

¹Павлов К. И., ²Дуж Е. В., ²Титов Л. П., ²Гончаров А. Е.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИОННЫХ ПРОФИЛЕЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК DAUDI

¹ Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск,

² Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь

Микроэррей-исследование позволяет одновременно измерить экспрессию большого массива генов, зонды к которым напечатаны на поверхности исследовательского чипа [1]. Подобные исследования позволяют выявлять сходства и различия в разных культурах клеток и тканей. На основе этого формируются специфические экспрессионные профили [2]. Микроэррей-исследование позволяет выявлять неочевидные маркёры патологических процессов, которые, впоследствии, возможно использовать более точными методами исследования, такими как RT-ПЦР. Daudi – В-лимфоцитоподобная культура клеток человека, происходящих из лимфомы Беркитта. Культура Daudi характеризуется экспрессией следующих поверхностных маркёров: CD10, CD19, CD27, CD34 μ , CD43, CD45, CD54, CD62L, CD69, CD79a, CD80, CD86. Сравнение профилей экспрессии доступных для исследования моноклеарных лейкоцитов периферической крови (МПК) и В-клеточной опухоли позволит выявить особенности клеточного цикла и гены-кандидаты, на роль маркёров патологического процесса.

Материалы и методы. Используя диагностические чип Human Discover Chips™ (ArrayIT corporation, California, USA) была определена экспрессия 390 генов, относящихся к основным путям клеточной физиологии и реализации генома [3]. Используя микс из кДНК от 12 здоровых добровольцев получен усреднённый паттерн экспрессии, нормализованный относительно средней яркости Blank-спотов чипа. Для сравнения с ним использована линия клеток Daudi. Отрицательный контроль представлял собой результаты выполнения только процедуры отмывки, блокировки, контакта с гибридизационным гелем и конечной отмывки фирменными растворами. РНК была получена из 40 млн клеток с помощью Tri-реагента (Applied), синтез кДНК выполнен прямым методом с помощью наборов SuperScript™ Direct plus cDNA Labeling System (Invitrogen). Данные исследовались в виде относительных и абсолютных значений флюорес-

ценции, с вычетом неспецифической флуоресценции – Ambion-контролей [4]. Для анализа результатов использован пакет программ Expander 6.

Результаты и обсуждение. Культура клеток Daudi отличалась уникальной экспрессией ряда факторов транскрипции: *v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like* (активатор транскрипции, связанный с MYB-сайтами; экспрессируется в основном в ткани яичек и лейкоцитах периферической крови), *signal transducer and activator of transcription 5A* (модулирует клеточный ответ на ростовые факторы KITLG/SCF; участвует в цитозольном сигналинге). При микроэррей-исследовании в МПК выявлена экспрессия ряда генетических детерминант, особенно из группы циклин-зависимых киназ, которые активны на разных этапах клеточного цикла и связаны с соматической рекомбинацией в Т- и В-лимфоцитах. Так, при оценке нормализованных показателей данных флуоресценции выявлена высокая экспрессия генов *Bcl-2*, *CCND1*, *CDC25A*, *CTSL2*, *CDK9*, связанных с формированием непродуктивной рекомбинации. Для 8 из 16-ти генов, связанных с активностью циклин-зависимых киназ и факторов пролиферации в культуре клеток Daudi выявлена повышенная (более, чем в 2 раза) экспрессия (табл.).

Гены, связанные с активностью циклин-зависимых киназ, экспрессируемые в культуре Daudi выше, чем в два раза (данные представлены в виде нормализованных данных средней флуоресценции)

	ID гена	Описание экспрессии гена и характеристика функций белкового продукта	Белковый продукт	МПК	*Daudi
1	CDK9	Циклин-зависимая киназа 9.	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	1390	2843
2	CDC37	Регулятор функций циклин-зависимых киназ-4, 6	CDC37 (cell division cycle 37, <i>S. cerevisiae</i> , homolog)	8220	16996
3	CDC2-like	Циклин-зависимая киназа 10.	cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10	1496	2949
4	CDC2	Циклин-зависимая киназа 2	cyclin-dependent kinase 2	2838	5122
5	CDC4	Циклин-зависимая киназа 4	cyclin-dependent kinase 4	1328	4458
6	CDC5	Циклин-зависимая киназа 5	cyclin-dependent kinase 5	1991	6215
7	CDC12A	Ингибитор циклин-зависимой киназы	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits)	3655	13035
8	CDC12D	Ингибитор циклин-зависимой киназы	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	993	1657

* – статистически значимый уровень различий $p < 0,05$ между двумя рядами.

В то же время, из кластера генов, связанных с активностью циклин-зависимых киназ, два гена имели схожую экспрессию в МПК и Daudi. Так ген *CCND1*, кодирующий белок *cyclin D1*, в МПК имел значение средней флуоресценции 1598, а в культуре Daudi – 1649. Это сопоставимые величины. Ген ингибитора циклин-зависимой киназы *CDC11A* в МПК имел большую яркость, чем в Daudi (4387 против 4103). Также сходно экспрессировался ген, кодирующий циклин *E1*: 748 – в МПК, 776 – в Daudi.

Выводы. При сравнении экспрессионных профилей МПК и культуры клеток Daudi отмечена сходно высокая экспрессия кластера генов, связанных с активностью циклин-зависимых киназ – регуляторов клеточного цикла. Культура клеток Daudi отличается повышенной, относительно МПК экспрессией генов циклин-зависимых киназ CDC 2, 4, 5, 9, 10. Сходно в МПК и Daudi экспрессируются гены циклинов D1 и E1 и ингибитора циклин-зависимой киназы CDKN1A.

ЛИТЕРАТУРА

1. *DNA Microarrays for Biomedical Research. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* / ed. M. Dufva. Humana Press, 2009. Vol. 529.
2. *BioGPS* [Electronic resource]. Mode of access : <http://biogps.org/>. Date of access : 20.10.2015
3. *Arrayit Corporation* [Electronic resource]. 2016. Mode of access : <http://arrayit.com/>. Date of access : 13.09.2016.
4. *DNA Arrays Methods and Protocols Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* / ed. J. B. Rampal. Humana Press, 1999. Vol. 170.