

# Влияние экспериментального гестационного диабета на экспрессию иммунной субъединицы протеасомы LMP-2 и аутоиммунного регулятора AIRE в тимусе

Камышный А.М.

Запорожский государственный медицинский университет, Украина, Запорожье, 69035, пр-т Маяковского, 26

*Исследовались особенности экспрессии белка AIRE и иммунной субъединицы протеасомы LMP-2 в тимусе у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД). Для определения AIRE и LMP-2 были применены методы иммуногистохимии и двойной иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к AIRE, LMP-2, CD4-антигену и цитокератинам крысы. Установлено, что у потомства крыс с ЭГД наблюдаются изменения уровня экспрессии LMP-2 и AIRE в тимусе, что может оказывать влияние на представительство панкреатических антигенов и их процессинг, являясь факторами риска развития аутоиммунной патологии у потомства.*

**Ключевые слова:** LMP-2, AIRE, тимус, гестационный диабет

## Введение

В настоящее время сахарный диабет I типа рассматривается как многофакторное, полигенное заболевание, в патогенезе которого важную роль могут играть нарушения функционирования целого ряда генов. К ним относят гены, кодирующие молекулы главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, инсулин, транскрипционный фактор Foxp3, цитотоксический лейкоцитарный антиген CTLA-4 и другие гены, и др. [6]. Особое место среди генов, критичных для развития аутоиммунной патологии, занимают гены, регулирующие протеасомную деградацию белков и процессинг антигенов [18], и ген аутоиммунного регулятора (AIRE) [11, 13].

Протеасомы — это мультисубъединичные и мультикаталитические протеиназные комплексы эукариотических клеток. Клетки млекопитающих и человека содержат несколько форм и субтипов протеасом. Наиболее изученными формами являются 26S- и 20S-протеасомы [7]. 26S-протеасомы состоят из 20S-субчастицы — протеолитического «ядра» — и фланкирующих ее 19S-субчастиц. Они гидролизуют убиквитинированные белки в АТФ-зависимой реакции. Каждая из этих форм образована четырьмя субтипами, различающимися сочетанием конститутивных и иммунных протеолитических субъединиц. Замена конститутивных субъединиц на иммунные происходит во вновь образующихся протеасомах при определенных условиях, например, под воздействием IFN. При этом конститутивные каталитические субъединицы X ( $\beta 5$ ), Y ( $\beta 1$ ) и Z ( $\beta 2$ ) замещаются на иммунные субъединицы LMP-7 ( $\beta 5i$ ), LMP-2 ( $\beta 1i$ ) и LMP-10 ( $\beta 2i$ ) [4]. Экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли нарушений процессинга антигена, осуществляемого иммунными протеасомами в развитии аутоиммунной патологии. Во многом, по-видимому, это обусловлено и их локализацией — гены, кодирующие иммунные субъединицы протеасом LMP-2, LMP7 и транспортер антигенных пептидов TAP, расположены в регионе, кодирующем молекулы MHCII класса и отличающемся выраженным полиморфизмом [18]. Таким образом, логично предположить, что в случае изменения экспрессии иммунных субъединиц

протеасомы в клетках тимуса они могли бы утратить способность продуцировать собственные антигенные эпитопы в достаточном количестве, что в результате может привести к риску развития аутоиммунной патологии из-за резкого уменьшения презентруемых тимоцитам аутоантигенов.

Ген AIRE был впервые идентифицирован в 1997 г. позиционным клонированием независимо двумя международными группами исследователей как ген, ответственный за развитие аутоиммунного полигландулярного синдрома (autoimmune polyendocrine/polyglandular syndromes, APS, APECED), представляющего собой первичное поражение двух и более периферических эндокринных желез с развитием их недостаточности [20]. Открытия последних лет показали, что AIRE является регулятором эктопической транскрипции в тимусе целого ряда периферических тканеспецифических антигенов (peripheral tissue-specific antigens, PTSAs), в том числе таких панкреатических антигенов как инсулин, проинсулин, проглюкагон, просоматостатин и пропанкреатический полипептид [11]. Изменения уровня экспрессии AIRE в тимусе может существенно влиять на представительство  $\beta$ -клеточных антигенов и таким образом нарушать процесс формирования центральной толерантности к ним, создавая серьезную угрозу для развития СД [13].

Наряду с этим, актуальной проблемой современной диабетологии является гестационный диабет (ГД) — нарушение углеводного обмена, впервые выявленное или возникшее во время настоящей беременности и приводящее к гипергликемии различной степени выраженности. Внутритробная гипергликемия, развивающаяся при ГД, способна вызвать нарушения морфогенеза тимуса и дисфункцию его лимфоидного и эпителиального компартов, что, в свою очередь, может привести к нарушению формирования центральной толерантности к панкреатическим антигенам как фактору риска развития сахарного диабета у потомства. Поэтому целью настоящего исследования было изучение особенности экспрессии иммунной субъединицы протеасомы LMP-2 и аутоиммунного регулятора AIRE в тимусе у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД).

### Методы исследования

Экспериментальный гестационный диабет моделировали по методике, разработанной на кафедре патофизиологии ЗГМУ [1]. Исследования проведены на самцах — потомках крыс с ЭГД в возрасте 1 мес. (n = 9), 2 мес. (n = 9), 3 мес. (n = 9) и 6-месячных (n = 9). Для выявления экспрессии AIRE и LMP-2 в тимусе использовали метод двойной иммунофлуоресценции. Для этого гистологические срезы тимуса инкубировали в течение 18 часов во влажной камере при T = 4°C одновременно с первичными кроличьими моноклональными антителами к AIRE или LMP-2 крысы производства Santa Cruz Biotechnology (США), с мышинными моноклональными антителами

к цитокератинам крысы (monoclonal Anti-Pan Cytokeratin — MAPC, клон РСК-26) производства Sigma, (США) и с мышинными моноклональными антителами к CD4-антигену крысы производства Beckman Coulter (США), уже конъюгированными с флюоресцеина изотиоцианатом (FITC) в вариантах AIRE-MAPC, AIRE-CD4, LMP-2-MAPC, LMP-2-CD4. После отмывки избытка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 мин (T = 37°C) со вторичными антителами в разведении 1:64. В качестве вторичных антител использовали козы антитела к полной молекуле IgG кролика, конъюгированные с Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, США). Изображение, получаемое на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) в ультрафиолетовом спектре воз-

Таблица 1

Количество (на 1 мм<sup>2</sup>) AIRE<sup>+</sup>-клеток и концентрация белка AIRE (E<sub>ИФ</sub>) в тимусе у потомства крыс с ЭГД (M ± m)

Серии	AIRE-иммунопозитивные клетки	
	Корковое вещество	Мозговое вещество
Контроль — 1 мес.	166 ± 23 0,252 ± 0,003	304 ± 25 0,264 ± 0,003
Потомство крыс с ЭГД — 1 мес.	123 ± 19 0,256 ± 0,005	332 ± 23 0,254 ± 0,003 <sup>1</sup>
Контроль — 2 мес.	164 ± 19 0,326 ± 0,006	322 ± 34 0,336 ± 0,004
Потомство крыс с ЭГД — 2 мес.	124 ± 18 0,230 ± 0,004 <sup>1</sup>	281 ± 28 0,231 ± 0,003 <sup>1</sup>
Контроль — 3 мес.	197 ± 20 0,250 ± 0,004	347 ± 25 0,249 ± 0,003
Потомство крыс с ЭГД — 3 мес.	195 ± 29 0,256 ± 0,003	362 ± 25 0,253 ± 0,003
Контроль — 6 мес.	155 ± 13 0,262 ± 0,005	314 ± 27 0,278 ± 0,004
Потомство крыс с ЭГД — 6 мес.	142 ± 14 0,283 ± 0,007 <sup>1</sup>	316 ± 21 0,255 ± 0,003 <sup>1</sup>

Примечание. в числителе — плотность популяции AIRE<sup>+</sup>-клеток (на 1 мм<sup>2</sup>), в знаменателе — концентрация AIRE (E<sub>ИФ</sub>); достоверность отличий параметров p<0,05 по отношению к контролю (<sup>1</sup>).

Таблица 2

Количество (на 1 мм<sup>2</sup>) LMP-2-иммунопозитивных клеток и концентрация LMP-2 (E<sub>ИФ</sub>) в тимусе у потомства крыс с ЭГД (M ± m)

Серии	LMP-2-иммунопозитивные клетки	
	Корковое вещество	Мозговое вещество
Контроль — 1 мес.	709 ± 29 0,424 ± 0,002	799 ± 31 0,402 ± 0,002
Потомство крыс с ЭГД — 1 мес.	367 ± 27 <sup>1</sup> 0,335 ± 0,003 <sup>1</sup>	474 ± 19 <sup>1</sup> 0,363 ± 0,003 <sup>1</sup>
Контроль — 2 мес.	584 ± 28 0,395 ± 0,003	680 ± 22 0,380 ± 0,002
Потомство крыс с ЭГД — 2 мес.	507 ± 18 <sup>1</sup> 0,409 ± 0,003 <sup>1</sup>	809 ± 33 <sup>1</sup> 0,431 ± 0,002 <sup>1</sup>
Контроль — 3 мес.	544 ± 25 0,363 ± 0,002	605 ± 29 0,381 ± 0,002
Потомство крыс с ЭГД — 3 мес.	541 ± 29 0,405 ± 0,003 <sup>1</sup>	721 ± 30 <sup>1</sup> 0,400 ± 0,002 <sup>1</sup>
Контроль — 6 мес.	771 ± 49 0,302 ± 0,003	844 ± 26 0,391 ± 0,002
Потомство крыс с ЭГД — 6 мес.	333 ± 20 <sup>1</sup> 0,335 ± 0,003 <sup>1</sup>	684 ± 24 <sup>1</sup> 0,390 ± 0,002

Примечание. В числителе — плотность популяции клеток (на 1 мм<sup>2</sup>), в знаменателе — концентрация LMP-2 (E<sub>ИФ</sub>); достоверность отличий параметров p<0,05 по отношению к контролю (<sup>1</sup>).

буждения 390 нм (FITC) или 595 нм (Texas Red) с помощью высокочувствительной видеокамеры СОНУ-4922 (СОНУ Inc., США), вводилось в компьютерную систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Дополнительно для визуализации LMP-2<sup>+</sup>-клеток в тимусе у потомства крыс с ЭГД ставили иммуногистохимическую реакцию с первичными МКАТ к LMP-2 крысы и вторичными антителами rabbit ImmunoCruz™ Staining system (Santa Cruz Biotechnology, США), конъюгированными с пероксидазой хрена.

### Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что количество AIRE<sup>+</sup>-клеток в корковом веществе тимуса у контрольных крыс во все изученные сроки постна-

тального онтогенеза было в 1,8—2 раза ниже ( $p < 0,05$ ), чем в мозговом, что соответствует данным литературы о преимущественной экспрессии AIRE в мозговом веществе тимуса [13]. При этом среди AIRE<sup>+</sup>-клеток идентифицировались как эпителиоретикулоциты тимуса (AIRE<sup>+</sup>MAPC<sup>+</sup>), так и тимоциты (AIRE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>). Изучение плотности популяции AIRE<sup>+</sup>-клеток в тимусе у экспериментальных животных показало, что развитие ЭГД не влияло на их количество, сохранявшееся на уровне контрольных значений на протяжении первых 6 месяцев постнатального онтогенеза (табл.1). При этом концентрация белка AIRE в AIRE<sup>+</sup>-клетках коркового вещества тимуса у потомства крыс с ЭГД достоверно снижалась на 29% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем у 2-месячного потомства и увеличивалась на 8% ( $p < 0,05$ ) у 3-месячного, тогда

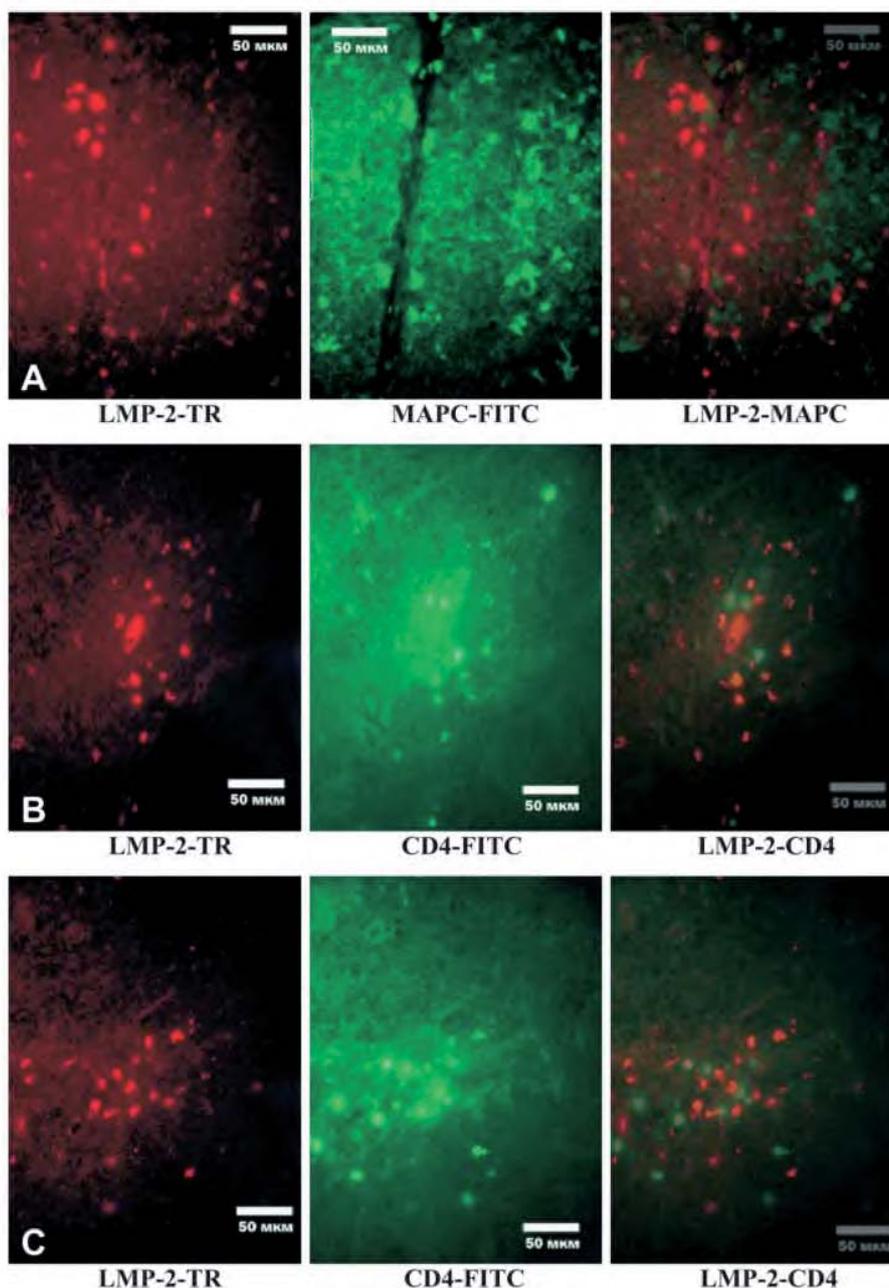


Рис. 1. (А-С). LMP-2<sup>+</sup>-клетки в тимусе крыс линии Wistar. Реакция двойной иммунофлуоресценции: LMP-2<sup>+</sup>-Texas Red, CD4<sup>+</sup>-FITC, MAPC<sup>+</sup>-FITC: А – ЭГД 1 мес., кора; В – ЭГД 2 мес., мозговое вещество; С – ЭГД 6 мес., мозговое вещество.

как в мозговом веществе тимуса наблюдалось достоверное снижение данного показателя по сравнению с контролем в 1-месячном, 2-месячном и 6-месячном возрасте, наиболее выраженное у 2-месячного потомства (на 31%,  $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Количество LMP-2<sup>+</sup>-клеток в корковом веществе тимуса у контрольных 1-месячных животных было  $709 \pm 29$  на  $1 \text{ мм}^2$ , затем несколько снижалось у 2-месячных и 3-месяч-

ных крыс, тогда как к 6-месячному возрасту их количество снова увеличивалось, превышая значения даже 1-месячного потомства (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют об относительной стабильности экспрессии LMP-2 в коре тимуса, которая обнаруживается не только в раннем периоде постнатального онтогенеза, но и сохраняется на высоком уровне вплоть до зрелого возраста. При этом количество LMP-2<sup>+</sup>-клеток в корковом веществе тимуса у контрольных

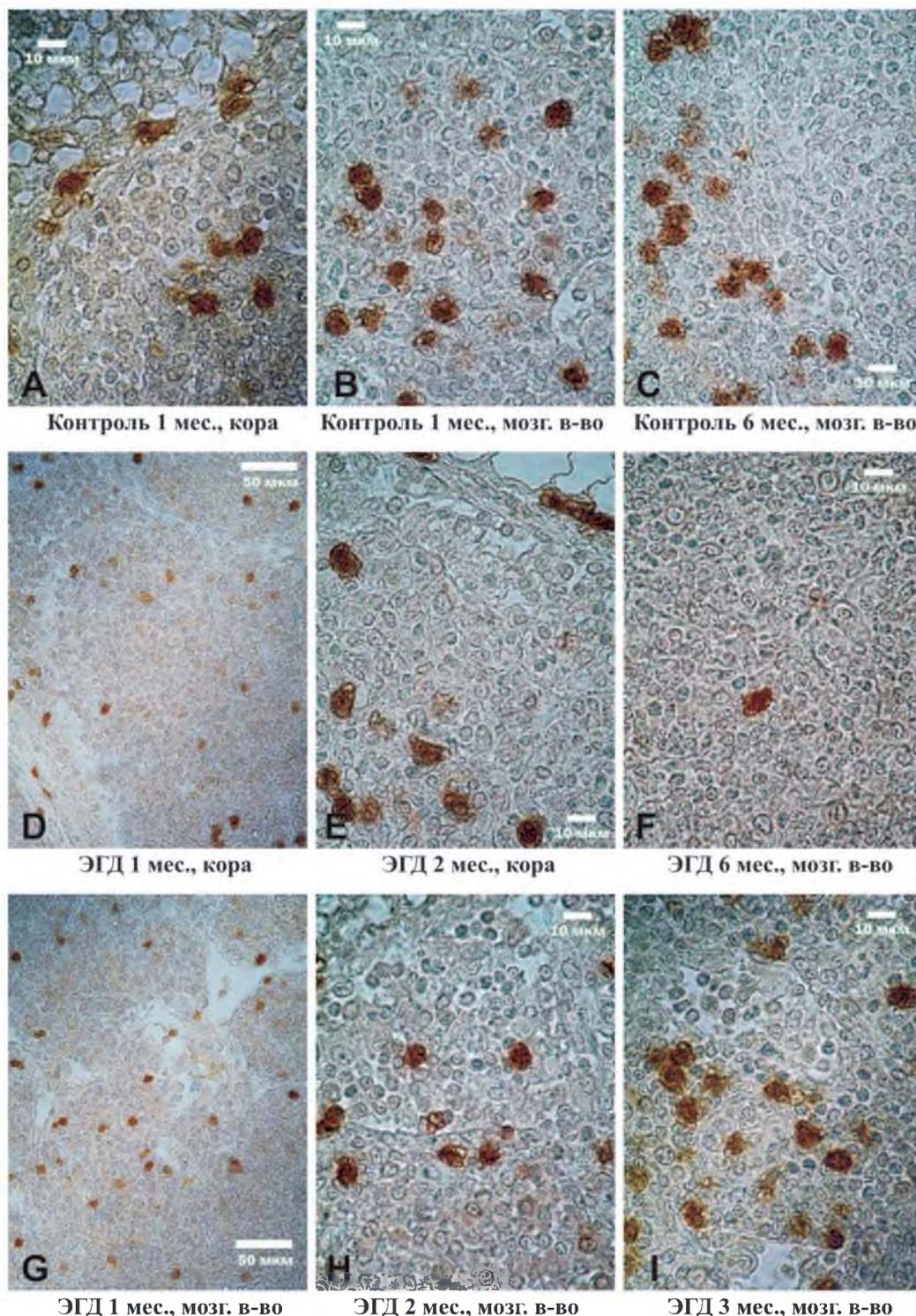


Рис. 2. (А-І) LMP-2<sup>+</sup>-клетки в тимусе у потомства крыс с ЭГД. Иммуногистохимическая реакция с первичными МКАТ к LMP-2 крысы и вторичными антителами rabbit ImmunoCruz™ Staining system.

крыс во все изученные сроки постнатального онтогенеза было ниже, чем в мозговом. Среди LMP-2<sup>+</sup>-клеток методом двойной иммунофлуоресценции идентифицировались эпителиоретикулоциты (LMP-2<sup>+</sup>MAPC<sup>+</sup>) и тимоциты (LMP-2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) (рис. 1).

Изучение плотности популяции LMP-2<sup>+</sup>-клеток в корковом веществе тимуса у экспериментальных животных показало, что развитие ЭГД сопровождалось снижением их количества в раннем периоде постнатального онтогенеза (на 48% ( $p < 0,05$ ) у 1-месячного потомства крыс с ЭГД и на 13% ( $p < 0,05$ ) у 2-месячного), восстановлением до уровня контрольных значений у 3-месячного потомства, после чего отмечалась вторая волна снижения числа LMP-2<sup>+</sup>-клеток у 6-месячного потомства (на 57%,  $p < 0,05$ ) (табл. 2, рис. 2).

Изучение концентрации белка LMP-2 в LMP-2<sup>+</sup>-клетках коркового вещества тимуса показало, что у 1-месячного потомства крыс с ЭГД наблюдалось достоверное снижение данного показателя на 21% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, тогда как в последующие изученные сроки постнатального онтогенеза концентрация LMP-2 достоверно увеличивалась по сравнению с контрольными животными соответствующего возраста (табл. 2).

Развитие ЭГД сопровождалось разонаправленными изменениями количества LMP-2<sup>+</sup>-клеток в мозговом веществе тимуса у потомков. Так, у 1-месячного потомства крыс с ЭГД плотность популяции LMP-2<sup>+</sup>-клеток снижалась на 41% ( $p < 0,05$ ), у 2- и 3-месячного потомства крыс с ЭГД их число увеличивалось на 19% ( $p < 0,05$ ), тогда как у 6-месячного потомства, как и в коре тимуса, отмечалась вторая волна снижения количества LMP-2<sup>+</sup>-клеток (на 20%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными животными соответствующего возраста (табл. 2, рис. 2). Изучение концентрации белка LMP-2 в LMP-2<sup>+</sup>-клетках мозгового вещества тимуса показало, что у 1-месячного потомства крыс с ЭГД наблюдалось достоверное снижение данного показателя на 10% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, тогда как у 2- и 3-месячного потомства крыс с ЭГД концентрация LMP-2 достоверно возрастала, после чего снижалась до уровня контрольных значений у 6-месячного потомства (табл. 2).

Полученные нами данные совпадают с рядом других исследований. Так, изучение иммунных протеасом в тимусе крыс методом Western blotting и ИГХ [14] показало, что LMP2 и LMP7 субъединицы обнаруживаются в эпителиоретикулоцитах как коры, так и мозгового вещества тимуса. Кроме того, экспрессия LMP2 и LMP7 была обнаружена и в тимоцитах также. Однако, количество иммунопозитивного материала в тимоцитах было ниже, чем в эпителиоретикулоцитах. Изучение внутриклеточной локализации LMP2 и LMP7 субъединиц показало их расположение в цитоплазме клеток. Иммунные субъединицы LMP7 и LMP2 обнаруживаются в достаточном количестве и в пулах протеасом селезенки крыс, и других лимфоидных органах [17].

Гидролиз генетически чужеродных и своих белков осуществляют как конститутивные, так и иммунные протеасомы. Но при гидролизе этих белков иммунными протеасомами в несколько раз возрастает выход олигопептидов длиной 8—11 аминокислотных остатков с «правильным» С-концом, содержащим гидрофобные аминокислоты или аргинин. Олигопептиды такой длины соответствуют размерам антигенных эпитопов. В комплексе с моле-

кулами ГКГ класса I они выносятся на поверхность клетки и более эффективно представляются тимоцитам в ходе их селекции [17].

Протеасомы являются важнейшими регуляторами селекции тимоцитов. Причем, если иммунные субъединицы LMP-2, MECL-1 и LMP-7 контролируют главным образом негативную селекцию [16], то недавно открытая субъединица  $\beta 5t$ , выраженная исключительно в корковых эпителиоретикулоцитах и названная «тимопротеасомой», как полагают, является ответственной за позитивную селекцию тимоцитов [15]. Субъединица  $\beta 5t$  включается в 20S протеасому вместо субъединицы  $b5i$  (LMP-7). Характерно, что другие две каталитические субъединицы, входящие в тимопротеасому — это LMP-2 и MECL1, однако они представлены в корковых эпителиоретикулоцитах слабее, чем  $b5t$ .

У мышей линии NOD методом иммуноблоттинга было обнаружено снижение экспрессии LMP2-субъединицы иммунной протеасомы в селезенке [9]. Количество мРНК LMP2 и TAP1 в лимфоцитах у мышей линии NOD было также снижено по сравнению с контрольными животными [19]. В ряде работ отмечается прямое регулирующее влияние между иммунными субъединицами протеасом и еще одним важным регулятором процессинга антигенов — белками теплового шока: усиление экспрессии Hsp увеличивает уровень экспрессии генов LMP2 и LMP7 [5]. Отмечается также прямая ассоциация между экспрессией гена SUMO (small ubiquitin-like modifier), являющегося важным компонентом убиквитин-протеасомной системы, и восприимчивостью к СД 1 типа [12], что автор связывает с изменением интенсивности сумоилиации HSF1 (heat shock transcription factor) и HSF2 и изменением таким образом уровня экспрессии белков теплового шока [3]. Дискутируется вопрос о возможности применения ингибиторов протеасом в терапии аутоиммунных заболеваний [2].

Было выдвинуто множество различных гипотез, пытающихся объяснить роль AIRE в контроле аутоиммунной патологии [11]. Эти гипотезы включают: контроль организации стромы тимуса; управление процессами селекции тимоцитов и формирования центральной толерантности; регуляция ответов Т- и В-лимфоцитов на антигенные стимулы; стимулирование апоптоза эпителиоретикулоцитов тимуса и таким образом усиление кросс-презентации их антигенов; управление процессами дифференцировки натуральных иммунорегуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток тимуса (T<sub>Reg</sub>) [13]. Значительный интерес представляют исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе функционирования AIRE, пытающихся приблизиться к пониманию того, каким образом этот белок регулирует эктопическую транскрипцию генов, кодирующих PTAs. Возможно, что AIRE функционирует как эпигенетический регулятор транскрипции, модифицируя генную экспрессию путем обратимых изменений структуры хроматина и/или в результате метилирования ДНК [11].

Поскольку AIRE-регулируемые гены имеют тенденцию локализоваться в определенных группах (кластерах), Kaufmann B. et al. (2007) было выдвинуто предположение, что AIRE функционирует как регулятор геномных кластеров и активизирует гены в стохастической манере [10]. Стохастическое управление транскрипцией может проявляться в том, что AIRE, одинаково выраженный в двух идентичных клетках, может выступать в роли промотора

транскрипции в одной клетке и в роли репрессора в другой, приводя в результате к неравному количественному выражению белка в каждой клетке [11]. Интересным фактом оказалось обнаружение того, что дефицит Aire вызывает увеличенную восприимчивость к стрептозоточин-индуцированному сахарному диабету [8]. Кроме того, макрофаги Aire (-/-) мышей продуцировали более высокие уровни продиабетогенного цитокина TNF $\alpha$  и более низкие уровни супрессорного цитокина IL-10 после индукции стрептозоточинового диабета, а Aire (-/-) мыши проявляли более высокую частоту обнаружения аутоантител к клеткам панкреатических островков [8].

### Выводы

1. У потомства крыс с ЭГД наблюдаются изменения уровня экспрессии иммунной субъединицы протеасомы LMP-2 и аутоиммунного регулятора AIRE в тимусе, что может оказывать существенное влияние на представительство панкреатических антигенов и их процессинг, являясь факторами риска развития аутоиммунной патологии у потомства.

2. Обнаруженная экспрессия иммунных протеасом тимусными клетками, а также выявленные данные об экспрессии AIRE этими же клетками, позволяет нам предположить, что не только эпителиоциты тимуса, а и тимоциты принимают активное участие в генерации эндогенных пептидов для негативной селекции.

### Список литературы

1. Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Беленічев І.Ф., Ганчева О.В., Камішній О.М., Грекова Т.А. Спосіб моделювання гестаційного діабету у щурів лінії Вістар для вивчення його наслідків для нащадків. Декларативний патент на корисну модель — 15.09.2006. — Бюл. №9. — №17281.
2. Bennett M., Kirk C. Development of proteasome inhibitors in oncology and autoimmune diseases // *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* — 2008. — Vol. 11(5). — P. 616–625.
3. Bohren K., Nadkarni V., Song J., Gabbay K., Owerbach D. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 27233–27238.
4. Borissenko L., Groll M. Diversity of proteasomal missions: fine tuning of the immune response // *Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 388(9). — P. 947–955.
5. Callahan M., Wohlfert A., Menoret A., Srivastava K. Heat shock up-regulates *lmp2* and *lmp7* and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes // *The J. of Immunology.* — 2006. — Vol. 177. — P. 8393–8399.
6. Chentoufi A., Binder N., Berka N. et al. Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms // *Scandinavian J. of Immunology.* — 2008. — Vol. 68. — P. 1–11.
7. DeMartino G., Gillette T. Proteasomes: machines for all reasons // *Cell.* — 2007. — Vol. 129. — P. 659–662.
8. Hassler S., Peltonen L., Sandler S. et al. Aire deficiency causes increased susceptibility to streptozotocin-induced murine type 1 diabetes // *Scand. J. Immunol.* — 2008. — Vol. 67. — P. 569–580.
9. Hayashi T., Faustman D. NOD mice are defective in proteasome production and activation of NF- $\kappa$ B // *Mol. and Cel. Biol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 8646–8659.
10. Kaufmann B., Oudenaarden A. Stochastic gene expression: from single molecules to the proteome // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2007. — Vol. 17. — P. 107–112.
11. Kont V., Laan M., Kisand K. et al. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens // *Mol. Immunol.* — 2008. — Vol. 45. — P. 25–33.
12. Li M., Guo D., Isales C., Eizirik D., Atkinson M., She J., Wang C. SUMO wrestling with type 1 diabetes // *J. Mol. Med.* — 2005. — Vol. 83. — P. 504–513.
13. Mathis D., Benoist C. A decade of AIRE // *Nature Reviews Immunology.* — 2007. — Vol. 7. — P. 645–650.
14. Melnikova V., Afanasieva M., Dmitrieva S., Karpova Y., Sharova N., Zakharova L. Immune proteasomes in the developing rat thymus. // *Biochemistry.* — 2008. — Vol. 73. — P. 451–457.
15. Murata S., Sasaki K., Kishimoto T. et al. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes // *Science.* — 2007. — Vol. 316. — P. 1349–1353.
16. Murata S., Takahama Y., Tanaka K. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides // *Curr. Opin. Immunol.* — 2008. — Vol. 20. — P. 192–196.
17. Sharova N. P. Immune proteasomes and immunity // *Ontogenesis.* — 2006. — Vol. 37. — P. 171–178.
18. Sia C., Weinem M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes in the intracellular pathway of antigen processing — a subject review and cross-study comparison // *Rev. Diabet. Stud.* — 2005. — Vol. 2(1). — P. 40–52.
19. Yan G., Fu Y., Faustman D. Reduced expression of Tap1 and *Lmp2* antigen processing genes in the nonobese diabetic (NOD) mouse due to a mutation in their shared bidirectional promoter // *J. Immunol.* — 1997. — Vol. 159. — P. 3068–3080.
20. Zuklys S., Balciunaite G., Agarwal A. et al. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune- polyendocrinopathy- candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165. — P. 1976–1983.

Посмувала 21.11.2013

## ***Influence of experimental gestational diabetes mellitus on the expression of immune subunits of the proteasome LMP-2 and autoimmune regulator AIRE in the thymus***

**Kamyshny A.M.**

Zaporozhye State Medical University, Department of Microbiology, Virology and Immunology; 69095 Ukraine, Zaporozhye, Mayakovskiy str., 26

*In experiment expression peculiarities of AIRE-protein and immune proteasomes subunit LMP-2 in EGD rat thymus were researched and discussed. Immunohistochemistry and double immunofluorescence with using monoclonal antibodies to AIRE, LMP-2, CD4-antigen and rat cytokeratins were applied for AIRE and LMP-2 determination. We have establish that rats offsprings with EGD had changes with thymus expression level LMP-2 and AIRE, that can influence on pancreatic antigen representation and its processing, being offsprings risk autoimmune pathology development factor.*

**Key words:** LMP-2, AIRE, thymus, gestational diabetes mellitus