

УДК 575.1:616.15

# Экспрессия генов при пролиферации и дифференцировке гемопоэтических клеток с Ph-хромосомой *ex vivo*

Н. И. Гринева\*, Е. А. Духовенская, А. М. Тимофеев, Т. В. Ахлынина, Л. П. Герасимова, Т. Е. Манакова, Т. В. Боровкова, Д. А. Шмаров, Т. Г. Сарычева, Н. М. Найденова, А. Р. Гавричкова, Л. Ю. Колосова, Т. И. Колошейнова, Л. Г. Ковалева  
Гематологический научный центр Минздравсоцразвития Российской Федерации, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4  
\*E-mail: nigrin27@mail.ru  
Поступила в редакцию 29.08.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Гены *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *bax*, *gapdh* вовлечены в регуляцию пролиферации, дифференцировки, апоптоза и клеточного цикла *ex vivo* клеток хронического миелолейкоза, содержащих Ph-хромосому и онкоген *bcr/abl*. Экспрессия этих генов коррелирует с регуляцией чередованием этапов пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток трех основных типов, встречающихся при хроническом миелолейкозе. Гены *p53*, *p21*, *mdm2* и *gapdh* сверхэкспрессируются в активно пролиферирующих миелоидных клетках в фазах S и G2/M клеточного цикла и при совпадении этих фаз с этапом пролиферации. Экспрессия этих генов заметно снижается при чередовании пролиферации и созревания, а также на этапах созревания со значительным накоплением нейтрофилов, особенно при многократных чередованиях этапов. В ходе созревания нейтрофилов уровни экспрессии генов падают в ряду *gapdh* > *actin* > *c-myc*, *bcr/abl*, *p21* > *p53* > *bcl2* > *bax*. Уровни экспрессии этих генов в нейтрофилах ниже, чем в миелоцитах, и на порядок ниже, чем в клетках с длительным этапом пролиферации. Экспрессия онкогена *bcr/abl* при длительном созревании и накоплении нейтрофилов ингибируется, а на этапе пролиферации с накоплением миелоцитов возрастает в 2–3 раза. Минимальная экспрессия *bcr/abl* наблюдается при сверхэкспрессии *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-myc* и максимуме клеток в S- и G2/M-фазах. Сверхэкспрессия *bcr/abl* отмечена при низкой экспрессии генов *p53*, *p21*, *mdm2*. В Ph<sup>+</sup>-клетках при бластном кризе и в фазе акселерации хронического миелолейкоза с высокими индексами эффективности (P/D = 5–20) наблюдается сверхэкспрессия генов в ряду *bcr* > *gapdh* > *bcr/abl* и снижение экспрессии *p53*, *bcl2*, *mdm2*, *p21* << *gapdh*. Низкий контроль пролиферации и клеточного цикла генами-регуляторами способствует, очевидно, сверхэкспрессии гена *bcr/abl* и активному образованию *bcr/abl*<sup>+</sup>-клеток. Апоптоз в Ph<sup>+</sup>-клетках индуцируется при экспрессии генов *bax* > *bcl2*, *p53*, *p21*, *c-myc* и *gapdh*. На этапе созревания ингибируется апоптоз, накапливаются нейтрофилы и уменьшается экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** экспрессия генов, регуляция пролиферации и дифференцировки, клетки, содержащие Ph-хромосому, хронический миелолейкоз, ОТ-ПЦР, клеточный цикл, апоптоз.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** УЭГ – уровни экспрессии генов; ПДК – пролиферация и дифференцировка клеток; ХМЛ – хронический миелолейкоз; Ph – Филадельфийская хромосома; Ph<sup>+</sup>-клетки – гемопоэтические (кроветворные) клетки, содержащие Филадельфийскую хромосому; ПК – периферическая кровь; КМ – костный мозг; ЭТС – эмбриональная сыворотка теленка; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; нз – незрелые, делящиеся клетки; з – зрелые клетки, нейтрофилы.

## ВВЕДЕНИЕ

Хромосомные аномалии, транслокации, инверсии, делеции и многочисленные мутации приводят к развитию большинства лейкозов ([1–5] и ссылки там). В результате хромосомной транслокации t(9;22)(q34;q11), возникшей в гемопоэтической (кроветворной) полипотентной стволовой клетке, образуется Филадельфийская хромосома (Ph), которая приво-

дит к хроническому миелолейкозу (ХМЛ), острому и хроническому лимфолейкозам. В клетках с Ph-хромосомой (Ph<sup>+</sup>-клетках) в результате реципрокной транслокации 5'-фрагмента гена *bcr* и 3'-фрагмента гена *abl* образуется химерный онкоген *bcr/abl*, кодирующий активную тирозинкиназу p210/p185, которая участвует в патогенезе ХМЛ. Транслокация приводит к замещению нормальных гемопоэтических

клеток Ph<sup>+</sup>-клетками. В клеточные и молекулярные механизмы патогенеза ХМЛ вовлечены многие гены: *bcl2*, ряд генов *stat* и гены, регулирующие клеточный цикл и апоптоз [1–57].

Способность онкогена *bcr/abl* определять опухолевые свойства, повышать жизнеспособность, активировать пролиферацию и блокировать апоптоз в линиях Ph<sup>+</sup>-клеток изучалась детально [9–7, 42–57]. Обнаружено, что тирозинкиназа p210 *bcr/abl* может как подавлять апоптоз, так и не влиять на него. Данные о блокировании апоптоза при ХМЛ остаются противоречивыми [1–5, 42, 44, 45, 47 и наши неопубликованные данные]. Роль апоптоза при пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup>-клеток ранее не изучали. Наши последние исследования показывают, что апоптоз зависит от этапов пролиферации и созревания, а также от типа Ph<sup>+</sup>-клеток, выделяемых из костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) при ХМЛ [Гринева и др., неопубликованные данные].

Пролиферация и дифференцировка *ex vivo* трех основных типов Ph<sup>+</sup>-клеток регулируется при чередовании этапов пролиферации этих клеток (этап 1) и созревания нейтрофилов (этап 2). На этапе 1 скорость пролиферации превышает скорость созревания. На этапе 2, напротив, выше скорость созревания. Чередование этапов и их скоростей поддерживает эффективность пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток на оптимальном уровне [1–4] и определяет волновой характер регуляции этих процессов.

Цель нашей работы состояла в выяснении роли экспрессии генов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку, апоптоз и клеточный цикл нормальных гемопоэтических клеток, в регуляции этих процессов в Ph<sup>+</sup>-клетках. Мы изучали кинетику экспрессии генов *p53*, *c-myc*, *bcr/abl*, *mdm2*, *p21*, *bcl2*, *bax*, *bcr*, а также генов *gapdh* и *actin* в качестве контрольных, и сопоставляли ряды кинетических кривых и закономерности *ex vivo* пролиферации, дифференцировки, апоптоза и распределения в фазах клеточного цикла Ph<sup>+</sup>-клеток, полученных от больных ХМЛ.

Ph<sup>+</sup>-клетки ХМЛ, состоящие на 90% из гранулоцитов, примечательны способностью совершать полный цикл пролиферации и дифференцировки подобно нормальным миелоидным клеткам, которых в пуле кроветворных клеток на порядок меньше. Это облегчает изучение закономерностей регуляции пролиферации и дифференцировки и их экстраполяцию на нормальные гемопоэтические клетки.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованные материалы: гепарин («Flow», Англия); Limphoprep, среда α-МЕМ («MP Biomedical»,

США); DEPC, HEPES, Трис, эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), цитрат Na, лаурилсаркозил («ICN», США); краситель трипановый синий, L-глутамин и 2-меркаптоэтанол («Serva», Германия); Триреагент, гуанидинтиоцианат («Sigma», США); RQ1 ДНКазы, свободная от РНКаз, РНКазин, dNTP, бычий сывороточный альбумин (BSA), Taq-полимераза, буфер для обратной транскрипции, обратная транскриптаза MuMLV («Promega», США); пенициллин и стрептомицин (ОАО «Биохимик», Саранск, Россия); PBS (10 мМ фосфатный буфер + 0.13 М NaCl + 2.7 мМ KCl, pH 7.4) таблетированный (НПО «Эко-сервис», Россия).

Олигонуклеотидные праймеры (таблица) синтезированы и очищены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) или HPLC фирмой «Синтол» (Москва).

Исследовали Ph<sup>+</sup>-моноклеары, выделенные из ПК и КМ больных ХМЛ в хронической фазе до и в процессе лечения, в фазе акселерации и бластного криза. При ХМЛ моноклеары представлены в основном лейкоцитами и гранулоцитами, поэтому именно эти клетки здесь изучались. Характеристики Ph<sup>+</sup>-клеток и больных ХМЛ, из ПК и КМ которых выделены моноклеары, приведены в [2–5]. Типы мРНК *bcr/abl*: b3a2, b2a2 или e1a2 в Ph<sup>+</sup>-клетках определены с помощью ОТ-ПЦР [2, 5].

Методы выделения моноклеаров, анализа пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток описаны ранее [1–6]. Суспензию (0.8–1.2) × 10<sup>6</sup> клеток/мл в среде α-МЕМ, содержащей 10–20% ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 10<sup>-4</sup> М 2-меркаптоэтанол, 100 ед./мл пенициллина и 50 ед./мл стрептомицина, 25 мМ HEPES-NaOH pH 7.2–7.4, культивировали в строго одинаковых условиях, и отбирали пробы для анализа.

Степень апоптоза и распределение культивируемых Ph<sup>+</sup>-клеток по фазам клеточного цикла анализировали цитофлуориметрически [1–4] в гранулоцитарном гейте с помощью проточного флуориметра EPICS-XL. Пробы Ph<sup>+</sup>-клеток (по 5000 клеток), выделенные из КМ и ПК в градиенте плотности фикола, и пробы, отобранные в процессе культивирования, центрифугировали в течение 7 мин при 600 g и 4°C, промывали PBS и по каплям фиксировали охлажденным 70% этанолом в течение 30 мин при 4°C. Перед измерением взвесь клеток промывали PBS, центрифугировали и инкубировали осадок в 0.5 мл PBS, содержащего пропидий йодид (5 мкг/мл) и РНКазу А (50 мкг/мл), в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Измерения проводили в проточном флуориметре EPICS-XL. Клетки гранулоцитарного гейта анализировали с помощью прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, одновременно ре-

гистрировали флуоресценцию пика FL2 по амплитуде и площади импульса (это позволяло «отсекать» слипшиеся клетки, конгломераты и обрывки клеток) в линейном и логарифмическом масштабе, определяли клетки, находящиеся в апоптозе. К клеткам, вошедшим в апоптоз, относили частицы FL2-Н с гиподиплоидным набором ДНК, которые формировали пик слева от пика клеток с диплоидным набором ДНК (уменьшение размера клеток не превышало двух порядков). Долю гранулоцитов, находящихся в апоптозе, анализировали в гранулоцитарном гейте, где отсутствуют обрывки клеток. Получали ДНК-гистограммы Ph<sup>+</sup>-клеток, в тех же пробах анализировали распределение по фазам клеточного цикла (S, G2/M) при помощи компьютерной программы (SFIT-метод) [7, 10].

Для выделения клеточной РНК использовали пробы, содержащие 10<sup>6</sup> клеток. Каждую пробу лизировали гуанидинизоцианатом согласно [11] с небольшими модификациями [5].

Обработку проб ДНКазой проводили согласно [5]. РНК, выделенную из пробы (10<sup>6</sup> клеток), отжигали с 50 нг смеси гексамеров в 8 мкл воды (70°C, 10 мин). кДНК синтезировали в течение 1 ч при 37°C в 25 мкл буферного раствора для обратной транскрипции («Promega»), содержащего по 2.5 мкМ каждого из dNTP, 20 ед. акт. РНКазина («Promega»), 20 ед. акт. обратной транскриптазы MuMLV («Promega»). Раствор кДНК хранили при -70°C и быстро использовали для проведения ПЦР.

Транскрипцию генов *p53*, *c-myc*, *bcr/abl*, *mdm2*, *p21*, *bcl2*, *bax*, *bcr* и контрольных генов *gapdh* и *actin* анализировали методом ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР проводили со специфическими праймерами на РНК, выделенной из каждой пробы (таблица), в один или два раунда.

ПЦР проводили в 25 мкл раствора, содержащего буфер для ПЦР (50 мМ Трис-НСl pH 8.9, 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мкМ EDTA, 0.14 мг/мл BSA), 2–5 мкл раствора кДНК, 200 мкМ каждого из dNTP, 2.5 ед. акт. Таq-полимеразы («Promega») и 75 нг каждого праймера (таблица). ПЦР (30 циклов) проводили по следующей схеме: денатурация – 1 мин, 94°C; отжиг – 1 мин, 56°C для 1-го и 60°C для 2-го раунда; синтез – 3 мин, 72°C. Отжиг проб кДНК генов *bcr*, *p53*, *mdm2* и *bcr/abl* проводили при 56°C для внешних праймеров и 60°C для внутренних (таблица). Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 6% ПААГ. Гели окрашивали бромидом этидия (1 мкг/мл). Интенсивность флуоресценции амплифицированных фрагментов в данное время (*Jt*) определяли компьютерной денситометрией с помощью программы «Scion Image», учитывая объемы проб для ОТ-ПЦР и электрофореза.

Об экспрессии генов судили по результатам ОТ-ПЦР, проведенной на суммарной РНК Ph<sup>+</sup>-клеток с праймерами, приведенными в таблице. Уровень экспрессии мРНК оценивали по интенсивности флуоресценции (*Jt*) полос, соответствующих продуктам амплификации кДНК. В качестве внутреннего стандарта использовали уровень экспрессии мРНК *gapdh* и/или *actin* в той же пробе.

Экспрессию изоформ мРНК *bax* [9] анализировали с использованием праймеров для амплификации продуктов альтернативного сплайсинга РНК интрона 1 (таблица), накопление ПЦР-фрагмента которого коррелирует с ожидаемой экспрессией *bax*, *bcl2* и других генов, а также с кинетикой апоптоза (рис. 1–9).

Кинетические кривые экспрессии генов, пролиферации, дифференцировки, апоптоза и распределения Ph<sup>+</sup>-клеток по фазам клеточного цикла представляли в полиномиальной аппроксимации. По изменению интенсивности флуоресценции (*Jt*) судили о положении пиков экспрессии РНК и их максимумов, по *Jt/Jgapdh* оценивали относительные уровни экспрессии мРНК. Это предполагает возможность сопоставления с результатами точечных измерений уровней экспрессии, широко применяемых в других исследованиях.

Для обработки кривых экспрессии генов, пролиферации и дифференцировки клеток применяли полиномиальную аппроксимацию шестой степени на том основании, что кривые имеют волнообразный характер с несколькими максимумами и минимумами и не подчиняются логарифмической и экспоненциальной зависимостям. При этом учитывали следующие возможности и ограничения полиномиальной аппроксимации. Оптимальное число обобщаемых данных равно степени аппроксимации минус единица. Аппроксимацию принимали достоверной на основании точности экспериментальных данных ± 10%, приведенной в работах [1–6] (R<sup>2</sup> ≥ 0.81–1). Превышение числа аппроксимируемых точек над показателем степени аппроксимации возможно на один-два пункта. Особое значение в характеристике кинетических кривых имеют точки первого периода роста (пять–восемь точек в наших опытах для отрезка времени 8–10 сут). Отбор проб через 1 сут при ПДК *ex vivo* соответствует ожидаемому времени развития клеточного цикла животных клеток *in vivo*, близкому к 1 сут. Пропуск одной-двух точек на вершине пика при известной кинетике (вычисляется и прогнозируется компьютерной программой по началу пика) позволяет построить кинетическую кривую в целом.

Для построения кинетических кривых пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-гранулоцитов и их субпопуляций: миелоидных клеток (бластов, про-

Олигонуклеотидные праймеры для ОТ-ПЦР

мРНК, мишень	Праймеры, последовательность 5' → 3', GenBank Acc.no		Фрагмент, п.н.
	Внешние, отжиг при 56°C, первый раунд	Внутренние, отжиг при 60°C, второй раунд	
<i>bcr/abl</i> <i>b3a2</i> , <i>b2a2</i>	TGGATGAACTGGAGGCAG NM_005157 (342–361 bp, 20b) TCA CAG GCG TGA TGT AGT T NM_007313 (835–854 bp, 20b) NM_004327 (2896–2913 bp, 22b) (90% гомология)	GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC NM_004327 (3227–3248 bp, 22b) GCTTCACACCATTCCTCCATT NM_007313 (3477–3496 bp, 20b) NM_005157 (289–308 bp, 20b)	378 b3a2, 303 b2a2
<i>bcr</i>	TGGATGAACTGGAGGCAG NM_004327 (2896–2913 bp, 22b) CAGTTTGGCTCAGCTGTGTCCC NM_004327 (3448–3469 bp, 22b)	GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC. NM_004327 (3227–3248 bp, 22b) CAGTGGCTGAGTGGACGATGA NM_004327 (3340–3360 bp, 21b)	134
<i>mdm2</i>	ATGTGCAATACCAACATGTC NM_002392 (297–317 bp, 20b) TAGGGGAAATAAGTTAGCAC NM_002392 (1470–1492 bp, 20b)	CAAGAACTCTCAGATGAAGATG NM_002392 (1092–1114 bp, 22b) TTGATGGCTGAGAATAGTCTTC NM_002392 (1470–1492 bp, 22b)	401
<i>p53</i>	ATTGGCAGCCAGACTGCCTT NM_000546 (219–238 bp, 20b) GGAACAAGAAGTGGAGAATG NM_000546 (1434–1453 bp, 20b)	AGCTACTCCCCTGCCCTCAA NM_000546 (624–643 bp, 20b) GTCTTCCAGTGTGATGATGG NM_000546 (1009–1028 bp, 20b)	405
<i>gapdh</i>	GCTTGTCAATGGAATC NM_002046 (300–319bp, 20b) CACGATACCAAAGTTGTCATG NM_002046 (595–615 bp, 21b)		316
<i>bcl2</i>		TGTGGAAGTGTACGGCCCCAGCATGC NM_000633 (1087–1113 bp, 27b) GCCTGCAGCTTTGTTTCATGGTACATC NM_000633 (1286–1312 bp, 27b)	226
<i>bax</i>		CATCAGGGACTCAGTTGT NC_000019 (522–540 bp, 19b) CACTCCTCAAATCTGTGCCA NC_000019 (764–783 bp, 20b)	262
<i>p21</i>		GCCGGAGCTGGGCGCGGATT NM_07846(42–61 bp, 20b) GGCTTCCTCTTGGAAGAT NM_07846 (707–726 bp, 20b)	685
<i>actin, beta</i> (АКТВ)		GCGGGAAATCGTGCGTGACATT M10277complete CDS (2280–2301 bp, 22b) GATGGAGGTTGAAGGTAGTTTCGTG M10277 complete CDS (2583–2606 bp, 24b)	327
<i>c-myc</i>	GAGGСТАТТСТGCCАТТТГ NM_002467 (440–459 bp, 20b) GGCAGCAGCTCGAАТТТСТТ NM_002467 (721–740 bp, 20b)		301

миелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов) использовали морфологический анализ. Состав клеток анализировали на мазках (в трех зонах каждого мазка по 100 клеток в каждой). Концентрацию субпопуляций клеток в пробах вычисляли по их содержанию на мазках в пересчете на  $10^6$  клеток/мл исходной суспензии [1–6].

Кинетические кривые индексов эффективности (P/D, соотношение скоростей пролиферации и созревания нейтрофилов) получали как соотношение накопления незрелых, пролиферирующих клеток, P (бласты, промиелоциты, миелоциты), и накопления созревающих без деления нейтрофилов, зрелых клеток, D (метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы) согласно [1–4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Кинетические кривые уровней экспрессии генов (УЭГ) *p53*, *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *mdm2*, *bcl2*, *bax*, *bcrl*, участвующих в регуляции клеточного цикла [14, 24, 28, 45–48, 52, 58, 59], апоптоза [3, 14, 16–22, 28, 42, 47, 49, 50, 56, 58, 60], пролиферации и дифференцировки получали при культивировании Ph<sup>+</sup>-клеток (моноклеаров), состоящих на 95% из миелоидных Ph<sup>+</sup>-клеток, т.е. при миелопоэзе, изменяющемся при ХМЛ [1–3, 24, 26–28, 42, 43, 46, 48, 51–54, 57–68].

Кинетические кривые экспрессии генов *c-myc*, *p53*, *bcr/abl*, *mdm2*, *p21*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin*, *bcrl* сопоставили с кинетическими кривыми регуляции пролиферации и дифференцировки миелоидных Ph<sup>+</sup>-клеток трех основных типов, их апоптоза и распределения в фазах клеточного цикла. Кривые УЭГ и ПДК получены из одной пробы для каждой точки.

Уровни экспрессии мРНК оценивали по интенсивности флуоресценции (*Jt*) соответствующих продуктов ОТ-ПЦР исследуемых генов. Гены *gapdh* и *actin* использовали в качестве контрольных. По величине *Jt* определяли изменения экспрессии генов и положение ее пиков. По величине *Jt/Jgapdh* судили о соотношении экспрессии генов, но положение пиков, их максимумов и минимумов заметно изменяются вследствие изменений в экспрессии *gapdh*. Ранее изменения в уровне экспрессии *gapdh* наблюдали и другие исследователи [55, 56].

Кинетические кривые экспрессии генов сопоставляли с закономерностями пролиферации и дифференцировки субпопуляций гранулоцитов, апоптоза и распределения Ph<sup>+</sup>-клеток в фазах клеточного цикла при чередовании этапов пролиферации и созревания, регулирующих эффективность этих процессов (индекс P/D) [1–4] и представленных в полиномиальной аппроксимации. Закономерности регуляции пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток изучены ранее [1–6], но здесь они рассмотрены в полиномиальной аппроксимации, так как не подчиняются логарифмической и экспоненциальной зависимости, и кинетические кривые этих закономерностей имеют несколько максимумов и минимумов (рис. 1–9).

Закономерности распределения клеток по фазам клеточного цикла, уровень апоптоза и индексы эффективности P/D, согласно [1–4], различаются у Ph<sup>+</sup>-клеток трех типов, полученных от больных ХМЛ. Типы клеток, их пролиферация и дифференцировка различаются последовательностью чередования этих этапов, их числом и длительностью. Предположение, что экспрессия генов отражает особенности регуляции пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток трех типов, их апоптоза и распределения в фазах клеточного цикла, находит подтверждение в данной работе.

## Экспрессия генов при пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup>-клеток типа 1

Ph<sup>+</sup>-клетки типа 1 характеризуются продолжительным этапом пролиферации (этап 1), скорость которого выше скорости созревания, концентрация незрелых клеток длительно превышает концентрацию зрелых клеток, а индекс P/D<sup>1</sup> ≥ 1–20. Эти клетки отличаются повышенным накоплением миелоцитов, промиелоцитов, бластов при низком накоплении созревающих без деления нейтрофилов и их активном апоптозе [1–3].

На рис. 1А–З представлены кинетические кривые экспрессии генов, пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток типа 1 из КМ и ПК больных ХМЛ с умеренным пролиферативным потенциалом и индексом P/D = 1–5. Видно, что пики с максимальной и минимальной экспрессией генов в клетках КМ группируются в трех зонах. По величине пиков экспрессию генов в этих зонах можно подразделить на активную и умеренно активную. Активная экспрессия генов *bcl2* и *bax* видна в первой зоне (на 1–2 сут). Во второй зоне в интервале 2–7 сут виден широкий пик сверхэкспрессии *p53*, *mdm2* и *p21* с максимумом на 3–5 сут (рис. 1А,Б, клетки КМ). Максимальная экспрессия генов *p21*, *mdm2*, *p53*, *actin*, *gapdh*, *c-myc* снижается в разной степени в том же ряду, достигая своего минимума на 8–9 сут. В 2-й зоне менее активно экспрессируются гены *c-myc*, *bcr/abl*, *gapdh*, *actin*, *bcrl*. Все гены, кроме *bcr/abl*, имеют два минимума экспрессии – на 1–2 и 8–9 сут. В Ph<sup>+</sup>-клетках из ПК гены *p53*, *p21*, *mdm2*, *c-myc*, *bax*, *bcl2* сверхэкспрессируются сходным образом, но пики экспрессии *p21*, *mdm2*, *c-myc* и *gapdh* заметно уже (рис. 1Д,Е).

При пролиферации и дифференцировке клеток сверхэкспрессия генов *p21*, *mdm2* и *p53* достигает своего максимума в соответствии с распределением клеток в фазах S и G2/M, т.е. происходит в активно пролиферирующих миелоидных клетках-предшественниках. К концу цикла пролиферации и дифференцировки с гибелью клеток на 6–7 сут (рис. 1В,Ж) экспрессия этих генов несколько снижается, а затем вновь возрастает на 7–8 сут. Экспрессия генов *c-myc*, *bcr/abl* и *gapdh* при этом становится более умеренной. При этом концентрация пролиферирующих – незрелых – клеток значительно больше концентрации нейтрофилов (зрелых). На всем протяжении пролиферации и дифференцировки скорость накопления пролиферирующих клеток превышает скорость накопления созревающих нейтрофилов, и все клетки имеют общий максимум экспрессии генов при высоком содержании незрелых клеток и весьма низком – нейтрофилов.

Активная экспрессия генов *p53*, *mdm2*, *p21* (в меньшей степени *c-myc*) коррелирует с изменени-

ями концентрации клеток, регуляцией цикла, а также с изменениями апоптоза клеток на 3–4 и 7–10 сут (рис. 1А–3). Сверхэкспрессию *p21*, *p53*, *mdm2*, умеренную и низкую экспрессию остальных генов (*actin*, *c-myc*, *gapdh*, *bcr* и *bcr/abl*) в Ph<sup>+</sup>-клетках из КМ следует отнести к экспрессии генов клеток пролиферативного пула, которые активно накапливаются в G1- и S-фазах клеточного цикла на 3–4 сут. За это время, по-видимому, протекает G1-фаза с синтезом циклинов и киназ, формированием их ансамблей и фосфорилированием белка Rb, что происходит с участием *p21* и белков, отвечающих за прохождение контрольных точек G1/S-перехода [23, 24, 58, 64, 67–71]. Наблюдаемая при этом сверхэкспрессия *p53* означает, что *p53* выполняет свои функции в полном объеме: регулирует транскрипцию, клеточный цикл и его контрольные точки, дифференцировку и апоптоз [10–16].

Максимальный апоптоз клеток из костного мозга наблюдается на 4 сут (~30%), а далее лишь немного уменьшается. Минимальный апоптоз выявляется на 1 сут после быстрого уменьшения его доли вначале. В клетках из периферической крови апоптоз более интенсивен – с двумя максимумами УЭГ на 1 и 5–6 сут и с минимумом на 2–3 сут (рис. 1,3), что не согласуется с УЭГ *bcl2* и *bax*, отвечающих за апоптоз [13, 14, 16–22]. Экспрессия *bcl2*, *bax* в клетках КМ характеризуется двумя пиками с максимумами на 2 сут и минимумом на 4–5 сут, что не соответствует максимумам апоптоза в клетках из КМ и ПК (рис. 1Г,3). Стимулировать апоптоз, как известно, могут также активно экспрессирующиеся гены *p21*, *p53*, *gapdh*, *c-myc* [10–28, 32, 34, 49–51, 55, 56, 67–69]. Белок *p21* является ингибитором циклин-зависимых киназ и медиатором ряда функций *p53*. Экспрессия *p21* отвечает за задержку роста клеток в фазе G1, регуляцию клеточного цикла и апоптоз [23–28, 64, 67, 68, 71]. Если при сверхэкспрессии *p21* рост клеток в фазе G1 не задерживается, то дополнительные молекулы *p21* индуцируют апоптоз и/или терминацию дифференцировки [24, 64, 68]. Активация апоптоза в ответ на экспрессию *p21* происходит здесь на 4 сут при отсутствии в это время экспрессии *bcl2* и *bax* (рис. 1А–Г).

Уровень апоптоза в Ph<sup>+</sup>-клетках ПК во втором пике с максимумом на 5–6 сут существенно выше, чем в клетках из КМ (рис. 1Г,3). Сравнивая УЭГ (рис. 1), можно отметить сходство в характере экспрессии генов *p53*, *bcl2*, *bax* в клетках КМ и ПК, и более узкий пик экспрессии в клетках ПК. Однако в клетках КМ активация экспрессии генов *bax* > *bcl2* с максимумами на 5–6 сут отсутствует и не соответствует второму пику апоптоза, который наблюдается на 4 сут. Предполагается, что в регуляции этого

пика в клетках КМ участвует *p21*, который, согласно [28, 57, 60], регулирует апоптоз. В клетках ПК в это время сверхэкспрессируется также *gapdh* (максимум экспрессии на 4–6 сут). Экспрессия *gapdh* в Ph<sup>+</sup>-клетках КМ возрастает в несколько раз, как и апоптоз (рис. 1Г,3).

Сверхэкспрессия *mdm2* связана с функциями этого фактора транскрипции, модулирующего свойства многих генов и взаимодействующего с различными факторами роста и факторами транскрипции. Белки *mdm2* и *p53* взаимодействуют между собой и негативно регулируют экспрессию друг друга [29–36]. Сверхэкспрессия *mdm2* модулирует, вероятно, функции *p53* и *p21*, регулирует длительность S- и G2/М-фаз клеточного цикла и повышает пролиферативный потенциал Ph<sup>+</sup>-клеток при слабой экспрессии гена *bcr/abl*.

Супрессор опухолевого роста *p53*, активируемый при генотоксическом и клеточном стрессе, защищает нестабильные клетки с помощью экспрессии генов, инициирующих клеточный цикл с торможением пролиферации, арестом апоптоза и репарацией ДНК. При этом *p53* и *mdm2* взаимно активируют друг друга, одновременно стабилизируются и подвергаются деградации. Активация стрессом по механизму обратной связи ведет к активации *p53* и *mdm2* [31–36] и защите клеток от гибели. О взаимодействии *p53* и *mdm2* можно судить по совпадению их кинетических кривых (рис. 1А,Б,Д) с максимумом накопления клеток в S- и G2/М-фазах. Сверхэкспрессию *mdm2* можно связать с активацией отложенного перехода клеток в S- и G2/М-фазы клеточного цикла на 4–6 сут (рис. 1Г,3). Известно, что *mdm2* стимулирует неконтролируемый переход клеток в S-фазу [29]. Кроме того, сверхэкспрессия *mdm2*, непосредственно взаимодействующего с промоторами *p53* и *p21*, приводит к неконтролируемому выходу клеток в S-фазу и к их трансформации [24, 29–31, 67, 68, 71].

Известно, что пролиферация Ph<sup>+</sup>-клеток активируется экспрессией *bcr/abl* [43–48]. В данной работе Ph<sup>+</sup>-клетки из КМ и ПК характеризовались очень низкой экспрессией *bcr/abl*, существенно меньшей, чем *p53*, *mdm2*, *p21* и *c-myc*. Довольно низкие уровни экспрессии *bcr/abl* находятся в зоне максимальной экспрессии генов *p53*, *mdm2*, *p21* и даже *c-myc* на 3–10 сут, что соответствует значениям эффективности пролиферации и дифференцировки, невысоким для Ph<sup>+</sup>-клеток типа 1 (индексы P/D = 1.2–1.8–0.8). Экспрессия *bcr/abl* в клетках ПК несколько выше, чем в клетках КМ. В клетках из ПК отмечается максимум – на 5 сут и два минимума – на 1 и 9 сут. В клетках из КМ экспрессия *bcr/abl* медленно увеличивается к 4–10 сут. Эти различия не отражаются в индексах P/D, которые указывают на сопоставимые скорости

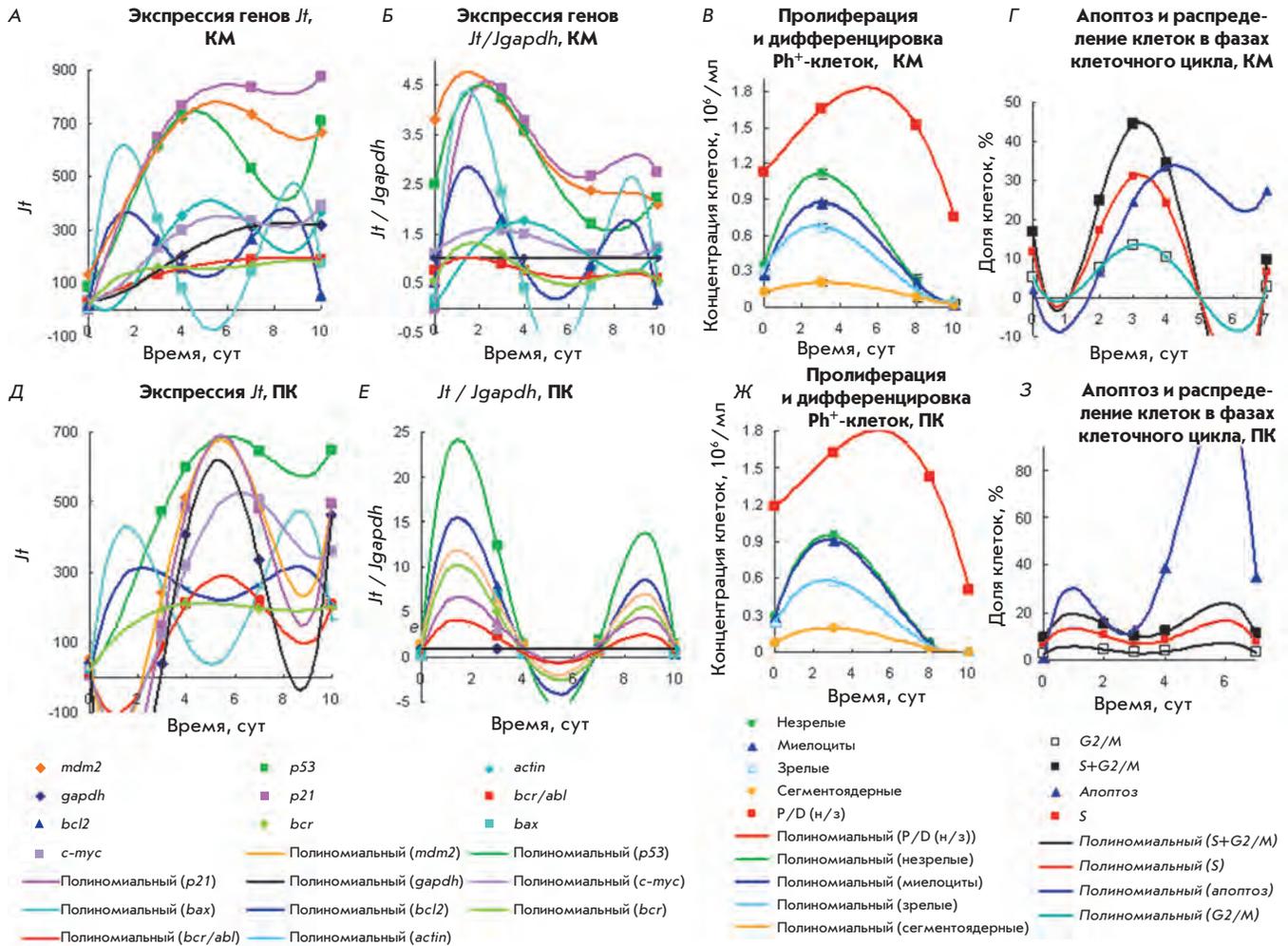


Рис. 1. Экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б, Д, Е) в  $Ph^+$ -клетках с умеренными пролиферативным потенциалом (индексами P/D) и длительностью пролиферации. Сравнение уровней экспрессии этих генов с кинетическими кривыми пролиферации и дифференцировки  $Ph^+$ -клеток (В, Ж), уровнем апоптоза и распределением клеток в фазах клеточного цикла (Г, З). Измерения кинетических кривых выполнены в каждой пробе из  $10^6$   $Ph^+$ -клеток, выделенных из костного мозга (КМ) (А–Г) и периферической крови (ПК) (Д–З). Уровни экспрессии генов (в условных единицах флуоресценции, *Jf*) (А, Д) определяли с использованием ОТ-ПЦР на суммарной РНК из  $10^6$  клеток и *Jf/Jgapdh* (Б, Е). Этап пролиферации, концентрация незрелых > зрелых ([нз] > [з]) и индекс P/D = 1.2–1.8 на 0–10 сут. Полиномиальная аппроксимация шестой степени.

пролиферации и созревания в клетках из КМ и ПК. По-видимому, низкую экспрессию *bcr/abl* при высоком содержании клеток в S- и G2/M-фазах можно объяснить подавлением *bcr/abl* при сверхэкспрессии генов *p53*, *p21*, *mdm2*, *c-myc* – основных регуляторов клеточного цикла [10–16, 23–28, 31–36, 51–54, 67, 68]. Экспрессия этих генов необходима также для пролиферации миелоидных клеток и терминации их дифференцировки. Возможно, снижение уровня экспрессии согласуется с понижением концентрации незрелых делящихся клеток.

Видно, что в  $Ph^+$ -клетках из ПК гены экспрессируются более узким пиком, чем в  $Ph^+$ -клетках из КМ (рис. 1Д–З). В клетках из ПК и КМ экспрессия *p53*, *bcl2*, *bax* начинается сразу и протекает сходным образом, достигая максимума на 2 и 9 сут (*bcl2*, *bax*) и на 5 сут (*p53*). В клетках из ПК гены *p21*, *mdm2*, *c-myc* экспрессируются с задержкой на 3 сут и с максимальным уровнем на 5–6 сут. Затем их экспрессия быстро снижается при более высоком пике апоптоза, чем в клетках из КМ (рис. 1Г,З). Видно, что максимум экспрессии генов *p21*, *p53*, *mdm2* и *c-myc*

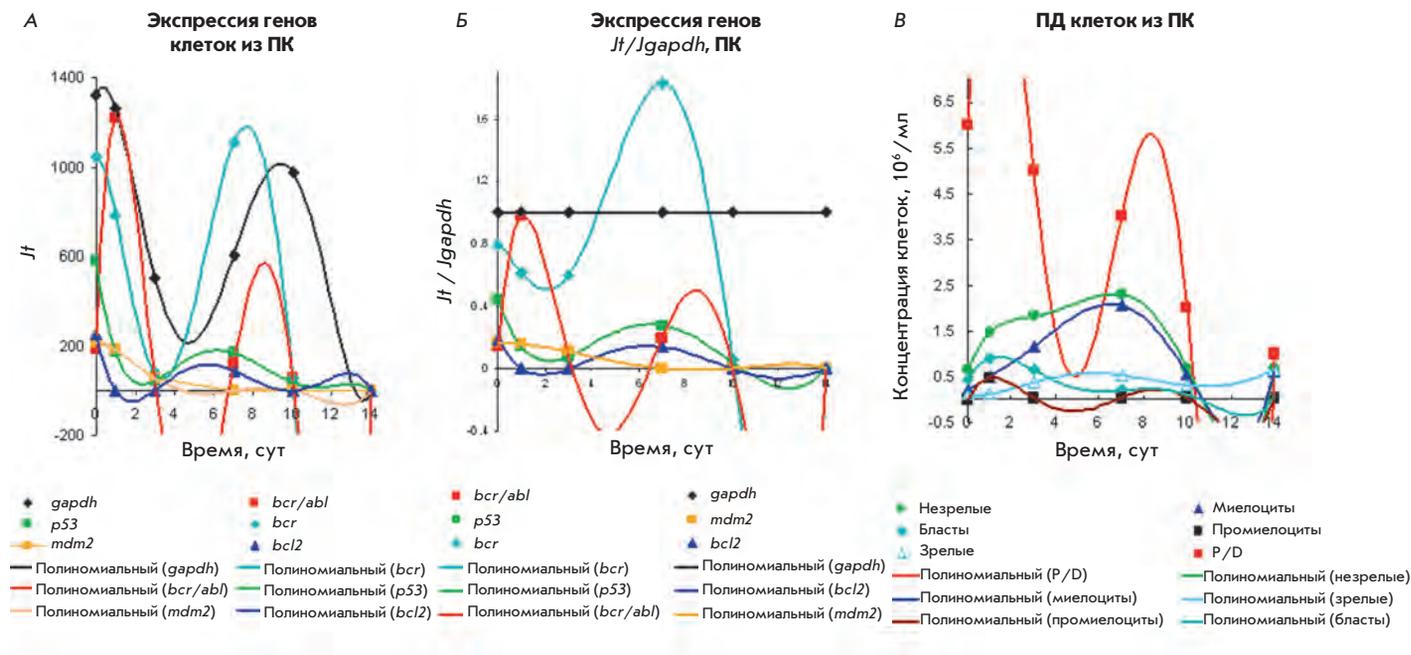


Рис. 2. Экспрессия генов в  $Ph^+$ -клетках ПК типа 1 с высоким пролиферативным потенциалом, длительной пролиферацией и индексом  $P/D = 5-12$ . Кинетические кривые уровней экспрессии генов (УЭГ) *p53*, *mdm2*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *gapdh* (А, Б), а также пролиферации и дифференцировки (В). Условия обработки проб как на рис. 1. Уровни экспрессии генов по ОТ-ПЦР *Jt* (А) и *Jt/Jgapdh* (Б). Продолжительность этапа пролиферации при  $[нз] > [з]$  равна 14 сут. Здесь и далее обозначения как на рис. 1.

по отдельности соответствует максимальному числу клеток из КМ и ПК в S- и G2/M-фазах (рис. 1Г,З). По-видимому, клетки из ПК синхронизированы в большей степени, чем клетки из КМ.

По соотношению  $Jt/Jgapdh$  (рис. 1Б) можно предположить, что экспрессия генов, связанных с пролиферацией клеток из КМ, падает в ряду:  $mdm2 \sim p21 \sim p53 > actin \sim c-myc > gapdh \sim bcr/abl \sim bcr$ . На максимуме пиков УЭГ в клетках КМ уменьшаются в 4.5 раза по сравнению с *gapdh*. В клетках из ПК сверхэкспрессия *gapdh* сочетается с резким снижением уровней экспрессии других генов, поэтому сравнение в координатах  $Jt/Jgapdh$  оказывается здесь бессмысленным.

На рис. 1 видно, что экспрессия ряда генов (в том числе *bcr/abl*) коррелирует с закономерностями пролиферации и дифференцировки, апоптоза и распределения  $Ph^+$ -клеток по фазам клеточного цикла. Корреляция между максимальным накоплением пролиферирующих и дифференцирующихся клеток и экспрессией генов означает, что гены *p21*, *mdm2*, *p53*, *c-myc*, *bcr*, *bcl2* и *bax* участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза  $Ph^+$ -клеток типа 1. Однако «привязать» экспрессию этих генов к различным видам клеток типа 1 нельзя – они продуцируются общим пиком с одновременным максимумом.

На примере  $Ph^+$ -клеток типа 1, выделенных из ПК больного ХМЛ во время бластного криза (рис. 2), можно видеть сверхэкспрессию генов  $bcr > gapdh > bcr/abl$  с двумя максимумами на 1 и 7–10 сут при минимуме на 4–5 сут. Эти клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом (индекс эффективности  $P/D = 2-12$ ) и значительным содержанием клеток  $CD34^+$  [6]. Широкому пику пролиферации и дифференцировки с максимумом пика бластных клеток на 1–3 сут соответствует весьма умеренная экспрессия *p53*, *mdm2*, *bcl2* с максимумами на 0.5, 6 и 9 сут и минимумами на 2–4 и 11 сут. При этом концентрация незрелых клеток значительно больше, чем миелоцитов. К 5–8 сут пик незрелых клеток возрастает, однако он уже состоит в основном из миелоцитов. При этом уровень экспрессии гена *bcr* увеличивается, а *bcr/abl* падает (рис. 2А–В).

Высокие уровни экспрессии *bcr/abl* (рис. 2А,Б) с двумя максимумами соответствуют профилю индексов  $P/D$ , накоплению бластов и миелоцитов в процессе пролиферации и дифференцировки (рис. 2В). Они также отражают начало циклов 1 и 2 пролиферации и дифференцировки с экспрессией генов в ранних миелоидных клетках-предшественниках [6].

Таким образом, пик индекса  $P/D$  на 1 сут и распределение экспрессии генов в ряду

*gapdh* ~ *bcr/abl* > *bcr* >> *p53* ~ *mdm2* > *bcl2* относятся в основном к бластным клеткам (миелоидные клетки-предшественники, примерно на 75% состоящие из бластов и промиелоцитов). Видно, что уровень экспрессии генов *p53*, *mdm2* и *bcl2* в 5 раз ниже, чем у генов *bcr/abl* и *gapdh*. Возможно, при сверхэкспрессии *bcr/abl* и *gapdh* ингибируются гены *p53*, *mdm2* и *bcl2*, или же снижение экспрессии генов *p53* и *mdm2* ведет к бесконтрольному делению Ph<sup>+</sup>-клеток.

Пик пролиферации и дифференцировки незрелых пролиферирующих клеток на 7 сут состоит в основном из миелоцитов, и экспрессия генов в ряду *bcr* >> *gapdh* >> *p53* > *bcl2* ~ *mdm2* > *bcr/abl* на 4–6 сут также определяется миелоцитами. Экспрессия генов в миелоцитах и нейтрофилах далее также уменьшается, что согласуется с низкой экспрессией многих белков и факторов роста в нейтрофилах [51, 57, 64, 65, 68, 69].

С другой стороны, известно, что белок BCR<sub>(64-413)</sub>, сверхэкспрессируемый в Ph<sup>+</sup>-клетках мышей с ХМЛ, фосфорилируется белком *bcr/abl* по остатку тирозина, вследствие чего киназная активность онкобелка *bcr/abl* снижается на 80% [37–40]. Сверхэкспрессия *bcr* (рис. 2) приводит к существенному, но не полному ингибированию *bcr/abl*. Максимум пика экспрессии *bcr* наблюдается на 2 сут раньше пика экспрессии *bcr/abl* и соответствует высоким индексам P/D = 6–12 и быстрому развитию бластного криза ХМЛ у этого больного [2].

Низкая экспрессия *p53* отмечается также в других Ph<sup>+</sup>-клетках в фазе акселерации и бластного криза ХМЛ с высоким пролиферативным потенциалом и индексом P/D = 3–23. Так, на 3 сут обнаруживается экспрессия генов *p53*, не превышающая 1/3 экспрессии *gapdh*. В этих клетках уровни экспрессии *bcr/abl*, *mdm2* и *bcl2* сопоставимы с *gapdh*, при том, что экспрессия *bcr* в 2 раза выше. Ph<sup>+</sup>-клетки с высоким индексом P/D (от другого больного ХМЛ) имеют сходный профиль экспрессии этих генов. Возможно, данные клетки бластного криза ХМЛ несут дефектный *p53*, хотя мутации в этом гене не типичны для ХМЛ.

Итак, Ph<sup>+</sup>-клетки типа 1 при продолжительной пролиферации, концентрации незрелых клеток большей, чем зрелых, и индексе P/D = 2–20 отличаются по составу и уровню экспрессии генов. Для клеток с индексом P/D ~ 5–20 характерно повышенное содержание бластных клеток (от CD34<sup>+</sup> до промиелоцитов), которым соответствует сверхэкспрессия *bcr* > *gapdh* > *bcr/abl* при пониженной экспрессии *p53*, *bcl2* и *mdm*, *p21* < *gapdh*. Активация *bcr/abl* в миелоидных клетках-предшественниках сопровождается низкой экспрессией *p53*, *p21*, *mdm2*. В отсутствие контроля, осуществляемого генами-

регуляторами пролиферации и клеточного цикла, создаются, по-видимому, благоприятные условия для активной пролиферации клеток *bcr/abl*<sup>+</sup>. Возможно, эти Ph<sup>+</sup>-клетки содержат мутантный *p53*.

В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1 с невысоким пролиферативным потенциалом, P/D ~ 1.2–4 и большим содержанием незрелых клеток, чем зрелых, наблюдается умеренная экспрессия *bcr/abl* при сверхэкспрессии *p21*, *mdm2*, *p53*, *bcl2*, *bax*, а также пролиферация и дифференцировка, благополучная для данного клона Ph<sup>+</sup>-клеток. Эти гены участвуют в регуляции клеточного цикла, распределение клеток в S- и G2/M-фазах которого представлено широким пиком на 2–5 сут с максимумом на 3 сут. В этот период экспрессируются гены *p21*, *p53* и *mdm2* и взаимодействуют *p53* и *mdm2*, контролирующие экспрессию друг друга.

В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1 происходит эффективная пролиферация с накоплением незрелых клеток и сверхэкспрессией *p21*, *p53* и *mdm2*. Зрелые клетки (нейтрофилы), образующиеся в период с 3 по 7 сут, быстро выходят в апоптоз. При этом концентрация зрелых клеток падает почти на порядок, что служит дополнительной причиной уменьшения экспрессии генов в ряду *p21* > *mdm2* > *p53*. По совокупности приведенных данных можно сказать, что в зоне 1 пролиферации и дифференцировки (1–4 сут) клеток типа 1 (рис. 1 и 2) экспрессия генов *p21* > *mdm2* > *p53* в 4–4.5 раза выше, чем гена *gapdh*. Далее на 4–10 сут, когда число клеток в S- и G2/M-фазах падает, уровни экспрессии этих генов уменьшаются в 3, 2.5 и 1.5 раза по сравнению с *gapdh* соответственно. На 8–9 сут уровни экспрессии этих генов на кинетической кривой имеют близкие минимумы.

### Экспрессия генов при пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup>-клеток типа 2

Для Ph<sup>+</sup>-клеток типа 2 на этапе созревания характерно значительное накопление нейтрофилов, особенно сегментоядерных, которые существенно блокируют апоптоз и ингибируют пролиферацию Ph<sup>+</sup>-клеток. Пролиферация и дифференцировка происходят длительно с низкой эффективностью (P/D<sup>2</sup> ≤ 1) и скоростью созревания большей, чем скорость пролиферации, и при большей концентрации зрелых клеток, чем незрелых [1–4].

В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 2 (рис. 3А–Г) наиболее активно экспрессируются гены *mdm2* > *p53*, значительно слабее *actin* ~ *gapdh* > *p21* > *bcr* > *c-myc* ~ *bcr/abl* > *bax* > *bcl2* (широкий пик с максимумом на 2 сут), что по длительности и положению максимумов соответствует повышенному (30–40%) накоплению клеток в S- и G2/M-фазах в течение 3–4 сут при низком уровне апоптоза (2–5%, рис. 3Г). Уровни экспрессии генов *p21* > *c-myc* ~ *bcr/abl* > *bax* > *bcl2* ниже, чем у гена

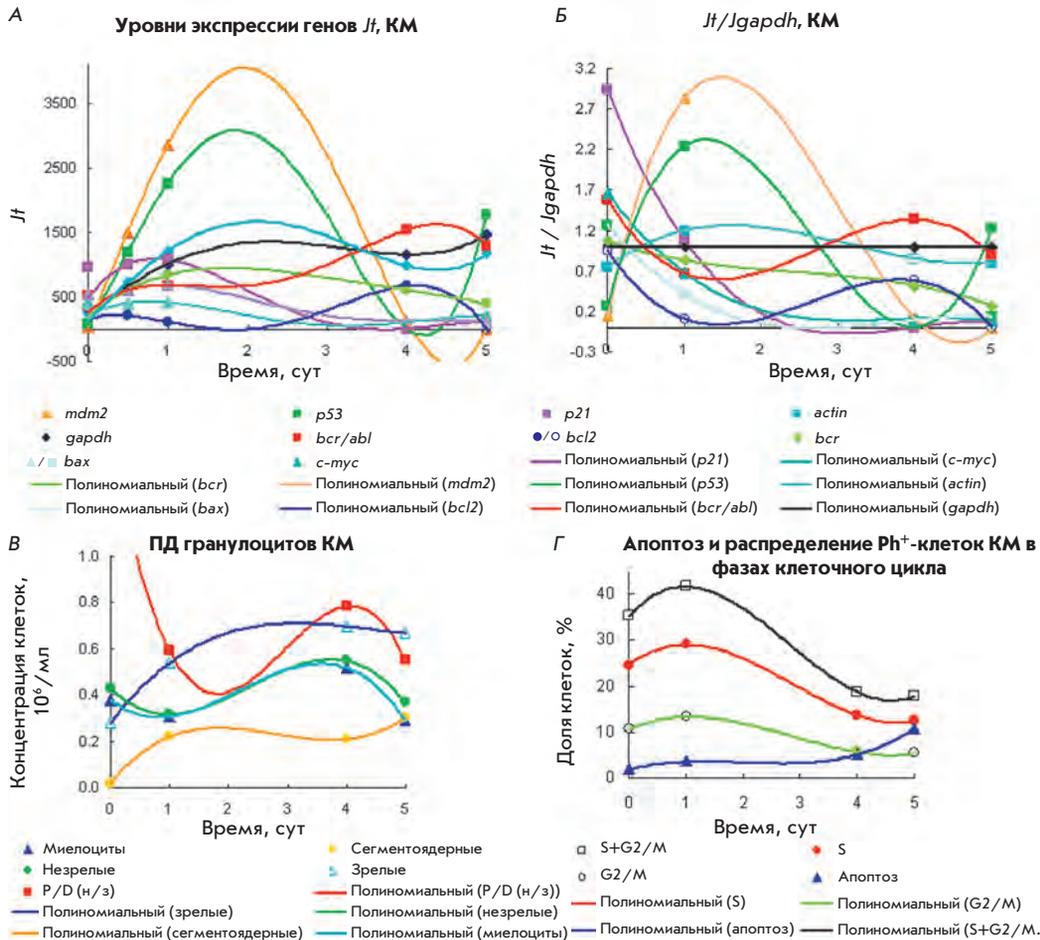


Рис. 3. Экспрессия генов в Ph<sup>+</sup>-клетках типа 2 из КМ при длительном этапе созревания с низкой эффективностью P/D ≤ 1. Кинетические кривые уровней экспрессии генов (УЭГ) *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б), а также пролиферации и дифференцировки (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г) Ph<sup>+</sup>-клеток КМ при [з] > [нз]. Детали обработки проб как на рис. 1. Уровни экспрессии генов *Jt* (А) и *Jt/Jgapdh* (Б).

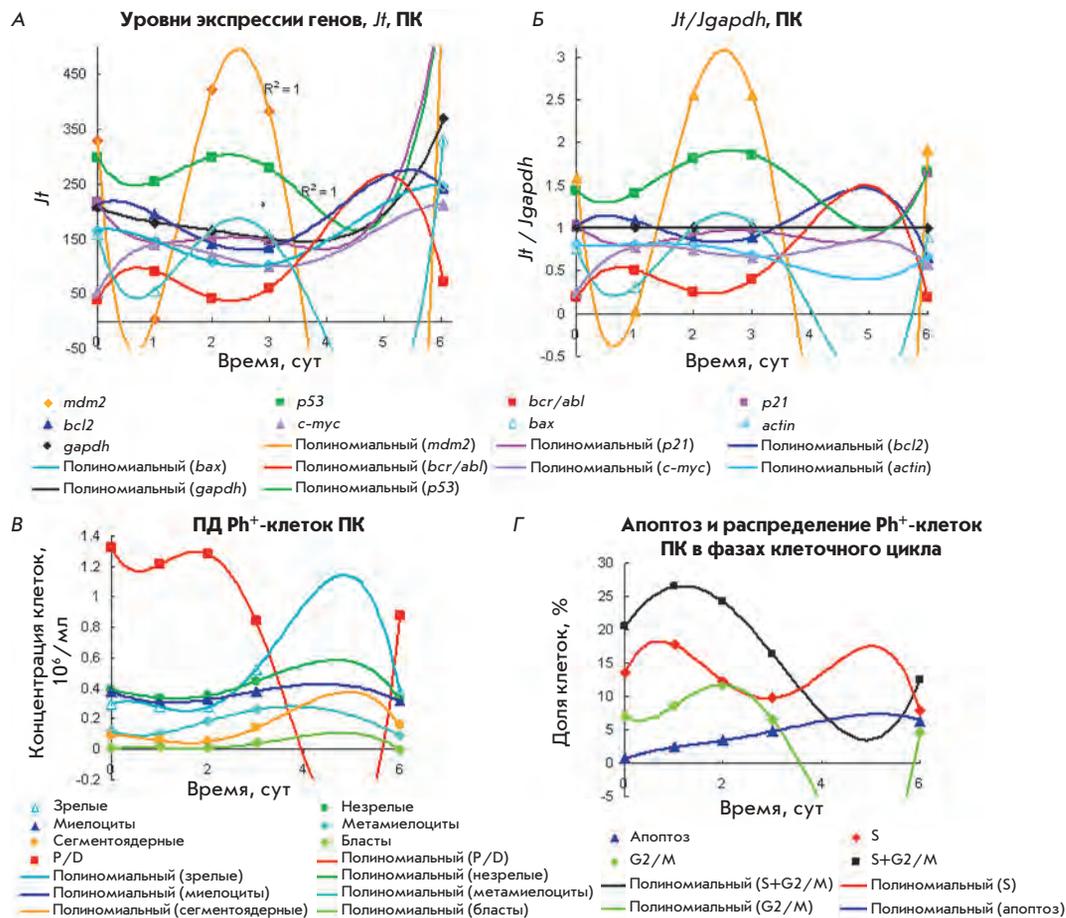
*gapdh*. Ко времени максимума продукции миелоцитов (4–5 сут) экспрессия генов *mdm2* > *p53* приближается к минимуму (4 сут). При этом в течение всего времени наблюдения (5 сут) концентрация нейтрофилов в ~ 2 раза выше, чем миелоцитов, что согласно [1, 3] заметно тормозит накопление незрелых клеток – ингибирует пролиферацию в течение 1–5 сут. Несмотря на большее накопление нейтрофилов, чем незрелых, при совпадении по времени их максимумов и высокого содержания клеток в G2/M + S-фазах (~ 40%) экспрессия *mdm2* > *p53* > *gapdh* остается значительной.

В этих условиях уровни экспрессии *gapdh*, *actin*, *p21*, *bcr*, *c-myc*, *bax* мало изменяются, а уровень *bcl2* составляет не более половины от уровня *gapdh*; у остальных генов этот показатель еще ниже. Таким образом, нейтрофилы и миелоциты при высоком их содержании мало влияют на экспрессию этих генов. Уровни экспрессии генов *p21*, *bcr*, *c-myc*, *bcl2*, *bax* в клетках типа 2 в 2–5 раза ниже, чем в клетках типа 1. Это позволяет отнести сверхэкспрессию генов

*p53* и *mdm2* в Ph<sup>+</sup>-клетках типа 2 к пролиферирующим клеткам в S- и G2/M-фазах, а не к миелоцитам и нейтрофилам на этапе созревания. При этом уровни экспрессии *mdm2* и *p53* в S- и G2/M-фазах клеток обоих типов сходны и составляют 4.5 и 2–3 относительно *gapdh*.

Максимальные уровни экспрессии *bcr/abl* и *bcl2* соответствуют максимуму пика миелоцитов. В случае *bcr/abl* максимум отвечает максимальному накоплению миелоцитов, росту индексов P/D на 4 сут и максимальной экспрессии *bcr/abl* > *gapdh* на 4–5 сут. Экспрессия *bcr/abl* снижается одновременно с накоплением нейтрофилов и возрастает примерно в 2 раза с продукцией миелоцитов. Низкие уровни *bax* и *bcl2* соответствуют низкой доле апоптоза, особенно при *bcl2* > *bax*, когда *bcl2* блокирует апоптоз. Другими словами, миелоциты и нейтрофилы характеризуются низкой экспрессией генов *gapdh* ~ *actin* > *bcr*, *p21*, *bax*, *mdm2*, *p53* и *c-myc*, тогда как уровень экспрессии гена *bcr/abl* достигает своего максимума в миелоцитах (рис. 3А–В).

**Рис. 4.** Кинетические кривые уровней экспрессии генов (УЭГ) *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-мус*, *bcr/abl*, *bcl2*, *bax*, *gadh*, *actin* (А, Б), а также ПДК (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г) для Rh<sup>+</sup>-клеток типа 3 из ПК с чередованием этапов пролиферации и дифференцировки по схеме 1/2. Уровни экспрессии генов *Jt* (А) и *Jt/Jgadh* (А, Б). Этап пролиферации на 0–3 сут с [нз] > [з], этап созревания с [з] > [нз] на 3–6 сут.



### Экспрессия генов при пролиферации и дифференцировке Rh<sup>+</sup>-клеток типа 3

Регуляция пролиферации и дифференцировки Rh<sup>+</sup>-клеток типа 3 зависит от последовательности этапов чередования и от схемы чередования: 1/2/1 или 2/1/2, т.е. с какого этапа – пролиферации (1) или созревания (2) – начинается их чередование. Согласно [1–4] пролиферация и созревание протекают параллельно, однако с повышенной скоростью начального этапа чередования по сравнению с последующим. Максимуму скорости пролиферации соответствует минимум скорости созревания и наоборот. В точках пересечения кривых накопления незрелых клеток и нейтрофилов скорости этапов одинаковы и равны 1. Таким образом, чередование этапов определяет волновой процесс пролиферации и дифференцировки клеток. Чередование этапов по схемам 1/2/1 или 2/1/2 различается не только поочередным повышением скорости (либо пролиферации, либо созревания), но также ингибированием пролиферации высокими концентрациями нейтрофилов при [з] >> [нз] [1–4].

Характер экспрессии генов в Rh<sup>+</sup>-клетках, так же как их пролиферация и дифференцировка, зависит

от последовательности этапов чередования и от его начального этапа.

### Экспрессия генов при чередовании пролиферации и созревания по схеме 1/2/1

На рис. 4А–Г видно, что активная экспрессия генов совпадает с максимумами распределения клеток в фазах G2/M + S и индексов P/D (максимум на 2–3 сут, рис. 4В,Г). На этапе 1 (0–3 сут) скорости пролиферации и созревания различаются незначительно (по накоплению незрелых и нейтрофилов) без выраженного максимума (рис. 4В). Примерно на 3 сут (после пересечения кривых накопления незрелых и зрелых клеток) этап пролиферации (P/D = 1.4–1.1 и концентрация незрелых выше, чем зрелых) переходит в этап созревания (3–6 сут) с максимумом накопления нейтрофилов и их компонентов: метамиелоцитов, сегментоядерных, палочкоядерных, и снижением индексов эффективности (P/D<sup>2</sup> < 1). При этом на этапе 2 концентрация нейтрофилов существенно (в 4 раза) увеличивается, достигая максимума на 5 сут, а незрелых и миелоцитов возрастает всего на ~ 20% и также достигает максимума на 5 сут.

При этом зрелых клеток в 3 раза больше, чем незрелых (низкий уровень апоптоза – 3–7%, *рис. 4В,Г*). Видно, что накопление клеток в S-фазе на 5 сут сопровождается незначительным повышением их апоптоза, которое не приводит к увеличению содержания клеток в G2/M-фазе (*рис. 4Г*). Видно также, что 4-кратное увеличение содержания нейтрофилов заметно ингибирует пролиферацию на этапе созревания.

На *рис. 4А–Г* можно видеть, что этапу пролиферации (1) на 2–3 сут соответствуют максимумы экспрессии *mdm2* > *p53* > *bax* > *p21*, минимумы *bcl2* > *c-myc* >> *bcr/abl*, а также первый максимум S-фазы, максимумы G2/M, S+G2/M и индекса P/D. На 0.5 сут видны первый максимум экспрессии *bcr/abl*, минимумы *p53*, *mdm2*, *bax* и максимумы *bcl2*, *c-myc*. Этапу созревания (2) на 3–6 сут (максимум зрелых >> незрелых > метамиелоцитов > сегментоядерных >> бластов и небольшой максимум апоптоза) соответствуют минимумы экспрессии *p53* > *p21* >> *bax*, *mdm2* на 4–5 сут, минимумы клеток в G2/M-, G2+S-фазах и P/D на 5–6 сут, а также максимумы экспрессии *bcr/abl* и *bcl2*. При этом пику 2 непроизводительной S-фазы (не ведущей к G2/M) на 4–6 сут соответствуют максимумы *c-myc* и G2+S и второй минимум P/D на 5–6 сут, а также минимумы экспрессии *p53* ~ *p21* >> *bax* и минимум G2/M на 4–5 сут.

Уровни экспрессии генов (*рис. 4А,Б*) на первом этапе (2–3 сут) снижаются в ряду: *mdm2* >> *p53* > *bax* ~ *gapdh* ~ *p21* ~ *bcl2* > *bcr/abl*, а экспрессия генов *bcl2*, *c-myc* > *bcr/abl* достигает минимума. На этапе 2 (на 5 сут) видны максимумы экспрессии *bcr/abl* ~ *bcl2* > *gapdh* и повышение уровней *actin*, *p53* ~ *p21*, а также *c-myc* при минимальном уровне *bax*. Сверхэкспрессия *mdm2* >> *p53* >> *bax* > *gapdh*, максимум которой наблюдается на 2 сут, соответствует максимальному числу клеток в S- и G2/M-фазах. При этом с завершением пролиферации и переходом к созреванию экспрессия *p53* и *mdm2* резко падает, а *bcr/abl* и *bcl2* возрастает. На этапе созревания по уровню максимальной экспрессии (4–6 сут) гены располагаются в ряду: *bcr/abl* ~ *bcl2* > *gapdh* ~ *actin* ~ *p21* ~ *c-myc*. Максимальные уровни экспрессии *bcr/abl* и *bcl2* наблюдаются при незначительном накоплении незрелых и миелоцитов на 5 сут. При экспрессии *bcl2* >> *bax* апоптоз блокирован (он составляет 2–4% и на 5–6 сут не превышает 7%). Это подчеркивает роль сверхэкспрессии *bcl2* по сравнению с низкой экспрессией *bax* в таком значительном подавлении апоптоза (*рис. 4А,Г*). В случае *bcl2* > *bax* или асинхронности максимумов и минимумов их экспрессии также наблюдалось ингибирование апоптоза в Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1 и 2. Повышение уровней экспрессии ряда генов к 5–6 сут можно считать предвестником этапа

пролиферации, следующего за этапом созревания.

На этапе пролиферации, когда содержание пролиферирующих клеток едва превосходит содержание нейтрофилов, сверхэкспрессия в ряду *mdm2* >> *p53* > *bax* > *gapdh* соответствует максимуму пролиферирующих клеток в S- и G2/M-фазах, а на этапе созревания появляются небольшие максимумы экспрессии *bcr/abl* ~ *bcl2* > *gapdh*. Уровни экспрессии остальных генов ниже, чем у *gapdh* на этапах и пролиферации, и созревания. Экспрессия генов *mdm2* и *p53* резко увеличивается на этапе пролиферации и быстро уменьшается на этапе созревания в соответствии с долей клеток в фазе G2/M. Это означает, что экспрессия гена *mdm2* значительна в пролиферирующих клетках, но низка или отсутствует в нейтрофилах. Активная экспрессия *mdm2*, вероятно, может служить маркером этапа пролиферации и активации клеток в фазе G2/M клеточного цикла. Такой же характер изменения максимумов экспрессии *mdm2*, *p53* и *p21*, совпадающих с максимумом клеток в фазе G2/M (*рис. 5*), отмечается и на этапе созревания с чередованием 2/1.

Экспрессия *bcr/abl* имеет два максимума (*рис. 4А,Б*). На этапе пролиферации с незначительным превышением незрелых клеток над зрелыми, максимум *bcr/abl* < *gapdh*. Однако на этапе созревания, при высокой концентрации зрелых и их значительном превышении над незрелыми, экспрессия максимальна в ряду *bcr/abl*<sup>1</sup> > *gapdh* и *bcr/abl*<sup>1</sup> < *bcr/abl*<sup>2</sup> (*рис. 4А–В*). Отметим, что и здесь при пролиферации и созревании Ph<sup>+</sup>-клеток с чередованием этапов 1/2 экспрессия *bcr/abl* возрастает при снижении УЭГ *p53*, *mdm2* и *p21*. В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 2 и 3 уровень экспрессии *bcr/abl*<sup>1</sup> < *bcr/abl*<sup>2</sup> (*рис. 3* и 4). В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1 можно встретить и *bcr/abl*<sup>1</sup> < *bcr/abl*<sup>2</sup>, и *bcr/abl*<sup>1</sup> > *bcr/abl*<sup>2</sup>.

Таким образом, экспрессия генов коррелирует с регуляцией пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток типа 3 с чередованием пролиферации и созревания по схеме 1/2. И в этом случае повышенная экспрессия *p53*, *mdm2* и *p21* совпадает с максимумом фаз S+G2/M и соответствует низкой экспрессии *bcr/abl*.

#### Экспрессия генов Ph<sup>+</sup>-клеток с чередованием этапов по схеме 2/1/2

При чередовании пролиферации и созревания по схемам 2/1–2/1/2/1 концентрация Ph<sup>+</sup>-клеток типа 3 последовательно изменяется в ряду: [з] > [нз] → [нз] > [з] → [з] > [нз] (*рис. 5–9*).

На *рис. 5* и 6 видно, что уровни экспрессии генов при созревании и пролиферации соответствуют низкому содержанию пролиферирующих клеток в фазах клеточного цикла (10–20%) при значительной индук-

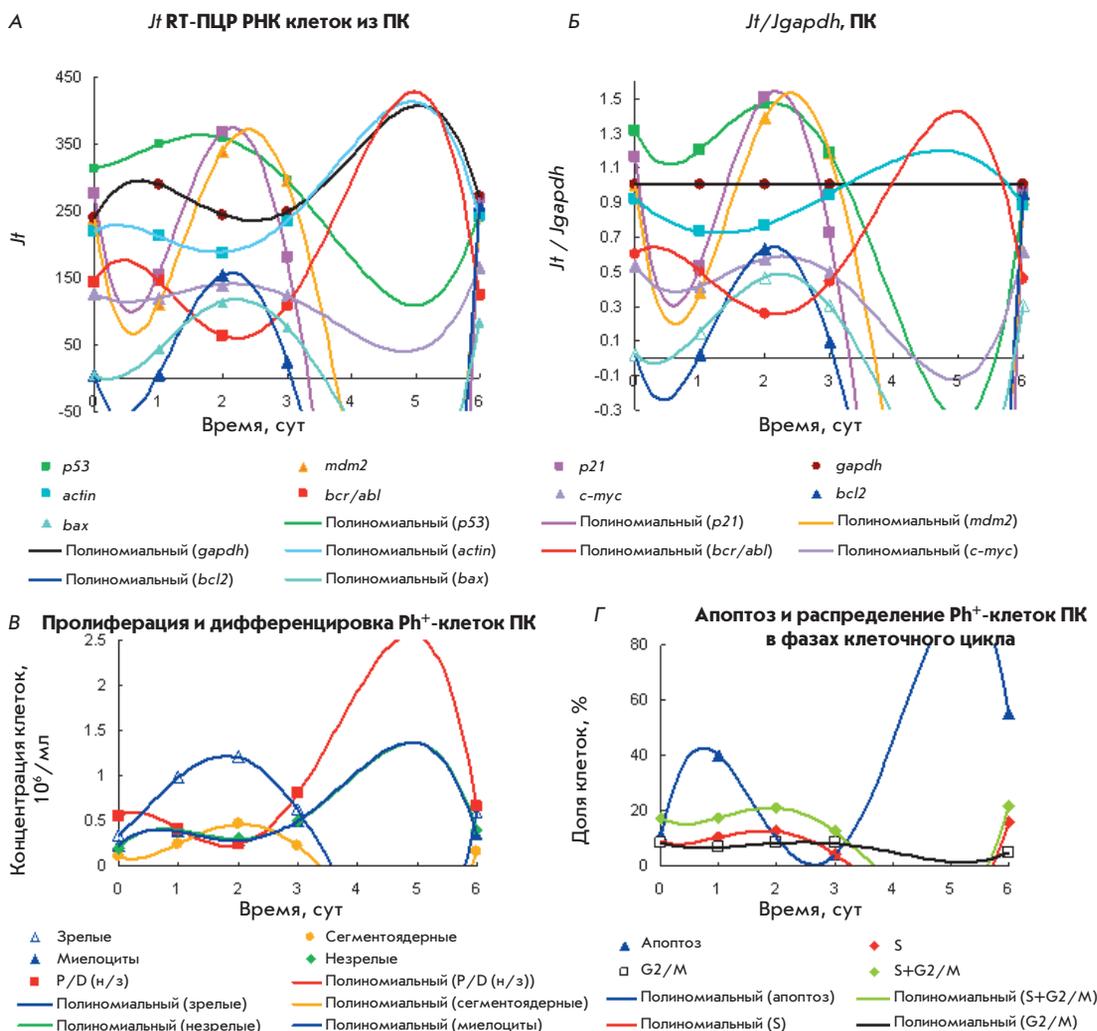


Рис. 5. Уровни экспрессии генов *p53*, *p21*, *mdm2*, *c-мус*, *bcr/abl*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б), а также кинетические кривые ПДК (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г) Ph<sup>+</sup>-клеток типа 3 из КМ с чередованием этапов по схеме 2/1/2. Детали на рис. 1. Уровни экспрессии генов *Jt* (А) и *Jt/Jgapdh* (Б). Этапы созревания при [з] > [нз] на 0–3 и 6 сут; этап пролиферации с [нз] > [з] на 3–6 сут.

ции апоптоза (40–80%). При этом высокое содержание неспособных к делению нейтрофилов на этапе созревания ведет к уменьшению пролиферативного пула клеток в фазах S+G2/M, особенно заметному на рис. 6, и этот пул не увеличивается при пролиферации на 2–6 сут. Возможно, максимум клеток в этих фазах не совпадает со значительным накоплением незрелых на этапе пролиферации. Однако созревающие без деления нейтрофилы, естественно, уменьшают накопление пролиферирующих клеток в фазах S и G2/M, при этом в них снижается экспрессия генов, активность которых существенно повышена в пролиферирующем пуле клеток в фазах S + G2/M.

Здесь уровни экспрессии исследованных генов существенно ниже, чем в предыдущих примерах, в том числе относительно *gapdh*.

При пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup>-клеток, начинающейся с этапа созревания, при значительном накоплении нейтрофилов с их ин-

гибированием пролиферации на 0–3 сут (рис. 5 и 6) максимум накопления нейтрофилов соответствует минимумам индекса эффективности P/D и накопления незрелых и миелоцитов. При переходе к этапу пролиферации на 3–5 сут видны минимумы накопления зрелых, рост P/D и минимумы накопления нейтрофилов. При этом концентрации зрелых и незрелых в их максимумах отличаются в 4–5 раз, что позволяет вполне корректно отнести экспрессию генов к нейтрофилам или соответственно к миелоцитам, уже не способным делиться.

На этапе созревания (рис. 5А–Г) максимальная экспрессия *p21*, *mdm2*, *p53* > *bcl2* > *bax* на 2 сут принадлежит не нейтрофилам, а пролиферирующим клеткам в S- и G2/M-фазах (20%), поскольку при повышении накопления миелоцитов в 5 раз на этапе пролиферации на 5 сут экспрессия этих генов не только не увеличивается, но снижается до минимальных значений.

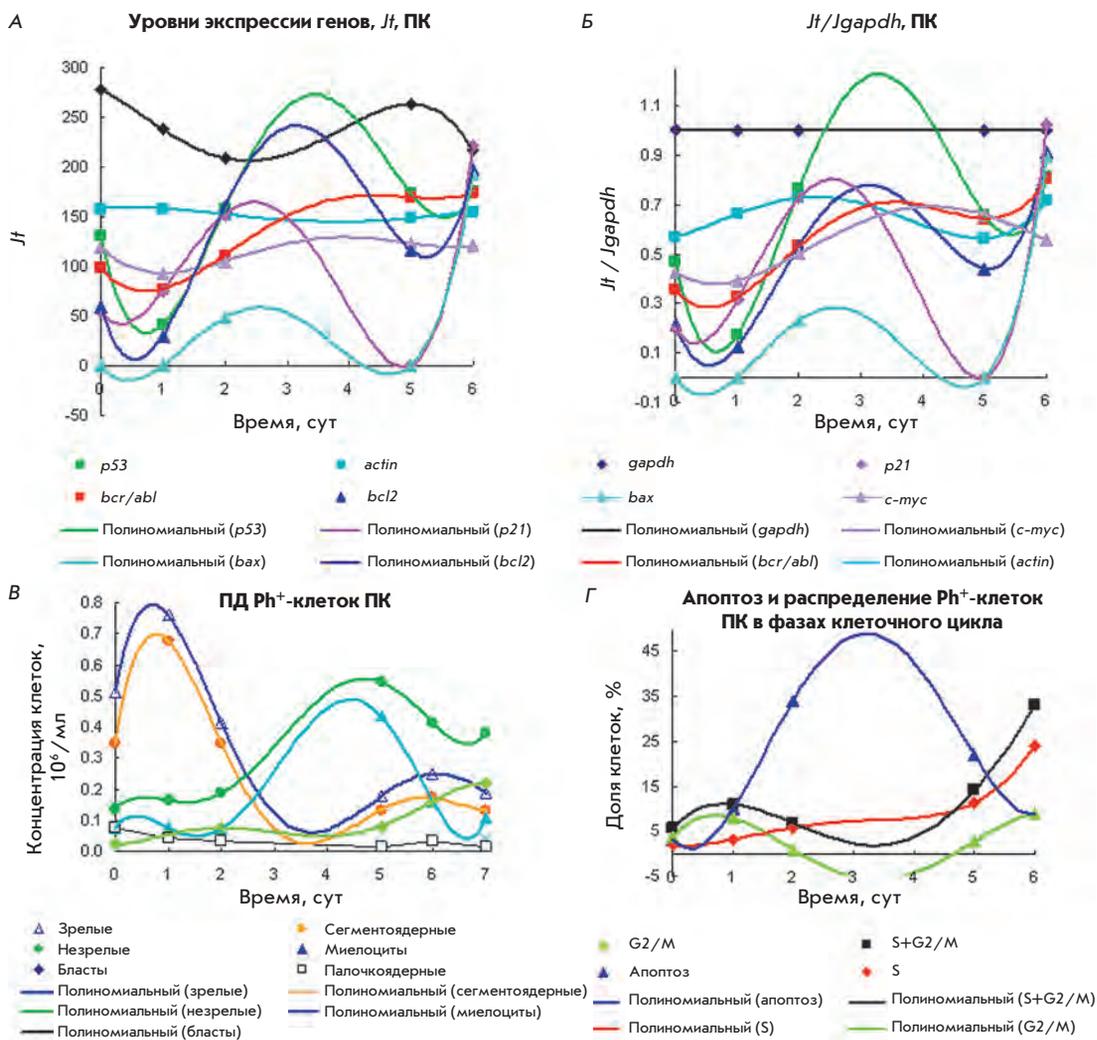


Рис. 6. Экспрессия генов *p53*, *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б), а также кинетические кривые ПДК (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г)  $Rh^+$ -клеток ПК типа 3 с чередованием по схеме 2/1. Детали на рис. 1. Уровни экспрессии генов  $Jt$  (А) и  $Jt/Jgapdh$  (Б) для ОТ-ПЦР (проба  $10^6$  клеток). Этап созревания с 0–3 сут при  $[z] > [nz]$ , этап пролиферации с 3–6 сут при  $[nz] > [z]$ .

Максимальный уровень экспрессии генов *bcr/abl*, *actin*, *gapdh*, *c-myc*, наблюдаемый на 5 сут, относится уже к миелоцитам ( $P/D^2 = 2.5$ ). Два пика экспрессии *bcr/abl* (относительно *gapdh*, рис. 5А,Б) при пролиферации миелоцитов в 2 раза больше, чем при созревании нейтрофилов (на 5 и 0.5 сут). На этапе созревания (на 2 сут) видны также минимумы экспрессии генов *gapdh* > *actin* > *bcr/abl*. Это означает, что экспрессия генов, регулирующих клеточный цикл в пролиферирующих незрелых клетках, активируется и на этапе созревания в соответствии с максимумом клеток в фазах S и G2/M, но уровень экспрессии в 2–3 раза ниже, чем в  $Rh^+$ -клетках типа 1 и 2.

На рис. 5 уровни экспрессии генов *p21* ~ *mdm2* ~ *p53* > *gapdh* выше, чем на рис. 6. Из рис. 6 видно, что на этапе созревания содержание клеток в фазах S + G2/M в 2 раза меньше, а нейтрофилов в 5 раз больше, чем незрелых, при значительно большем количестве сегментоядерных нейтрофилов. То есть, чем

выше содержание нейтрофилов, тем меньше клеток накапливается в фазах S и G2/M и тем ниже относительные уровни экспрессии генов *p21*, *mdm2*, *p53* и *gapdh* (рис. 5 и 6).

На этапе пролиферации с максимумом пика миелоцитов (на 5 сут) только у генов *bcr/abl* и *actin* уровни экспрессии выше, чем у *gapdh*, а у *p53* > *c-myc* > *bax* > *mdm2* > *p21* они ниже. Два максимума экспрессии *gapdh* коррелируют с максимумами апоптоза (рис. 5А,Б,Г). На рис. 6А,Б,Г видно, что на 2–4 сут только *p53* и *bcl2* экспрессируются активнее *gapdh*. Максимум экспрессии генов *p53* > *gapdh* >> *mdm2* > *p21* на 2–4 сут соответствует также максимуму широкого пика апоптоза (на 2–5 сут). Это отличается от умеренной экспрессии *gapdh* в ранее обсуждаемых примерах пролиферации и дифференцировки без чередования этапов и, вероятно, связано с участием *gapdh* в индукции апоптоза с максимумом на 1 и 5 сут. Отметим, что экспрессия *p53*, *c-myc* и *bcl2*,

минимальная на этапе пролиферации на 3–6 сут, составляет 0.5–0.7 от максимального уровня экспрессии *gapdh* (рис. 6). На рис. 6 видно, что максимумы экспрессии генов  $p53 > mdm2 > p21$  на 2–4 сут соответствуют также максимуму широкого пика апоптоза (на 2–5 сут).

Известно, что экспрессия *p21*, *p53*, *gapdh* и *c-myc* может отвечать за индукцию апоптоза [13–16, 20, 21, 28, 55, 56]. На этапе пролиферации на 3–6 сут в отсутствие экспрессии *bax* и *bcl2* апоптоз индуцируется, очевидно, с участием генов *gapdh*, *p21* и *p53* (рис. 5 и 6).

Отметим, что уровень экспрессии *bcr/abl* на 0.5–1 сут соответствует максимальному кратковременному накоплению миелоцитов и незрелых клеток-предшественников миелоцитов. Экспрессия генов, достигающая максимума на 0.5 сут, изменяется в ряду  $p53 > gapdh > actin > bcr/abl$ . Уровень экспрессии гена *bcr/abl* на 0–1 сут в 2 раза ниже, чем на 5 сут, что также связано с ингибированием пролиферации  $Ph^+$ -клеток при повышенной концентрации нейтрофилов (рис. 5 и 6).

Таким образом, относительные изменения уровня экспрессии генов в  $Ph^+$ -клетках соответствуют чередованию этапов по схеме 2/1 (от созревания к пролиферации). Экспрессия генов согласуется с ингибированием пролиферации незрелых клеток нейтрофилами, созревающими без деления. Экспрессия генов на этапе созревания с максимальным содержанием нейтрофилов (в виде сегментоядерных при небольшой доле пролиферирующих клеток в фазах S и G2/M) в несколько раз ниже, чем в  $Ph^+$ -клетках типа 1–3 с максимумом пула пролиферативных клеток. В этих случаях экспрессия генов однозначно повышена в активно пролиферирующих клетках в фазах S и G2/M. При этом нейтрофилы, как неделяющиеся клетки, в этих фазах отсутствуют.

Низкая экспрессия исследуемых генов в самих нейтрофилах видна на этапах созревания  $Ph^+$ -клеток типа 2 и 3 (рис. 3–6), что согласуется с пониженной продукцией в нейтрофилах многих белков и факторов роста [51, 57, 64, 65, 68, 69].

Видно (рис. 6), что в клетках типа 3 с чередованием этапов 2/1 на этапе созревания при повышенном содержании нейтрофилов понижены уровни экспрессии всех генов. Уровни экспрессии генов  $p21 \sim mdm2 \sim p53 > gapdh > c-myc$  при созревании в 3–5 раз ниже, чем на этапе пролиферации (рис. 5 и 6). При этом изменяется характер экспрессии *p21* и *mdm2*. Пики их экспрессии, достигающей максимума на 1 или 2 сут, сужаются, а затем снижаются до минимума в соответствии с завершением фаз S и G2/M клеточного цикла по времени.

Отметим, что на этапе пролиферации с накоплением миелоцитов существенно повышается экспрессия *bcr/abl*. На этапе созревания нейтрофилов экспрессия *bcr/abl* в ~ 2 раза ниже, чем при накоплении миелоцитов. На этапе пролиферации экспрессия *bcr/abl* зависит от вида и концентрации пролиферирующих миелоидных клеток-предшественников (бластов), экспрессия *bcr/abl* в которых, возможно, подавляется активной экспрессией *p53*, *mdm2* и *p21*. Дополнительно к ингибированию пролиферации в  $Ph^+$ -клетках типа 3 с чередованием 2/1 на этапе созревания происходит ингибирование экспрессии *bcr/abl* до минимума – в 1.5–3 раза ниже *gapdh* (рис. 5–6). При этом в нейтрофилах в максимуме созревания (1–2 сут с сегментоядерными нейтрофилами, составляющими основное содержание) заметно экспрессируются только *gapdh* и *actin*. Минимальные уровни *c-myc*, *bcr/abl*,  $p53 > p21 > bcl2 > bax$  в 2–10 раз ниже, чем у *gapdh* (рис. 6А,Б), что согласуется с низким содержанием клеток в фазах S и G2/M (< 12%).

При длительном чередовании этапов 2/1/2/1  $Ph^+$ -клеток с очень низким содержанием в фазах S и G2/M (от 5 до 2%) и активном апоптозе экспрессия генов также коррелирует с чередованием этапов созревания и пролиферации. При этом экспрессия генов  $bcr/abl > gapdh \geq c-myc$  повышена, а у генов *mdm2*, *p53*, *bcl2* остается на низком уровне и при созревании, и при пролиферации (рис. 7А,Б). Экспрессия гена *bcr/abl* характеризуется двумя пиками, большими, чем у гена *gapdh* и  $bcr/abl^1 > bcr/abl^2$  на этапах созревания и пролиферации соответственно (рис. 7). Этап созревания с высоким накоплением нейтрофилов сопровождается экспрессией  $bcr/abl > gapdh > c-myc > p53 > mdm2$ , которая к 5 сут стремится к минимуму. На этапе пролиферации (5–7 сут) уровни экспрессии снова возрастают до максимума (на 7–8 сут) и затем снижаются с четкой очередностью. Так максимумы и минимумы накопления  $Ph^+$ -клеток при созревании и пролиферации чередуются так же, как максимумы и минимумы экспрессии генов в ряду  $c-myc$ , *bcr/abl*, *gapdh*, *p53*. При этом им соответствуют высокие уровни экспрессии генов *bcr/abl* и *c-myc* и очень низкие – *bcl2* и *mdm2*. Быстро растущее накопление нейтрофилов приводит к подавлению пролиферации незрелых и экспрессии их генов и снижению содержания клеток в S- и G2-фазах до 3–5% (рис. 7В,Г). Последовательность этих событий отражается на уровне экспрессии генов в ряду:  $c-myc \sim gapdh \sim bcr/abl > p53 > mdm2$  на 1–9 сут (рис. 7А–Г).

В другом примере  $Ph^+$ -клеток из КМ (рис. 8) с чередованием этапов 2/1/2/1 при повышенном содержании клеток в S- и G2-фазах (~ 30%, с двумя их максимумами на 2 и 6 сут) видны два максимума экспрессии

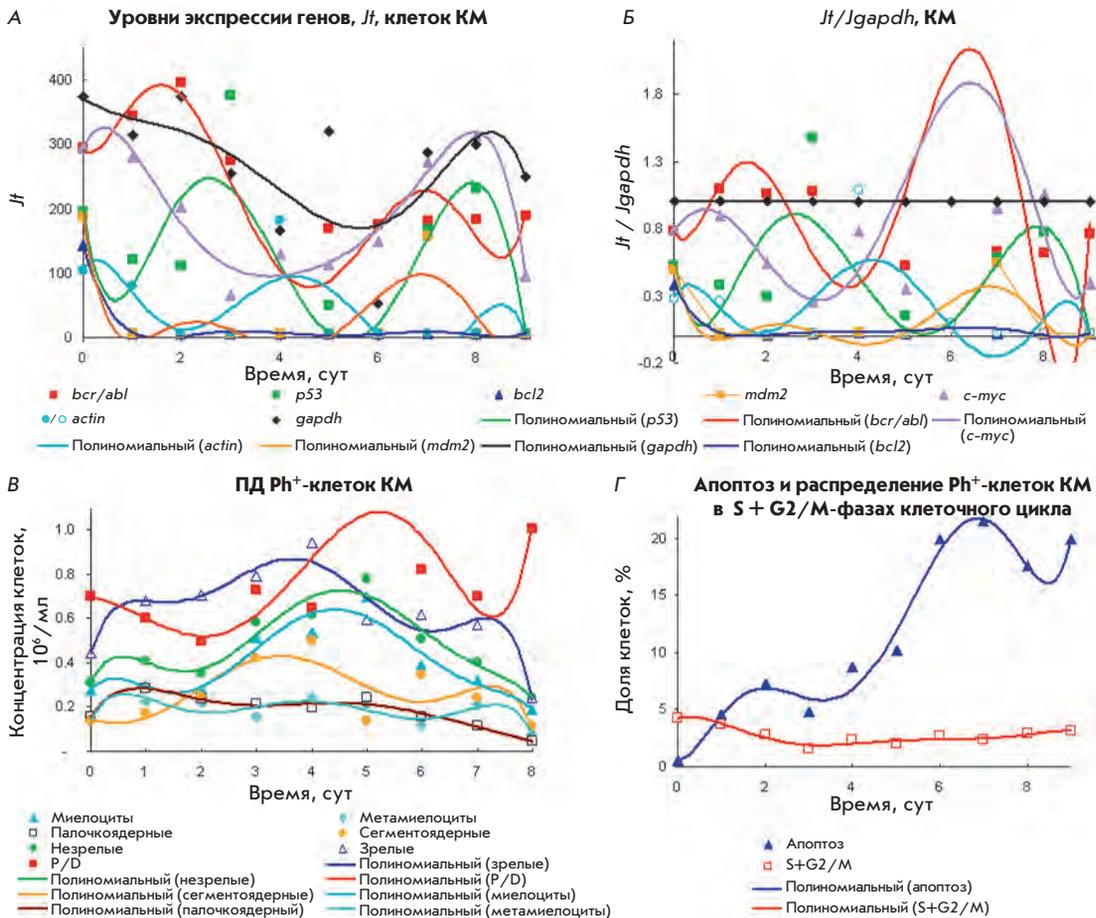


Рис. 7. Экспрессия генов *p53*, *mdm2*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcl2*, *gapdh*, *actin* (А, Б), а также кинетические кривые ПДК (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г) в  $Ph^+$ -клетках типа 3 из КМ с чередованием этапов по схеме 2/1/2/1. Детали на рис. 1. Уровни экспрессии генов  $J_t$  (А) и  $J_t/J_{gapdh}$  (Б). Этапы созревания 0–5 и 6–8 сут с  $[z] > [nz]$ , этапы пролиферации на 5–6 и 8 сут при  $[nz] > [z]$ .

генов: первый на этапе созревания:  $p21 > bax \sim c-myc \sim actin \gg bcr/abl$  и  $gapdh \sim bcl2 \sim p53 > mdm2$ ; второй на этапе пролиферации:  $c-myc \sim p21 > bax \gg bcr/abl > actin$  и  $gapdh > mdm2 > p53 > bcl2$ . Второй максимум уровней экспрессии  $p21 > bax \sim c-myc$  на порядок выше первого. В  $Ph^+$ -клетках из ПК (рис. 9) от того же больного ХМЛ экспрессия генов  $p21 > bax \sim c-myc$  была значительно ниже уровней экспрессии в клетках из КМ (рис. 8) и оставалась высокой на этапе пролиферации при трехкратном накоплении нейтрофилов ПК на этапе созревания. То есть при значительном накоплении нейтрофилов подавляется экспрессия генов на этапах созревания даже с повышенным содержанием клеток в фазах S + G2/M.

Результаты, представленные на рис. 7–9, примечательны тем, что рис. 7 показывает влияние длительного избытка нейтрофилов над незрелыми на экспрессию генов и на полное подавление пула пролиферирующих клеток в S + G2/M-фазах при низком уровне апоптоза. А на рис. 8–9 видно подавление нейтрофилами экспрессии генов на этапе созревания при совпадении существенного максимума клеток в S + G2/M-фазах (30%). Однако при пере-

ходе к пролиферации со значительным накоплением незрелых пролиферирующих клеток в условиях 50–80% индукции апоптоза (до того 10–20%) образуется второй максимум накопления пролиферирующего пула в фазах S+G2/M. При этом экспрессия генов  $p21 > bax \sim c-myc > bcr/abl > mdm2$  возрастает на порядок при минимумах  $p53 > bcl2$ . Другими словами, нейтрофилы способны подавлять и задерживать образование пула пролиферирующих клеток в фазах клеточного цикла и/или подавлять экспрессию соответствующих генов. В этих терминах можно также интерпретировать и результаты, представленные на рис. 4–6.

Итак, при пролиферации и дифференцировке с чередованием этапов 2/1 – 2/1/2/1 экспрессия генов в нейтрофилах и миелоцитах согласуется с типами клеточной регуляции чередованием этапов, апоптоза и распределения  $Ph^+$ -клеток ХМЛ в фазах клеточного цикла. Это также дополнительно свидетельствует о блокировании нейтрофилами апоптоза и ингибировании пролиферации  $Ph^+$ -клеток. Уровни экспрессии генов на этапах созревания определяются максимальным накоплением клеток в S- и G2/M-фазах клеточ-

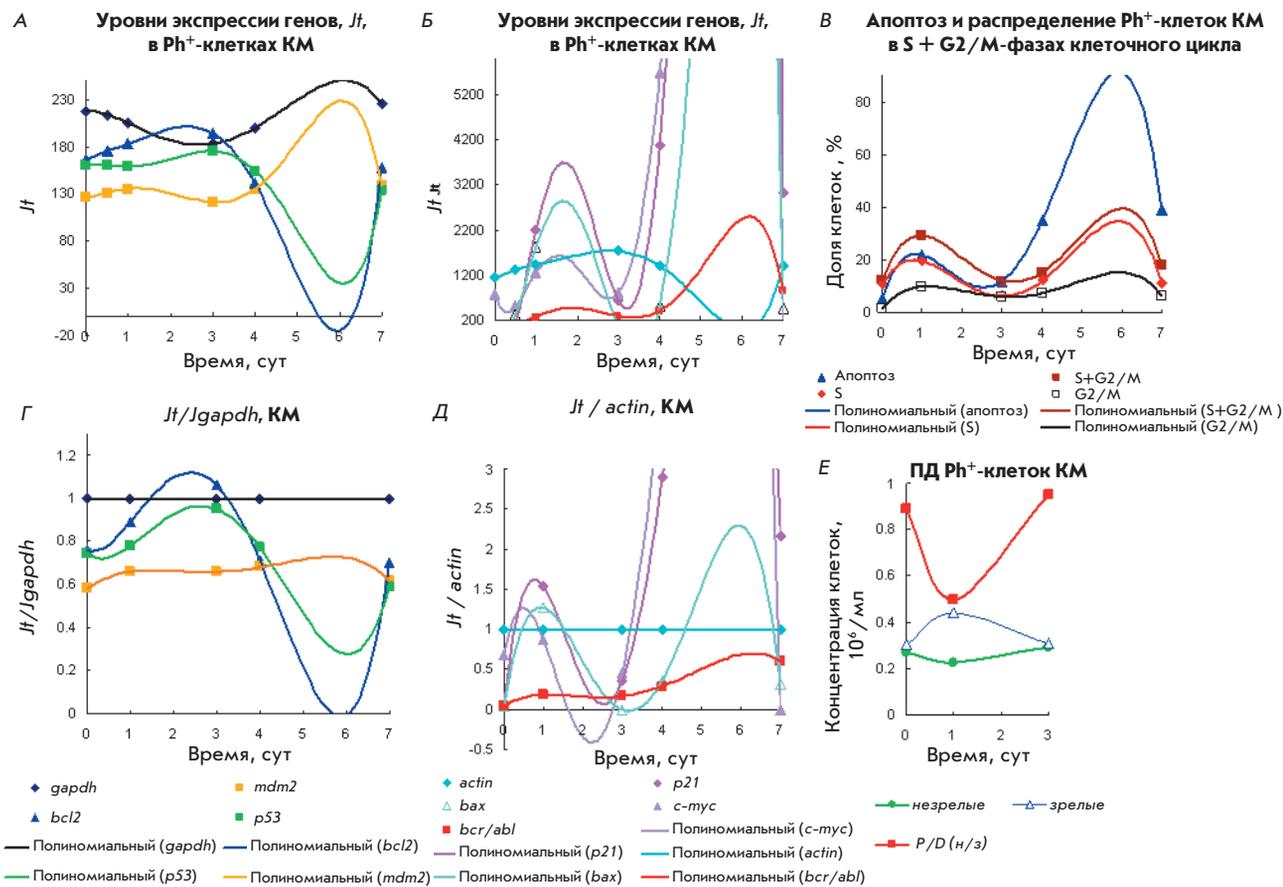


Рис. 8. Кинетические кривые уровней экспрессии генов *p21*, *c-мус*, *bcl2*, *p53*, *mdm2*, *bcr/abl*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б, Г, Д), а также ПДК (Е), апоптоза и распределения в фазах клеточного цикла (В)  $Ph^+$ -клеток из КМ типа 3 с чередованием этапов по схеме 2/1. Детали на рис. 1.  $J_t$  (А, Б),  $J_t/J_{gapdh}$  (Г, Д). Этап созревания с [з] > [нз] на 0–3 сут, этап пролиферации с [нз] > [з] на 3–7 сут.

ного цикла и ингибированием пролиферации нейтрофилами. Совпадение максимумов накопления клеток в S + G2/M-фазах и на этапе пролиферации указывает на их значение в повышении уровней экспрессии генов *p21*, *mdm2*, *p53*, *bax*, *c-мус* в 1.5–7 раз.

В нейтрофилах на этапе созревания уровни экспрессии остальных генов в 2–10 раз ниже, чем у гена *gapdh*. Это сопоставимо с уровнями экспрессии в клетках 2-го типа и в 5–10 раз ниже, чем в незрелых клетках первого типа.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В полученных от больных ХМЛ гемопоэтических клетках, содержащих Ph-хромосому и онкоген *bcr/abl*, определены кинетические кривые экспрессии 10 генов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку, клеточный цикл и апоптоз. Экспрессия основных регуляторов клеточного цикла – *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-мус*, *bcr/abl*, *bax*, *bcl2* и *gapdh*, в диф-

ференцирующихся пролиферирующих миелоидных  $Ph^+$ -клетках и нейтрофилах, созревающих без деления, коррелирует с регуляцией процессов пролиферации и дифференцировки, с индукцией апоптоза и распределением клеток в фазах клеточного цикла *ex vivo*. Сравнение кинетики экспрессии генов и закономерностей регуляции пролиферации и дифференцировки  $Ph^+$ -клеток *ex vivo* с функциями этих генов показало, что эти гены участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки *ex vivo*  $Ph^+$ -клеток трех основных типов, а также в чередовании пролиферации (1) и созревания (2).

Определенные нами уровни экспрессии генов можно считать оценочными, выявляющими тенденцию, поскольку данные ОТ-ПЦР сравнивали с уровнями экспрессии *gapdh* и *actin*, которые также изменяются (измеряли в тех же пробах) в ходе культивирования, а не применяли внутренние стандарты на каждый ген.

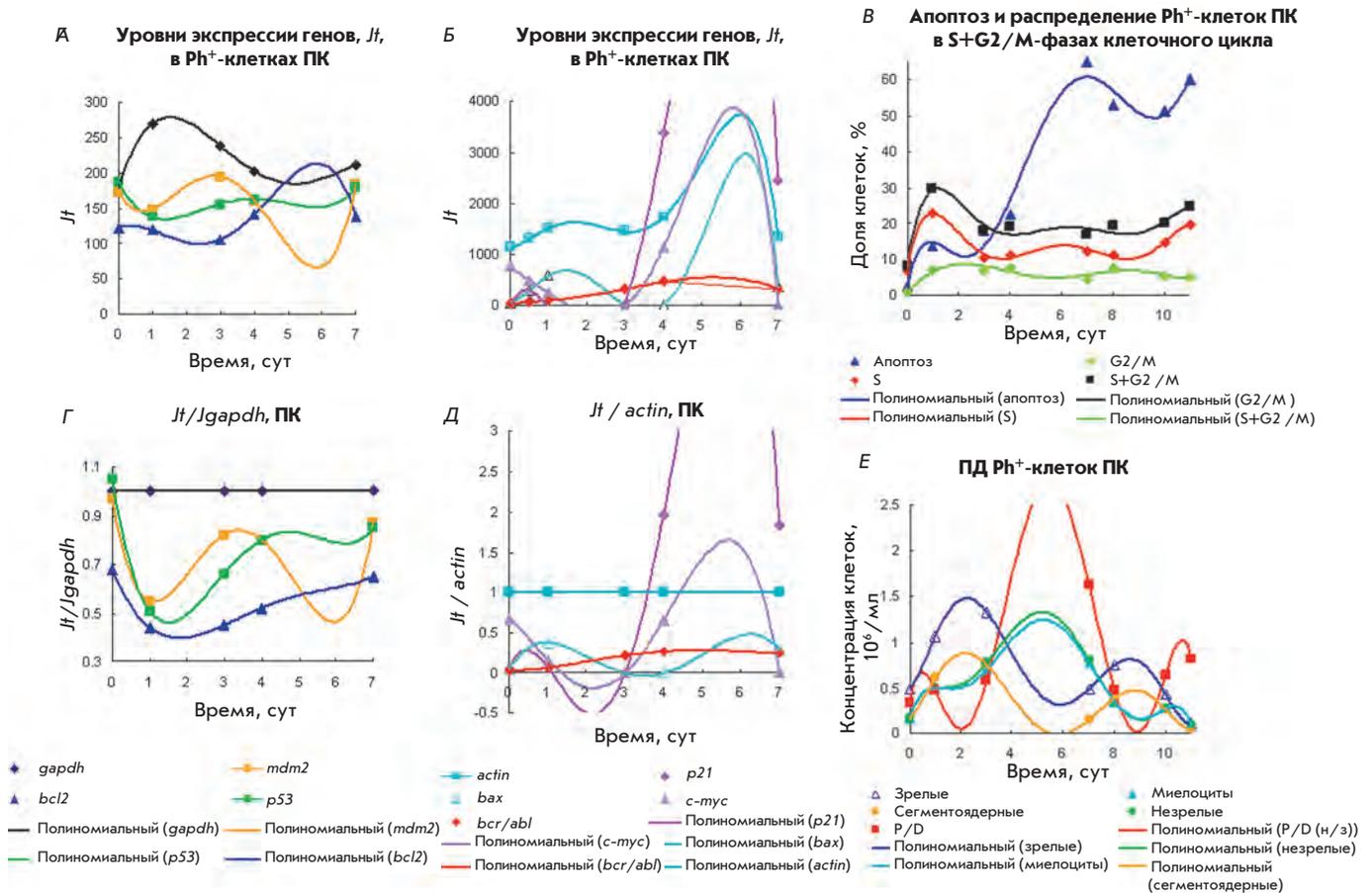


Рис. 9. Экспрессия генов *p21*, *c-мус*, *bcl2*, *p53*, *mdm2*, *bcr/abl*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б, Г, Д) в сравнении с кинетикой апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (В), а также ПДК (Е) для  $Rh^+$ -клеток из ПК типа 3 с чередованием этапов по схеме 2/1/2. Детали на рис. 1. *Jt* (А, Б), *Jt/Jgapdh* (Г, Д). Этап созревания с [з] > [нз] на 0–4 сут, этап пролиферации с [нз] > [з] на 4–7 сут.

Обнаружено, что экспрессия генов изменяется синхронно с регуляцией пролиферации и дифференцировки, фазами клеточного цикла и апоптозом. Это показывает, что рассмотренные гены участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки пролиферирующих миелоидных  $Rh^+$ -клеток и нейтрофилов. Полученные результаты соответствуют опубликованным данным о закономерностях экспрессии этих генов в других клетках. Они также согласуются с закономерностями пролиферации и дифференцировки, клеточного цикла и апоптоза в других системах. Это свидетельствует о пригодности использованных методов и кинетических кривых, полученных с помощью ОТ-ПЦР, для изучения экспрессии генов. Низкая экспрессия генов в нейтрофилах согласуется с низкой продукцией белка *p21*, ряда специфичных белков и многих факторов в гемопоэтических нейтрофилах [51, 57, 64, 65, 68, 69].

Кинетический подход к изучению экспрессии генов методом ОТ-ПЦР при сравнении с кинетикой пролиферации и дифференцировки клеток в полиномиальной аппроксимации оказывается вполне информативным для исследования регуляции пролиферации и дифференцировки, клеточного цикла и апоптоза гемопоэтических клеток, пролиферирующих с дифференцировкой и созревающих без деления. Полученные результаты позволяют поставить новые вопросы, важные для понимания экспрессии генов и механизмов ХМЛ. Один из них – участвуют ли гены *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-мус* в ингибировании экспрессии *bcr/abl*. Второй вопрос – является ли экспрессия *bcr/abl* генотоксическим или клеточным стрессом для гемопоэтических клеток, и как реагируют на это гены *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-мус*.

Результаты работы свидетельствуют, что повышению скорости пролиферации и агрессивности пролиферирующих  $Rh^+$ -клеток с высокой экспрессией гена

*bcr/abl* способствует пониженная экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, создающая условия для неконтролируемой экспрессии *bcr/abl*. Сверхэкспрессия генов *p53*, *p21*, *mdm2* и *c-myc*, основных регуляторов клеточного цикла, напротив, подавляет экспрессию *bcr/abl* в Ph<sup>+</sup>-клетках и образование клеток *bcr/abl*<sup>+</sup>.

## ВЫВОДЫ

1. Экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* участвует в общей программе регуляции *ex vivo* пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток при ХМЛ.

Экспрессия этих генов согласуется с пролиферацией и дифференцировкой Ph<sup>+</sup>-клеток трех типов и с их регуляцией чередованием этапов пролиферации (1) и созревания (2) по схемам 1/2/1 и 2/1/2, а также с пролиферацией и дифференцировкой на этапах только пролиферации (тип 1) или только созревания (тип 2).

2. В активно пролиферирующих миелоидных клетках-предшественниках, накапливающихся в S- и G2/M-фазах клеточного цикла, сверхэкспрессируются гены *p53*, *p21*, *mdm2* >> *gapdh*. Сверхэкспрессия этих генов наблюдается в клетках типа 1 и при совпадении максимума клеток в S- и G2/M-фазах с этапом пролиферации в Ph<sup>+</sup>-клетках типов 2 и 3. При созревании и повторных чередованиях этапов пролиферации и созревания, где накапливаются нейтрофилы и миелоциты, экспрессия генов существенно снижается, а при чередовании по схеме 2/1/2 уменьшается также доля клеток в S- и G2/M-фазах клеточного цикла.

3. В нейтрофилах на этапе созревания уровень экспрессии падает в ряду *gapdh* > *actin* > *c-myc*,

*bcr/abl*, *p21* > *p53* > *bcl2* > *bax*; в миелоцитах уровень экспрессии этих генов также не достигает уровня *gapdh*.

4. Экспрессия гена *bcr/abl* в Ph<sup>+</sup>-клетках типов 2 и 3 имеет два пика – снижается на этапе созревания при блокировании апоптоза и накоплении нейтрофилов и усиливается в 2–3 раза на этапе пролиферации с накоплением миелоцитов. Минимуму экспрессии *bcr/abl* соответствует сверхэкспрессия генов *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-myc* и максимум клеток в S- и G2/M-фазах клеточного цикла.

5. На этапе созревания ингибируется апоптоз, накапливаются нейтрофилы и уменьшается экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*. Апоптоз в Ph<sup>+</sup>-клетках индуцируется при экспрессии генов *bax* > *bcl2*, *p53*, *p21*, *c-myc* и *gapdh*.

6. В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1, полученных при бластном кризе и в фазе акселерации ХМЛ, с индексами эффективности P/D ~ 5–20 и высоким содержанием клеток CD34<sup>+</sup> и промиелоцитов, наблюдается сверхэкспрессия генов *bcr* > *gapdh* > *bcr/abl* при пониженной экспрессии *p53*, *bcl2*, *mdm*, *p21* < *gapdh*. При этом сверхэкспрессия *bcr/abl* в миелоидных предшественниках сопровождается низкой экспрессией *p53*, *p21*, *mdm2*. Предполагается, что снижение/отсутствие контроля генов регуляторов пролиферации, дифференцировки и клеточного цикла способствует сверхэкспрессии гена *bcr/abl* и активной продукции клеток *bcr/abl*<sup>+</sup>. ●

Работа поддержана Российским фондом  
фундаментальных исследований  
(грант № 06-04-08372-офи).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Сарычева Т.Г., Шмаров Д.А., Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Колосова Л.Ю., Колошейнова Т.И. и др. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 3. С. 120–133.
- Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Сарычева Т.Г., Шмаров Д.А., Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Саркисян Г.П., Боровкова Т.В. и др. // Рос. биотерапевт. журн. 2009. Т. 8. № 4. С. 53–68.
- Ахлынина Т.В., Гринева Н.И., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Шмаров Д.А., Сарычева Т.Г., Боровкова Т.В., Найденова Н.М., Саркисян Г.П., Тимофеев А.М. и др. // Рос. биотерапевт. журн. 2010. Т. 9. № 2. С. 3–12.
- Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Сарычева Т.Г., Шмаров Д.А., Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Саркисян Г.П., Боровкова Т.В. и др. // Рос. биотерапевт. журн. 2010. Т. 9. № 4. С. 61–76.
- Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Саркисян Г.П., Боровкова Т.В., Духовенская Е.А., Манакова Т.Е., Найденова Н.М., Тимофеев А.М., Гринева Н.И. // Цитология. 2007. Т. 49. С. 889–900.
- Гринева Н.И., Барышников А.Ю., Герасимова Л.П., Боровкова Т.В., Саркисян Г.П., Манакова Т.Е., Ахлынина Т.В., Логачева Н.П., Найденова Н.М. // Рос. биотерапевт. журн. 2007. Т. 6. № 2. С. 21–32.
- Dean P.N. // Cell Tissue Kinet. 1980. V. 13. P. 299–302.
- Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
- Edlich F., Banerjee S., Suzuki M., Cleland M.M., Arnoult D., Wang C., Neutzner A., Tjandra N., Youle R.J. // Cell. 2011. V. 145. P. 104–116.
- Levine A.J. // Cell. 1997. V. 88. P. 323–331.
- Ko L.J., Praves C. // Genes Dev. 1996. V. 10. P. 1054–1072.
- Chylicki K., Ehinger M., Svedberg H., Gulberg U. // Cell Growth Differ. 2000. V. 11. P. 561–571.
- Miyashita T., Kraevsky S., Kraevsky M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B., Reed J.C. // Oncogene. 1994. V. 9. P. 1799–1805.
- Wang Y., Okan I., Szekely L., Klein G., Wiman K.G. // Cell Growth Differ. 1995. V. 6. P. 1071–1075.
- Brosh R., Rotter V. // Mol. Biosyst. 2010. V. 6. № 1. P. 17–29.
- Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C., Stoneman V.E.,

- Williams G.T. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 236. № 1. P. 1–26.
17. van Delft M.F., Huang D.C.S. // *Cell Res.* 2006. V. 15. P. 203–213.
18. Latier L., Cartron P.F., Juin P., Nedelkina S., Manon S., Bechinger B., Vallete F.M. // *Apoptosis.* 2007. V. 12. P. 887–896.
19. Fletcher J.L., Meusburger S., Hawkins C.J., Riglar D.T., Lee E.F., Fairlie W.D., Huang D.C.S., Adams J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 18081–18087.
20. Adams J.M. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 2481–2495.
21. Green D.R., Kroemer G. // *Science.* 2004. V. 305. P. 626–629.
22. Yin X.M., Olevai Z.N., Korsmeyer S.N. // *Nature.* 1994. V. 369. P. 321–323.
23. Yusen. L., Martindale J.L., Gorospe M., Holbrook N.J. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 31–35.
24. Sherr C.J., Roberts J.M. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. P. 1149–1165.
25. El-Deiry W., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B. // *Cell.* 1993. V. 75. P. 817–825.
26. Macleod K.F., Sherry N., Hannon G., Besch D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., Jacks T. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. P. 935–944.
27. Parker S.B., Eichele G., Zhang P., Rawis A., Sands A.T., Bradley A., Olson E.N., Hasper J.W., Elledge S.G. // *Science.* 1995. V. 267. P. 1024–1027.
28. Lee E.W., Lee M.S., Camus S., Ghim J., Yang M.R., Oh W., Ha N.C., Lane D.P., Song J. // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 2100–2113.
29. Freedman D.A., Wu L., Levine A.J. // *Cell Mol. Life Sci.* 1999. V. 55. № 1. P. 96–107.
30. Momand J., Zambetti G.P., Olson D., George D., Levine A.P. // *Cell.* 1992. V. 69. P. 1237–1242.
31. Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. // *Nature.* 1997. V. 387. P. 296–299.
32. Wu L., Levine A.J. // *Mol. Med.* 1997. V. 3. № 7. P. 441–451.
33. Stommel J.M., Wahl G.M. // *Cell Cycle.* 2005. V. 4. № 3. P. 411–417.
34. Xia M., Knezevic D., Tovar C., Huang B., Heimbrook D.C., Vassilev L.T. // *Cell Cycle.* 2008. V. 7. № 11. P. 1604–1612.
35. Momand J., Wu H.H., Dasgupta G. // *Gene.* 2000. V. 242. № 1–2. P. 15–29.
36. Asher G., Lotem J., Sachs L., Kahana C., Shaul Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 13125–13130.
37. Arlinghaus R.B. // *Oncogene.* 2002. V. 21. P. 8560–8567.
38. Hawk N., Sun T., Xie S., Wang Y., Wu Y., Liu J., Arlinghaus R.B. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 2. P. 386–390.
39. Ling X., Ma G., Sun T., Liu J., Arlinghaus R.B. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 2. P. 298–303.
40. Chen S., O'Reilly L.P., Smithgall T.E., Engen J.R. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 383. № 2. P. 414–423.
41. Melo J.V. // *Blood.* 1996. V. 88. P. 2375–2384.
42. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. // *Blood.* 2000. V. 96. P. 3343–3356.
43. Primo D., Flores J., Quijano S., Sanchez M.L., Sarasquete M.E., del Pino-Montes J., Gaarder P.L., Gonzalez M., Orfao A. // *Brit. J. Haematol.* 2006. V. 135. P. 43–51.
44. Holyoake T.L., Jiang X., Eaves A.C., Eaves C.J. // *Leukemia.* 2002. V. 16. P. 549–558.
45. Buckle A.M., Mottram R., Pierce A., Lucas G.S., Russell N., Miyan J.A., Whetton A.D. // *Mol. Med.* 2000. V. 6. P. 892–902.
46. Coppo P., Dusanter-Fourt I., Millot G., Nogueira M.M., Dugray A., Bonnet M.L., Mitjavila-Garcia M.T., Le Pasteur D., Guilhot F., Vainchenker W., et al. // *Oncogene.* 2003. V. 22. P. 4102–4110.
47. Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. // *Mol. Cell Biol.* 1995. V. 15. № 10. P. 5531–5541.
48. Traycoff C.V., Haistead B., Rice S., McMahl J., Srouf E.F., Cornetta K. // *Brit. J. Haematol.* 1998. V. 102. P. 759–767.
49. Juin P., Hunt A., Littlewood T., Griffiths B., Swigart L.B., Korsmeyer S., Evan G. // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. № 17. P. 6158–6169.
50. Mitchell K.O., Ricci M.S., Miyashita T., Dicker D.T., Jin Z., Reed J.C., El-Deiry W.S. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 6318–6325.
51. Liebermann D.A., Hoffman B. // *Stem Cells.* 1994. V. 12. № 4. P. 352–369.
52. Gartel A.L., Shchors K. // *Exp. Cell Res.* 2003. V. 283. № 1. P. 17–21.
53. Hoffman B., Amanullah A., Shafarenko M., Liebermann D.A. // *Oncogene.* 2002. V. 21. P. 3414–3421.
54. Kleine-Kohlbrecher D., Adhikary S., Eilers M. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006. V. 302. P. 51–62.
55. Berry M.D., Boulton A.A. // *J. Neurosci. Res.* 2000. V. 60. № 2. P. 150–154.
56. Bustin A.S. // *J. Mol. Endocrinol.* 2000. V. 25. P. 169–193.
57. Goldman J.M., Melo J.V. // *Acta Haematol.* 2008. V. 119. № 4. P. 212–217.
58. Khwaja A., Tatton L. // *Blood.* 1999. V. 94. P. 291–301.
59. Josefson D., Myklebust J.H., Lomo J., Sioud M., Blomhoff H.K., Smeland E.B. // *Stem Cells.* 2000. V. 18. P. 261–272.
60. Daniel N.N. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. P. 7254–7263.
61. Bedi A., Sharkis S.J. // *Curr. Opin. Hematol.* 1995. V. 2. P. 12–21.
62. Madrigal-Velázquez M., Avilés A., Neri N., Huerta J., Martínez-Jaramillo G., Mayani H. // *Leuk. Lymphoma.* 2006. V. 47. P. 665–673.
63. Graham S.M., Vass J.K., Holyoake T.L., Graham G.J. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. P. 3111–3120.
64. Liu Y., Martindale J.L., Gorospe M., Holbrook N.J. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 31–35.
65. Berliner N., Hsing A., Graubert T., Sigurdsson F., Zain M., Bruno E., Hoffman R. // *Blood.* 1995. V. 85. P. 799–803.
66. Eaves C., Jiang X., Eisterer W., Chalandon Y., Porada G., Zanjani E., Eaves A. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003. V. 996. P. 1–9.
67. Chin Y.E., Kitagawa M., Su W.C., You Z.H., Iwamoto Y., Fu X.Y. // *Science.* 1996. V. 272. P. 719–722.
68. Steinman R.A., Huang J., Yaroslavskiy B., Goff J.P., Ball E.D., Nguyen A. // *Blood.* 1998. V. 91. P. 4531–4542.
69. Borregaard N., Cowland J.B. // *Blood.* 1997. V. 89. P. 3503–3521.
70. Moore S., Haylock D.N., Levesque J.-P., McDiarmid L.A., Samels L.M., To L.B., Simmons P.J., Hughes T.P. // *Blood.* 1998. V. 92. P. 2461–2470.
71. Matsumura I., Ishikawa J., Nakajima K., Oritani K., Tomiyama Y., Miyagawa J., Kato T., Miyazaki H., Matsuzawa Y., Kanakura I. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. № 5. P. 2933–2943.