

ИССЛЕДОВАНИЕ «ГРУППОВОЙ» ЭКСПРЕССИИ мРНК ИОННЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ АТР1В1, NHE1 И NKCC1, β -АКТИНА, ГЛИЦЕРОФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, БЕЛКОВ — РЕГУЛЯТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА p53, Bcl-2, IL-2 И КИНАЗЫ hSGK НА ПРЕРЕПЛИКАТИВНОЙ СТАДИИ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© А. А. Веренинов,¹ И. О. Васильева, В. Е. Юринская, В. В. Матвеев, Л. Н. Глушанкова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹электронный адрес: veren@mail.cytspb.rssi.ru

На лимфоцитах периферической крови человека, активированных фитогемагглютинином в течение 4, 8, 12 или 24 ч, методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции определяли изменения уровня мРНК ионных транспортеров (АТР1В1, NHE1 и NKCC1), β -актина, глицерофосфатдегидрогеназы (GAPDH), белков — регуляторов пролиферации и апоптоза (p53, Bcl-2, IL-2) и киназы hSGK, причастной к регуляции водного баланса клеток. Обнаружено сходное в общих чертах нарастание уровня мРНК АТР1В1, NHE1, hSGK, GAPDH, p53, Bcl-2 и β -актина во временном интервале 8—24 ч, позволяющее характеризовать их экспрессию как «групповой» ответ. Наряду со сходством наблюдалась и определенная специфика в изменении уровня отдельных мРНК, которая проявлялась в неполном совпадении временной динамики и различных амплитудах ответа. Обнаружена независимая вариабельность динамики изменения содержания отдельных мРНК у лимфоцитов разных доноров, указывающая на их «дифференциальную» регуляцию. В более частном плане, полученные данные подтверждают ранее высказанное предположение о возможности геномной регуляции изменения ионного баланса на поздних стадиях перехода лимфоцитов к пролиферации.

Ключевые слова: активация лимфоцитов человека, β -актин, белки АТР1В1, NHE1, NKCC1, p53, Bcl-2, IL-2, hSGK, глицерофосфатдегидрогеназа, мРНК.

Известно, что переход лимфоцитов к пролиферации сопровождается комплексом процессов, развертывающихся на различных уровнях организации клетки: на физиологическом, на «белковом» и на уровне мРНК (Ling, Kay, 1975; Ashman, 1984; Crabtree, 1989; Weiss, 1993; Berridge, 1997). В самом общем плане, все они должны быть скоординированы. Вместе с тем очевидно, что внутри функционально связанных подсистем координация должна быть более жесткой, чем между относительно автономно функционирующими подсистемами. Выделение этих подсистем представляет значительный интерес.

Транспорт моновалентных ионов через плазматическую мембрану, изменяющийся при переходе лимфоцитов к пролиферации (Crinstein, Dixon, 1989; Веренинов и др., 1991; Marakhova et al., 1995, 1998, 1999), может служить примером сравнительно простой подсистемы, в которой работа отдельных трактов — каналов и транспортеров — должна быть жестко скоординирована. Эта координация может достигаться, как чаще всего, по-видимому, и происходит, на функциональном уровне благодаря существованию множества обратных связей между потоком ионов по тому или иному тракту и соответствующим изменением концентрации ионов в цитоплазме, разности электрических или электрохимических потенциалов на мембране, водного баланса, измене-

нием pH цитоплазмы и т. п. Однако вряд ли это единственный механизм. Так, нельзя не обратить внимание на то, что уже на ранней стадии активации лимфоцитов наблюдается всплеск экспрессии множества генов. Для периферических лимфоцитов человека еще в 1980-е годы была показана индукция экспрессии более чем 80 генов (Irving et al., 1989; Zipfel et al., 1989). В недавней работе, проведенной с использованием чиповой технологии, было обнаружено, что при активации лимфоцитов мыши через 8 ч изменяется уровень 282 из 6319 исследованных мРНК (Teague et al., 1999). Экспрессия мРНК ионных транспортеров при активации лимфоцитов остается до сих пор практически неисследованной.

Настоящая работа предпринята для того, чтобы выяснить, изменяется ли уровень мРНК основных ионных транспортеров при переходе лимфоцитов от покоя к пролиферации, скоординированы ли изменения мРНК ионных транспортеров между собой, и скоординированы ли изменения мРНК ионных транспортеров с изменениями других мРНК. С этой целью было предпринято сравнительное исследование динамики изменения группы мРНК, которая включала в себя 3 мРНК ионных транспортеров — Na/H-обменника (изоформа NHE1), симпортера NKCC (изоформа NKCC1) и Na,K-АТФазного насоса (β -субъединица, изоформа АТР1В1), мРНК

киназы, причастной к регуляции клеточного объема (hSGK), 3 мРНК белков — регуляторов пролиферации и апоптоза (Bcl-2, IL2, p53), а также мРНК β -актина и глицерофосфатдегидрогеназы, чаще всего используемых при исследовании уровня мРНК в качестве внутренних стандартов.

Для определения уровня мРНК был использован метод обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Поскольку все еще широко распространено скептическое отношение к возможности количественной оценки изменения уровня мРНК в клетках с помощью этого метода, одна из первых задач состояла в исследовании калибровочных зависимостей. Мы пришли к заключению о том, что, используя метод ОТ-ПЦР, даже и в простейшем «бесчиповом» варианте можно успешно следить за относительно небольшими изменениями уровня мРНК в клетках и, что особенно важно, проводить сравнительные исследования изменения уровня большого числа мРНК. Это открывает широкие возможности для анализа механизмов внутриклеточной сигнализации, поскольку позволяет наблюдать сразу множество весьма специфических внутриклеточных ответов.

Материал и методика

Получение и активирование лимфоцитов. Лимфоциты выделяли широко известным методом (Вьюит, 1968) из донорской крови, полученной в тот же день, с использованием глюцира в качестве антикоагулянта. Для осаждения эритроцитов в кровь добавляли 6% -ный раствор декстрана (декстран-500, Pharmacia) в физиологической среде (1 : 10) и через 15—20 мин начинали отбор лейкоцитарной фракции. По 3 мл суспензии лейкоцитов наслаивали на 8 мл смеси

фиколлы и верографина с плотностью 1.077 г/мл. После центрифугирования в течение 30 мин при 400g интерфазу переносили в пробирки объемом 12 или 50 мл и 2—3 раза промывали средой Хенкса без кальция. Далее лимфоциты инкубировали в течение ночи в CO_2 -инкубаторе в плоскодонных флаконах объемом 50—100 мл в 25—50 мл среды RPMI-1640 (Flow) с глутамином (2 мМ) и 10%-ной инактивированной человеческой сывороткой АВ IV Rh(+) без антибиотиков при концентрации клеток 1—2 млн в 1 мл. На следующий день клеточную суспензию разливали в пенициллиновые флаконы, вносили фитогемагглютинин (ФГА; РНА-М, Calbiochem или Sigma, 10—20 мкг/мл) и инкубировали в течение 4, 8, 12, 24 и 48 ч в CO_2 -инкубаторе. Контроль степени активации лимфоцитов ФГА проводили по включению тимидина, лейцина и уридина, как описано ранее (Веренинов и др., 1991; Марахова и др., 1998; Marakhova et al., 1998).

Получение РНК, проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Содержание мРНК определяли в 15 млн лимфоцитов. Клетки лизировали смесью 4 М гуанидинатиоцианата (Sigma) с 25 мМ цитрата натрия («Реахим», Россия). Суммарную РНК выделяли гуанидинтиоцианатным методом (Chomczynsky, Sacchi, 1987). Обратную транскрипцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 200 ед. ревертазы MMLV в соответствующем буфере (Amersham), 2—3 мкг суммарной РНК и 1 мкг синтетического гексануклеотида (Biomaster, Россия), в течение 1 ч при 37 °С; реакцию останавливали прогреванием проб при 95 °С в течение 10 мин. Полимеразную цепную реакцию проводили в 10 мкл среды, содержащей 10 мМ Tris-HCl-буфера (pH 8.0), 50 мМ KCl, 1.5 мМ MgCl_2 , 0.2 мМ дАТФ, дГТФ, дТТФ, 0.5 ед. ДНК-полимеразы (Taq-полимераза, Biomaster, Россия) и

Таблица 1

Характеристики продуктов ПЦР и использованные праймеры

мРНК ^а	Продукт ПЦР		Праймеры	Литературный источник
	размер, н. п.	фрагмент кДНК ^б		
NHE1 (6707110)	464	1590—2032	CAA GAG ACG AAG CGC TCC ATC AAC G; ATC TGG TTC CAG GCT TCC TCG TAG G	Quednau et al., 1994
ATP1B1 (4502276)	339	382—731	ACT GAA ATT TCC TTT CGT CCT AAT; ATC ACT GGG TAA GTC TCC A	Akopyanz et al., 1991
NKCC1 (4506974)	124	—	GCA GTC CTT GTT CCT ATG GC; CAC TAG GGA TGC TAA TGC	Topper et al., 1997
hSGK (1834510)	507	725—1231	TTT TGC TAG ATT CAC AGG GAC ACA; AGT TGG GGA CAG GCT CTT CGG TAA	S. Waldegger, личное сообщение
β -актин (5016088)	539	200—713	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA; CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC	Yamamura et al., 1991
GAPDH (182976)	300	70—370	GTG AAG GTC GGA GTC AAC G; GGT GAA GAC GCC AGT GGA CTC	S. Waldegger, личное сообщение
Bcl-2 (179366)	270	1899—2171	GTG GCC TTC TTT GAG TTC GG; GGG CTC AGA TAG GCA CCC AGG	Фирма IDT, США
p53 (339815)	377	750—1101	GCG TGT GGA GTA TTT GGA TG; TAT TCT CCA TCC AGT GGT TT	Zakut-Houri et al., 1983
IL-2 (847817)	267	—	ACT CAC CAG GAT GCT CAC AT; AGG TAA TCC ATC TGT TCA GA	Yamamura et al., 1991

^а В скобках указан индекс мРНК по базе данных GenBank. ^б Прочерк означает, что контрольного сиквенса транскриптов не проводили.

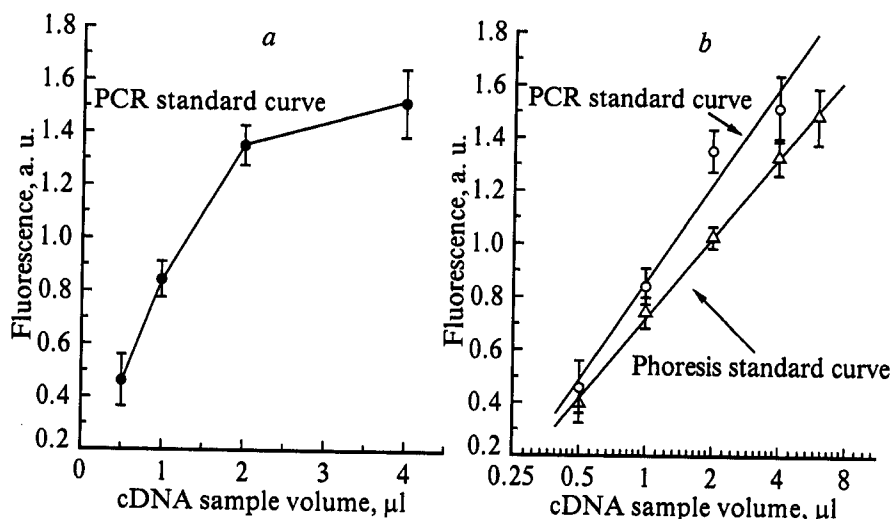


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции полосы электрофореграммы, содержащей продукт ПЦР, от количества кДНК на старте ПЦР (*PCR standard curve*) и от количества продукта ПЦР на старте при электрофорезе (*Phoresis standard curve*).

По оси абсцисс: *a* — объем препарата кДНК на старте ПЦР, мкл; *b* — объем препарата кДНК на старте ПЦР, мкл (*PCR standard curve*), и объем препарата, содержащего продукт ПЦР, на старте электрофореза, мкл (*Phoresis standard curve*); шкала логарифмическая. По оси ординат — интенсивность флуоресценции полосы, отн. ед. *PCR standard curve* — средние значения для трех видов мРНК (β -актина, NHE1 и hSGK), полученные при проведении 2—3 ПЦР для каждой мРНК и каждой точки. *Phoresis standard curve* — средние значения для 7 электрофорезов. На этом и остальных рисунках вертикальные отрезки у точек — стандартные ошибки средних значений. На графике *b* прямой *PCR standard curve* соответствует уравнение $y = (0.859 \pm 0.059) + (0.368 \pm 0.048) \log_2 x$, а прямой *Phoresis standard curve* — уравнение $y = (0.728 \pm 0.009) + (0.302 \pm 0.007) \log_2 x$, где y — интенсивность флуоресценции, x — объем препарата кДНК, мкл.

0.5 мкМ прямого и обратного специфических праймеров. Матрицей служила кДНК, содержащаяся в 2 мл разбавленного в 6 раз продукта обратной транскрипции. Праймеры, использованные при ПЦР, приведены в табл. 1; там же указаны ожидаемые размеры транскриптов — продуктов ПЦР — и местоположение транскриптов, найденное при контрольном сиквенсе продуктов ПЦР. Число циклов ПЦР подбирали для каждой пары праймеров так, чтобы существенного насыщения по ПЦР не было.

После проведения необходимого числа циклов ПЦР 6 мкл реакционной смеси наносили на 6% -ный полиакриламидный гель для электрофореза. Размеры продуктов ПЦР соответствовали ожидаемым при использовании указанных праймеров (табл. 1). Контрольный сиквенс продуктов ПЦР подтвердил хорошее согласие с ожидаемым местоположением транскрипта в нуклеотидной последовательности соответствующих кДНК по базе данных GenBank (табл. 1). Негативным контролем служили вода и ДНК.

Определение относительного количества продукта ПЦР на электрофореграммах. Интенсивность флуоресценции полос электрофореграмм, окрашенных бромистым этидием, определяли компьютерным сканированием цветных снимков геля, сделанных с помощью цифрового фотоаппарата Kodak DC20. Соотношение между интегральной интенсивностью флуоресценции полосы и количеством кДНК было нелинейным (рис. 1, *a*). Сравнение калибровочных графиков, полученных при варьировании количества продукта ПЦР, наносимого на разные дорожки геля при электрофорезе (рис. 1, *b*, *Phoresis standard curve*), и при варьировании количества продукта обратной транскрипции на старте ПЦР (рис. 1, *b*, *PCR standard curve*), показывает, что нелинейность калибровочных графиков

обусловлена характеристиками фотодетектора, а не насыщением, связанным с особенностями ПЦР. Изменения уровня мРНК, представленные на последующих рисунках, даны в относительных единицах флуоресценции. Необходимо помнить о нелинейности соотношения между интенсивностью флуоресценции и количеством кДНК (мРНК). К примеру, увеличение флуоресценции на 0.5 ед. соответствует изменению количества кДНК (мРНК) в 2.6—2.8 раза (рис. 1). О варибельности результатов при повторных проведениях ПЦР с использованием одного и того же образца можно судить по стандартным ошибкам, приведенным для некоторых отдельных точек на рис. 3.

Результаты

На рис. 2 показаны изменения уровня 8 исследованных мРНК в лимфоцитах, активированных ФГА. Усредненные по 6 донорам результаты на трех графиках верхнего ряда дают представление о сходстве и различиях ответов по отдельным мРНК, когда усреднение стирает различия, обусловленные особенностями донора. Сходство ответов по исследованным мРНК в том, что во всех случаях начиная с 4 ч уровень мРНК повышается. Различия ответов, обусловленные видом мРНК, проявляются в разной динамике и амплитуде изменений. Простое монотонное повышение уровня наблюдается в случае мРНК Bcl-2, тогда как в случае мРНК ATR1B1, GAPDH, p53 и β -актина имеет место нарастание с выходом на плато. Начальная задержка в повышении уровня является особенностью кривых для мРНК NHE1, ATR1B1 и NKCC1; в случае NKCC1 показатель вначале снижается даже ниже исходного уровня. Данные этого ряда позволяют прийти к следующим выводам: 1) уров-

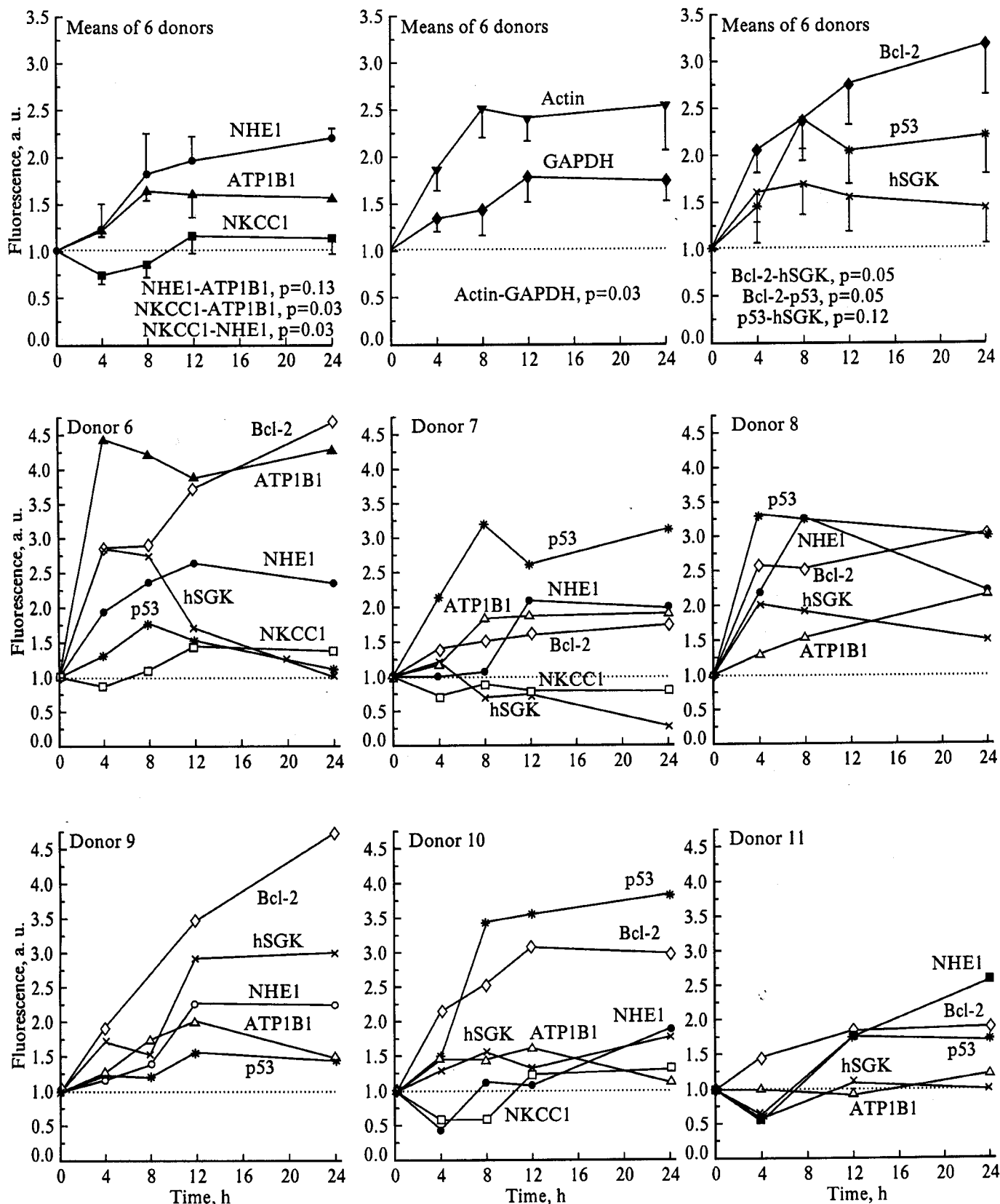


Рис. 2. Изменение уровня разных мРНК в периферических лимфоцитах в процессе активации их фитогемагглютинином.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — интенсивность флуоресценции полосы электрофореграммы, содержащей продукт ПЦР, отн. ед. Графики верхнего ряда — средние значения для лимфоцитов 6 доноров (2—3 ПЦР на каждую точку для каждого донора). Графики среднего и нижнего рядов — результаты, полученные на лимфоцитах отдельных доноров (средние значения, полученные при проведении 2—3 ПЦР для каждой точки). На графиках верхнего ряда приведены значения p , позволяющие оценить достоверность различий уровней указанных мРНК ($n = 6$).

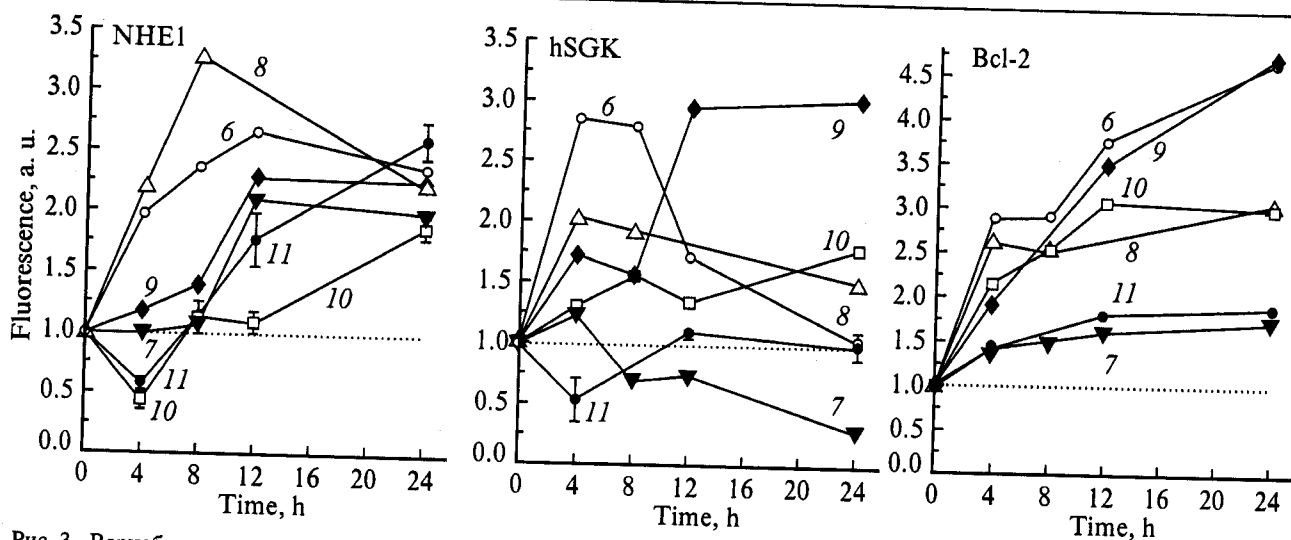


Рис. 3. Вариабельность изменений уровня мРНК NHE1, hSGK и Bcl-2 при активации лимфоцитов разных доноров. По осям — то же, что и на рис. 2. Числа у кривых — доноры. Каждая точка — среднее значение по 2—3 ПЦР.

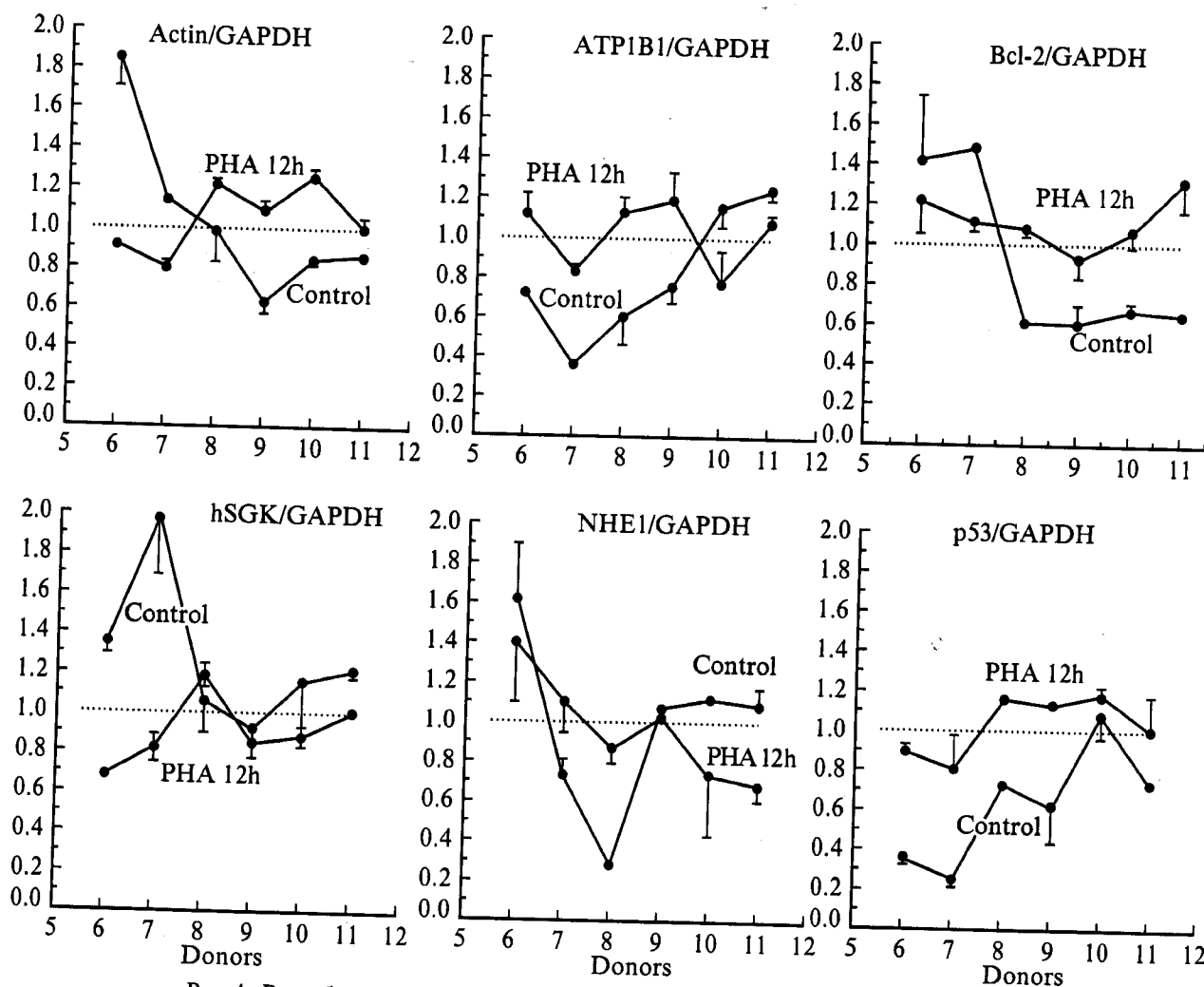


Рис. 4. Вариабельность уровня различных мРНК у лимфоцитов разных доноров.

По горизонтали — номера доноров; по вертикали — отношение уровня мРНК данного вида к уровню мРНК GAPDH. Control — неактивированные лимфоциты; PHA 12 h — лимфоциты, активированные ФГА в течение 12 ч. Каждая точка — отношение средних значений по 2—3 ПЦР.

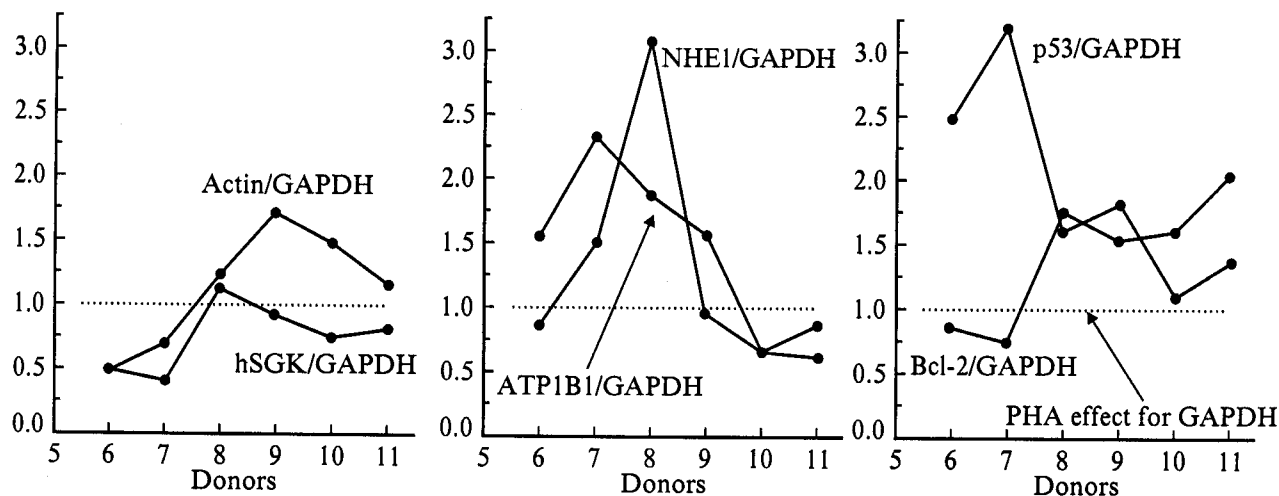


Рис. 5. Вариабельность изменения уровня мРНК под влиянием ФГА у лимфоцитов разных доноров.

По горизонтали — номера доноров; по вертикали — отношение изменения уровня данной мРНК по отношению к изменению уровня мРНК GAPDH. Графики построены по данным рис. 4.

ни мРНК исследованных ионных транспортеров изменяются уже на относительно ранней стадии активации лимфоцитов, хотя и не так быстро, как это известно для мРНК генов раннего ответа, когда изменения можно наблюдать уже через 5—10 мин (Weiss, 1993); 2) изменения уровня мРНК ионных транспортеров ATP1B1 и NHE1 и киназы hSGK похожи в первом приближении на изменения уровня мРНК таких конститутивно экспрессируемых белков, как β -актин и глицерофосфатдегидрогеназа, и таких белков — регуляторов пролиферации и апоптоза, как p53 и Bcl-2; 3) существуют определенные различия эффектов, зависящие от вида мРНК.

На графиках среднего и нижнего рядов на рис. 2 представлены кривые изменения уровня отдельных мРНК у лимфоцитов разных доноров. Можно видеть, что форма индивидуальных кривых во многих случаях существенно отличается от формы соответствующих усредненных кривых в верхнем ряду. Второй интересный момент состоит в том, что взаимное расположение кривых, их «иерархия», или «профиль экспрессии разных мРНК», у разных доноров не совпадает. У лимфоцитов одного донора при активации сильнее изменяется уровень одной мРНК, а у другого донора — другой, и наблюдаемые различия во многих случаях выходят за рамки тривиальных аналитических погрешностей. Это говорит о том, что, несмотря на общее сходство изменения уровня большинства исследованных мРНК в интервале 4—24 ч, жесткой координации ответов по разным мРНК нет.

Рис. 3 особенно наглядно показывает, как существенно может изменяться временная динамика ответов по отдельным мРНК от донора к донору. Следует напомнить, что кривые для разных мРНК получены с использованием одних и тех же для данного донора продуктов обратной транскрипции («общей» кДНК), а ПЦР со специфическими праймерами, электрофорез и фотометрирование электрофореграмм для каждого вида мРНК по всем временным точкам проводятся одновременно. Таким образом, на соотношении уровней разных мРНК в образце, соответствующем отдельной временной точке, не могут сказываться ошибки, связанные с неизбежной вариабельностью от точки к точке количества клеток, количества выделенной суммарной РНК и эф-

фективности обратной транскрипции, но могут сказываться различия в эффективности ПЦР для разных мРНК. С другой стороны, на соотношении уровней одной и той же мРНК в образцах, соответствующих разным временным точкам, ошибки первого рода сказываются, зато эффективность ПЦР и условия фотометрирования электрофореграмм сохраняются постоянными. Итог состоит в том, что ошибки первого рода могут влиять на форму отдельной кривой, но не могут порождать различия формы кривых для разных мРНК у лимфоцитов одного и того же донора. Соответственно изменения взаимного расположения и формы кривых для разных мРНК от донора к донору не могут быть артефактом, обусловленным отмеченными выше неопределенностями.

Для того чтобы выяснить, как от донора к донору изменяется характер ответа лимфоцитов на ФГА по разным мРНК, была проведена еще одна серия анализов исходных образцов общей РНК, в которой обратная транскрипция, последующая специфическая ПЦР и прочие процедуры были проведены одновременно для образцов от 6 доноров (точки 0 и 12 ч). Поскольку количество общей РНК в образцах, полученных от разных доноров, могло быть неодинаковым, сравнение ответов лимфоцитов по индивидуальным мРНК проводилось по отношению к ответу, наблюдаемому для мРНК GAPDH. Выбор данной мРНК в качестве внутреннего стандарта

Таблица 2

Корреляция уровней различных мРНК у отдельных доноров

Пары мРНК	Коэффициент корреляции	P	N
β -актин—NHE1	0.763	0.004	12
β -актин—NKCC1	0.583	0.060	11
ATP1B1—Bcl-2	0.629	0.029	12
ATP1B1—hSGK	0.598	0.040	12
ATP1B1—NHE1	0.510	0.090	12
hSGK—NKCC1	0.923	<0.001	11

Примечание. Уровень каждой мРНК оценивали по отношению к уровню мРНК GAPDH. Неактивированные лимфоциты.

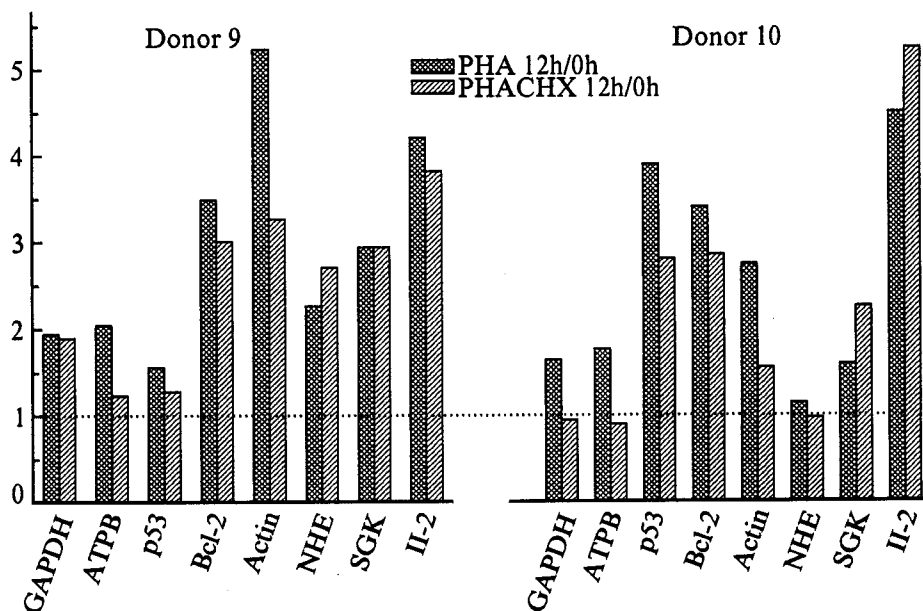


Рис. 6. Изменение уровня различных мРНК в лимфоцитах при активации их в присутствии циклогексимида (5 мкг/мл) и в его отсутствие.

По вертикали — отношение уровня мРНК после активации в течение 12 ч к уровню до активации. Под столбиками указаны мРНК. Каждый столбик — среднее значение, полученное в результате проведения 2—3 ПЦР.

произволен, но выводы, к которым мы приходим, не зависят от того, какую мРНК взять для сравнения.

Результаты этой серии анализов показали, что размах колебаний от донора к донору отношения уровня исследованных мРНК к уровню GAPDH у активированных лимфоцитов меньше, чем у исходных лимфоцитов, номинально не активированных (рис. 4). Напрашивается

предположение о том, что в исходном состоянии лимфоциты уже активированы какими-то неучитываемыми факторами, но степень этой активации у разных доноров (или, более строго, в разных опытах) неодинакова. Очевидно, различие в степени активации лимфоцитов разных доноров под влиянием ФГА обусловлено в первую очередь различиями исходных уровней соответствующих мРНК. Особенно сильно этот эффект проявляется в случае мРНК, уровень экспрессии которых у неактивированных лимфоцитов низок, как это имеет место для мРНК интерлейкина 2 (данные не приводятся).

На графиках, представленных на рис. 4, можно заметить индивидуальные различия доноров. Так, например, отношения уровней мРНК в парах β -актин/GAPDH, Bcl-2/GAPDH и hSGK/GAPDH после активации лимфоцитов у доноров 6 и 7 ниже, а у доноров 8—11, наоборот, выше исходного значения или близки к нему. Это значит, что вызванные ФГА изменения уровня мРНК β -актина, Bcl-2 и hSGK у доноров 6 и 7 меньше, а у доноров 8—11, наоборот, больше, чем изменение уровня мРНК GAPDH. В случае отношений уровней мРНК ATP1B1/GAPDH, NHE1/GAPDH и p53/GAPDH наблюдается противоположная картина.

Определенную группировку исследованных видов мРНК можно заметить, если сравнить относительную величину ФГА-эффектов у разных доноров (рис. 5). Изменения этого показателя от донору к донору имеют одинаковое направление в парах отношений: β -актин/GAPDH—hSGK/GAPDH и ATP1B1/GAPDH—NHE1/GAPDH и противоположное в паре Bcl-2/GAPDH—p53/GAPDH.

На отдельной группе доноров, включавшей в себя 12 здоровых мужчин в возрасте 18—30 лет, была исследована корреляция уровней различных мРНК в лимфоцитах, не подвергавшихся активации. Рассматривались уровни 6 мРНК по отношению к уровню мРНК GAPDH. В табл. 2 приведены значения коэффициентов корреляции для тех пар мРНК, для которых уровень

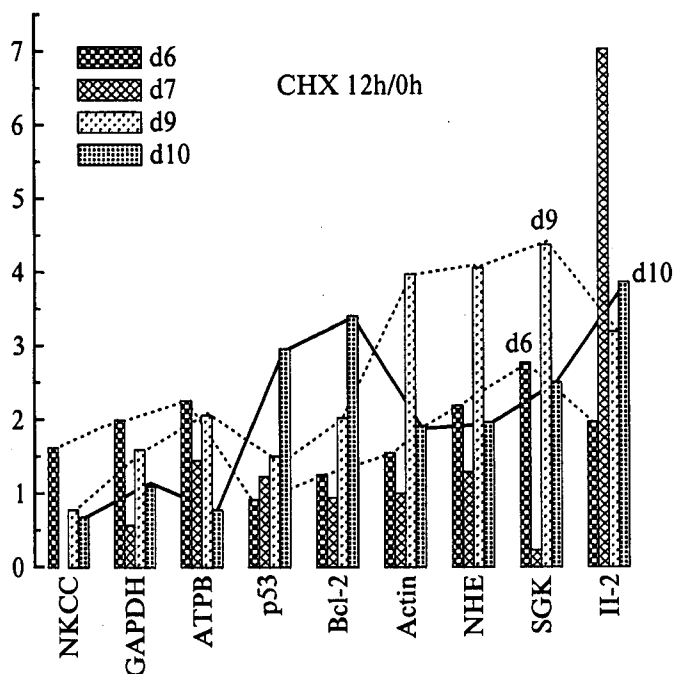


Рис. 7. Влияние циклогексимида (5 мкг/мл) на уровень различных мРНК в нестимулированных лимфоцитах.

По вертикали — отношение уровня мРНК после инкубации лимфоцитов в среде с ЦГ в течение 12 ч к начальному уровню. Под столбиками указаны мРНК. d6, d7, d9, d10 — доноры лимфоцитов. Каждый столбик — среднее значение, полученное в результате проведения 2—3 ПЦР.

значимости этих коэффициентов был достаточно высок ($P < 0.09$). Для 4 пар из 15 $P < 0.04$. Это указывает на какую-то согласованность регуляции уровня соответствующих мРНК.

При исследовании реакции клетки на внешний сигнал на уровне мРНК всегда возникает вопрос: опосредовано ли изменение уровня мРНК синтезом нового белка — транскрипционного фактора? В связи с этим в некоторых опытах было исследовано влияние на уровень мРНК ингибитора синтеза белка — циклогексимида (ЦГ) в концентрации 5 мкг/мл, при которой, как показали наши предыдущие исследования (Verenipov et al., 1993; Marakhova et al., 1995, 1998), включение в лимфоциты меченого лейцина практически полностью подавляется, и в то же время содержание в них калия и натрия по крайней мере в течение 8 ч существенно не изменяется. На рис. 6 представлены данные, полученные в двух таких опытах. Только в случае мРНК ATP1B1 можно было бы говорить о том, что ЦГ, вводимый в среду одновременно с ФГА, предотвращает повышение ее уровня в лимфоцитах при активации. В случае мРНК p53, Bcl-2 и β -актина ЦГ лишь несколько уменьшает активационное повышение их уровня, в то время как для мРНК IL-2, hSGK и NHE1 ЦГ не изменяет или, возможно, даже несколько усиливает такое повышение.

На рис. 7 представлены данные, полученные при исследовании влияния ЦГ на уровень рассматриваемых мРНК в отсутствие ФГА. Они показывают, что ЦГ сам по себе может вызывать существенное возрастание уровня рассматриваемых мРНК. Подобный эффект принято связывать с блокированием синтеза короткоживущих белков — негативных регуляторов уровня мРНК. Обращает на себя внимание значительная вариабельность реакции на ЦГ лимфоцитов разных доноров, а также то, что варьирование реакции на ЦГ от донора к донору по разным мРНК может существенно различаться (ср. профиль ответов по разным мРНК для лимфоцитов донора 10, показанный на рис. 7 сплошной линией, с аналогичными профилями для лимфоцитов доноров 6 и 9, показанными пунктирными линиями). По-видимому, это еще один признак «дифференциальной» регуляции рассматриваемых мРНК.

Обсуждение

Активация периферических лимфоцитов фитогемагглютинином — хорошо и в самых разных планах изученная модель перехода клеток от покоя к пролиферации (Ling, Kay, 1975; Ashman, 1984; Crabtree, 1989; Weiss, 1993; Berridge, 1997). Известно по многим работам и подтверждено в наших экспериментальных условиях, что при активации периферических лимфоцитов человека ФГА интенсивное включение тимидина в них начинается примерно через 1 сут. Таким образом, временной интервал 8—12 ч, когда в стимулированных ФГА лимфоцитах наблюдается повышение уровня исследованных мРНК, следует относить к пререпликативной стадии активации лимфоцитов. Динамика изменения ионных потоков и внутриклеточного содержания калия и натрия при активации лимфоцитов ФГА была детально исследована нами в серии предыдущих работ (Веренинов и др., 1991; Verenipov et al., 1993; Marakhova et al., 1995, 1998, 1999; Марахова и др., 1998). Было показано, что активация

лимфоцитов сопровождается существенным возрастанием ионных потоков через плазматическую мембрану, в котором следует различать по крайней мере три фазы, быстрый начальный подъем, не ингибируемый ЦГ; последующее более медленное нарастание потока в интервале 4—16 (или 24) ч, которое подавляется ЦГ, но не подавляется ингибиторами транскрипции (актиномицином, α -аманитином); позднее нарастание (24—48 ч), которое снимается ингибиторами транскрипции. Именно эту последнюю стадию возрастания ионных потоков можно было бы связывать с регуляцией на уровне мРНК. Вместе с тем из данных ингибиторного анализа вовсе не следует, что это должны быть непременно мРНК, кодирующие ионные транспортеры.

Полученные в настоящей работе данные показывают, что уровень мРНК β -субъединицы натриевого насоса (ATP1B1), Na/H-антипортера (NHE1), симпортера NKCC1 и киназы hSGK действительно изменяется на относительно ранней пререпликативной стадии перехода лимфоцитов к пролиферации. Таким образом, предположение о возможности регуляции ионных потоков на поздней стадии активации лимфоцитов на уровне мРНК получает более прямое подтверждение, хотя для окончательного решения вопроса необходимо, конечно, более детальное сопоставление экспрессии мРНК ионных транспортеров, экспрессии соответствующего белка и изменения функции.

Данных о регуляции ионных транспортеров на уровне мРНК в связи с переходом клеток к пролиферации в литературе чрезвычайно мало. Проводились исследования изменения уровня мРНК α - и β -субъединиц Na, K-АТФазного насоса при регенерации печени крысы и индукции пролиферации гепатоцитов крысы в культуре (Bhutada et al., 1990, 1991; Bhutada, Ismail-Beigi, 1991; Lu, Leffert, 1991; Perez et al., 1991; Simon et al., 1996). Список 6139 мРНК, экспрессию которых исследовали в активируемых лимфоцитах мыши с помощью чиповой технологии (Teague et al., 1999), включает в себя мРНК β -субъединицы натриевого насоса. Авторы приводят данные, позволяющие характеризовать изменение уровня этой мРНК по отношению к среднему изменению уровней всех исследованных мРНК. Оно оказалось меньше среднего повышения уровня исследованных мРНК и при 8-, и при 48-часовой активации лимфоцитов, которую вызывали внутривенным введением мыши стафилококкового энтеротоксина В. К сожалению, представленные данные не позволяют провести прямое сравнение уровней мРНК ATP1B1 до и после 8- либо 48-часовой активации.

Регуляции Na/H-антипортера в связи с действием на клетку ростовых факторов на функциональном и белковом уровнях посвящено довольно много работ (Sardet et al., 1989; Counillon, Pouyssegur, 1995; Noël, Pouyssegur, 1995; Yun et al., 1995), однако сообщений об изменении уровня мРНК NHE1, как и иных изоформ NHE, в связи с переходом лимфоцитов к пролиферации, кроме наших первых публикаций (Vasilieva et al., 1996; Verenipov et al., 1997), до сих пор не было. Экспрессия в лимфоцитах мРНК NKCC1 и hSGK описывается нами впервые.

Изменения уровня мРНК β -актина и GAPDH представляют особый интерес, так как их часто используют как внутренний стандарт при изучении экспрессии других мРНК, хотя работ, в которых приводилась прямая проверка стабильности мРНК β -актина и

GAPDH при активации лимфоцитов, относительно немного. Сообщалось, что при активации Т-лимфоцитов из селезенки мыши уровень мРНК β -актина практически не изменяется (Furue et al., 1990). Сфикакис с соавторами (Sfikakis et al., 1996) не обнаружили изменения уровня мРНК β -актина в активированных лимфоцитах человека в условиях, когда уровень мРНК Bcl-2 значительно возрастал. Большинство исследователей, однако, приходит к выводу о том, что уровень мРНК β -актина при активации лимфоцитов повышается (Degen et al., 1983; McCairns et al., 1984; Muscat et al., 1985; Mach et al., 1986; White et al., 1987; Goodier et al., 1991). Имеются данные о том, что повышение уровня мРНК β -актина в лимфоцитах при их активации обусловлено торможением ее деградации, а не усилением транскрипции (White et al., 1987). Сходные данные были получены на лимфоцитах человека и для мРНК GAPDH (Voelkerding et al., 1995).

Исследованию экспрессии мРНК Bcl-2 и p53, кодирующих белки — регуляторы апоптоза и пролиферации, посвящено множество работ (Ko, Prives, 1996; Levine, 1997; Chao, Korsmeyer, 1998; Giaccia, Kastan, 1998). Сообщалось, что при активации лимфоцитов человека уровень мРНК и Bcl-2, и p53 повышается (Reed et al., 1986, 1987; Lubbert et al., 1989; Osipovich et al., 1992; Boise et al., 1993; Voelkerding et al., 1995; Adachi et al., 1996; Sfikakis et al., 1996), и эти данные хорошо согласуются с нашими. Наиболее интересный момент здесь состоит в том, что, по литературным данным, повышение уровня мРНК Bcl-2 обусловлено усилением транскрипции (Reed et al., 1987), в то время как повышение уровня мРНК p53 — торможением ее деградации (Voelkerding et al., 1995). Таким образом, при внешнем сходстве повышения уровня мРНК Bcl-2 и p53 в активированных лимфоцитах (рис. 2) его механизмы могут быть совершенно различными. Все это нужно иметь в виду, анализируя природу «общих» и «специфических» компонентов ответа клеток на пролиферативный сигнал.

Подводя итоги и возвращаясь к поставленным в начале вопросам, мы приходим к следующим выводам. 1. Уровень мРНК исследованных ионных транспортеров и киназы hSGK изменяется уже на пререпликативной стадии активации лимфоцитов, и это может быть одним из механизмов изменения ионного баланса лимфоцитов при переходе к пролиферации. 2. Изменения уровня мРНК исследованных ионных транспортеров и киназы hSGR при активации лимфоцитов похожи в общих чертах на изменения мРНК белков, не имеющих прямого отношения к ионному транспорту, и можно говорить о «групповом» изменении исследованных мРНК. 3. Жесткой координации изменений уровня исследованных видов мРНК при активации лимфоцитов ФГА нет.

Авторы благодарят Н. Е. Броуде (Институт биоорганической химии РАН, Москва) и А. Н. Третьякова (С.-Петербургский институт ядерной физики РАН) за помощь в освоении ПЦР, З. Вальдегера (Физиологический институт Тюбингенского университета, Германия), Е. В. Ефимову (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) и Т. С. Годовикову (Новосибирский институт органической химии РАН) за предоставленные праймеры и Ф. Ланга (Физиологический институт Тюбингенского университета, Германия) за ценные советы и секвенирование продуктов ПЦР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 98-04-49850 и 98-04-04125).

Список литературы

- Веренинов А. А., Гусев Е. В., Казакова О. М., Клименко Е. М., Марахова И. И., Осипов В. В., Торопова Ф. В. 1991. Транспорт и распределение моновалентных катионов при бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека, активированных фитогемагглютином. Цитология. 33 (11) : 78—93.
- Марахова И. И., Веренинов А. А., Виноградова Т. А., Торопова Ф. В. 1998. Циклоспорин А тормозит долговременную активацию Na^+ , K^+ -АТФазного насоса в лимфоцитах человека, стимулированных фитогемагглютинином. Биол. мембраны. 15 (3) : 290—298.
- Adachi M., Sekiya M., Torigoe T., Takayama S., Reed J. C., Miyazaki T., Minami Y., Taniguchi T., Imai K. 1996. Interleukin-2 (IL-2) upregulates BAG-1 gene expression through serine-rich region within IL-2 receptor beta c chain. Blood. 88 : 4118—4123.
- Akopyanz N. S., Broude N. E., Bekman E. P., Marzen E. O., Sverdlov E. D. 1991. Tissue-specific expression of Na, K-ATPase β -subunit. Does β -2 expression correlate with tumorigenesis? FEBS Lett. 289 : 8—10.
- Ashman R. F. 1984. Lymphocyte activation. In: Fundamental immunology. New York: Raven Press. 267—300.
- Berridge M. J. 1997. Lymphocyte activation in health and disease. Crit. Rev. Immunol. 17 : 155—178.
- Bhutada A., Ismail-Beigi F. 1991. Serum and growth factor induction of Na^+ - K^+ -ATPase subunit mRNAs in Clone 9 cells: role of protein kinase C. Amer. J. Physiol. 261 : C699—C707.
- Bhutada A., Perez C., Chon D. Y., Ismail-Beigi F. 1990. Induction of Na^+ - K^+ -ATPase and its subunit mRNAs by serum in a rat liver cell line. Amer. J. Physiol. 258 : C1044—C1050.
- Bhutada A., Wassinger W. W., Ismail-Beigi F. 1991. Dexamethasone markedly induces Na, K-ATPase mRNA $_{\beta 1}$ in a rat liver cell line. J. Biol. Chem. 266 : 10859—10866.
- Boise L. H., González-García M., Postema C. E., Ding L., Lindsten T., Turka L. A., Mao X., Nuñez G., Thompson C. B. 1993. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell. 74 : 597—608.
- Böyum A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 97 : 9—29.
- Chao D. T., Korsmeyer S. J. 1998. Bcl-2 family: regulators of cell death. Annu. Rev. Immunol. 16 : 395—419.
- Chomczynsky P. A., Sacchi N. 1987. Single-step RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 : 156—159.
- Counillon L., Pouyssegur J. 1995. Structure-function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1). Cardiovasc. Res. 29 : 147—154.
- Crabtree G. R. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. Science. 243 : 355—361.
- Degen J. L., Neubauer M. G., Degen S. J., Seyfried C. E., Morris D. R. 1983. Regulation of protein synthesis in mitogen-activated bovine lymphocytes. Analysis of actin-specific and total mRNA accumulation and utilization. J. Biol. Chem. 258 : 12153—12162.
- Furue M., Katz S. I., Kawakami Y., Kawakami T. 1990. Coordinate expression of src family protooncogenes in T cell activation and its modulation by cyclosporine. J. Immunol. 144 : 736—739.
- Giaccia A. J., Kastan M. B. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. Genes Develop. 12 : 2973—2983.
- Goodier M. R., Kay J. E. 1991. Post-transcriptional regulation of cytoskeletal actin and T lymphocyte receptor beta chain

mRNA by phorbol ester. *Biochim. biophys. acta.* 1092 : 124—127.

Grinstein S., Dixon S. J. 1989. Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol. Rev.* 69 : 417—481.

Irving S. G., June C. H., Zipfel P. F., Siebenlist U., Kelly K. 1989. Mitogen-induced genes are subject to multiple pathways of regulation in the initial stages of T-cell activation. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 1034—1040.

Ko L. J., Prives C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Develop.* 10 : 1054—1072.

Levine A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88 : 323—331.

Ling N. R., Kay J. E. 1975. Lymphocyte stimulation. Amsterdam: North Holland Publ.

Lu X. P., Leffert H. L. 1991. Induction of sodium pump β_1 -subunit mRNA expression during hepatocellular growth transitions *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 266 : 9276—9284.

Lubbert M., Miller C. W., Kahan J., Koeffler H. P. 1989. Expression, methylation and chromatin structure of the p53 gene in untransformed and human T-cell leukemia virus type I-transformed human T-lymphocytes. *Oncogene.* 4 : 643—651.

Mach M., White M. W., Neubauer M., Degen J. L., Morris D. R. 1986. Isolation of a cDNA clone encoding S-adenosylmethionine decarboxylase. Expression of the gene in mitogen-activated lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 261 : 11697—11703.

Marakhova I. I., Ivanova A. E., Toropova F. V., Vereninov A. A., Vinogradova T. A. 1999. Functional expression of the Na/K pump is controlled via a cyclosporin A-sensitive signalling pathway in activated human lymphocytes. *FEBS Lett.* 456 : 285—289.

Marakhova I. I., Vereninov A. A., Toropova F. V., Vinogradova T. A. 1995. Long-term enhancement of Na, K-ATPase pump during blast transformation of human lymphocytes is controlled first by translational, then by transcriptional mechanisms. *FEBS Lett.* 368 : 110—112.

Marakhova I. I., Vereninov A. A., Toropova F. V., Vinogradova T. A. 1998. Na, K-ATPase pump in activated human lymphocytes: on the mechanisms of rapid and long-term increase in K influxes during the initiation of phytohemagglutinin-induced proliferation. *Biochim. biophys. acta.* 1368 : 61—72.

McCairns E., Fahey D., Muscat G. E., Murray M., Rowe P. B. 1984. Changes in levels of actin and tubulin mRNAs upon the lectin activation of lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 1754—1760.

Muscat G. E., Caputo A., McCairns E., Rowe P. B. 1985. Growth-related changes in specific mRNAs upon lectin activation of human lymphocytes. *DNA.* 4 : 377—384.

Noël J., Pouyssegur J. 1995. Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na^+/H^+ exchanger isoforms. *Amer. J. Physiol.* 268 : C283—C296.

Osipovich O. A., Misuno N. I., Kolesnikova T. S., Sudarikov A. B., Voitenok N. N. 1992. The difference in p53 antioncogene transcription in human monocytes and lymphocytes. *Oncogene.* 7 : 549—552.

Perez C., Bhutada A., Ismail-Beigi F. 1991. Induction of Na^+/K^+ -ATPase subunit mRNAs by cycloheximide in a rat liver cell line. *Amer. J. Physiol.* 260 : C417—C423.

Quednau B., Roskopf D., Reusch H. P., Luft F. C., Siefert W. 1994. Enhanced Na^+/H^+ exchanger activity and NHE-1 mRNA levels in human lymphocytes during metabolic acidosis. *Amer. J. Physiol.* 266 : C480—C488.

Reed J. C., Alpers J. D., Nowell P. C., Hoover R. G. 1986. Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83 : 3982—3986.

Reed J. C., Tsujimoto Y., Alpers J. D., Croce C. M., Nowell P. C. 1987. Regulation of Bcl-2 protooncogene expression

during normal human lymphocyte proliferation. *Science.* 236 : 1295—1299.

Sardet C., Franchi A., Pouyssegur J. 1989. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth-activatable Na^+/H^+ antiporter. *Cell.* 56 : 271—280.

Sfikakis P. P., Souliotis V. L., Akbar A. N., Katsilambros N., Hoffbrand V. A., Panayiotidis P. 1996. Regulation of Bcl-2 and fas expression in primary activation of human peripheral lymphocytes is not sensitive to dexamethasone or cyclosporin-A. *Hum. Immunol.* 50 : 121—126.

Simon F. R., Fortune J., Alexander A., Iwahashi M., Dahl R., Sutherland E. 1996. Increased hepatic Na, K-ATPase activity during hepatic regeneration is associated with induction of the β_1 -subunit and expression on the bile canalicular domain. *J. Biol. Chem.* 271 : 24967—24975.

Teague T. K., Hildeman D., Kedl R. M., Mitchell T., Rees W., Schaefer B. C., Bender J., Kappler J., Marrack P. 1999. Activation changes the spectrum but not diversity of genes expressed by T cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 12691—12696.

Topper J. N., Wasserman S. M., Anderson K. R., Cai J., Falb D., Gimbrone M. A., jr. 1997. Expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter BSC2 is differentially regulated by fluid mechanical and inflammatory cytokine stimuli in vascular endothelium. *J. Clin. Invest.* 99 : 2941—2949.

Vasilieva I. O., Glushankova L. N., Marakhova I. I., Vereninov A. A. 1996. Expression of Na/H antiporter mRNA during activation of human lymphocytes by phytohemagglutinin and phorbol ester with or without ionomycin. *Mol. Biol. Cell.* 7 : 254a.

Vereninov A. A., Marakhova I. I., Osipov V. V., Toropova F. V. 1993. Expression of mRNAs encoding the α_1 and the β_1 subunits of Na^+ , K^+ -ATPase in human lymphocytes activated with phytohemagglutinin. *FEBS Lett.* 316 : 37—40.

Vereninov A. A., Vasilieva I. O., Marakhova I. I., Glushankova L. N. 1997. Transcriptional regulation of Na/H antiporter (NHE-1) at the prereplicative stage of lymphocyte activation. In: Abstr. XXXIII Congr. of physiological sciences. P.015.01.

Voelkerding K. V., Steffen D. W., Zaidi S. H., Malter J. S. 1995. Post-transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene during growth-induction of human peripheral blood mononuclear cells. *Oncogene.* 10 : 515—521.

Waldegger S., Barth P., Raber G., Lang F. 1997. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 4440—4445.

Weiss A. 1993. Lymphocyte activation. In: *Fundamental immunology*. New York: Raven Press. 467—504.

White M. W., Oberhauser A. K., Kuepfer C. A., Morris D. R. 1987. Different early-signaling pathways coupled to transcriptional and posttranscriptional regulation of gene expression during mitogenic activation of T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 3004—3007.

Yamamura M., Uyemamura K., Deans R. J., Weinberg K., Rea T. H., Bloom B. R., Modlin R. L. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 254 : 277—279.

Yun C. H., Tse C. M., Nath S. K., Levine S. A., Brant S. R., Donowitz M. 1995. Mammalian Na^+/H^+ exchanger gene family: structure and function studies. *Amer. J. Physiol.* 269 : G1—G11.

Zakut-Houri R., Oren M., Bienz B., Lavie V., Hazum S., Givol D. 1983. A single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53. *Nature.* 306 : 594—597.

Zipfel P. F., Irving S. G., Kelly K., Siebenlist U. 1989. Complexity of the primary genetic response to mitogenic activation of human T cell. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 1041—1048.

A STUDY OF THE «GROUPED» EXPRESSION OF ATP1B1, NHE1, NKCC1, β -ACTIN, GAPDH, p53, Bcl-2, AND hSGK mRNAs IN HUMAN LYMPHOCYTES ACTIVATED WITH PHYTOHEMAGGLUTININ

A. A. Vereninov, I. O. Vassilieva, V. E. Yurinskaya, V. V. Matveev, L. N. Glushankova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg

Changes in the levels of mRNAs encoding ion transporters (ATP1B1, NHE1, NKCC1), β -actin, GAPDH, regulators of proliferation and apoptosis (p53, Bcl-2) and kinase hSGK, involved in cell water regulation, were studied using RT PCR in the peripheral human lymphocytes activated with phytohemagglutinin for 4—24 h. The common, «grouped», effect that was found was an increase in the levels of the studied mRNAs after an 8 h activation, sometimes preceded by a delay or slight decrease at the initial stage of 0—4 h. Apart from the common features, some differences were observed in the time courses and amplitudes of the responses of individual mRNAs. The arrangement of the individual mRNA responses in lymphocytes from different donors could differ significantly, thus indicating differential regulation of the studied mRNAs apart from the «grouped» effect. The data obtained confirmed our suggestion that regulation of ion transport at the level of mRNA could be involved in the changes of ion balance at the late stage of lymphocyte activation.
