

©Коллектив авторов

ПЦР-АНАЛИЗ АБСОЛЮТНОГО ЧИСЛА КОПИЙ ТРАНСКРИПТОВ ХРОСОМОСЫ 18 ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ И ЛИНИИ HepG2

Я.Ю. Киселёва, К.Г. Птицын, О.В. Тихонова, С.П. Радько, Л.К. Курбатов, И.В. Вахрушев,
В.Г. Згода, Е.А. Пономаренко, А.В. Лисица, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; эл. почта: radkos@yandex.ru

Используя обратную транскрипцию совместно с количественной ПЦР в реальном времени или цифровой капельной ПЦР, проведено профилирование транскриптома хромосомы 18 человека в гепатоцитах печени и клетках гепатобластомы (клеточная линия HepG2) в терминах абсолютного числа копий каждого транскрипта на клетку. Количественная представленность транскриптов варьирует в пределах от 0,006 до 9635 и от 0,011 до 4819 копий на клетку для клеточной линии HepG2 и гепатоцитов печени, соответственно. Обнаружена значительная корреляция между экспрессией генов хромосомы 18 в гепатоцитах и клетках HepG2: коэффициент корреляции Спирмана составил 0,81. Распределение частоты транскриптов по их количественной представленности является бимодальным для клеток линии HepG2 и унимодальным для гепатоцитов печени. Биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии генов выявил, что гены хромосомы 18, показывающие повышенную экспрессию в клетках HepG2 по сравнению с гепатоцитами, ассоциированы с процессами клеточного деления и клеточной адгезии. Предполагается, что усиленная экспрессия этих генов связана с пролиферативной активностью культивируемых клеток HepG2. Различия транскриптомных профилей должны учитываться при использовании клеток линии HepG2 в качестве модели гепатоцитов печени.

Ключевые слова: транскриптом, количественная ПЦР, хромосома 18, гепатоциты, HepG2

DOI 10.18097/PBMC20176302147

ВВЕДЕНИЕ

Метод ПЦР в реальном времени в соединении с методом обратной транскрипции (reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) является “золотым стандартом” количественной оценки экспрессии генов благодаря высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости [1, 2]. Одной из сильных сторон метода RT-qPCR является его способность определять абсолютное число копий транскрипта при условии построения калибровочной прямой (standard curve) с использованием ДНК- или РНК-стандартов [3]. Замена ПЦР в реальном времени (ПЦРrv) на цифровую капельную ПЦР (цкПЦР) позволяет упростить процедуру определения абсолютного числа копий транскрипта, так как в этом случае не требуется построения калибровочной прямой [4]. Несмотря на очевидные достоинства, применение метода RT-qPCR для количественного профилирования полного транскриптома клетки (transcriptome-wide profiling) затруднено в силу невысокой производительности метода. Хотя в последнее десятилетие появились автоматизированные технологические платформы, использующие принципы микро- и наногидродинамики и позволяющие проводить одновременно десятки и сотни ПЦР-анализов [5, 6], процедура подбора и верификации многих тысяч пар праймеров и зондов остаётся крайне трудоёмкой задачей. Тем не менее, по аналогии с подходом, использованным для количественного анализа протеома человека масс-спектрометрическими методами и получившим название “хромосома-центричного” [7, 8], эта задача представляется решаемой при условии

анализа методом RT-qPCR ограниченной части транскриптома клетки.

В данной работе на примере одной хромосомы показана возможность определения методом RT-qPCR абсолютного числа копий транскриптов, приходящихся в среднем на одну клетку, для заданной части транскриптома клетки, представляющей продукты транскрипции 276 генов хромосомы 18 человека. Абсолютное количество транскриптов было измерено в гепатоцитах печени и культивируемых клетках линии HepG2 (гепатобластома человека [9]). Знание среднего числа копий транскрипта на единичную клетку важно с точки зрения поиска так называемых “missing proteins” – белков, которые до настоящего времени не удавалось обнаружить при анализе протеома [10]. Кроме того, линия HepG2 широко используется в качестве модели для исследования метаболизма лекарств гепатоцитами печени, гепатотоксичности различных химических соединений и для изучения внутриклеточных процессов, связанных с метаболизмом гепатоцитов [11–13]. Сравнительный количественный анализ экспрессии генов в клетках печени и линии HepG2 на примере хромосомы 18 человека показал, что их транскриптомные профили существенно различаются, что необходимо учитывать при использовании клеток линии HepG2 в качестве модели гепатоцитов печени.

МЕТОДИКА

Выделение РНК и синтез кДНК

Четыре образца печени человека от разных доноров, полученные из LLC Biobank (<http://www.ilsbio.com>)

* - адресат для переписки

в замороженном состоянии (-70°C), были помещены в раствор RNAlater RNA Stabilization Reagent ("Qiagen", США; кат. № 76104). Суммарную РНК выделяли из каждого образца печени и из 10^7 клеток линии HepG2 (ATCC HB-8065) с помощью набора RNeasy Mini Kit ("Qiagen", кат. № 74104) согласно инструкции производителя. Суммарную РНК, полученную из образцов печени, объединили. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 ("Thermo Fisher Scientific", США) в соответствии с инструкцией производителя, используя среднеарифметическое значение концентрации, полученное в результате не менее пяти измерений. Спектрофотометр NanoDrop 1000 регулярно тестировали с использованием растворов ДНК-олигонуклеотидов известной оптической плотности. Качество РНК оценивали на биоанализаторе Agilent Bioanalyser 2100 ("Agilent Technologies", США), используя набор "Agilent RNA 6000 Nano Kit" ("Agilent Technologies"; кат. № 5067-1511). Значение RIN (RNA integrity number), составлявшее 9,0 и 9,5 для препаратов суммарной РНК печени и клеток HepG2 соответственно, указывает на отсутствие значимой деградации РНК. Аликвоты препаратов РНК хранили при -80°C до использования.

Препараты суммарной РНК печени и клеток HepG2 подвергали обработке ДНКазой I, используя набор AMPD-1 Kit ("Sigma-Aldrich", США; кат. № AMPD1). К препаратам РНК добавляли известное количество контрольной РНК люциферазы ("Promega", Франция; кат. № L4561) из расчёта 1000 копий на 1 нг суммарной РНК печени или клеток HepG2. Синтез кДНК проводили с помощью набора Agilent Fluorescent Direct Label Kit ("Agilent Technologies", кат. № G2557A), согласно инструкции производителя, за исключением того, что флуоресцентно-меченные dCTP были заменены на немеченные. По завершению синтеза 1 мкл препаратов содержал кДНК, полученную из 200 нг суммарной РНК. Все разведения препаратов РНК и ДНК проводили DEPC-обработанной водой. Препараты кДНК хранили при -20°C до использования.

Подбор и проверка специфичности праймеров

Подбор праймеров проводили с помощью программы Oligo 7 ("Molecular Biology Insights", США), проверяя их специфичность с помощью интернет-ресурса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Праймеры синтезировали в компании "Евроген" (Россия). Специфичность каждой пары синтезированных праймеров тестировали экспериментально, для чего проводили ПЦР_{Рв} с последующим электрофоретическим анализом ПЦР-продукта. ПЦР (40 циклов, перед которыми проводили активацию фермента – 95°C , 6 мин) выполняли с использованием ПЦР-смеси qPCRmix-HS SYBR+ROX ("Евроген"; кат. № PK155L) на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System ("Bio-Rad", США). Концентрация каждого праймера составляла 400 нМ. Температуру отжига (продолжительность – 1 мин) задавали в соответствии с рекомендацией программы Oligo 7 для каждой пары праймеров, денатурацию и элонгацию

проводили соответственно при 95°C (45 с) и 72°C (45 с). Длину продуктов амплификации оценивали, используя аналитический гель-электрофорез. Электрофорез проводили в TBE буфере (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ EDTA) в 8% ПААГ (Т=8%, С=5%). Гель окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green I ("Thermo Fisher Scientific"; кат. № S7563) и визуализировали с использованием системы документирования гелей GelDoc XR ("Bio-Rad"). Для оценки размера продуктов амплификации использовали ДНК-маркеры (GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder, "Thermo Fisher Scientific"; кат. № SM1213). При несовпадении размера ампликона с его ожидаемым размером или при наличии дополнительных полос данная пара праймеров отвергалась и проводился подбор новой пары праймеров.

Приготовление стандартов ДНК

Для построения калибровочной прямой с целью определения абсолютного числа каждого транскрипта использовали фрагменты ДНК с последовательностью, идентичной амплифицируемому участку кДНК. Фрагменты ДНК синтезировали с помощью препаративной ПЦР, при этом матрицей служили ампликоны, полученные в ходе тестирования специфичности праймеров. Препаративную ПЦР проводили на амплификаторе Tetrad 2 thermocycler ("Bio-Rad"). Суммарный объем ПЦР-смеси составлял 1-1,5 мл. Продукты препаративной ПЦР концентрировали до объема 100-200 мкл, используя центрифужные концентраторы Vivaspin 2 ("Sartorius Stedium Biotech", Германия; кат. № VS0201), а затем очищали с помощью набора AxyPrep PCR Clean-up Kit ("Axygen Biosciences", США; кат. № AP-PCR-250) и осаждали этанолом в присутствии гликогена ("Thermo Fisher Scientific"; кат. № R0561). Очищенные фрагменты ДНК растворяли в DEPC-обработанной воде и использовали как ДНК-стандарт. Качество ДНК-стандартов определяли электрофоретическим методом, как описано выше. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 в соответствии с инструкцией производителя.

Количественная ПЦР в реальном времени и цифровая капельная ПЦР

Для измерения абсолютного числа копий заданной последовательности кДНК методом ПЦР_{Рв} получали калибровочную прямую, для чего использовали серию из пяти десятикратных разведений соответствующего ДНК-стандарта. ПЦР проводили в дубликатах как описано в разделе "Подбор и проверка специфичности праймеров". Результаты анализировали с помощью программы CFX Manager software ("Bio-Rad"). Программа, используя встроенный алгоритм, определяет значения порогового цикла для всех кривых амплификации, строит калибровочную прямую по данным амплификационных кривых ДНК-стандартов (зависимость значения порогового цикла от логарифма концентрации ДНК-стандарта в ПЦР-пробе). Программа также вычисляет эффективность реакции,

коэффициент корреляции (r) калибровочной прямой и количество искомой последовательности кДНК в реакционной смеси, что позволяет рассчитать количество копий данной последовательности в 1 мкл препарата кДНК. Результаты анализа образца принимались, если эффективность ПЦР составляла 90–110%, а r был не менее 0,98.

Праймеры и TaqMan-зонды для проведения цкПЦР подбирали с помощью программы Oligo 7. Праймеры и зонды синтезированы в компании “Евроген”. ПЦР проводили в дубликатах с использованием ПЦР-смеси ddPCR Supermix for Probes (“Bio-Rad”, кат. № 1863010) на амплификаторе CFX96 (“Bio-Rad”). ПЦР-пробы предварительно смешивали с минеральным маслом (“Bio-Rad”, кат. № 1863005) с помощью генератора микродисперсных капель QX100 Droplet Generator (“Bio-Rad”). Концентрации каждого праймера и TaqMan-зонда в пробе составляли соответственно 450 и 250 нМ. Все пробы анализировали с использованием следующих параметров: активация фермента – 10 мин при 95°C, затем 40 циклов, включающих 30 с при 94°C (денатурация) и 1 мин при 60°C (отжиг/элонгация). Амплификацию завершали инкубацией пробы в течение 10 мин при 94°C. ПЦР-пробы после амплификации анализировали с помощью автоматизированного устройства QX100 Droplet Reader (“Bio-Rad”), измеряющего количество копий кДНК в 1 мкл ПЦР-пробы, что позволяет рассчитать количество копий искомой последовательности кДНК в 1 мкл препарата кДНК. Все операции проводились в строгом соответствии с инструкциями производителя оборудования.

Оценка эффективности обратной транскрипции

Для оценки эффективности реакции обратной транскрипции использовали РНК люциферазы (Luciferase Control RNA). К препаратам суммарной РНК добавляли известное количество копий РНК люциферазы, как описано в разделе “Подбор и проверка специфичности праймеров”. Количество синтезированной кДНК люциферазы оценивали с помощью цкПЦР, используя праймеры Luc-F (TACTTCGTCCACAACACAACCTCC), Luc-R (TTGTTACAACACCCCAACATCTTCG) и флуоресцентно-меченный зонд Luc-P (CCGTCATCGTCTTTCCGTGCTCCA), подобранные с использованием программы Oligo 7. Сравнение известного количества добавленной РНК люциферазы и измеренного количества соответствующей ей кДНК показало, что эффективность обратной транскрипции составляет $(5,5 \pm 0,4)\%$ ($n=9$) для клеточной линии HepG2 и $(4,3 \pm 0,3)\%$ ($n=7$) для ткани печени.

Биоинформатический анализ

Классификацию транскриптов в терминах категорий онтологии генов (Gene Ontology (GO)) проводили при помощи модуля “Функциональная классификация” (Functional Classification) платформы GeneXplain (<http://genexplain-platform.com>), используя установки по умолчанию для вида организмов “Homo Sapiens”. Алгоритм функционального

анализа предназначен для выявления статистически значимой представленности определённых функциональных групп генов среди всех генов в исследуемых выборках. Статистическую значимость оценивали при помощи вероятности $P_{adjusted}$, рассчитанной с использованием гипергеометрического распределения. При функциональном анализе принимали во внимание только статистически достоверную классификацию генов по GO в категории “Биологический процесс”: порог отсека по вероятности случайного отнесения гена к определённой группе составлял $P_{adjusted} < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка абсолютного количества копий транскрипта на клетку

В большинстве случаев метод RT-qPCR используется для количественной оценки относительного содержания того или иного транскрипта в образце, что требует выбора нормировочных генов (как правило, это так называемые housekeeping genes – “гены домашнего хозяйства”), экспрессия которых не должна варьировать при изменении экспериментальных условий и/или между различными типами клеток (тканей) [14]. Подбор таких генов представляет непростую задачу, успешное решение которой в ряде случаев затруднено [15]. Использование ДНК-стандартов позволяет отказаться от подбора нормировочных генов. Более того, это позволяет рассчитать абсолютное число копий транскрипта в единичной клетке при условии, что известно (1) количество суммарной РНК, приходящейся в среднем на клетку, и (2) эффективность реакции обратной транскрипции. Эффективность обратной транскрипции может варьировать в широких пределах – от 40-50% до нескольких процентов, в зависимости от условий реакции [16]. В рамках данного исследования абсолютное количество копий заданной последовательности кДНК в 1 мкл препарата кДНК было измерено экспериментально. Основываясь на значениях эффективности реакции обратной транскрипции (раздел “МЕТОДИКА”), было рассчитано количество копий соответствующего транскрипта в препаратах суммарной РНК. Это количество было нормировано на 1 нг суммарной РНК, исходя из того, что 1 мкл препаратов содержал кДНК, полученную из 200 нг суммарной РНК. Число копий транскрипта на клетку рассчитывали, основываясь на количестве копий транскрипта в 1 нг суммарной РНК и количестве суммарной РНК на клетку, которое для клеток HepG2 и гепатоцитов печени равно 40 пг [17].

Всего было определено абсолютное количество транскриптов 276 генов хромосомы 18 человека (UniProt, версия 2014_05). Из них число копий 227 транскриптов измеряли с использованием количественной ПЦР в реальном времени. Оценку количества 49 транскриптов, для которых возникли сложности при подборе специфичной пары праймеров или наработке стандартов, проводили с помощью цкПЦР

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПЦР-АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОВ ХРОМОСОМЫ 18 ЧЕЛОВЕКА

с использованием TaqMan-зондов, что позволило добиться требуемой специфичности и избежать необходимости получения ДНК-стандартов.

Соотношение между количеством транскриптов генов хромосомы 18 человека в клетках HepG2 и гепатоцитах печени

В результате проведенного ПЦР-анализа было определено число копий транскриптов для 250 генов хромосомы 18 в случае клеток HepG2 и для 260 – в случае гепатоцитов печени. Как видно из таблицы, количество транскриптов, не обнаруженных в HepG2 и гепатоцитах печени человека, составило 14, не обнаруженных только в HepG2 – 12, не обнаруженных только в гепатоцитах печени – 2. При этом мы не можем однозначно утверждать,

что данные транскрипты полностью отсутствуют в клетках HepG2 или гепатоцитах, так как их количество может быть ниже предела чувствительности использованного метода детекции. В связи с этим транскрипты, указанные в таблице (суммарно 28), были исключены из анализа при исследовании корреляции между числом копий транскриптов хромосомы 18 человека в гепатоцитах печени и клетках HepG2.

На рисунке 1 в логарифмическом масштабе представлены значения абсолютного количества транскриптов. Проведенный регрессионный анализ показывает, что существует высокая степень корреляции между экспрессией 248 генов хромосомы 18 в клетках HepG2 и гепатоцитах печени: коэффициент корреляции Спирмена r_s составил 0,81.

Таблица. Гены хромосомы 18 человека, чьи транскрипты не были обнаружены, либо были обнаружены только в клетках линии HepG2 или гепатоцитах печени. Приведены значения числа копий транскрипта на клетку. N/D - не обнаружен (not detected)

Идентификатор UniProt	Имя гена	Клетки линии HepG2	Гепатоциты печени
Q9UIV8	<i>serpinb13</i>	N/D	N/D
Q96P63	<i>serpinb12</i>	N/D	N/D
P15884	<i>tcf4</i>	N/D	N/D
P43146	<i>dcc</i>	N/D	N/D
Q8TDF5	<i>neto1</i>	N/D	N/D
Q9BXX2	<i>ankrd30b</i>	N/D	N/D
Q9HBT6	<i>cdh20</i>	N/D	N/D
P32926	<i>dsg3</i>	N/D	N/D
P07492	<i>grp</i>	N/D	N/D
Q8N1N2	<i>c18orf26</i>	N/D	N/D
B2RU33	<i>potec</i>	N/D	N/D
Q68DL7	<i>c18orf63</i>	N/D	N/D
P32245	<i>mc4r</i>	N/D	N/D
Q96RT6	<i>ctage1</i>	N/D	N/D
P48594	<i>serpinb4</i>	N/D	0,049
Q9BYG7	<i>mro</i>	N/D	0,9
P48595	<i>serpinb10</i>	N/D	0,09
P59095	<i>stard6</i>	N/D	0,027
Q13336	<i>slc14a1</i>	N/D	0,615
Q8IYT4	<i>katnal2</i>	N/D	0,986
Q8IVV2	<i>loxhd1</i>	N/D	0,932
Q96P15	<i>serpinb11</i>	N/D	0,065
Q96KH6	<i>c18orf12</i>	N/D	0,056
P0C7T4	<i>hmsd-v</i>	N/D	0,033
Q9H159	<i>cdh19</i>	N/D	0,922
A6NM36	<i>lrrc30</i>	N/D	0,06
Q96N95	<i>znf396</i>	0,183	N/D
O14490	<i>dlgap1</i>	0,289	N/D

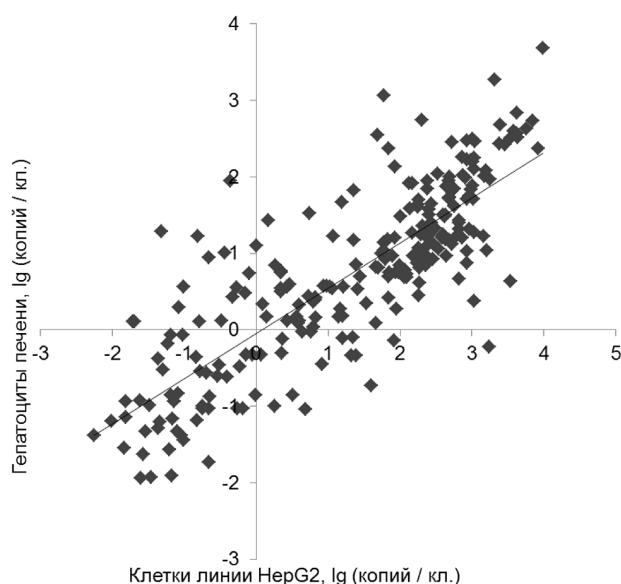


Рисунок 1. Корреляция между ограниченными частями транскриптомов клеток линии HepG2 и гепатоцитов печени. Точки соответствуют абсолютным количествам мРНК, кодируемых 248 генами, расположенными на хромосоме 18 человека. Линия линейной регрессии, показанная на графике, описывается уравнением $Y = 0,592 \cdot X - 0,044$. Коэффициент корреляции Спирмана равен 0,81.

Следует отметить, что линия регрессии проходит практически через начало координат, а её коэффициент наклона $\approx 0,6$ (количество копий транскриптов на гепатоцит представлено по оси ординат, а на клетку HepG2 – по оси абсцисс). Это указывает на то, что уровень экспрессии генов хромосомы 18 в клетке HepG2 в среднем в два раза превышает уровень их экспрессии в гепатоците печени. Очевидно, это связано с более высокой активностью биохимических процессов, протекающих в пролиферирующих клетках HepG2 в сравнении с неделящимися гепатоцитами. Следует также отметить, что, в отличие от гепатоцитов, клетки линии HepG2 являются злокачественными [9].

На рисунке 2 представлено распределение частоты транскриптов по их количественной представленности, то есть число транскриптов, чьё абсолютное количество в клетке лежит в заданном интервале значений. Для удобства представления результатов, каждый последующий интервал получали путём умножения предыдущего на фактор 3 (рис. 2). Можно видеть, что в клетках HepG2 распределение транскриптов является бимодальным с динамическим диапазоном от 0,006 до 9635 копий транскрипта на клетку и максимальным уровнем представленности, приходящимся на диапазон 177-531 копий транскрипта на клетку. Для гепатоцитов печени характерно унимодальное распределение с динамическим диапазоном от 0,011 до 4819 копий мРНК на клетку и максимальным уровнем представленности, приходящимся на диапазон 2-20 копий транскрипта на клетку. При этом количество транскриптов с числом копий менее и более одной на клетку было примерно одинаковым:

соответственно для HepG2 – 63 и 187 или 25% и 75%, для гепатоцитов – 73 и 187 или 28% и 72%. Однако количество транскриптов с числом копий 100 и более на клетку существенно отличалось для HepG2 и гепатоцитов печени: соответственно 111 и 33. Таким образом, количество транскриптов с высоким уровнем количественной представленности (>100 копий на клетку) заметно выше в клетках HepG2 в сравнении с гепатоцитами, в то время как с низким (>1 копии на клетку) – приблизительно одинаково. Как в клетках HepG2, так и в гепатоцитах печени самым высоко представленным транскриптом является мРНК транстиретина (9635 и 4819 копий/клетку, соответственно). Известно, что транстиретин синтезируется и секретируется преимущественно гепатоцитами и что культивируемые клетки линии HepG2 сохраняют эту способность [18]. Интересно, что среди десяти генов с наиболее высокими уровнями экспрессии в клетках HepG2 и гепатоцитах, шесть (включая ген транстиретина, *ttr*) совпадают, а именно *zcchc2* (6902 и 546 копий/кл.), *atp5a1* (5631 и 424 копии/кл.), *smchd1* (4231 и 366 копий/кл.), *lman1* (4204 и 693 копии/кл.) и *mapre2* (3749 и 398 копий/кл.). В скобках указаны их представленности, соответственно, в клетках HepG2 и гепатоцитах. Ген *zcchc2* кодирует белок с доменами типа “цинковые пальцы” (zinc-finger protein). Наиболее вероятно, что это фактор транскрипции, однако его точные биологические функции не установлены (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9C0B9>). Остальные гены, указанные выше, кодируют белки, вовлечённые во внутриклеточный метаболизм и клеточное деление. Так, ген *atp5a* кодирует субъединицу митохондриальной АТФ-синтазы (<http://www.uniprot.org/uniprot/P25705>); ген *smchd1* – белок, вовлечённый в метилирование ДНК (<http://www.uniprot.org/uniprot/A6NHR9>); ген *lman* – манноза-специфический лектин, предположительно участвующий во внутриклеточной сортировке белков

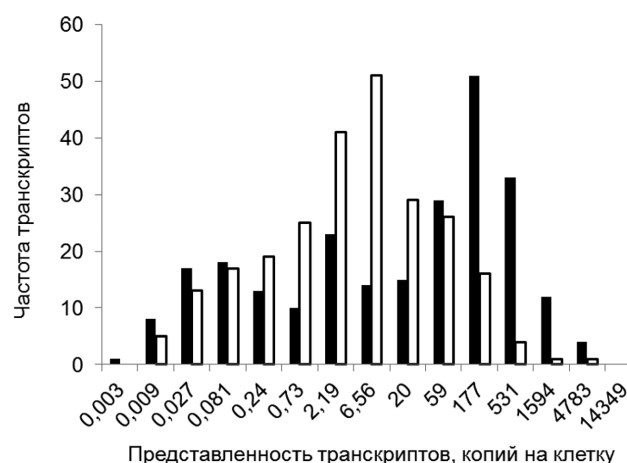


Рисунок 2. Зависимость частоты транскриптов от их количественной представленности (число транскриптов, чьё абсолютное количество в клетке лежит в заданном интервале значений). Тёмные столбцы – клетки линии HepG2, светлые – гепатоциты печени. Каждый интервал значений по оси абсцисс получен умножением предыдущего значения на фактор 3.

(<http://www.uniprot.org/uniprot/P49257>); ген *mapre2* – белок, предположительно участвующий в полимеризации микротрубочек, формирующих цитоскелет (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q15555>).

Дифференциальная экспрессия генов хромосомы 18 человека в клетках HepG2 и гепатоцитах печени

Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили, используя подход, основанный на установлении фиксированного порога относительного изменения экспрессии. Для того, чтобы повысить достоверность различия в экспрессии генов, значение порога принималось равным 4. Количество генов хромосомы 18, для которых число копий транскриптов в клетках линии HepG2 превышало в четыре раза соответствующее значение в гепатоцитах печени, составило 141. В то же время, количество генов, число копий транскриптов которых было выше в четыре раза в гепатоцитах печени по сравнению с их числом в клетках линии HepG2, составило 29. Для выявления биологических процессов, в которых участвуют гены хромосомы 18, преимущественно экспрессирующиеся либо в клеточной линии HepG2, либо в гепатоцитах печени, полученные группы генов анализировали как описано в разделе “МЕТОДИКА” с целью функциональной классификации транскриптов в соответствующих терминах категорий онтологии генов (GO).

Для 29 транскриптов, высоко представленных в гепатоцитах, в сравнении с клетками HepG2, не удалось выявить со статистической значимостью $p_{\text{adjusted}} < 0,05$ каких-либо групп генов, относящихся к определённым биологическим процессам, что скорее всего является следствием небольшого размера выборки. В случае генов, преимущественно экспрессирующихся в клетках HepG2 ($N=141$), удалось выявить несколько функциональных групп генов, которые представлены на диаграмме на рисунке 3. Наиболее статистически значимой ($p_{\text{adjusted}}=0,0012$) является группа “Клеточное деление” (GO:0051301), состоящая из 14 генов (*cables1*, *chmp1b*, *ctdp1*, *haus1*, *mapre2*, *ndc80*, *pard6g*, *pik3c3*, *ralbp1*, *rbbp8*, *sehl1*, *skal*, *txn14a*, *vps4b*), за которой следует группа “Клеточный цикл” (GO:0022402; $p_{\text{adjusted}} = 0,0094$) из 19 генов (*cables1*, *cep192*, *cep76*, *chmp1b*, *ctdp1*, *escl1*, *haus1*, *mapre2*, *ndc80*, *pik3c3*, *psmg2*, *ralbp1*, *rbbp8*, *sehl1*, *skal*, *spire1*, *txn14a*, *tyms*, *vps4b*). Все гены из первой группы, за исключением *pard6g*, входят в число генов, составляющих вторую группу. Очевидно, высокая представленность их транскриптов в клетках HepG2 по сравнению с гепатоцитами связана с пролиферативной активностью клеточной линии, в то время как такая активность должна практически отсутствовать у гепатоцитов печени. Следующую по уровню статистической значимости ($p_{\text{adjusted}}=0,018$) группу составляют 65 генов, вовлечённых в клеточные метаболические процессы (GO:0044267). Интересно, что выполненный биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии генов позволил также выявить группу генов, вовлечённых в клеточную адгезию (GO:0098609; $p_{\text{adjusted}} = 0,022$; 13 генов:

cdh2, *dsc1*, *dsc2*, *dsc3*, *dsg2*, *dsg4*, *malt1*, *me2*, *myl12a*, *myl12b*, *ptpn2*, *ptprm*, *rock1*). Наиболее вероятно, что доминирование в клетках HepG2 (в сравнении с гепатоцитами) генов, чьи белковые продукты участвуют в клеточной адгезии через адгезионные молекулы плазматической мембраны, также связано с клеточной пролиферацией. Действительно, клеточная линия HepG2, полученная из клеток злокачественной опухоли печени эмбрионального происхождения [9], является “субстрат-зависимой” (adherent-dependent), то есть растёт и делится при культивировании только при контакте с инертной поверхностью (как правило, стекло или пластик) [19], что может требовать активного синтеза белков, участвующих в процессах клеточной адгезии.

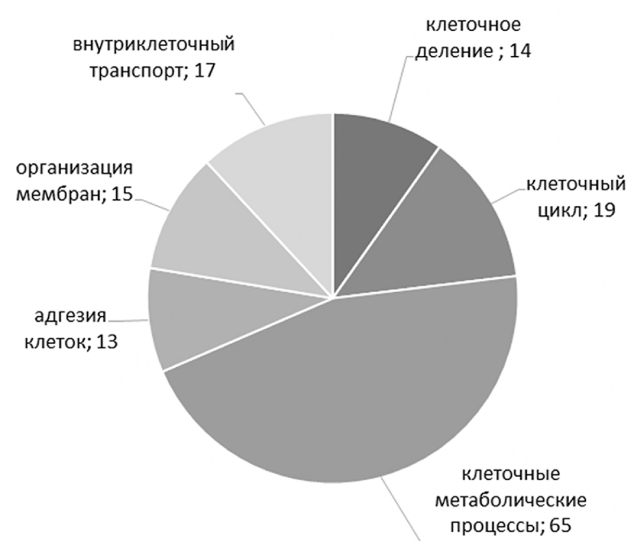


Рисунок 3. Результаты классификации транскриптов по категориям GO “Биологический процесс”, преимущественно экспрессирующихся в клеточной линии HepG2. Интенсивность окрашивания секторов указывает на статистическую значимость классификации: чем темнее сектор, тем выше статистическая значимость отнесения транскриптов к указанной группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе на примере хромосомы 18 человека показана возможность определения для заданной части транскриптома методом количественной ПЦР абсолютного числа копий транскриптов, приходящихся на единичную клетку. Обнаружена значительная корреляция ($r_s = 0,81$) между экспрессией генов хромосомы 18 в гепатоцитах и культивируемых клетках гепатобластомы (линия HepG2), однако при этом распределение транскриптов по уровню их количественной представленности в клетках линии HepG2 является бимодальным с диапазоном от 0,006 до 9635 копий транскрипта на клетку, а в гепатоцитах – унимодальным с диапазоном от 0,011 до 4819 копий на клетку. Биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии генов хромосомы 18 выявил, что гены, ответственные за процессы, связанные с клеточным делением и адгезией, показывают более высокий уровень экспрессии в клетках линии HepG2 в сравнении

с гепатоцитами печени, что вероятно связано с активной пролиферацией клеток в культуре. Таким образом, исследованные транскриптомные профили существенно различаются, что необходимо учитывать при использовании клеток линии HepG2 в качестве модели гепатоцитов печени.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adamski M.G., Gumann P., Baird A.E. (2014) PLoS One, **9**, e103917.
2. Gadkar V., Filion M. (2014) Curr. Issues Mol. Biol., **16**, 1-6.
3. Bustin S.A., Mueller R. (2005) Clin. Sci. (Lond), **109**, 365-379.
4. Киселёва Я.Ю., Птицын К.Г., Радько С.П., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2016) Биомед. химия, **62**, 403-410. DOI: 10.18097/PBMC20166204403
5. Spurgeon S.L., Jones R.C., Ramakrishnan R. (2008) PLoS One, **3**, e1662.
6. Hayes C.J., Dalton T.M. (2015) Biomol. Detect. Quantif., **4**, 22-32.
7. Paik Y.K., Jeong S.K., Omenn G.S., Uhlen M., Hanash S., Cho S.Y., Lee H.J., Na K., Choi E.Y., Yan F. et al. (2012) Nat. Biotechnol., **30**, 221-223.
8. Archakov A., Zgoda V., Kopylov A., Naryzhny S., Chernobrovkin A., Ponomarenko E., Lisitsa A. (2012) Expert Rev. Proteomics, **9**, 667-676.
9. Lopez-Terrada D., Cheung S.W., Finegold M.J., Knowles B.B. (2009) Hum. Pathol., **40**, 1512-1515.
10. Chang C., Li L., Zhang C., Wu S., Guo K., Zi J., Chen Z., Jiang J., Ma J., Yu Q. et al. (2014) J. Proteome Res., **13**, 38-49.
11. Donato M.T., Lahoz A., Castell J.V., Gomez-Lechon M.J. (2008) Curr. Drug. Metab., **9**, 1-11.
12. Mailloux R.J., Lemire J., Appanna V.D. (2011) Exp. Cell. Res., **317**, 2231-2238.
13. Bassila C., Ghemrawi R., Flayac J., Froese D.S., Baumgartner M.R., Gueant J.L., Coelho D. (2017) Biochim. Biophys. Acta, **1863**, 103-112.
14. Guenin S., Mauriat M., Pelloux J., Van Wuytswinkel O., Bellini C., Gutierrez L. (2009) J. Exp. Bot., **60**, 487-493.
15. Jacob F., Guertler R., Naim S., Nixdorf S., Fedier A., Hacker N.F., Heinzelmann-Schwarz V. (2013) PLoS One, **8**, e59180.
16. Stahlberg A., Kubista M., Pfaffl M. (2004) Clin. Chem., **50**, 1678-1680.
17. Wilkening S., Stahl F., Bader A. (2003) Drug. Metab. Dispos., **31**, 1035-1042.
18. Knowles B.B., Howe C.C., Aden D.P. (1980) Science, **209**, 497-499.
19. Dituri F., Mazzocca A., Fernando J., Papappicco P., Fabregat I., De Santis F., Paradiso A., Sabba C., Giannelli G. (2013) PLoS One, **8**, e67109.

Поступила: 28. 12. 2016.
Принята к печати: 14. 03. 2017.

PCR ANALYSIS OF THE ABSOLUTE NUMBER OF COPIES OF HUMAN CHROMOSOME 18 TRANSCRIPTS IN LIVER AND HepG2 CELLS

Y.Y. Kiseleva, K.G. Ptitsyn, O.V. Tikhonova, S.P. Radko, L.K. Kurbatov, I.V. Vakhrushev, V.G. Zgoda, E.A. Ponomarenko, A.V. Lisitsa, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow 119121, Russia; e-mail: radkos@yandex.ru

Using reverse transcription in conjunction with the quantitative real-time PCR or digital droplet PCR, the transcriptome profiling of human chromosome 18 has been carried out in liver hepatocytes and hepatoblastoma cells (HepG2 cell line) in terms of the absolute number of each transcript per cell. The transcript abundance varies within the range of 0.006 to 9635 and 0.011 to 4819 copies per cell for HepG2 cell line and hepatocytes, respectively. The expression profiles for genes of chromosome 18 in hepatocytes and HepG2 cells were found to significantly correlate: the Spearman's correlation coefficient was equal to 0.81. The distribution of frequency of transcripts over their abundance was bimodal for HepG2 cells and unimodal for liver hepatocytes. Bioinformatic analysis of the differential gene expression has revealed that genes of chromosome 18, overexpressed in HepG2 cells compared to hepatocytes, are associated with cell division and cell adhesion processes. It is assumed that the enhanced expression of those genes in HepG2 cells is related to the proliferation activity of cultured cells. The differences in transcriptome profiles have to be taken into account when modelling liver hepatocytes with cultured HepG2 cells.

Key words: transcriptome, quantitative PCR, chromosome 18, hepatocytes, HepG2