

Исследование степени пролиферации лимфоцитов и экспрессии мРНК генов ИЛ2 и ИЛ2РА в активированных конканавалином А лимфоцитах с помощью ПЦР «в реальном времени»

Савилова А. М., старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ ГНЦ «Институт Иммунологии ФМБА России», г. Москва; Чулкина М. М., научный сотрудник, ЗАО «НПФ ДНК Технология», г. Москва; Трофимов Д.Ю., генеральный директор, доктор биологических наук, ЗАО «НПФ ДНК Технология», г. Москва

Investigation of lymphocyte proliferation rate and IL2 and IL2RA mRNA expression in concanavalin A-activated lymphocytes by real time PCR

Savilova A.M., Chulkina M.M., Trofimov D.Yu.

Резюме

Реакция бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) представляет собой классический метод исследования функциональной активности лимфоцитов. В этой реакции *in vitro* оценивают степень пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) в ответ на различные стимулы с помощью включения меченого ³H-тимидина в ДНК в сравнении с нестимулированными клетками, однако использование радиоактивной метки ограничивает применение этой методики на практике. Целью работы являлось исследование степени пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови с помощью разработанной нами тест-системы на основе ПЦР «в реальном времени» в сравнении с классической методикой с использованием ³H-тимидина. Маркерами реакции служили гены, активность продуктов которых возрастает при митозе: топоизомеразы II альфа (ген *tpa*) и белка CDC2 (ген *cdc2*). В ходе работы с использованием метода ПЦР в режиме «реального времени» была исследована кинетика накопления соответствующих мРНК в процессе стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови неспецифическим митогеном конканавалином А (ConA). Также был проведен мониторинг изменения уровня мРНК генов интерлейкина 2 и рецептора интерлейкина 2α (*il2* и *il2ra*, соответственно). Выявлены значимые различия в кинетике накопления мРНК исследованных генов по сравнению со стимуляцией фитогемагглютинином. Полученные результаты показывают, что мРНК генов *tpa* и *cdc2* может служить надежным маркером пролиферации клеток в РБТЛ, что позволяет создать удобные тест-системы для оценки функциональной активности лимфоцитов *in vitro* без использования радиоактивной метки, а определение уровня мРНК интерлейкина 2 можно использовать как маркер активации клеток иммунной системы при стимуляции ConA в первые же часы после стимуляции.

Ключевые слова: реакция бластной трансформации, РВМС, конканавалин А, экспрессия мРНК, ПЦР «в реальном времени»

Summary

One of the traditional methods of lymphocytes functional activity research is blast transformation reaction (RBTL). The rate of PBMC proliferation in response to different stimuli can be evaluated *in vitro* by introduction of radioactive ³H-thymidine in cell DNA. The aim of our work was to search for alternative method of RBTL evaluation by PCR since clinical application of RBTL is limited due to radioactive labelling. The genes expressing an increased proteomic activity of their products in mitosis such as topoisomerase II alpha (gene *tpa*) and CDC2 (gene *cdc2*) were chosen as proliferation markers. In our work test systems for mRNA content estimation of *tpa* and *cdc2* genes in concanavalin A activated lymphocytes were developed by means of real time PCR. Kinetics of mRNA level of *il2* and *il2ra* genes in these cells was investigated. As a result the mRNA accumulation of the given genes was monitored from the stimulation starting up to 180 hours of post stimulation time. Common pattern of their mRNA expression in cells of healthy donors was identified, significant differences in kinetics of mRNA levels in comparison with lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin were determined. The obtained results show that *tpa* and *cdc2* mRNA are reliable proliferation markers in RBTL. Thus convenient test systems for lymphocytes functional activity evaluation *in vitro* free of radioactive labelling can be developed. The mRNA level of interleukin 2 gene can be used as marker of lymphocyte activation by concanavalin A in the first hours of stimulation.

Keywords: blast transformation reaction, PBMC, concanavalin A, mRNA expression, real time PCR.

Введение

Конканавалин А (ConA) — глобулярный лектин из бобов *Canavalia ensiformis*, который широко применяется в иммунологии как Т-клеточный митоген. ConA является поликлональным активатором Т-системы лимфоцитов — стимулирует процесс образования интерлейкина 2 и других цитокинов, повышает цитотоксичность Т-клеток. Связывается мембранными гликопротеинами Т-лимфоцитов: глюкопиранозидами, фруктофуранозидами и маннанопиранозидами.

Достаточно хорошо изучено активирующее влияние ConA на лимфоциты. В 60-70-х годах появилось большое количество работ по активации ConA антигеннеспецифических Т-супрессоров. Было показано, что ConA приводит к значительной супрессии первичного и вторичного иммунного ответа на эритроциты барана, генерировании цитотоксических Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ), а также антительного ответа. Была исследована не только супрессия клеточной цитотоксичности, но и перенос её клетками перитонеального экссудата при внутрибрюшинной инъекции ConA. Отмечали замедление отторжения трансплантата у животных, которым вводили ConA. Однако в дальнейшем было обнаружено, что ConA активирует также и хелперное звено иммунитета. Имеются факты, свидетельствующие об активирующем влиянии ConA на лимфоциты: выработка интерлейкина 2, генерирование неспецифических киллеров, индукция пролиферации лимфоцитов и повышение уровня экспрессии рецепторов к интерлейкину 1.

В последние годы нарастает количество работ, посвященных влиянию ConA на печень. Так, показано, что при развитии индуцированного ConA гепатита важную роль играют цитокины: фактор некроза опухоли альфа, ИЛ 2 и интерферон γ , увеличивается содержание ИЛ 4 и ИЛ 10. Наряду с этим происходит активация клеточного звена иммунитета (Kato et al., 2001). Таким образом, ConA-индуцированное повреждение печени является адекватной экспериментальной моделью гепатита.

В настоящее время во многих странах (например, в Южном Китае и в Тайване) рак печени представляет собой основную причину смерти среди мужчин с онкологическими заболеваниями. Было обнаружено, что конканавалин А обладает противоопухолевым эффектом. После связывания ConA с маннозными остатками на поверхности клеточной мембраны он интернализуется (в основном в митохондриях), вследствие чего запускается процесс аутофагии, что приводит к гибели клеток. Кроме того, ConA, действуя как Т-клеточный митоген, одновременно активирует иммунный ответ в печени, и это приводит к уничтожению опухоли в мышинной модели гепато-

мы in situ. Образование опухолевых узелков в печени ингибируется CD8+ Т-клетками, и в процессе воспаления в печени формируется антиген-специфичная иммунологическая память к опухолевым клеткам. Двойной эффект ConA (аутофагальная цитотоксичность и иммуномодуляция) посредством связывания со специфическим углеводным остатком позволяет этому веществу оказывать мощный терапевтический эффект против клеток гепатомы (Lei et al., 2009). Таким образом, конканавалин А представляет собой потенциальное терапевтическое средство с противоопухолевым эффектом, и изучение его действия на клетки иммунной системы человека на современном уровне и современными методами является актуальной задачей.

Материалы и методы

Реагенты, среды, приборы

Вакутейнеры с гепарином BD Vacutainer Heparin Tubes #367675

Раствор фиколла - ПанЭко #P050 (плотность 1.077г/мл)

Глутамин ПанЭко #Ф032

HEPES ПанЭко #Ф134

Полная питательная среда (ППС) RPMI 1640 с добавлением 2мМ глутамин, 20мМ HEPES буфера и 10% инактивированной FBS.

Конканавалин А ПанЭко #M011, стоковый раствор в ППС 25мкг/мл.

Планшеты 96 луночные индивидуально упакованные - Nunc

Среда 199 с солями Хэнкса и глутамином – ПанЭко #C230

Среда RPMI 1640 - Sigma, #R0883

Сыворотка Standart Fetal Bovine Serum, HyClone #SH30088.03, лот APC20780, инактивирована нагреванием на водяной бане в течение 1 часа при 56°C

Меченый ^3H -тимидин – Санкт-Петербургское ФГУП «Изотоп». 1мл раствора, содержащий 1мCi радиоактивного изотопа, разбавили 19 мл стерильного физиологического раствора. Полученная концентрация составила 50 $\mu\text{Ci}/\text{мл}$.

Синтез праймеров и зондов «НПФ ДНК Технологии»

Центрифуга для выделения лимфоцитов Eppendorf 5810R, ротор А-4-81

Микроскоп инвертированный Nikon TMS

Набор для выделения нуклеиновых кислот «Проба НК», «НПФ ДНК-Технология» #P 002/1

Амплификатор для ПЦР «в реальном времени» «ДТ-322» «НПФ ДНК-Технология» #O DT322 02/2, и «ДТ-96», «НПФ ДНК-Технология» #O DT96 05/1

Твердотельный термостат с прижимной крышкой «Гном» «НПФ ДНК-Технология» #O TT1

Реакция бластной трансформации

Работа состояла из двух этапов. На первом этапе брали кровь 15 здоровых доноров (семи мужчин и восьми женщин, средний возраст 32±6 лет), для которых исследовали клетки без стимуляции и при стимуляции ConA.

Ответственный за ведение переписки -
Савилова Анастасия Михайловна,
109469, Москва, ул.Поречная д.31 корп.1 кв.194,
тел.+7 917 561 05 36,
e-mail: saviлова@dna-technology.ru

Без стимуляции брали следующие четыре точки: сразу после выделения на фиколле и через 6, 18, 36 часов культивирования в полной питательной среде. При стимуляции СопА исследовали следующие шесть точек: в момент добавления СопА (через 8 12 часов после выделения на фиколле), через 6, 18, 28, 52, 76 часов (в данной работе не показано). Подобный эксперимент с этими донорами повторили дважды.

Из исследованных 15 человек были отобраны наиболее различающиеся по результатам предварительных анализов трое здоровых доноров (женщины 38 и 34 лет и мужчина 33 лет), на клетках крови которых была построена более развернутая кинетика ответа, представленная в настоящей работе. Кровь брали натошак в вакутейнеры с гепарином, выделение лимфоцитов из ПК проводили не позднее чем через 2 часа после взятия крови. Выделение фракции мононуклеарных клеток проводили, как описано ранее (Current protocols in immunology, 2003), с наибольшими изменениями. Коротко, 7 мл свежей крови, взятые в вакутейнер с гепарином, разбавляли 1:2 по объему средой 199 с солями Хэнкса и глутамином, насливали на 3-4 мл раствора фиколла, центрифугировали при 1600 об/мин., 15°C, 15 мин. Интерфазу аккуратно переносили в чистые пробирки и трижды отмывали 5-8 мл среды 199 в той же центрифуге при 1200 об/мин., 15°C, 10 мин. После отмывок сливали супернатант, полученные клетки ресуспендировали на вортексе в 1 мл полной питательной среды RPMI-1640, определяли число выделенных мононуклеарных клеток в гемоцитометре под микроскопом. Добавляли необходимое количество полной питательной среды RPMI-1640 до концентрации 10^6 клеток/мл среды.

В стерильный планшет раскапывали по 2×10^4 выделенных клеток на лунку в объеме 200 мкл, добавляли по 20 мкл стокового раствора СопА (итоговая концентрация 2.5 мкг/мл). В лунки с клетками для контроля спонтанной пролиферации СопА не добавляли. Планшет помещали в CO_2 инкубатор, насыщенный водяным паром, на 7-8 суток при 37°C, 5% CO_2 . Через определенное количество часов брали пробы клеток.

Праймеры и зонды для ПЦР «в реальном времени»

Для определения содержания мРНК исследуемых генов в наших экспериментах были использованы праймеры и зонды, опубликованные ранее (Савилова и др., 2008).

Выделение РНК и ДНК

Для выделения нуклеиновых кислот использовали наборы "Проба НК". Метод основан на лизисе образцов в 4М растворе гуанидинтиоцианата, осаждении нуклеиновых кислот изопропанолом, с последующими отмывками этанолом и ацетоном. Использование 4М раствора гуанидинтиоцианата позволило зафиксировать материал, предотвратить его деградацию, а также провести все работы и измерения в пределах одного эксперимента. Выделение образцов проводили в соответствии с методикой набора «Проба НК». Объем полученного препарата нуклеиновых кислот составил 50 мкл.

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводили в объе-

ме 20 мкл (в реакцию брали 16,5 мкл полученного препарата нуклеиновых кислот). В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды. Реакцию проводили при температуре 40°C в течение 1 часа, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 15 минут.

Проведение ПЦР «в реальном времени»

Для каждого образца проводили ПЦР со специфическими праймерами на гены *tpa*, *cdc2*, *il2* и *il2ra*. Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом структур экзонов и интронов таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК на генах *tpa*, *cdc2*, *il2*, *il2ra* и *hprt1*. Это позволило не использовать дополнительный этап обработки нуклеиновых кислот ДНКазой. Отсутствие амплификации на матрице геномной ДНК со специфичных праймеров на гены *tpa*, *cdc2*, *il2*, *il2ra* и *hprt1* проверяли экспериментально на образцах, не прошедших реакцию обратной транскрипции. Все зонды содержали метку Fam. Реакции амплификации со специфичных праймеров на *tpa*, *cdc2*, *il2*, *il2ra*, *hprt1* и *ghr* ставили в разных пробирках. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР использовали "горячий старт", который обеспечивался путем разделения компонентов реакции парафином. Амплификацию осуществляли в режиме «реального времени» в объеме 35 мкл по следующей программе:

80°C 30 сек, 94°C 1 мин 1 цикл

94°C 10 сек, 64°C 20 сек 50 циклов

Для ПЦР «в реальном времени» использовали прибор «ДТ-322» и «ДТ-96» («НПФ ДНК-Технология»). Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C.

Дополнительный контроль прохождения реакции осуществляли методом электрофореза продуктов ПЦР в 2% агарозном геле.

Параметры, используемые для описания ПЦР «в реальном времени»

1. Cp - значение порогового цикла, автоматически определяемое прибором.

2. Slope - разница в значениях Cp (Δ Cp) при разведении образца в 10 раз.

3. Эффективность амплификации оценивали по формуле:

$$E = 10^{-(1/\text{slope})}; E(\%) = (E - 1) \times 100\% \text{ (формула 1)}$$

4. В качестве главной характеристики эксперимента использовали отношение (R) уровня экспрессии маркеров реакции к фоновому значению экспрессии этих маркеров, полученному в первые минуты/часы культивирования лимфоцитов. Фактически величина R показывает, во сколько раз увеличивается количество мРНК исследуемого гена в процессе культивирования лимфоцитов по сравнению с количеством мРНК этого гена в свежее выделенных из крови здорового донора лимфоцитах.

Для определения R были использованы два способа (Ребриков и другие, 2009):

- метод нормировки по ДНК. R считали, как соотношение нормированного по ДНК гена *ghr* уровня экспрессии мРНК *cdc2*, *tpa*, *il2* или *il2ra* (X) в определенный

момент времени $[X_i]/[ghr]$ к фоновому значению $[X_i]/[ghr]$.

- метод без применения нормировочных генов:

$$R = 10^{1(Cr_i - Cr_f)/\log e} \text{ (формула 2),}$$

где Cr_f – фоновое значение порогового цикла в первые часы РБТЛ,

Cr_i – значение порогового цикла в определенный момент времени РБТЛ.

Мониторинг экспрессии мРНК генов *cdc2*, *tpa*, *il2*, *il2ra*.

Кинетику нарастания мРНК генов осуществляли путем отбора проб в определенные временные промежутки времени РБТЛ (таблица 1), причем каждая временная точка ставилась в двух повторях, а в расчетах использовали среднее значение. Кроме стимулированных лимфоцитов, в качестве отрицательного контроля использовали точки спонтанной пролиферации без добавления *ConA*. Таким образом, в каждый момент времени отбирали материал из 4 лунок планшета для каждого образца.

Было проведено три независимых эксперимента с клетками РВМС отобранных доноров, в результатах показаны средние значения по трем экспериментам.

Оценка РБТЛ по включению меченого 3Н-тимидина

Оценку РБТЛ по включению меченого 3Н-тимидина проводили, как описано ранее (Current protocols in immunology, 2003). Коротко, через 72 часа инкубации клеток с *ConA* (либо без *ConA* – контроль спонтанной пролиферации) вносили по 10 мкл раствора 3Н тимидина в лунку (0,5 μ Ci), инкубировали 8 часов в CO_2 инкубаторе с 5% CO_2 и насыщенным водяным паром при 37°C, собирали клетки на харвестере (Titertek cell harvester, Flow Laboratories) на стеклянные фильтры, промывали водой, фиксировали метанолом, высушивали как описано в методике, помещали фильтры во флаконы со сцинтиллятором и определяли β излучение на β счетчике (Wallac 1409 DSA).

По полученным значениям СРМ определяли индекс стимуляции лимфоцитов (ИС) по формуле 3:

$ИС = СРМ(\text{среднее значение опыта})/СРМ(\text{среднее значение контроля})$ (формула 3),

где среднее значение контроля представляет собой среднее значение СРМ образцов, культивированных без добавления *ConA*.

Результаты и обсуждение

Мониторинг накопления мРНК генов *cdc2*, *tpa*, *il2*, *il2ra* в РБТЛ при стимуляции лимфоцитов *ConA*

В наших экспериментах в каждую лунку планшета вносилось одинаковое количество материала. Благодаря использованному в данной работе протоколу взятия проб и выделения нуклеиновых кислот (см. главу «Материалы и методы») исключалась деградация мРНК и, таким образом, нормировка по мРНК генов жизнеобеспечения клетки (housekeeping genes) не являлась необходимой. Для корректировки полученных значений по количеству клеток использовали нормализацию по количеству ДНК, определяемому с помощью ПЦР «в реальном вре-

мени» по значениям, полученным для гена *ghr*. Этот ген присутствует в клетке в единственной копии. Более того, поскольку в данной работе количество клеток и условия культивирования были стандартизованы, оказалось возможным определять соотношение уровней экспрессии мРНК генов *cdc2*, *tpa*, *il2*, *il2ra* напрямую, без применения нормировочных генов (формула 2). Ранее нами было показано (Савилова и др., 2009), что при стимуляции РВМС митогеном фитогемагглютинином (ФГА) экспрессия мРНК гена *hprt1* увеличивается; в случае митогена *ConA* экспрессия мРНК гена *hprt1* также увеличивается (не показано), поэтому данный ген оказался непригоден для нормировки в нашей работе, но может быть использован для контроля стадий выделения нуклеиновых кислот и обратной транскрипции. Соотношения нормированных значений по ДНК в большинстве случаев соответствовали соотношению уровня экспрессии без применения нормировочных генов.

В ходе экспериментов были установлены следующие закономерности:

в реакции бластной трансформации с применением *ConA* экспоненциальное увеличение уровней экспрессии мРНК генов *cdc2* и *tpa* начинается со вторых суток культивирования (рисунок 1, через 32-40 часов), а существенное нарастание уровня экспрессии мРНК гена *il2ra* – в первые сутки примерно через 20 часов после стимуляции (рисунок 2);

максимум экспрессии мРНК генов *cdc2* и *tpa* приходится на 3-5 сутки реакции (60-120 часов) (рисунок 1); максимум содержания мРНК гена *il2* наблюдается в первые часы культивирования с *ConA* (3-4 часа), а максимум содержания мРНК гена *il2ra* – существенно позже, на 3-5 сутки (60-72 часа) (рисунок 2).

уровень экспрессии мРНК генов *cdc2*, *tpa*, *il2* и *il2ra* возрастает в сотни и тысячи раз по сравнению с исходным уровнем в крови здоровых доноров; следовательно, оценка этого уровня с помощью ПЦР является еще одним доступным методом наряду с использованием гибридационных методов (рисунки 1, 2);

уровень экспрессии генов *cdc2* и *tpa* в свежыведенных из крови лимфоцитах оказался незначительно выше, чем в культуре клеток до начала периода экспоненциального роста (таблица 1), поэтому фоновые значения следует определять в течение первых суток культивирования, а не в точке 0.

Оценка РБТЛ по включению меченого 3Н-тимидина

Для контроля постановки РБТЛ использовали метод оценки по включению меченого 3Н-тимидина, как описано в главе «Материалы и методы». Полученные значения сведены в таблицу 2.

После взятия крови и выделения мононуклеарных клеток в них происходит снижение уровня экспрессии генов *cdc2*, *tpa*, *il2* и *il2ra* (таблица 1); по видимому, такой эффект вызывает процедура выделения. В «нулевой» точке сразу после выделения значения уровней экспрессии этих генов имеют большой разброс и не могут использоваться в качестве нормировочных. Лишь через несколь-

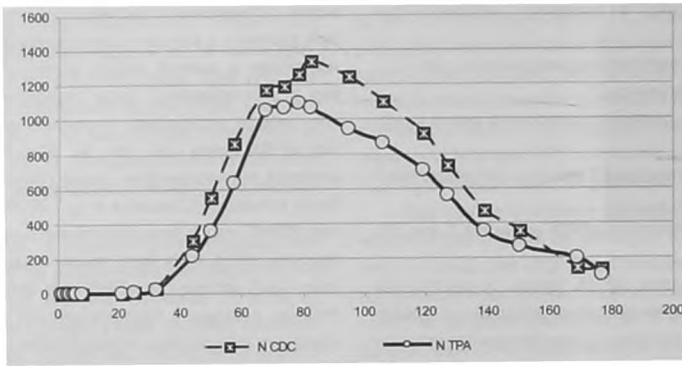


Рис. 1. Кинетика изменения уровней экспрессии мРНК генов *tra* и *cdc2* в мононуклеарных клетках периферической крови, стимулированных ConA.

Показано среднее значение по трем здоровым донорам.
N CDC уровень экспрессии мРНК гена *cdc2* в РВМС;
N TPA уровень экспрессии мРНК гена *tra* в РВМС.

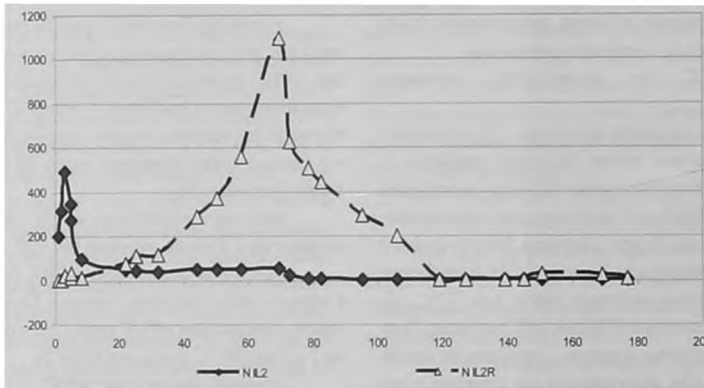


Рис. 2. Кинетика изменения уровней экспрессии мРНК генов *il2* и *il2ra* в мононуклеарных клетках периферической крови, стимулированных ConA.

Показано среднее значение по трем здоровым донорам.
N IL2 уровень экспрессии мРНК гена *il2* в РВМС;
N IL2R уровень экспрессии мРНК гена *il2ra* в РВМС.

Таблица 1. Значения в свежeweделенных РВМС в точке 0 и после 12 часов культивирования, нормированные на среднее значение культивированных клеток в течение 12 80 ч без добавления митогена.

Показано среднее по трем экспериментам, \pm стандартное отклонение.

	CDC	TPA	IL2	IL2RA
Нормированные значения в точке 0	6,2 \pm 1,5	5,4 \pm 1,7	15,5 \pm 5,7	7,3 \pm 2,1
Нормированные значения в точке 12 часов	1,04 \pm 0,2	0,97 \pm 0,4	1,03 \pm 0,5	0,98 \pm 0,4

ко часов (10 12 часов) после выделения мононуклеарных клеток из периферической крови значения уровней мРНК исследуемых генов выходят на плато, и именно эти значения были выбраны в качестве нормировочных в данной работе. В лимфоцитах без стимуляции ранее не удавалось обнаружить мРНК гена *cdc2* (Furukawa et al., 1990), одна-

ко это может быть связано с недостаточной чувствительностью использованных методов (Нозерн блота и обратной транскрипции-ПЦР с детекцией по конечной точке).

В таблице 3 показано сравнение результатов оценки степени пролиферативного ответа клеток, полученных с помощью классического метода включения мече-

ного ^3H тимидина после культивации лимфоцитов в течение 72 часов и с помощью ПЦР «в реальном времени» через 72, 82 и 106 часов культивирования. Нормировку количества мРНК проводили относительно содержания мРНК данных генов через 12 часов после начала культивирования клеток. Видно, что результаты, полученные этими двумя методами, хорошо соответствуют друг другу, однако значения, полученные в точке 72 часа, еще не являются максимальными в случае оценки относительно количества мРНК. Максимальные значения количества мРНК генов *cdc2* и *tpa* достигаются позднее, через 82 часа. Можно сделать вывод, что при анализе результатов воздействия на мононуклеарные клетки периферической крови разнообразными стимулами для получения более адекватной картины следует анализировать несколько образцов (оптимально 2-3) в различные промежутки времени, учитывая возможные временные отличия в динамике пролиферативного ответа (Савилова и др., 2009). Например, для анализа с помощью ПЦР «в реальном времени» мРНК генов *cdc2* и *tpa* в ответ на стимуляцию *СopA* можно отбирать образцы клеток через 72 и 82 часа после начала культивирования.

При стимуляции лимфоцитов *СopA*, в отличие от стимуляции с помощью ФГА (Савилова и др., 2008), существенных индивидуальных отличий во временной динамике накопления мРНК генов, участвующих в митозе, между здоровыми донорами нами обнаружено не было. Это объясняется, по видимому, другой природой митогенного стимула, а также, возможно, другой выборкой здоровых доноров. Кроме того, содержание мРНК гена *cdc2* достигает максимума практически одновременно с мРНК гена *tpa* (рисунок 1), в отличие от результатов, полученных при стимуляции РВМС ФГА (Савилова и др., 2008), где максимальное значение мРНК гена *cdc2* достигалось на несколько часов раньше по сравнению с мРНК

гена *tpa*. Известно, что максимум содержания мРНК гена *tpa* приходится на 16 часов после прохождения клетками метафазы (Goswami et al., 1996), а в случае с геном *cdc2* клетки содержат максимальное количество его мРНК именно в метафазе (Welch and Wang, 1992). В нашей работе разница между точками максимального накопления мРНК этих двух генов не обнаружено. Это может быть связано с погрешностями экспериментов, а также с гетерогенностью культур клеток в нашей работе и, следовательно, тем фактом, что мононуклеарные клетки периферической крови претерпевали митоз не одновременно, в отличие от ранее опубликованных работ, где авторы использовали гомогенные и синхронизированные по клеточному циклу клетки.

Сразу после выделения РВМС у здоровых доноров в них содержится заметное количество мРНК генов *il2* и *il2ra* (точка 0 в таблице 1). Далее при культивировании РВМС без стимуляции мРНК этих генов детектируется на низком уровне (как описано в главе «Материалы и методы»; точка 12 часов в таблице 1). Это согласуется с результатами более ранних работ, где был обнаружен определенный уровень экспрессии мРНК генов *il2* и *il2ra* в свежeweделенных РВМС (Breen et al., 2000), несмотря на то, что в более ранних работах использовали менее чувствительный и специфичный способ оценки количества мРНК (метод полуколичественной ПЦР) по сравнению с ПЦР «в реальном времени». Мы проводили оценку количества мРНК генов *il2* и *il2ra* не только в свежeweделенных лимфоцитах, но также и в цельной крови, только что взятой у здоровых доноров, и разницы между нормированными значениями количества мРНК этих генов не обнаружили. Это может говорить о том, что процедура выделения на фиколе практически не влияет на увеличение экспрессии мРНК данных генов, а то количество мРНК генов *il2* и *il2ra*, которое присутствует в клетках

Таблица 2. Включение ^3H тимидина в ходе РБТЛ при стимуляции лимфоцитов *СopA*, среднее по трем экспериментам, \pm стандартное отклонение.

Донор	СРМср., спонтанная пролиферация	СРМср., стимуляция <i>СopA</i>	Индекс стимуляции, среднее
1	412 \pm 25	38316 \pm 1015	93 \pm 6
2	396 \pm 21	29700 \pm 827	75 \pm 4
3	383 \pm 22	26044 \pm 945	68 \pm 5

Таблица 3. Сравнение результатов оценки степени пролиферации лимфоцитов, полученных двумя методами: с помощью включения меченого ^3H тимидина и с помощью ПЦР «в реальном времени». Показаны средние значения по трем экспериментам.

Донор	Индекс стимуляции, 72 часа	Количество мРНК, 72 часа		Количество мРНК, 82 часа		Количество мРНК, 106 часов	
		<i>cdc2</i>	<i>tpa</i>	<i>cdc2</i>	<i>tpa</i>	<i>cdc2</i>	<i>tpa</i>
1	93	1344	1204	1467	1182	1152	915
2	75	1121	1045	1359	1103	1027	832
3	68	1028	1178	1306	1072	1134	861

крови здоровых доноров, отражает нормальный физиологический уровень экспрессии мРНК этих цитокинов. Далее при культивировании РВМС в отсутствие стимула уровень мРНК генов *il2* и *il2ra* падает в первые часы в несколько раз, что, по видимому, указывает на отсутствие физиологического поддержания экспрессии этих цитокинов на определенном уровне, которое имеется в крови в целостном организме.

В нашей работе было обнаружено, что при стимуляции РВМС конканавалином А уровень мРНК генов *il2ra* и *il2* нарастает по разному. Уровень мРНК гена *il2* начинает нарастать уже в первые же минуты и часы после стимуляции, и максимум его содержания наблюдается через 3-4 часа культивирования с ConA. Уровень содержания мРНК гена *il2ra* начинает нарастать существенно позже, примерно через 20 часов после стимуляции, и достигает своего максимума через 60-80 часов (на 2.5-3 сутки) после стимуляции.

В работе (Horgan et al., 1994) было показано, что при стимуляции ConA РВМС здоровых доноров уровень мРНК интерлейкина 2 в них начинает нарастать через 6 часов после добавления стимула и достигает максимума через 12-24 часа. Расхождение между нашими результатами и результатами, полученными в упомянутой работе, может объясняться разными методами исследований: в работе (Horgan et al., 1994) уровень мРНК интерлейкина 2 определяли с помощью Нозерн-блоттинга, а гибридационные методы обладают существенно меньшей чувствительностью по сравнению с ПЦР «в реальном времени». В работе (Katial et al., 1998) показано, что через трое суток после стимуляции РВМС митогеном ConA продукции растворимого интерлейкина 2 в среде культивирования практически не обнаруживается; это согласуется с результатами, полученными в нашей работе, поскольку примерно через 72 часа после стимуляции конканавалином экспрессия мРНК интерлейкина 2 падает до уровня, характерного для клеток без стимуляции. Кроме экспериментов с клетками человека, действие конканавалина А исследовали также на лимфоциты других видов животных. В частности, при стимуляции РВМС свиней конканавалином А (Verfaillie et al., 2001) оказалось, что максимальный уровень мРНК интерлейкина 2 в них содержится между 8 и 16 часами после добавления митогена, причем нарастание мРНК в ответ на стимуляцию хорошо согласуется с изменением уровня растворимого белка интерлейкина 2 в культуральной жидкости выделенных лимфоцитов в первые вторые сутки культивирования. В данной работе анализ количества мРНК производился с помощью денситометрии количества полученного ампликона по конечной точке, что является менее чувствительным полуколичественным методом по сравнению с ПЦР «в реальном времени». В работе (Harrington et al., 2006) с помощью ПЦР «в реальном времени» было показано, что количество мРНК гена интерлейкина 2 в РВМС благородного оленя, стимулированных ConA, максимально в период 8-16 часов после начала стимуляции, и затем падает к 72 ча-

сам культивирования до уровня спонтанной стимуляции. Отличия в кинетике накопления мРНК этого цитокина в РВМС оленя и человека в ответ на стимул могут объясняться разным способом действия митогена ConA на лимфоциты из разных видов, а также определенными различиями в культивировании лимфоцитов. Кроме того, в работе (Harrington et al., 2006) использовали достаточно высокую концентрацию ConA (10 мкг/мл среды) для стимуляции РВМС оленя; такая концентрация для лимфоцитов человека представляет собой верхнюю границу и является уже токсичной.

Известно, что интерлейкин 2 (продукт гена *il2*) непосредственно участвует в регуляции экспрессии собственного рецептора IL2RA (CD25; продукт гена *il2ra*) (Reem and Yeh, 1984), и кинетика экспрессии мРНК гена *il2ra*, нарастающая в нашей работе вслед за экспрессией мРНК гена *il2*, это подтверждает. Интересно, что при стимуляции конканавалином А пик максимального содержания мРНК гена *il2ra* оказался достаточно узким (62-76 часов после добавления стимула, рисунок 2), в отличие от широкого пика для мРНК этого гена при стимуляции митогеном фитогемагглютинином (60-96 часов и даже более) (Савилова и др., 2009). Кроме того, обращает на себя внимание существенно более высокое содержание мРНК гена *il2ra* в максимальной точке: в данной работе при стимуляции ConA уровень мРНК гена *il2ra* оказался выше уровня спонтанной стимуляции более чем в 1000 раз, а при стимуляции ФГА максимальное количество мРНК этого гена превышало уровень спонтанной стимуляции в 200-300 раз. Уровни содержания мРНК гена *il2* при стимуляции ФГА и ConA оказались несколько более сходными, хотя и с некоторым превышением в случае стимуляции ConA: в 250 раз и 450 раз выше уровня спонтанной стимуляции, соответственно. В случае стимуляции ФГА и ConA кинетика нарастания уровня мРНК гена *il2ra* оказалась в целом более сходной, чем кинетика нарастания мРНК гена *il2*, для которого увеличение мРНК оказалось существенно более резким и быстрым при стимуляции конканавалином А.

В данной работе мы использовали мРНК генов *tpa* и *cdc2* для оценки степени пролиферации, поскольку продукты этих генов непосредственно задействованы в процессе деления лимфоцитов в ответ на митогенные стимулы. Ключевым белком, регулирующим вступление клетки в митоз (G2/M переход), является специфическая серин/треонин-протеинкиназа, включающая в себя регуляторную субъединицу, циклин, и каталитическую субъединицу, циклинзависимую киназу – продукт исследуемого нами гена *cdc2*. Топоизомераза II (продукт гена *tpa*) включается в процесс синтеза ДНК в самый ранний и поздний периоды S фазы. Полученные нами результаты по уровню содержания мРНК генов, продукты которых задействованы в смене фаз клеточного цикла, указывают на возможность использования метода ПЦР «в реальном времени» для изучения механизмов жизнедеятельности клеток, причем не только клеток иммунной системы, но и многих других.

Выводы

Таким образом, мРНК генов *tpa* и *cdc2* могут использоваться как маркеры, которые позволяют напрямую заменить методику радиоактивного мечення ДНК при оценке пролиферативного ответа. Кроме этого подхода, можно использовать мРНК генов, продукты которых являются воспринимающими сигнал молекулами или участвуют в проведении стимула и передаче его эффекторным молекулам, участвующим в ответе на стимул. ПЦР протоколы на основе таких генов могут дать результат в более сжатые сроки, поскольку воспринимающие и передающие сигнал молекулы вовлекаются в процесс стимуляции на более ранних этапах по сравнению с началом пролиферации лимфоцитов в ответ на стимул. Мы показали возможность использования мРНК гена *il2ra* и особенно гена *il2* для этой цели, а также впервые исследовали кинетику изменения уровня мРНК этих генов в процессе стимуляции ConA за период 0-180 часов культивирования РВМС в присутствии стимулятора.

В наших экспериментах было обнаружено, что уровень экспрессии мРНК генов *cdc2*, *tpa*, *il2* и *il2ra* при стимуляции лимфоцитов ConA повышается в сотни и даже тысячи раз. Изменения в сотни раз легко показать с помощью ПЦР, поэтому данный метод кажется очень перспективным для оценки уровня экспрессии выбранных генов в реакции бласттрансформации лимфоцитов в свя-

зи со своей простотой, доступностью, хорошей воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью и возможностью использовать этот метод в клинических исследованиях. В настоящее время метод ПЦР «в реальном времени» активно применяется в медицинских лабораториях, поскольку он обладает достаточной простотой и высокой пропускной способностью, особенно учитывая возможности автоматизации по выделению нуклеиновых кислот и постановке реакций, а также наличию на медицинском рынке российских приборов отечественных производителей, таких как «НПФ ДНК-Технология».

В ходе экспериментов были разработаны тест системы для определения экспрессии мРНК генов *cdc2*, *tpa*, *il2* и *il2ra* в лимфоцитах, стимулированных конканавалином А. мРНК этих генов были использованы как маркеры РБТЛ с помощью метода ПЦР в режиме «реального времени». Проведен мониторинг нарастания мРНК генов *cdc2*, *tpa*, *il2* и *il2ra*, определены основные закономерности экспрессии мРНК данных генов в ходе стимуляции выделенных лимфоцитов ConA. Применен подход оценки результатов реакции без использования нормировочных генов.

Полученные в работе результаты могут быть использованы в дальнейшем как в научных разработках, так и в клинической практике, поскольку РБТЛ является удобной и наглядной моделью исследования функциональной активности лимфоцитов *in vitro*. ■

Литература:

1. Kato M, Ikeda N., Matsushita E, Kaneko S, Kobayashi K. Involvement of IL- 10, an anti-inflammatory cytokine in murine liver injury induced by Concanavalin A. *HepatoL Res.* - 2001 v.20 (2): 232-243.
2. Huan-Yao Lei and Chih-Peng Chang. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *J Biomed Sci.* 2009 16(1): 10.
3. *Current Protocols in Immunology.* Ред. Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M., Strober W. John Wiley & Sons. 2003 ISBN: 0471522767.
4. Савилова А.М., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П. и Хаитов Р.М. Метод оценки результатов РБТЛ с помощью количественной ПЦР. *Иммунология.* 2008 т.29 (3): стр.178-182.
5. Ребриков ДВ, Саматов ГА, Трофимов Д.Ю., Семенов ПА, Савилова АМ, Кофиади ИА, Абрамов ДД. «ПЦР «в реальном времени». 2009, М., БИНОМ.
6. Савилова А.М., Бурменская О.В., Чулкина М.М., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П. Способ оценки степени пролиферации лимфоцитов и исследование экспрессии мРНК генов ИЛ2 и ИЛ2РА в активированных митогеном лимфоцитах с помощью ПЦР «в реальном времени». *Физиология и патология иммунной системы.* 2009 т.13 (11): стр.14-24.
7. Furukawa Y, Piwnica-Worms H, Ernst TJ, Kanakura Y, Griffin JD. *cdc2* gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science* 1990 V.250 (4982): 805-808.
8. Goswami PC, Roti Roti JL and Hunt CR. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase IIalpha during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr. V.16: 1500-1508.
9. Welch PJ and Wang JYJ. Coordinated synthesis and degradation of *cdc2* in the mammalian cell cycle. *PNAS.* 1992 Apr; V.89 (7): 3093-3107.
10. Breen EC, McDonald M, Fan J, Boscardin J, Fahey JL. Cytokine gene expression occurs more rapidly in stimulated peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 V.7 (5): 769-773.
11. Horgan AF, Mendez MV, O'Riordain DS, Holzheimer RG, Mannick JA, and Rodrick ML. Altered gene transcription after burn injury results in depressed T-lymphocyte activation. *Ann Surg.* 1994 September; 220(3): 342-352.
12. Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, and Lieberman MM. Cytokine Production in Cell Culture by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Immunocompetent Hosts. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998 January; 5(1): 78-81.
13. Verfaillie T, Cox E, To LT, Vanrompay D, Bouchaut H, Buys N, Goddeeris BM. Comparative analysis of porcine cytokine production by mRNA and protein detection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001 Aug 30; 81 (1-2): 97-112.
14. Harrington NP, Surujballi OP, Prescott JF. Cervine (Cervus elaphus) cytokine mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction. *J Wildl Dis.* 2006 Apr; 42(2): 219-233.
15. Reem GH, Yeh NH. Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes. *Science.* 1984 Jul 27; 225 (4660): 429-430.