

РОЛЬ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА В РЕГУЛЯЦИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК ИММУННОЙ ПАМЯТИ

Раев М.Б.^{1,3}, Литвинова Л.С.², Юрова К.А.², Хазиахматова О.Г.²,
Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.¹, Храмцов П.В.^{1,2,3}, Заморина С.А.^{1,3}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук,
г. Пермь, Россия

² ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. Изучали роль трофобластического β 1-гликопротеина (ТБГ) в регуляции молекулярно-генетических факторов, определяющих функциональную активность наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти в системе *in vitro*. ТБГ человека получали авторским запатентованным методом иммуноочистки с использованием биоспецифического сорбента с последующим освобождением от иммуноглобулиновой контаминации на колонке HiTrap™ Proten G HP. В экспериментах использовали физиологические концентрации ТБГ, соответствующие его уровню в периферической крови будущей матери в период беременности: 1, 10 и 100 мкг/мл (I, II, III триместр соответственно). Объектами исследования являлись монокультуры наивных Т-клеток (CD45RA⁺) и Т-клеток иммунной памяти (CD45R0⁺), полученные методом иммуномагнитной сепарации из периферической крови женщин репродуктивного возраста.

Установлено, что на уровне наивных Т-клеток ТБГ угнетал экспрессию CD28 (1, 10, 100 мкг/мл) и CD25 (100 мкг/мл), не влияя на продукцию этими клетками (IL-2). В то же время, на уровне Т-клеток иммунной памяти, ТБГ во всех используемых концентрациях подавлял экспрессию CD25, но повышал продукцию IL-2 этими клетками. Параллельно оценивали экспрессию генов *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, кодирующего CD45. Установлено, что ТБГ снижал экспрессию генов *Gfi1* (1, 10, 100 мкг/мл), *hnRNPLL* (10, 100 мкг/мл), но повышал экспрессию гена *U2af114* (1, 10, 100 мкг/мл) наивными Т-клетками. Показано, что на уровне Т-клеток иммунной памяти эффекты были аналогичными, причем ТБГ оказывал их во всех используемых концентрациях. Выявленные изменения в транскрипции мРНК генов *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL* в исследуемых субпопуляциях Т-клеток могут вести к снижению формирования «зрелой» изоформы CD45R0.

Адрес для переписки:

Заморина Светлана Анатольевна
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Address for correspondence:

Zamorina Svetlana A.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Образец цитирования:

М.Б. Раев, Л.С. Литвинова, К.А. Юрова,
О.Г. Хазиахматова, В.П. Тимганова,
М.С. Бочкова, П.В. Храмцов, С.А. Заморина
«Роль трофобластического β 1-гликопротеина
в регуляции молекулярно-генетических механизмов
дифференцировки Т-клеток иммунной памяти»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1.
С. 49-58. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-49-58
© Раев М.Б. и соавт., 2019

For citation:

M.B. Rayev, L.S. Litvinova, K.A. Yurova,
O.G. Khaziakhmatova, V.P. Timganova, M.S. Bochkova,
P.V. Khramtsov, S.A. Zamorina "The role of pregnancy-specific
glycoprotein in regulation of molecular genetic differentiation
mechanisms of immune memory T cells", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 1,
pp. 49-58. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-49-58

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-49-58

Таким образом, ТБГ снижает функциональную активность наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти, связанную с экспрессией молекул костимуляции/активации CD25 и CD28, и участвует в регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, определяющего соотношение вариантов рецептора CD45. По-видимому, при помощи указанных механизмов ТБГ регулирует функциональную активность циркулирующего пула Т-клеток памяти, потенциально способных к осуществлению антиген-специфических цитотоксических реакций в отношении антигенов эмбрионального происхождения в ситуации *in vivo*. В целом полученные данные расширяют представления о роли ТБГ в регуляции молекулярно-генетических механизмов дифференцировки наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти.

Ключевые слова: ТБГ, иммунная память, наивные Т-клетки, Т-клетки памяти, альтернативный сплайсинг, ген *Ptprc*, CD45RA, CD45R0, CD25, CD28, IL-2

THE ROLE OF PREGNANCY-SPECIFIC GLYCOPROTEIN IN REGULATION OF MOLECULAR GENETIC DIFFERENTIATION MECHANISMS OF IMMUNE MEMORY T CELLS

Rayev M.B.^{a,c}, Litvinova L.S.^b, Yurova K.A.^b, Khaziakhmatova O.G.^b, Timganova V.P.^a, Bochkova M.S.^a, Khramtsov P.V.^{a,b,c}, Zamorina S.A.^{a,c}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^c Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. The role of pregnancy-specific β 1-glycoprotein (PSG) in the regulation of molecular genetic factors determining the functional activity of naïve T cells and T cells of immune memory *in vitro* was studied. Human PSG was isolated with a proprietary immuno-purification method using a biospecific sorbent followed by removing of immunoglobulin contamination with a HiTrap™ Protein G HP column. Physiological concentrations of PSG were used in the experiments. They corresponded to PSG levels in the peripheral blood of pregnant woman: 1, 10 and 100 μ g/ml (I, II, III trimester, respectively). The objects of study were monocultures of naïve T cells (CD45RA⁺) and memory T cells (CD45R0⁺), obtained by immunomagnetic separation from the peripheral blood of women of reproductive age.

It was established that at the level of naïve T cells (CD45RA⁺) PSG inhibited the expression of CD28 (1, 10, 100 μ g/ml) and CD25 (100 μ g/ml), without affecting the interleukin-2 (IL-2) production by these cells. At the same time, PSG in all concentrations studied suppressed the expression of CD25 at the immune memory T-cell (CD45R0⁺) surface but increased the IL-2 production. Expression of *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL* genes regulating the alternative splicing of the *Ptprc* gene encoding CD45 was also evaluated. It was found, that PSG reduced the expression of the *Gfi1* (1, 10, 100 μ g/ml), *hnRNPLL* (10, 100 μ g/ml) genes, but increased the expression of the *U2af114* gene (1, 10, 100 μ g/ml) in the naïve T cells. It was shown that at the immune memory T-cells' level the effects were similar, with PSG rendering them in all concentrations used. The revealed changes in the mRNA transcription of *U2af114*, *Gfi1* and *hnRNPLL* genes in the studied T cell subsets may lead to the inhibition of CD45 "mature" isoform formation – CD45R0.

Thus, PSG reduces the functional activity of naïve T cells and immune memory T cells associated with the expression of costimulation/activation molecules CD25 and CD28 and is involved in the regulation of *Ptprc* gene alternative splicing, which determines the ratio of CD45 molecule variants. Apparently, using these mechanisms, PSG regulates the functional activity of the memory T cell circulating pool, which is potentially capable of carrying out antigen-specific cytotoxic reactions against fetal antigens *in vivo*. In general, the data obtained broadens the notion of the PSG role in the regulation of molecular-genetic mechanisms of naïve T cells and immune memory T cells differentiation.

Keywords: PSG, immune memory, naïve T cells, memory T cells, alternative splicing, *Ptprc* gene, CD45RA, CD45R0, CD25, CD28, IL-2

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-44-0049 и программой повышения конкурентоспособности (5-100) и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

Список сокращений

CD45 – общелейкоцитарный рецептор; CD45R0 – низкомолекулярная изоформа рецептора CD45; CD45RA – высокомолекулярная изоформа рецептора CD45; Gfi1 (*Gfi1*) – фактор транскрипции (growth factor independent 1); МНС – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); Ptprc – белок тирозинфосфатаза, рецепторный тип (Protein Tyrosine-Phosphatase, Receptor Type), кодируется геном *Ptprc*; 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); АПК – антигенпрезентирующая клетка; кДНК – копия дезоксирибонуклеиновой кислоты; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РНК – рибонуклеиновая кислота; ТБГ – трофобластический β 1-гликопротеин.

Введение

Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы [4]. На уровне иммунной системы ТБГ участвует в регуляции как врожденного, так и адаптивного иммунного ответов [1, 10, 12]. Невзирая на очевидный иммунорегуляторный потенциал ТБГ, его роль в регуляции Т-клеток иммунной памяти остается неизвестной. В то же время присутствие фетоплацентарных антигенов в период беременности модулирует Т-клеточную память, что имеет значение для формирования иммунной толерантности, а также для последующей беременности [8]. Можно предположить, что ТБГ регулирует функциональную активность циркулирующего пула Т-клеток памяти, потенциально способных к осуществлению антиген-специфических цитотоксических реакций в отношении антигенов эмбрионального происхождения.

Во время беременности иммунная система матери претерпевает изменения, направленные на формирование иммунной толерантности к полуженому эмбриону. Изучение дифференцировки Т-клеток памяти в настоящее время связано с оценкой экспрессии различных изоформ молекулы CD45, экспрессия которой на иммунокомпетентных клетках является критическим регулятором сигнализации, опосредованной

Т-клеточным рецептором (TCR) [11]. В процессе дифференцировки Т-клеток изменяется структура внеклеточного домена CD45: так, в наивных клетках это полная форма (CD45RA, 220 кДа), по мере антигензависимой дифференцировки ряд доменов теряется, а продукт конечной модификации обозначают как CD45R0 (180 кДа). Т-лимфоциты, экспрессирующие CD45RA⁺, рассматриваются как «наивные» Т-клетки, а экспрессирующие CD45R0⁺ – как «примированные» Т-клетки иммунной памяти [2].

CD45 является трансмембранной тирозинфосфатазой, которую кодирует ген *Ptprc* [17]. С помощью механизма альтернативного сплайсинга, в результате дифференциального использования трех экзонов (4, 5 и 6) внеклеточного домена гена *Ptprc*, возможна генерация восьми различных изоформ молекулы CD45, пять из которых присутствуют на лимфоцитах (R0, RA, RB, RBC и RABC изоформы) и определяют этапы их дифференцировки [6]. После активации Т-клеток пропуск переменных экзонов CD45 приводит к гомодимеризации рецептора на клеточной поверхности и образованию неактивной формы фосфатазы со снижением сигнализации через TCR. В настоящее время выявлено три гена (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*), продукты которых, взаимодействуя, модулируют процесс альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, сопряженный с дифференцировкой иммунокомпетентных клеток [7].

Известно, что функциональная активность Т-лимфоцитов тесно связана с экспрессией поверхностных маркеров, таких как CD28 и CD25 [3, 14]. Молекула CD28 является первичным корцептором, опосредующим позитивную костимуляцию Т-клеток, участвуя в формировании иммунного синапса через взаимодействие с CD80/86 (B7) на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК). CD25 (α -цепь рецептора для IL-2) представляет собой ранний маркер активации, функционально связанный с продукцией IL-2 [3] и отражающий способность клеток к дифференцировке и пролиферации.

Мы предполагаем, что ТБГ принимает непосредственное участие в дифференцировке и созревании Т-лимфоцитов посредством регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, что в конечном итоге может определить исход как первичных, так и вторичных иммунных реакций. В связи с вышесказанным, целью исследования явилось определение роли ТБГ в регуляции молекулярно-генетических процессов, определяющих дифференцировку и созревание наивных Т-клеток в Т-клетки иммунной памяти. В задачи входила оценка влияния ТБГ на мембранную экспрессию молекул костимуляции/активации

(CD28, CD25) наивными Т-клетками (CD45RA⁺) и Т-клетками иммунной памяти (CD45R0⁺) с одновременной оценкой уровней относительной экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1*, и *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* в исследуемых субпопуляциях Т-клеток и продукции IL-2 этими клетками.

Материалы и методы

Исследование проводилось согласно Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., получено разрешение этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» (IRB00010009) от 12.06.2016.

Получение препарата ТБГ

ТБГ человека получали авторским запатентованным методом иммуноочистки с использованием биоспецифического сорбента с последующим освобождением от иммуноглобулиновой контаминации на колонке HiTrapTM Proten G HP (Amersham Biosciences, Швеция) [5]. Чистоту препарата подтверждали электрофоретически, молекулярную гетерогенность — методом LC/MS. Препарат, полученный по этой методике, содержал как минимум 5 молекулярных форм белка: ТБГ-1, ТБГ-3, ТБГ-4, ТБГ-7, ТБГ-9. Полученный таким образом ТБГ имеет очевидные преимущества перед рекомбинантными формами белка и максимально приближен по своему составу к ТБГ беременной женщины в ситуации *in vivo*. В экспериментах использовали физиологические концентрации ТБГ, соответствующие его уровню в периферической крови матери в период беременности: 1, 10 и 100 мкг/мл (I, II, III триместр соответственно) [4].

Объекты исследования

В работе использовали фракционированные мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) практически здоровых доноров, которыми являлись небеременные женщины репродуктивного возраста ($n = 10$). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см³) (Pharmacia, Швеция).

Сепарирование CD45RA⁺ и CD45R0⁺ клеток

Монокультуры наивных Т-клеток (CD45RA⁺) и Т-клеток памяти (CD45R0⁺) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS[®] (Miltenyi Biotec, Германия) из суспензии МПК. В эксперименте использовали клеточные культуры, содержание CD3⁺CD45RA⁺CD14⁻CD19⁻ и CD3⁺CD45R0⁺CD14⁻CD19⁻ Т-клеток в которых составляло в среднем $98,5 \pm 1,5\%$. Выделенные клетки с фенотипом CD45RA⁺ или CD45R0⁺ (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночных

планшетах в полной питательной среде (ППС): RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), с добавлением 10% ЭТС (Sigma, США), 10 мМ Hepes (ICN Ph., США), 2 мМ L-глутамин (ICN Ph., США) 5×10^{-5} М β-меркаптоэтанола (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения) в течение 48 ч при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В качестве контроля использовали образец, где вместо гормона добавляли ППС.

В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали Т-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) (Miltenyi Biotec, Германия) — антибиотинные частицы MACSiBead[™] с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺ человека. Определение поверхностных молекул костимуляции и активации (CD25 PE-Cy 5.5, CD28PE-Cy7, Miltenyi Biotec, Германия) на CD45RA⁺ и CD45R0⁺ Т-клетках проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Результаты проточной цитометрии были проанализированы с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

Мультиплексный ПЦР-анализ

Выделение тотальной РНК из полученных образцов проводили с использованием реагента ExtractRNA kit (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием праймера oligo(dT)23-primer (20 мкМоль) (Beagle, Россия) и обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия). Мультиплексный анализ ПЦР проводили с использованием реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМоль (Beagle, Россия). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена — ген GAPDH. Последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в таблице 1. ПЦР была проведена в трех повторах с использованием амплификатора LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche, Швейцария) в следующем режиме: 95 °С, 5 мин; 95 °С, 20 с; 60 °С, 30 с; 72 °С, 60 с — 45 циклов, 72 °С, 5 мин. Уровень экспрессии мРНК в контрольных и опытных пробах определяли относительно экспрессии референсного гена с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$, вычисляя значение $2^{-(Ct \text{ целевого гена} - Ct \text{ референсного гена})}$, где Ct — пороговый цикл реакции [9].

Оценка концентрации IL-2

Содержание IL-2 в культуральных супернатантах оценивали иммуноферментным методом при помощи тест-систем «Вектор-Бест» (Россия). Измерение оптической плотности производили на многоканальном спектрофотометре Biohit BP 800 (Финляндия).

ТАБЛИЦА 1. НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ

TABLE 1. NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PRIMERS AND PROBES

| |
|---|
| 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'-CCATTGCTTGTATCCCATTTCTC-3' |
| GAPDH_for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' |
| GAPDH_rev 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTC-3' |
| GFI1_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1 |
| U2af114_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAAGTCA-3'~BHQ-1 |
| hnRPLL_probe FAM-5'-TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC-3'~BHQ-1 |
| GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTCCCGTTCTCAGCC-3'~BHQ-1 |

Статистическая обработка полученных результатов для иммуноферментного анализа проводилась с помощью парного t-критерия Стьюдента, данные представлены в виде $M \pm \sigma$. Данные, полученные методом проточной цитометрии и в мультиплексном ПЦР-анализе, представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилем $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$, статистическая обработка проведена с помощью W-критерия Вилкоксона. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для оценки эффектов ТБГ на naive Т-клетки и Т-клетки памяти использовали активационную модель, которая отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с АПК. Присутствие в культуре частиц, имитирующих АПК (Ac/Exp), активирует Т-клетки через молекулы CD2, CD3 и CD28. Вследствие этого формируется иммунный синапс, и регулируются такие процессы, как активация, дифференцировка и пролиферация лимфоцитов. Такой подход позволяет в контролируемых условиях исследовать разные аспекты функциональной деятельности Т-клеток памяти. Наличие интактных проб (без Ac/Exp) позволило нам оценить самостоятельный эффект ТCR-активации клеток.

Известно, что функциональная активность Т-лимфоцитов тесно связана с экспрессией CD25 (α -цепь рецептора для IL-2), который представляет собой ранний маркер активации, отражающий способность клетки к дифференцировке и пролиферации. Показано, что самостоятельный эффект ТCR-активации клеток заключался

в значительном повышении экспрессии CD25 на поверхности naive Т-клеток и Т-клеток памяти (рис. 1), что свидетельствует о ранней активации этих клеток. В то же время ТCR-активация клеток не влияла на уровень экспрессии CD28 (рис. 1).

Показано, что на уровне общего пула naive Т-клеток (CD45RA⁺) ТБГ снижал экспрессию CD28 во всех используемых концентрациях (1, 10, 100 мкг/мл), а уровень экспрессии CD25 снижался только ТБГ в высокой концентрации. В то же время на уровне Т-клеток иммунной памяти (CD45R0⁺) эффекты ТБГ, сохраняя свою супрессивную направленность, были иными. Так, ТБГ снижал экспрессию CD25 (10 и 100 мкг/мл), но не влиял на уровень CD28 (рис. 1).

Известно, что молекула CD28 конститутивно экспрессируется на всех naive (CD45RA⁺) Т-клетках и является первичным корецептором, опосредующим их позитивную костимуляцию, играя важную и сложную роль в контроле иммунного гомеостаза [3]. Снижение экспрессии CD28 может приводить к подавлению функциональной активности naive Т-клеток, так как эта молекула участвует в формировании иммунного синапса, взаимодействуя с CD80/86 (B7) на поверхности АПК. Формирование полноценного иммунного синапса, в свою очередь, приводит к антиген-специфической клональной экспансии Т-лимфоцитов. В контексте полученных результатов можно предположить, что в ситуации *in vivo* снижение экспрессии CD28 на naive Т-лимфоцитах под воздействием ТБГ приводит к подавлению иммунного ответа на фетоплацентарные антигены. В то же время «антигенпри-

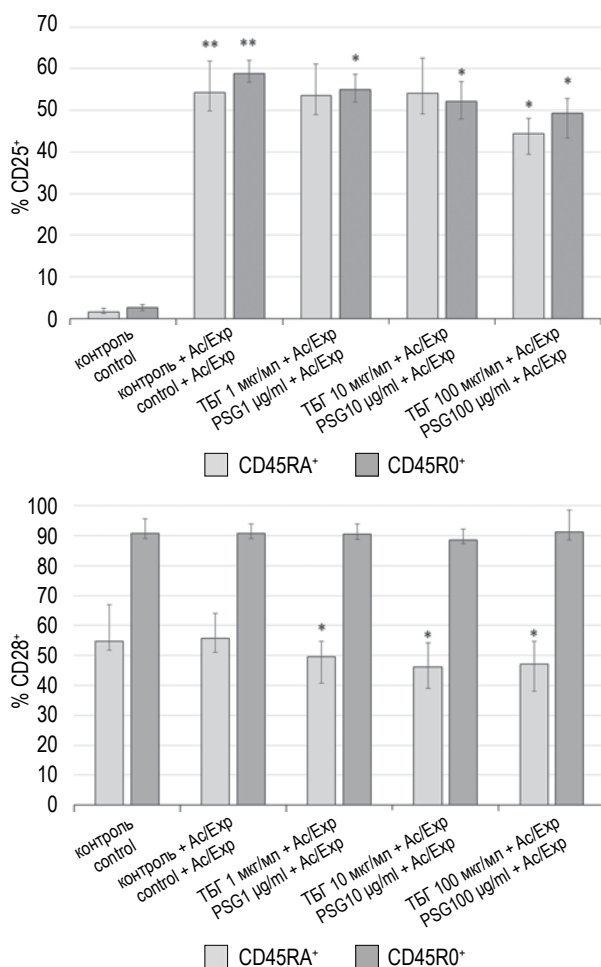


Рисунок 1. Влияние ТБГ на экспрессию CD25 и CD28 в TCR-активированных культурах CD45RA⁺ и CD45R0⁺ T-лимфоцитов (n = 10; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}))

Примечание. * – достоверные по W-критерию Вилкоксона (p < 0,05) различия с контролем + Ac/Exp; ** – достоверные по W-критерию Вилкоксона (p < 0,05) различия с контролем (без Ac/Exp).

Figure 1. The effect of PSG on the CD25 and CD28 expression on TCR-activated CD45RA⁺ and CD45R0⁺ T cells (n = 10; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}))

Note. *, p < 0.05 as compared with control + Ac/Exp, paired Wilcoxon test; **, p < 0.05 as compared with control (without Ac/Exp), paired Wilcoxon test.

мированные» T-клетки (CD45R0⁺) изначально экспрессировали высокие уровни CD28 и были устойчивы к действию ТБГ.

Таким образом, в целом на уровне наивных T-клеток (CD45RA⁺) ТБГ угнетал экспрессию CD28 и CD25, на уровне T-клеток иммунной памяти (CD45R0⁺) угнетая только экспрессию CD25.

Установлено, что добавление T-клеточного активатора способствовало значительному увеличению концентрации IL-2 в среде культивирования (рис. 2). Внесение ТБГ приводило к по-

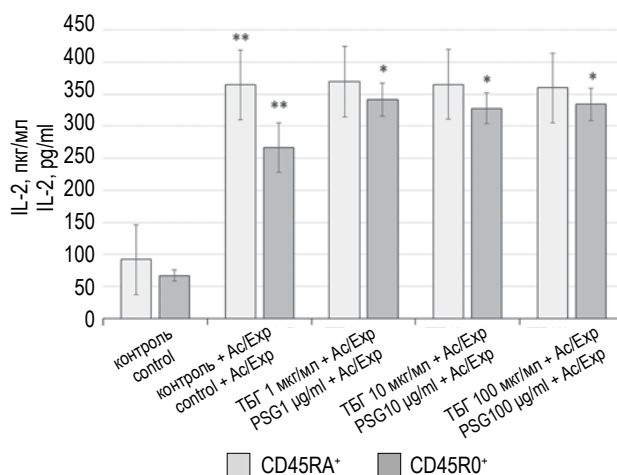


Рисунок 2. Влияние ТБГ на продукцию IL-2 изолированными CD45RA⁺ и CD45R0⁺ лимфоцитами (n = 9; M±σ)

Примечание. * – достоверные по t-критерию Стьюдента (p < 0,05) различия с контролем + Ac/Exp; ** – достоверные по t-критерию Стьюдента (p < 0,05) различия с контролем (без Ac/Exp).

Figure 2. The effect of PSG on IL-2 production by isolated CD45RA⁺ and CD45R0⁺ lymphocytes (n = 9; M±σ)

Note. *, p < 0.05 as compared with control + Ac/Exp, paired Student's t-test; **, p < 0.05 as compared with control (without Ac/Exp), paired Student's t-test.

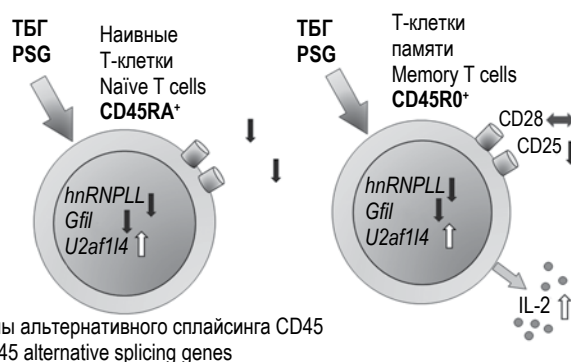


Рисунок 3. Влияние ТБГ на молекулярно-генетические характеристики дифференцировки T-клеток

Figure 3. PSG influence on the molecular genetic characteristics of T cell differentiation

вышению уровня IL-2 в супернатантах культур CD45R0⁺-клеток, однако не влияло на уровень IL-2, продуцируемый наивными T-клетками (CD45RA⁺) (рис. 2). Тот факт, что ТБГ повышает продукцию IL-2 примированными T-клетками памяти, свидетельствует о том, что гормон активно участвует в регуляции активности этих субпопуляций. В то же время повышение IL-2 в нашем исследовании ассоциировано со снижением экспрессии молекулы CD25 (α-цепь рецептора для IL-2) на этих клетках, что можно объяснить аутокринной регуляцией эффектов IL-2.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ТБГ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *hnRNPLL*, *Gfi1* И *U2af114* В КУЛЬТУРАХ TCR-AКТИВИРОВАННЫХ CD45RA⁺ И CD45R0⁺Т-КЛЕТОК

TABLE 2. THE EFFECT OF PSG ON THE *hnRNPLL*, *Gfi1* AND *U2af114* GENES EXPRESSION IN CULTURES OF TCR-ACTIVATED CD45RA⁺ AND CD45R0⁺T CELLS

| | Экспериментальное воздействие Experimental impact | CD45RA ⁺ Уровень экспрессии мРНК, отн. ед. CD45RA ⁺ Level of mRNA expression, relative units | | | CD45R0 ⁺ Уровень экспрессии мРНК, отн. ед. CD45R0 ⁺ Level of mRNA expression, relative units | | |
|---|---|---|--|--|---|--|--|
| | | <i>Gfi1</i> | <i>U2af114</i> | <i>hnRNPLL</i> | <i>Gfi1</i> | <i>U2af114</i> | <i>hnRNPLL</i> |
| 1 | Контроль (без Ас/Ехр) Control (without Ac/Exp) | 0,009 (0,001-0,011) | 0,023 (0,011-0,030) | 0,026 (0,010-0,033) | 0,016 (0,008-0,027) | 0,018 (0,007-0,029) | 0,011 (0,002-0,019) |
| 2 | Контроль + Ас/Ехр Control + Ac/Exp | 0,616 (0,346-0,762) $p_{2-1} < 0,05$ | 0,332 (0,243-0,412) $p_{2-1} < 0,05$ | 0,775 (0,587-0,976) $p_{2-1} < 0,05$ | 0,512 (0,422-0,631) $p_{2-1} < 0,05$ | 0,417 (0,335-0,563) $p_{2-1} < 0,05$ | 0,943 (0,802-1,022) $p_{2-1} < 0,05$ |
| 3 | ТБГ-1 мкг/мл + Ас/Ехр PSG 1 µg/ml + Ac/Exp | 0,414 (0,211-0,465) $p_{3-2} < 0,05$ | 0,612 (0,453-0,721) $p_{3-2} < 0,05$ | 0,701 (0,542-0,789) | 0,313 (0,187-0,421) $p_{3-2} < 0,05$ | 0,611 (0,532-0,723) $p_{3-2} < 0,05$ | 0,675 (0,533-0,711) $p_{3-2} < 0,05$ |
| 4 | ТБГ-10 мкг/мл + Ас/Ехр PSG 10 µg/ml + Ac/Exp | 0,334 (0,252-0,378) $p_{4-2} < 0,05$ | 0,587 (0,443-0,711) $p_{4-2} < 0,05$ | 0,411 (0,345-0,587) $p_{4-2} < 0,05$ | 0,278 (0,203-0,365) $p_{4-2} < 0,05$ | 0,634 (0,508-0,785) $p_{4-2} < 0,05$ | 0,714 (0,665-0,837) $p_{4-2} < 0,05$ |
| 5 | ТБГ-100 мкг/мл + Ас/Ехр PSG 100 µg/ml + Ac/Exp | 0,353 (0,287-0,411) $p_{5-2} < 0,05$ | 0,623 (0,565-0,723) $p_{5-2} < 0,05$ | 0,454 (0,332-0,549) $p_{5-2} < 0,05$ | 0,328 (0,256-0,378) $p_{5-2} < 0,05$ | 0,621 (0,511-0,765) $p_{5-2} < 0,05$ | 0,697 (0,645-0,811) $p_{5-2} < 0,05$ |

Примечание. n = 10, p < 0,05 – достоверные по W-критерию Вилкоксона различия.

Note. n = 10, p < 0.05 according to Wilcoxon test are shown.

Несмотря на то, что присутствие ИЛ-2 является необходимым условием для развития долгоживущих клеток памяти [16], в нашем исследовании Т-клетки иммунной памяти под воздействием ТБГ снижают экспрессию CD25 и вследствие этого, по-видимому, относительно резистентны к ИЛ-2. Тем не менее известно, что ИЛ-2 необходим для развития Т-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества которых ассоциировано с успешной беременностью, и, возможно, именно они являются «мишенью» для ИЛ-2, продуцируемого CD45RA⁺-клетками. Помимо этого, ИЛ-2 ингибирует дифференцировку провоспалительных Th17-клеток, что в контексте беременности оказывает фетопротекторный эффект [13].

Один из механизмов, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, основан на противоположном действии факторов: сплайсинга *U2af114* (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4, *U2af114*) и транскрипции *Gfi1* (growth

factor independent 1), что в конечном итоге определяет образование разных изоформ молекулы CD45 и активацию Т-клеток во время иммунного ответа [7]. В нашем исследовании присутствие TCR-активатора приводило к существенному достоверному повышению экспрессии исследуемых генов (табл. 2).

Культирование наивных Т-клеток с ТБГ способствовало значительному снижению уровня относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1* и *hnRNPLL* по сравнению с активированной пробой. Противоположный эффект ТБГ оказывал на уровень относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* (табл. 2). Важно отметить, что на уровне Т-клеток памяти эффекты ТБГ были аналогичными, что свидетельствует о неких общих механизмах регуляции альтернативного сплайсинга CD45 на уровне Т-клеток.

Известно, что продукты гена *hnRNPLL* (семейство гетерогенных ядерных рибонуклеопротеи-

нов (Heterogeneous 86 nuclear ribonucleoprotein, hnRNPLL-типа)) координируют работу множества транскрипционных факторов в процессе альтернативного сплайсинга Т-лимфоцитов. Функциональную активность гена *hnRNPLL* ассоциируют с экспрессией CD28, и предполагается, что эта взаимосвязь является дополнительным механизмом регуляции альтернативного сплайсинга CD45 [6]. В частности, повышенная экспрессия гена *hnRNPLL* вызывает пропуск 4 экзона, что приводит к формированию короткой изоформы CD45R0 [15]. В контексте нашей работы снижение экспрессии гена *hnRNPLL* под воздействием ТБГ, по-видимому, блокирует транскрипцию наивных Т-клеток в Т-клетки памяти (CD45R0⁺).

Помимо участия продуктов гена *hnRNPLL* в регуляции альтернативного сплайсинга молекулы CD45, важную роль в этом процессе отводят совместным действиям вспомогательного фактора сплайсинга U2AF26 (*U2af114*) и фактора транскрипции *Gfi1*. Считается, что антагонистические взаимодействия U2AF26 и *Gfi1* определяют соотношение изоформ CD45: U2AF26 способствует исключению 4 экзона, что приводит к формированию коротких изоформ – CD45R0, тогда как *Gfi1* способствует образованию более активной, высокомолекулярной формы рецептора – CD45RB или RA [7]. Таким образом, выявленные нами эффекты ТБГ, по-видимому, препятствуют генерации более активной, высокомолекулярной формы рецептора – CD45RB или RA за счет пониженной экспрессии *Gfi1*. В то же время повышение экспрессии *U2af114*, которое может способствовать формированию CD45R0, компенсируется сниженной экспрессией гена *hnRNPLL*, который оказывает противоположный эффект на формирование «зрелой» формы CD45R0.

Заключение

Резюмируя вышесказанное, следует заключить, что в ходе выполненного исследования получены данные, характеризующие эффекты ТБГ на молекулярно-генетические процессы дифференцировки наивных Т-клеток и Т-клеток памяти, ассоциированные с мембранной экспрессией молекул костимуляции/активации (CD28 и CD25), продукцией IL-2 и изменением уровней транскрипции мРНК генов *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL* и *hTERT*, определяющих соотношение вариантов рецептора CD45.

Итоговая схема полученных эффектов представлена на рисунке 3. Так, установлено, что на уровне наивных Т-клеток (CD45RA⁺) ТБГ угнетал экспрессию CD28 и CD25, не влияя на продукцию этими клетками IL-2. В то же время на уровне Т-клеток иммунной памяти (CD45R0⁺) ТБГ подавлял экспрессию CD25 и продукцию IL-2 этими клетками. Параллельно оценивали экспрессию генов *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, кодирующего CD45, поскольку именно по этому маркеру дифференцируются Т-клетки иммунной памяти. Установлено, что ТБГ снижал экспрессию генов *Gfi1*, *hnRNPLL*, но повышал экспрессию гена *U2af114* в исследуемых субпопуляциях Т-клеток, препятствуя, таким образом, формированию «зрелой» изоформы CD45R0.

В целом ТБГ снижает функциональную активность наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти, связанную с экспрессией CD25 и CD28. Полученные данные расширяют представления о роли ТБГ в регуляции молекулярно-генетических механизмов дифференцировки наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти.

Список литературы / References

1. Заморина С.А., Раев М.Б. Изучение иммуномодулирующих эффектов трофобластического β 1-гликопротеина человека // Физиология человека, 2015. Т. 41, № 1. С. 117-123. [Zamorina S.A., Rayev M.B. Immunomodulating effects of human pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*, 2015, Vol. 41, no. 1, pp. 117-123. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 4 (17). С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4 (17), pp. 947-964. (In Russ.)]
3. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2014. Т. 6, № 1. С. 7-26. [Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sohoneyevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 6, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.

4. Посисеева Л.В., Назаров С.Б., Татарин Ю.С. Трофобласт-специфический бета-гликопротеин в акушерстве и гинекологии. Иваново: ОАО «Издательство Иваново», 2004. 240 с. [Posiseeva L.V., Nazarov S.B., Tatarinov Yu.S. Trophoblast-specific beta-glycoprotein in obstetrics and gynecology]. Ivanovo: Ivanovo Publishing, 2004. 240 p.
5. Раев М.Б. Способ выделения и очистки трофобластического β -1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449, опубликован 20.09.2009, Бюл. № 26. [Rayev M.B. A method for the isolation and purification of trophoblastic β -1-glycoprotein. Patent of the Russian Federation No. 2367449, published on September 20, 2009, Bul. No. 26].
6. Butte J.M., Lee J.S., Jesneck J. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 6, e40032. doi: 10.1371/journal.pone.0040032.
7. Heyd F., ten Dam G., Möry T. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 8, pp. 859-867.
8. Kieffer T.E., Faas M.M., Scherjon S.A., Prins J.R. Pregnancy persistently affects memory T cell populations. *J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 119, pp. 1-8.
9. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta C(T)). *Methods*. 2001, Vol. 25, pp. 402-408.
10. Martinez F.F., Cervi L., Knubel C.P., Panzetta-Dutari G.M., Motran C.C. The role of pregnancy-specific glycoprotein 1a (PSG1a) in regulating the innate and adaptive immune response. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, pp. 383-394.
11. 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. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity*, 2007, Vol. 27, no. 3, pp. 425-437.
12. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-specific β 1-Glycoproteins: combined biomarker roles, structure/function relationships and implications for drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2016, Vol. 23, pp. 245-267.
13. Russell S.E., Moore A.C., Fallon P.G., Walsh P.T. Soluble IL-2R α (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 10, e47748. doi: 10.1371/journal.pone.0047748.
14. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta*, 2012, Vol. 413, no. 17-18, pp. 1338-1349.
15. Topp J.D., Jackson J., Melton A.A., Lynch K.W. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4. *RNA*, 2008, Vol. 14, no. 10, pp. 2038-2049.
16. Williams M.A., Tzgnik A.J., Bevan M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature*, 2006, Vol. 441, pp. 890-893.
17. Wu Z., Yates A.L., Hoyne G.F., Goodnow C.C. 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.*, 2010, Vol. 185, pp. 231-238.

Авторы:

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., заведующая базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Юрова К.А. — к.м.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Rayev M.B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Yurova K.A., PhD (Medicine), Research Associate, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khaziakhmatova O.G., PhD (Biology), Research Associate, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Тимганова В.П. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Храмцов П.В. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия; научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Timganova V.P., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Khramtsov P.V., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm; Research Associate, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Поступила 09.04.2018
Отправлена на доработку 10.05.2018
Принята к печати 22.05.2018

Received 09.04.2018
Revision received 10.05.2018
Accepted 22.05.2018