
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 612.006-092.19:612.017.1-063

КОРЕЦЕПТОРНАЯ ФУНКЦИЯ CD4 В ОТВЕТЕ НА МОЛЕКУЛУ МНС КЛАССА I

© 2008 г. Е. С. Звездова¹, Т. С. Гриненко², Е. Л. Побезинская³,
Л. А. Побезинский³, Д. Б. Казанский^{1*}

¹Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва,
115478

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

³National Cancer Institute, National Institutes of Health, 9000 Rockville Pike, Bethesda, Maryland 20892

Поступила в редакцию 17.01.2008 г.
Принята к печати 27.02.2008 г.

Специфичность Т-клеточного рецептора (TCR) и его взаимодействие с корецепторными молекулами играют решающую роль в успешном прохождении Т-лимфоцитами контрольных точек в их развитии и в конечном счете определяют эффективность адаптивного иммунитета. Клонированы гены, кодирующие α - и β -цепи TCR Т-гибридомы 1D1, полученной слиянием клеточной линии BWZ.36CD8 α с клетками памяти CD8 $^{+}$, специфичными к молекуле МНС класса I H-2K b . С использованием ретровирусной трансдукции клеток тимомы 4G4 генами TCR 1D1, а также корецепторов CD4 и CD8, получены варианты этой линии клеток, на поверхности которых присутствует комплекс CD3/TCR в раздельном или совместном сочетании с обеими корецепторными молекулами. Основная функция корецептора CD4 – стабилизация взаимодействия TCR с молекулами МНС класса II. Тем не менее, мы обнаружили, что CD4 может успешно участвовать в активации трансфектантов через TCR, специфичный к молекуле МНС класса I H-2K b . Более того, корецептор CD4 доминирует над CD8, так как ответ трансфектантов CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ подавляется антителами к CD4 и молекуле A b МНС класса II, но не к корецептору CD8. Ответ трансфектантов CD4 $^{+}$ не вызван кросс-реактивностью TCR 1D1 с молекулами МНС класса II, поскольку трансфектанты не отвечают на спленоциты мышней-нокаутов гаплотипа H-2 b с нарушениями в сборке комплекса молекула МНС класса I/β $_2$ -микроглобулин/пептид, которые приводят к его отсутствию на поверхности клеток. Эффект доминирования не связан с секвестрацией киназы p56 lck , так как CD4, лишенный участка для ее связывания, остается функциональным в клетках тимомы 4G4. Полученные результаты могут объяснить ряд особенностей внутритимусной селекции и служат экспериментальным обоснованием для разработки новых методов генной терапии рака.

Ключевые слова: Т-лимфоцит, клонирование, ретровирус, трансдукция, корецептор, CD4, CD8, МНС, TCR.

CORECEPTOR FUNCTION OF CD4 IN RESPONSE TO MHC CLASS I MOLECULE, by E. S. Zvezdova¹,
T. S. Grinenko², E. L. Pobezinskaya³, L. A. Pobezinsky³, D. B. Kazansky^{1*} (¹Blokhin Cancer Research Center,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia, *e-mail: kazansky@dataforce.net;
²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ³National
Cancer Institute, National Institutes of Health, 9000 Rockville Pike, Bethesda, Maryland 20892). Specificity of
T cell receptor (TCR) and its interaction with coreceptor molecules play decisive role in successful passing of T
lymphocytes via check-points during their development and finally determine the efficiency of adaptive immu-
nity. Genes encoding α - and β -chains of TCR hybridoma 1D1 have been cloned. The hybridoma 1D1 was es-
tablished by the fusion of BWZ.36CD8 α cell line with CD8 $^{+}$ memory cells specific to MHC class I H-2K b
molecule. Exploiting retroviral transduction of thymoma 4G4 cells with TCR genes and coreceptors CD4 and
CD8, variants of this cell line expressing on the surface CD3/TCR complex and coreceptors, separately or si-
multaneously have been obtained. The main function of CD4 is stabilization of interaction between TCR and
MHC class II molecule. Nevertheless, we have found that CD4 could successfully participate in the activation

Принятые сокращения: МНС (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости; MLR (mixed lymphocyte reaction) – реакция смешанной культуры лимфоцитов; TCR (T cell receptor) – Т-клеточный рецептор; АПК – антигенпредставляющая клетка; ТАР (transport associated proteins) – белки, ассоциированные с транспортом пептидов в эндоплазматический ретикулум; IL-2 – интерлейкин-2; PBS – фосфатно-солевой буфер; FCS – эмбриональная сыворотка теленка; БСА – бычий сывороточный альбумин; DTT – дитиотреитол; dNTPs – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты; DP – двойные позитивные (клетки).

* Эл. почта: kazansky@dataforce.net

of transfectants via TCR specific to MHC class I molecule H-2K^b. Moreover, coreceptor CD4 dominates CD8, because the response of transfectants CD4⁺CD8⁺ is blocked by antibodies to CD4 and MHC Class II A^b molecule but not to coreceptor CD8. The response of CD4⁺ cells was not due to cross-reaction between TCR 1D1 with MHC class II molecules, because transfectants do not respond to splenocytes of H-2^b knockouted mice with impaired assembly of TCR/β₂-microglobulin/peptide complexes resulting in their absence on the cell surface. The effect of domination was not due to sequestration of kinase p56^{lck}, because truncated CD4 with the loss of binding motif for p56^{lck} remained functional in 4G4 cells. Results obtained can explain the number of features of intrathymic selection and represent experimental basis for development of new methods of cancer gene therapy.

Key words: T lymphocyte, cloning, retrovirus, transduction, coreceptor, CD4, CD8, MHC, TCR.

Формирование репертуара Т-лимфоцитов происходит в результате случайной перестройки генных сегментов TCR и процессов позитивной и негативной селекции внутри тимуса. Эти процессы направлены на отбор клонов, TCR которых способен взаимодействовать со “своими” молекулами МНС, ассоциированными с эндогенными пептидами микроокружения тимуса (позитивная селекция) и на устранение клонов, способных к высокоаффинному взаимодействию с собственными МНС/пептидными комплексами (негативная селекция), что важно для предотвращения аутоиммунных реакций. Клоны Т-клеток, чей TCR удовлетворяет этим условиям, созревают и в них прекращается продукция “ненужного” корецептора [1]. Результаты последних лет показывают, что выбор корецептора определяется силой и продолжительностью сигнала, получаемого Т-лимфоцитом в результате взаимодействия TCR и корецептора CD4 с молекулами МНС внутри тимуса. Более продолжительный и сильный сигнал приводит к экспрессии генов транскриptionных факторов Th-POK и GATA-3, включающих программу дифференцировки Т-лимфоцитов CD4⁺ с хелперной функцией [2, 3]. Если Т-клетка получает слабый и прерывистый сигнал, то это вызывает экспрессию гена фактора Runx3, связывание Runx3 с энхансером CD8 и сайленсером CD4, и к дифференцировке в киллеры CD8 “по умолчанию” [4, 5]. В норме это приводит к формированию двух субпопуляций Т-лимфоцитов – CD4⁺, распознающих молекулы МНС класса II, и CD8⁺, распознающих молекулы МНС класса I. Проблема состоит в том, что в момент “выбора” дальнейшей программы дифференцировки в тимусе на Т-лимфоците обнаруживаются оба корецептора, при этом отсутствуют резонные объяснения, почему “продолжительный” сигнал, вызванный взаимодействием молекулы МНС класса I с TCR и с корецептором CD8, не включает ту же самую программу дифференцировки в Т-лимфоциты CD4⁺. В этой работе, используя трансфектанты тимомы 4G4, экспрессирующие гены Т-рецептора, специфичного к молекуле МНС класса I и гены корецепторов, мы показали, что в условиях доступности их естественных лигандов корецептор CD4 способен принимать на себя функции CD8 и участвовать в активации Т-лимфоцита. Более того,

когда на поверхности Т-лимфоцита присутствуют обе молекулы (CD4 и CD8), корецептор CD8 “молчит”. Это “молчание” не связано с секвестрацией киназы p56^{lck} молекулами CD4 и, по всей видимости, вызвано конкуренцией корецепторов в процессе формирования иммунологического синапса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали мышей C57BL/6 (K^bI-A^bD^b), C57BL/10 (K^bI-A^bD^b), B10.D2 (K^dI-A^dE^dD^dL^d), B10.D2(R101) (K^dI-A^dE^dD^b), B6.C-H-2^{bm1}(K^{bm1}I-A^bD^b), C57BL/6J-H-2^{bm3} (K^{bm3}I-A^bD^b), B6.C-H-2^{bm12} (K^bI-A^{bm12}D^b) из вивария Российского Онкологического научного центра Российской академии медицинских наук. Мыши-нокалуты по генам β₂-микроглобулина – C57BL/6J-B2m^{tm1Unc} (H-2^b) и транспортеров, ассоциированных с процессингом (ТАР) – C57BL/6J-Tap1^{tm1Atp} были получены из лаборатории Джексона (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Main, USA) и поддерживались в лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ РАМН. Поддержание и генотипирование генетически модифицированных животных проводили в соответствии с инструкциями, размещенными на web-сайте – http://www.jax.org/imr/tech_info.html.

Антитела. Использовали следующие антитела фирмы “Pharmingen” (США): анти-CD3ε-FITC (Cat. No. 01084A), анти-CD4-PE (Cat. No. 09425A), анти-CD8-APC (Cat. No. 01049A), анти-TCR β-цепь-FITC (Cat. No. 01304A), анти-rat Ig (mouse adsorbed)-FITC (Cat. No. 12314D). Антитела козы к иммуноглобулинам мыши, меченные FITC (Cat. No. F1010), и вторичные антитела к Fc-фрагменту иммуноглобулинов мыши, меченные FITC (Cat. No. F2772), приобретены у фирмы “Sigma”. В качестве источника моноклональных антител к антигенам CD4 и CD8 Т-лимфоцитов мыши использовали супернатанты гибридом GK1.5 (IgG2a) и 3.168 (IgG2a) соответственно, которые применяли для разделения клеток методом иммуномагнитной сепарации. Антитела к CD3 мыши (Clone 145-2C11) использовали в виде супернатанта гибридомы.

Клеточные линии. Клетки саркомы MC-11 (K^bD^b) и тимомы EL4 получали в асцитной форме,

трансплантируя их в количестве $3-5 \times 10^6$ сингенным мышам C57BL/10 соответственно. Клетки мастоцитомы P815 (K^dD^d) пассировали *in vitro* в среде RPMI-1640 с добавлением 4 mM L-глутамина и 10% FCS. Источником мышиного интерлейкина-2 (IL-2) служила линия клеток EL4 с высокой спонтанной продукцией этого цитокина (линия любезно предоставлена А.В. Червонским (A.V. Chervonsky, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Main, USA). Клеточную линию поддерживали в среде DMEM с добавлением 4 mM L-глутамина и 10% FCS. Для определения концентрации IL-2 использовали тест, основанный на измерении катаболизма МТТ клетками IL-2-зависимой линии CTLL-2 с незначительными модификациями [6]. Линию CTLL-2 поддерживали в среде RPMI-1640 с добавлением 4 mM L-глутамина, 10% FCS и 5 МЕ/мл IL-2. Линию BWZ.36 CD8 alpha использовали с любезного разрешения Н. Шастри (N. Shastri, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, USA) [7].

Иммунизацию мышей проводили внутрибрюшинной инъекцией каждому животному 25×10^6 клеток аллогенной опухоли. Через 2 мес после иммунизации спленоциты таких мышей использовали в опытах как источник клеток памяти.

Приготовление клеточных супензий. Стимулирующие (стимуляторы) и отвечающие лимфоциты (респондеры) выделяли из селезенок мышей в гомогенизаторе Поттера с коническим пестиком осторожным выдавливанием из стромы органа. Для разделения субпопуляций Т-лимфоцитов методом комплемент-зависимого цитолиза в качестве отмычной среды использовали 0.2%-ный раствор БСА ("Sigma", Cat N 84F-9435) в среде RPMI-1640 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва). Жизнеспособные клетки подсчитывали после окрашивания в смеси трипанового синего и эозина.

Окрашивание клеток антителами и анализ на проточном цитофлуориметре. Окрашивание антителами проводили при 4°C в течение 20–30 мин. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur ("Becton Dickinson", США) с аргоновым лазером 480 нм и гелий-неоновым лазером 630 нм используя программу CellQuest. Погибшие клетки и их фрагменты исключали из анализа, пользуясь критерием окрашивания йодистым пропидием (PI) и показателями прямого и бокового рассеивания. Анализировали не менее 40 тыс. событий для характеристики периферических популяций Т-лимфоцитов и культур *in vitro*. Для анализа результатов использовали программу WinMDI 2.8.

Получение и тестирование специфичности Т-клеточных гибридом. Т-клетки памяти, обогащенные в ответе на прогретые стимуляторы в течение 4 сут, и клетки BWZ.36 CD8 alpha отмывали два раза в среде без сыворотки. Затем смешивали их в

соотношении 3 : 1 в плоскодонных стеклянных фла-конах, центрифугировали для достижения физического контакта между клетками 4 мин при 1500 г и инкубировали 20 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе. После этого удаляли супернатант с помощью хирургического отсоса и добавляли предварительно нагретый до 37°C 50%-ный раствор полиэтиленгликоля PEG-1500 ("Merck") в 75 mM HEPES, pH 7.0, на 70 с. Затем клетки три раза отмывали средой без сыворотки, центрифугируя по 2 мин при 1000 г. После последней отмычки к клеткам добавляли 20 мл среды с сывороткой и инкубировали 45 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе. После подсчета клеток супензию помещали в 96-луночные планшеты в концентрации 0.4 млн/мл. Через 2 сут среду в лунках замещали селективной средой, содержащей смесь гипоксантина, аминоптерина и тимицина, а через две недели выросшие клоны переводили в селективную среду, содержащую смесь гипоксантина и аминоптерина. Тестирование Т-клеточных гибридом проводили, помещая гибридомные клетки в лунки плоскодонных планшетов, содержащие АПК, экспрессирующие различные аллельные формы МНС. Через сутки планшеты замораживали и впоследствии тестировали супернатанты на способность поддерживать рост и жизнеспособность клеток линии CTLL-2 [8].

Определение экспрессии и клонирование вариантов генов TCR. Осадок $5-10 \times 10^6$ клеток лизировали в 0.5 мл реагента TRIZOL LS ("Gibco BRL", США) 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 0.1 мл хлороформа и хорошо перемешивали, инкубировали 2–15 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали (12000 об/мин, 15 мин) на центрифуге Minispin ("Eppendorf") при охлаждении. После центрифugирования в водную фазу, содержащую РНК, добавляли 0.5 мл изопропилового спирта, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и осаждали РНК, как указано выше. Осадок РНК промывали 70%-ным этанолом и растворяли в воде до концентрации 1 мкг/мкл. Синтез кДНК: 5 мкг водного раствора РНК дополнительно ресуспединировали в 5.6 мкл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC), добавляли 0.4 мкл dNTPs (25 мМ), 1 мкл олиго(dT) (500 мкг/мл) и инкубировали 5 мин при 65°C, затем охлаждали на льду 2 мин. К раствору добавляли 4 мкл 5-кратного буфера для синтеза первой цепи ("Invitrogen"), 2 мкл 0.1 M DTT "Invitrogen", 1 мкл ингибитора РНКаз (40 ед./мкл) и инкубировали 2 мин при 42°C. Затем добавляли 1 мкл (200 ед.) фермента Superscript II RT "Invitrogen" и инкубировали 50 мин при 42°C. Реакцию останавливали нагреванием смеси в течение 15 мин при 70°C. Полученный раствор кДНК разводили в 3 раза. В ПЦР использовали 0.2 мкл разведенного раствора кДНК. Структура праймеров и условия ОТ-ПЦР описаны в [9]. Для анализа смесь наносили на 1.5%-ный гель агарозы, содержащий

бромистый этидий, и разделяли электрофорезом в Трис-ацетатном буфере (40 мМ, pH 8.0) в режиме 8 В/см в течение 45 мин. Гели фотографировали и анализировали, используя УФ-трансиллюминатор, оборудованный CD-камерой.

Анализ V-, D-, J-сегментов и CDR-районов TCR.

Амплифицированные фрагменты TCR клонировали в вектор pTZ57RT с последующим секвенированием полученных клонов в ЦКП “Геном” ИМБ РАН. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы Chromas v. 1.45. Аминокислотную последовательность и наличие стоп-кодонов в реаранжированном участке определяли с помощью программы DNAAssist v. 1.0. С помощью программы BLAST идентифицировали последовательности сегментов V, D, J, а также зависимые от матрицы палиндромные Р-нуклеотиды и добавленные в результате действия терминальной дезокси-нуклеотидилтрансферазы независимые от матрицы N-нуклеотиды. С помощью этой же программы составляли гипотетические полноразмерные последовательности кДНК выявленных α - и β -цепей TCR, используя наиболее полно охарактеризованную геномную последовательность α/β и β -локусов мышиной линии 129. Затем полноразмерные кДНК клонировали в ретровирусные векторы.

Клонирование полноразмерных цепей TCR в экспрессионные векторы. Продукты амплификации кДНК α - и β -цепей гибридомы, полученные с помощью праймеров к полноразмерным цепям TCR, содержащих сайты для рестриктаз XhoI (α -цепи) и BgIII (β -цепи), обрабатывали этими ферментами (здесь и далее все рестриктазы фирмы “Fermentas”, Литва). ПЦР-продукты полноразмерных цепей TCR очищали с помощью набора фирмы (“QIAGEN”), выделяя их из легкоплавкой агарозы. Для клонирования цепей использовали ретровирусные экспрессирующие векторы. Вектор pMigRI (“Invitrogen”), содержащий IRES (внутренний сайт связывания рибосомы) и ген зеленого флуоресцентного белка GFP, использовали для клонирования α -цепей. Вектор pMINV (“Invitrogen”), содержащий IRES и ген устойчивости к неомицину, использовали для клонирования β -цепей. Векторы переводили в линейную форму, обрабатывая их XhoI и BgIII соответственно. Далее векторы обрабатывали щелочной фосфатазой CIAP (“Fermentas”) и очищали с помощью набора фирмы “QIAGEN” после выделения их из легкоплавкой агарозы. Для клонирования α - и β -цепей в векторы использовали ДНК-лигазу T4 (“Fermentas”) и полученные конструкции секвенировали. Эти процедуры повторяли несколько раз до получения последовательности, не содержащей мутаций в кодирующей области.

Клонирование цепей корецепторов в экспрессирующие векторы. Последовательности α - и β -цепей корецептора CD8 в векторе pBS были любезно

предоставлены Д. Литманом (D. Littman, The Kimmel Center for Biology and Medicine of the Skirball Institute, New York University School of Medicine, USA). Из вектора pBS последовательность CD8 α вырезали с помощью рестриктазы SalI, а последовательность CD8 β – с помощью ApaI и SacII. Последовательность корецептора CD4 была любезно предоставлена А.В. Червонским в векторе pcDNA3.1(+/-). Кодирующую последовательность CD4 вырезали из вектора pcDNA3.1(+/-) с помощью рестриктаз ApaI и HindIII. Векторы pMSCVpuro и pMSCVhygro обрабатывали рестриктазой Xhol. Экспрессирующий лентивирусный вектор pLenti6/V5-D-TOPО линеаризовали при помощи ApaI. Одноцепочечные концы достраивали по матрице комплементарными нуклеотидами, обрабатывали щелочной фосфатазой, очищали и клонировали в векторы, как описано выше. Векторы pMSCVpuro и pMSCVhygro использовали для клонирования кДНК α - и β -цепей корецептора CD8 соответственно, а вектор pLenti6/V5-D-TOPО – для клонирования кДНК корецептора CD4.

Получение укороченной формы CD4. В фрагмент последовательности гена CD4 вместо триплета, кодирующего цистеин-420, ответственный за связывание с тирозинкиназой Lck, вводили стоп-кодон, используя амплификацию с праймерами, содержащими комплементарные последовательности. кДНК мутантного гена CD4 клонировали в вектор pLenti6/V5-D-TOPО.

Трансфекция пакующих фибробластов. Фибробласти линии 293.1 (“Invitrogen”) высевали на 60 мм чашку Петри в количестве 1×10^6 клеток в 4–5 мл полной среды DMEM (“Sigma”) с добавлением 20 мМ HEPES (“Sigma”), 4 мМ L-глутамина (“Serva”), 10% FCS (“Пан Эко”). Через 24 ч среду заменяли на 1.6 мл среды DMEM. Готовили смесь ДНК с вспомогательными плазмидами объемом не менее 30 мкл, в смесь добавляли 0.2 мкг вектора pEGFPN1 (“Invitrogen”), чтобы определить эффективность трансфекции. Для векторов pMINV и pMigRI в качестве вспомогательной плазмиды использовали вектор PPACK (“Invitrogen”). Молярное отношение вспомогательной плазмиды к вектору составляло 2 : 1. Трансфекцию для вектора pLenti6/V5-D-TOPО проводили с использованием линии пакующих фибробластов 293FT. Молярное отношение вспомогательных плазмид pLP1, pLP2, pLP3 (“Invitrogen”) к вектору составляло 3 : 1. Трансфекцию для векторов pMSCVpuro и pMSCVhygro проводили с использованием линии фибробластов GP293. Молярное отношение вспомогательной плазмиды pVSVG (“Invitrogen”) к вектору составляло 1 : 1. Для трансфекции использовали реагент Escort V (“Sigma”) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. Через 8–16 ч среду заменяли на 5 мл DMEM, с добавлением 20 мМ HEPES, 4 мМ L-глутамина, 5% FCS. Супернатант, содержащий вирус, собирали через 48 и 72 ч после трансфекции и хранили при температуре –70°C.

Инфицирование клеток тимомы 4G4. Клетки опухоли в количестве 100 тыс. смешивали с 1 мл содержащего вирусы супернатанта, добавляли 1 мкл полибредна 8 мг/мл (“Sigma”) и помещали в 24-луночный планшет. Через сутки заменяли среду на полную среду RPMI1640 с добавлением 1мкг/мл селектирующего антибиотика неомицина (“Sigma”) для β-цепей, 1 мкг/мл пуромицина (“Sigma”) и 600 мкг/мл гигромицина (“Sigma”) для корецепторов CD8α и CD8β соответственно. Так как вектор pMigRI не содержит гена устойчивости к антибиотику, а кодирует GFP, то клетки, экспрессирующие α-цепи TCR, анализировали с помощью проточного цитофлуориметра и клонировали методом лимитирующих разведений. Наличие CD4 и CD8 на поверхности клеток полученных клонов определяли также методом проточной цитофлуориметрии. Для дальнейшей работы отбирали клоны со стабильной экспрессией корецепторов, “ярко” окрашивающиеся соответствующими антителами.

Определение функциональности TCR-трансфектантов. Функциональность TCR оценивали при помощи антител к CD3ε, сорбированных на пластике. Для теста использовали антитела в концентрации 25 мкг/мл, разведенные в стерильном PBS. Сначала антитела инкубировали в 96-луночном плоскодонном планшете в течение ночи при 4°C. На следующий день жидкость из лунок удаляли и лунки трижды отмывали холодным PBS. В лунки с сорбированными антителами помещали по 50 тыс. клеток трансфектантов и инкубировали в течение суток при 37°C. Супернатанты клеточных культур тестировали на присутствие IL-2, используя линию клеток CTLL-2, зависимую от IL-2.

Определение IL-2 с помощью линии клеток CTLL-2. Использовали оригинальный метод [8] с небольшими модификациями. Вкратце: 100 мкл супернатанта клеточных культур переносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета с $5-10 \times 10^3$ клеток линии CTLL-2, которые предварительно трижды отмывали от IL-2 в PBS. Через 18 ч в лунки добавляли 15 мкл красителя Alamar Blue (“Gibco”). Через 18–24 ч жизнеспособность клеток оценивали по восстановлению окисленной формы красителя на приборе MULTISCAN. Процент восстановления красителя вычисляли по формуле: % восстановления = $[OD_{540}^{exp} - OD_{620}^{exp}] \times (OD_{540}^{AB} - OD_{540}^{med}) / (OD_{620}^{AB} - OD_{620}^{med})] \times 100\%$, где OD_{540}^{exp} и OD_{620}^{exp} – оптическая плотность в экспериментальных лунках, OD_{540}^{AB} и OD_{620}^{AB} – оптическая плотность 10%-ного Alamar Blue в 100 мкл среды, и OD_{540}^{med} и OD_{620}^{med} – оптическая плотность, измеренная в лунке со 100 мкл среды при длинах волн 540 и 620 нм соответственно.

Статистическая обработка. Для каждой экспериментальной группы подсчитывали среднее арифметическое и среднюю ошибку выборки. Оценку достоверности проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и клеток памяти необходимо для последующей молекулярной идентификации их антиген-специфических рецепторов. Вместе с тем оно сопряжено с существенными методическими трудностями, связанными с коротким временем жизни и нестабильностью полученных клонов, необходимостью подбора индивидуальных условий для их рестимуляции и требует дорогостоящих цитокинов. Эти трудности можно преодолеть, используя технологию получения Т-клеточных гибридом. Метод селективной активации клеток памяти CD8⁺, разработанный нами ранее, позволяет добиться их пролиферации, что необходимо для слияния с опухолевым партнером [10–12]. Такое слияние приводит к утрате как цитотоксической активности гибридной клетки, так и утрате корецептора CD8, необходимого для стабилизации взаимодействия TCR с молекулой MHC. Поэтому в качестве опухолевого партнера для слияния обычно используют тимому BWZ.36 CD8α–стабильный трансфектант тимомы BW5147 с генетической конструкцией, кодирующей α-субъединицу корецептора CD8. Активацию гибридных клеток в этом случае можно оценить по продукции ими IL-2 или транскрипционного фактора Т-лимфоцитов NF-AT (ядерный фактор активированных Т-клеток) [7].

Чтобы получить Т-клетки памяти, специфичные к молекуле H-2K^b MHC класса I, мы иммунизировали мышей B10.D2(R101) (K^dD^b) клетками тимомы EL4, происходящей из мышей линии C57BL/6 (K^bI^bD^b). Такая иммунизация приводит к иммунному ответу на единственный аллельный продукт – молекулу MHC класса I H-2K^b. При этом избирательно активируются Т-лимфоциты CD8⁺ реципиента, что приводит к развитию CTL с пиком активности на 12 сутки. Через 2 мес. после иммунизации в селезенке реципиентов остаются клетки памяти, не обладающие цитолитической активностью, которые можно избирательно рестимулировать *in vitro* спленоцитами мышей C57BL/6, убитыми воздействием острого теплового шока. Именно такие рестимулированные клетки памяти мы использовали для слияния с клетками тимомы BWZ.36CD8α и последующего получения Т-гибридом. Примерно половина (28 из 60) полученных клонов продуцировали IL-2 в ответ на спленоциты мышей C57BL/6 и их иммортилизованные фибробласты. Ответы этих клонов блокируются антителами к молекуле H-2K^b, и лишь 1/3 из них сохраняет

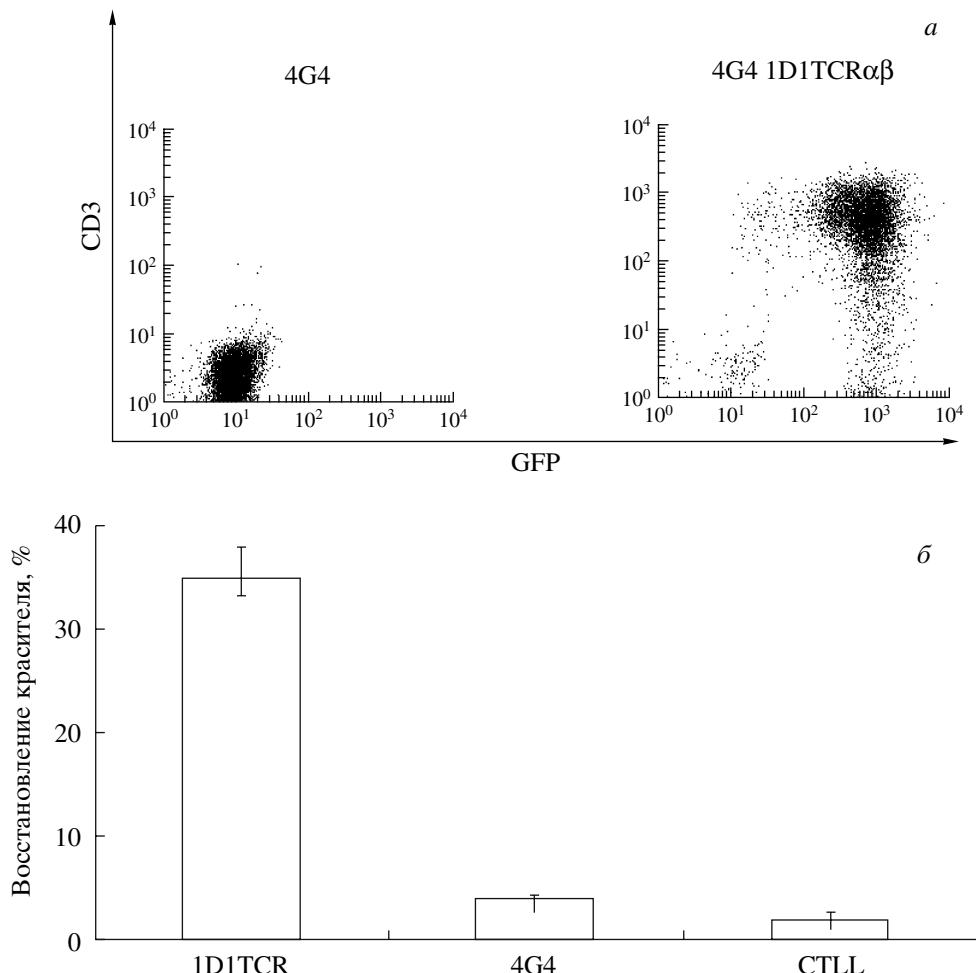


Рис. 1. Появление комплекса TCR/CD3 на мембране клеток тимомы 4G4 после ретровирусной трансдукции генетических конструкций, кодирующих α - и β -цепи TCR 1D1. *а* – Результаты цитофлуориметрического определения внутриклеточной экспрессии трансгена GFP и наличия CD3 на поверхности клеток тимомы 4G4 (контроль) и трансфектанта 4G4 1D1TCR $\alpha\beta$. По оси абсцисс – интенсивность экспрессии трансгена GFP, появляющейся в результате трансдукции гена α -цепи TCR в составе вектора, кодирующего IRES-GFP. По оси ординат – интенсивность окрашивания клеток антителами к CD3, появляющимся на мембране трансфектантов в результате корректного сворачивания и соединения α - и β -цепей TCR. *б* – Продукция IL-2 (измеренная по восстановлению красителя) трансфектантами после контакта с антителами к CD3, сорбиованными на пластике. По оси абсцисс – линии исследуемых клеток, по оси ординат – процент восстановления красителя Alamar Blue клетками CTL2-2 (% восстановления красителя).

способность отвечать на аллогенные спленоциты, убитые острым тепловым шоком. По всей видимости, эта способность связана с высокой аффинностью TCR, так как ответы клонов не полностью блокируются антителами к молекуле H-2K^b и наблюдаются при стимуляции мутантными формами молекулы H-2K^b – H-2K^{bm1} и H-2K^{bm3}.

Для дальнейшего клонирования TCR использовали гибридому 1D1, способную отвечать на молекулу гистосовместимости дикого типа H-2K^b и ее мутантную форму H-2K^{bm3}, содержащую точечные аминокислотные замены в остатках 77 и 89 тяжелой цепи. Нуклеотидные последовательности мРНК, кодирующую α - и β -цепи TCR этой гибридомы, доступны в GenBank под номерами DQ983579 и

DQ983580, а кодируемые ими полипептидные цепи – под номерами ABJ88843 и ABJ88844.

Для определения функциональности полученных конструкций мы использовали ретровирусную трансдукцию клеток тимомы 4G4 с последующей селекцией и клонированием трансфектантов со стабильной экспрессией трансгенов. Появление на поверхности клеток субъединицы CD3 ϵ рецепторного комплекса TCR/CD3, обнаруживаемое методом проточной цитофлуориметрии, может служить свидетельством корректного сворачивания, соединения и появления на клеточной поверхности трансгенных цепей TCR, в отсутствие которых эта молекула на мембране не появляется (рис. 1*a*). Свидетельством сохранности сигнальных функций комплекса

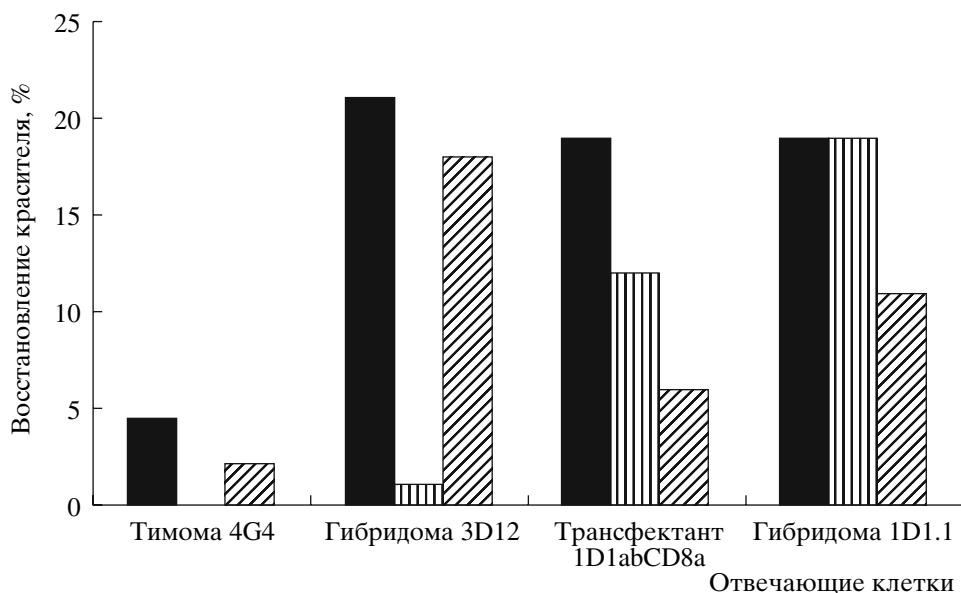


Рис. 2. Подавление продукции IL-2 в ответе на спленоциты мышей C57BL/10 антителами к корецепторам CD4 и к CD8. По оси абсцисс – отвечающие клетки: тимома 4G4; Т-гибридома 3D12, экспрессирующая CD4 и TCR, специфичный к молекуле A^b; трансфектант тимомы 4G4, экспрессирующий TCR 1D1, специфичный к молекуле H-2K^b, и корецептор CD8; Т-гибридома 1D1, экспрессирующая TCR 1D1 и CD8. Черные столбы – контроль; вертикальная штриховка – присутствие антител к CD4, косая штриховка – антител к CD8.

TCR/CD3 у трансфектантов может служить появление способности отвечать на антитела к CD3, сорбированные на пластике (рис. 1б). В отсутствие корецепторов полученные трансфектанты не отвечают на молекулы МНС (данные не представлены). В этой работе мы использовали идею А.В. Червонского ввести в клетки 4G4 посторонний корецептор (CD4) для оценки истинной специфичности TCR 1D1 в момент прохождения селекции в тимусе. Поэтому в полученные трансфектанты дополнитель но вводили генетические конструкции, кодирующие корецепторы CD4 и CD8.

Зависимость проведения сигнала через TCR 1D1 от корецептора CD8 подтвердилась в опытах с его блокированием антителами. На рис. 2 видно, что ответы как трансфектанта, так и Т-гибридомы, из которой был клонирован TCR 1D1, подавляются антителами к CD8, но не к CD4. В тех же условиях ответы клеток полученной нами Т-гибридомы 3D12, специфичной к молекуле МНС класса II A^b (положительный контроль), подавляются антителами к CD4, но не к CD8. На рис. 3 представлены результаты оценки активации трансфектантов спленоцитами мышей C57BL/6 и нокаутов по молекулам TAP. Ответ трансфектантов на спленоциты мышей, лишенные молекул МНС класса I, практически отсутствует, что и следовало ожидать, учитывая специфичность TCR 1D1 к молекуле МНС класса I H-2K^b. В тех же условиях клетки Т-гибридомы 3D12, специфичной к молекуле МНС класса II A^b, успешно

активируются в ответ на стимуляторы нокаутных животных. Это подтверждает селективность дефекта в экспрессии молекул МНС класса I при сохраненной способности стимулировать ответы на молекулы МНС класса II, а также указывает на корректные условия постановки опыта в целом. Обращает на себя внимание тот факт, что, несмотря на специфичность TCR 1D1 к молекуле МНС класса I H-2K^b, корецептор CD4 не менее эффективно способствует активации трансфектантов, чем CD8. Эти результаты показывают, что Т-лимфоцит, специфичный к молекуле МНС класса I, может успешно активироваться в присутствии корецептора, не совпадающего по специфичности с TCR.

Также интересный результат получен на трансфектантах, экспрессирующих оба корецептора одновременно. Как видно на рис. 3 и рис. 4, эти трансфектанты также успешно активируются в ответе на молекулу H-2K^b. Но если ответ трансфектанта, экспрессирующего только трансген корецептора CD8, как и следовало ожидать, подавляется антителами к CD8, то ответ двойных позитивных (DP) клеток CD4⁺ CD8⁺ начинает блокироваться антителами к CD4 и молекуле A^b МНС класса II, но не антителами к корецептору CD8 (рис. 4а, б). То есть трансфектанты DP, хотя их TCR и специфичен к молекуле МНС класса I, при добавлении антител к корецепторам начинают себя “вести” подобно клеткам Т-гибридомы 3D12, экспрессирующей корецептор CD4 и TCR, специфичный к молекуле МНС класса II A^b. Эти факты

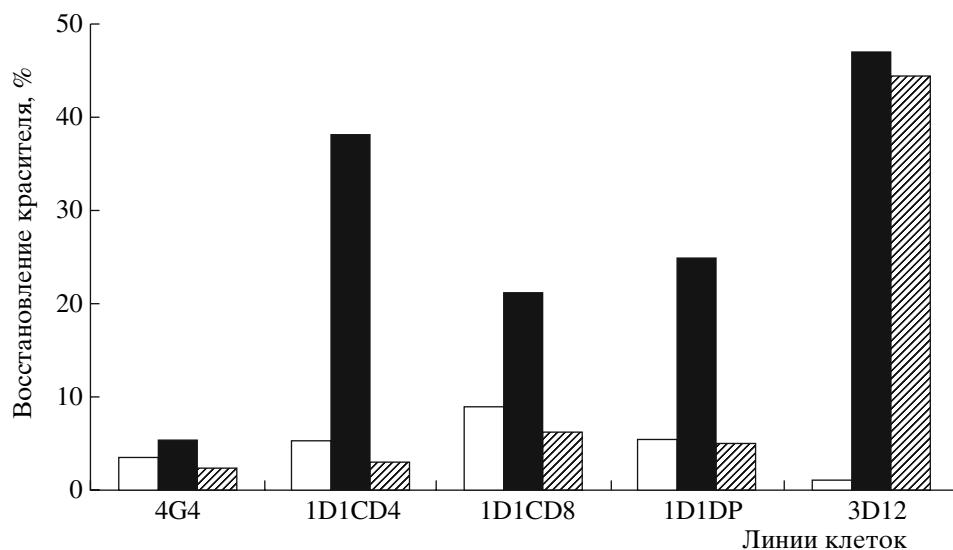


Рис. 3. Продукция IL-2 вариантами тимомы 4G4, экспрессирующими TCR 1D1, корецепторы CD4 и CD8 раздельно или вместе (DP), после стимуляции спленоцитами мышей R101 (контроль, белые столбы), C57BL/10 (черные столбы) и нокаутов по гену *Tap* (косая штриховка). Клетки нетрансфицированной тимомы 4G4 использовали как отрицательный контроль; клетки Т-гибридомы 3D12, специфичной к молекуле МНС класса II A^b, – как положительный контроль. По оси абсцисс – линии исследуемых клеток.

свидетельствуют о том, что трансгенный корецептор CD4 сохраняет свою специфичность и в процессе активации трансфектантов DP взаимодействует с молекулами МНС класса II. При этом он не только успешно замещает функции корецептора CD8 в ответе на молекулу МНС класса I, но и функционально доминирует над ним в условиях коэкспрессии на одном и том же Т-лимфоците. Сходная картина наблюдается и в ответе трансфектанта на мутантную молекулу K^{bm3}, что свидетельствует об истинно кросс-реактивном распознавании молекул K^b и K^{bm3} клонированным Т-рецептором 1D1 и о том, что способность исходной гибридомы отвечать на мутант bm3 не была обусловлена экспрессией второго аллеля α-цепи TCR, не выявленной нами.

Для проверки, связан ли эффект доминирования CD4 с сигнальными функциями корецепторов или их ролью стабилизатора взаимодействий TCR/MНС, мы получили трансфектанты с укороченной формой CD4, лишенной участка для связывания с тирозинкиназой p56^{lck}. Как видно на рис. 5, трансфектанты, экспрессирующие мутантный корецептор CD4, сохраняют способность к активации в ответе на молекулу МНС класса I, что свидетельствует о независимости активации трансфектантов 4G4 от сигнальной функции корецептора CD4. По всей видимости, реализация эффекта доминирования обусловлена конкурентными взаимоотношениями корецепторов CD4 и CD8 в ходе формирования иммунологического синапса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ключевые открытия этой работы следующие: 1) способность корецептора CD4 успешно замещать функции корецептора CD8 в процессе активации Т-лимфоцита, несущего TCR, специфичный к молекуле МНС класса I; 2) эффект функционального доминирования CD4 над CD8 в процессе активации Т-лимфоцита, коэкспрессирующего обе эти молекулы. Важное значение первого открытия состоит в том, что соответствие специфичностей TCR и корецептора, в норме являющееся результатом так называемого “коммитирования” (или детерминации) путей развития Т-клеток, не служит ограничением для антиген-специфической активации Т-лимфоцита CD4⁺. В связи с развитием методик трансгенеза и адоптивной иммунотерапии рака существенным практическим следствием этой находки является возможность одновременной активации Т-киллеров и Т-хелперов после трансфекции Т-лимфоцитов TCR, специфичными к молекулам МНС класса I у онкологических больных.

Функциональное доминирование CD4 над CD8 может быть крайне важным для понимания механизмов внутритимусной селекции и дифференцировки Т-лимфоцитов, так как только в этом органе имеет место стадия развития Т-клеток, на которой наблюдается коэкспрессия обоих корецепторов. Точной консенсуса в многолетней дискуссии о механизмах коммитирования Т-лимфоцитов в настоящее время является гипотеза о том, что ключевую роль в этом процессе играет продолжительность сигнала, получаемого клетками в результате взаимодействия TCR и CD4 развивающегося Т-лимфоцита с эндо-

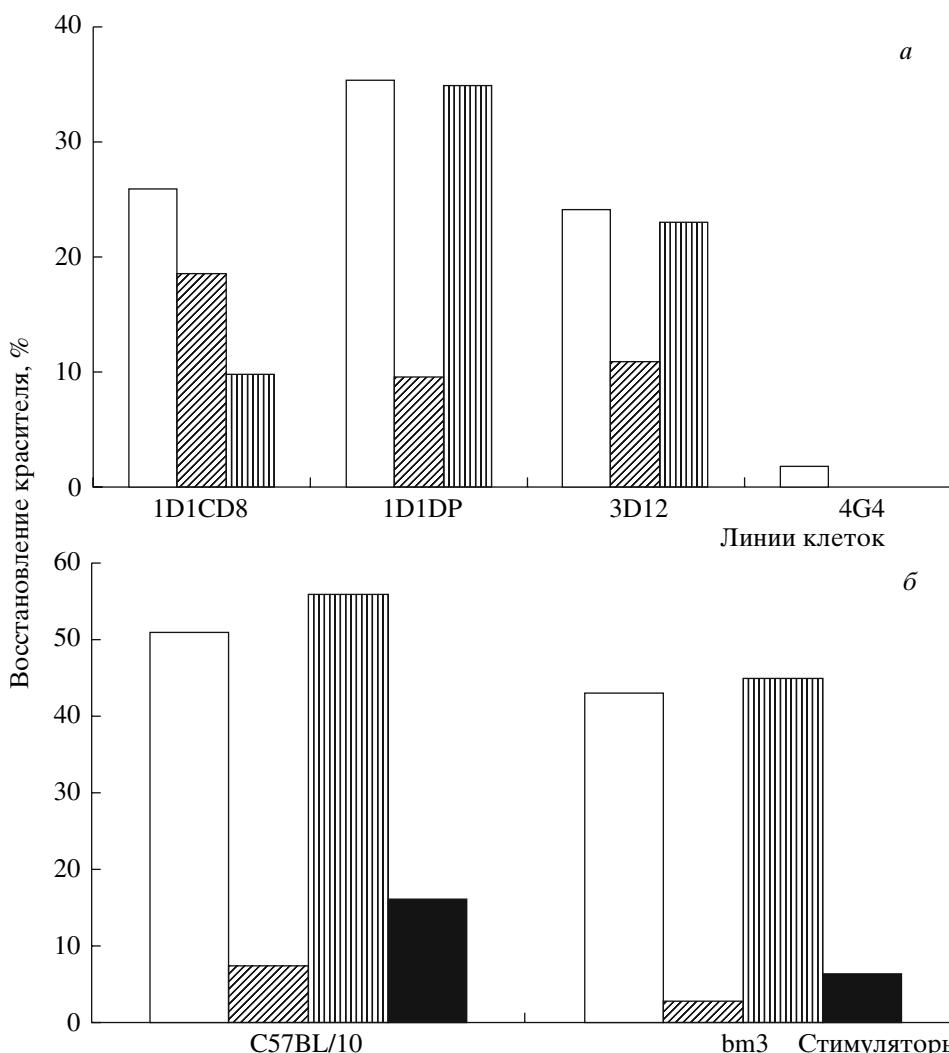


Рис. 4. Подавление ответа трансфектантов антителами к корецепторам CD4 и CD8 и молекуле МНС класса II A^b.
а – Ответ трансфектантов на спленоциты мышей C57BL/10 без добавления антител (белые столбцы), в присутствии антител к CD4 (косая штриховка) и в присутствии антител к CD8 (вертикальная штриховка). По оси абсцисс – линии исследуемых клеток; *б* – ответ трансфектантов CD4⁺CD8⁺ на спленоциты мышей C57BL/10 и bm3 (стимуляторы) без добавления антител (белые столбцы), в присутствии антител к CD4 (косая штриховка), к CD8 (вертикальная штриховка) и к молекуле A^b (черные столбцы). Клетки нетрансфицированной тимомы 4G4 использовали как отрицательный контроль. Клетки Т-гибридомы 3D12 использовали как аналог Т-клеток CD4⁺, специфичных к молекуле МНС класса II. По оси абсцисс – стимуляторы.

гennymi внутритимусными комплексами МНС-пептид. Сильный и продолжительный сигнал запускает дифференцировку Т-клеток CD4⁺, тогда как слабый и прерывистый приводит к дифференцировке Т-лимфоцитов CD8⁺ “по умолчанию”. Но до сих пор оставалось неясным, каким образом Т-лимфоцит “определяет”, с какой именно молекулой МНС связался его TCR, какой корецептор ему необходим для стабилизации этого связывания и почему такое коммитирование в направлении CD4 “не срабатывает” в отношении Т-клеток, несущих TCR, специфичный к молекуле МНС класса I. Действительно, все существующие объяснения феномена коммитиро-

вания основываются на постулате, что оба корецептора двойных позитивных клеток внутри тимуса функциональны и не зависят друг от друга. Наши опыты с трансфектантами показывают, что это может быть не так и что “в паре” с CD4 корецептор CD8 не работает. Это означает, что корецептору CD4 может принадлежать ведущая роль в ранних процессах позитивной и негативной селекции внутри тимуса, тогда как функция CD8 может включаться значительно позднее – на стадии однопозитивных Т-лимфоцитов SP CD8⁺. Такая временная задержка позволила бы клетке дифференцировать сигналы, получаемые от взаимодействия корецепторных мо-

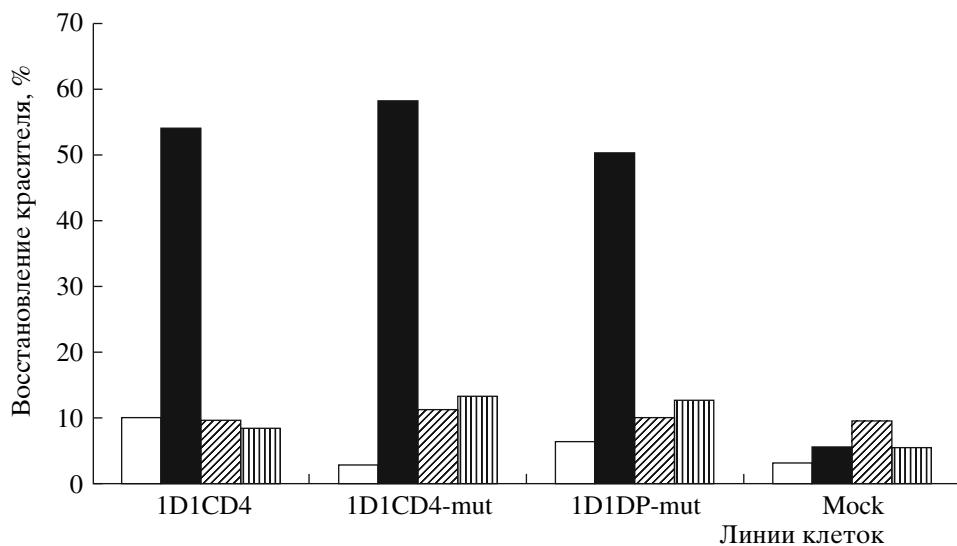


Рис. 5. Продукция IL-2 вариантами тимомы 4G4, экспрессирующими TCR 1D1, а также нормальный или мутантный CD4, лишенный участка для связывания с тирозинкиназой p56lck в цитоплазматическом домене, в ответ на стимуляторы мышей R101 (сингенный контроль, белые столбцы), C57BL/10 (черные столбцы), нокаутов по молекулам β_2 -микроглобулина (косая штриховка) и TAP (вертикальная штриховка). Трансфектанты, экспрессирующие пустые (без вставок) векторы (Mock), использовали как отрицательный контроль.

лекул с молекулами МНС, и включить соответствующую программу дифференцировки.

В соответствии с нашей гипотезой, решающая роль в процессе коммитирования развития Т-лимфоцитов принадлежит корецептору CD4. Его взаимодействие с молекулой МНС класса II при специфичности Т-клеточного рецептора к той же молекуле должно приводить к продолжительному активационному сигналу, подавлению экспрессии гена CD8 и дифференцировке в Т-лимфоциты CD4⁺. Если же TCR взаимодействует с молекулой МНС класса I, т.е. имеет место несоответствие специфичностей TCR и CD4, то это должно приводить к разобщению сигнальных событий и получению Т-клеткой слабого прерывистого сигнала, ведущего к подавлению экспрессии гена CD4 и дифференцировке Т-лимфоцитов CD8⁺.

Эта гипотеза дает возможность понять ряд труднообъяснимых особенностей формирования периферического репертуара зрелых Т-клеток, выявленных в последние годы. Например, почему у генетических нокаутов по корецептору CD4 развиваются Т-лимфоциты CD8⁺, значительную долю которых составляют Т-клетки со специфичностью к молекулам МНС класса II [13]. В этом случае отсутствие корецептора CD4 должно в соответствии с гипотезой приводить к слабым и непродолжительным взаимодействиям TCR с молекулами МНС класса II, что включает процесс их aberrантной дифференцировки в направлении Т-клеток CD8⁺. Становится понятным и то, почему Т-лимфоциты с нарушенным соответствием специфичностей TCR и корецептора не развиваются у нока-

тутов по корецептору CD8. Антиген-специфические киллеры (CTL) и клетки памяти у таких животных имеют фенотип двойных негативных Т-лимфоцитов DN CD4⁻CD8⁻ и не становятся CD4⁺. В этом случае наличие корецептора CD4 обеспечивает нормальное коммитирование Т-лимфоцитов, специфичных к молекулам МНС класса II, по пути развития Т-клеток CD4⁺. Т-лимфоциты со специфичностью к молекулам МНС класса I получают активационный сигнал через взаимодействие TCR с молекулой МНС класса I и корецептора CD4 с молекулами МНС класса II, что позволяет им пройти эту “контрольную точку” их развития. Не имея возможности экспрессировать корецептор CD8, Т-лимфоциты, тем не менее, приобретают другие функциональные свойства предшественников киллеров – экспрессию генов Runx3 и перфорина, и после стимуляции аллогенными молекулами МНС класса I становятся CTL и клетками памяти CD4⁻CD8⁻ (даные не представлены).

Если предложенная гипотеза верна, то не менее интересным будет новое объяснение механизмов негативной селекции Т-клеток. Согласно существующим представлениям негативной селекции подвергаются автoreактивные Т-лимфоциты, несущие высокоаффинные TCR к “своим” молекулам МНС, что приводит к получению ими слишком сильного активационного сигнала и включению процессов апоптоза. Этот механизм является ключевым в создании и поддержании центральной толерантности к “своему” и предотвращении аутоиммунных реакций. Доминирование CD4 в этом случае приведет к тому, что негативная селекция сможет эффективно

устранить лишь аутореактивные Т-лимфоциты, коммитированные в направлении дифференцировки Т-лимфоцитов CD4⁺ и распознающие собственные молекулы МНС класса II. Популяция Т-лимфоцитов с TCR, специфичными к собственным молекулам МНС класса I, не сможет получить сильный активационный сигнал из-за разобщенности связывания TCR и корецептора CD4 с молекулами МНС классов I и II соответственно. Таким образом, популяция Т-лимфоцитов CD8⁺ может содержать повышенное число клонов с аутореактивными, кросс-реактивными и "неразборчивыми" TCR по сравнению с Т-лимфоцитами CD4⁺. Не исключено, что именно неполная делеция аутореактивных клеток приводит к тому, что заметная часть Т-лимфоцитов CD8⁺ несет рецепторы, специфичные к сингенным молекулам МНС класса II – эффекту, выявленному нами ранее [14]. Широко известный феномен индукции *in vitro* лимфокин-активированных киллеров, способных к неспециальному разрушению сингенных и посторонних клеток-мишеней, может служить подтверждением справедливости этой гипотезы.

Механизм функционального доминирования CD4 над CD8 пока неясен. Обсуждая роль корецепторов в активации Т-лимфоцитов, обычно отмечают сигнальную функцию этих молекул, связанную с их ассоциацией с тирозинкиназой p56^{lck}, и взаимодействие с консервативными эпигопами молекул МНС. Первая функция важна для усиления сигнала активации через Т-клеточный receptor, тогда как вторая приводит к стабилизации взаимодействия TCR с молекулами МНС и формированию иммунологического синапса. В этой работе мы применили экспериментальную систему оценки активации Т-лимфоцитов, в которой сигнальная функция корецепторов, по-видимому, не играет особой роли. Мы показали, что укороченная форма CD4, лишенная участка для связывания с тирозинкиназой p56^{lck} в цитоплазматическом домене, остается функциональной, будучи экспрессированной в клетках злокачественно трансформированной тимомы 4G4, хотя ассоциация этой киназы с корецепторами критически важна для активации нормальных Т-лимфоцитов [15, 16]. По этой причине мы не можем сказать, в какой мере доминирование обусловлено конкуренцией CD4 с CD8 за связывание с p56^{lck}, учитывая 18-кратное различие в его эффективности [17]. Во всяком случае, роль конкурентных физических взаимодействий корецепторов с молекулами МНС в ходе формирования иммунологического синапса представляется более вероятной.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (05-04-49793а, 07-04-00567а) и грантом ЗАО Центр внедрения "Протек".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen W. 2004. The late stage of T cell development within mouse thymus. *Cell Mol. Immunol.* **1**, 3–11.
- He X., Kappes D.J. 2006. CD4/CD8 lineage commitment: light at the end of the tunnel? *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 135–142.
- Anderson M.K. 2006. At the crossroads: diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators. *Immunol. Rev.* **209**, 191–211.
- Liu X., Bosselut R. 2004. Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation *in vivo*. *Nat. Immunol.* **5**, 280–288.
- Egawa T., Tillman R.E., Naue Y., et al. 2007. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 1945–1957.
- Sladowski D., Steer S.J., Clothier R.H., Balls M. 1993. An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods.* **157**, 203–207.
- Sanderson S., Shastri N. 1994. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int. Immunol.* **6**, 369–376.
- Ahmed S.A., Gogal R.M. Jr., Walsh J.E. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods.* **170**, 211–224.
- Casanova J.L., Romero P., Widmann C., et al. 1991. T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J. Exp. Med.* **174**, 1371–1383.
- Казанский Д.Б., Петрищев В.Н., Штиль А.А., et al. 1999. Использование теплового шока антигенпрезентирующих клеток для функционального тестирования аллоспецифических Т-клеток памяти. *Биоорганич. химия*. **25**, 117–128.
- Побединская Е.Л., Побединский Л.А., Силаева Ю.Ю., et al. 2004. Кросс-реактивность Т-клеточного рецептора клона клеток памяти CD8⁺, полученного в ответе на иммунизацию клетками аллогенной опухоли. *Бюлл. эксп. биол. мед.* **137**, 563–568.
- Гриненко Т.С., Побединская Е.Л., Побединский Л.А., et al. 2005. Подавление клетками памяти CD8⁺ первичного аллогенного ответа. *Бюлл. эксп. биол. мед.* **140**, 556–561.
- Tuznik A.J., Sun J.C., Bevan M.J. 2004. The CD8 population in CD4-deficient mice is heavily contaminated with MHC class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **199**, 559–565.
- Побединский Л.А., Побединская Е.Л., Терещенко Т.С., et al. 2004. Периферический пул Т-клеток CD8⁺ содержит лимфоциты с антигенспецифическими рецепторами, распознающими сингенные молекулы МНС класса II. *Онкогенез*. **35**, 183–189.
- Glaichenhaus N., Shastri N., Littman D.R., Turner J.M. 1991. Requirement for association of p56^{lck} with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell*. **64**, 511–520.
- Palacios E.H., Weiss A. 2004. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*. **23**, 7990–8000.
- Campbell K.S., Buder A., Deusche U. 1995. Interactions between the amino-terminal domain of p56^{lck} and cytoplasmic domains of CD4 and CD8 alpha in yeast. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2408–2412.