

УДК 612.414.017.1.019.08

А. А. Мюльберг, Т. В. Гришина, О. В. Жмайлова-Сеник

**РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2**

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра биохимии биолого-почвенного факультета

Интерлейкин-2 (IL-2) был открыт в 1976 г. как основной фактор для Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга человека [78]. Он был первым клонированным цитокином типа I [112], а также первым цитокином типа I, для которого был клонирован рецепторный комплекс (IL-2R) [63, 84]. Последний состоит из трех субъединиц, которые кодируются тремя независимыми генами и по-разному комбинируются, формируя рецепторы высокой, промежуточной и низкой аффинности [41, 80, 111]. В Т-клетках система IL-2/IL-2R является критической для правильной регуляции пролиферации CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток после воздействия антигенов. Известно также, что IL-2 опосредует в Т-клетках процесс клеточной смерти, индуцированной активацией (AICD), механизмом петли обратной связи и интернализации рецептора [36] и тем самым вносит вклад в генерацию и функционирование CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток [70]. В этих клетках IL-2-сигнализация up-регулирует экспрессию трансфактора FoxP3 [33, 131]. Недостаточность в продукции регуляторных Т-клеток может быть основной причиной аутоиммунитета, который возникает в отсутствие IL-2-сигнализации и характеризуется неконтролируемым накоплением активированных Т-клеток на периферии [71, 101]. Следовательно, IL-2/IL-2R система регулирует или воздействует на многие критические функции в биологии Т-клеток, включая амплитуду клональной экспансии, развитие и рост эффекторных или регуляторных Т-клеток и последующую редукцию числа Т-клеток, специфических для данного антигена. В дополнение к этим воздействиям на Т-лимфоциты IL-2 оказывает плеотропные эффекты на другие типы клеток. Так, он может повышать цитолитическую активность НК-клеток, увеличивать продукцию иммуноглобулинов В-клетками и, вероятно, оказывать воздействие на нейтрофилы и моноциты [36].

Большинство IL-2 продуцируется активированными CD4<sup>+</sup>-клетками. Некоторое количество этого цитокина секретируется CD8<sup>+</sup>-клетками, а также скоротечно дендритными клетками [36, 44]. Хотя экспрессия IL-2 контролируется на многих уровнях, большинство исследований было сфокусировано на транскрипционной регуляции. Многочисленные регуляторные элементы гена *IL-2* локализируются на минимальном регионе промотора размером ~ 300 п. н., который расположен непосредственно *upstream* от сайта инициации транскрипции [94]. В этом регионе гена *IL-2* были идентифицированы несколько важных позитивных регуляторных элементов, связывающих разнообразные транскрипционные факторы [36, 57, 104], а также сайт связывания негативного элемента FoxP3 регуляторных клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [126, 136]. Наконец были получены многочисленные доказательства необходимости оккупации всех связывающих сайтов промотора гена *IL-2* соответствующими транскрипционными факторами для обеспечения оптимальной транскрипции этого гена.

© А. А. Мюльберг, Т. В. Гришина, О. В. Жмайлова-Сеник, 2009

**Интерлейкин-2 (IL-2).** Интерлейкин-2 был впервые выделен из костного мозга в 1976 г. как Т-клеточный ростовой фактор, который индуцировал пролиферацию активированных Т-клеток и являлся одним из первых цитокинов, охарактеризованных по молекулярному весу [78]. Ген *IL-2* был клонирован в 1983 г. [28, 112]. Это позволило установить, что пролиферативная активность IL-2 осуществляется благодаря единственному молекулярному виду. Кристаллическая структура протеина была установлена в 1992 г. [6].

IL-2 — мономерный секретируемый гликопротеин, полипептидная часть которого состоит из 133 аминокислот (15,4 кДа) [42]. Его предшественник дополнительно включает 20 аминокислот на N-конце, которые являются гидрофобным секреторным сигналом, важным для взаимодействия с рецептором IL-2 [31]. При сравнении аминокислотных последовательностей в IL-2 различных видов млекопитающих обнаружена высокая степень гомологии и структурный консерватизм данного полипептида [42]. По своим структурным характеристикам IL-2 является типичным для семейства короткоцепочечных цитокинов типа I и представляет собой глобулу, описанную как «пучок из четырех  $\alpha$ -спиралей» [6]. Были определены главные сайты контактов IL-2 с тремя субъединицами IL-2R [138]. Показано существование единственной дисульфидной связи (Cys58/105), которая играет ключевую роль в создании биологически активной конформации молекулы. Кроме того, IL-2 гликозилирован по OH-группе Thr3, но эта модификация не существенна для его биологической активности. Вероятно, роль гликозилирования состоит в повышении растворимости IL-2 в водном окружении [36].

IL-2 относится к провоспалительным цитокинам *Th1* типа. Он оказывает воздействие на многие типы клеток, из которых самыми предпочтительными являются Т-лимфоциты. Действительно, одним из самых быстрых последствий активации Т-клеток через их антиген/рецептор является *de novo* синтез IL-2, способствующий быстрой и избирательной экспансии популяций эффекторных Т-клеток, активируемых антигеном [61]. Таким образом, главная функция IL-2 — обеспечить пролиферацию как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

Индукцированное этим цитокином деление осуществляется посредством пролиферативных сигналов от протоонкогенов *c-fos* и *c-myc* в сочетании с антиапоптотическими сигналами от членов семейства Bcl-2 [76, 83]. В дополнение к антиапоптотическим сигналам IL-2 также оказывает позитивное воздействие на клеточный метаболизм и гликолиз, которые необходимы для долговременного выживания Т-клеток [34].

Кроме того, исследования, проводимые на IL-2-дефицитных мышах, показали, что, вероятно, самой важной функцией IL-2 является отрицательная регуляция иммунных ответов для того, чтобы предотвратить аутоиммунную реакцию. Эти ингибирующие эффекты IL-2 создают ауторегуляторную петлю негативной обратной связи, которая осуществляется несколькими механизмами. Во-первых, продукция IL-2 крайне скоротечна. Таким образом, в отсутствии продолжающейся антигенной стимуляции, активированные Т-клетки умирают из-за отсутствия цитокина в своем микроокружении. Во-вторых, IL-2 инициирует про-апоптотический путь через усиление FasL экспрессии на активированных Т-клетках [92, 116]. Так как Т-клетки также экспрессируют Fas/CD95, это событие ведет к запрограммированной клеточной смерти (апоптозу) активированных Т-лимфоцитов. В этом отношении *IL-2*<sup>-/-</sup> мыши проявляют поразительно схожий аутоиммунный фенотип с *Fas*<sup>-/-</sup> видами мышей [50]. Кроме того, имеются неопровержимые доказательства, что IL-2 может действовать в течение развития регуляторных Т-клеток, чтобы предотвратить аутоиммунную реакцию, посредством запуска развития CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток [33, 70, 131].

Наконец, недавно описана классическая ауторегуляторная петля обратной связи, в которой IL-2 ингибировал свою собственную продукцию. Эта ауторегуляторная петля зависела от активации передатчика сигнала и активатора транскрипции-5 (STAT5) и индукции транскрипционного репрессора В-лимфоцитарного белка созревания (Blimp-1), зависимой от IL-2. Таким образом, после активации антигеном наивных Т-клеток продуцируется IL-2, экспрессируется высоко-аффинный IL-2R. Секретирующийся IL-2 связывается со своим рецептором, что ведет к активации STAT5 и индукции Blimp-1, в конечном счете репрессируется ген *IL-2*. Blimp-1 является ключевым конечным медиатором репрессии *IL-2*, и Blimp-1-дефицитные клетки продуцируют больше интерлейкина-2 [43, 117].

Механизм, который определяет затухание сигналов гена интерлейкина-2 после активации Т-клетки, изучен недостаточно, но представляет собой другой критический аспект, контролирующий временную экспрессию этого гена. ZEB (TCF8) и CREM (Icer) связываются с минимальным промотором гена *IL-2* и ингибируют продукцию репортерного гена, однако механизм этого действия не определен [8, 54]. Показано также, что IL-2 продукция в развивающихся *Th1* клетках регулируется гетеродимеризацией Rel-A и T-bet на проксимальном промоторе *IL-2* гена [51].

Многочисленные типы регуляторных Т-клеток (Treg) стали известными недавно. Они включают IL-10-секретирующие Treg-клетки, TGF- $\beta$  секретирующие *Th3* клетки,  $\gamma\delta$  Т-клетки, а также NKT-клетки. Тем не менее, регуляторные Т-клетки экспрессирующие forkhead box 3 (FoxP3) транскрипционный фактор, оказались наиболее изучаемым субтипом. Этот субтип характеризуется экспрессией CD25<sup>+</sup> (IL-2R $\alpha$ ), рецептора фактора некроза опухоли, индуцируемого глюкокортикоидами (GITR), антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), CD621 и CD103 [124]. Примерно 10 % периферических CD4<sup>+</sup> Т-клеток экспрессируют FoxP3 в то время, как он обнаружен только в 1 % CD8<sup>+</sup> популяции [95, 97]. Эти регуляторные Т-клетки супрессируют широкий круг лейкоцитов, включая Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки (DCs), натуральные киллеры (NK-клетки) и NKT-клетки [96].

Treg-клетки входят в отдельные популяции: «натуральные» регуляторные Т-клетки (nTreg), которые развиваются из CD4<sup>+</sup> Т-клеток в тимусе, «индуцированные» регуляторные Т-клетки (iTreg), которые происходят из наивных Т-клеток путем дифференцировки в присутствии трансформирующего фактора роста- $\beta$  и IL-2, и тип 1 регуляторных клеток, который продуцирует IL-10. nTreg- и некоторые линии iTreg-клеток типично экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3 [120, 136]. Существуют структурные, биохимические и функциональные доказательства кооперативного взаимодействия между NF-AT и FoxP3. Были получены кристаллические структуры NF-AT-AP1- и NF-AT-FoxP3-комплексов на NF-AT-AP1 композитном сайте промотора *IL-2* гена. Сравнение структур этих комплексов показало, что FoxP3 и AP1 оккупируют один и тот же регион ДНК и взаимодействуют с перекрывающимися, но не с идентичными остатками NF-AT. NF-AT-AP1-комплекс активирует, а NF-AT-FoxP3-комплекс репрессирует экспрессию *IL-2* гена, формируя стабильную, неподверженную ремоделированию нуклеосомную структуру [108]. Белки FoxP3 с мутациями, которые разрушают область контакта NF-AT-FoxP3, были не способны down-регулировать экспрессию *IL-2* гена [126].

У людей с мутацией в X-связанном гене *FOXP3* развиваются мультиорганные аутоиммунные заболевания, известные так же как иммунодисрегуляция, а спонтанные мутации в гене *FOXP3* у скорбунных штаммов мышей также ассоциируются с агрессивными аутоиммунными заболеваниями [136]. Стабильное присутствие nTreg-клеток на периферии существенно, поскольку острое удаление CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-FoxP3<sup>+</sup> клеток у взрослых мышей

приводит к подобному синдрому прогрессивной аутоиммунной и воспалительной болезни [125]. Таким образом, регуляторные Т-клетки уникальной линии  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  приводят в действие активную иммунную супрессию и существенны для поддержания аутоотолерантности. Периферическая толерантность, опосредованная этими клетками, дополняет и укрепляет «центральную» толерантность, процесс, с помощью которого аутореактивные клоны Т-клеток удаляются при негативной селекции в тимусе [115].

Интерлейкин-2 играет критические роли в развитии и функциях регуляторных Т-клеток. Вместе с тем он является также крайне важным для надлежащих эффекторных функций обычных Т-клеток, таких, как продукция цитокинов, рост и выживание. Поэтому существенные дисфункции ИЛ-2 как у людей, так и мышей ассоциируют с развитием аутоиммунитета, а также иммунодефицитами [109]. Это означает, что баланс между про- и анти-воспалительными эффектами ИЛ-2 является критическим для соответствующего возникновения и протекания иммунного ответа.

В дополнение к этим эффектам интерлейкин-2 «предоставляет помощь» другим клеточным типам, активно участвующим в иммунном ответе, таким, как В-клетки и НК-клетки. Так, например, ИЛ-2 усиливает продукцию НК-производных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и GM-CSF). Кроме того, ИЛ-2 и ИЛ-12, действуя синергично, тем самым повышают цитотоксическую активность НК-клеток. Показана также роль ИЛ-2 в увеличении секреции антител В-клетками. Как и в Т-клетках, интерлейкин-2 увеличивает экспрессию ИЛ-2R $\alpha$  в В-клетках, увеличивая тем самым их чувствительность к ИЛ-2 [36].

Значительные количества ИЛ-2 секретируются  $CD4^+$  Т-клетками. Большая часть этих Т-клеток продуцирует ИЛ-2 сразу же после стимуляции антигеном, в то время как остальные *Th1* цитокины экспрессируются в больших количествах только после дифференциации Т-хелперов [47]. Кроме того,  $CD8^+$  Т-клетки также секретируют ощутимые количества ИЛ-2 после стимуляции их TCR. Показано также, что минорные количества интерлейкина-2 продуцируются и APC. Относительно недавно было обнаружено, что DCs скоротечно секретируют ИЛ-2 после микробного вызова, чтобы усилить активацию Т-клеток. Это подтверждается данными, полученными в опытах с DCs из ИЛ-2-дефицитных мышей, которые повреждаются в способности содействовать пролиферации Т-клеток. Однако макрофаги, очевидно, не продуцируют ИЛ-2 в ответ на бактериальную активацию [44].

**Рецептор интерлейкина-2 и его функции.** Антиген-индуцированный иммунный ответ Т-клеток критически регулируется взаимодействием ИЛ-2 с высокоаффинным ИЛ-2 рецепторным (ИЛ-2R) комплексом. Этот комплекс состоит из трех субъединиц ИЛ-2R $\alpha$  (CD25), ИЛ-2R $\beta$  (CD122) и общей гамма-цепи или  $\gamma$ с (CD132). CD122 и  $\gamma$ с первоначально собираются в структуру  $\beta$ -листа и родственны членам класса I суперсемейства цитокиновых рецепторов. С другой стороны, CD25 и ИЛ-15R $\alpha$  содержат так называемые «суши»-модули в своем внеклеточном регионе [83]. Все три субъединицы необходимы для формирования высокоаффинного ИЛ-2R ( $K_d \sim 10^{-11}$  M). ИЛ-2R не существует в виде пресформированного гетеротримера. Скорее, CD25 по своей собственной инициативе связывает ИЛ-2 ( $K_d \sim 10^{-8}$  M), что способствует ассоциации CD122 и  $\gamma$ с. Покоящиеся Т-лимфоциты экспрессируют комплекс промежуточной аффинности ( $K_d \sim 10^{-9}$  M), состоящий из ИЛ-2R $\beta$ - и  $\gamma$ с-цепей. Кристаллическая структура ИЛ-2, связанного с ИЛ-2R показывает, что каждая субъединица рецептора взаимодействует с интерлейкином-2 с наибольшим контактом по поверхности ИЛ-2/CD25 и что существенное взаимодействие имеет место между CD122 и  $\gamma$ с, которое приводит к стабильному четвертичному комплексу ИЛ-2–CD25–CD122– $\gamma$ с [107].

Из всех субъединиц  $\alpha$ -цепь обладает самым коротким цитоплазматическим доменом, составленным только из 13 аминокислот, в то время как ИЛ-2R $\beta$ - и  $\gamma$ с-цепи содержат

в цитоплазматическом домене 286 и 86 аминокислот соответственно [64, 93]. Общая гамма-цепь разделяется рецепторами для IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 и IL-15 [62, 83]. В дополнение к  $\gamma$ -цепи IL-15 также разделяет с IL-2 субъединицу IL-2R $\beta$ . Разделение субъединиц может играть роль в обеспечении избыточности в воспалительных ответах. Хотя IL-2 и IL-15 используют идентичные рецепторные субъединицы, чтобы передавать сигналы, эти цитокины тем не менее проявляют противоположные эффекты *in vivo* [66]. Следует отметить, что CD25 также у-регулируется в мышинных и человеческих дендритных клетках, В- и NK-клетках [13, 81, 110].

Как свидетельствуют длины цитоплазматических доменов рецепторных субъединиц IL-2, IL-2R $\beta$  и  $\gamma$  являются ответственными за IL-2-сигнализацию. В обычных Т-клетках в ответ на связывание IL-2 гетеродимеризация  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц запускает активацию и рекрутирование Janus-киназ (Jak), которые в свою очередь фосфорилируют тирозиновые остатки в цитоплазматических доменах  $\beta$ -цепи [64]. Специфически Jak1 рекрутируются на серин-богатый домен  $\beta$ -цепи, в то время как Jak3 связывается с цитоплазматическим доменом  $\gamma$ . Фосфорилированные тирозины затем служат в качестве докирующих сайтов для адапторных протеинов, таких, как SHC протеин (SH — SRC homology домен; C — домен гомологии коллагена) и STAT5 [15]. SHC протеины в конце концов приводят к активации Ras-Raf-МАР-киназного и PI3К-киназного путей, которые способствуют транскрипции цитокинов, выживанию, вхождению в клеточный цикл и росту Т-клеток. В ответ на активацию фосфорилированными тирозинами STAT5 димеризуются и транслицируются в ядро, где они связываются с последовательностями ДНК, содержащими интерферон- $\gamma$ -активируемые сайты (GAS), отвечают за пролиферацию клеток и регулируют экспрессию митогенных генов и генов выживания [65]. Интересно, что *IL-2R $\alpha$* -промотор также является мишенью STAT5 и включает 3 позитивно регулируемых региона (PRR). PRR1 регулируется сывороточно-чувствительным фактором (SRF) и NF- $\kappa$ B, тогда как PRRII является мишенью E1f-1 (члена семейства Ets факторов лимфоидно-миелодных клеток) и архитектурного протеина HMGAI. STAT5, E1f-1 и GATA-1-подобный протеин связывают PRRIII [90]. Это поддерживает позитивную петлю обратной связи, где сигнализация IL-2-рецептора обеспечивает дальнейшую продукцию самого рецептора.

Регуляция экспрессии гена *IL-2R $\alpha$*  с помощью PRR1 и PRRII является результатом как специфических протеин/ДНК, так и протеин/протеин взаимодействий HMGAI, E1f-1, NF- $\kappa$ B и SRF. Например, протеин HMGAI может физически взаимодействовать *in vitro* с каждым из трех протеинов, которые связываются с этими регуляторными элементами [90]. В результате многочисленных взаимодействий между транскрипционными факторами, которые связаны с PRR1 и PRRII, формируется высокоупорядоченный мультипротеиновый комплекс (известный как энхансеосома), который регулирует *in vivo* активность промотора гена *IL-2R $\alpha$*  [18].

Хотя сигнализация другими гамма-цитокинами может также индуцировать пролиферацию и выживание Т-клеток, IL-2 остается самым эффективным цитокином для экспансии этих клеток. В ответ на TCR-сигнализацию важную роль в IL-2-продукции играет CD28-костимуляция, которая опосредует транскрипцию *IL-2* гена и стабилизацию *IL-2* мРНК. Последняя, в свою очередь, вызывает почти 1000-кратную клональную экспансию Т-клеток [85], которая может существенно ингибироваться самим IL-2 [71]. Фактически IL-2 индуцирует далее экспрессию его рецептора [40]. Используя математические модели, было показано, что основной ранний эффект IL-2 на Т-клетки — мишени, является зависимым от способности IL-2 уменьшать скорости их смерти без изменения скорости их деления [37]. Однако в дополнение к пролиферативным, провоспалительным

и способствующим выживанию эффектам IL-2 также обладал противовоспалительными сигналами. Баланс про- и противовоспалительных свойств IL-2 вносит свой вклад в контролируемый воспалительный эффект.

Несколько событий, опосредованных IL-2, помогают контролировать воспалительные ответы. В ответ на связывание IL-2 рецепторный комплекс быстро интернализуется, приводя к лизосомальной деградации IL-2 [60]. Эта интернализация, по-видимому, зависит от  $\gamma$ -цепи [64]. IL-2 может также лимитировать его собственную продукцию в негативной петле обратной связи даже в отсутствие регуляторных Т-клеток. Продукция IL-2 Т-клетками достигает пика спустя 24 ч культивирования в присутствии анти-CD3 или анти-CD8 антител и снижается в 3 раза после 72 ч, как было определено внутриклеточным окрашиванием и real-time PCR IL-2 мРНК [30]. Однако истощение IL-2, использующее нейтрализующие антитела, ингибирует это время-зависимое снижение IL-2 и фактически существенно увеличивает частоту IL-2<sup>+</sup> Т-клеток, уровень продукции IL-2 в расчете на Т-клетку, а также уровни IL-2 мРНК. Драматическое уменьшение продукции IL-2 через 72 ч является независимым от регуляторных Т-клеток. IL-2 также является критическим для индукции активации-индуцированной смерти Т-клеток (ASID) через up-регуляцию Fas-лиганда и down-регуляцию антиапоптотического FLIP [92].

Необходимость IL-2 для развития регуляторных Т-клеток была спорной. После открытия FoxP3, как ключевого маркера CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных клеток, стало возможным исследовать регуляторные клетки в IL-2-дефицитных животных [56]. Установлено, что в IL-2 и CD25 дефицитных животных FoxP3-регуляторные Т-клетки еще генерируются. Однако несмотря на сходное абсолютное число этих клеток на периферии, процентное отношение FoxP3-регуляторных Т-клеток существенно уменьшается у данных животных. Важно, что такие животные демонстрируют ряд аутоиммунных заболеваний [3, 135]. Тем не менее неизменные процент и частоты тимусных FoxP3-регуляторных Т-клеток привели к убеждению, что IL-2 может быть более важным в периферальной индукции, в поддержании и размножении Treg. Действительно, другие животные недостаточные в IL-2R, обнаруживают потенциальную зависимость от последующей сигнализации IL-2 в развитии регуляторных Т-клеток [135].

В настоящее время известен ряд сигнальных путей регуляторных Т-клеток, которые отвечают на стимуляцию IL-2 и отличаются от таковых эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Мышьные Tregs не проявляют PI3K путей в ответ на стимуляцию IL-2 *in vitro*, но STAT5 еще активируется. Отсутствие активации PI3K приписывается экспрессии PTEN, который регулирует пролиферативную способность регуляторных Т-клеток [7, 119]. Однако экспрессия PTEN down-регулируется в ответ на стимуляцию TCR в Tregs [7].

С другой стороны, сходно с эффекторными Т-клетками, активация STAT сохраняется и в регуляторных Т-клетках. Интересно, что STAT-связывающие сайты были найдены в FoxP3 гене мышей и людей [7, 119], чего не наблюдалось в наивных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клетках [129, 137]. Соответственно, Tregs up-регулируют экспрессию FoxP3 в ответ на стимуляцию IL-2 как у людей, так и у мышей. Однако IL-2-зависимая индукция FoxP3 в наивных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетках выявляется тогда, когда эти клетки сочетаются с регуляторными Т-клетками. И в этом случае транскрипция FoxP3 обусловлена посредничеством STAT5 [129]. Фактически, Т-клетки, недостаточные в STAT5, неспособны к дифференции в регуляторные Т-клетки [15].

IL-2R $\beta$ -дефицитные животные отличаются тем, что демонстрируют существенно более высокое истощение FoxP3-регуляторных Т-клеток на периферии по сравнению с IL-2 или CD25 дефицитными животными [26, 33, 137]. Это привело к гипотезе, что

благодаря избытку цитокинов, связывающихся с рецептором IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 и IL-15), отсутствие одного интерлейкина-2 или CD25 не эффективно в противодействии развитию регуляторных Т-клеток. Полное отсутствие FoxP3-регуляторных Т-клеток в  $\gamma\text{c}^{-/-}$ -животных поддерживает эту гипотезу, так как любой из этих цитокинов требует  $\gamma\text{c}$ -компонента в их соответствующих рецепторах. Кроме того, Treg в IL-2 $^{-/-}$ -мышях проявляют повышенную экспрессию IL-15R $\alpha$  и IL-7R $\alpha$ , вероятно, для компенсации потери IL-2-сигнализации [14]. Фактически, IL-2/IL-15 нокаутированные мыши подобно IL-2R $\beta$ -дефицитным животным показывают сходное уменьшение в регуляторных Т-клетках, что подтверждает вклад IL-15 в развитие этих клеток. Было продемонстрировано, что сигнальный домен IL-7R $\alpha$  мог замещать IL-2R $\beta$  в IL-2R $\beta$ -дефицитных мышях в развитии Treg [131]. Эти исследования были завершены генерацией химерного рецептора, составленного из экстрацитоплазматического домена IL-2R $\beta$  и цитоплазматического домена IL-7R $\alpha$ . Совокупность полученных результатов демонстрируют что  $\gamma\text{c}$ -сигнализация через  $\gamma\text{c}$ -цитокины является критической для развития регуляторных Т-клеток и может в ограниченной степени восполнить недостаточность IL-2 сигнализации [69].

#### **Ген интерлейкина-2. Регуляторные сайты и транскрипционные факторы.**

В геноме человека имеется лишь одна копия гена *IL-2*, локализованная на 4-й хромосоме. Ген включает 6684 п. н. и состоит из 4 экзонов и 3 интронов [100]. Первые экспериментальные данные по организации транскрипционных контрольных элементов, которые ответственны за Т-лимфоцит-специфическую индукцию *IL-2* гена, были представлены в 1986 г. Т. Футжита и сотрудниками [35]. Авторы идентифицировали ближайший *upstream* регион *IL-2* гена как элемент, контролирующей индуцибельную экспрессию *IL-2* гена человека в Т-клетках.

Полученные экспериментальные данные позволили определить минимальный участок промотора гена интерлейкина-2, который был назван «промотор/энхансер гена *IL-2*» или «минимальный высококонсервативный энхансер» [94]. Он представляет собой участок ДНК длиной ~ 300 п. н. *upstream* от точки старта транскрипции и компонуется из корового (от ~ -40 до +40 п. н.) и регуляторного (от ~ -300 до -40 п. н.) промоторов. *IL-2*-коровый промотор содержит близлежащий consensus ТАТА-бокс, который расположен на участке от -32 до -25 п. н. Хотя ТАТА-бокс и является критическим для индуцибельной экспрессии гена *IL-2*, функция этого элемента и других последовательностей корового промотора не определена [121]. Регуляторный промотор гена *IL-2* содержит секвенционные элементы, ответственные за индукцию экспрессии гена *IL-2*, связанную с активацией TCR, а также чувствительные участки, опосредующие CD28 ко-стимуляцию, супрессию иммуносупрессантами, такими, как CsA и FK506 и элементы, репрессирующие активацию гена *IL-2*. Показано, что промотор *IL-2* — высоко консервативен, он обладает 86 %-ной гомологией у человека и мыши. Вклад архитектуры регуляторного промотора в детерминацию уровней транскрипции гена *IL-2* остается неясным. Не ясны также «природа», локализация и протяженность истинного энхансера гена *IL-2*.

В структуре регуляторного промотора гена *IL-2* выделяют следующие пять регионов связывания основных регуляторных факторов: ARRE-1- и ARRE-2-элементы, NF-AT/ТАТА, NF-AT/AP-1 и CD28RR. Порядок расположения этих регионов в промоторе гена *IL-2*, их нуклеотидные последовательности и сайты связывания транскрипционных факторов, участвующих в регуляции гена интерлейкина-2 представлены на рис. 1. Имеются многочисленные доказательства того, что все сайты связывания в промоторе *IL-2* должны быть оккупированы соответствующими транскрипционными факторами, чтобы обеспечить оптимальную транскрипцию.

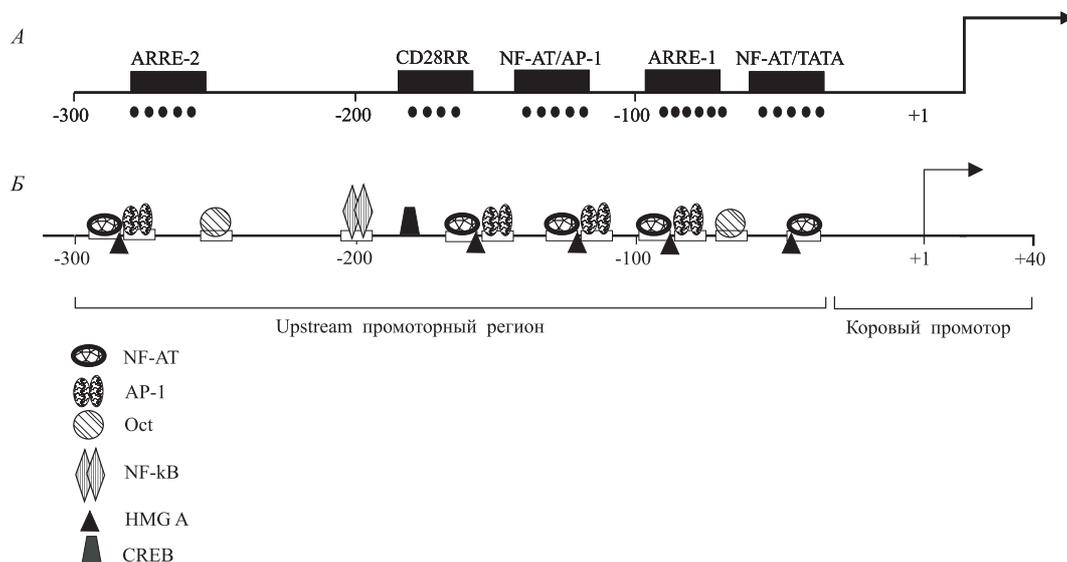


Рис. 1. Изображение минимального промотора *IL-2* гена от  $-300$  п. н. до сайта старта транскрипции  $+1$  п. н. (А). Известные регуляторные элементы и соответствующие транскрипционные факторы, идентифицированные в *IL-2* гене (Б)

Черными прямоугольниками отмечены сайты связывания функциональных транскрипционных факторов; приводятся общепринятые обозначения элементов промотора. Пунктирные линии указывают сайты связывания HMG A1.

**NF-AT транскрипционные факторы** — семейство протеинов, ядерных факторов активированных Т-клеток, служит главным передатчиком кальциевого сигнала, которое ассоциируется с TCR активацией через Т-клеточный рецептор. NF-AT протеины экспрессируются конститутивно, но входят в ядро только после их освобождения из цитоплазмы, процесса, который требует каталитического действия кальцинейрина. Были идентифицированы 5 протеинов семейства NF-AT, каждый из которых кодируется отдельным геном. Четыре из них NF-ATс1— NF-ATс4 регулируются кальцием, в то время как NF-ATс5 им не регулируется. NF-ATс1, 2, 3, 5 экспрессируются клетками иммунной системы, тогда как NF-ATс4 — клетками, не принадлежащими иммунной системе. В промоторе *IL-2* гена были идентифицированы четыре NF-AT-связывающих сайта [48, 67]. Экспрессия *IL-2* гена была неизменна у *NF-ATс1*<sup>-/-</sup> или *NF-ATс2*<sup>-/-</sup>-дефицитных мышей, что указывало на потенциальную избыточность NF-ATс изоформ и возможную компенсацию другими протеинами семейства NF-AT у этих мышей. Действительно, Т-клетки, лишённые NF-ATс1 и NF-ATс2, не могут продуцировать IL-2, тогда как Т-клетки, лишённые NF-ATс1 и NF-ATс3, продуцируют IL-2 в заметно меньших количествах [67, 68]. Это указывает, что NF-ATс1, NF-ATс2 и NF-ATс3 все позитивно регулируют транскрипцию *IL-2* гена [86].

**AP-1 транскрипционные факторы** являются гомо- или гетеродимерами из продуктов двух протоонкогенов *JUN* и *FOS*. Это родственные белки c-jun (Mr 36 кД) и c-fos (Mr 41кД). Члены fos- и jun-семейств содержат высоко консервативный регион, включающий основной ДНК-связывающий домен и мотив для димеризации, так называемую bZIP-лейциновую застёжку. Активация Т-клеток посредством взаимодействия TCR/CD3 ведет к активации PKC-SEK1-JNK, Rac-JNK и Ras-Raf- ERK сигнальных путей и впоследствии к индукции AP-1. В то время как Ras-ERK путь ведет к продукции c-fos,

JNK-сигнальный путь приводит к формированию AP-1 посредством фосфорилирования c-jun, допускающего его ассоциацию с c-fos [106]. AP-1 связывается с *IL-2* энхансером в тесной ассоциации с другими транскрипционными факторами, такими, как протеины NF-AT-семейства и Oct-1. Взаимодействие между AP-1 и другими факторами усиливает ДНК-связывающие свойства каждого взаимодействующего партнера. ДНК-связывающая активность AP-1 является необходимой, но недостаточной для его транскрипционной активности. Способность c-jun активировать транскрипцию зависит от N-терминального фосфорилирования киназой JNK.

ARRE-1 и ARRE-2-элементы промотора *IL-2* являются композитными ДНК-сайтами, содержащими участки связывания двух транскрипционных факторов, NF-AT и AP-1. Так, ARRE-1 включает в себя слабый NF-AT связывающий сайт (GAAA) и сильный для связывания AP-1 (TGTGTAA). ARRE-2 элемент содержит слабый ДНК-сайт для NF-AT (GGAAA) и слабый сайт связывания для AP-1 (TGTTTCA), разделенные парой оснований (AC), которая значительно уменьшает связывание NF-AT с его индивидуальным сайтом [22, 68].

Взаимодействие AP-1 и NF-AT с их индивидуальными сайтами связывания в этих композитных элементах характеризуется относительно высокими скоростями диссоциации. Однако, когда все три протеина (NF-AT, c-jun и c-fos) связываются с композитным ДНК-сайтом, наблюдается сильный кооперативный эффект, стабилизирующий данный комплекс [21]. Тесное взаимодействие NF-AT и AP-1 факторов на композитных элементах ДНК составляет мощный механизм интеграции сигналов кальциевого ( $Ca^{2+}$  и кальцинейрина) и протеинкиназного c-Ras (PKC→Ras→Raf→MAPK) путей в регуляции экспрессии интерлейкин-2 гена. Используя NF-AT мутантные протеины, которые не способны взаимодействовать с c-fos/c-jun димерами, но с сохранившейся способностью связываться с ДНК или транскрипционной активностью, удалось показать, что экспрессия *IL-2* гена абсолютно зависима от кооперации между NF-AT и c-fos/c-jun димерами [68].

**NF-κB транскрипционные факторы.** Семейство NF-κB млекопитающих состоит из NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), RelA (p65), RelB и c-Rel и играет важную роль в регуляции многих генов иммунной системы [38]. В Т-клетках наиболее часто находятся гомодимеры p50, гетеродимеры p50-p65 (RelA) и p50-c-Rel [99]. *IL-2* промотор содержит два сайта связывания NF-κB, один из которых находится между -200 и -180 п. н, а второй локализуется внутри CD28RE [105]. Связывание членов семейства NF-κB с CD28RE после активации Т-клеток изменяется с течением времени. Спустя один час после стимуляции главным компонентом являются гомодимеры RelA, тогда как через 6 ч доминируют c-Rel-содержащие комплексы [46]. Было показано, что для усиления связывания c-Rel с CD28RE необходимы NMG1 протеины [46, 105]. C-Rel играет существенную роль в ремоделировании нуклеосомной структуры *IL-2* хроматина при активации CD3/CD28 соответствующими антителами [89]. Уровни *IL-2* являются нормальными в RelA-дефицитных Т-клетках, тогда как в c-Rel-дефицитных клетках продукция *IL-2* нарушена. Повышенная экспрессия *IL-2*, найденная у *Nfkb1*<sup>-/-</sup>-мышей, указывает на то, что гомодимеры p50 репрессировали экспрессию гена *IL-2 in vivo* [128]. В совокупности эти данные подтверждают, что в регуляции *IL-2* гена активирующую роль играют только p50-p65- или p50-c-Rel-гетеродимеры.

NF-κB факторы в сочетании с другими транскрипционными факторами участвуют в регуляции гена *IL-2* частично через CD28-ответствующий элемент этого гена, необходимый для CD28-опосредованной транскрипционной активации *IL-2* промотора. CD28RE структурно входит в регион CD28RR *IL-2* промотора (*CD28 receptor region*), который был впервые идентифицирован как 5'-AGAAATTCCA-3' последовательность, локализованная

между позициями –164 и –154 п. н. относительно начала старта транскрипции *IL-2* гена [17]. Показано, что CD28RE обладает гомологией с консенсус последовательностью сайта NF-κB, и связывает RelA гомодимеры и c-Rel-содержащие комплексы, а также NF-AT протеины со слабой гомологией с c-Rel ДНК-связывающим доменом NF-κB [74, 105]. CD28RR также содержит связывающий сайт для AP-1, который функционирует кооперативно с CD28RE. Интересно, что CD28RE отделяется от соседнего AP-1 сайта (*IL-2-TRE*) только двумя парами оснований. Этот сайт, подобно другим TREs, может связываться *in vitro* с транскрипционными регуляторами, протеинами класса базальных лейциновых застежек (bZip) — ATF-2/CREB и с димерами c-fos/c-jun. Исследования *in vivo* с использованием Т-клеток линии *Jurkat* установили, что CD28RE-TRE последовательность, будучи соединенной с минимальным базальным промотором, функционирует как композитный элемент и может опосредовать многократно увеличенную митоген- и CD28-зависимую активацию транскрипции, которая параллельна физиологической регуляции продукции *IL-2* [17].

**Октамер-связывающие протеины Oct-1 и Oct-2.** В периферических Т-лимфоцитах и в некоторых линиях Т-клеток экспрессируются два протеина Oct-1 и лимфоцит-специфический фактор Oct-2, которые взаимодействуют с двумя октамер-связывающими сайтами ATGCAAAT внутри *IL-2* промотора. Проксимальный Oct-связывающий сайт может также формировать комплекс с AP-1; плотная ассоциация и функциональная кооперация октамера и AP-1 фактора весьма важна для индукции активности *IL-2* промотора в ответ на PMA и иономицин [87].

**CREB.** Расшифровка данного названия [сАМР-отвечающий элемент (CRE)-связывающий протеин] показывает, что CREB активируется фосфорилированием в ответ на изменение уровня сАМР помимо других сигналов. Семейство CREB у млекопитающих включает CREB, CREM и ATF-1. CREB и ATF-1 экспрессируются повсеместно, тогда как CREM экспрессируется на максимальном уровне в нейроэндокринных тканях. Первичная структура активаторов семейства CREB показала наличие центрально расположенного, киназа-индуцибельного домена из 60 аминокислот (KID, так же известный, как Р-бокс), который содержит сайт фосфорилирования PKA (RRPSY) и иные потенциальные сайты фосфорилирования другими киназами. KID фланкирован гидрофобными, богатыми глицином доменами, обозначаемыми Q1 и Q2, которые действуют как конститутивные активаторы. Они найдены во многих регуляторных, ко-активаторных и базальных транскрипционных факторах и представляют поверхности взаимодействия для других трансфакторов.

Участок полипептидной цепи, простирающийся от KID и включающий последовательность, богатую основными остатками, и Q2-домен, часто обозначают как домен конститутивной активации (CAD). Наконец на С-конце у всех членов семейства CREB локализована основная область и домен димеризации — лейциновая застежка bZIP, образующие в совокупности ДНК-связывающий домен (рис. 2) [27, 45, 73, 88]. Гены *CREB*

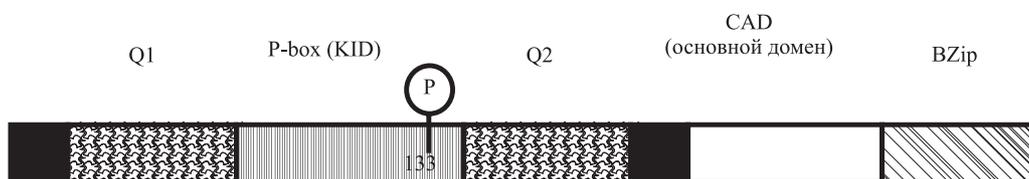


Рис. 2. Структура протеина CREB

Представлена сегрегация конститутивной и киназа-индуцибельной CREB активности в отдельных доменах протеина.

и *CREM* создают некоторые продукты альтернативного сплайсинга, которые кодируют полипептиды с различными активаторными или репрессорными способностями. Так, например, в случае *CREM* с альтернативного, управляемого CRE внутреннего промотора, в ответ на стимуляцию cAMP синтезируется усеченный основной домен/bZIP полипептид, называемый ICER (репрессор индуцибельного cAMP-отвечающего элемента). В соответствии с отсутствием активационного домена ICER действует как мощный транскрипционный репрессор гена *IL-2*, связывающийся с CRE-подобным мотивом промотора *IL-2* в позиции –160 и формируя комплекс с NF-AT [8].

CREB опосредует активацию cAMP-отвечающих генов путем связывания в виде димера с консервативными CRE-сайтами. Различная регуляция генов-мишеней cAMP через CREB достигается благодаря различиям в композиции последовательностей и расположения CRE на промоторе. Впервые описанный как палиндром TGACGTCA [24, 77], CRE также существует в виде половинного мотива (CGTCA), который менее активен в связывании CREB и менее способен реагировать на cAMP, чем полный CRE-палиндром [25]. Обычно CRE локализованы в пределах ~ 100 п. н. от TATA-бокса. CRE, расположенные *upstream* на промоторе, менее активны.

CREB связываются с палиндромными CRE в виде димера с наномолярной аффинностью. Формирование лейциновой застезки, межсубъединичные солеобразные мостики и водородные взаимодействия способствуют димеризации CREB [99]. Основное распознавание CREB осуществляется главным образом остатками, расположенными на одной поверхности спирали ДНК-связывающего домена CREB и включают инвариантные остатки Asn293, Arg301 и Lys305. Lys305, по-видимому, необходим для различия между CRE (TGACGTCA) и близкородственным AP-1 сайтом (TGACTCA).

Помимо других сигналов, CREB активируется фосфорилированием в ответ на cAMP. cAMP действует обычно как классический внутриклеточный вторичный мессенджер. Аккумуляция cAMP в ответ на активацию G-протеин-сочетанных рецепторов индуцирует большинство клеточных ответов через cAMP-зависимую протеинкиназу (PKA). В основном состоянии PKA находится в цитоплазме в виде неактивного гетеродимера, состоящего из двух регуляторных (R) и двух каталитических (C) субъединиц. Индукция cAMP высвобождает C-субъединицы, которые пассивно диффундируют в ядро и индуцируют экспрессию генов в клетках путем фосфорилирования CREB по остаткам Ser133 в сайте RRPSY [73]. Фосфорилирование CREB по Ser133 способствует рекрутированию транскрипционного ко-активатора CBP и его паралога p300.

Вместе с тем фосфорилированию CREB по Ser133 способствуют различные ростовые факторы и стрессорные сигналы, активирующие различные клеточные киназы. В их число входят кальций-кальмодулин киназы I, II и IV, Lim-киназа, и ряд MAPKAPK (MAP-KAP2, MAP-KAP3, MSK1 и MSK2, RSK1 и RSK2), а также PKB/Akt и PKC [52]. Однако между активностью CREB после обработки cAMP и после воздействий стрессорных/митогенных сигналов существуют различия, и эти различия, по-видимому, реализуются на уровне промотора. Так, активация клеточных генов в ответ на NGF требует дополнительных факторов связывающих промотор, которые действуют совместно с CREB. Это взаимодействие зависит от фосфорилирования Ser133. Более того активация клеточного рецептора в *Jurkat* клетках стимулирует фосфорилирование CREB по Ser133 в отсутствие активации CRE репортерного гена. Очевидно, что способность генов-мишеней CREB отвечать на один сигнал, но не на другой — вопреки сопоставимому фосфорилированию Ser133 CREB — может отражать или различия в оккупации CRE на промоторе или способность CREB рекрутировать транскрипционный аппарат [52, 73, 88].

CREB стимулирует базальную транскрипцию CRE-содержащих генов и опосредует индукцию транскрипции в ответ на фосфорилирование протеинкиназой А. Соответственно трансактивационный домен CREB — двураздельный, состоящий из конститутивного (Q2-домен: аминокислотные остатки 160–283) и индуцибельного (KID-домен: остатки 100–160) активаторов, которые объединяют усилия в ответ на стимуляцию cAMP [73, 88]. Q2-домен способствует экспрессии гена-мишени посредством его взаимодействия с dTAFII110/hTAFII135 компонентами комплекса TFIID, основного транскрипционного фактора, состоящего из ТАТА-связывающего белка (TBP) и TBP-ассоциированных факторов (TAFs). Взаимодействие между TAFs и Q2 опосредуется кластером гидрофобных аминокислот, мутации которых разрушают TAF-связывание, рекрутирование полимеразы и активацию транскрипции [32]. Q2-домен, но не KID, опосредует рекрутирование компонентов комплекса инициации транскрипции, включая Pol II, IIB и IID. Однако Q2 относительно неэффективен в стимуляции последующих ступеней реакции. Наоборот, фосфорилированный PKA по Ser133 KID эффективно стимулирует изомеризацию рекрутированного полимеразного комплекса и многие раунды транскрипции [73, 88]. Кроме того, фосфорилирование Ser133 делает возможным для KID рекрутировать ко-активаторные паралоги CBP и p300 на промотор за счет взаимодействия с доменом KIX этих паралогов. Как полагают, после рекрутирования CBP опосредует активацию генов-мишеней путем ассоциации с комплексом PolII [52, 118], а также с помощью внутренней гистон-ацетилтрансферазной активности, посредством которой он ацетирует гистоны, связанные с промотором [132].

**Ко-активаторы транскрипции цитокиновых генов.** Скоординированная сборка транскрипционных факторов на регуляторных регионах цитокиновых генов необходима, чтобы обеспечить оптимальный уровень транскрипции, опосредованной РНК-полимеразой II. Важную роль в этом процессе играют архитектурные протеины HMGA. Вместе с тем ключевыми регуляторами транскрипции являются транскрипционные ко-активаторы CBP (CREB-связывающий протеин) и p300.

**Архитектурные протеины HMGA.** Архитектурные протеины HMGA семейства млекопитающих являются полипептидами, построенными из примерно сотни аминокислот и обладающие модульной секвенционной организацией. Это семейство состоит из 3 членов: HMGA1a, HMGA1b и HMGA2. HMGA1a и HMGA1b продуцируются одним геном и альтернативным сплайсингом мРНК, тогда как HMGA2 продуцируется отдельным геном [53]. Тем не менее, все они являются высокородственными членами семейства архитектурных протеинов. HMGA протеины имеют три высокопозитивно заряженных региона, представленных последовательностями KKPRGRPKK для HMGA1a и HMGA1b, и KKPRGPRK для HMGA2 [102]. Эти мотивы взаимодействуют с минорным желобом А/Т-богатых участков ДНК и получили название АТ-ловушек. Наоборот, С-терминалы содержат высокий процент негативно заряженных аминокислотных остатков.

ДНК-связывающие мотивы различно размещены вдоль молекул трех HMGA протеинов (рис. 3), что результируется во взаимодействующей модульной системе, составленной из набора трех протеинов, способных осуществлять направленные взаимодействия с различно размещенными А/Т-богатыми регионами ДНК. Структурный анализ показал, что так называемые АТ-ловушки этих белков направленно присоединяются к перекрестку (стыку) 4 цепей ДНК и к ДНК-собранный нуклеосоме [91]. Наличие трех ДНК-связывающих доменов позволяет HMGA1 взаимодействовать с несколькими А/Т-регионами вдоль линейной протяженности ДНК, что способствует устранению изломов и образованию петель ДНК и последующей транскрипции ДНК или хроматина в присутствии дистального энхансера

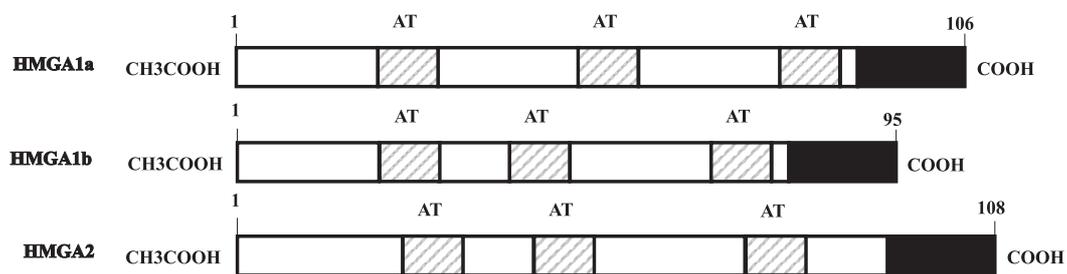


Рис. 3. Схема последовательностей протеинов HMGA, указывающая на различие расположение АТ-ловушек (светло-серые) и С-терминальных окончаний (черные) вдоль молекул трех протеинов

и Нolo РНК Pol II [5]. Связываясь с ДНК, упакованной в нуклеосомы, HMGA1 могут изменять ротационное обрамление нуклеосомных коровых частиц, взаимодействуя с пунктами входа и выхода нуклеосомной ДНК [90, 91] и удаляя гистон H1 [102]. Таким образом, эти протеины могут играть роль в позиционировании или скольжении нуклеосом. Вместе с тем HMGA протеины могут взаимодействовать с различными транскрипционными факторами, причем регионы, наиболее часто вовлекаемые в протеин/протеин взаимодействия, включают в себя первый ДНК-связывающий домен и аминокислотные остатки между вторым и третьим доменами HMGA1 [113].

Промотор *IL-2* гена богат АТ парами (см. рис. 1), и неудивительно, что в экспериментах по ДНКазе I-футпринтингу, HMGA связывались со многими сайтами поперек промотора. Исследования, в которых использовали антисмысловую экспрессию для HMGA мРНК, показали, что эти белки являются позитивным активатором промотора *IL-2* гена [46]. Показано также, что HMGA влияют на связывание с ДНК многих главных транскрипционных факторов, таких, как NF-AT, NF-κB и AP-1. При этом архитектурные протеины изменяют связывание трансфакторов с сайтами, перекрывающимися или соседствующими с их А/Т богатыми участками связывания [16]. Так высокие концентрации HMGA способны ингибировать связывание NF-AT [46, 103]. Кроме того, HMGA могут оказывать различные воздействия на трансфакторы одного и того же семейства. Так, например, HMGA оказывает большое положительное влияние на *in vitro* связывание c-Rel, но не RelA с CD28RR *IL-2* промотора [104]. Эти примеры иллюстрируют значение протеин/протеин взаимодействий в модуляции связывания транскрипционных факторов с ДНК, осуществляемых архитектурными протеинами.

HMGA протеины участвуют в регуляции многих генов. Однако одним из наиболее изученных механизмов генной регуляции, в которую вовлекаются эти протеины, является регуляция гена интерферона-β. Активация экспрессии *INF-β* обусловлена мультифакторным комплексом, который собирается в энхансерном регионе гена, свободного от нуклеосомы. Этот комплекс формируется трансфакторами NF-κB, IRF, ATF-2/c-jun и HMGA1 протеинами [79, 130]. HMGA1 выполняют двойную функцию в этом процессе: 1) они индуцируют аллостерические изменения в ДНК, увеличивая таким образом сродство транскрипционных факторов (TFs) к их связывающим сайтам и 2) устанавливают протеин/протеин взаимодействия с этими же факторами. Данная новая структура, называемая энхансеосомой, ответственна за модификацию и ремоделирование нуклеосомы, которая маскирует ТАТА-боксы, что способствует начальной транскрипции. Это ремоделирование запускается рекрутированием на энхансеосому ацетилтрансферазных протеинов СВР/p300 и ассоциированных с ними факторов PCAF/GCN5, которые в дополнение к модификации

гистонов ацетируют HMGA1 [79]. Ацетилирование последних по Lys71 посредством PCAF/GCN5 приводит к стабилизации энхансеосомы. Позже другая ацетилтрансфераза, CBP/p300, модифицирует HMGA1 по Lys65, что дестабилизирует энхансеосому и репрессирует транскрипцию.

Рекрутирование на промотор/энхансер-элемент хроматина ремоделирующих факторов ген-специфическими молекулярными комплексами, очевидно, является широко распространенным механизмом активации генов. Важно подчеркнуть, что HMGA участвуют в регуляции большого числа генов, действуя механизмами очень сходными с таковыми для *INF-β* гена. Примером таких генов могут служить ген *IL-2Rα* и ген рецептора инсулина (*IR*) [12, 91].

Суммируя вышеизложенное можно заключить, что протеины HMGA прямо связываются с ДНК, модифицируя ее конформацию и облегчая в результате связывание группы транскрипционных факторов. С другой стороны, протеины HMGA взаимодействуют как с ДНК, так и с TFs, генерируя мультипротеиновый стереоспецифический комплекс, связанный с ДНК [79]. Кроме того, протеины HMGA взаимодействуют с TF, который обладает низким сродством к ДНК, модифицируя его конформацию и обеспечивая его связывание с ДНК с высокой аффинностью. Наконец, замещая гистон H1, протеины HMGA способствуют дерепрессии транскрипции [102].

**Транскрипционные ко-активаторы CBP и p300.** Транскрипционные ко-активаторы CBP (CREB связывающий протеин) и p300 являются ключевыми регуляторами транскрипции, опосредованной РНК полимеразой II. Данные, полученные на пациентах, нокаутированных мышцах и исследования, использующие различные культуры клеток, указывают, что способность этих мультидоменных протеинов ацетилировать гистоны и иные протеины является критической для многих биологических процессов. CBP и/или его паралог p300 представлены во всех многоклеточных организмах, но не у низших эукариотах, таких, как дрожжи [132]. Сравнение аминокислотных последовательностей этих мультидоменных протеинов из различных источников обнаружило присутствие многих почти идентичных регионов: три Cys-His богатых региона (CH1, 2 и 3), связывающий сайт для транскрипционного фактора CREB (KIX домен), бромодомен, HAT-домен и домен взаимодействия с ко-активатором 1 стероидных рецепторов (SID), тогда как другие регионы являются мало консервативными (рис. 4) [132].

CBP и p300 могут взаимодействовать с факторами базальной транскрипции, ТАТА-связывающими протеинами TBP и TFIIB и/или формировать комплекс с РНК-полимеразой II [23, 82, 118]. Эти взаимодействия осуществляются через N- и C-терминальные активационные домены AD (см. рис. 4).

В дополнение CBP и p300 могут связывать множество разнообразных транскрипционных факторов и других протеинов через свои CH1-, CH3-, KIX- и SID-домены [19, 118]. Посредством одновременных взаимодействий с базальной транскрипционной машиной и с одним или более upstream транскрипционными факторами CBP и p300 функционируют как

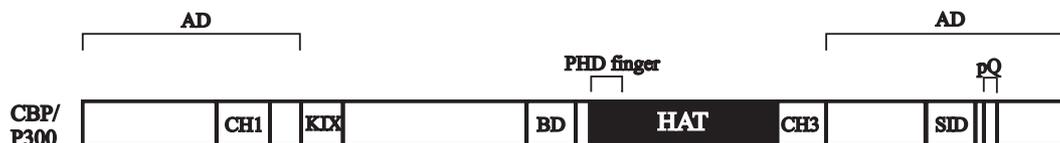


Рис. 4. Структура протеинов семейства CBP/p300

Представлены регионы и функциональные домены, которые являются высоко консервативными для CBP и p300.

физические мосты или каркасы, стабилизируя тем самым транскрипционный комплекс. Интересно, что некоторые из этих протеин/протеин взаимодействий могут регулироваться теми же самыми пост-транскрипционными модификациями, субъектом которых является хроматин, такими, как фосфорилирование [1], сумоилирование [39] и метилирование [127], указывая тем самым, что СВР и р300 сами являются мишенями сигнальных каскадов.

Вторым важным аспектом ко-активаторной функции СВР и р300 является их способность ацетилировать гистоны нуклеосомы на проксимальном промоторе, что приводит к увеличению доступности ДНК для других важных регуляторов [58, 118]. Внутри НАТ-домена СВР и р300 были идентифицированы два функционально важных региона. Один из них (аминокислоты 1495–1541 в СВР) является частично консервативным среди протеинов НАТ, и постулировалось, что он является связывающим сайтом Co-A [72]. Второй важный регион в НАТ-доме СВР, который не найден в других протеинах НАТ, это Zn-фингер РНД типа. Он характеризуется (Cys)<sub>4</sub>-His-Cys-мотивом и преимущественно находится в протеинах, которые функционируют на уровне хроматина. Zn-фингер РНД является интегральной частью энзиматического ядра ацетилтрансферазного домена СВР [9, 55], но он необязателен для НАТ активности р300 [9]. НАТ-домеу предшествует бромодомен, построенный из 110 аминокислот, который найден во многих хроматин-ассоциированных протеинах. Функция бромодомена — связывание ацетиллизина [29] и он, следовательно, может играть роль в присоединении СВР и р300 к специфическим сайтам хроматина.

Предпочтительные сайты *in vitro* ацетилирования N-терминальных хвостов гистонов посредством СВР/р300 — это Lys12 и Lys15 в гистоне H2B, Lys14 и Lys18 в гистоне H3 и Lys5 и Lys8 в гистоне H4 [98]. В дополнение к их способности ацетилировать гистоны СВР и р300 ацетилируют и другие протеины, подобные транскрипционным факторам и ко-активаторам. В этих случаях СВР и р300 выступают в роли факторов ацетилтрансферазных активностей (FAT) и осуществляют равноценно важный способ транскрипционной регуляции, влияя на формирование или разрушение протеин/протеин или протеин/ДНК взаимодействий. Одним из примеров такой функции является ассоциация СВР/р300 с дополнительными НАТs PCAF/GCN5, о которой говорилось выше. Для сборки полноценной энхансеосомы на *INF-β* энхансере необходимо ацетилирование HMGA1 по остатку Lys71, которое, по-видимому, осуществляется примерно через 4 ч после вирусной инфекции посредством PCAF/GCN5. Во время пика ацетилирования Lys71 HMGA1 все активаторы гена интерферона-β находятся на энхансере, запирая энхансеосому в «метастабильной» конфигурации, которая инициирует рекрутирование Pol II, SWI/SNF и TFIID. Последующее ацетилирование Lys65 посредством СВР/р300 коррелирует деацетилирование Lys71, нарушает взаимодействие HMGA1 с ДНК энхансера *INF-β* и дестабилизирует энхансеосому [79].

Другим примером нарушения протеин/протеин взаимодействий посредством FAT служит ко-репрессор CtB (карбокси-терминал связывающий протеин). Взаимодействия ко-репрессора CtB со множеством транскрипционных репрессоров будут блокированы ацетилированием сайтов взаимодействия CtB с помощью гистон-ацетилазы СВР/р300 [134]. Наконец FAT влияет на сохранение в ядре ядерного фактора гепатоцитов (HNF4) или *half-life* протеинов E2F. Таким образом, в то время как СВР и р300 являются существенными ко-активаторами для множества транскрипционных факторов, относительная важность мост/каркас функции НАТ/FAT варьируют.

Важность ацетилтрансферазной функции СВР и р300 в фундаментальных биологических процессах указывает на то, что их энзиматическая активность, вероятно, является

субъектом регуляции. НАТ-активность СВР и р300 положительно регулируется *in vitro* посредством фосфорилирования р42/р44 МАР киназой [1] или протеинкиназой А (РКА) [11]. Наоборот, протеинкиназа Сδ опосредует фосфорилирование консервативного остатка Ser89, уменьшая активность СВР [132]. Необходимо отметить, что Ser89 является единственным сайтом фосфорилирования, который был подтвержден *in vivo*. Поэтому биологическую значимость *in vitro* фосфорилирования СВР/р300 посредством р42/р44 МАР киназой, cdk2 и РКА необходимо еще установить.

Взаимодействие с другими протеинами также могут влиять на НАТ активность СВР и р300 или в позитивной, или в негативной манере. Например, взаимодействие с транскрипционными факторами такими, как СААТ/энхансер, связывающий протеин (С/ЕВР $\alpha$ ), ядерный фактор эритроидного происхождения (2NF-E2) и ядерный фактор гепатоцитов (HNF-1 $\alpha$ ) положительно регулирует НАТ активность СВР/р300 [20], тогда как связывание транскрипционного фактора PU.1 (Ets семейство онкопротеинов) ингибирует ацетилтрансферазную активность [49].

**Позиционированная нуклеосома на промоторе IL-2 гена.** Многочисленными работами по изучению ДНК последовательности, необходимой для позиционирования нуклеосом, обнаружено, что высокогибкая поли (АТ) ДНК собирает нуклеосомы более легко, чем суммарная ДНК [2, 122, 123]. Исследования установили, что искусственная повторяющаяся последовательность ТАТАААСГСС обладает наивысшей аффинностью для связывания нуклеосом и собирает четко позиционированную нуклеосому. Последнее, очевидно, обуславливается чередующимися А/С и С/Г богатыми элементами в фазе со спиральным повтором, что обеспечивает гибкую последовательность, которая может бороться с торсионным напряжением, когда она ассоциирована с нуклеосомами. Последовательность проксимального промотора *IL-2* имеет высокое содержание А/Т (~ 65 %), превышающее таковое в других индуцибельных цитокиновых генах (например, в промоторе GM-CSF А/Т содержание около 48 %). Заметная периодичность А/Т протяженности в 10–20 п. н. через большую часть региона минимального промотора *IL-2* могла бы потенциально поставить эту последовательность в нуклеосома-позиционирующий класс ДНК фрагментов, содержащих «ТАТА-тетрады».

Чтобы определить роль структуры хроматина в регуляции транскрипции гена *IL-2*, исследователи [4] изучили сборку нуклеосомы поперек промотора *IL-2*. С этой целью были использованы радиоактивно меченые фрагменты промотора, простирающиеся от –235 до –55 п. н. (180 п. н.) и от –220 до –1 п. н. (220 п. н.). Было осуществлено картирование расщепления этих фрагментов ДНКазой I и расщепления их по гидроксильным радикалам (*DNAaseI and hydroxyl radikal footprinting*). Кроме того, были определены границы трансляционно-позиционированной нуклеосомы с помощью различных энзимов рестрикции (*MseI, HinfI и SspI*). Результаты этих экспериментов показали, что *in vitro* позиционированная нуклеосома локализована на участке промотора простирающемся от – 210 до – 60 п. н. Как уже говорилось выше, этот участок промотора включает в себя регионы CD28RR, NFIL-2B и ARRE1, которые содержат сайты связывания для NF-кВ, NF-AT, AP-1, CREB и HMGA1. Связывание транскрипционных факторов с этими сайтами (за исключением архитектурного протеина HMGA1) блокировалось присутствием нуклеосомы. Вместе с тем нуклеосома делает недоступным и ТАТА-бокс. Напомним, что в Treg клетках с ДНК ARRE1-сайта и трансфактором NF-AT, локализованном в этом сайте, взаимодействует FoxP3.

Данные по доступности хроматина промотора гена *IL-2* в покоящихся *Jurkat* Т-клетках, полученные из геномного футпринтинга посредством PCR соединенного

с лигированием (LM-PCR), а также из опытов по изучению доступности рестриктазам (*DraI*, *MseI* и *HinfI*) и *MNase* с использованием real-time PCR (CHART-PCR), представили доказательства наличия сходно позиционированной нуклеосомы *in vivo* на этом промоторе [4]. Аналогичные результаты были получены на линии Т-клеток *EL4*. Анализ доступности хроматина промотора гена *IL-2* посредством CHART-PCR показал, что позиционированная нуклеосома локализована на участке от – 200 до – 60 п. н. [89]. Регион, охваченный этой нуклеосомой, становится ремоделированным после активации как *Jurkat*, так и *EL4* клеток. Данное ремоделирование требует сочетания TCR-сигнализации и CD28 ко-стимуляции, которая приводит к ацетилированию гистонов, деметелированию цитозина, ремоделированию хроматина и большей доступности ДНК-связывающим протеинам [4, 89, 114]. Однако подобное ремоделирование нуклеосомы, позиционированной на этом участке *IL-2* промотора, становится невозможным в регуляторных Т-клетках [108], поскольку ARRE1 регуляторный элемент блокирован комплексом NF-AT — FoxP3 [126].

Итак, транскрипция *IL-2* гена плотно контролируется объединенными действиями многочисленных транскрипционных активаторов, взаимодействующих с регуляторным промотором этого гена. Однако вклад последовательностей корового промотора и архитектуры регуляторного региона *IL-2* в установку уровней его транскрипции остается не ясным. Тем не менее становится очевидным, что регуляторный промотор *IL-2* лишен многих свойств, ассоциированных с энхансерными элементами. Так, например, местоположение и ориентация между регионами, регуляторного и корового промотора *IL-2* являются важными для установления уровня транскрипции этого гена. Более того, регуляторный регион промотора *IL-2* способен опосредовать высокие уровни экспрессии, даже тогда, когда спиральное фазирование между сайтами связывания трансфакторов нарушается [121].

Несмотря на то, что минимальный промотор *IL-2* гена весьма активен *in vitro*, эта область или более обширный фрагмент гена *IL-2* размером 2,8 kb upstream, не дают тканеспецифическую и зависимую от числа копий активацию *in vivo*, которая повторяет транскрипцию эндогенного гена *IL-2* [10, 75]. Таким образом, другие регуляторные элементы должны располагаться дальше 5' upstream, контролируя экспрессию гена *IL-2 in vivo*. В соответствии с этим взглядом, экспрессия в мышцах зеленого флюоресцирующего белка (GRP) под контролем последовательности 5' upstream *IL-2* размером 8,4 kb имела большее сходство с экспрессией эндогенного гена *IL-2* [133].

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что регуляторный промотор гена *IL-2* не является «высококонсервативным энхансером», который способен регулировать экспрессию данного гена *in vivo* и на котором может собираться энхансосома. Очевидно, что его можно рассматривать как минимальный регуляторный регион гена интерлейкина-2.

## Литература

1. Ait-Si-Ali S., Carlisi D., Ramirez S. Phosphorylation by p44 MAP Kinase/ERK1 stimulates CBP histone acetyl transferase activity *in vitro* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. Vol. 262. N 1. P. 157–162.
2. Anselmi C., Bocchinfuso G., De Santis P. A theoretical model for the prediction of sequence-dependent nucleosome thermodynamic stability // Biophys. J. 2000. Vol. 79. N 2. P. 601–613.
3. Aoki C. A., Roifman C. M., Lian Z. X. IL-2 receptor alpha deficiency and features of primary biliary cirrhosis // J. Autoimmun. 2006. Vol. 27. N 1. P. 50–53.
4. Attema J. L., Reeves R., Murray V. The human IL-2 gene promoter can assemble a positioned nucleosome that becomes remodeled upon T cell activation // J. Immunol. 2002. Vol. 169. N 5. P. 2466–2476.
5. Bagga R., Michalowski S., Sabnis R. HMG I/Y regulates long-range enhancer-dependent transcription on DNA and chromatin by changes in DNA topology // Nucleic Acids Res. 2000. Vol. 28. N 13. P. 2541–2550.

6. *Bazan J. F.* Unraveling the structure of IL-2 // *Science*. 1992. Vol. 257. N 5068. P. 410–413.
7. *Bensinger S. J., Walsh P. T., Zhang J.* Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells // *J. Immunol.* 2004. Vol. 172. N 9. P. 5287–5296.
8. *Bodor J., Bodorova J., Gress R. E.* Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER // *J. Leukoc. Biol.* 2000. Vol. 67. N 6. P. 774–779.
9. *Bordoli L., Husser S., Luthi U.* Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29. N 21. P. 4462–4471.
10. *Brombacher F., Schäfer T., Weissenstein U.* IL-2 promoter-driven lacZ expression as a monitoring tool for IL-2 expression in primary T cells of transgenic mice // *Int. Immunol.* 1994. Vol. 6. N 2. P. 189–197.
11. *Brouillard F., Cremisi C. E.* Concomitant increase of histone acetyltransferase activity and degradation of p300 during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 41. P. 39509–39516.
12. *Brunetti A., Manfoletti G., Chieffari E.* Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high-mobility group protein HMGI (Y) // *FASEB J.* 2001. Vol. 15. N 2. P. 492–500.
13. *Bryceson Y. T., March M. E., Ljunggren H. G., Long E. O.* Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells // *Immunol. Rev.* 2006. Vol. 214. P. 73–91.
14. *Burchill M. A., Yang J., Vang K. B., Farrar M. A.* Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis // *Immunol. Lett.* 2007a. Vol. 114. N 1. P. 1–8.
15. *Burchill M. A., Yang J., Vogtenhuber C.* IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells // *J. Immunol.* 2007b. Vol. 178. N 1. P. 280–290.
16. *Bustin M.* Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins // *Mol. Cell Biol.* 1999. Vol. 19. N 8. P. 5237–5246.
17. *Butscher W. G., Powers C., Olive M.* Coordinate transactivation of the interleukin-2 CD28 response element by c-Rel and ATF-1/CREB2 // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. N 1. P. 552–560.
18. *Carey M.* The enhanceosome and transcriptional synergy // *Cell.* 1998. Vol. 92. N 1. P. 5–8.
19. *Chan H. M., La Thangue N. B.* p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds // *J. Cell Sci.* 2001. Vol. 114. Pt. 13. P. 2363–2373.
20. *Chen C. J., Deng Z., Kim A. Y.* Stimulation of CREB binding protein nucleosomal histone acetyltransferase activity by a class of transcriptional activators // *Mol. Cell Biol.* 2001. Vol. 21. N 2. P. 476–487.
21. *Chen L., Glover J. N., Hogan P. G.* Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA // *Nature.* 1998. Vol. 392. N 6671. P. 42–48.
22. *Chinenov Y., Kerppola T. K.* Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity // *Oncogene.* 2001. Vol. 20. N 19. P. 2438–2452.
23. *Cho H., Orphanides G., Sun X.* A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure // *Mol. Cell Biol.* 1998. Vol. 18. N 9. P. 5355–5363.
24. *Comb M., Birnberg N. C., Seasholtz A.* A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element // *Nature.* 1986. Vol. 323. N 6086. P. 353–356.
25. *Craig J. C., Schumacher M. A., Mansoor S. E.* Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 15. P. 11719–11728.
26. *D’Cruz L. M., Klein L.* Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6. N 11. P. 1152–1159.
27. *De Cesare D., Sassone-Corsi P.* Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors // *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 2000. Vol. 64. P. 343–369.
28. *Devos R., Plaetinck G., Cheroutre H.* Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in *E. coli* // *Nucleic Acids Res.* 1983. Vol. 11. N 13. P. 4307–4323.
29. *Dhalluin C., Carlson J. E., Zeng L.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. // *Nature.* 1999. Vol. 399. N 6735. P. 491–496.
30. *DiSanto J. P., Guy-Grand D., Fisher A., Tarakhovskiy A.* Critical role for the common cytokine receptor gamma chain in intrathymic and peripheral T cell selection // *J. Exp. Med.* 1996. Vol. 183. N 3. P. 1111–1118.
31. *Eckenberg R., Moreau J. L., Melnyk O., Theze J.* IL-2R beta agonist P1–30 acts in synergy with IL-2, IL-4, IL-9, and IL-15: biological and molecular effects // *J. Immunol.* 2000. Vol. 165. N 8. P. 4312–4318.
32. *Felinski E. A., Quinn P. G.* The CREB constitutive activation domain interacts with TATA-binding protein-associated factor 110 (TAF110) through specific hydrophobic residues in one of the three subdomains required for both activation and TAF110 binding // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. N 17. P. 11672–11678.
33. *Fontenot J. D., Rasmussen J. P., Gavin M. A., Rudensky A. Y.* A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6. N 11. P. 1142–1151.

34. *Frauwirth K. A., Thompson C. B.* Regulation of T lymphocyte metabolism // *J. Immunol.* 2004. Vol. 172. N 8. P. 4661–4665.
35. *Fujita T., Shibuya H., Ohashi T.* Regulation of human interleukin-2 gene: functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes // *Cell.* 1986. Vol. 46. N 3. P. 401–405.
36. *Gaffen S. L., Liu K. D.* Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications // *Cytokine.* 2004. Vol. 28. N 3. P. 109–123.
37. *Ganusov V. V., Milutinović D., De Boer R. J.* IL-2 regulates expansion of CD4+ T cell populations by affecting cell death: insights from modeling CFSE data // *J. Immunol.* 2007. Vol. 179. N 2. P. 950–957.
38. *Ghosh S., May M. J., Kopp E. B.* NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses // *Annu. Rev. Immunol.* 1998. Vol. 16. P. 225–260.
39. *Girdwood D., Bumpass D., Vaughan O. A.* P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification // *Mol. Cell.* 2003. Vol. 11. N 4. P. 1043–1054.
40. *Goebel J., Forrest K., Wills-Karp M., Roszman T. L.* Tubulin polymerization modulates interleukin-2 receptor signal transduction in human T cells // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 2006. Vol. 26. N 1–2. P. 87–106.
41. *Goldsmith M. A., Lai S. Y., Xu W.* Growth signal transduction by the human interleukin-2 receptor requires cytoplasmic tyrosines of the beta chain and non-tyrosine residues of the gamma c chain // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. N 37. P. 21729–21737.
42. *Goldsmith, M. A., Greene W. C.* // *Cytokine Handbook* / Ed. by A. Thomson. London, 1994. P. 57–80.
43. *Gong D., Malek T. R.* Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178. N 1. P. 242–252.
44. *Granucci F., Vizzardelli C., Pavelka N.* Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis // *Nat. Immunol.* 2001. Vol. 2. N 9. P. 882–888.
45. *Haus-Seuffert P., Meisterernst M.* Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding protein CREB // *Mol. Cell Biochem.* 2000. Vol. 212. N 1–2. P. 5–9.
46. *Himes S. R., Reeves R., Attema J.* The role of high-mobility group I (Y) proteins in expression of IL-2 and T cell proliferation // *J. Immunol.* 2000. Vol. 164. N 6. P. 3157–3168.
47. *Ho I. C., Kim J. I., Szabo S. J., Glimcher L. H.* Tissue-specific regulation of cytokine gene expression // *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 1999. Vol. 64. P. 573–584.
48. *Hogan P. G., Chen L., Nardone J., Rao A.* Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT // *Genes Dev.* 2003. Vol. 17. N 18. P. 2205–2232.
49. *Hong W., Kim A. Y., Ky S.* Inhibition of CBP-mediated protein acetylation by the Ets family oncoprotein PU.1 // *Mol. Cell. Biol.* 2002. Vol. 22. N 11. P. 3729–3743.
50. *Hsu H. C., Matsuki Y., Zhang H. G.* The Fas signaling connection between autoimmunity and embryonic lethality // *J. Clin. Immunol.* 2001. Vol. 21. N 1. P. 1–14.
51. *Hwang E. S., Hong J. H., Glimcher L. H.* IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508 // *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 202. N 9. P. 1289–1300.
52. *Johannessen M., Delghandi M. P., Moens U.* What turns CREB on? // *Cell Signal.* 2004. Vol. 16. N 11. P. 1211–1227.
53. *Johnson K. R., Lehn D. A., Elton T. S.* Complete murine cDNA sequence, genomic structure, and tissue expression of the high mobility group protein HMG-I (Y) // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. N 34. P. 18338–18342.
54. *Juang Y. T., Wang Y., Solomou E. E.* Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115. N 4. P. 996–1005.
55. *Kalkhoven E., Teunissen H., Houweling A.* The PHD type zinc finger is an integral part of the CBP acetyltransferase domain // *Mol. Cell. Biol.* 2002. Vol. 22. N 7. P. 1961–1970.
56. *Khattry R., Cox T., Yasayko S. A., Ramsdell F.* An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4. N 4. P. 337–342.
57. *Kim H. P., Imbert J., Leonard W. J.* Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system // *Cytokine Growth. Factor Rev.* 2006. Vol. 17. N 5. P. 349–366.
58. *Kundu T. K., Palhan V. B., Wang Z.* Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300 // *Mol. Cell.* 2000. Vol. 6. N 3. P. 551–561.
59. *Kuo C. T., Leiden J. M.* Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function // *Annu. Rev. Immunol.* 1999. Vol. 17. P. 149–187.

60. Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway // *Mol. Cell*. 2001. Vol. 7. N 3. P. 661–671.
61. Lenardo M., Chan K. M., Hornung F. Mature T lymphocyte apoptosis - immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment // *Annu. Rev. Immunol.* 1999. Vol. 17. P. 221–253.
62. Leonard W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases // *Nat. Rev. Immunol.* 2001. Vol. 1. N 3. P. 200–208.
63. Leonard W. J., Depper J. M., Crabtree G. R. Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor // *Nature*. 1984. Vol. 311. N 5987. P. 626–631.
64. Lin J. X., Leonard W. J. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus // *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* 1997. Vol. 8. N 4. P. 313–332.
65. Lord J. D., McIntosh B. C., Greenberg P. D., Nelson B. H. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5 // *J. Immunol.* 2000. Vol. 164. N 5. P. 2533–2541.
66. Ma A. Pleiotropic functions of IL-15 in innate and adaptive immunity // *Mod. Aspects Immunobiol.* 2000. Vol. 1. P. 102–104.
67. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. Vol. 5. N 6. P. 472–484.
68. Macian F., Lopez-Rodriguez C., Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1 // *Oncogene*. 2001. Vol. 20. N 19. P. 2476–2489.
69. Maerten P., Shen C., Bullens D. M. Effects of interleukin 4 on CD25+CD4+ regulatory T cell function // *J. Autoimmun.* 2005. Vol. 25. N 2. P. 112–120.
70. Malek T. R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells // *J. Leukoc. Biol.* 2003. Vol. 74. N 6. P. 961–965.
71. Malek T. R., Bayer A. L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2 // *Nat. Rev. Immunol.* 2004. Vol. 4. N 9. P. 665–674.
72. Marmorstein R., Roth S. Y. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001. Vol. 11. N 2. P. 155–161.
73. Mayr B., Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. Vol. 2. N 8. P. 599–609.
74. McGuire K. L., Iacobelli M. Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells // *J. Immunol.* 1997. Vol. 159. N 3. P. 1319–1327.
75. Minasi L. E., Kamogawa Y., Carding S. The selective ablation of interleukin 2-producing cells isolated from transgenic mice // *J. Exp. Med.* 1993. Vol. 177. N 5. P. 1451–1459.
76. Miyazaki T., Liu Z. J., Kawahara A. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation // *Cell*. 1995. Vol. 81. N 2. P. 223–231.
77. Montminy M. R., Sevarino K. A., Wagner J. A. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. Vol. 83. N 18. P. 6682–6686.
78. Morgan D. A., Ruscetti F. W., Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows // *Science*. 1976. Vol. 193. N 4257. P. 1007–1008.
79. Munshi N., Agalioti T., Lomvardas S. Coordination of a transcriptional switch by HMG1 (Y) acetylation // *Science*. 2001. Vol. 293. N 5532. P. 1133–1136.
80. Nakamura Y., Russell S. M., Mess S. A. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signaling // *Nature*. 1994. Vol. 369. N 6478. P. 330–333.
81. Naranjo-Gómez M., Oliva H., Climent N. Expression and function of the IL-2 receptor in activated human plasmacytoid dendritic cells // *Eur. J. Immunol.* 2007. Vol. 37. N 7. P. 1764–1772.
82. Neish A. S., Anderson S. F., Schlegel B. P. Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme // *Nucleic. Acids. Res.* 1998. Vol. 26. N 3. P. 847–853.
83. Nelson B. H., Willerford D. M. Biology of the interleukin-2 receptor // *Adv. Immunol.* 1998. Vol. 70. P. 1–81.
84. Nikaido T., Shimizu A., Ishida N. Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor // *Nature*. 1984. Vol. 311. N 5987. P. 631–635.
85. Pei Y., Zhu P., Dang Y. Nuclear export of NF90 to stabilize IL-2 mRNA is mediated by AKT-dependent phosphorylation at Ser647 in response to CD28 costimulation // *J. Immunol.* 2008. Vol. 180. N 1. P. 222–229.
86. Peng S. L., Gerth A. J., Ranger A. M., Glimcher L. H. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation // *Immunity*. 2001. Vol. 14. N 1. P. 13–20.

87. *Phillips K., Luisi B.* The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 302. N 5. P. 1023–1039.
88. *Quinn P. G.* Mechanisms of basal and kinase-inducible transcription activation by CREB // *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 2002. Vol. 72. P. 269–305.
89. *Rao S., Gerondakis S., Woltring D., Shannon M. F.* c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170. N 7. P. 3724–3731.
90. *Reeves R.* Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function // *Gene.* 2001. Vol. 277. N 1–2. P. 63–81.
91. *Reeves R., Leonard W. J., Nissen M. S.* Binding of HMG-I (Y) imparts architectural specificity to a positioned nucleosome on the promoter of the human interleukin-2 receptor alpha gene // *Mol. Cell Biol.* 2000. Vol. 20. N 13. P. 4666–4679.
92. *Refaeli Y., Van Parijs L., London C. A.* Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis // *Immunity.* 1998. Vol. 8. N 5. P. 615–623.
93. *Rickert M., Wang X., Boulanger M. J.* The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor // *Science.* 2005. Vol. 308. N 5727. P. 1477–1480.
94. *Rothenberg E. V., Ward S. B.* A dynamic assembly of diverse transcription factors integrates activation and cell-type information for interleukin 2 gene regulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. N 18. P. 9358–9365.
95. *Sakaguchi S.* Naturally arising FoxP3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6. P. 345–352.
96. *Sakaguchi S., Powrie F.* Emerging challenges in regulatory T cell function and biology // *Science.* 2007. Vol. 317. N 5838. P. 627–629.
97. *Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // *J. Immunol.* 1995. Vol. 155. N 3. P. 1151–1164.
98. *Schiltz R. L., Mizzen C. A., Vassilev A.* Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. N 3. P. 1189–1192.
99. *Schumacher M. A., Goodman R. H., Brennan R. G.* The structure of a CREB bZIP, somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. N 45. P. 35242–35247.
100. *Seigel L. J., Harper M. E., Wong-Staal F.* Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1 // *Science.* 1984. Vol. 223. N 4632. P. 175–178.
101. *Setoguchi R., Hori S., Takahashi T., Sakaguchi S.* Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization // *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 201. N 5. P. 723–735.
102. *Sgarra R., Rustighi A., Tessari M. A.* Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 574. N 1–3. P. 1–8.
103. *Shang C., Attema J., Cakouros D.* Nuclear factor of activated T cells contributes to the function of the CD28 response region of the granulocyte macrophage-colony stimulating factor promoter // *Int. Immunol.* 1999. Vol. 11. N 12. P. 1945–1956.
104. *Shannon M. F., Coles L. S., Attema J., Diamond P.* The role of architectural transcription factors in cytokine gene transcription // *J. Leukoc. Biol.* 2001. Vol. 69. N 1. P. 21–32.
105. *Shapiro V. S., Truitt K. E., Imboden J. B., Weiss A.* CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites // *Mol. Cell Biol.* 1997. Vol. 17. N 7. P. 4051–4058.
106. *Shaulian E., Karin M.* AP-1 as a regulator of cell life and death // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4. N 5. P. E131–E136.
107. *Stauber D. J., Debler E. W., Horton P. A.* Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006. Vol. 103. N 8. P. 2788–2793.
108. *Su L., Creusot R. J., Gallo E. M.* Murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173. N 8. P. 4994–5001.
109. *Suzuki H., Zhou Y. W., Kato M.* Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo // *J. Exp. Med.* 1999. Vol. 190. N 11 P. 1561–1572.

110. *Tangye S. G., Avery D. T., Deenick E. K., Hodgkin P. D.* Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170. N 2. P. 686–694.
111. *Taniguchi T.* Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases // *Science.* 1995. Vol. 268. N 5208. P. 251–255.
112. *Taniguchi T., Matsui H., Fujita T.* Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 // *Nature.* 1983. Vol. 302. N 5906. P. 305–310.
113. *Tessari M. A., Gostissa M., Altamura S.* Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2 // *Mol. Cell Biol.* 2003. Vol. 23. N 24. P. 9104–9116.
114. *Thomas R. M., Gao L., Wells A. D.* Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter // *J. Immunol.* 2005. Vol. 174. N 8. P. 4639–4646.
115. *Turku L. A., Walsh P. T.* IL-2 signaling and CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells // *Front. Biosci.* 2008. Vol. 13. P. 1440–1446.
116. *Van Parijs L., Abbas A. K.* Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off // *Science.* 1998. Vol. 280. N 5361. P. 243–248.
117. *Villarino A. V., Tato C. M., Stumhofer J. S.* Helper T cell IL-2 production is limited by negative feedback and STAT-dependent cytokine signals // *J. Exp. Med.* 2007. Vol. 204. N 1. P. 65–71.
118. *Vo N., Goodman R. H.* CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 17. P. 13505–13508.
119. *Walsh P. T., Buckler J. L., Zhang J.* PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs // *J. Clin. Invest.* 2006. Vol. 116. N 9. P. 2521–2531.
120. *Weaver C. T., Harrington L. E., Mangan P. R.* Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties // *Immunity.* 2006. Vol. 24. N 6. P. 677–688.
121. *Weaver J. R., Good K., Walters R. D.* Characterization of the sequence and architectural constraints of the regulatory and core regions of the human interleukin-2 promoter // *Mol. Immunol.* 2007. Vol. 44. N 11. P. 2813–2819.
122. *Widlund H. R., Kuduvalli P. N., Bengtsson M.* Nucleosome structural features and intrinsic properties of the TATAAACGCC repeat sequence // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. N 45. P. 31847–31852.
123. *Widlund H. R., Vitolo J. M., Thiriet C., Hayes J. J.* DNA sequence-dependent contributions of core histone tails to nucleosome stability: differential effects of acetylation and proteolytic tail removal // *Biochemistry.* 2000. Vol. 39. N 13. P. 3835–3841.
124. *Wilczynski J. R., Radwan M., Kalinka J.* The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions // *Front. Biosci.* 2008. Vol. 13. P. 2266–2274.
125. *Williams L. M., Rudensky A. Y.* Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3 // *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8. N 3. P. 277–284.
126. *Wu Y., Borde M., Heissmeyer V.* FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT // *Cell.* 2006. Vol. 126. N 2. P. 375–387.
127. *Xu W., Chen H., Du K.* A transcriptional switch mediated by cofactor methylation // *Science.* 2001. Vol. 294. N 5551. P. 2507–2511.
128. *Yang L., Cohn L., Zhang D. H.* Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation // *J. Exp. Med.* 1998. Vol. 188. N 9. P. 1739–1750.
129. *Yao Z., Kanno Y., Kerenyi M.* Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3 // *Blood.* 2007. Vol. 109. N 10. P. 4368–4375.
130. *Yie J., Merika M., Munshi N.* The role of HMG I (Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome // *EMBO J.* 1999. Vol. 18. N 11. P. 3074–3089.
131. *Yu A., Malek T. R.* Selective availability of IL-2 is a major determinant controlling the production of CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells // *J. Immunol.* 2006. Vol. 177. N 8. P. 5115–5121.
132. *Yuan L. W., Giordano A.* Acetyltransferase machinery conserved in p300/CBP-family proteins // *Oncogene.* 2002. Vol. 21. N 14. P. 2253–2260.
133. *Yui M. A., Hernández-Hoyos G., Rothenberg E. V.* A new regulatory region of the IL-2 locus that confers position-independent transgene expression // *J. Immunol.* 2001. Vol. 166. N 3. P. 1730–1739.
134. *Zhang Q., Yao H., Vo N., Goodman R. H.* Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. N 26. P. 14323–14328.
135. *Zheng L., Sharma R., Gaskin F.* A novel role of IL-2 in organ-specific autoimmune inflammation beyond regulatory T cell checkpoint: both IL-2 knockout and Fas mutation prolong lifespan of Scurfy mice but by different mechanisms // *J. Immunol.* 2007. Vol. 179. N 12. P. 8035–8041.
136. *Ziegler S. F.* FOXP3: of mice and men // *Annu. Rev. Immunol.* 2006. Vol. 24. P. 209–226.

137. *Zorn E., Nelson E. A., Mohseni M.* IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo // *Blood*. 2006. Vol. 108. N 5. P. 1571–1579.

138. *Zurawski S. M., Vega F. Jr., Doyle E. L.* Definition and spatial location of mouse interleukin-2 residues that interact with its heterotrimeric receptor // *EMBO J.* 1993. Vol. 12. N 13. P. 5113–5119.