

ДОЗОЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *Gfi1* и *U2af114* В Т-ЛИМФОЦИТАХ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

© 2013 г. Л. С. Литвинова, И. О. Мазунин*, А. А. Гуцол, Н. А. Сохоневич,
О. Г. Хазиахматова, К. А. Кофанова

Инновационный парк, Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, 236016

Поступила в редакцию 29.01.2013 г.

Принята к печати 06.03.2013 г.

В процессе дифференцировки Т-клеток памяти важная роль принадлежит альтернативному сплайсингу гена *Ptprc*, кодирующего трансмембранную тирозинфосфатазу CD45. Один из возможных механизмов регуляции альтернативного сплайсинга *Ptprc* основан на антагонистических эффектах вспомогательного фактора сплайсинга U2AF26 и фактора транскрипции *Gfi1*, вовлеченных в регуляцию антигензависимой активации Т-клеток. Показано, что стероидные гормоны противоположным образом действуют на транскрипцию генов *U2af114* и *Gfi1* в культурах клеток с разной степенью дифференцировки, подвергнутых антигеннезависимой активации. Глюкокортикоидный гормон дексаметазон (Dex) и женский половой гормон эстрадиол (Est) в низких концентрациях активируют экспрессию *U2af114* в рестимулированных клетках CD45RO и предположительно индуцируют образование неактивных конечных изоформ рецептора CD45, тогда как в высоких дозах гормоны, напротив, подавляют этот процесс. В условиях антигеннезависимой стимуляции наивных CD45RA+ -клеток Dex (10^{-5} – 10^{-7} М) и Est (10^{-6} и 10^{-7} М) способствуют резкой активации экспрессии гена *U2af114*, что, возможно, приводит к образованию “суррогатных клеток памяти”. Дозозависимое действие тестостерона (Test) противоположно действию Est и Dex на примированные (CD45RO+) и наивные (CD45RA+) лимфоциты. Изучение роли стероидных гормонов в контроле дифференцировки Т-клеток памяти в условиях антигеннезависимой стимуляции может представлять интерес для расшифровки механизмов, ассоциированных с формированием хронического иммунного и гормонального дисбаланса.

Ключевые слова: стероидные гормоны, дифференцировка Т-клеток, альтернативный сплайсинг, CD45.

DOSE-RESPONSE EFFECT OF STEROID HORMONES ON THE *GFI1* AND *U2AF114* GENE EXPRESSION IN T LYMPHOCYTES AT DIFFERENT STAGES OF DIFFERENTIATION, by L. S. Litvinova, I. O. Mazunin*, A. A. Gutsol, N. A. Sokhnevich, O. G. Khaziakhmatova, K. A. Kofanova (Innovation Park, Baltic Federal University of Immanuel Kant, Kaliningrad, 236000, Russia; *e-mail: IMazunin@kantiana.ru). Alternative splicing of *Ptprc* gene is a key event in memory T cell differentiation. This gene encodes transmembrane tyrosine phosphatase CD45. One of potential mechanisms of alternative splicing regulation is based on antagonistic effects of auxiliary splicing factor U2AF26 and transcription factor *Gfi1*. These two proteins regulate antigen-dependent T cell activation. We have shown that steroid hormones have different effects on *U2af114* and *Gfi1* transcription regulation in dissimilar differentiation stage cell culture, subjected to antigen-independent stimulation. Low concentrations of glucocorticoid (Dex) and female sex hormone (Est) can activate expression of *U2af114* in re-stimulated cells that probably induce terminal receptor CD45 isoforms formation mechanism, whereas high doses of hormones inhibit the process. In the same conditions Dex in a wide range of concentrations (10^{-5} – 10^{-7} M) and Est (10^{-6} and 10^{-7} M) activate *U2af114* gene expression that probably leads to “surrogate memory T cells” formation. Dose dependent testosterone (Test) effect is opposite to Est and Dex effect on priming (CD45RO+) and naive (CD45RA+) lymphocytes. The role of steroid hormones in memory T cell differentiation in antigen-independent stimulation conditions is of great interest for the understanding of chronic hormonal and immune disbalance mechanisms.

Keywords: steroid hormones, T cell differentiation, alternative splicing, CD45.

DOI: 10.7868/S0026898413040095

Принятые сокращения: МНК – мононуклеарные клетки; ПЦР – полимеразная цепная реакция; Dex – дексаметазон; Test – тестостерон; Est – β -эстрадиол; CD45RO – поверхностный рецептор примированных Т-лимфоцитов иммунной памяти; CD45RA – поверхностный рецептор наивных Т-лимфоцитов.

* Эл. почта: IMazunin@kantiana.ru

В изучении иммунной памяти особого внимания заслуживают молекулярно-генетические механизмы дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Т-клетки иммунной памяти [1]. На поверхности наивных Т-лимфоцитов находится трансмембранная тирозиновая протеинфосфатаза CD45 (общий лейкоцитарный рецептор), которую кодирует ген *Ptprc*, состоящий из 33 экзонов. Основной маркер Т-клеток памяти – CD45RO – представляет собой вариант CD45RA, который образуется в результате альтернативного сплайсинга, регулируемого многими факторами, в том числе, вспомогательным фактором сплайсинга U2AF26 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4, *U2af114*) и фактором транскрипции Gfi1 (growth factor independent 1). Предполагается, что антагонистические взаимодействия этих факторов могут определять соотношение вариантов рецептора CD45, регулирующего активность Т-клеток во время иммунного ответа [1].

Стероидные гормоны – биологически активные вещества, воздействие которых на процессы пролиферации, дифференцировки и гибели клеток иммунной системы интенсивно изучается. Уровень стероидных гормонов в организме подвержен значительным колебаниям, что важно для адаптации к разного рода воздействиям, включая антигенные [2, 3]. Известно, что кортикостероиды и андрогены обладают выраженным иммуносупрессорным действием, тогда как эстрогены могут усиливать иммунные реакции [2–4]. Действие стероидов, как полагают, носит дозозависимый характер, что определяет разнонаправленность их эффектов на основные процессы, обеспечивающие гомеостаз иммунокомпетентных клеток.

В представленной работе изучено влияние стероидных гормонов на изменение уровня мРНК генов *Gfi1* и *U2af114*, определяющих соотношение основных вариантов рецепторов CD45 в разных клеточных культурах: мононуклеарных лейкоцитах (МНК), наивных Т-лимфоцитах (CD45RA+) и примированных Т-лимфоцитах памяти (CD45RO+), полученных от здоровых доноров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали венозную кровь 22 условно здоровых доноров – 16 мужчин и шести женщин в возрасте от 19 до 39 лет. Фракцию МНК выделяли центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Urografin, $\rho = 1.077$ г/см³, (“Pharmacia”, Швеция). Часть МНК использовали в эксперименте.

Популяцию Т-клеток иммунной памяти (наивных и примированных) получали из выделен-

ных ранее МНК методом иммуномагнитной сепарации (MidiMACS Separator, LS Columns, “Miltenyi Biotec”, ФРГ) с использованием моноклональных антител к CD45RA+ и CD45RO+ с парамагнитными частицами (MicroBeads human, “Miltenyi Biotec”) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Содержание фракции CD45RA+- и CD45RO+-лимфоцитов в образцах составляло не менее 95%.

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”, Великобритания 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 $97.5 \pm 2.12\%$ (рис. 1).

МНК, гейтированные по панлейкоцитарному антигену CD45, были представлены следующими субпопуляциями: CD45+CD3+ – $76.21 \pm 12.15\%$; CD3+CD45RA+ – $52.34 \pm 13.24\%$; CD3+CD45RO+ – $24.00 \pm 7.15\%$. Кроме того, в популяции МНК здоровых доноров обнаружены клетки CD14+ – $6.42 \pm 2.12\%$, CD19+ – $12.24 \pm 3.14\%$. Остальные клетки были представлены лимфоцитами с фенотипом – CD16+CD56+.

МНК, CD45RA+- и CD45RO+-клетки (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночной планшете в бессывороточной среде Искова (“Sigma”), содержащей 0.5% сывороточного альбумина человека (“Микроген”, Россия), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанол (“Acros Organics”, США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии дексаметазона (Dex) (“KRKA”, Словения), тестостерона (Test) (“Sigma”) и β -эстрадиола (Est) (“Sigma”) в разных концентрациях или без гормонов (контроль) в течение 48 ч при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент Т-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) (“Miltenyi Biotec”) – антибиотинные частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2+, CD3+, CD28+ человека. Использовали следующие варианты культивирования: 1) интактная проба; 2) проба с добавлением Ac/Exp; 3) пробы с Ac/Exp и Dex (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М); 4) пробы с Ac/Exp и Test (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М); 5) пробы с Ac/Exp и Est (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М).

Количество живых и мертвых клеток в культурах МНК – как CD45RA+-, так и CD45RO+-лимфоцитов, а также динамику изменения общего ко-

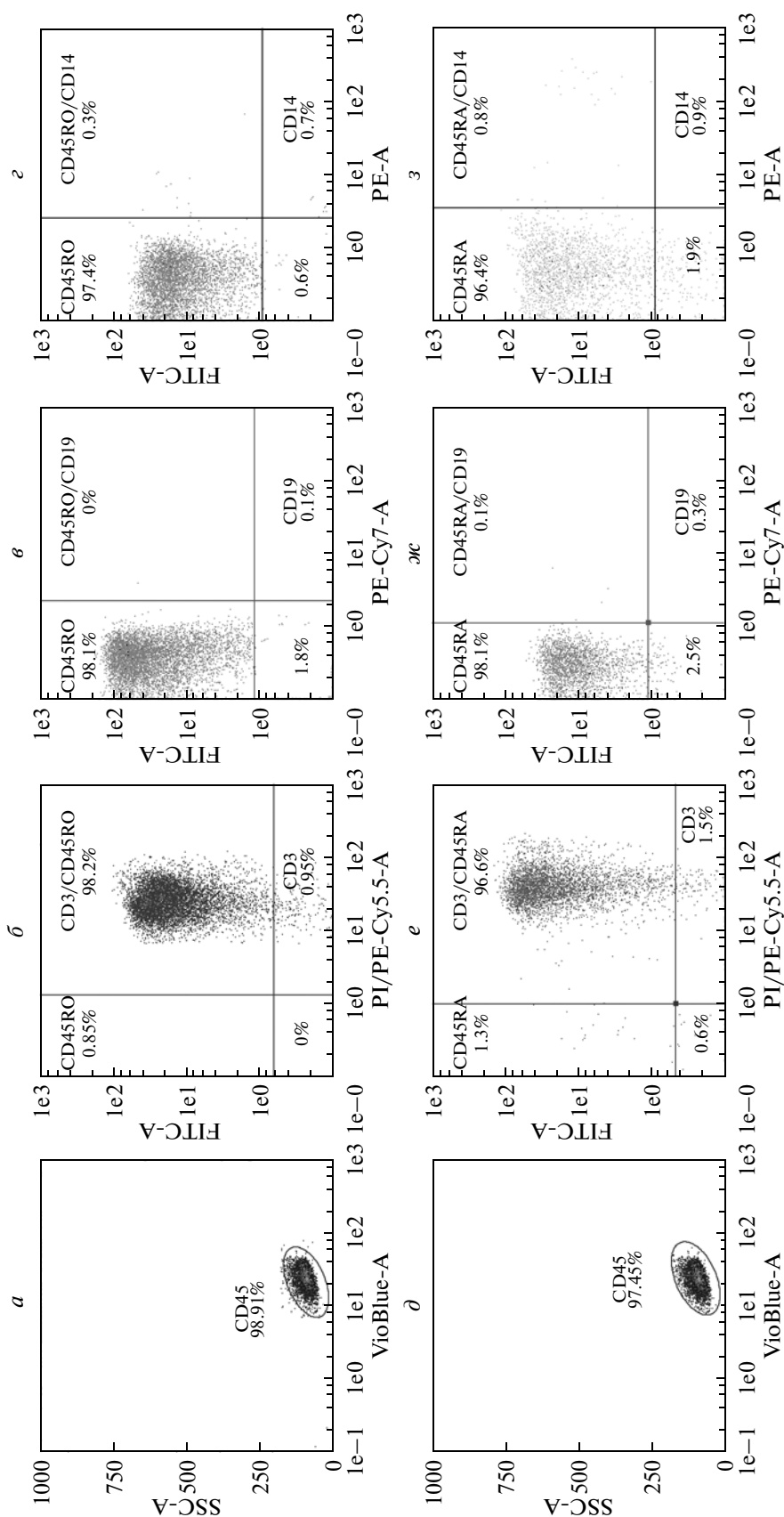


Рис. 1. Анализ клеточного состава CD45RA+ (a-e) и CD45RO+ (b-g) культур, полученных методом иммуномагнитной положительной селекции. Показано отсутствие CD14++ и CD19++-клеток.

личества клеток до и после культивирования определяли методом проточной лазерной двухцветной цитометрии на проточном цитофлуориметре Guava EasyCite Plus с использованием реагента и программы Guava ViaCount (“Millipore”).

Суммарную РНК выделяли после инкубации клеточных культур с использованием набора реагентов AXYPREP MULTISOURCE TOTAL RNA MINIPREP KIT (“Axugen Biosciences”, США) согласно протоколу производителя. Препараты РНК использовали для спектрофотометрического анализа, проведения контрольного электрофореза и в реакции обратной транскрипции. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически (Pico100 Picodrop™ µl Spectrophotometer, Англия). Степень очистки препаратов РНК определяли по соотношению A_{260}/A_{280} . Качество препаратов РНК оценивали с использованием электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле и окрашивания бромистым этидием.

Обратную транскрипцию проводили на образцах суммарной РНК, выделенной из клеточных культур. Использовали набор реагентов MMLV RT kit (“Евроген”). кДНК синтезировали согласно протоколу производителя. В качестве затравки использовали декануклеотидный праймер (Random (dN)10–primer, 20 мкМ). Качество кДНК оценивали с использованием электрофореза в 2%-ном агарозном геле и окрашивания бромистым этидием.

Динамику изменений экспрессии *Gfi1* и *U2af114* оценивали с помощью ПЦР с использованием реагентов qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) и праймеров в концентрации 10 пМ. В качестве матрицы использовали 2 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген 18S рРНК.

Олигонуклеотидные праймеры синтезировали с помощью фосфорамидитного метода на синтезаторе ДНК/РНК модели AMS-2000 (“Биосет”, Россия) с использованием реагентов компании “Glen Research” (США). Праймеры очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на установке для очистки олигонуклеотидов (модель OPS-1000, “Биосет”). Использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: *Gfi1_for* – 5'-AGACCCTTTCCTGCGAGATGTGC-3' и *Gfi1_rev* – 5'-TAGGGCCGACTGTCTGAGTGGATA-3' (длина продукта амплификации 176 п.н.); *U2af114_for* – 5'-GCCGAAGTGAACACGCAGCTT-3' и *U2af114_rev* – 5'-AGGGACAGATGTTCTGGCA-3' (длина продукта амплификации 156 п.н.); *18SrRNA_for* – 5'-GGCGCCCCCTCGATGCTCTTAG-3' и *18SrRNA_rev* – 5'-GCTCGGGCCCTGCTTTGAACACTCT-3' (длина продукта амплификации 89 п.н.).

ПЦР проводили в трех повторностях с использованием амплификатора в реальном времени RotorGene Q (“QIAGEN”, ФРГ) в следу-

ющем режиме: 95°C, 5 мин; 95°C, 30 с; 58°C, 45 с; 72°C, 60 с – 45 циклов; 72°C, 10 мин. Специфичность продуктов реакции определяли с использованием кривых плавления. Количественный анализ проводили методом подсчета $2^{\Delta\Delta Ct}$ [5, 6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для нормального функционирования иммунной системы необходимо, чтобы сохранялось равновесие между пролиферацией иммунокомпетентных клеток и их гибелью. Сдвиг этого равновесия считается одним из факторов, приводящих к развитию патологических процессов [7].

Согласно полученным данным, содержание живых клеток в культурах МНК, CD45RO+ и CD45RA+-лимфоцитов в контрольных образцах к моменту окончания инкубации (48 ч) составляло в среднем $72.90 \pm 13.28\%$ (рис. 2). Добавление Т-клеточного активатора (Ac/Exp) приводило к статистически значимому уменьшению числа жизнеспособных лимфоцитов во всех культурах. Более выраженным был эффект в случае CD45RA+-клеток. Dex в относительно высокой концентрации (10^{-5} М) снижал негативный эффект активации до значений, аналогичных показателям в интактных пробах. В меньших концентрациях гормон не влиял на жизнеспособность активируемых МНК и Т-клеток. Test (10^{-6} и 10^{-7} М) снижал общее число живых клеток в культурах клеток с фенотипом CD45RO+ и не влиял существенно на жизнеспособность активируемых МНК и CD45RA+ Т-лимфоцитов (рис. 2).

Интересно, что в отличие от Dex и Test, Est в концентрации 10^{-5} и 10^{-6} М резко снижал содержание живых клеток в культурах МНК, CD45RO+- и CD45RA+-клеток ($p < 0.001$). Более выраженным эффект был в случае CD45RA+-клеток. В более низкой концентрации (10^{-7} М) этот гормон не влиял существенно на жизнеспособность культивируемых лимфоцитов ($p > 0.05$) (рис. 2).

Общее количество клеток в интактных культурах МНК, CD45RA+- и CD45RO+-Т-лимфоцитов после окончания срока культивирования (48 ч) составляло в среднем $(1.06 \pm 0.09) \times 10^6$ кл/мл. Добавление активатора приводило к статистически значимому повышению числа клеток в культурах МНК и CD45RA+-лимфоцитов – на 18 и 20%, соответственно, а добавление комбинации активатора и Est (10^{-5} и 10^{-6} М) – в среднем на 28 и 30% (рис. 3). Количество Т-клеток CD45RO не изменялось существенно на протяжении всего периода исследования.

Мы предприняли попытку выявить дозозависимое влияние стероидных гормонов на уровень экспрессии мРНК генов *Gfi1* и *U2af114*, регулирую-

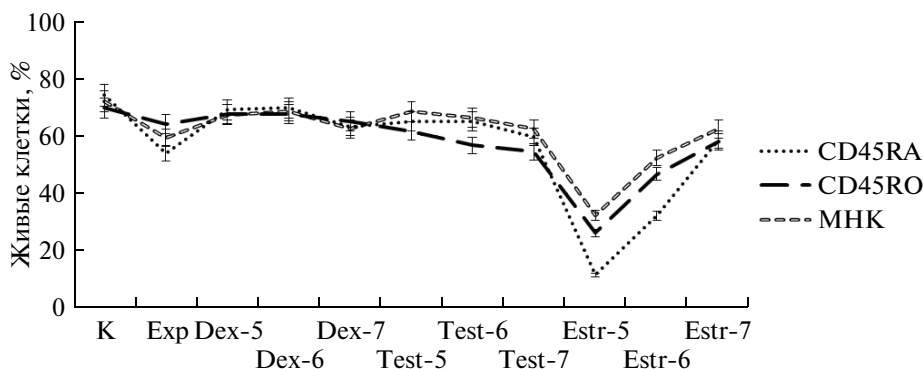


Рис. 2. Содержание живых клеток (%) в культурах мононуклеарных клеток (МНК), CD45RA⁺- и CD45RO⁺-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением стероидных гормонов в различной концентрации. К – количество живых клеток в контрольной пробе; Exp – с Т-клеточным активатором; Exp d-5–d-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и дексаметазоном (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М); Exp t-5–t-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и тестостероном (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М); Exp e-5–e-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и β-эстрадиолом (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М).

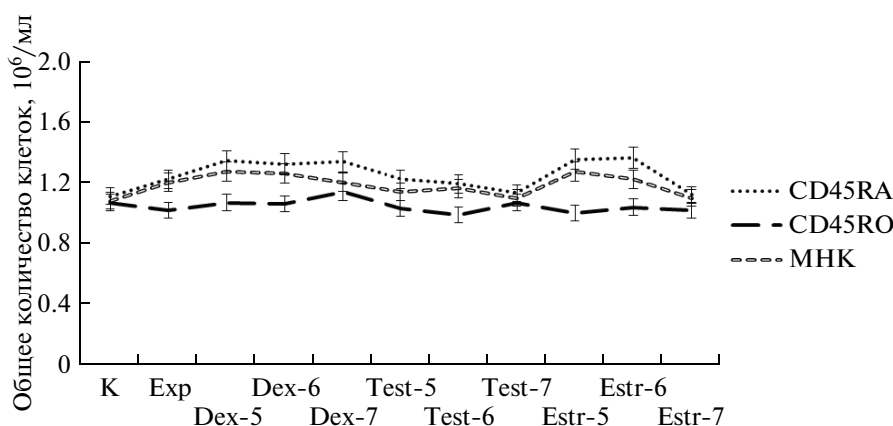


Рис. 3. Общее количество клеток (10^6 /мл) в культурах мононуклеарных клеток (МНК) и CD45RA⁺- и CD45RO⁺-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением стероидных гормонов в различной концентрации; К – количество клеток в контрольной пробе; Exp – с Т-клеточным активатором; Exp d-5–d-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и дексаметазоном (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М); Exp t-5–t-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и тестостероном (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М); Exp e-5–e-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и β-эстрадиолом (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М).

ющих альтернативный сплайсинг общего лейкоцитарного рецептора – CD45. Добавление в культуру МНК активатора Ас/Exp, имитирующего действие антигенпредставляющих клеток, приводило к снижению уровня экспрессии мРНК гена *Gfi1* и, напротив, к незначительному увеличению уровня *U2af114* по сравнению с контролем. При культивировании МНК в присутствии комбинаций Ас/Exp и Dex в разных концентрациях экспрессия мРНК обоих генов снижалась по сравнению со значениями, полученными при добавлении только Ас/Exp. При этом максимальное снижение (более чем в 15 раз) наблюдали при инкубации МНК с глюкокортикоидом в минимальной концентрации (10^{-7} М) (рис. 4).

Транскрипция обоих генов также значительно снижалась при добавлении в среду культивирования Test в максимальной концентрации (10^{-5} М), и этот эффект усиливался при уменьшении дозы до 10^{-6} М. Однако дальнейшее снижение концентрации Test (10^{-7} М) приводило к повышению экспрессии мРНК *Gfi1* и *U2af114*, уровень которой оставался при этом ниже, чем в пробах с активатором. Следует отметить, что уровень транскрипции мРНК *U2af114* заметно снижался (в 7.5 раза по сравнению с пробами с Ас/Exp) при добавлении Est в максимальной концентрации (10^{-5} М). При инкубации МНК с Est в концентрации 10^{-7} М отмечено наибольшее снижение экспрессии гена

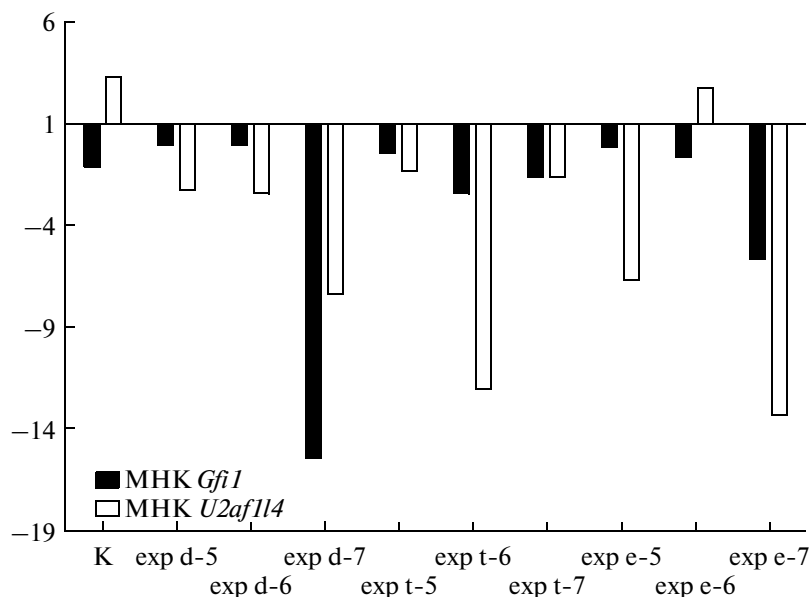


Рис. 4. Относительное изменение уровня (кратность) транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в мононуклеарных клетках под влиянием стероидных гормонов; К – соотношение уровней экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и образцах с добавлением Т-клеточного активатора; exp d-5–d-7 – соотношение уровней экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с дексаметазоном (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М) и Т-клеточным активатором; exp t-5–t-7 – соотношение уровней экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с тестостероном (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М) и Т-клеточным активатором; exp e-5–e-7 – соотношение уровней экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с β -эстрадиолом (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М) и Т-клеточным активатором.

U2af114 – уровень экспрессии был ниже, чем в контроле и в присутствии максимальной дозы Est (10^{-5} М). В то же время, в экспрессии мРНК гена *Gfi1* наблюдалась четко выраженная дозовая зависимость – при уменьшении концентрации Est экспрессия мРНК *Gfi1* снижалась и достигала критических значений в присутствии минимальной дозы гормона (10^{-7} М) (рис. 4).

В ходе работы установлено, что добавление активатора к лимфоцитам с фенотипом CD45RO приводило к резкому (более чем в 50 раз) подавлению транскрипции гена *U2af114* и, напротив, к незначительному снижению экспрессии *Gfi1* (по сравнению со значениями в интактной пробе). В то же время, инкубация Т-клеток памяти с Dex в разной концентрации сопровождалась разнонаправленными, дозозависимыми изменениями транскрипции *Gfi1* и *U2af114*. С уменьшением концентрации Dex экспрессия мРНК гена *Gfi1* снижалась, а экспрессия гена *U2af114*, напротив, возрастала (рис. 5).

При культивировании CD45RO-лимфоцитов с Test и Est уровни экспрессии изучаемых генов изменялись разнонаправленно. Так, при инкубации CD45RO-клеток с Est (10^{-5} М) экспрессия *U2af114* снижалась, а *Gfi1* – увеличивалась (по сравнению с пробой с добавлением активатора). В промежу-

точной концентрации Est угнетал экспрессию обоих генов, тогда как в минимальной концентрации этот гормон вызывал резкое падение транскрипции гена *Gfi1* в культуре клеток CD45RO+ при незначительном изменении уровня *U2af114* (рис. 5).

Совершенно противоположным (по сравнению с Est) оказался эффект Test на динамику изменений транскрипции генов *Gfi1* и *U2af114* в культурах примированных клеток CD45RO: высокие и промежуточные концентрации Test угнетали *Gfi1*, активируя одновременно экспрессию *U2af114*. Транскрипция гена *Gfi1* в рестимулированных клетках CD45RO усиливалась под действием минимальной (10^{-7} М) дозы Test (относительно значений в пробе с активатором и в интактной пробе) при высоком уровне экспрессии *U2af114* (рис. 5).

Значительный интерес для нас представляли данные, полученные при культивировании наивных клеток с фенотипом CD45RA+ со стероидными гормонами. Как и в случае клеток CD45RO+, при добавлении в культуру CD45RA+-лимфоцитов активатора Ac/Exp экспрессия мРНК обоих генов снижалась по сравнению с интактной пробой ($p < 0.05$). Добавление Dex в среду культивирования позволило выявить дозозависимый эффект этого гормона. В целом, уровень экспрессии мРНК *U2af114* возрастал с увеличением дозы глюкокорти-

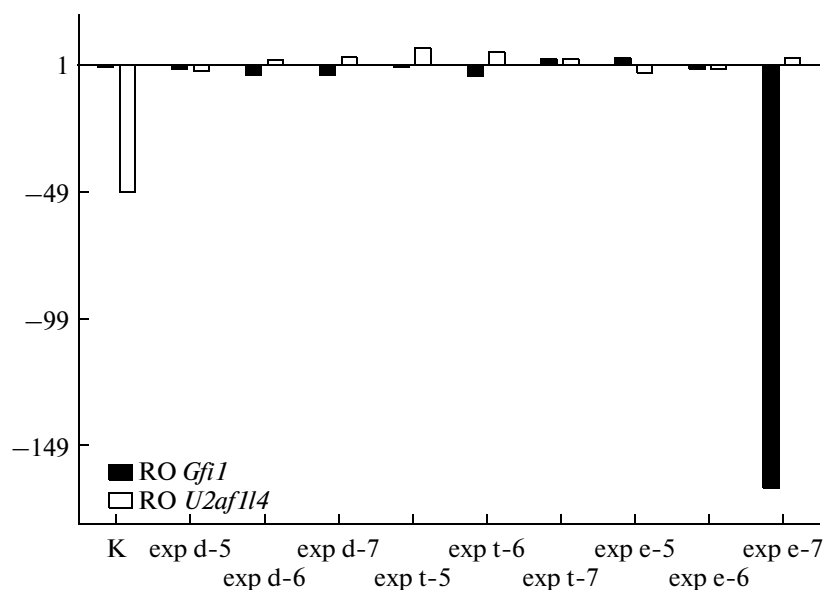


Рис. 5. Относительное изменение уровня (кратность) транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RO-клетках под влиянием стероидных гормонов в различной концентрации. Обозначения как на рис. 4.

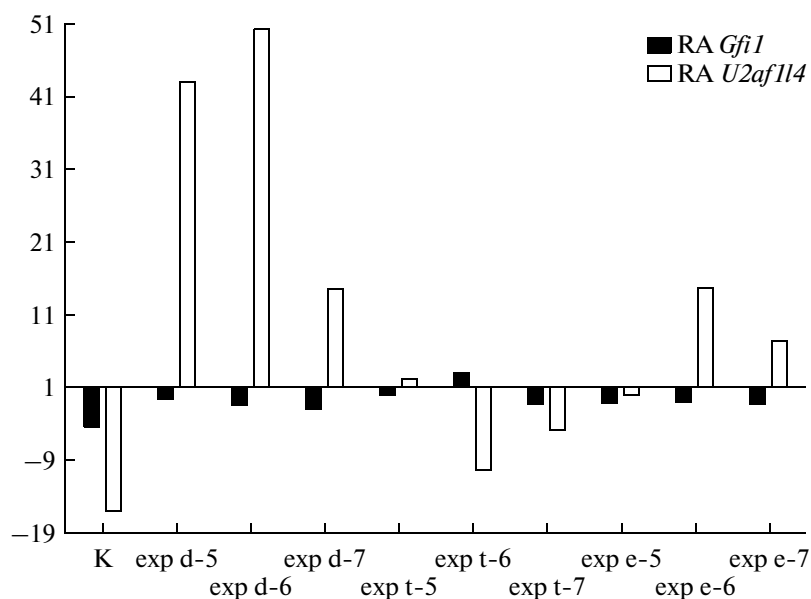


Рис. 6. Относительное изменение уровня (кратность) транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RA-клетках под влиянием стероидных гормонов в различной концентрации. Обозначения как на рис. 4.

когда, тогда как экспрессия гена *Gfi1* оставалась низкой. Следует подчеркнуть, что в CD45RA-клетках уровень транскрипции *U2af114* резко повышался в отличие от МНК и CD45RO-клеток (рис. 6).

Est, независимо от его концентрации, равномерно подавлял экспрессию гена *Gfi1* в наивных Т-клетках. В целом, при повышении концентрации Est в среде инкубации наблюдалось снижение экспрессии мРНК *U2af114*. Женский половой

гормон в дозе 10^{-6} М индуцировал транскрипцию гена *U2af114* (рис. 6).

Следует отметить, что уровни экспрессии обоих генов не коррелировали с изменением концентрации Test. Добавление Test в минимальной концентрации (10^{-7} М) приводило к значительному снижению (по сравнению со значениями в пробе с активатором) экспрессии генов *Gfi1* и *U2af114*. Обращало на себя внимание повышение экспрессии гена *Gfi1* и, напротив, резкое угнетение гена

U2af114, кодирующего вспомогательный фактор сплайсинга, при использовании промежуточной дозы Test. И, наконец, Test в концентрации 10^{-5} М снижал экспрессию гена *Gfi1* при незначительном увеличении экспрессии *U2af114* (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Иммунная реакция организма на различные агенты инфекционной и неинфекционной природы определяется процессами пролиферации, дифференцировки и запрограммированной гибели основных участников иммунного ответа — лимфоцитов. Как уже упоминалось, стероидные гормоны способны комплексно воздействовать на клетки иммунной системы [3, 4, 8].

Согласно представленным нами данным, активация МНК, CD45RO⁺- и CD45RA⁺-Т-клеток, индуцируемая Т-клеточным активатором, снижала содержание жизнеспособных лимфоцитов в культуре, возможно, вследствие апоптоза, который индуцируется наряду с усилением пролиферативной реакции [7, 9].

Глюкокортикоиды, обладающие плейотропным действием на рост, дифференцировку и функции лимфоцитов, обладают иммуносупрессорной и противовоспалительной активностью. Установлено, что чувствительность к глюкокортикоидам зависит от стадии дифференцировки клеток [10, 11], а действие гормонов в иммуногенезе направлено, прежде всего, на сдерживание избыточной пролиферации примированных Т-клеток памяти и на поддержание клонального баланса в лимфоидной ткани [10].

Повышение количества живых клеток в активированных культурах МНК, CD45RO⁺- и CD45RA⁺-клеток, наблюдаемое при добавлении 10^{-5} М Dex, в целом согласуется с опубликованными данными [8, 10] и может определяться способностью глюкокортикоидов подавлять индуцированный активацией Т-клеток апоптоз, влияя на экспрессию *fasL* на мембранах иммунокомпетентных клеток. Рост числа клеток в культурах МНК и CD45RA⁺-клеток при добавлении Dex в широком диапазоне концентраций может быть связан с его способностью усиливать пролиферативную активность Т-клеток *in vitro*, индуцируемую анти-CD3-антителами и интерлейкином-7 (IL-7). Этот факт связывают со стимуляцией Dex экспрессии рецептора IL-7 (ген α -цепи этого рецептора индуцируется глюкокортикоидами), в большом количестве представленного на мембранах наивных Т-лимфоцитов [12–14].

Андрогены обладают способностью к умеренному подавлению функций иммунной системы. Рецепторы андрогенов в больших количествах представлены на тимоцитах и лимфоцитах [3, 15].

Нами показано, что Test в использованных концентрациях не влиял существенно на жизнеспособность активируемых МНК и CD45RA⁺-лимфоцитов, но снижал количество живых клеток в культурах CD45RO⁺-клеток. Отмечено разнонаправленное действие мужских половых гормонов на активацию запрограммированной гибели клеток-мишеней в зависимости от их типа и стадии дифференцировки [3, 15, 16].

Считается, что эстрогены могут усиливать иммунные реакции [2, 4, 17]. Так, эстрадиол стимулирует антигенспецифичный иммунный ответ, возможно, за счет некоторого угнетения функциональной активности CD8⁺-Т-клеток и усиления активации CD4⁺-Т-клеток [18, 19].

Выявленный нами проапоптогенный эффект высоких концентраций Est на МНК и Т-клетки разной степени дифференцировки может быть связан с дозовой зависимостью влияния эстрогенов на иммунную систему в целом [20]. При этом наиболее чувствительными к действию женского полового гормона оказались CD45RA⁺-клетки. Существенное увеличение общего числа МНК и CD45RA⁺-клеток, регистрируемое на фоне их значительной гибели при инкубации с Est, связано с усилением пролиферативной активности. В то же время, высокое содержание мертвых клеток в культуре CD45RO⁺-лимфоцитов, подвергнутых воздействию Est (10^{-5} и 10^{-6} М), в сочетании с отсутствием пролиферативных процессов может определяться способностью молекулы CD45RO, с высокой плотностью представленной на примированных клетках памяти, ограничивать пролиферацию Т-лимфоцитов [21].

На взаимосвязь между структурной и функциональной атрофией тимуса, связанной, в частности, с уменьшением количества наивных клеток в крови и секрецией половых гормонов, указывают данные [16]. Снижение уровня эстрогенов и андрогенов приводит к феномену так называемого “тимусного омоложения”. Интересно, что возрастное снижение уровня стероидных гормонов способствует поддержанию протективного иммунитета, с одной стороны, и увеличению вероятности развития аутоиммунных расстройств, с другой.

Альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, кодирующего лейкоцитарный рецептор CD45, крайне важен для функциональной активности Т-клеток человека [22]. В частности, CD45 на иммунокомпетентных клетках признан критическим регулятором сигнализации, опосредованной Т-клеточным рецептором (TCR) [23–25]. Как уже упоминалось, согласно [1], регуляция альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* основана на антагонистических эффектах вспомогательного фактора U2AF26 и фактора транскрипции (репрессора) *Gfi1*, которые, в конечном итоге, регулируют антигензависимую

мую активацию Т-клеток. Предполагается, что индукция альтернативного сплайсинга с образованием изоформы CD45RO угнетает пролиферацию Т-клеток по принципу отрицательной обратной связи [1, 21]. С другой стороны, с клетками, несущими укороченный вариант молекулы CD45RO, связывают более быструю и эффективную антигензависимую активацию, тогда как клетки с фенотипом CD45RA с большей вероятностью подвергаются апоптозу при воздействии активирующих стимулов [1, 9, 21].

Нами выявлено разнонаправленное действие стероидных гормонов на динамику транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1*, определяющих соотношение вариантов рецепторов CD45, в подвергнутых антигеннезависимой активации культурах клеток с разной степенью дифференцировки.

Повышение уровня транскрипции *U2af114* в культурах МНК при добавлении Ас/Ехр, и, напротив, подавление транскрипции гена *Gfi1*, согласно [1], характерны для образования конечных форм CD45 рецептора – CD45RO. На мышинных моделях показано, что снижение уровня экспрессии *Gfi1* приводит к образованию более коротких транскриптов гена *Ptpnc* [1]. Полученные результаты можно считать вполне прогнозируемыми, поскольку 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 [1].

Снижение транскрипции обоих генов, особенно *Gfi1*, регистрируемое после окончания срока инкубации, в культурах активированных МНК коррелировало с уменьшением концентрации Dex. Test действовал аналогично Dex. Подавление экспрессии гена *Gfi1* в Т-клетках под действием Dex [26], по-видимому, можно связать как с прямым действием гормона, так и с длительным сроком инкубации клеточных культур (48 ч). Выявленное нами угнетение экспрессии мРНК *U2af114*, усиливающееся при понижении концентрации Est, было сходным с действием Dex, тогда как противоположным был эффект Est в концентрации 10^{-6} М, что можно объяснить дозовой зависимостью воздействия эстрогенов на иммунокомпетентные клетки [2].

Противоположная тенденция прослеживалась в случае воздействия Т-клеточного активатора на CD45RA- и CD45RO-клетки: наблюдалось резко выраженное, особенно в популяции CD45RO-клеток, угнетение экспрессии *U2af114* при низком уровне транскрипции *Gfi1*.

Особого внимания заслуживает влияние стероидных гормонов на экспрессию *U2af114* и *Gfi1* в

CD45RO- и CD45RA-лимфоцитах. Оценивая действие Dex и половых гормонов на примированные (CD45RO) и наивные (CD45RA) Т-лимфоциты, следует отметить разнонаправленность эффектов этих гормонов на клетки с разной степенью дифференцировки. Мы полагаем, что Ас/Ехр в комбинации с глюкокортикоидом (Dex) в низких концентрациях в случае рестимуляции примированных клеток с фенотипом CD45RO активирует экспрессию *U2af114* и индуцирует образование конечных изоформ рецептора CD45, тогда как Dex в высоких дозах, напротив, подавляет этот процесс.

В последнее время накапливаются данные, согласно которым краткосрочные и длительные эффекты стероидных гормонов на иммунные процессы могут быть разнонаправленными. В частности, реакция на стресс, неразрывно связанная с усилением продукции гормонов надпочечников и краткосрочной иммуносупрессией, способствует образованию антигенспецифических цитолитических Т-лимфоцитов памяти. Согласно [27], длительное применение метилпреднизолона приводит к относительному увеличению числа циркулирующих в крови миелинреактивных CD4+CD45RO+-Т-клеток. Показано, что Т-клетки памяти обладают гораздо меньшей чувствительностью к действию высоких доз глюкокортикоидных и кортикостероидных гормонов, чем наивные Т-лимфоциты [28]. Очевидно, относительная резистентность активации Т-клеток памяти к действию Dex может создавать предпосылки, необходимые для ускоренной реализации их функционального потенциала в процессе антигензависимого иммуногенеза.

Эффекты Test в минимальной концентрации (10^{-7} М) и Est – в максимальной (10^{-5} М) были ассоциированы с повышенной гибелью рестимулированных CD45RO-клеток и сопровождались (с разной степенью выраженности) угнетением экспрессии *U2af114* с одновременным повышением транскрипции гена *Gfi1*, ответственного за образование активных промежуточных вариантов сплайсинга рецептора CD45. Одновременно с этим противоположный результат – повышение экспрессии *U2af114* – наблюдали в присутствии максимальных доз Test и минимальных Est.

Известно, что изоформа CD45RO со временем может замещаться исходным вариантом CD45RA. При повторной стимуляции клеток происходит образование устойчивых конечных изоформ CD45RO [9, 14], чему способствуют низкие концентрации глюкокортикоидного и женского полового гормонов, и, напротив, высокие дозы мужского полового гормона.

В то же время, в условиях антигеннезависимой стимуляции наивных CD45RA-клеток Dex в концентрации 10^{-5} – 10^{-7} М и Est в концентрации 10^{-6} и 10^{-7} М способствовали резкому повышению

экспрессии вспомогательного фактора U2AF26, регулирующего образование коротких вариантов сплайсинга рецептора CD45. Test при этом угнетал транскрипцию *U2af114*, активируя (в концентрации 10^{-6} М) экспрессию *Gfi1*. Возможно, что усиление пролиферативной активности клеток, обусловленное действием комбинации Т-клеточного активатора и стероидных гормонов, сопровождается конверсией мембранного фенотипа, т.е. экспрессией маркеров Т-клеток памяти – CD45RO+. В этой связи особого внимания заслуживает образование пула “суррогатных” лимфоцитов 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) [9, 29]. Стоит подчеркнуть, что выявленные нами эффекты стероидных гормонов на наивные Т-клетки, направленные на образование коротких вариантов рецептора CD45, могут иметь важное значение в условиях эндокринного дисбаланса.

Полученные нами результаты нуждаются в дальнейшем изучении. Необходимо определить количественные и качественные характеристики вариантов мРНК гена *Ptprc*, кодирующего рецептор CD45. Понимание роли стероидных гормонов в контроле процессов дифференцировки Т-клеток памяти в условиях антигеннезависимой стимуляции может использоваться для расшифровки механизмов формирования патологии, ассоциированной с хроническим иммунным и гормональным дисбалансом.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (Соглашения № 14.А18.21.1121, № 14.132.21.1778 и № 14.132.21.1341), а также при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-докторов наук (№ МД-4999.2012) и стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (СП-454.2013.4.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Heyd F., ten Dam G., Möry T. 2006. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol.* **8**, 859–867.
- Karagiannidis C., Akdis M., Holopainen P., Woolley N.J., Hense G., Ruckert B., Mantel P.Y., Menz G., Akdis C.A., Blaser K., Schmidt-Weber C.B. 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 1425–1433.
- Литвинова Л.С., Селедцов В.И., Шуплецова В.В., Гуцол А.А., Анищенко Е.С. 2011. Стероидная регуляция иммунной памяти. *Вестник РГУ им. И. Канта.* **1**, 77–87.
- Fedor M.E., Rubinstein A. 2006. Effects of long-term low-dose corticosteroid therapy on humoral immunity. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **1**, 113–116.
- Schmittgen T.D., Livak K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **6**, 1101–1108.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**, 45.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* **35**, 495–516.
- Baschant U., Tuckermann J. 2010. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **120**, 69–75.
- Ярилин А.А. 2010. *Иммунология.* М.: Гэотар-Медиа.
- Ashwell J.D., Lu F.W., Vacchio M.S. 2000. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 309–345.
- Winoto A., Littman D.R. 2000 Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell.* **109**, 57–66.
- Talayev V., Zaichenko I., Babaykina O.N., Lomunova M.A., Talayeva E.B., Nikonova M.F. 2005. *Ex vivo* stimulation of cord blood mononuclear cells by dexamethasone and interleukin-7 results in the maturation of interferon- γ -secreting effector memory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **141**, 440–448.
- Schluns K.S., Lefrançois L. 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Immunology.* **3**, 269–279.
- Селедцов В.И., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г., Шуплецова В.В., Селедцов Д.В., Гуцол А.А., Селедцова И.А. 2010. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти. *Цитокины и воспаление.* **4**, 9–15.
- Татарчук Т.Ф., Сольский Я.П. 2003. *Эндокринная гинекология.* К.: Заповг.
- Hince M., Sakkal S., Vlahos K., Dudakov J., Boyd R., Chidgey A. 2008. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. *Cell Immunol.* **252**, 122–138.
- Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev. Immunol.* **22**, 745–763.
- Chernyshov V.P., Radysh T.V., Gura I.V., Tatarchuk T.P., Khominskaya Z.B. 2001. Immune disorders in women with premature ovarian failure in initial period. *Am. J. Reprod. Immunol.* **46**, 220–225.
- Anderson D.J. 2000. *Immunologic Aspects of Menopause. Menopause. Biology and Pathology.* San Diego, Tokyo: Acad. Press.

20. Grossman C.J., Roselle G.A., Mendenhall C.L. 1991. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**, 649–659.
21. Xu Z., Weiss A. 2002. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat. Immunol.* **3**, 764–771.
22. Wu Z., Yates A.L., Hoyne G.F., Goodnow C.C. 2010. Consequences of increased CD45RA and RC isoforms for TCR signaling and peripheral T cell deficiency resulting from heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like mutation. *J. Immunol.* **185**, 231–238.
23. McNeill L., Salmond R.J., Cooper J.C., Carret C.K., Cassady-Cain R.L., Roche-Molina M., Tandon P., Holmes N., Alexander D.R. 2007. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity.* **27**, 425–437.
24. Lynch K.W. 2004. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 931–940.
25. Mustelin T., Tasken K. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem. J.* **371**, 15–27.
26. Ligons D.L., Tunce C., Linowes B.A. 2012. CD8 lineage-specific regulation of interleukin-7 receptor expression by the transcriptional repressor Gfi1. *J. Biol. Chem.* **287**, 34386–34399.
27. Martínez-Cáceres E.M., Barrau M.A., Brieva L. 2002. Treatment with methylprednisolone in relapses of multiple sclerosis patients: immunological evidence of immediate and short-term but not long-lasting effects. *Clin. Exp. Immunol.* **127**, 165–171.
28. Brinkmann V., Kristofic C. 1995. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO– and CD45RO+ subsets. *J. Immunol.* **155**, 3322–3328.
29. Kincade P.W., Medina K.L., Payne K.J. 2000. Estrogen regulates lymphopoiesis. *Menopause at the Millennium.* **2**, 171–174.