

ЗАСТОСУВАННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ПРОТЕЇНІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ

Г. А. ЛЮБЧЕНКО¹, Р. М. МОРЕВ², Л. С. ХОЛОДНА¹, Л. І. ОСТАПЧЕНКО³

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка

²Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ

³Інститут біології Київського національного університету імені Тараса Шевченка

E-mail: moriev.r.m@gmail.com

Отримано 18.05.2012

Активация імунних клітин — ключова ланка процесу формування специфічного імунітету. Методи моніторингу руху й активності сигнальних месенджерів та рецепторних протеїнів лімфоцитів у живих клітинах і тканинах є методологічною основою для розуміння тонких механізмів активації лімфоцитів.

Шляхи передачі сигналу в лімфоцитах функціонують як сітка фосфатаз, протеїнкіназ і сигнальної системи іонів кальцію. Сигнальні молекули, змінюючи свою структуру, утворюючи комплекси і переміщуючись з одного клітинного компартмента в інший, забезпечують процес активації.

Особливості молекулярних механізмів активації лімфоцитів і сучасні генетично закодовані флуоресцентні протеїни уможливають створення нових імунологічних тест-систем. Флуоресцентні протеїни можуть бути використані як репортери, маркери локалізації та донорно-акцепторні пари для методу резонансної передачі енергії флуоресценції. Множинні генетично кодовані рекомбінантні флуоресцентні протеїни, одночасно експресовані в одній клітині для дослідження сигнальних шляхів можуть набути широкого застосування для вивчення сигнальних шляхів лімфоцитів у фармацевтиці, молекулярній імунології, біотехнології та біомедицині.

Ключові слова: активація лімфоцитів, протеїнкіназа, кальцій, тест-система, флуоресцентний протеїн.

Формування специфічної ланки імунітету неможливе без активації імунних клітин. Процес активації лімфоцитів має спільну молекулярну основу з механізмами регуляції розмноження та диференціації в інших клітинах і певні особливі риси, пов'язані з функціональними пристосуваннями клітин імунної системи [1–3]. Створення тест-систем для дослідження активації лімфоцитів має як теоретичне, так і прикладне значення в ветеринарії, імунології, онкології та фармакології. Ці тест-системи мають бути швидковиконуваними та зручними. Такі методи і відповідні експериментальні моделі повинні давати можливість кількісно та якісно охарактеризувати відгуки сигнальних систем клітин імунної системи за умов дії досліджуваних речовин [4, 5].

Класичні тест-системи для визначення рівня активації лімфоцитів

Активациєю лімфоцитів називають усі внутрішньоклітинні біологічні процеси, які

починаються зі взаємодії антигену (ліганду) з рецепторами лімфоцитів і закінчуються синтезом цитокінів. Активация спричинює запуск певних ефекторних механізмів імунної відповіді. У класичному тесті активації лімфоцитів використано явище бласттрансформації *in vitro*, яке можна кількісно оцінити за допомогою мікроскопа і вимірювати за включенням радіоактивно міченої ДНК. В іншій модифікації реакції бласттрансформації застосовують 3-4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифенілтетразол (МТТ), продукт відновлення якого — диформазан — забарвлює живі клітини в синій колір і дає змогу оптичними методами визначати їхню щільність. Обидві методики потребують декількох діб на серію аналізів, а в разі застосування радіоактивної мітки — спеціального облаштування лабораторії та реактивів, мічених радіоактивними ізотопами. Окрім того, ці методи не дозволяють відслідковувати сигнальні механізми активації, які відрізняються залежно від типу мітогену, не

вказують на напрямки диференціації, частоту апоптозу і некрозу та фізіологічний стан лімфоцитів до і після стимуляції [6–8].

Мітогени можуть реалізовувати свої ефекти, залучаючи різні сигнальні шляхи. Але серед різноманіття механізмів можна виділити найбільш універсальні, ключові, які визначають особливості перебігу імунологічної реакції. Тому слід розглянути та функціонально охарактеризувати основні ланки сигнальних каскадів лімфоцитів.

Роль фосфорилування протеїнів в активації лімфоцитів

Принципи функціонування сигнальних каскадів В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів та НК-клітин схожі. У процесі передачі сигналу фосфатази, кінази та адапторні протеїни втрачають або отримують фосфатний залишок, змінюють свою доменну структуру й агрегують у підмембранному комплексі. Вважають, що ключовим моментом в активації Т-лімфоцитів антигеном є підвищення рівня фосфорилування тирозинових залишків імунорецепторного тирозинвмісного активаційного мотиву (ІТАМ) у субодиницях Т-клітинного рецептора (ТКР) під дією кіназ родини Src — Lck і Fyn (в окремих випадках — c-Yes). Достойно невідомо, яким чином розпізнавання антигену ТКР спричинює його фосфорилування. Запропоновано моделі, в яких цитозольна тирозина протеїнфосфокіназа (Lck), зв'язана з корецептором CD 4 чи CD 8, наближується до ТКР, а корецептор у разі розпізнавання антигену агрегує з ТКР. Підвищена локальна концентрація кіназ та їхніх субстратів, імовірно, призводить до олігомеризації різних субодиниць у процесі утворення імунологічного синапсу і витіснення тирозинових протеїнфосфатаз (ТПФ) та кінази Csk, яка фосфорилує Lck, дезактивуючи її. Обидва механізми не є взаємовиключними і можуть реалізовуватись одночасно. Фосфорилування ІТАМ є оборотним в інтактних Т-лімфоцитах. Таким чином підвищене фосфорилування ІТАМ після активації може бути досягнуто збільшенням рівня фосфорилування та зменшенням інтенсивності дефосфорилування або комбінацією обох процесів. У лініях клітин, нокаутних за Lck, таких як Jurkat CaM1, активація ТКР зумовлює незначне фосфорилування ζ -ланцюгів, істотно знижене зв'язування і відсутність фосфорилування незамінної для активації тирозинової протеїнкінази ZAP-70. Іншими важливими для активації Т-лімфо-

цитів кіназами із групи протоонкогенів є VAV та SLP-76. Дефектність гена SLP-76 призводить до Т-клітинного імунодефіциту [9].

Процес дефосфорилування є так само важливим, як і процес фосфорилування, і, відповідно, протеїнфосфатази є інтегральними компонентами сигнальних систем, керованих протеїнкіназами. Було встановлено, що за відсутності в клітинах активної мембранної фосфатази з антигенним маркером CD-45 протеїнкіназа Lck залишається неактивною, і фосфорилування за тирозином не відбувається. Активація CD45 невідомим лігандом (що, можливо, сприяє розділенню димерів фосфатази) викликає дефосфорилування амінокислотного залишку Y505 Lck, від'єднання каталітичного домену від блокувального домену Sh2 і уможливорює активацію після додаткового автофосфорилування амінокислотного залишку Y394. Після цього Lck здатна фосфорилувати субстрати, зокрема домени ІТАМ в субодиницях ТКР, так само вона функціонує і в НК-кілерах [10].

Протеїнфосфокіназа Lyn відіграє аналогічну роль в В-лімфоцитах під час передачі сигналів активації від В-клітинного рецептора (ВКР): активується тирозиною протеїнфосфатазою С; запускає процес вивільнення інозитолтрифосфату (ІР3); фосфорилує протеїнкіназу Syk, яка функціонально подібна до Zap-70; фосфорилує сигнальні та адапторні протеїни. Подібно до Lck у цієї протеїнфосфатази є інгібіторні домени Sh2 та Sh3, які, від'єднуючись від каталітичної субодиниці, стають рухливими. Слід зазначити, що всі вищезгадані протеїни просторово взаємодіють в одному комплексі на мембранах імунологічного синапсу чи ендцитозного пухирця з корпускулярним антигеном [11].

Шляхи трансдукції сигналу активації в цитозоль та ядро

На сьогодні досліджено основні й найважливіші сигнальні шляхи, які передають сигнал активації в цитозоль та клітинне ядро лімфоцитів: кальцієвий сигнальний шлях, шлях протеїнкінази С (ПКС), який тісно зв'язаний з першим, MAP-кіназні каскади сигналювання, протеїни родин JAK/STAT та NF- κ B.

MAP-кіназні сигнальні каскади

MAP-кінази (англ. mitogen activated protein kinases) — фосфокінази, які регулюють багато процесів у клітинах різних організмів: тварин, рослин, грибів. У хребетних

регуляторні протеїни цієї групи, впливаючи на диференціацію, апоптоз та розмноження клітин, регулюють процеси росту, розвитку й регенерації організму.

Існують три основні групи MAP-кіназ у тваринних клітинах:

- протеїнкінази, що регулюються зовнішньоклітинними сигналами (англ. extracellular signal-regulated protein kinases — ERK);

- p38 MAP-кінази;

- c-Jun NH₂-кінцеві кінази (JNK) [12].

ERK-шлях було вперше ідентифіковано як нижню ланку передачі сигналу від Ras (рис. 1). Він задіяний у регуляції клітинного росту та диференціації. Сигнали від Ras у цьому каскаді з трьома послідовними групами кіназ належать до так званого MAP-кіназного модуля. Ізоформи кінази Raf є проксимальними кіназами у модулі ERK1/2. Після активації вони фосфорилують та активують MAP/ERK-кінази MEK1 (p45) і MEK2, які мають подвійну специфічність і фосфорилують треонін та тирозин регуляторного мотиву ERK. MAP-кінази p42 і p44 — ERK 1/2 — це змішані серинові та треонінові кінази, які швидко активуються під дією різних зовнішньоклітинних стимулів. Є дві ізоформи ERK — ERK 1 та ERK 2, які іноді називають p44/p42 MAP-кіназами. MAP-кінази ERK 1 та ERK2 — перші ідентифіковані ефектори сигнального каскаду Ras із різноманітними сигнальними властивостями, що беруть участь в різних фізіологічних реакціях. Під дією мітогенних стимулів цей регуляторний шлях активується в процесі переходу від фази G0 до G1. У ході активації кінази ERK транслокуються в ядро протягом 15 хв, як це було продемонстровано на лінії фібробластів *in vitro*. Гіперекспресія ERK призводить до їх константної транслокації в ядро. Показано, що після активації клітин базофільної лейкемії щурів (RBL-2H3) за допомогою антитіл до імуноглобулінового рецептора типу E MEK-кінази ERK2 транслокується в ядро протягом 6–7 хв на початку активації, а потім полишає ядро (рис. 1) [13–15].

Каскад гуаніннуклеотидзв'язувального протеїну Ras із молекулярною масою 21 кДа є одним із сигнальних каскадів ТКР. Між цим сигнальним протеїном та ТКР функціонують посередники: перші три протеїни — тирозинові кінази HSC, Lnk, протеїн обміну ГДФ на ГТФ SOS — тимчасово агрегують із фосфорильованими залишками ITAM ζ-ланцюгів, фосфорилуються під дією вищепи-саної кінази Zap-70 та споріднених з нею

кіназ. Потім цей комплекс протеїнів фосфорилує фосфатазу Grb-2, протеїн обміну ГДФ на ГТФ p120-GAP, протеїнфосфокіназу SLP76 та адапторний протеїн Grb2. Це спричинює заміщення зв'язаного з Ras ГДФ на ГТФ. Заміна нуклеотидів активує Ras, який активує MAP-кіназний каскад SOS-RAS-RAF-MEK-ERK (рис. 1) [16–19].

Дефектність активації RAS та ERK виявлено в анергічних клонах Т-лімфоцитів, стимульованих без коstimуляції CD28 [20–22]. Окремі дослідження показали, що інгібування тільки ERK не впливає на індукцію анергії [20], а отже, незрозуміло, чи дефект ERK є тільки результатом анергії, чи разом з іншими регуляторними шляхами робить свій внесок в анергію. Попри це є переконливі докази ролі ERK-шляху в селекції тимоцитів — в ERK 1-дефектних мишей виявляли порушення дозрівання Т-лімфоцитів [12]. Використовуючи трансгенних мишей H-RAS, у яких активацію ERK через ТКР було порушено, встановили, що цей шлях необхідний для диференціації Т-хелперів другого типу [16]. Подібні результати отримали із цими самими клітинами дикого типу, обробленими інгібіторами MEK. Автори продемонстрували, що функції шляху ERK — підвищувати індуковане ІЛ-4 фосфорилування STAT6 та рецептора ІЛ-4, і це можна вважати механізмом перехресної регуляції між ранніми й пізніми сигнальними шляхами активації. Клінічні дослідження показали, що підвищення проліферативного індексу великих гранулярних лімфоцитів супроводжується константною активацією шляху RAS — ERK у проліферуючих НК. Інгібування цього кіназного каскаду спричинює масову загибель лімфоцитів шляхом апоптозу, що свідчить про важливу роль цього сигнального шляху в НК-клітинах [24]. ERK-кінази беруть участь і в активації В-лімфоцитів. Цей каскад не має суттєвого впливу на ВКР-індуковану затримку клітинного циклу та апоптоз В-лімфоцитів, однак його активація необхідна для дозрівання В-лімфоцитів та експресії відповідних поверхневих антигенів [25]. Продемонстровано, що сила і тривалість активації ERK визначає шлях розвитку Т-лімфоцитів [26].

Інгібування p38MAPK послаблює CD40-опосередкований мітогенний вплив на В-лімфоцити, але посилює мітогенні стимули ВКР. Активність p38MAPK необхідна для експресії CD 54, ICAM-1 у відповідь на мітоген. У Т-лімфоцитах ця кіназа потрібна для синтезу ІЛ-2, ІЛ-4 та ІFN-γ під дією мітогенів [27].

Стимуляція В-клітин через рецептор CD40 призводить до активації кіназ JNK та p38MAPK (але не ERK), тимчасом як стимули ВКР спричиняють підвищення активності тільки ERK і зумовлюють апоптичну загибель лімфоцитів без костимуляції через CD40 [28].

Мутації кінази JNK2 блокують передачу сигналу до Jun, на рівні організму в моделі генетичного нокауту мишей це супроводжується різким зниженням секреції IFN- γ та імунної відповіді [29].

Активаційні стимули через протеїн CREB активують транскрипцію c-Jun-субстрату JNK та ERK у В-лімфоцитах і таким чином посилюють ефект цих кіназ на транскрипцію [30].

P38 MAPK, c-Jun в активних, фосфорильованих формах транслокуються в ядро, де формують транскрипційний комплекс. Комбінації стимулів різної інтенсивності через вищезазначені MAP-кіназні шляхи є критичними для детермінування напряму розвитку НК, Т- та В-клітин [30, 31].

Отже, сигнальні каскади, пов'язані з MAP-кіназами, є необхідними для нормального функціонування різних субпопуляцій лімфоцитів. Внесок різних сигнальних протеїнів та кіназ варіює залежно від характеристики стимулу та субпопуляції клітин. Тому кількісне оцінювання цих сигналів можна використовувати для встановлення природи ефекту досліджуваних речовин. Дані щодо активності сигнальних шляхів у різних імунологічних реакціях можуть застосовуватись як «фінгерпринт» відповідних імунологічних процесів.

Сигнальний шлях протеїнкінази С

Під час активації кіназ ТКР та ВКР шляхом фосфорилування активується фосфоліпаза С (PLC), яка вивільнює інозитол — 1, 4, 5-трифосфат та діацилгліцериди з фосфоліпідів плазматичної мембрани. Паралельно активуються та залучаються в підмембранний комплекс фосфатиділінозитол-3-кінази, які синтезують фосфатиділінозитол-3-фосфат, фосфатиділінозитол-3, 4-дифосфат та фосфатиділінозитол-3, 4, 5-трифосфат. Ці фосфоліпіди забезпечують зв'язування РКС ζ і РКС θ та необхідної для їх активації фосфоінозитолзалежної фосфопротеїнкінази 1 (PDK1). РКС β , РКС δ , РКС γ активуються продуктом PLC — діацилгліцеролом та іонами кальцію. РКС ζ має особливе значення для передачі мітогенних стимулів у В-лімфоцитах, підвищуючи активність ERK 1/2, NF- κ B та викликаючи реорганізацію

цитоскелета, передає також сигнал під час дегрануляції цитотоксичних лімфоцитів зв'язаним на поверхні антигеном. Нокаут цього гена призводить до недорозвиненості фолікулів лімфоїдних органів, порушення дозрівання В-лімфоцитів. РКС ζ , РКС θ , РКС β , РКС δ , РКС γ беруть участь в активації NF- κ B, формуванні транскрипційного комплексу AP-1 у лімфоцитах за дії мітогенів, тому також необхідні для активації лімфоцитів. Мутації генів цих ізоформ РКС призводять до патології імунної системи. Окрім того, молекули РКС транслокуються в ядро лімфоциту в процесі його активації, забезпечуючи фосфорилування ядерних протеїнів [33–37].

Сигналізування іонами кальцію

Вивільнення кальцію з депо ініціюється IP3 зазвичай через відповідні рецептори в ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР) та підтримується позитивним зворотним зв'язком через кальційчутливі р'анодинові рецептори. Падіння концентрації іонів кальцію в ендоплазматичному ретикулумі зумовлює входження іонів кальцію із зовнішньоклітинного середовища. Кальцієвий канал, який забезпечує входження іонів кальцію із зовнішньоклітинного середовища, складається із двох субодиниць: порфомувальної субодиниці, продукту гена ORAI, та сенсора кальцію STIM. Він вбудований у мембрану ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) і реагує на зниження концентрації іонів кальцію в ньому димеризацією з CRACK. Ця взаємодія і спричинює активацію поротвірної субодиниці й так зване депо-залежне входження кальцію. Іони кальцію за умови їх підвищеної концентрації в цитозолі змінюють конформацію кальційчутливих регуляторних доменів, що призводить до значної зміни активності протеїнкіназ. Дослідження на культурі Т-клітин лінії Jurkat продемонстрували, що входження кальцію в цитозоль опосередковано активує ERK1. Кальцинейрин після входження кальцію в цитозоль стимулює ядерний фактор активації Т-лімфоцитів (NFAT), який, у свою чергу, індукує експресію цитокинів, транслокуючись в ядро. Окрім того, кальмодулін та інші кальцієві сенсори фосфорилують низку протеїнів, у тому числі компоненти цитоскелета, змінюючи рухливість структури цитоплазми. Трансдукція сигналу також забезпечується каскадом, в який послідовно входять кальмодулін, кальмодулінзалежна протеїнфосфокіназа, Lck, кінази ERK-шляху, власне ERK [38, 39].

Навіть короткочасне чи локальне підвищення концентрації цитозольного кальцію може слугувати значним стимулом для активації лімфоцитів та вмикання певних генетичних програм диференціації. Тому нокаутні за відповідними генами лімфоцити нездатні до індукції депозалежного входження іонів кальцію і не активуються у відповідь на мітогенний стимул. Ці механізми функціонують як у В-лімфоцитах, так і в НК- та Т-лімфоцитах [40–42].

Багато імуноактивних речовин впливають на кальцієве сигналізування та активність фосфокіназ. Так, наприклад, доведено, що токсини, протеїни адгезини та протеїн А золотистого стафілокока мають мембранотропні властивості й змінюють мембранну іонну провідність, зокрема стосовно іонів кальцію. Водночас ці біологічно активні субстанції активізують рецептори лімфоцитів і відповідні протеїнофосфатази та протеїнофосфокінази [43–47].

Таким чином, кальцієві сигнали та сигналізування через РКС активуються комплексом кіназ рецепторів лімфоцитів. PLC є тією ланкою, яка об'єднує РКС та кальцієве сигналізування, адже продукти реакції PLC — IP3 та діацилгліцерол — активують обидва каскади. Кальцій необхідний для функціонування вищезазначених ізоформ РКС. Загалом обидві сигнальні системи забезпечують реорганізацію цитоскелета та формування транскрипційних комплексів.

Роль інтерлейкінів та сигнальних протеїнів Jak/STAT

Інтерлейкіни відіграють важливу роль на всіх етапах регулювання активації лімфоцитів. Цитокіни, передусім інтерлейкіни, визначають напрямок диференціації імунних клітин, залучають ті чи інші ефекторні механізми імунної системи, наприклад, ІЛ-12 необхідний для диференціації недиференційованих Т-хелперів у Т-хелпери 1-го типу та підтримки їх функціонального стану. Т-хелпери 1-го типу забезпечують клітинний імунітет проти вірусів і прокаріотичних внутрішньоклітинних паразитів [48]. ІЛ-1 активує NF-κB, MAPK, JNK Т-лімфоцитів, що забезпечує важливий костамуляторний ефект *in vivo* (рис. 1). Інші інтерлейкіни активують сигнальні протеїни JAK/STAT — ядерні месенджери, активатори транскрипції, які транслокуються в ядро у фосфорильованому стані. Нещодавні дослідження показали, що інтерлейкіни ІЛ-6, ІЛ-7, ІЛ-15 не тільки беруть участь у кін-

цевих етапах стимуляції лімфоцитів і впливають на процес формування клітин пам'яті, але й можуть самостійно, без участі антигенспецифічних рецепторів активувати лімфоцити та підтримувати їх проліферацію. ІЛ-6 активує STAT 1 і STAT 3, а ІЛ-7 та ІЛ-15 — STAT 5 [49].

Роль сигнальних протеїнів родини NF-κB

Родина протеїнів NF-κB — важлива група сигнальних протеїнів в імунній системі. До неї належать NF-κB₁(p105/p50), NF-κB₂ (p100/p52), RelA (p65), RelB і c-Rel. Перші два представники утворюються під час протеолітичного розщеплення попередників, у яких два ланцюги залишаються переважно в димері. Три інші утворюють гомодимери та гетеродимери з різними представниками групи. Із димерами взаємодіє додатково низка інгібуючих протеїнів: p105 з NF-κB₁, p100 з NF-κB₂, IκBα, IκB, IκB та Bcl-3, які, у свою чергу, закріплюються через анкірин у підмембранному комплексі. Під час активації Toll-like рецепторів на лімфоцитах та макрофагах бактеріальними субстанціями, наприклад ліпополісахаридом, під дією TNFα, ІЛ-18 та ІЛ-1, через костамуляторні молекули CD28 та CD40 відбувається активація кіназ IKK (α, β, γ). IKK фосфорилують інгібіторні протеїни, що призводить до їх убіквітинзалежного протеолізу та вивільнення димерів NF-κB. NF-κB містять сигнальні послідовності ядерної локалізації. Потрапляючи в ядро, ці протеїни зв'язуються з регуляторними елементами і таким чином активують експресію низки хемокінів, цитокінів та протеїнів адгезії залежно від типу клітин імунної системи. Під час активації Т-лімфоцитів через ТКР РКС активує NF-κB (рис. 1). Спадкове блокування активності протеїнів цієї родини призводить як до апоптичної загибелі наївних лімфоцитів, так і до порушення нормальної реактивності лімфоцитів та антигенпрезентуючих клітин на патогенні організми, а гіперактивація — до лімфом та неконтрольованої проліферації лімфоцитів. Активація їх необхідна для формування клітин пам'яті.

Протеїни родини NF-κB реагують на різноманітні стимули, у тому числі неімунологічної природи, наприклад інтенсивні фізичні навантаження, інтегруючи імунологічні реакції у фізіологічні системи регуляції всього організму [50–54]. Сучасні уявлення та наші узагальнення основних механізмів трансдукції сигналів у лімфоїдних клітинах відображено на схемі (рис. 1).

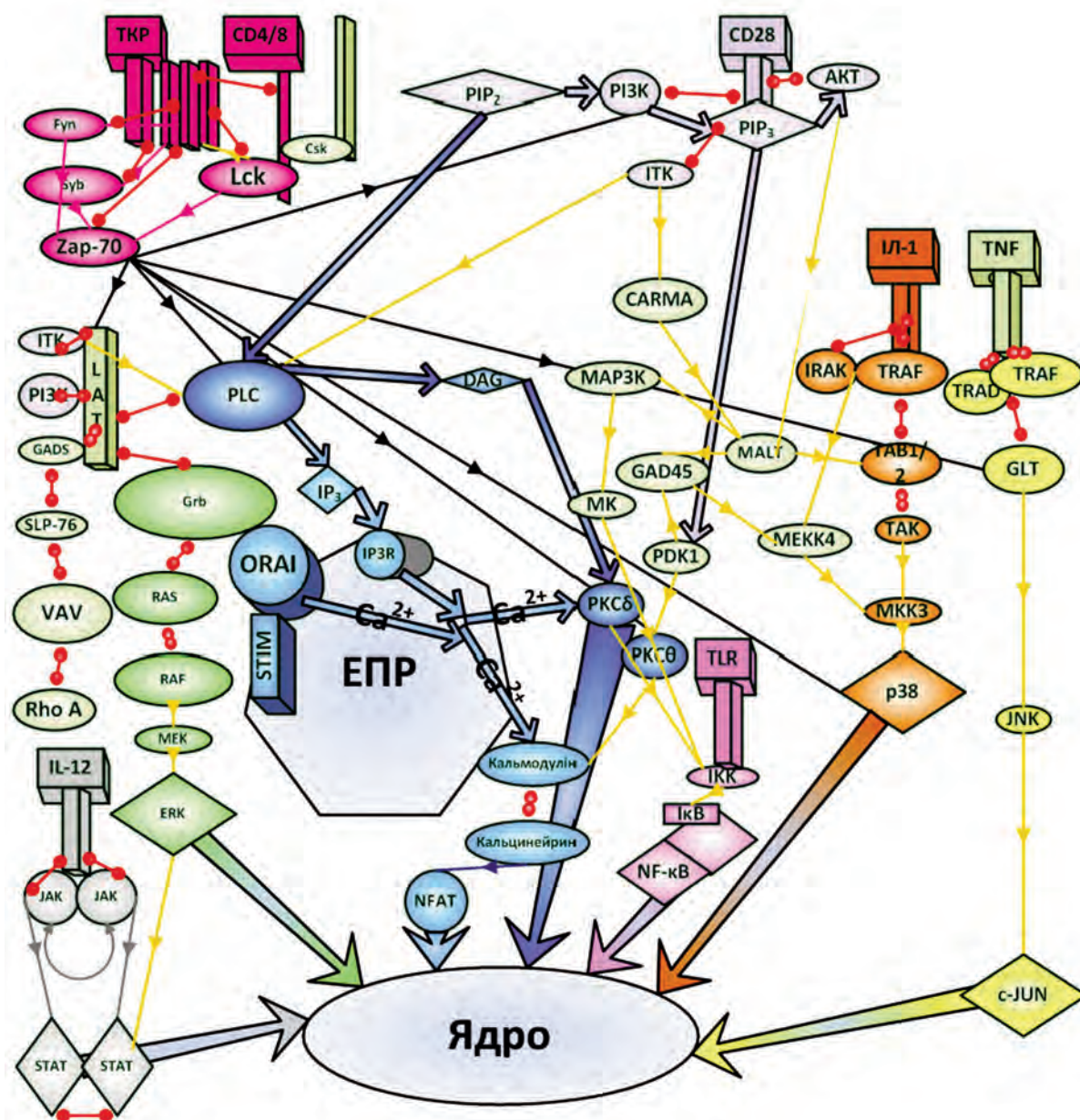


Рис. 1. Молекулярні механізми трансдукції активаційних сигналів у лімфоцитах: товстими стрілками позначено внутрішньоклітинне транспортування, тонкими — фосфорилування та дефосфорилування, лініями з кулями — агрегування

Конструювання тест-систем на основі флуоресцентних протеїнів

Підсумовуючи вищезазначене, можна поділити внутрішньоклітинні сигнальні шляхи активації лімфоїдних клітин за принципом їх реалізації на молекулярному рівні на 4 типи. Перший тип — хімічна модифікація молекули та зміна її конформації, до нього можна віднести фосфорилування ITAM рецепторів імунокомпетентних клітин та Fyn, Syk, Csk, Zap-70. Фосфорилування та дефосфорилування

супроводжуються зміною взаємного розташування доменів; прикладом значної перебудови третинної структури протеїну є кінза Lck. Для того щоб ідентифікувати молекулярну перебудову в інтактних клітинах, зазвичай застосовують методи резонансної передачі енергії флуоресценції (FRET — англ. Forster resonance energy transfer — резонансна передача енергії Фьорстера) та люмінесценції (LRET — англ. luminescence resonance energy transfer). Найсучаснішими варіаціями першого із методів є застосування

генетично кодованих флуоресцентних протеїнів. Суть цього методу полягає в застосуванні генетично модифікованих сигнальних протеїнів, які на обох кінцях або в інших ділянках несуть додаткові домени флуоресцентних протеїнів з різними довжинами хвиль поглинання та збудження. Зміна взаємного розташування доменів призводить до зміни ефективності передачі енергії флуоресценції від одного флуоресцентного протеїну до іншого. Це відображається у вигляді зміни спектра флуоресценції, а також спектра збудження та часу напіврозпаду збудженого стану флуоресцентної молекули і тому може бути кількісно виміряно за допомогою детекції одного із трьох параметрів флуоресценції. Отримують ці протеїни експресією в клітинах *in vitro*, застосовуючи методи генетичної інженерії, а спостерігають за допомогою флуоресцентних мікроскопів зі звичайним або конфокальним об'єктивом, а також за допомогою методу проточної цитометрії. Можливі варіанти експресії цих протеїнів:

1) у виділених *ex vivo* трансфектованих тканинах чи клітинах для тимчасової культури;

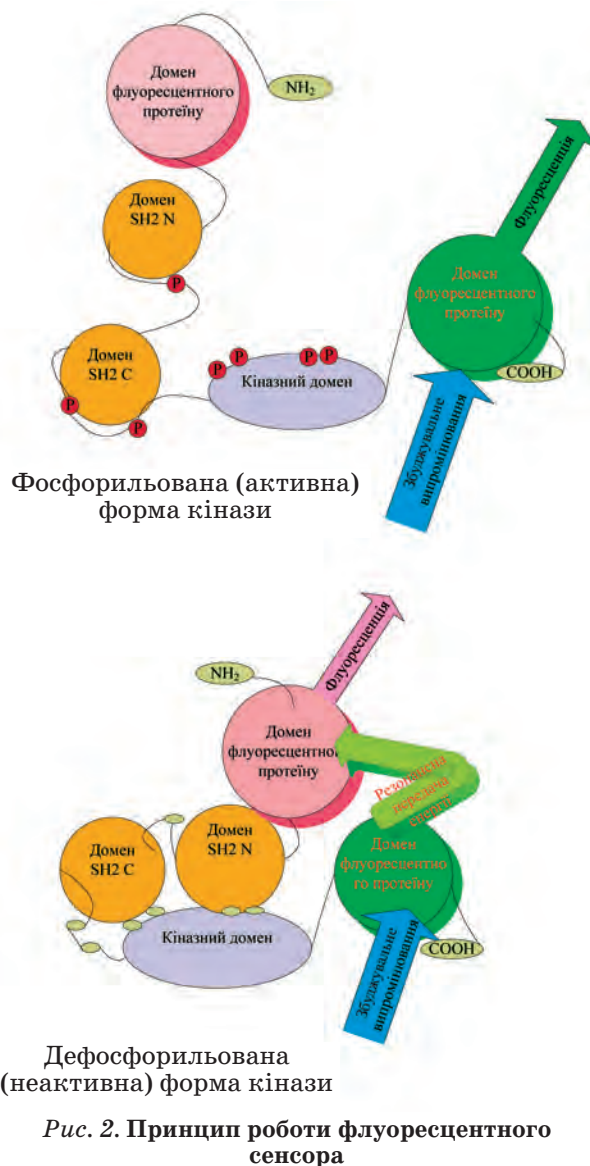
2) у постійних культурах онкотрансформованих, стовбурових, напівстовбурових, ембріональних клітин;

3) у генетично модифікованих організмах, що уможливорює проведення дослідження на препаративних клітинах і тканинах без попередньої трансфекції, а також *in vivo* [55–60].

Для скринінгових досліджень оптимальним є застосування постійних культур генетично модифікованих культур клітин, оскільки в цьому разі вдається отримати стабільний, відтворюваний рівень експресії, і такий метод може застосовуватись у режимі потоку зразків.

Створено специфічні внутрішньоклітинні сенсори активності кінази ERK2 на основі резонансної внутрішньомолекулярної передачі енергії флуоресценції. Вони містять субстратний пептид для ERK2, домен, який зв'язує фосфорильовану форму пептиду, та два різні флуоресцентні домени на С- та N-кінцях, між якими може відбуватися резонансне перенесення енергії флуоресценції. Принцип роботи сенсора ґрунтується на зв'язуванні субстратспецифічного сайту ERK2 з фосфорильованим пептидом, що призводить до зближення флуоресцентних протеїнів та відповідної зміни спектра флуоресценції: послаблення короткохвильової та посилення довгохвильової компоненти [59].

Аналогічна конструкція можлива з Lck, в якій на N- та С-кінцях міститимуться два різні флуоресцентні домени зі спектральними характеристиками, оптимальними для FRET. Вивільнення каталітичного домену за умов відсутності інгібуючого фосфорилування інгібування кіназою Csk впливатиме на ефективність передачі енергії флуоресценції. За умов оптимізації довжин лінкерів між власне Lck та флуоресцентними домонами можна отримати ефективний флуоресцентний сенсор ранніх етапів активації Т-лімфоцитів. Подібні конструкції тирозिनорних протеїнкіназ Syk у моделі Т-лімфоцитів або Lyn у моделі В-лімфоцитів також можуть бути застосовані для аналогічних досліджень, оскільки мають подібні структуру та принцип регуляції (рис. 2). Такий підхід до конструювання химерних



флуоресцентних протеїнкіназ у моделях В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів та НК-кілерів уможливить проведення моніторингу ранніх подій активації в цих клітинах під дією різноманітних чинників *in vitro*. Показано, що інгібітори Syk — перспективні біологічно активні речовини проти автоімунних захворювань, а блокування активності Lyn призводить до апоптичної загибелі клітин гострого мієлоїдного лейкозу. Інгібітори Lyn та Lck є потенційними ефективними протиревматичними біологічно активними речовинами, тому ці кінази перспективні як мішені для фармакологічного скринінгу. Флуоресцентні тест-системи на основі цих кіназ, а також аналогічні на основі їхніх субстратів є важливими для проведення фармакологічних досліджень [60–62].

Другий тип молекулярних механізмів — взаємодія різних молекул та зміна їх взаємного розташування в комплексах. Цей тип перебудов може бути зафіксований аналогічно попередньому з тією різницею, що флуоресцентні домени різного типу розташовані на різних протеїнах. До цього типу можна віднести димеризацію Jak/STAT та розпад димерів NF- κ B з інгібуючими протеїнами.

Третій тип — транслокація сигнальних молекул із цитозолу в органели, наприклад у ядро чи плазматичну мембрану. До сигнальних молекул, які транслокуються в плазматичну мембрану під час активації лімфоцитів належать вищезазначені кінази Fyn, Syk, Zap-70 та інші протеїни активаційного комплексу. Як вже було згадано, до сигнальних молекул, що транслокуються в клітинне ядро лімфоцитів під час активації, належать ERK, NFAT, c-fos, c-jun. У складі флуоресцентних протеїнів злиття, що зберігають функціональність, ці месенджери дозволяють візуалізувати транслокацію протеїнів і відслідковувати відповідні сигнали в клітині [58].

Візуалізувати транслокації в плазматичну мембрану, апарат Гольджі чи ЕПР можна за допомогою конфокальної мікроскопії. Для візуалізації транслокації в клітинні ядра та плазматичну мембрану достатньо застосувати флуоресцентний мікроскоп зі світлофільтрами. До цього типу сигнальних реакцій належить входження іонів кальцію з депо і зовнішньоклітинного середовища в цитозоль. Розроблено спеціальні флуоресцентні протеїни, які змінюють власну флуоресценцію залежно від концентрації кальцію в навколишньому середовищі, що дає змогу без застосування синтетичних кальцієвих зондів визначати вміст цитозольного

кальцію. Рекombінантні флуоресцентні протеїни на основі кальмодуліну змінюють флуоресценцію під час взаємодії з кальцієм і, окрім того, можуть локалізуватись у певних ділянках цитоплазми та інших компартментах клітини. Такі протеїни дістали назву «хамелеонів» і їх експресія в різних модельних об'єктах, зокрема в лімфоцитах, уможливило дослідження кальцієвих сигналів [63].

Четвертий тип реакцій під час активації лімфоцитів, який можна детектувати, — це зміна вмісту певних сигнальних протеїнів у клітині внаслідок модифікації рівня експресії. Адже в лімфоцитах під час відповіді на різні стимули регулюється не тільки локалізація вищезазначених факторів, але й рівень їх експресії [4]. Застосування мічених ядерних факторів дає змогу не тільки детектувати їх локалізацію, але й визначати загальноклітинний вміст. Для таких цілей зручним є метод проточної цитофлуориметрії чи флуоресцентної мікроскопії. Іншим варіантом дослідження активації певних генів є застосування флуоресцентних протеїнів у складі генів-репортерів.

Для флуоресцентної та конфокальної мікроскопії можна застосовувати до десяти різних флуоресцентних сигналів одночасно для визначення рівня експресії такої самої кількості протеїнів злиття чи протеїнів-репортерів. Для розділення флуоресцентних сигналів використовують спеціальні алгоритми обробки спектральних даних. У дослідях із резонансним перенесенням енергії флуоресценції для ратіометричних вимірювань можна застосовувати відповідно до п'яти пар різних флуоресцентних протеїнів. У разі нератіометричного методу вимірювання кількість одночасно вимірюваних параметрів може сягати десяти. Оскільки сучасні оптичні системи дозволяють одночасно фіксувати декілька флуоресцентних сигналів від різних флуоресцентних протеїнів, лімфоцити з вищезазначеними генетично кодованими флуоресцентно міченими ядерними месенджерами, кальцієвим сенсором та кіназами є перспективними багатofункціональними тест-системами [57, 58].

Як модельні об'єкти найзручніше використовувати перевивні лінії лімфоїдних клітин. Такими клітинами можуть бути онкотрансформовані лінії, а також перевивні культури Т-хелперів. Клітинам цих культур притаманний високий проліферативний потенціал, тому з ними зручно проводити процедуру селекції після трансформації вектором, і такі клітини здатні стабільно передавати отриманий генетичний матеріал, не

змінюючи своїх імунологічних та культуральних властивостей упродовж років [64].

Такі генетично модифіковані тест-системи на основі генетично модифікованих культур імунних клітин можуть дати комплексну інформацію про молекулярні механізми впливу різних факторів на імунну систему. Індивідуальні дані для кожної клітини про поведінку різних компонентів сигнальних шляхів можна проаналізувати та інтерпретувати за допомогою обчислювальних та евристичних алгоритмів на базі цифрової обчислювальної техніки [65].

Висока інформативність описаних багатофункціональних тест-систем дає змогу досліджувати процеси внутрішньоклітинної взаємодії і передачу сигналу для багатьох молекулярних механізмів водночас. Новітня галузь біології — системна біологія — передбачає аналіз саме такого типу експери-

ментальних даних. Дослідження поведінки вищезазначених сигнальних факторів належить до розділів системної біології: інтерактоміки та протеоміки. Такий підхід перспективний для застосування в High Content Screening — високоінформативному фармакологічному скринінгу, який дозволяє отримати повне уявлення щодо процесів, які відбуваються в модельних об'єктах під час випробувань, та фіксувати зміни, які не фіксує звичайний фармацевтичний скринінг високої та низької пропускну здатності [66, 67].

Таким чином, застосування множинних генетично кодованих флуоресцентних протеїнів злиття в тест-системах *in vitro* для дослідження сигнальних шляхів набуватиме дедалі більшого розвитку і поширення в біотехнології.

ЛІТЕРАТУРА

1. Холодна Л. С. Імунологія: Підручник. — К.: Вища школа, 2007. — 271 с.
2. Чумак А. А., Холодна Л. С., Любченко Т. А., Голева О. Г. Радіаційна імунологія. — К.: ВПЦ Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, 2002. — С. 91.
3. Вершигора А. Ю., Пастер С. У., Колибо Д. В. та ін. Імунологія /Заг. ред. Є. У. Пастер. — К.: Вища школа, 2005. — 599 с.
4. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Імунологія. — М.: Мир, 2000. — 582 с.
5. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д. Р., Ройт А. Імунологія: Пер. с англ. — М.: Логосфера, 2007. — 568 с.
6. Ярилин А. А. Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1999. — 607 с.
7. Холодна Л. С., Любченко Т. А., Голева О. Г. Прикладна імунологія. Практикум. — К.: ВПЦ Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, 2003. — С. 77.
8. Холодна Л. С. Імуномодулятори. — К.: ВПЦ Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, 2004. — С. 91.
9. Mustelinand T. K. Tasken Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases // *Biochem. J.* — 2003. — V. 371. — P. 15–27.
10. Davis R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases // *Cell.* — 2000. — V. 103. — P. 239–246.
11. Zhu Q. S., Xia L., Mills G. B. et al. G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth // *Blood.* — 2006. — V. 107. — P. 1847–1856.
12. Roitt I. M., Delves P. J. Encyclopedia of Immunology. — London: Academic Press, 1999. — P. 2323–2329.
13. Dong Ch., Davis R. J., Flavell R. A. MAP Kinases in the immune response // *Annu. Rev. Immunol.* — 2002. — V. 20. — P. 55–72.
14. Sebзда E., Mariathasan S., Ohteki T. et al. Selection of the T cell repertoire // *Ibid.* — 1999. — V. 17. — P. 829–874.
15. Furuno T., Hirashima N., Onizawa Sh. et al. Nuclear Shuttling of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase (Extracellular Signal-Regulated Kinase ERK2) Was Dynamically Controlled by MAP/ERK Kinase After Antigen Stimulation in RBL-2H3 Cells // *J. Immun.* — 2001. — V. 166. — P. 4416–4421.
16. Rincon M. MAP-kinase signaling pathways in T cells // *Curr. Opin. Immun.* — 2001. — V. 13. — P. 339–345.
17. Rincon M., Flavell R. A., Davis R. J. Signal transduction by MAP-kinases in T-lymphocytes // *Oncogene.* — 2001. — V. 20. — P. 2490–2497.
18. Kane L. P., Lin J., Weiss A. Signal transduction by the TCR for antigen // *Curr. Opin. Immun.* — 2000. — V. 12. — P. 242–249.
19. Li W., Whaley C. D., Mondino A. et al. Blocked signal transduction to the ERK and JNK proteinkinases in anergic CD4⁺ T cells // *Science.* — 1996. — V. 271. — P. 1272–1276.
20. Fields P. E., Gajewski T. F., Fitch F. W. Blocked Ras activation in anergic CD4⁺ T cells // *Ibid.* — 1996. — V. 271. — P. 1276–1278.
21. De Silva D. R., Jones E. A., Favata M. F. et al. Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy // *J. Immun.* — 1998. — V. 160. — P. 4175–4181.

22. Pages G., Guerin S., Grall D. et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice // *Science*. — 1999. — V. 286 — P. 1374–1377.
23. Yamashita M., Kimura M., Kubo M. et al. Cell antigen receptor mediated activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway controls interleukin 4 receptor function and type-2 helper T cell differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 1999. — V. 96. — P. 1024–1029.
24. Pearlle E.-B., Fanqi K. B., Sheng W. et al. ERK couples chronic survival of NK cells to constitutively activated Ras in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL) // *Oncogene*. — 2004. — V. 23, N 57. — P. 9220–9229.
25. Richards J. D., Davù Sh. H., Chou Chih-Hao G. et al. Inhibition of the MEK/ERK Signaling Pathway Blocks a Subset of B Cell Responses to Antigen // *J. Immunol.* — 2001. — V. 166. — P. 3855–3864.
26. Bernatchez Chantale Signalisation du récepteur des lymphocytes T (TCR) dans le thymus. Interaction entre différentes voies MAPK (mitogen activated protein kinase) et régulation par l'adénosine: Doctorat en microbiologie-immunologie, doctor (Ph.D.) / Université Laval, 2009.
27. Craxton A., Shu G., Graves J. D. et al. p38 MAPK Is Required for CD40-Induced Gene Expression and Proliferation in B Lymphocytes // *J. Immunol.* — 1998. — V. 161. — P. 3225–3236.
28. Zhang J., Salojin K. V., Gao J. X. et al. p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells // *Ibid.* — 1999. — V. 162, N 7. — P. 3819–3829.
29. Weiss L., Whitmarsh A. J., Yang D. D. et al. Regulation of c-Jun NH₂-terminal Kinase (Jnk) Gene Expression during T Cell Activation // *J. Exp. Med.* — 2000. — V. 191, N 1. — P. 139–146.
30. Amato S. F., Nakajima K., Hirano T. et al. Transcriptional regulation of the jun B promoter in mature B lymphocytes. Activation through a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-like binding site // *J. Immunol.* — 1997. — V. 159, N 10. — P. 4676–4685.
31. Lenormand P., Sardet C., Pagus G. et al. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts // *J. Cell Biol.* — 2002. — V. 122, N 5. — P. 1079–1085.
32. Guo B., Rawlings D. J. Emerging Roles for PKC Isoforms in Immune Cell Function // *Mol. Interv.* — 2002. — V. 2. — P. 141–144.
33. Mellor H., Parker P. J. The extended protein kinase C superfamily // *Biochem. J.* — 1998. — V. 332. — P. 281–292.
34. Puente L. G., He J. S., Ostergaard H. L. A novel PKC regulates ERK activation and degranulation of cytotoxic T lymphocytes: Plasticity in PKC regulation of ERK // *Europ. J. Immunol.* — 2006. — V. 36, N 4. — P. 1009–1018.
35. Martin P., Duran A., Minguet S. et al. Role of PKC ζ in B-cell signaling and function // *EMBO J.* — 2002. — V. 21, N 15. — P. 4049–4057.
36. Rich T., Lawler S. E., Lord J. M. et al. HLA class II-induced translocation of PKC alpha and PKC beta II isoforms is abrogated following truncation of DR beta cytoplasmic domains // *J. Immunol.* — 1997. — V. 159, N 8. — P. 3792–3798.
37. Marquez C., Martinez C., Bosca L. Protein kinase C mobilization in B lymphocytes. Differential isoenzyme translocation upon activation // *Ibid.* — 1991. — V. 147, N 2. — P. 627–632.
38. Franklin R. A., Atherfolda P. A., McCubreya J. A. Calcium-induced ERK activation in human T lymphocytes occurs via p56Lck and CaM-kinase // *Mol. Immunol.* — 2000. — V. 37, N 11. — P. 675–683.
39. Badou A., Basavappa S., Desai R. et al. Requirement of Voltage-Gated Calcium Channel γ 4 Subunit for T Lymphocyte Functions // *Science*. — 2005. — V. 307. — P. 117–121.
40. Lyubchenko T., Nielsen J. P., Miller S. M. et al. Holers Role of initial protein phosphorylation events and localized release-activated calcium influx in B cell antigen receptor signaling // *J. Leuk. Biol.* — 2009. — V. 85, N 2. — P. 298–309.
41. Kulik L., Marchbank K. J., Lyubchenko T. et al. Intrinsic B cell hypo-responsiveness in mice prematurely expressing human CR2/CD21 during B cell development // *Europ. J. Immunol.* — 2007. — V. 37, N 3. — P. 623–633.
42. Холодна Л. С., Гордієнко В. М., Любченко Т. А. Морфофункціональна характеристика лімфоїдних органів мишей після імунізації антигенами стафілокока // *Вестн. пробл. совр. мед.* — Харків. держ. мед. ун-т. — 1995. — С. 46–49.
43. Афонін С. Е., Давидовська Т. А., Шатурський О. Я. та ін. Вивчення мембранної активності білка А стафілокока на бімолекулярних ліпідних мембранах // *Вісн. Київ. ун-ту.* — 1996. — Вип. 3–4. — С. 30–36.
44. Олешко Г. М., Любченко Г. А. Біохімічні складові та імунобіологічна активність факторів патогенності // *Укр. біохім. журн.* — 2006. — Т. 78, № 1. — С. 20–28.
45. Олешко Г. М., Любченко Г. А. Імунобіологічні властивості поверхневих білків-адгезинів стафілокока // *Там само.* — 2007. — Т. 79, № 3. — С. 5–12.

46. Богданова О. В., Олешко Г. М., Моргаєнко О. О. *та ін.* Вплив іонізуючого випромінення на активацію тирозинпротеїнфосфатазної активності в лімфоїдних клітинах після преінкубації з клітинно-зв'язаним білком А // *Фізика живого*. — 2005. — Т. 13, № 1. — С. 86–90.
47. Gagnon J., Ramanathan S., Leblanc C. *et al.* IL-6, in Synergy with IL-7 or IL-15, Stimulates TCR-Independent Proliferation and Functional Differentiation of CD8+ T Lymphocytes // *J. Immun.* — 2008. — V. 180. — P. 7958–7968.
48. Hebenstreit D., Horejs-Hoeck J., Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines // *Drug News Persp.* — 2005. — V. 18, N 4. — P. 243–249.
49. Gately M. K., Renzetti L. M., Magram J. *et al.* The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses // *Annu. Rev. Immun.* — 1998. — V. 16. — P. 495–521.
50. Hunter C. A. κ B Family of Transcription Factors: Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2002. — V. 15, N 3. — P. 414–429.
51. Jelena V., David E. L., Kilk A. *et al.* Physical Exercise Induces Activation of NF- κ B in Human Peripheral Blood Lymphocytes // *Antioxid. Redox Signal.* — 2001. — V. 3, N 6. — P. 1131–1137.
52. Ryazantseva N. V., Novitskii V. V., Zhukova O. B. *et al.* Role of NF- κ B, p53, and p21 in the Regulation of TNF- α Mediated Apoptosis of Lymphocytes // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2010. — V. 149, N 1. — P. 50–53.
53. Huang W.-Ch., Chen J.-J., Chen Ch.-Ch. Src-dependent Tyrosine Phosphorylation of IKK Is Involved in Tumor Necrosis Factor- α -induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression // *J. Biol. Chem.* — 2003. — V. 278. — P. 9944–9952.
54. Stepanenko O. V., Kuznetsova I. M., Kuznetsova I. M. *et al.* Denaturation of proteins with beta-barrel topology induced by guanidine hydrochloride // *Spectroscopy: Intern. J.* — 2010. — V. 24. — P. 367–373.
55. Piatkevich K. D., Malashkevich V. N., Almo S. C. *et al.* Engineering ESPT pathways based on structural analysis of LSSm Kate red fluorescent proteins with large Stokes shift // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2010. — V. 132. — P. 10762–10770.
56. Subach F. V., Zhang L., Gadella T. W. J. *et al.* Red fluorescent protein with reversibly photoswitchable absorbance for photochromic FRET // *Chem. Biol. (Cell press)*. — 2010. — V. 17. — P. 745–755.
57. Morozova K. S., Piatkevich K. D., Gould T. G. *et al.* Far-Red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and super-resolution STED nanoscopy // *Biophys. J.* — 2010. — V. 99. — P. 13–15.
58. Wu B., Piatkevich K. D., Lionnet T. *et al.* Modern fluorescent proteins and imaging technologies to study gene expression, nuclear localization, and dynamics // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2011. — V. 23. — P. 310–317.
59. Chudakov M., Lukyanov K. A. Hetero Development of ERK Activity Sensor, oligomeric tagging diminishes nonspecific aggregation of targetproteins fused with Anthozoa fluorescent proteins // *Biochem. J.* — 2003. — V. 371. — P. 109–114.
60. Kyttaris V. C., Tsokos G. C. Syk kinase as a treatment target for therapy in autoimmune diseases // *Clin. Immun.* — 2007. — V. 124, N 3. — P. 235–237.
61. Zhu Q. S., Xia L., Mills G. B. *et al.* G-CSF induction of reactive oxygen species involves the Lyn-PI 3-kinase-Akt pathway and is increased in cells expressing a truncated G-CSF Receptor associated with acute myeloid leukemia // *Blood*. — 2006. — V. 107. — P. 1847–1856.
62. Yuta Kochi, Akari Suzuki, Ryo Yamada *et al.* Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis // *Nat. Rev. Rheumatol.* — 2010. — V. 6. — P. 290–295.
63. Demaurex N., Frieden M. Measurements of the free luminal ER calcium concentration with targeted «chameleon» fluorescent proteins // *Cell Calcium*. — 2003. — V. 34. — P. 109–119.
64. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярна біотехнологія: Підручник. — М.: Мир, 2002. — 585 с.
65. Andersen J. S., Mann M. Organellar proteomics: turning inventories into insights // *EMBO Reports*. — 2006. — V. 7, N 9. — P. 874–879.
66. Berezin M. Y., Achilefu S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging // *Chem. Rev.* — 2010. — V. 110, N 5. — P. 2641–2684.
67. Margineanu A., Warren S., Alexandrov Y. *et al.* Fluorescence lifetime imaging microscopy in a high content screening context [Electronic source] // MipTec — The Leading European Event for Drug Discovery: [web-site] — Excess: http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=139575&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=149&XNMASKEN_ID=900 (21.09.2011). — Title from screen.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПРОТЕИНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ

Г. А. Любченко¹
Р. М. Морев²
Л. С. Холодная¹
Л. И. Остапченко³

¹Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

²Международный центр молекулярной
физиологии НАН Украины, Киев

³Институт биологии Киевского национального
университета имени Тараса Шевченко

E-mail: moriev.r.m@gmail.com

Активация иммунных клеток — ключевое звено процесса формирования специфического иммунитета. Методы мониторинга движения и активности сигнальных мессенджеров и рецепторных протеинов лимфоцитов в живых клетках и тканях являются методологической основой для понимания тонких механизмов активации лимфоцитов.

Пути передачи сигнала в лимфоцитах функционируют как сетка фосфатаз, протеинкиназ и сигнальной системы ионов кальция. Сигнальные молекулы, изменяя свою структуру, образуя комплексы и перемещаясь из одного клеточного компартмента в другой, обеспечивают процесс активации.

Особенности молекулярных механизмов активации лимфоцитов и современные генетически кодируемые флуоресцентные протеины позволяют создавать новые иммунологические тест-системы. Флуоресцентные протеины могут быть использованы как репортеры, маркеры локализации и донорно-акцепторные пары для метода резонансной передачи энергии флуоресценции. Множественные генетически кодируемые рекомбинантные флуоресцентные протеины, одновременно экспрессируемые в одной клетке для исследования сигнальных путей, могут получить широкое применение для изучения сигнальных путей лимфоцитов в фармацевтике, молекулярной иммунологии, биотехнологии и биомедицине.

Ключевые слова: активация лимфоцитов, протеинкиназа, кальций, тест-система, флуоресцентный протеин.

FLUORESCENT PROTEINS USING FOR LYMPHOCYTE ACTIVATION ASSAYING

G. A. Lubchenko¹
R. G. Morev²
L. S. Holodnaya¹
L. I. Ostapchenko³

¹Kyiv National Taras Shevchenko University

²International Center of Molecular Physiology
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

³Institute of Biology of Kyiv National Taras
Shevchenko University

E-mail: moriev.r.m@gmail.com

Activation of immune cells is a key process in development of the specific immunity. The techniques for monitoring of the movement and the activity of signalling messengers and receptor proteins of lymphocytes in living cells and tissues are the methodological key for understanding the subtle mechanisms of the lymphocyte activation.

The signalling pathways in lymphocytes act as a system of phosphatases, protein kinases and calcium signalling. Signalling molecules change its structures, form complexes and move from one cell compartment to another to provide activation. Peculiarities of molecular mechanisms of lymphocyte activation and properties of modern genetically encoded fluorescent proteins enable developing new immunological assays. Fluorescent proteins could be used as reporters, markers of the localization and donor-acceptor pairs for fluorescence resonance energy transfer. Multiple genetically encoded fluorescent recombinant proteins simultaneously expressed in one cell, in our opinion, will be widely and routinely used to study the signalling pathways of lymphocytes in vitro in the fields of pharmacy, molecular immunology, biotechnology and biomedicine.

Key words: lymphocytes activation, protein kinase, calcium, assay, fluorescent protein.