

## АКТИВАЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ В-ЛИМФОЦИТОВ МЫШИ И ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ В РАННИЕ СТАДИИ АКТИВАЦИИ\*

С. В. Комиссаренко

**Введение.** Несмотря на большое количество работ, посвященных активации лимфоцитов, в настоящее время нет единого мнения о том, какие из биохимических процессов являются важнейшими или уникальными в передаче сигнала об активации клетки от ее поверхностной мембраны к ядру. Очевидно, что наряду с существованием на поверхности клетки большого разнообразия рецепторов для различных эффекторов и (или) дифференцировочных антигенов, набор которых определяется соответствующей стадией созревания лимфоцитов, стимуляция клетки, ведущая к ее пролиферации и (или) дифференциации, осуществляется за счет ограниченного количества синэргически или антагонистически взаимодействующих биохимических процессов. Поэтому отличающиеся эффекторные молекулы могут активировать общие для них биохимические пути в разные временные точки или одновременно, конкурируя за них между собой. Среди важнейших событий, лежащих в основе или сопровождающих активацию лимфоцитов, сейчас выделяют следующие: увеличенный транспорт экзогенных ионов (прежде всего  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ ) в клетку [1]; активацию метаболизма мембранных фосфолипидов, что может приводить к активации фосфолипазы С, гидролизу фосфатидилинозитолбисфосфата с образованием диацилглицерола, активированного протеинкиназу С, и инозитолтрифосфата, способствующего освобождению и увеличению концентрации эндогенного кальция, а также повышению внутриклеточного рН [2, 3], или же к активации фосфолипазы А<sub>2</sub> и каскада арахидоиновой кислоты с образованием простагландинов, тромбоксанов и активацией гуанилатциклазы [4]; активацию мембранных протеинкиназ, часть которых относится к белкам-продуктам экспрессии одной группы клеточных протоонкогенов [5], а также функционирование другой группы клеточных протоонкогенов, продукты экспрессии которых находятся в ядре и могут регулировать пролиферацию и дифференциацию клеток [6]. Уровни циклических нуклеотидов и их соотношение в клетке имеют важное регуляторное значение, в частности в отдельных фазах клеточного цикла [7], однако данные о роли сАМР и сGMP в стимулировании лимфоцитов остаются противоречивыми [8, 9], хотя участие циклических систем в пролиферации и (или) дифференциации многих типов клеток весьма очевидно [10]. Трудности в исследовании молекулярных механизмов активации лимфоцитов во многом связаны со сложностью этих механизмов, а также с отсутствием адекватных экспериментальных моделей, позволяющих иметь достаточное для биохимического анализа количество материала. Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния разных эффекторов на активацию лимфоцитов и на содержание сАМР и сGMP в «ранние сроки» стимуляции этих клеток. В качестве модели активации лимфоцитов использовали выделенные В-клетки мыши, стимулированные  $F(ab')_2$ -фрагментами антител против  $\mu$ -цепей IgM мыши или липополисахаридом (LPS) *Escherichia coli*.

**Материалы и методы.** Для выделения В-лимфоцитов получали спленоциты мышей *C3H/HeJ* (возраст 8—12 недель). Т-клетки лизировали моноклональными антителами анти-Thy 1,2 (источником антител был разведенный в  $10^4$  раз асцит мыши с соответствующей гибридомой), инкубируя спленоциты 30 мин при 4 °С, а затем добавляя к

\* Работа частично выполнялась в Слоан-Кеттеринг противораковом центре, Нью-Йорк, США, в соответствии с соглашением о научном сотрудничестве между АН СССР и Национальной академией наук США.

осадку клеток на 30 мин при 37 °С разведенный в 15 раз комплемент кролика. Эритроциты лизировали гипотоническим шоком 20 с при 4 °С в 0,0256 М NaCl. Обрывки лизированных клеток убирали центрифугированием, а осадок, состоящий из целых клеток, суспендировали в среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и инкубировали 60 мин при концентрации  $(4-5) \cdot 10^6$  клеток/1 мл и 37 °С в пластиковых флаконах для удаления прилипающих клеток. Неприлипающие клетки смывали с флаконов теплой средой RPMI-1640, центрифугировали, довели этой же средой до  $10^7$  клеток в 1 мл и вносили по 0,5 мл в пластиковые пробирки для измерения сNMP. Выделенные В-клетки обычно составляли около 30 % начального количества ядерных клеток селезенки. Контроль на качество выделения проводили электронно-микроскопически с помощью иммуноэнзимохимического метода РАР, обрабатывая полученную аналогичным способом суспензию В-лимфоцитов мыши последовательно кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши, свиными антителами против иммуноглобулинов кролика и комплексом РАР (пероксидаза — антитела против пероксидазы), как описано ранее [11]. Практически все (до 95 %) полученные клетки имели Ig на своей поверхности и интактную ультраструктуру. Эффекторы ( $Ca^{2+}$ , ЭГТА, 2-меркаптоэтанол, LPS или  $F(ab')_2$ -фрагменты) добавляли в RPMI-1640 до общего объема 1 мл. Конечные концентрации эффекторов были:  $Ca^{2+}$  — 1 мМ (помимо 0,4 мМ  $Ca^{2+}$ , находившегося в среде), ЭГТА — 5 мМ, 2-меркаптоэтанол — 0,05 мМ, LPS — 50 мкг/мл,  $F(ab')_2$  — 45 мкг/мл. Лимфоциты активировали при 37 °С, добавляя LPS *E. coli* («Difco», США) или  $F(ab')_2$ . Реакцию останавливали через 3, 10 и 30 мин, внося по 0,5 мл 1,5 М HClO<sub>4</sub> и замораживая пробы при —20 °С. Содержание сAMP и сGMP в клетках определяли радиоиммунологически с соответствующими моноспецифическими антисыворотками после очистки сNMP на колонке с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, разделения сAMP и сGMP на колонках с Dowex 1×8 («Bio-Rad», США), ацетилирования образцов и стандартов и выражали в фмолях (сGMP) или пмолях (сAMP) на 1 мг белка, внося поправки на гашение образцов и потери при хроматографии, сравнивая с [<sup>3</sup>H]-мечеными контролями [12]. Фрагменты  $F(ab')_2$  анти-μ были получены гидролизом козьих антител против белков миеломы MOPC 104E (μ, λ) мыши. Перед гидролизом козьего антисыворотка была истощена на иммобилизованном на сефарозе 4В («Pharmacia», Швеция) белке миеломы MOPC 315 (α, λ), а анти-μ антитела были выделены при pH 2,8 на иммуносорбенте сефароза 4В — белок миеломы MC 471B (μ, χ). Иммуносорбент синтезировали, как описано ранее [13]. Гидролиз отдиализированных против 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,1, антител проводили в 2 %-ном пепсине 36 ч при 37 °С. Затем белок переводили в 10 мМ фосфатный буфер, pH 6,9, «осветляли» центрифугированием 60 мин при 30000 g и 4 °С и хроматографировали на колонке 16×700 мм с биогеелем P-150, 100—200 меш («Bio-Rad», США) в том же буфере. Основной пик элюировался во фракции, соответствующей молекулярной массе 105000—110000. Гомогенность и идентичность полученного  $F(ab')_2$  были подтверждены электрофорезом в тонком слое 7,5 %-ного полиакриламидного геля с DS-Na. Из части выделенного  $F(ab')_2$ -фрагмента восстановлением дитиотрептолом и блокированием SH-групп иодацетамидом были получены Fab-фрагменты. Активацию В-лимфоцитов контролировали двумя способами: по включению [<sup>3</sup>H]тимидина и цитофлюориметрически. В первом случае к культуре клеток в 96-ячеечных планках, содержащих в каждой ячейке  $5 \cdot 10^5$  клеток в 200 мкл среды RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и соответствующие эффекторы, за 8 ч до конца культивирования добавляли 18,5 кБк [<sup>3</sup>H]тимидина. При активации В-клеток мышей изучали действие фрагментов  $F(ab')_2$  анти-μ антител (конечные концентрации 15 и 45 мкг/мл), которое сравнивали с действием аффинно выделенных, но не гидролизованных анти-μ антител (30 и 150 мкг/мл), Fab-фрагментов этих антител (45 мкг/мл), LPS *E. coli* (10 и 50 мкг/мл) и лимфокина интерлейкина 2 (IL-2). Источником IL-2 была разведенная в 20 раз обогащенная культуральная жидкость активированных клеток LBRM-33, предоставленная д-ром С. Гилисом (Ун-т штата Вашингтон, США). Во всех культурах В-клеток присутствовал 2-меркаптоэтанол в концентрации 0,05 мМ. В-лимфоциты культивировали 30, 55 и 80 ч при 37 °С, 5 %-ном CO<sub>2</sub> и 100 %-ной влажности. В нескольких экспериментах вместо обогащенных В-клеток использовали спленоциты этих же мышей, степень активации которых определяли по включению [<sup>3</sup>H]тимидина в ДНК этих клеток. Для определения уровня синтеза ДНК В-лимфоциты или спленоциты переносили с помощью автоматического собирателя клеток на стекловолоконные фильтры, промывали водой, сушили и определяли радиоактивность в реактиве Брея на жидкостно-сцинтилляционном спектрометре. Параметры активации клеток измеряли цитофлюориметрически на проточном лазерном цитофлюорографе

FC 200 («ORTHO», США) и Nova 1220 миникомпьютере («Data General», США) после окраски клеток акридиновым оранжевым, перенося  $10^5$  клеток в 200 мкл среды в 0,4 мл 0,1 %-ного раствора тритона X-100. После инкубации в течение 30 с при комнатной температуре добавляли 1,2 мл раствора акридинового оранжевого (6 мкг/мл) в 0,02 М фосфат-цитратном буфере, pH 3,0, и сразу же измеряли флюоресценцию клеток [14].

**Результаты и обсуждение.** При анализе данных по включению [ $^3\text{H}$ ]тимидина в ДНК спленоцитов (табл. 1) и обогащенных В-лимфоцитов (табл. 2) оказалось, что в обоих случаях добавление к клеткам целых молекул антител (150 мкг/мл) приводило к очень сильному снижению включения метки по сравнению с контролем, которым служили культивируемые клетки без добавления каких-либо эффекторов. Такое

Таблица 1

Включение [ $^3\text{H}$ ]тимидина (имп·мин $^{-1}$ ) в ДНК  $5 \cdot 10^5$  спленоцитов мыши ( $M \pm m$ )  
 $[^3\text{H}]thymidine incorporation (counts per minute) into 5 \cdot 10^5 mouse splenocytes DNA$   
 $(M \pm m)$

Эффекторы, мкг/мл	Время культивирования, ч		
	48	69	96
Контроль, клетки в среде	4611 $\pm$ 374	7025 $\pm$ 455	9903 $\pm$ 672
Антитела, 30	3806 $\pm$ 258	6063 $\pm$ 524	10786 $\pm$ 540
Антитела, 150	197 $\pm$ 62	434 $\pm$ 132	251 $\pm$ 59
$F(ab')_2$ , 45	49498 $\pm$ 1230	49743 $\pm$ 2627	30020 $\pm$ 4083
$Fab$ , 45	3897 $\pm$ 296	6463 $\pm$ 997	8758 $\pm$ 688
LPS, 10	10968 $\pm$ 270	6590 $\pm$ 596	5496 $\pm$ 229
LPS, 50	17896 $\pm$ 535	7078 $\pm$ 652	5578 $\pm$ 335

Таблица 2

Включение [ $^3\text{H}$ ]тимидина (имп·мин $^{-1}$ ) в ДНК  $5 \cdot 10^5$  В-лимфоцитов мыши ( $M \pm m$ )  
 $[^3\text{H}]thymidine incorporation (counts per minute) into 5 \cdot 10^5 mouse B-lymphocytes DNA$   
 $(M \pm m)$

Эффекторы	Время культивирования, ч		
	30	55	80
Контроль, клетки в среде	2258 $\pm$ 99	3976 $\pm$ 262	4352 $\pm$ 238
Антитела, 150 мкг/мл	154 $\pm$ 36	314 $\pm$ 64	203 $\pm$ 52
$F(ab')_2$ , 15 мкг/мл	2676 $\pm$ 124	3507 $\pm$ 223	4544 $\pm$ 324
$F(ab')_2$ , 45 мкг/мл	2753 $\pm$ 115	4501 $\pm$ 317	4210 $\pm$ 324
$Fab$ , 45 мкг/мл	3041 $\pm$ 153	3176 $\pm$ 289	4226 $\pm$ 200
LPS, 10 мкг/мл	16678 $\pm$ 795	11010 $\pm$ 1044	3120 $\pm$ 223
LPS, 50 мкг/мл	16694 $\pm$ 1187	14972 $\pm$ 779	4141 $\pm$ 511
$F(ab')_2$ (45 мкг/мл) + IL-2 (1:20)	13208 $\pm$ 746	12895 $\pm$ 661	4616 $\pm$ 248
IL-2 (1:20)	11426 $\pm$ 1030	8865 $\pm$ 456	5782 $\pm$ 224

снижение могло быть только за счет цитотоксического действия антител. Если же из этих анти- $\mu$  антител, вызывающих гибель клеток, выделить  $F(ab')_2$ -фрагменты, то последние в концентрации 45 мкг/мл вызывали значительную активацию спленоцитов мыши. LPS также, но в меньшей степени, стимулировал спленоциты в концентрации 50 и 10 мкг/мл.  $Fab$ -фрагменты этих же антител, обладающие одним антигенсвязывающим центром, не влияли на пролиферацию спленоцитов. Представляет интерес сравнение данных по действию одних и тех же эффекторов на спленоциты и на обогащенные В-лимфоциты. Оказывается, что активирующее действие фрагментов  $F(ab')_2$  анти- $\mu$ , наблюдавшееся на спленоцитах, полностью отсутствует на В-клетках, хотя клетки, с которыми могут взаимодействовать эти фрагменты, в обоих случаях остаются одними и теми же — В-лимфоцитами, имеющими

IgM-рецепторы на поверхностной мембране. Очевидно, что для эффективной стимуляции В-клеток фрагментами  $F(ab')_2$  анти- $\mu$  необходимы другие типы клеток, присутствующие среди спленоцитов и отсутствующие во фракции В-лимфоцитов и удаленные при обработке спленоцитов антителами анти-*Thy* 1,2 (Т-лимфоциты) и(или) прилипанием к пластику (клетки ряда макрофагов). Свойство  $F(ab')_2$ -фрагментов стимулировать пролиферацию В-клеток среди спленоцитов частично восстанавливалось на обогащенных В-лимфоцитах при добавлении

Т а б л и ц а 3

Цитофлюориметрический анализ активации В-лимфоцитов мыши  
Flow cytofluorimetry analysis of mouse B lymphocytes activation

Эффекторы	Время, ч	1	2	3	4	5	6
Контроль, клетки в среде	18	3,0	84,1	12,9	×	×	×
	44	6,2	79,2	14,6	×	×	×
	68	15,5	73,3	11,2	×	×	×
Антитела, 150 мкг/мл	18	92,7	4,1	3,2	×	×	×
	44	94,4	2,7	2,9	×	×	×
	68	×	×	×	×	×	×
$F(ab')_2$ , 15 мкг/мл	18	3,4	82,2	14,4	×	×	×
	44	4,9	82,4	12,7	×	×	×
	68	11,7	79,5	8,8	×	×	×
$F(ab')_2$ , 45 мкг/мл	18	6,0	80,0	14,0	×	×	×
	44	13,3	73,1	13,6	×	×	×
	68	28,6	64,0	7,4	×	×	×
$F(ab')_2$ (45 мкг/мл) + +IL-2 (1:20)	18	1,2	73,8	25,0	17,9	5,6	1,5
	44	7,1	70,6	22,3	15,7	3,6	3,0
	68	8,6	72,6	18,8	16,7	1,3	0,8
LPS, 50 мкг/мл	18	1,3	71,6	27,1	19,5	5,3	2,3
	44	1,7	75,0	23,3	17,3	3,9	2,1
	68	10,6	76,8	12,6	×	×	×
IL-2 (1:20)	18	1,0	76,7	22,3	14,4	5,5	2,4
	44	0,9	78,1	21,0	13,2	4,6	3,2
	68	12,8	76,3	10,9	×	×	×

П р и м е ч а н и е. 1 — мертвые клетки, %; 2 — клетки в  $G_0$ -фазе, %; 3 — стимулированные клетки, % (в фазах  $G_1+S+G_2+M$ ); 4 — клетки в  $G_1$ -фазе, %; 5 — клетки в S-фазе, %; 6 — клетки в фазах  $G_2$  и M, %; × — определения не проводили.

$F(ab')_2$  к культуре клеток вместе с IL-2, который мог служить источником факторов, заменяющих Т-клетки. Активирующее действие LPS в культурах спленоцитов и В-лимфоцитов проявлялось практически одинаково, что подтверждает независимость эффекта LPS от Т-лимфоцитов. Данные по стимуляции клеток, полученные исходя из включения [ $^3H$ ]тимидина в ДНК этих клеток, были подтверждены и дополнены с помощью проточной цитофлюориметрии обогащенных В-лимфоцитов. Этот метод с применением акридинового оранжевого позволяет определить относительное количество ДНК (по зеленой флуоресценции при 515—575 нм) и одновременно РНК (по красной флуоресценции при 600—650 нм) в единичных клетках и таким образом рассчитать по соответствующим программам, в какой фазе цикла находится каждая клетка, количество активированных клеток, а также дифференцировать живые клетки от мертвых или агглютинированных [14]. Было показано, что интактные молекулы анти- $\mu$  антител, из которых получали  $F(ab')_2$ - и Fab-фрагменты, в отличие от имеющих их данных литературы о пролиферативном действии растворимых [15] или инсольбулизированных [16] анти- $\mu$  антител не только не обладали активирующим эффектом, но и были цитотоксичны при концентрации 150 мкг/мл, вызывая гибель до 92—94 % В-лимфоцитов в культуре (табл. 3). Наибольшую активацию В-клеток вызывали LPS и смесь  $F(ab')_2$ -фрагментов с IL-2. Однако степень активации была незначительной. Она достигала 25—27 % клеток в культуре и лишь вдвое превышала коли-

чество стимулированных клеток в контроле, которые, по-видимому, были активированы за счет ростовых факторов, присутствующих в эмбриональной сыворотке крови. Такой сравнительно низкий уровень активации В-лимфоцитов с помощью LPS связан, очевидно, с тем, что линия мышей *C3H/HeJ* фенотипически слабо отвечает на LPS *E. coli* как на митоген. Неполная активация при помощи  $F(ab')_2$  с IL-2 может объясняться недостаточным содержанием костимулирующего фактора (BSF-1 или IL-4, или BCGF-1) [17] в препаратах IL-2, полученных из культуры активированных клеток. В пробах, где активация клеток

Таблица 4

Содержание циклических GMP и AMP в В-лимфоцитах селезенки мышей после их активации LPS или  $F(ab')_2$ -фрагментами анти- $\mu$  антител  
Cyclic GMP and AMP levels in mouse spleen B lymphocytes after their activation by LPS or by  $F(ab')_2$  fragments of anti- $\mu$  antibodies

Эффектор	Ca <sup>2+</sup> i	ЭГТА	Время активации, мин	cGMP/белок лимфоцитов, фмоль/мг	cAMP/белок лимфоцитов, пмоль/мг
Контроль	+	—	0	138±16	17,3±3,2
$F(ab')_2$	+	—	3	120±22	20,6±4,3
$F(ab')_2$	+	—	3	369±37	17,0±3,4
LPS	+	—	3	470±55	15,7±3,0
$F(ab')_2$	+	+	10	168±41	19,0±2,0
$F(ab')_2$	+	—	10	485±52	20,7±3,4
LPS	+	—	10	585±76	19,0±3,5
$F(ab')_2$	+	+	30	165±35	12,1±2,9
$F(ab')_2$	+	—	30	129±21	14,8±3,6
LPS	+	—	30	166±35	12,0±2,4

достигала наибольших величин, было рассчитано распределение клеток по фазам клеточного цикла. Оказалось, что при стимуляции клеток LPS,  $F(ab')_2$  с IL-2 и IL-2 активированные В-клетки находятся преимущественно в G<sub>1</sub>-фазе, что может быть связано с большей длительностью этой фазы по сравнению с другими (быстрым прохождением клеткой S-, G<sub>2</sub>- и M-фаз) или с невозможностью перехода клеток из G<sub>1</sub>- в S-фазу клеточного цикла. Первая возможность маловероятна, так как низкое включение [<sup>3</sup>H]тимидина в аналогичных экспериментах свидетельствует о том, что лишь незначительная часть лимфоцитов прошла S-фазу, а также потому, что длительность фаз цикла обычно постоянна для клеток данного типа и составляет у активированных В-лимфоцитов по 8 ч для G<sub>1</sub>- и S-фаз и 4 ч для G<sub>2</sub>+M-фаз [17]. Большинство зрелых лимфоцитов обычно является нестимулируемыми клетками, находящимися в G<sub>0</sub> (или в G<sub>1q</sub>) фазе цикла. Активация пролиферации лимфоцитов приводит к прохождению ими клеточного цикла (G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>-, M-фазы) и к делению клетки. Однако для этого необходимо присутствие ряда факторов, без которых клетки останавливаются в так называемых рестрикционных точках цикла — на границе G<sub>0</sub>—G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>—S и в G<sub>2</sub>-фазе цикла [17]. По-видимому, в использованной нами системе обогащенных В-лимфоцитов мыши LPS и  $F(ab')_2$  с IL-2 способствовали переходу клеток лишь из G<sub>0</sub>- в G<sub>1</sub>-фазу. При этом только незначительная часть этих активированных клеток в дальнейшем завершала клеточный цикл из-за отсутствия  $\alpha$ -факторов или факторов прогрессии, секретируемых макрофагами (IL-1, C3b и C3d субкомпонентов комплемента) и необходимых для перехода из G<sub>1</sub>- в S-фазу.

Вышеописанный способ получения В-лимфоцитов использовали также для исследования уровней циклических нуклеотидов в этих клетках через 3, 10 и 30 мин после добавления LPS (50 мкг/мл) или  $F(ab')_2$ -фрагментов (45 мкг/мл). cAMP и cGMP определяли в клетках, находившихся в бессывороточной среде с Ca<sup>2+</sup> или с Ca<sup>2+</sup>+ЭГТА, радиоиммунологически с помощью моноспецифических антител. Эти данные приведены в табл. 4. Очевидно, что  $F(ab')_2$ -фрагменты анти- $\mu$  ан-

тител и LPS через 3 и 10 мин после добавления повышают в В-лимфоцитах уровень сGMP, практически не влияя на содержание сAMP в этих клетках. Увеличение содержания сGMP в клетках под действием  $F(ab')_2$ -фрагментов зависело от наличия в среде ионов Ca, хелатирование которых ЭГТА останавливало повышение сGMP. Уровень сGMP не увеличивался также при использовании вместо  $F(ab')_2$ -фрагментов одновалентных Fab-фрагментов или при добавлении ЭГТА к пробам, содержащим LPS и  $Ca^{2+}$  (числовые значения здесь не приведены).

Принимая во внимание известное иммуномодуляторное и комплексобразующее действие метиленбисфосфоновой кислоты (МБФК) [18], был поставлен эксперимент по исследованию влияния этого препарата на уровень сGMP в В-лимфоцитах через 10 мин после стимуляции этих клеток  $F(ab')_2$  (45 мкг/мл) и LPS (50 мкг/мл). МБФК вводили мышам подкожно в дозе 40 мг на 1 кг веса за 24 ч до выделения В-клеток. Оказалось, что введенная *in vivo* МБФК практически не влияла на последующее увеличение сGMP в В-лимфоцитах под действием LPS и  $F(ab')_2$ -фрагментов. Так, в выделенных В-клетках животных, которым за 24 ч до опыта инъекцировали МБФК, уровень сGMP до добавления LPS или  $F(ab')_2$  к культивируемым клеткам составлял  $136 \pm 21$  фмоль/мг белка, а после активации клеток в течение 10 мин фрагментами  $F(ab')_2$  анти- $\mu$  или LPS соответственно:  $470 \pm 21$  и  $480 \pm 22$  фмоль сGMP на 1 мг белка.

Результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что ранние этапы (первые минуты) активации В-лимфоцитов мышей под действием LPS или  $F(ab')_2$ -фрагментов антител против  $\mu$ -цепей иммуноглобулинов мыши сопровождаются повышением уровня сGMP в этих клетках. Эта активация зависит от наличия ионов Ca и происходит при кластеризации рецепторов поверхностной мембраны В-клеток (только двухвалентные  $F(ab')_2$ -фрагменты, но не Fab-фрагменты той же специфичности, могли активировать клетки). Условия такой активации коррелируют с условиями, приводящими к стимуляции пролиферации лимфоцитов. Тем не менее увеличение количества сGMP, которое, по-видимому, сопряжено с активацией сGMP-зависимой протениназы [19], не является достаточным условием для последующей активации пролиферации В-клеток. Под влиянием  $F(ab')_2$  и LPS стимулированные клетки останавливаются в  $G_1$ -фазе цикла. Для прохождения лимфоцитом всех фаз клеточного цикла необходимо последовательное действие нескольких факторов, действующих на общие или синергические метаболические пути.

Автор выражает глубокую благодарность докторам З. Дарзинкевичу и Л. Стояно-Койко за цитофлуориметрический анализ лимфоцитов (Слоан-Кеттеринг противораковый центр) и проф. К. П. Заку (Киев. НИИ эндокринологии и обмена веществ) за электронную микроскопию В-лимфоцитов мыши.

#### MOUSE B LYMPHOCYTE ACTIVATION OF PROLIFERATION AND CYCLIC NUCLEOTIDES AT EARLY STAGES OF ACTIVATION

S. V. Komissarenko

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Kiev

#### Summary

Splenocytes and isolated mouse spleen B lymphocytes were activated in culture by: antibodies to  $\mu$ -chains of mouse immunoglobulins, Fab and  $F(ab')_2$  fragments of such antibodies, LPS from *E. coli* and interleukin 2 (IL-2). Cell activation was monitored by [ $^3$ H]-incorporation and by flow cytofluorimetry. The latter permitted detecting cell-cycle phases distribution of cells stained by acridine orange. It was shown that anti- $\mu$  antibodies were cytotoxic to mouse splenocytes and B lymphocytes. Isolated B cell could not be

stimulated by *Fab* or  $F(ab')_2$  anti- $\mu$  fragments but were activated by LPS and by  $F(ab')_2 + IL-2$ , though  $F(ab')_2$  were stimulative to mouse splenocytes.

In most cases activated cells passed  $G_1$  phase and were arrested at the  $G_1$ -S boundary. LPS or  $F(ab')_2$  anti- $\mu$  addition to isolated B cells in culture caused a  $Ca^{2+}$ -dependent increase in cGMP but not cAMP levels in these cells. Methylene bisphosphonic acid being administered to mice 24 hours before B cells isolation did not change cAMP or cGMP levels in LPS or  $F(ab')_2$  activated B lymphocytes. These data show that during the first minutes of B cell activation by LPS or  $F(ab')_2$  anti- $\mu$  fragments there occurs a  $Ca^{2+}$ -dependent increase in the cGMP level which is not sufficient for these cells proliferation and progression through the whole cell-cycle. The cells are usually arrested in  $G_1$  phase.

1. Ashcroft F. M. Ion channels in lymphocytes // Immunol. Today.— 1984.—5, N 8 — P. 232—233.
2. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion // Nature.— 1984.—308, N 5961.— P. 693—698.
3. B lymphocyte receptors and polyphosphoinositide degradation / M. K. Bijsterbosch, Ch. J. Meade, G. A. Turner, G. G. B. Klaus // Cell.— 1985.—41, N 3.— P. 999—1006.
4. Membrane perturbation and stimulation of arachidonic acid metabolism / D. Gemsa, H.-G. Leser, M. Scitz et al. // Mol. Immunol.— 1982.—19, N 10 — P. 1287—1296.
5. Olashaw N., Pledger W. Mechanisms initiating cellular proliferation // Mediators in cell growth and differentiation / Eds R. Ford, A. Maizel.— New York: Raven press, 1985.— P. 31—44.
6. Cell-cycle control of *c-myc* but not *c-ras* expression is lost following chemical transformation / J. Campisi, H. E. Gray, A. B. Pardee et al. // Cell.— 1984.—36, N 2.— P. 241—247.
7. Содержание циклических нуклеотидов в разных фазах клеточного цикла плазматомных клеток и влияние экзогенных нуклеотидов на распределение клеток по клеточному циклу / Д. А. Лукинов, С. В. Комиссаренко, С. Н. Тихонова и др. // Докл. АН УССР.— 1986.— № 2.— С. 67—69.
8. Parker Ch. W. Control of lymphocyte function // New England J. Med.— 1976.—295.— P. 1180—1186.
9. Cyclic nucleotides and calcium in lymphocyte regulation and activation / J. W. Hadden, R. G. Coffey, R. Ananthkrishnan, E. M. Hadden // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1979.—332.— P. 241—254.
10. Nestler E. J., Greengard P. Protein phosphorylation in the brain // Nature.— 1983.—305, N 5935.— P. 583—588.
11. Ультраструктура различных популяций иммуноглобулиннесущих лимфоцитов, меченных ПАП-комплексом, и топография иммуноглобулинов на поверхности клеточной мембраны / К. П. Зак, С. В. Комиссаренко, З. А. Бутенко и др. // Молекуляр. биология.— 1982.— Вып. 33.— С. 11—15.
12. Coffey R. G. Assays for cyclic nucleotides including clinical applications // Immunopharmacology / Eds J. W. Hadden et al.— New York: Plenum press, 1977.— P. 389—412.
13. Комиссаренко С. В., Аврамеас С. Свойства иммуносорбентов, приготовленных связыванием антигенов с активированным глутаровым альдегидом полиакриламидным гелем, BrCN-активированной агарозой и сополимеризацией антигенов глутаровым альдегидом // Укр. биохим. журн.— 1978.—50, № 4.— С. 500—511.
14. Darzynkiewicz Z. Acridine orange as a molecular probe in studies of nucleic acids *in situ* // Flow cytometry and sorting / Eds M. R. Melamed et al.— New York: John Wiley and Sons, 1979.— P. 285—316.
15. Activation of mouse lymphocytes by anti-immunoglobulin. I. Parameters of the proliferative response / D. Sieckmann, R. Asofsky, D. Mosier et al. // J. Exp. Med.— 1978.—147, N 3.— P. 814—829.
16. Parker D. C. Stimulation of mouse lymphocytes by insoluble antimouse immunoglobulins // Nature.— 1975.—258, N 5533.— P. 361—363.
17. Melchers F., Andersson J. Factors controlling the B-cell cycle // Ann. Rev. Immunol.— 1986.—4.— P. 13—36.
18. Применение дифосфонатов в качестве иммуномодуляторов / С. В. Комиссаренко, Н. П. Карлова, И. Н. Колесникова и др. // Химия и биология иммунорегуляторов.— Рига: Зинатне, 1985.— С. 237—252.
19. Komissarenko S. V., Hadden J. W. Cyclic nucleotides and cNMP dependent protein kinases in lymphocyte activation // Abstr. Vth Int. Congr. Immunol.— Kyoto, 1983.— P. 25.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина  
АН УССР, Киев

Получено 19.03.87