

УДК 591.33

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

Л.К. Курбатов^{1}, И.Б. Чеглаков¹, К.Н. Ярыгин¹, Г.Т. Сухих², Г.В. Вартамян³,
И.Ю. Торопыгин¹, А.И. Арчаков¹*

¹Государственное учреждение Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва,
Погодинская ул., 10; тел.: (495) 246-84-65; факс (495) 246-37-71;
эл. почта: kurbatovl@mail.ru

²Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН

³Российский Научный центр хирургии РАМН

Проведён сравнительный анализ синтеза мРНК и белков печени 10,5-недельного плода и взрослого человека. Данные о дифференциальной экспрессии генов получены с использованием двухцветной конкурентной гибридизации флуоресцентно меченой кРНК на микрочипах фирмы Agilent, включающих гены полного генома человека. Протеиновые профили получали при помощи двумерного электрофореза клеточных экстрактов в диапазоне рI от 3 до 10. Белки изолировали из гелей и идентифицировали при помощи масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF). Список идентифицированных белков сравнивали со списком генов, преимущественно экспрессируемых в фетальной печени. Объект исследования – фетальная печень – является уникальным органом, поскольку объединяет в себе два типа ткани – собственно печёночную и гемопоэтическую и в течение эмбриогенеза меняет свою основную функциональную активность – с гемопоэтической на начальных стадиях развития на собственно функции метаболизма, детоксификации и секреции различных сывороточных белков.

Полученные данные показали, что транскриптомный анализ вполне адекватно отражает основную функцию печени на раннем этапе эмбриогенеза. Были идентифицированы гемоглобины как эмбрионального, так и взрослого типа. Результаты протеомного анализа по большей части подтверждены на уровне анализа мРНК, однако одновременно установлено, что часть высокоэкспрессируемых генов при помощи двумерного электрофореза не выявляется.

Ключевые слова: двумерный электрофорез, экспрессионный анализ, ДНК микрочипы, экспрессия генов, фетальная печень.

ВВЕДЕНИЕ. Завершение проекта “Геном человека” открыло принципиальную возможность исследования всего спектра экспрессии генов *Homo sapiens*. Возникло и развивается новое направление - постгеномика. Эта наука решает задачи исключительной сложности, так как экспрессия генов в каждой отдельной клетке определяется как ее морфо-функциональным типом (фибробласт, нейрон, мышечное волокно и др.), которых в организме человека не менее 220, так и её положением в той или иной тканевой нише. Кроме того, активность генов постоянно меняется в соответствии с фазами, характерными для любой живой системы ритмов (например, сезонных, суточных, связанных

* - адресат для переписки

с приёмом пищи), при стрессе, в условиях патологии и так далее. Поэтому, несмотря на большие затраты и серьезные достижения в развитии методов постгеномики, работа в данном направлении фактически только начинается. В связи с этим очень важно иметь четкое представление о возможностях и ограничениях каждого из используемых методов [1].

Комплексный подход в современных исследованиях предполагает сравнительный анализ данных, полученных при использовании различных методов. Наиболее логичным представляется сравнение экспрессии мРНК с протеомным профилем клеток. Исследования белков фетальной печени носили до недавнего времени отрывочный и явно недостаточный характер. Практически все работы такого рода выполнялись в основном на мышах и крысах. Из ранних примеров по человеку можно привести сравнительное исследование двумерных белковых профилей фетальной печени 19-недельных плодов с диагностированной трисомией по 21-й хромосоме [2]. Наиболее полные данные по протеомике печени 16-24-недельных плодов были получены путём предварительного фракционирования содержимого клетки с последующим анализом методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, двумерного электрофореза (2D-электрофорез) и масс-спектрометрии [3]. Для масштабного исследования экспрессии генов в фетальной печени наиболее распространен метод секвенирования библиотеки клонов синтезированной кДНК [4, 5], который является весьма трудоёмким и требует многократной повторности.

В настоящей работе сравнивали результаты исследования экспрессии генов клетками фетальной (10,5 недель гестации) печени и печени взрослого человека. Сопоставляли спектры синтезируемых белков, полученные методом 2D-электрофореза в сочетании с MALDI-TOF спектроскопией, со спектрами транскрибируемых мРНК, полученными с использованием микрочипов фирмы Agilent. В организме 10,5-недельного плода печень – это основное место гемопоэза, в то время как печень взрослого человека выполняет иные функции, такие как участие в пищеварении, процессинге всасываемых в кишечнике компонентов пищи, детоксификации ядов, инактивации лекарств и других биологически активных веществ. Естественно, клетки фетальной и взрослой печени имеют совершенно разный фенотип. Соответственно должны различаться и спектры экспрессии генов. В данной работе был сделан акцент на идентификации и функциональной кластеризации генов, преимущественно экспрессируемых в фетальной печени. Ожидалось, что профили экспрессии отразят главную, гемопоэтическую функцию органа в раннем внутриутробном развитии плода, быстрый рост фетальной ткани и ее перестройку в процессе морфогенеза.

Полученные результаты показывают, что спектры экспрессии мРНК адекватно отражают функциональную специфику и другие особенности ткани печени на разных этапах онтогенеза. С другой стороны, было установлено, что двумерный электрофорез в сочетании с масс-спектрометрией в варианте MALDI-TOF не способен выявить многие важные особенности активности генома в фетальной и постнатальной печени.

МЕТОДИКА.

Образцы ткани. Образцы печени взрослого человека были получены от доноров при проведении операции холецистэктомии. Перед забором материала пациенты, оперированные по поводу холецистэктомии, и женщины, идущие на аборт, знакомились с описанием целей исследования и подписывали документ о своём информированном согласии на взятие и использование материала. Возраст доноров составлял от 20 до 32 лет. Фетальная печень была изолирована после аборта из плодов возрастом 10,5 недель. Сразу после диссекции печени образцы помещали в стерильные криопробирки и немедленно замораживали в жидком азоте. В дальнейшем препараты хранили при температуре -80°C . Отсутствие грубых морфологических изменений документировали путём гистологического анализа ткани после окраски гематоксилином-эозином. Для оценки значимости

индивидуальных различий дополнительно был поставлен двумерный электрофорез белковых экстрактов всех образцов.

Экстракция белков и двумерный гель-электрофорез. После проведения гистологического анализа те же самые замороженные блоки ткани использовали для выделения белков. От 8 до 10 срезов толщиной 15 мкм помещали в 100 мкл лизирующего буфера (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% CHAPS (по массе), 1,5% NP40 (по массе), 5% амфолины 3-10 (по объёму) и 65 мМ DTT) и подвергали ультразвуковой обработке с использованием микрозонда Bandelin (2 раза по 20 секунд при 40% мощности). После инкубирования в течение 30 минут при комнатной температуре и 2 часа при температуре 4°C остатки ткани отделяли центрифугированием при 4°C (30 мин, 20 000 g). Полученные экстракты хранили при -20°C.

После размораживания в экстрактах определяли содержание белка по методу Bradford. Для получения аналитических и препаративных гелей использовали по 50 мкг или 100 мкг белка соответственно. Двумерный электрофорез каждой пробы проводили в трёхкратной повторности.

Изоэлектрофокусирование проводили в полиакриламидном геле с формирующимся во время электрофореза градиентом pI (использовали прибор фирмы BioRad Protean II xi Cell). При заливке гелей использовались фармалиты фирмы BioRad с pH 3-10. Для первого направления электрофореза нами были выбраны следующие параметры: градиент 100-200-300-400-500-600 В по 45 минут, 700 В – 10 часов и 900 В – 1- 1,5 часа.

По окончании изоэлектрофокусировки гели с разделёнными по pI белками извлекали из трубочек и инкубировали в течение 1 часа в уравнивающем буфере (60 мМ трис HCl pH 6,8, 2% SDS и 1% DTT по весу, 10% глицерина по весу).

Второе направление электрофореза осуществляли в акриламидном геле 20×20 см с градиентом Т 9-16. После переноса трубочек из уравнивающего буфера на поверхность полиакриламидного геля их заливали сверху 1% легкоплавкой агарозой. Электрофорез проводили в камере Protean II Multi-Cell в течение 5 часов при 10°C по следующей программе: 20 минут – 20 мА, 2 ч. – 40 мА, 2,5 ч. – 35 мА в расчете на один гель.

По окончании двумерного электрофореза гели фиксировали в течение ночи в растворе 10% уксусной кислоты и 20% изопропанола. Белки окрашивали нитратом серебра (1 г/л AgNO₃, 0,37% формальдегид) с предварительной обработкой тиосульфатом (Na₂S₂O₃ × 5 H₂O, 0,3 г/л).

Полученные гели сканировали на сканере Epson EU35. Для анализа цифровых изображений гелей использовали программу Melanie 3.0 (GeneBio, Швейцария).

Масс-спектрометрическая идентификация белков (MALDI-TOF). Фрагменты геля с интересующими белковыми пятнами вырезали из геля и помещали в силиконизированные пробирки объёмом 200 мкл. После отбора воды в пробирки добавляли 50 мкл ацетонитрила и инкубировали 20 минут при комнатной температуре, после чего удаляли ацетонитрил и высушивали гели в открытых пробирках при 58°C в течение часа. К высушенным кусочкам геля добавляли 10 мкл 0,1 мкг/мкл раствора трипсина (Promega) в 25 мМ бикарбонате аммония и инкубировали сначала 30 минут на льду, а затем 40 минут при 58°C или в течение ночи при 37°C. По окончании трипсинолиза пептиды экстрагировали в 20 мкл 0,1% (по объёму) водного раствора трифторуксусной кислоты в течение 30 минут. При небольшой интенсивности протеинового пятна экстракцию из геля проводили вторично и растворы объединяли. После высушивания экстрактов в вакуумном испарителе пептиды растворяли в 7 мкл 0,1% (по объёму) водного раствора трифторуксусной кислоты.

Анализ образцов проводили на времяпролётном масс-спектрометре Reflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия). Полученные спектры пептидных масс сравнивали с теоретически ожидаемыми спектрами базы данных NCBI при помощи программного обеспечения Mascot (Matrix Science, США).

Выделение и обработка РНК. Общую РНК выделяли из образцов печени массой около 20 мг при помощи набора Agilent Total RNA mini isolation kit. Качество и количество полученной РНК контролировали на приборе 2100 Bioanalyser (Agilent, США) с использованием чипов RNA 6000 Nano LabChip и стандартного программного обеспечения 2100 Expert. Учитывали такие показатели как концентрацию РНК (нг/мкл), соотношение 28S/18S рРНК и основной показатель качества РНК - RNA Integrity Number (RIN).

Синтез кДНК с последующим синтезом флуоресцентно меченой кРНК проводили с использованием набора Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit. В качестве метки использовали флуоресцентно меченые нуклеотиды 3-СТР или 5-СТР (PerkinElmer). После определения концентрации кРНК и оценки эффективности включения флуоресцентной метки образцы (по 750 нг) смешивали в одной пробирке и фрагментировали при помощи реактивов из набора Agilent *In situ* Hybridisation kit-plus. После остановки фрагментации 500 мкл смеси наносили на экспрессионные чипы G4112A фирмы Agilent (Human Whole Genome Oligo Microarray). Данные микрочипы содержат 44000 иммобилизованных на стекле 60-ти нуклеотидных зондов и предназначены для анализа экспрессии в объёме полного генома человека (аннотированных генов с известной и неизвестной функцией). Гибридизацию проводили в роторном инкубаторе фирмы Agilent при 65°C в течение 17 часов.

Промывка чипов проводилась в SSC – буфере с добавлением Тритона X102 согласно протоколу фирмы – производителя, после чего они сканировались на конфокальном лазерном сканере G2505B (Agilent) с разрешением 10 мкм.

Анализ полученных данных. Для поиска дифференциально экспрессируемых белков цифровые изображения двумерных гелей совмещали при помощи программы Melanie Viewer III. Учитывали как наличие/отсутствие пятна на геле, так и относительную площадь пятна. Достоверность идентификации белков по массам пептидов (MALDI-TOF анализ) определяли совпадением молекулярной массы и изоэлектрической точки и как минимум 30% соответствием аминокислотной последовательности.

Первичную обработку транскриптомных данных осуществляли с помощью программного обеспечения Feature Extraction 9.1 фирмы Agilent Technologies. Эта программа осуществляет экстракцию данных ДНК-чипа (идентификация генов на чипе), вычисление фонового сигнала, а также расчёт интенсивности флуоресценции по красному и зелёному каналу для каждой пробы (пятна). После определения фонового уровня сигнала из дальнейшего анализа исключали все гены, не экспрессируемые в образцах как взрослой, так и фетальной печени и оценивали степень различия сигнала одного гена в разных образцах.

Гены, уровень экспрессии которых различался более чем в два раза, были объединены в таблицы по принадлежности к фетальной или взрослой печени и ранжированы по степени различия сигнала. Функции белков и систематические названия уточняли с использованием баз данных свободного доступа UniProt (<http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml>), HPRD (Human Protein Reference Database - <http://www.hprd.org/>), а также базы NCBI Entrez Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Genome>). По этим данным производили первичную систематизацию групп белков по их биологической функции. Дополнительную кластеризацию белков по функциональным категориям осуществляли с использованием биоинформационного ресурса DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как для протеомного, так и транскриптомного анализа использовали материал трёх образцов фетальной печени и пяти образцов печени взрослого человека. На первом этапе проводили исследование индивидуальных протеиновых профилей от каждого пациента. Сравнительный статистический анализ 2D-гелей с помощью программы Melanie III

показал, что при относительной интенсивности белковых пятен 0,11 стандартное отклонение составляет не более 0,03. Эти данные позволили заключить, что индивидуальные различия не превышают стандартной ошибки метода.

Исходя из этих результатов, для дальнейшего анализа использовали объединённые экстракты белков или выделенной РНК. Такой подход довольно распространен в протеомике при строго лимитированном количестве материала для исследования и в транскриптомике вследствие высокой стоимости каждого анализа.

Результаты протеомного анализа. Сравнительный анализ двумерных белковых профилей нормальной печени взрослого человека и печени зародышей первого триместра развития показал достоверные различия в интенсивности 118 пятен. Интенсивность 34 белковых пятен была существенно выше в фетальной печени, 84 пятен - во взрослой печени (рис. 1).

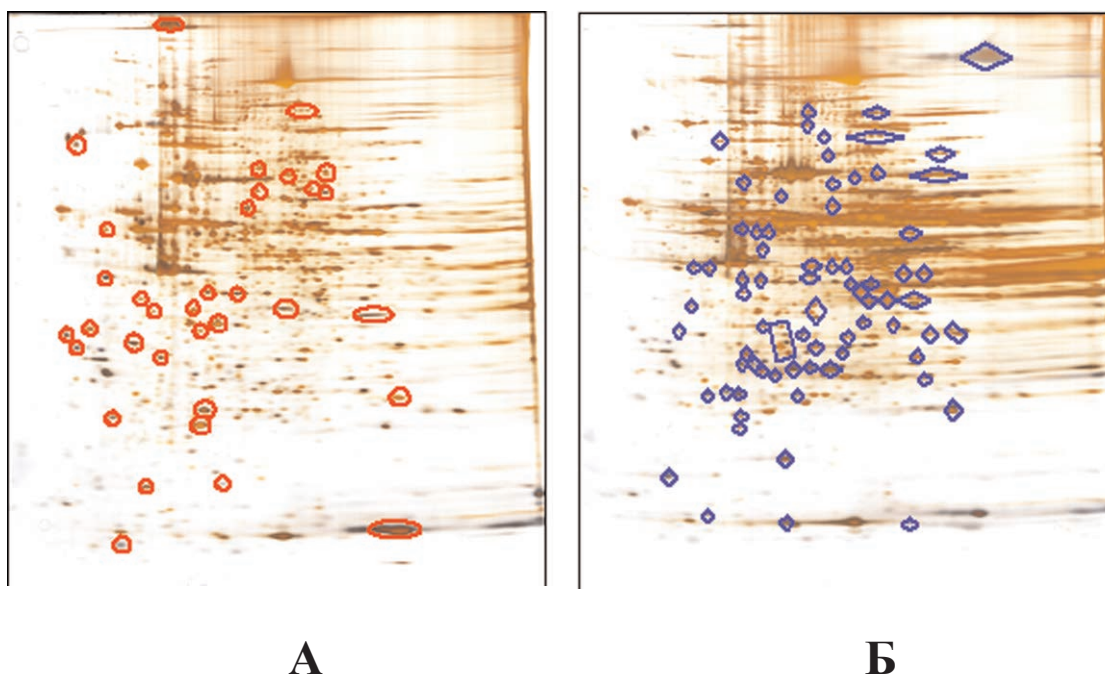


Рисунок 1.

А: 2D-профиль экстракта белков фетальной печени (10,5 недель); Б: 2D-профиль экстракта белков печени взрослого человека. Отмечены пятна, интенсивность которых существенно выше в фетальной (А) или взрослой (Б) печени.

При помощи масс-спектрометрического анализа удалось идентифицировать 31 белок, преимущественно экспрессируемый в фетальной печени (табл. 1). Систематизацию этих белков по биологической функции проводили при помощи базы данных HPRD. Все идентифицированные белки были изначально распределены в пять групп, однако после более тщательного анализа группа “общий метаболизм” была разделена на “энергетический метаболизм” (белки, участвующие в процессах синтеза высокоэнергетических соединений или осуществляющие высвобождение энергии из таких соединений) и “белковый метаболизм”. В последнюю группу вошли все белки, имеющие шаперонную активность.

ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

Таблица 1. Список идентифицированных белков, преимущественно экспрессируемых в фетальной печени по сравнению с печенью взрослого человека по результатам 2D-электрофореза. Жирным шрифтом отмечены белки, преимущественный синтез которых был в дальнейшем подтверждён транскриптомным анализом.

№ п/п	Название белка	Номер в базе данных NCBI	Символ* соотв. гена
1	аденозин-5'-фосфотрансфераза изоформа а	<u>32484973</u>	ADK
2	альдозоредуктаза	<u>493797</u>	AKR1B10
3	аннексин 5 (1HVG)	<u>999937</u>	ANXA5
4	биливердин-редуктаза	<u>32891807</u>	BLVRB
5	Электронпереносающий флавопротеин (1EFV_A)	<u>2781202</u>	ETFA
6	ADP-рибозилирующий фактор (1HUR_B)	<u>1065362</u>	ARF1
7	Белок DNAJB11	<u>48146309</u>	DNAJB11
8	енолаза 1	<u>4503571</u>	ENO1
9	Белок 5, связывающий жирные кислоты (и ассоциированный с псориазом)	<u>4557581</u>	FABP5
10	ферритин, лёгкая субъединица	<u>48145547</u>	FTL
11	Фумарилацетоацетат гидролаза	<u>4557587</u>	FAH
12	Галактокиназа 1	<u>4503895</u>	GALK1
13	Глиоксилаза 1	<u>15030212</u>	GLO1
14	глутатион-S-трансфераза	<u>2204207</u>	GSTP1
15	Белок 5 теплового шока 70 кДа	<u>16507237</u>	HSPA5
16	Белок 8 теплового шока 70кДа, изоформа 1	<u>16741727</u>	HSPA8
17	Предшественник изоформы Ia гомолога ES1 полосатого данио (zebrafish)	<u>12803133</u>	HES1
18	Лактат дегидрогеназа Б	<u>48734977</u>	LDHB
19	Белок MAWBP	<u>16307296</u>	PBLD
20	NM23-H1	<u>29468184</u>	NME1
21	Белок хлоридных каналов	<u>4588526</u>	CLIC1
22	Пурин нуклеозид фосфорилаза	<u>4557801</u>	NP
23	Пероксиредоксин 3, изоформа б	<u>32483377</u>	PRDX3
24	Хинолилат фосфорибозилтрансфераза	<u>17511917</u>	QPRT
25	Ядерный белок, родственник белку Ras	<u>48734884</u>	RAN
26	Тиоредоксин-пероксидаза Б, субъединица J	<u>9955016</u>	PRDX2
27	Триозофосфат-изомераза, субъединица Б (1HTI_B)	<u>999893</u>	TPII
28	Тиосульфат сульфотрансфераза	<u>14603391</u>	TST
29	Белок TRAP-1	<u>1082886</u>	TRAP1
30	Уропорфириноген-декарбоксилаза	<u>9845522</u>	UROD
31	Белок YWHAZ	<u>49119653</u>	YWHAZ

Примечание: *Символы генов приводятся по базе данных NCBI.

Анализ этих же данных при помощи биоинформационного ресурса DAVID позволил выделить ещё одну важную группу белков, участвующих в регуляции программируемой смерти клетки (апоптоз). В эту группу вошли следующие белки: NM23-H1, глиоксилаза I, белок 5 теплового шока 70 кДа, аннексин 5, тиоредоксин пероксидаза Б и глутатион-S-трансфераза. Все эти белки наряду с другими своими функциями осуществляют в клетке негативную регуляцию апоптоза. Таким образом, можно сделать заключение, что в печени 10,5-недельного эмбриона преобладают процессы, препятствующие апоптозу.

Как видно из рисунка 2, большую часть выявленных при помощи двумерного электрофореза и идентифицированных протеинов составляют белки, задействованные в “энергетическом метаболизме”. В эту группу вошли продукты следующих генов из таблицы 1: AKR1B10, ETFA, BLVRB, ENO1, FAN, GALK1, KNK, LDHB, NP, PRDX3, GPRT, TPI1, TST, и UROD. Транспортные белки представлены: белком 5, связывающим жирные кислоты, ферритином и белками хлоридных каналов. Два идентифицированных протеина - предшественник изоформы Ia гомолога ES1 полосатого данио (zebrafish) и белок MAWBP до настоящего времени в базах данных не охарактеризованы.

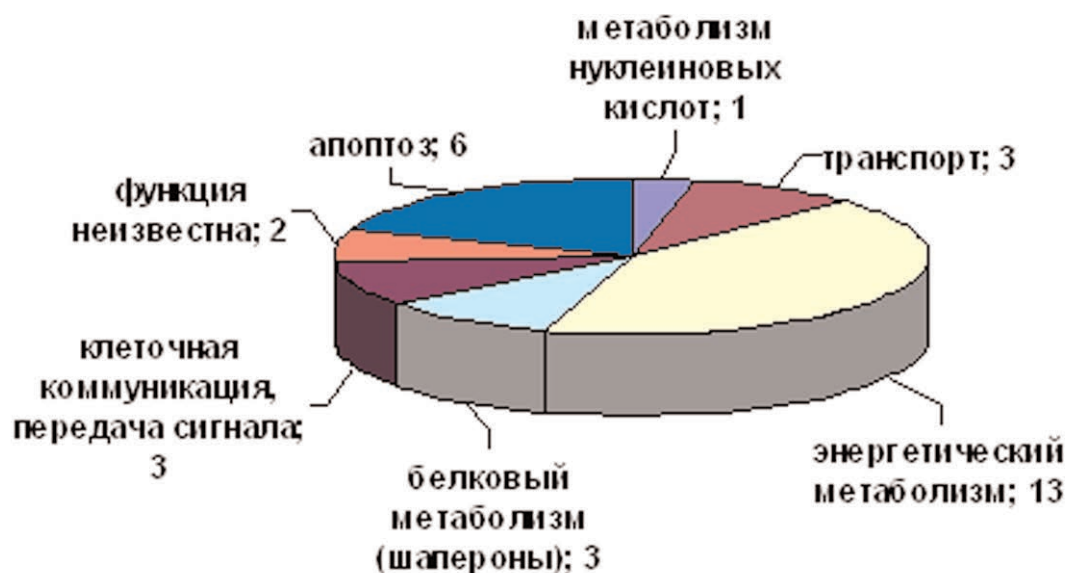


Рисунок 2.

Распределение по биологической функции преимущественно экспрессируемых белков фетальной печени, выявленных при помощи двумерного электрофореза и идентифицированных масс-спектрометрическим анализом. Цифрами отмечено количество белков, принадлежащих к данной группе.

Хотя в фетальной печени идут активные процессы деления клеток и, соответственно, синтеза новой ДНК, только один из идентифицированных белков - аденозин-5'-фосфотрансфераза (изоформа а) – был аннотирован в базе HPRD как участник метаболизма нуклеиновых кислот. Этот фермент катализирует перенос гамма-фосфата АТФ на аденозин, регулируя таким образом концентрацию как внеклеточного аденозина, так и внутриклеточного адениннуклеотида [6]. Другой белок - ядерный белок, родственник Ras белку – играет важную роль в контроле синтеза ДНК и клеточного деления [для обзора см. 7], однако в связи с многосторонней регуляторной функцией он был включён в группу “клеточная коммуникация и передача сигнала”. Также в эту функциональную группу вошли ADP-рибозилирующий фактор (1HUR_B) и белок YWHAZ.

ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

Большой интерес вызывают протеины с шаперонной активностью (“белковый метаболизм”) – DNAJB11, белок 8 теплового шока 70 кДа и TRAP1. К этой группе можно отнести и белок 5 теплового шока 70 кДа, однако последний обладает также и анти-апоптозной функцией. Присутствие высоких концентраций шаперонов в фетальной печени отражает усиленный биосинтез, что требует максимальной активности протеинов, обеспечивающих корректную сборку новых белков.

Результаты транскриптомного анализа. По результатам транскриптомного анализа все гены с разницей сигнала более чем в 2 раза (т.е. потенциально имеющее биологически значимое различие) были разделены на следующие группы: а) с повышенной экспрессией в фетальной печени и в) с повышенной экспрессией в печени взрослого человека по сравнению с фетальной. В первой группе оказалось порядка 1800 генов, а во второй – около 600.

На начальном этапе была проанализирована функция только белков, соответствующих генам из первого списка (фетальная печень) с разницей сигнала более чем в 10 раз. Из 72 генов этой группы гены HBG1 и ALAS2 были представлены на ДНК-чипе двумя различными зондами, а 9 генов с неизвестной функцией не имеют собственных названий.

Для определения основной биологической функции белков, соответствующих генам с повышенной экспрессией в фетальной печени, мы использовали базу данных HPRD. Как и при анализе данных, полученных при помощи 2D-электрофореза, в отдельные группы были выделены белки, участвующие в регуляции апоптоза и шапероны.

Систематизация генов по биологической функции их продуктов позволила разделить их на 9 групп. Как видно на рисунке 3, самую большую группу составили 15 генов, функция которых до сих пор не известна или не определена точно. Далее следуют гены, кодирующие белки с транспортной функцией (12), участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот (12) и задействованные в клеточной коммуникации (9). При более подробном рассмотрении выяснилось, что “транспортная” группа более чем наполовину состоит из гемоглобинов. Остальные белки с транспортной функцией представлены альфа-фетопротеином (AFP) и продуктами генов SLC2A1, TFRC, ABCB10 и X77737. Ровно половина второй группы (метаболизм нуклеиновых кислот) - это гены гистонов, обеспечивающих пространственную организацию хроматина и регуляцию активности генома. Повышенная экспрессия этих генов связана, очевидно, с активным синтезом ДНК в пролиферирующих клетках фетальной печени.

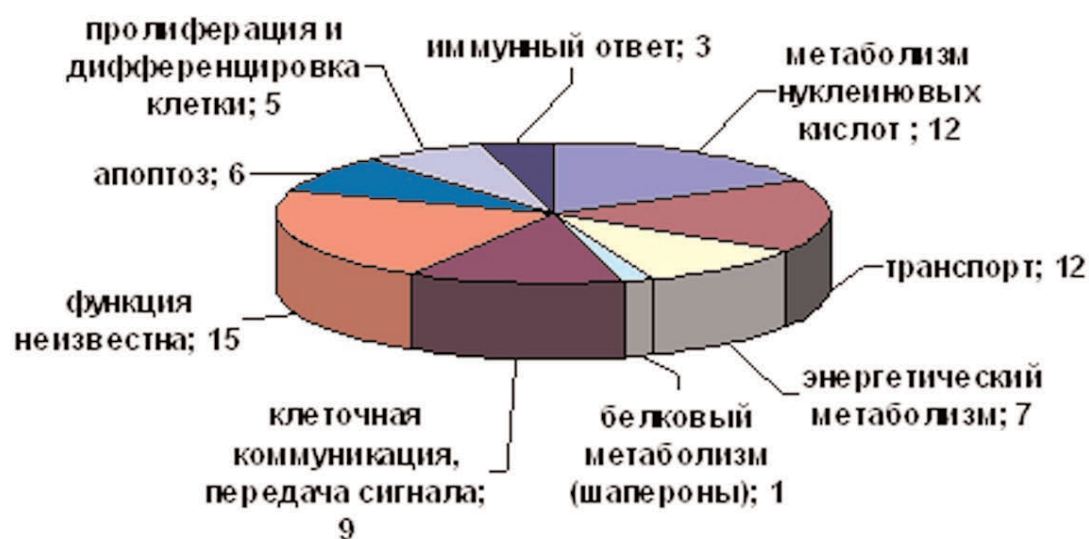


Рисунок 3.

Биологические функции белков с повышенной экспрессией в фетальной печени. Диаграмма выполнена по данным транскриптомного анализа для генов с разницей сигнала более чем в 10 раз. Цифрами отмечено количество белков, принадлежащих к данной группе.

Группа генов, продукты которых участвуют в регуляции апоптоза, была сформирована по результатам кластеризации при помощи биоинформационного ресурса DAVID. На первом этапе идентификационные номера генов из формата базы данных RefSeq mRNA (стандартно используется для экспрессионных чипов Agilent) были трансформированы в доступный для системы формат. Из общего списка в 72 олигонуклеотида 65 генов были идентифицированы и им были присвоены соответствующие ID системы DAVID. Следует отметить, что из группы “апоптоз”, в которую вошли продукты генов BCL2L12, BIRC5, SNCA, GSTP1, PIM1, PRDX2, только для BCL2L12 и PIM1 функция обозначена как “регуляция апоптоза”, остальные же имеют выраженную антиапоптозную активность.

По результатам программной обработки данных с помощью ресурса DAVID наиболее представительным оказался кластер генов, продукты которых играют основную роль в гемопоэзе и метаболизме гемоглобинов. В целом эта группа, состоящая из 14 генов, объединила в себе как гены самих глобинов (HBE1, HBM, HBD, HBA2, HBZ, HBG1 и HBB), так и гены структурных белков, участвующих в синтезе и созревании эритроцитов (ALAS2, XMOX1, BPGM, HMBS, HEMGN, ERAF и X77737). Таким образом, транскриптомный анализ адекватно отражает основную функцию печени 10,5-недельного эмбриона - гемопоэтическую. Среди нескольких форм глобиновых генов обращает на себя внимание повышенная экспрессия глобина β , который является глобином “взрослого” типа и максимально экспрессируется в гемопоэтических клетках красного костного мозга. В своей работе Choi и соавт. [4] изучали экспрессию гемоглобинов в печени 22-недельного эмбриона при помощи тотального секвенирования библиотеки кДНК клонов и также подтвердили экспрессию этого гена. Примечательно, что в более позднем исследовании экспрессионного профиля фетальной печени с использованием той же методики [5] этот гемоглобин не был обнаружен на том же этапе развития печени. По всей видимости, данное противоречие вызвано несовершенством примененных методик по сравнению с гибридизацией РНК на микрочипах.

В то же время в группе гемоглобинов нами были обнаружены гены HBE1 (глобин ϵ) и HBZ (глобин ζ), характерные только для эмбрионального периода развития. Синтез этих глобинов начинается ещё в желточном мешке, из которого гемопоэтические клетки мигрируют впоследствии в эмбриональную печень.

Сравнение результатов протеомного и транскриптомного анализов. Основной целью нашего исследования было сравнение результатов протеомного и транскриптомного анализа одного и того же объекта исследования для определения наиболее адекватной методики. Первое различие в протеомном и транскриптомном подходах заключалось в количестве дифференциально экспрессируемых генов в сравниваемых клетках. В то время как двумерный гель-электрофорез выявил больше белков во взрослой печени по сравнению с фетальной (84 пятна против 34), при транскриптомном анализе наблюдалась обратная картина – около 1800 генов имели повышенную более чем два раза экспрессию в фетальной печени и всего порядка 600 – в печени взрослого человека.

Поскольку избранный нами тип протеомного анализа – 2D-электрофорез – имеет принципиальное ограничение по количеству идентифицируемых элементов, мы сосредоточились в основном на качественных различиях в полученных протеомном и транскриптомном профилях.

Как видно из сравнения диаграмм на рисунках 2 и 3, транскриптомный и протеомный анализ по-разному отражают функциональный статус одних и тех же клеток. В то же время следует учитывать, что при транскриптомном анализе была систематизирована лишь небольшая часть генов с максимальной экспрессией. Это ограничение (были систематизированы только гены с разницей в экспрессии более чем 10 раз) было введено исходя из предположения, что протеомный анализ выявляет в основном высококопийные белки и, соответственно, экспрессия мРНК для этих белков должна быть самой высокой.

При сопоставлении белков из таблицы 1 с транскриптомными данными были получены следующие результаты. Для 16 из 31 идентифицированных белков, преимущественно выраженных в фетальной печени, экспрессия была полностью подтверждена на уровне мРНК, то есть разница с экспрессией во взрослой печени составила от 2,3 (NME1) до 13,8 (GSTP1) раз. Ещё для 4 белков: енолазы 1, пероксиредоксина 3, изоформа б, триозофосфат изомеразы и тиосульфат сульфотрансферазы было установлено превышение экспрессии в среднем в 1,5 раза. Для генов AKR1B10, ETFA, FAN, GALK1, GLO1, PBLD, QPRT, TRAP1 и YWHAZ не было отмечено достоверной разницы в экспрессии в фетальной и взрослой печени. Один протеин - предшественник изоформы Ia гомолога ES1 полосатого данио (zebrafish) не вошёл в анализ, поскольку на микрочипе фирмы Agilent отсутствует соответствующий зонд.

Существенным недостатком протеомного анализа при помощи 2D-электрофореза явился тот факт, что в фетальной печени не было обнаружено ни одной из многочисленных форм гемоглобина. Всего один белок, вовлечённый в гемопоз - уропорфириноген-декарбоксилаза - был идентифицирован с помощью двумерного электрофореза. Также не было идентифицировано ни одного гистонового белка, хотя транскриптомный анализ показал весьма высокий уровень экспрессии генов гистонов в клетках эмбриональной печени. В то же время следует отметить, что при помощи альтернативного протеомного метода – высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрической идентификацией (LC-MS) были обнаружены как альфа-глобиновая субъединица 1, так и три формы гистоновых белков H1, H2A, H2B (данные не представлены).

Из 6 белков – регуляторов апоптоза, выявленных 2D-электрофорезом, только экспрессия GLO1 (глиоксилаза 1) не была подтверждена транскриптомным анализом. Поскольку для данного гена был отмечен очень низкий уровень гибридизации РНК на микрочип как для взрослой, так и для фетальной печени, возможно, что иммобилизованный зонд не является оптимальным для соответствующего транскрипта. Необходимо отметить, что к высокоэкспрессируемым (и имеющим максимальное отличие от взрослой печени) генам из этой группы относились только гены GSTP1 и PRDX2. Гены NME1 и ANXA5 имеют средний уровень экспрессии в образцах как взрослой, так и фетальной печени, однако различие составляет 2,3 и 3,2 раза соответственно. HSPA5 довольно слабо синтезируется во взрослой печени, разница с фетальной составила 6,3 раза. Дополнительно к этим белкам транскриптомный анализ выявил высокую экспрессию ещё 4 генов, продукты которых имеют антиапоптотную активность - BCL2L12, BIRC5, SNCA, PIM1. Таким образом, на примере группы белков – регуляторов апоптоза, можно видеть, что прямой зависимости между уровнем экспрессии гена и возможностью выявить его при помощи 2D-электрофореза не существует.

По всей видимости, причина некоторых несоответствий в результатах протеомного и транскриптомного анализа заключается в принципиальном различии этих технологий. Транскриптомика представляет исследователю как бы “моментальный отпечаток” экспрессии генов в клетке, в то время как протеомика отражает набор белков в образце, включая депонированные белки, экспрессия которых в настоящий момент уже не происходит, а также белки межклеточного вещества, клеточных мембран и органелл. С другой стороны, некоторые белки могут подвергаться ферментативному разрушению или процессингу. В этом случае будет обнаруживаться экспрессия мРНК, но идентификация соответствующего продукта протеомным анализом будет невозможна.

Кроме того, сам формат двумерного электрофореза имеет физические ограничения, что приводит к потере части данных. Например, при схожих физических характеристиках (pI и MW) пятна разных белков маскируют друг

друга и не поддаются идентификации. Также часть данных может быть потеряна из-за присутствия мажорных белков, часто занимающих значительную площадь на геле и скрывающих другие пятна.

Следует отметить, что основная возможная причина несоответствий результатов протеомного и транскриптомного анализа – различная чувствительность методов – в данном случае не является критичной. В представленном исследовании была сделана попытка подтвердить результаты менее чувствительного метода (двумерный электрофорез) более чувствительным и, таким образом, выявленные различия должны иметь качественную природу.

Анализ экспрессии цитохромов семейства P450 в фетальной печени на основе транскриптомных данных. Выше было проанализировано изменение уровня синтеза мРНК у генов с наибольшей разницей в уровне синтеза. Однако, в отличие от протеомного анализа, транскриптомный позволяет выбрать любую группу белков и исследовать содержание соответствующей мРНК вне зависимости от уровня экспрессии. Поскольку печень является основным органом детоксификации организма, был проведён анализ экспрессии цитохромов семейства P450 для оценки функциональной активности фетальной печени.

Цитохромы P450 являются мембраносвязанными белками, протеомная идентификация которых сопряжена со значительными методическими трудностями: сложность экстракции, необходимость значительных количеств исходного материала [8, 9] и т.д. В связи с этим использование транскрипционного подхода представлялось более предпочтительным. При помощи экспрессионных микрочипов, используемых в нашей работе, была проанализирована экспрессия мРНК семидесяти пяти цитохромов семейства P450.

Результаты эксперимента представлены в таблице 2. Оказалось, что в фетальной печени человека в значительно большей степени экспрессируется мРНК цитохромов - CYP51A1 (в четыре раза), и двух других - CYP11A1 и CYP11B1 (почти в два раза). Цитохром CYP51A1 содержит семь структурно-функциональных мотивов и является родоначальником всех современных форм цитохромов [10]. Этот белок играет ключевую роль в синтезе холестерина [для обзора см. 11, 12] и снижение его активности является причиной ABS синдрома [13]. Поскольку мы зарегистрировали в фетальной печени повышенную секрецию наряду с CYP51A1 двух других цитохромов - CYP11A1 и CYP11B1, то можно высказать предположение, что на данной стадии развития в печени может происходить синтез стероидных гормонов. Вместе с тем не наблюдалась экспрессия мРНК других участников синтеза стероидных гормонов - CYP19A1 и CYP11B2. Важно отметить, что и в печени взрослого человека экспрессию этих цитохромов мы не обнаружили. Это согласуется с данными, по которым эти два цитохрома не экспрессируются в постнатальной печени [12], а отсутствие CYP11B2 означает, что кортикостерон не переходит в альдостерон. Таким образом, результаты однозначно свидетельствуют о повышенной экспрессии стероидных гормонов фетальной печенью, как это происходит в коре надпочечников, и совпадают с данными полученными другими методами [14].

Следующие результаты можно рассмотреть с точки зрения участия цитохромов P450 в метаболизме арахидоновой кислоты [15]. Для двух цитохромов, вовлечённых в этот метаболизм, - CYP2C8 и CYP2C19 - достоверно была показано полное отсутствие экспрессии мРНК в фетальной печени (при этом экспрессия в постнатальной ткани была высокой). Лишь незначительной была экспрессия для мРНК CYP2C9 и CYP1A2 (экспрессия в постнатальной печени была почти в 20 и в 3 раза больше, соответственно). В то же время количество мРНК цитохромов CYP2J2 и CYP4A11 в фетальной печени находилось на достаточно высоком уровне. Таким образом, фетальная печень на данном этапе развития еще не готова метаболизировать арахидоновую кислоту, и пока экспрессируется лишь одна треть цитохромов, необходимых для этого.

ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

Таблица 2. Экспрессия мРНК цитохромов семейства P450 в фетальной и постнатальной печени человека.

Цитохромы с повышенной экспрессией мРНК в фетальной печени
CYP11A1 CYP11B1 CYP51A1
Цитохромы с повышенной экспрессией мРНК в постнатальной печени
CYP1A2 CYP2A6 CYP2A7 CYP2A13 CYP2B6 CYP2C9 CYP2C18 CYP2E1 CYP2J2
CYP3A4 CYP3A5 CYP4F3 CYP4F11 CYP4F12 CYP4V2 CYP8B1 CYP27A1
Цитохромы с примерно одинаковой экспрессией как в фетальной, так и постнатальной печени
CYP1B1 CYP2D6 CYP2F1 CYP2S1 CYP2U1 CYP2W1 CYP3A5 CYP3A7 CYP3A43
CYP4A11 CYP4F2 CYP4F8 CYP4X1 CYP4Z1 CYP7A1 CYP7B1 CYP17A1 CYP21A2
CYP24A1 CYP26A1 CYP26B1 CYP27B1
Цитохромы, отсутствующие в фетальной печени
CYP2C8 CYP2C19
Цитохромы с низким уровнем экспрессии как в фетальной, так и в печени взрослого человека
CYP1A1 CYP2U1 CYP2R1 CYP4B1 CYP4F2 CYP4V2 CYP4X1 CYP4ZZP CYP11B1
CYP11B2 CYP19A1 CYP20A1 CYP24A1 CYP26B1 CYP39A1 CYP46A1

Одной из важнейших функций печени является метаболизм ксенобиотиков. Во взрослой печени это делают следующие цитохромы семейства P450: CYP1A2, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7. Результаты же анализа фетальной печени показали, что мРНК только пяти из этих белков – CYP2D6, CYP2F1, CYP3A4, CYP3A5 и CYP3A7 экспрессируется на том же уровне, что и в постнатальной

ткани. Совершенно отсутствует мРНК цитохромов CYP2C8 и CYP2C19, очень незначительна экспрессия CYP1A2, CYP2A6 и CYP2C9, а мРНК цитохромов CYP2A13, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C18, CYP2E1 экспрессируется значительно выше базального уровня, но в несколько раз меньше в сравнении с уровнем экспрессии в постнатальном органе. Таким образом, фетальная печень 10,5-недельного эмбриона еще очень слабо может защищать организм от вредных воздействий окружающей среды, что согласуется с литературными данными [16, 17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Проведён сравнительный анализ двумерных белковых профилей фетальной (10,5 недель) печени и печени взрослого человека. Те же самые образцы были использованы и для выделения РНК с последующим введением метки и гибридизации на микрочипы. Таким образом, были получены профили экспрессии мРНК, которые сравнивали с идентифицированными протеинами, преимущественно представленными на 2D-профилях фетальной печени. Из результатов проведённого исследования можно сделать следующие выводы:

1. Результаты протеомного анализа по большей части подтверждаются на уровне экспрессии мРНК - 16 белков из 31 идентифицированного в печени плода. В то же время продукты многих высокоэкспрессируемых генов при помощи двумерного электрофореза не выявляются.

2. Транскриптомный анализ наиболее адекватно отображает основную функцию фетальной печени первого триместра развития – гемопоэтическую. При помощи экспрессионного чипа было выявлено 14 генов, продукты которых участвуют в гемопоэзе и созревании эритроцитов.

3. В 10,5-недельной фетальной печени экспрессируется далеко не весь комплекс цитохромов семейства P450, присутствующий в печени взрослого человека. Таким образом, функция метаболизма ксенобиотиков на раннем этапе эмбрионального развития (10,5 недель) выражена в печени довольно слабо.

4. Поскольку транскриптомный и протеомный анализ выявляют разные спектры различий, необходимо учитывать этот факт при разработке тестовых систем.

5. На примере нескольких групп белков нами не было выявлено прямой зависимости между интенсивностью экспрессии и возможностью обнаружить конкретный белок при помощи двумерного электрофореза. На белковых профилях присутствовали как продукты высокоэкспрессируемых генов, так и генов с низким уровнем синтеза.

Данная работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы “Протеомика в медицине и биологии” и Регионального общественного Фонда содействия отечественной медицине

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2007) *Proteomics*, **7**, 4-9.
2. Reichert G.H. (1986) *Human Genetics*, **73**, 250-253.
3. Ying W., Jiang Y., Guo L., Hao Y., Zhang Y., Wu S., Zhong F., Wang J., Shi R., Li D., Wan P., Li X., Wei H., Li J., Wang Z., Xue X., Cai Y., Zhu Y., Qian X., He F. (2006) *Molecular & Cellular Proteomics*, **5**, 1703-1707.
4. Choi S.S., Yun J.W., Choi E.K., Cho Y.G., Sung Y.C., and Shin H.-S. (1995) *Mamm. Genome*, **6**, 653-657.
5. Yu Y., Zhang C., Zhou G., Wu S., Qu X., Wei H., Xing G., Dong C., Zhai Y., Wan J., Ouyang S., Li L., Zhang S., Zhou K., Zhang Y., Wu C., He F. (2001) *Genome Res.*, **11**, 1392-1403.
6. Fox I.H., Kelley W.N. (1978) *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 655-686.
7. Li H-Y., Zheng Y. (2004) *Genes & Dev.*, **18**, 512-527.
8. Nelson D.R., Zeldin D.C., Hoffman S.M., Maltais L.J., Wain H.M., Nebert D.W. (2004) *Pharmacogenetics*, **14**(1), 1-18.

ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

9. *Petushkova N.A., Kanaeva I.P., Lisitsa A.V., Sheremetyeva G.F., Zgoda V.G., Samenkova N.F., Karuzina I.I., Archakov A.I.* (2006) *Toxicol. in Vitro*, **20**(6), 966-974.
10. *Лисица А.В., Гусев С.А., Мирошниченко Ю.В., Кузнецова Г.П., Лазарев В.Н., Скворцов В.С., Карузина И.И., Говорун В.М., Арчаков А.И.* (2004) *Биомед. химия*, **50**, 554-565.
11. *Pikuleva I.A.* (2006) *Pharmacology & Therapeutics*, **112**, 761-773.
12. *Seliskar M., Rozman D.* (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 458-466.
13. *Fukami M., Horikawa R., Nagai T., Tanaka T., Naiki Y., Sato N., Okuyama T., Nakai H., Soneda S., Tachibana K., Matsuo N., Sato S., Homma K., Nishimura G., Hasegawa T., Ogata T.* (2005) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**(1), 414-426.
14. *Pezzi V., Mathis J.M., Rainey W.E., Carr B.R.* (2003) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **87**(2-3), 181-189.
15. *Capdevila J., Chacos N., Werringloer J., Prough R.A., Estabrook R.W.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (9), 5362-5366.
16. *McCarver D.G., Hines R.N.* (2001) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 361-366.
17. *Hines R.N., McCarver D.G.* (2001) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 355-360.

Поступила: 20. 11. 2007.

COMPARATIVE TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC ANALYSIS OF FETAL AND ADULT HUMAN LIVER

*L.K. Kurbatov¹, I.B. Cheglakov¹, K.N. Yarygin¹, G.T. Sukhikh², G.V. Vartanian³,
I.Y. Toropygin¹, A.I. Archakov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: +7 495 246-84-65; fax: +7 495 246-37-71; e-mail: kurbatovl@mail.ru

²Research Centre for Obstetrics, Gynaecology and Perinatology Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

³Russian Scientific Surgery Centre of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

The transcriptome and proteome comparative analysis of the fetal liver (9.5–10.5 weeks of gestation) and normal adult liver was developed in the present investigation. We used 44k microarrays of Agilent company and 2D-GE MALDI-TOF in transcriptome and proteome approaches, respectively. The top lists of expression genes and proteins for fetal liver obtained by these methods were compared. Transcriptome analysis confirmed proteome data only partially, but these two semi-quantitative approaches established the interdependences between expression levels of genes and proteins. The discrepancies between data obtained by two approaches were discussed.

The unique feature of the fetal liver cell content is the combination of hemopoietic and nonmaturated liver cells. Fetal liver changes its hemopoietic role during embryogenesis towards the detoxicative tissue being able to metabolize different substances and produce wide serum of proteins. The status of fetal liver as the hemopoietic tissue was entirely characterized by transcriptome analysis having registered embryonic and adult hemoglobins, insufficient cytochrome-dependent detoxification system and highly developed anti-apoptotic potential.

Key words: two-dimensional electrophoresis, expression analysis, DNA microarrays, gene expression, fetal liver.