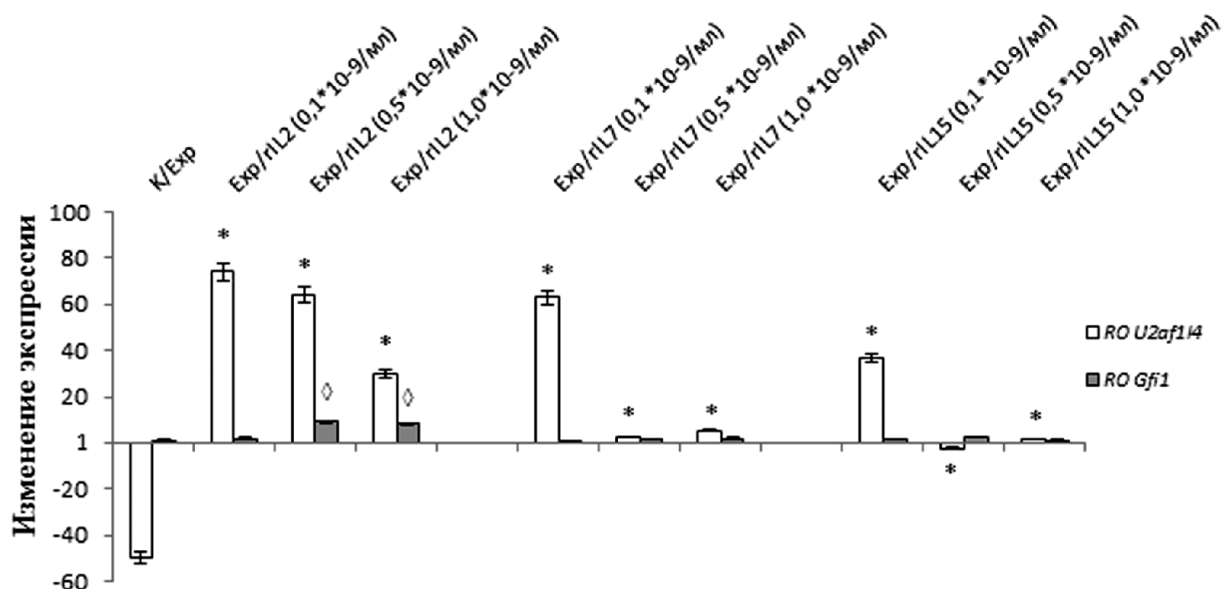
Альтернативный сплайсинг является одним из механизмов регуляции генной активности

клеток врождённого и адаптивного иммунитета [24]. Как уже упоминалось ранее, антагонистические взаимодействия факторов, кодируемых *U2AF114* и *Gfi1*, регулируют альтернативный сплайсинг трансмембранной тирозин-фосфатазы CD45, что в конечном итоге, определяют образование разных изоформ CD45 и антиген-зависимую активацию Т-клеток [9, 10]. Экспрессия изоформ рецептора CD45 в иммунокомпетентных клетках строго контролируется в течение их развития, дифференцировки и активации. Наивные Т-лимфоциты экспрессируют, преимущественно длинные, высокомолекулярные изоформы CD45 (CD45RA), тогда как активированные (примированные) Т-клетки памяти — короткий сплайс-вариант CD45 (CD45RO), с которым связывают более быструю и эффективную активацию, опосредованную антигеном [9, 10, 25].

Добавление Т-клеточного активатора в культуры CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток сопровождалось резко выраженным, особенно в популяции CD45RO<sup>+</sup> (более чем в 50 раз), угнетением экспрессии *U2af114* (рис. 3,4). Уровень транскрипции гена *Gfi1* у примированных Т-клеток (CD45RO<sup>+</sup>) был сопоставим с контролем, а у наивных Т-клеток, напротив, снижался более чем в 16 раз. На наш взгляд, выявленные изменения — угнетение транскрипции *U2af114* в культурах активированных Т-клеток разной степени дифференцировки после окончания срока инкубации (48 ч), сопряженные с активацией пролиферации, характерны для образования переходных, активных форм CD45 рецептора.



**Рисунок 3.** Относительное изменение уровня транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RA+ Т-клетках под влиянием активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) (кратность); К/Exp - отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных пробах (без воздействия) и проб с добавлением Т-клеточного активатора (Exp); Exp IL2-0,1-0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах 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); Exp IL7-0,1-0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах 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); Exp IL15-0,1-0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах 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). Здесь и на рисунке 4: \* - достоверность различий экспрессии гена *U2af114* по сравнению с пробой К/Exp; ◇ - достоверность различий экспрессии гена *Gfi1* по сравнению с пробой К/Exp. Снижение уровней экспрессии (fold change) исследуемых генов продемонстрировано с использованием отрицательных значений. К примеру, если относительный уровень экспрессии гена *U2af114* равен 0,02 (меньше 1), значит транскрипция этого гена снижена по сравнению с интактной группой, в 50 раз.



**Рисунок 4.** Относительное изменение уровня транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RO+ Т-клетках под влиянием активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) (кратность). К/Exp - отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и образцов, с добавлением Т-клеточного активатора (Exp); Exp IL2-0,1-0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах 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); Exp IL7-0,1-0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах 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); Exp IL15-0,1-0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах 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).

Heud и соавт. [9] показали, что угнетение транскрипции U2af114 способствует образованию активных форм молекулы CD45, а угнетение транскрипции Gfi1 приводит к формированию более коротких вариантов транскрипта гена *Ptprc*.

Наряду с угнетением экспрессии мРНК гена U2af114 (в случае CD45RA+ Т-лимфоцитов), подавление экспрессии Gfi1 может быть связано как с низкой чувствительностью наивных Т-клеток к антиген-независимым стимулам, так и с длительностью культивирования Т-клеточных культур. Через 24-72 ч после стимуляции в Т-клетках существенно активируется экспрессия гена фактора сплайсинга U2AF26, в то время как максимальная индукция синтеза белка Gfi1 (с образованием различных изоформ) наблюдается через 6–12 ч и полностью отсутствует на третьи сутки [9]. Полученные нами ранее результаты на 48 ч культуре моноклеарных лейкоцитов крови (МНК) демонстрируют активацию транскрипции U2af114, и, напротив, подавление его антагониста – Gfi1 [10].

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). При добавлении в культуру наивных CD45RA+ лимфоцитов комбинаций Exp/rIL-2, наряду с ростом количества клеток и увеличением их жизнеспособности, наблюдалось дозозависимое, но разнонаправленное угнетение экспрессии мРНК обоих генов – U2af114 и Gfi1. С увеличением действующей концентрации цитокина уменьшалась транскрипция гена U2af114, и, напротив, увеличивалась транскрипция гена Gfi1, что может косвенно свидетельствовать об образовании активных промежуточных вариантов сплайсинга рецептора CD45 (рис. 3).

Угнетающим эффектом на активированные наивные клетки обладал также IL-7, который вызывал одновременное снижение экспрессии мРНК генов U2af114 и Gfi1. При этом наибольшее угнетение экспрессии генов U2af114 и Gfi1 отмечено при инкубации наивных клеток с концентрацией rIL-7 ( $0,5 \times 10^9$  г/мл). Действие IL-15 было противоположным действию IL-2 и IL-7: с увеличением концентрации IL-15, экспрессия обоих генов увеличивалась, не достигая, однако значений активированных контрольных проб (только с добавлением активатора). Значимое угнетение экспрессии гена Gfi1 в активированных наивных Т-клетках под действием цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь, по-видимому, можно связать как с эффектами самих цитокинов, оказывающих влияние больше на поддержание жизнеспособности и гомеостатической пролиферации, нежели на активацию наивных Т-клеток, так и с длительностью инкубации клеточных культур (48 ч) [10]. В целом, цитокины, имеющие общую  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-7 и IL-15), предотвращают антиген-независимую дифференцировку наивных Т-клеток, препятствуя образованию "суррогатных" клеток.

Дозопосредованные эффекты IL-2 на рестимулированные CD45RO+ Т-клетки

были ассоциированы с их повышенной гибелью и сопровождалась угнетением экспрессии U2af114 с одновременным повышением транскрипции гена Gfi1, ответственного за образование активных промежуточных вариантов сплайсинга рецептора CD45. Аналогичным действием на активированные CD45RO+ клетки обладали IL-7 и IL-15: максимальное повышение экспрессии гена U2af114 отмечено при добавлении минимальных концентраций цитокинов, динамика изменений транскрипции мРНК гена Gfi1 была незначительной по сравнению с контролем (рис. 4).

Согласно данным литературы, изоформа CD45RO со временем может замещаться исходным вариантом CD45RA. Однако, как уже упоминалось, при повторной стимуляции клеток происходит образование устойчивых конечных изоформ CD45RO [15, 25, 26], чему способствуют низкие концентрации цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь; тогда как повышение концентрации цитокинов в культурах активированных Т-лимфоцитов памяти, напротив, опосредуют активацию и пролиферацию иммунокомпетентных Т-клеток [14].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, безусловно, является механизмом обратной связи для поддержания Т-клеточного гомеостаза. Полученные нами результаты нуждаются в дальнейшем изучении и дополнении. Несмотря на доказательства того, что изменение регуляции альтернативного сплайсинга значимы во время иммунного ответа и могут критически влиять на клеточную функцию, до сих пор нет систематического исследования, позволяющего определить полный спектр генов, регулируемых на уровне альтернативного сплайсинга в ответ на воздействие антигенной и не антигенной природы.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (конкурс молодых российских учёных – докторов наук № МД-4999.2012 и стипендия Президента Российской Федерации молодым учёным и аспирантам СП-454.2013.4), а также в рамках субсидии на выполнение государственной работы "Организация проведения научных исследований" (№603).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Stamm S. (2002) Human Molecular Genetics, **20**, 2409-2416.
2. Ip J.Y., Tong A., Pan Q., Topp J.D., Blencowe B.J., Lynch K.W. (2007) RNA, **4**, 563-572.
3. Rodrigues R., Grosso A.R., Moita L. (2013) PLoS One, **4**.
4. Tong A., Nguyen J., Lynch K.W. (2005) J. Biol. Chem., **46**, 38297-38304.
5. Wu Z., Yates A.L., Hoyne G.F., Goodnow C.C. (2010) J. Immunol., **1**, 231-223.
6. Mustelin T., Tasken K. (2003) Biochem. J., **371**, 15-27.
7. Saunders A.E., Johnson P. (2010) Cell Signal, **3**, 339-348.

8. Evsyukova I., Somarelli A.J., Gregory G.S., Garcia-Blanco M.A. (2010) RNA Biology, **4**, 462-473.
9. Heyd F., ten Dam G., Mörry T. (2006) Nat. Immunol., **8**, 859-867.
10. Litvinova L.S., Mazunin I.O., Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Kofanova K.A. (2013) Mol. Biol., **47**, 474-476.
11. Lynch W.K., Weiss A. (2000) Mol. Cell. Biol., **20**, 70-80.
12. Lantz O., Grandjean I., Matzinger P., Di Santo J.P. (2000) Nat. Immunol., **1**, 54-58.
13. Schluns K.S., Lefrançois L. (2003) Immunology, **4**, 269-279.
14. Litvinova L.S., Sokhnevich N.A., Gutsol A.A., Kofanova K.A. (2013) Cell and Tissue Biology, **7**, 539-544.
15. Ярилин А.А. (2010) Иммунология, Гэотар-Медиа М.
16. Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Селедцов В.И., Литвинова Л.С. (2013) Бюлл. экпер. биол. мед., **155**, 468-470.
17. Benczik M., Gaffen S.L. (2004) Immunol. Invest., **2**, 109-142.
18. Kovanen P.E., Young L., Al-Shami A., Rovella V., Pise-Masison C.A., Radonovich M.F., Powell J., Fu J., Brady J.N., Munson P.J., Leonard W.J. (2005) Int. Immunol., **8**, 1009-1021.
19. Ma A., Koka R., Burkett P. (2006) Annu. Rev. Immunol., **24**, 657-679.
20. Boyman O., Purton J.F., Surh C.D., Sprent J. (2007) Curr. Opin. Immunol., **3**, 320-326.
21. Singh M., Basu S., Camell C., Couturier J., Nudelman R.J., Medina M.A., Rodgers J.R., Lewis D.E. (2008) Eur. J. Immunol., **6**, 1522-1532.
22. Tanel A., Fonseca S.G., Yassine-Diab B., Bordi R., Zeidan J., Shi Y., Benne C., Sékaly R.P. (2009) Expert Rev. Vaccines, **3**, 299-312.
23. Le Campion A., Pommier A., Delpoux A., Stouvenel L., Auffray C., Martin B., Lucas B. (2012) J. Immunol., **7**, 3339-3346.
24. De Arras L., Alper S. (2013) PLoS Genet. 10:e1003855.
25. Селедцов В.И., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г., Шуплецова В.В., Селедцов Д.В., Гуцол А.А., Селедцова И.А. (2010) Цитокины и воспаление, **4**, 9-15.
26. Martinez M.N., Lynch W.K. (2013) Immunol. Rev., **1**, 216-236.

Поступила: 07. 07. 2014.  
Принята к печати: 19. 09. 2014.

# CYTOKINE-MEDIATED REGULATION OF EXPRESSION OF Gfi1 AND U2af114 GENES ACTIVATED BY T-CELLS WITH DIFFERENT DIFFERENTIATION STATUS *IN VITRO*

K.A. Yurova, N.A. Sokhnevich, O.G. Khaziakhmatova, L.S. Litvinova

Kant Baltic Federal University,  
3 Botkina str., Kaliningrad, 236000 Russia; tel.: 8(4012)-595595/6631; e-mail: larisalitinova@yandex.ru

The dose-dependent effects of cytokines (IL-2, IL-7, and IL-15), which have a common  $\gamma$ -chain, on mRNA expression of U2af114 and Gfi1 genes involved in regulation of alternative splicing of the Ptpcr gene, have been investigated in vitro using T-lymphocyte cultures with different degrees of differentiation. IL-2, IL-7, and IL-15 caused a similar unidirectional inhibitory effect of various severity on restimulated CD45RO+ T-cells exposed to an antigen-independent activation; they caused a dose-dependent decrease of the U2af114 gene expression, and an increase of Gfi1 gene expression. This may suggest formation of active forms of the CD45 receptor, and also limitation of the formation of low-molecular short splice variants of the CD45RO receptor. Under conditions of antigen-independent stimulation of naive CD45RA+cells rIL-7 and IL-15 exhibited opposite effects on U2af114 and Gfi1 gene expression. The increase of IL-7 concentrations in the incubation medium of naive cells was accompanied by a decrease in expression of both genes. IL-15 IL-7 exhibited opposite effects. Cytokines possessing a common  $\gamma$ -chain (IL-2, IL-7, and IL-15) prevented antigen-independent differentiation of naive T-cells, by preventing the formation of polyclonal "surrogate" cells. In general, the study of the molecular mechanisms of genetic control determining homeostatic processes of T-cells in response to exposure to antigenic or non-antigenic treatments may be important for construction of a general model of self-maintenance and differentiation of immune cells.

**Key words:** cytokines, gene expression, T-cells, activation, alternative splicing