

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

ПЦР-АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 18 В ТКАНИ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА: МЕЖИНДИВИДУАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ

О.С. Тимошенко¹, С.А. Хмельва¹, Е.В. Поверенная¹, Я.Ю. Киселёва², Л.К. Курбатов¹, С.П. Радько^{1},
И.В. Буромский³, С.С. Маркин¹, А.В. Лисица¹, А.И. Арчаков¹, Е.А. Пономаренко¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: radkos@yandex.ru

²Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

На примере хромосомы 18 человека проведён ПЦР-анализ межиндивидуальной вариабельности экспрессии 244 генов в ткани печени. В целом количественные профили транскриптома хромосомы 18, выраженные в количестве копий кДНК на единичную клетку, показывают высокую степень корреляции ($r_p=0,963-0,966$). Однако при попарном сравнении доноров экспрессия существенного количества генов (от 13% до 19% в зависимости от способа нормирования экспериментальных данных) различается более чем 4-кратно. При этом доля дифференциально экспрессированных генов возрастает с понижением уровня их экспрессии. Более высокая количественная вариабельность низкопредставленных транскриптов имеет в основном не техническую, а биологическую причину. Биоинформатический анализ межиндивидуальной вариабельности дифференциальной экспрессии генов хромосомы 18 в ткани печени человека не выявил каких-либо статистически значимых групп генов, относящихся к определённым биологическим процессам. Это, по-видимому, указывает на временную природу межиндивидуальной вариабельности их экспрессии, вероятно, отражающую реакцию клеток данного индивидуума на конкретные внешние стимулы.

Ключевые слова: транскриптом; количественная ПЦР; хромосома 18; ткань печени человека

DOI: 10.18097/PBMC20216705418

ВВЕДЕНИЕ

Метод, сочетающий обратную транскрипцию с количественной полимеразной цепной реакцией (reverse transcription — quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR, ОТ-кПЦР) давно утвердился в качестве “золотого стандарта” количественной оценки экспрессии генов благодаря его высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости [1, 2]. В рамках этого метода полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводится в формате либо ПЦР в реальном времени (ПЦРrv), либо цифровой капельной ПЦР (цкПЦР). В последнем случае становится возможным определять абсолютное число копий комплементарной ДНК (кДНК) без построения калибровочных прямых с использованием РНК- или ДНК-стандартов [3, 4]. В сравнении с современными методами секвенирования транскриптома (RNA-seq), метод ОТ-кПЦР не требует установления порога отсечения, выбор величины которого во многом субъективен [5]. Он также позволяет с высокой степенью достоверности количественно детектировать низкопредставленные транскрипты [6]. Кроме того, ОТ-кПЦР даёт возможность определять абсолютное количество транскриптов, если известна эффективность обратной транскрипции, и рассчитать уровень экспрессии каждого гена в копиях транскрипта на единичную клетку, если известно среднее количество суммарной РНК, приходящееся на клетку [7-9]. Однако его применение для полнотранскриптомного профилирования клеток и тканей человека

практически невозможно, что, в первую очередь, связано с крайней трудозатратностью подбора и верификации многих тысяч пар праймеров и зондов.

Как и в случае количественного профилирования полного транскриптома методом ОТ-кПЦР, профилирование полного протеома человека методами масс-спектрометрии при условии идентификации и количественной детекции низкопредставленных белков также является крайне трудоёмкой задачей. Это обусловило появление международного проекта, где каждая страна-участник концентрируется на исследовании протеома определённой хромосомы — совокупности белков, кодируемых генами, локализованными на этой хромосоме (Chromosome-Centric Human Proteome Project, C-HPP [10]). Российский консорциум исследует протеом хромосомы 18 человека (Xp18) [11]. Параллельно с протеомом было предложено рассматривать транскриптом Xp18, состоящий из 275 транскриптов, кодируемых на данной хромосоме, как модель для проведения транскриптомных исследований [12], в первую очередь для исследования корреляции “транскриптом-протеом” [7-9].

В рамках российской части C-HPP, мы подобрали и верифицировали набор праймеров и зондов для ПЦР-анализа транскриптома Xp18 [7, 8]. Таким образом, применительно к ограниченной части транскриптома, такой как транскриптом Xp18, использование метода ОТ-кПЦР с целью количественного профилирования представляется технически возможным. Данный набор был ранее

использован для ПЦР-анализа корреляции между абсолютным числом копий транскриптов, кодируемых на Xp18, в клетках культивируемой гепатобластомы человека HepG2 и гепатоцитах печени, а также дифференциальной экспрессии генов Xp18 на уровне транскриптома в этих объектах [3]. На примере транскриптома Xp18 было показано существенное различие в экспрессии генов в ткани печени человека и в клетках линии HepG2, что должно приниматься во внимание при использовании последней в качестве модели для исследования процессов биотрансформации [13]. Количественное профилирование транскриптомов Xp18 ткани печени разных доноров методом ОТ-кПЦР показало высокую степень корреляции между донорами: значения коэффициентов корреляции Пирсона (r_p) при попарном сравнении доноров лежали в интервале 0,963–0,966 в сравнении с интервалом 0,76–0,79 при попарном сравнении “ткань печени донора — клетки HepG2” [14, 15].

В данной работе мы провели анализ межиндивидуальной вариативности дифференциальной экспрессии генов Xp18 на уровне транскриптома и сопоставили её с различиями, обнаруженными нами ранее для гепатоцитов человека и клеток линии HepG2. Для сравнительных целей количество каждого транскрипта оценивали в числе копий соответствующей кДНК. Следует отметить, что в контексте данной работы межиндивидуальная вариативность экспрессии генов в тканях человека технически неотделима от её вариативности во времени. Поскольку исследование временных изменений профиля транскрипции в ткани печени человека не представляется возможным по этическим и техническим причинам, единственным практическим подходом к оценке вариативности транскриптома печени человека является исследование его межиндивидуальной вариативности с использованием образцов печени разных доноров, полученных *post mortem*.

МЕТОДИКА

Образцы печени человека

Образцы печени человека были получены от доноров мужского пола (возраст — 65 лет, 38 лет и 54 года, далее донор 1, 2 и 3) при аутопсии. На момент смерти у доноров не было известных заболеваний печени. Доноры 1 и 3 умерли от острой сердечной недостаточности, донор 2 — в результате травмы. После забора образцы были немедленно помещены в раствор RNeasy RNA Stabilization Reagent (“Thermo Fisher Scientific”, США; кат. № AM7021) и хранились при температуре -20°C до использования.

Выделение РНК и синтез кДНК

Для выделения суммарной РНК из образцов печени использовали набор RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США; кат. № 74104) согласно инструкции производителя. Для удаления следов геномной ДНК использовали набор RNase-Free DNase Set

(“Qiagen”; кат. № 79254). Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (“Thermo Fisher Scientific”) в соответствии с инструкцией производителя [3]. Качество РНК оценивали на биоанализаторе Agilent Bioanalyser 2100 (“Agilent Technologies”, США), используя набор Agilent RNA 6000 Nano Kit (“Agilent Technologies”; кат. № 5067-1511). Значения RIN (RNA Integrity Number) для препаратов суммарной РНК были 7,5 или выше. Полученную суммарную РНК (РНК-матрица) немедленно использовали для синтеза кДНК. Синтез кДНК проводили с помощью набора AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (“Agilent Technologies”; кат. № 600559) согласно инструкции производителя, с использованием “случайных” праймеров из данного набора. Препараты кДНК разводили DEPC-обработанной водой так, что конечная концентрация РНК-матрицы составляла 50 нг/мкл и хранили при температуре -20°C до использования.

ПЦР в реальном времени и цифровая капельная ПЦР

Для проведения ПЦР_{rv} и цкПЦР использовали подобранные ранее праймеры и зонды к кДНК транскриптов, кодируемых на Xp18 человека [7-9], за исключением трёх транскриптов, кодирующие гены которых не были отнесены к Xp18 на тот момент, а именно *ELO43C*, *LINC01387* и *C18orf65*. Для них подобрали праймеры с помощью программы Oligo 7 (“Molecular Biology Insights”, США) [7], проверяя их специфичность сначала с помощью интернет-ресурса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), а затем экспериментально, сравнивая размер ампликонов, наблюдаемый при их аналитическом гель-электрофорезе, с ожидаемым значением (за исключением *LINC01387*, где не было ПЦР-продуктов). Во всех случаях в ПЦР-пробе содержалась кДНК, полученная при обратной транскрипции 200 нг РНК-матрицы. ПЦР проводили в дубликатах. Праймеры и зонды были синтезированы компанией “Евроген” (Россия). Экспериментально определённая эффективность ПЦР для использованных пар праймеров лежала в пределах 90-110% [7-9].

ПЦР_{rv} (40 циклов) проводили с использованием ПЦР-смеси qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”; кат. № PK147L) на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad”, США). Концентрация каждого праймера составляла 400 нМ. Температуру отжига (продолжительность — 45 с) задавали в соответствии с рекомендацией программы Oligo 7 для каждой пары праймеров, элонгацию и денатурацию проводили соответственно при 72°C (45 с) и 95°C (45 с), за исключением пар праймеров, для которых был рекомендован так называемый “двухтемпературный” режим — 68°C (1 мин, отжиг и элонгация) и 95°C (45 с, денатурация). Для определения количества копий кДНК каждого транскрипта в формате ПЦР_{rv} (всего 226 транскриптов) использовали метод ΔC_t [16]. Все пары праймеров были поделены на группы по температуре отжига, и в каждой группе было выделено от одного до трёх “референсных транскриптов” (один референсный

транскрипт на группу от 4 до 12 транскриптов и три референсных транскрипта для групп с десятками транскриптов). Для референсных транскриптов их количество в числе копий кДНК на 200 нг РНК-матрицы было определено методом ПЦР_{рв} с использованием ДНК-стандартов, как описано ранее [7]. ПЦР-пробы с известным количеством соответствующих референсных транскриптов присутствовали в каждом “прогоне” ПЦР для пар праймеров с определённой температурой отжига. Количество копий кДНК в ПЦР-пробе (N_r), рассчитывали как $N_r = N_t \cdot 2^{\Delta Ct}$, где N_t — количество копий кДНК референсного транскрипта, а $\Delta Ct = Ct_r - Ct$ (Ct_r и Ct — среднеарифметические значения дубликатных измерений порогового цикла для референсного и определяемого транскрипта, соответственно). Когда количество референсных транскриптов было больше одного, среднеарифметическое значение числа копий кДНК определяемого транскрипта принимали за его количественную оценку. Определение количества копий кДНК транскрипта методом цкПЦР (49 транскриптов) проводили с использованием системы QX100 Droplet Digital PCR System (“Bio-Rad”) как описано в [7]. Количество транскриптов на клетку в копиях кДНК рассчитывали исходя из количества суммарной РНК в гепатоците, которое принимали равным 40 пг [13].

Биоинформатический анализ

Функциональную аннотацию в терминах категорий онтологии генов (Gene Ontology, GO) проводили с помощью веб-сервиса GOrilla [17] с уровнем статистической значимости $p < 0,001$, используя в качестве референсной основы (“background”) перечень всех генов человека. Дополнительно группы генов аннотировали согласно описанию их участия в биологических путях KEGG с использованием функционала веб-ресурса g:Profiler [18] (g:SCS threshold < 0,05), а также ресурса STRING [19] (score > 0,700).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соотношение между абсолютным количеством копий на клетку для кДНК транскриптов генов Xp18 человека в ткани печени разных доноров

В результате ПЦР-анализа ткани печени доноров было детектировано 259 транскриптов, кодируемых на Xp18. При этом 244 транскрипта были детектированы в образцах печени всех доноров, а 15 — по крайней мере для одного донора (дополнительные материалы, табл. S1). Количество транскриптов в копиях кДНК на клетку варьировало в динамическом диапазоне, составляющим 7 порядков — от 0,0001 (одна копия кДНК на 10 тыс. клеток, например, для гена *DSG3*) до 725 (для гена *TTR*, кодирующего транспортный белок транстиретин, секретируемый печенью). Не было детектировано (на уровне чувствительности проведённого ПЦР-анализа) транскриптов для 16 генов, из которых 7 генов не были детектированы

и в предыдущем исследовании [3], где был использован объединённый образец ткани печени от четырёх доноров. Из 12 генов, транскрипты которых не были обнаружены ранее в суммарном образце печени (дополнительные материалы, табл. S1, ссылка [3]), три транскрипта (продукты генов *TCF4*, *CDH20* и *DSG3*) детектировали у одного или двух доноров на низком уровне (не более 0,0043 копий кДНК на клетку: дополнительные материалы, табл. S1), а остальные 4 транскрипта хоть и детектировали у всех доноров, но также на довольно низком уровне (0,034 и менее копии кДНК на клетку). В целом, 15 транскриптов, которые были обнаружены по крайней мере у одного донора, присутствовали на низком уровне (не более 0,036 копий кДНК на клетку), за исключением транскриптов генов *ATP8B1* (phospholipid-transporting ATPase IC), *NAPG* (gamma-soluble NSF attachment protein) и *ZCCHC2* (zinc finger CCHC domain-containing protein), которые детектировали на уровне 1,6–4,0 копий кДНК на клетку у одного или двух доноров, но при этом не обнаруживали у других (другого) доноров.

Как отмечалось выше, при попарном сравнении степень корреляции между лог-трансформированными значениями представленности 244 транскриптов Xp18, детектированных у всех доноров, весьма высока и характеризуется величинами r_p в интервале 0,963–0,966 [14]. При этом можно отметить, что регрессионные прямые, получаемые в результате линейного регрессионного анализа лог-трансформированных значений представленности транскриптов (рис. 1), не проходят через центр координат во всех случаях, что говорит о системном (в среднем по набору из 244 генов Xp18) сдвиге числа копий кДНК, величина которого различается для каждой пары доноров. Причины такого сдвига могут иметь как биологическую, так и методическую природу. Известно, что доля мРНК в суммарной РНК может варьировать в зависимости от типа клеток и их физиологического состояния [20]. Таким образом, нельзя исключить, что для разных индивидуумов (или для одного индивидуума в разные моменты времени) доля мРНК в суммарной РНК клетки может различаться, что при использовании в ПЦР-анализе нормировки по количеству суммарной РНК приведёт к сдвигу регрессионных прямых относительно центра координат. С другой стороны, присутствие нежелательных примесей (например, белковые и пептидные загрязнения, ионы некоторых переходных металлов) в препаратах суммарной РНК может различаться у доноров, приводя к разной степени ингибирования синтеза кДНК и, соответственно, к наблюдаемому сдвигу регрессионных зависимостей. В этом случае наблюдаемые различия могут быть нивелированы через нормировку, основанную на приведении корреляционных прямых к виду, где они все проходят через центр координат.

Полученные количественные оценки представленности транскриптов, кодируемых на Xp18, позволяют оценить различия в среднем уровне экспрессии у исследованных доноров при прямом определении числа копий кДНК на клетку методом ОТ-кПЦР с нормировкой по количеству

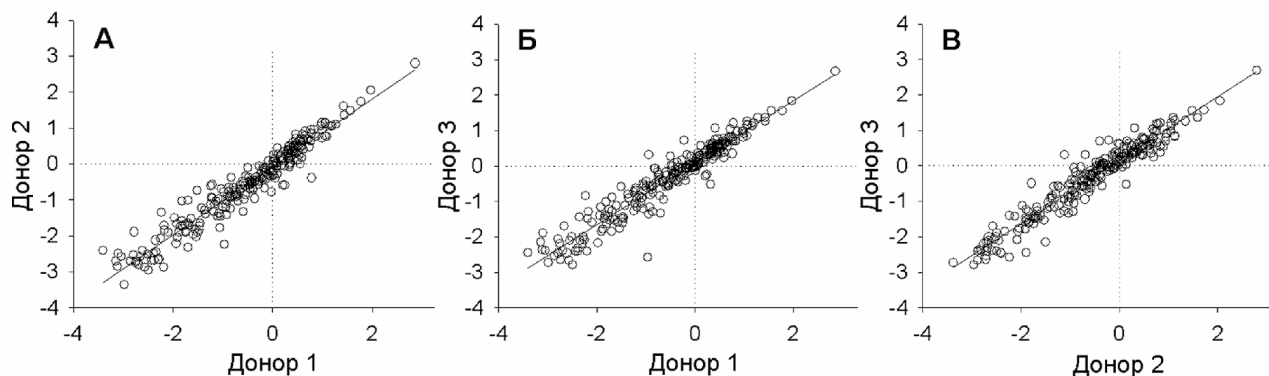


Рисунок 1. Корреляции между лог-трансформированными (по основанию 10) значениями представленности транскриптов генов Xp18 в ткани печени (в копиях кДНК на клетку) для пар доноров.

суммарной РНК. Действительно, зависимости на рисунке 1 могут быть хорошо описаны линейной регрессией вида $y = x + a$ (значения r_p лежат в этом случае в интервале 0,947–0,963 для всех пар доноров), где a равно -0,0572, 0,1571 и 0,2143 для пар доноров 2/1, 3/1 и 3/2 соответственно. Наибольший сдвиг наблюдается для пары доноров 3/2. Для этой пары, с учётом логарифмической шкалы, уравнение может быть записано в терминах представленности транскриптов Y и X как $\lg Y = \lg X + \lg 1,64$ (в случае пар доноров 2/1 и 3/1 последний член в этой зависимости будет соответственно $\lg 0,88$ и $\lg 1,44$) и, таким образом, максимальное различие между уровнями экспрессии наблюдается для доноров 2 и 3 и составляет около 64%.

На рисунке 2 представлено распределение частоты транскриптов по их количественной представленности — то есть сколько разных транскриптов имеет представленность (в копиях кДНК на клетку), лежащую в заданном интервале значений. Каждый последующий интервал на рисунке 2 получается путём умножения предыдущего на фактор 10. Можно видеть, что для каждого донора распределение является унимодальным, а представленность транскриптов варьирует в практически одинаковых диапазонах. Следует отметить, что для клеток линии HepG2 распределение было бимодальным [3]. Однако максимум значений частоты транскриптов лежит для донора 2 в интервале 0,1–1 копии кДНК на клетку, в то время как для остальных двух доноров — в интервале 1–10 (рис. 2). В целом, распределения частоты транскриптов для разных доноров показывают высокую степень совпадения.

Межиндивидуальные и внутриклеточные различия профилей транскрипции в ткани печени доноров для групп низко и высоко экспрессированных генов Xp18

Хотя в целом количественные профили транскрипции генов Xp18, полученные в ходе ПЦР-анализа образцов ткани печени, показывали высокую степень корреляции для пар доноров (рис. 1 и [14, 15]), корреляции заметно различались в группах условно высоко- и низкопредставленных транскриптов (табл. S1 дополнительных материалов

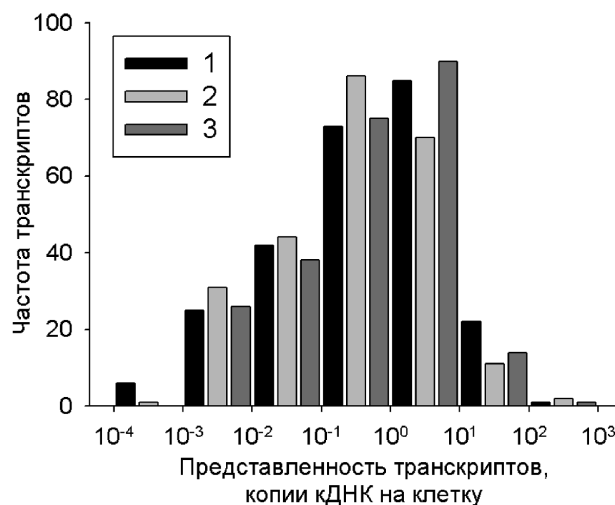


Рисунок 2. Гистограмма распределения числа транскриптов, кодируемых на Xp18 человека, по их количественной представленности. Число транскриптов (частота транскриптов) показывает, сколько различных транскриптов имеют количественную представленность (в копиях кДНК на клетку), лежащую в заданном интервале значений. Доноры указаны номерами на вкладке рисунка. Каждый интервал значений по оси абсцисс получен умножением предыдущего значения на фактор 10. Ось ординат представлена линейной шкалой, ось абсцисс — логарифмической шкалой.

и рис. 3). Группы (по 19 генов в каждой, табл. S2 дополнительных материалов) были сформированы таким образом, чтобы средний по донорам размер диапазона изменений значений ΔCt для них практически совпадал — средние по донорам значения ΔCt лежат в интервале от -0,67 до 3,63 и от 5,35 до 9,78 для высоко- и низкопредставленных транскриптов соответственно. Таким образом, внутри каждого интервала значения представленности транскриптов различаются в среднем приблизительно в 20 раз, диапазоны представленности транскриптов не перекрываются, а середины диапазонов различаются по представленности приблизительно в 60 раз. При этом количественная оценка представленности транскриптов в каждой группе выполнялась в одном формате — с помощью “двухтемпературной” ОТ-кПЦР.

ПЦР-АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА ХРОСОМЫ 18 ЧЕЛОВЕКА

Как можно видеть из данных таблицы 1, значения r_p систематически ниже для низкопредставленных транскриптов в сравнении с высокопредставленными, что указывает на более высокую количественную вариабельность первых. Следует отметить, что значения r_p в группах заметно ниже, чем соответствующие значения для полного транскриптома Xp18 ($r_p=0,963$), очевидно, в силу меньшего количества транскриптов и величины динамического диапазона.

Известно, что процедура пробоподготовки может оказывать заметное влияние на количественный профиль транскриптома (например, [21]). Для того, чтобы оценить, насколько независимое приготовление материала для ПЦР-анализа может повлиять на его результат даже в рамках одного протокола пробоподготовки и быть ответственно за наблюдаемые различия в профилях условно низко- и высокопредставленных транскриптов у разных доноров (табл. 1 и рис. 3), мы оценили эффект процедуры выделения суммарной РНК и синтеза кДНК на конечный результат ПЦР-анализа в этих группах. Для этого образец ткани печени донора 1 гомогенизировали в лизирующем растворе и гомогенат разделяли на две равные части, которые процессировали отдельно, используя независимое приготовление реагентики для выделения РНК и синтеза кДНК. Полученные препараты кДНК

использовали для определения экспрессии генов в независимых “ПЦР-прогонах”. Коэффициенты корреляции Пирсона для полученных таким образом наборов значений ΔCt для двух групп генов представлены в таблице 2 (корреляционные прямые показаны на рисунке 4). Видно, что для высокопредставленных транскриптов наблюдается практически полное совпадение, тогда как для низкопредставленных — незначительный разброс значений. Для оценки того, как потенциально возможная внутритканевая вариабельность экспрессии генов может влиять на результаты ПЦР-анализа, мы также выделили суммарную РНК и синтезировали кДНК, используя биологический материал, взятый из двух разных мест образца ткани печени донора 1. Полученные результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 5. В этом случае наблюдается некоторая вариабельность экспрессии генов, причём она более значительна для низкопредставленных транскриптов. Полученные результаты указывают на то, что различные участки образца печени даже одного донора могут потенциально иметь несколько различные количественные профили экспрессии генов. Такая “внутритканевая вариабельность” вносит больший вклад в вариабельность определяемого профиля экспрессии генов, чем процедура выделения суммарной РНК и синтеза кДНК

Таблица 1. Коэффициенты корреляции Пирсона (r_p) для значений ΔCt в группах высоко- и низкоэкспрессированных генов Xp18 человека при попарном сравнении образцов ткани печени разных доноров

Транскрипты	Пары доноров		
	донор 2 / донор 1	донор 3 / донор 1	донор 3 / донор 2
высокопредставленные	0,880	0,830	0,864
низкопредставленные	0,478	0,537	0,634

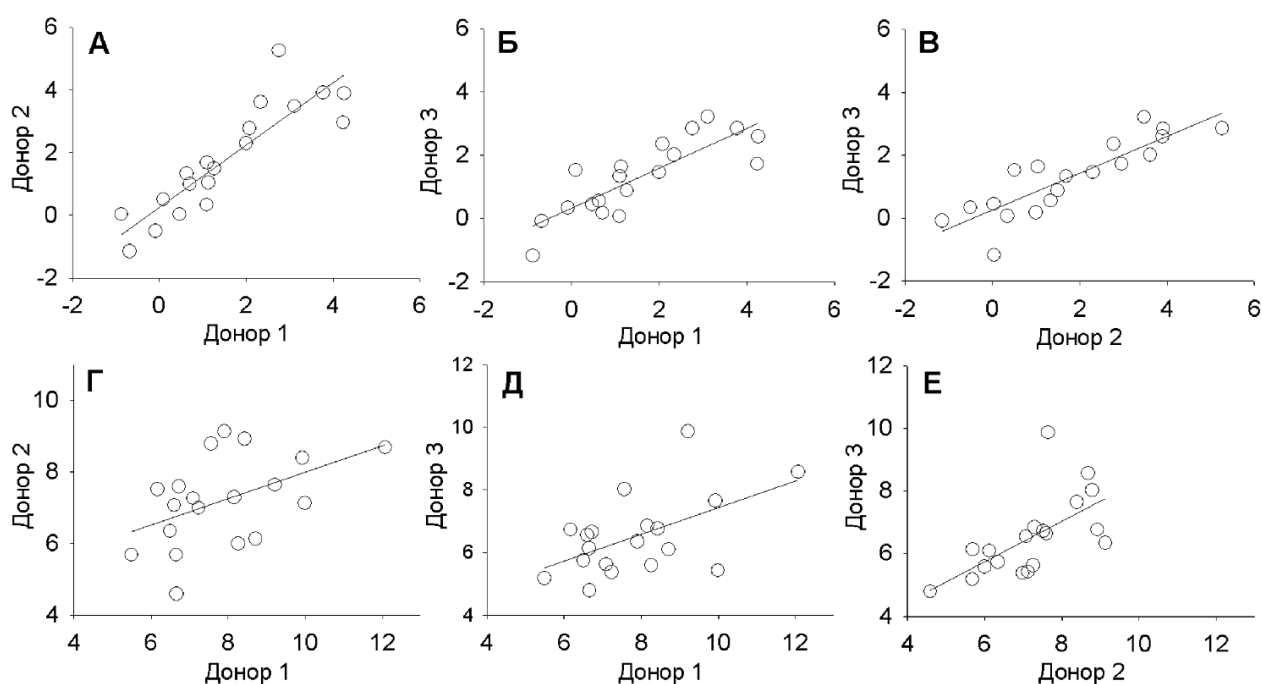


Рисунок 3. Корреляции между значениями ΔCt для кДНК транскриптов генов Xp18 человека в ткани печени для пар доноров. Панели А, Б и В — высокоэкспрессированные гены; панели Г, Д и Е — низкоэкспрессированные гены.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции Пирсона (r_p) для значений ΔCt в группах высоко- и низкоэкспрессированных генов Xp18 человека: влияние процедуры пробоподготовки и внутритканевой вариабельности образцов печени человека

Транскрипты	Влияющие факторы	
	Процедура пробоподготовки	Внутритканевая вариабельность
высокопредставленные	0,995	0,977
низкопредставленные	0,930	0,827

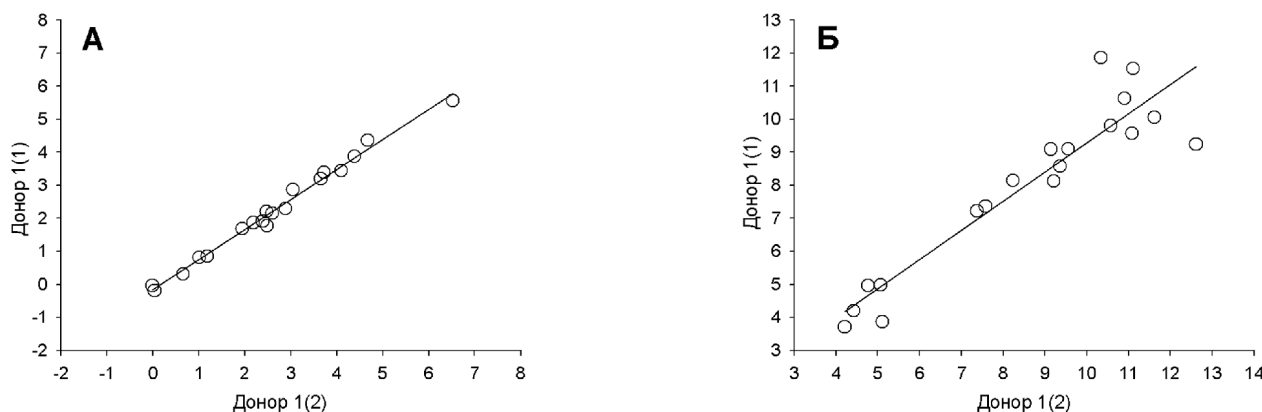


Рисунок 4. Корреляции между значениями ΔCt для кДНК транскриптов генов Xp18 человека при независимом процессировании гомогената ткани печени донора 1 (независимые процессирования указаны цифрами в скобках). Панели А и Б — высокоэкспрессированные и низкоэкспрессированные гены соответственно.

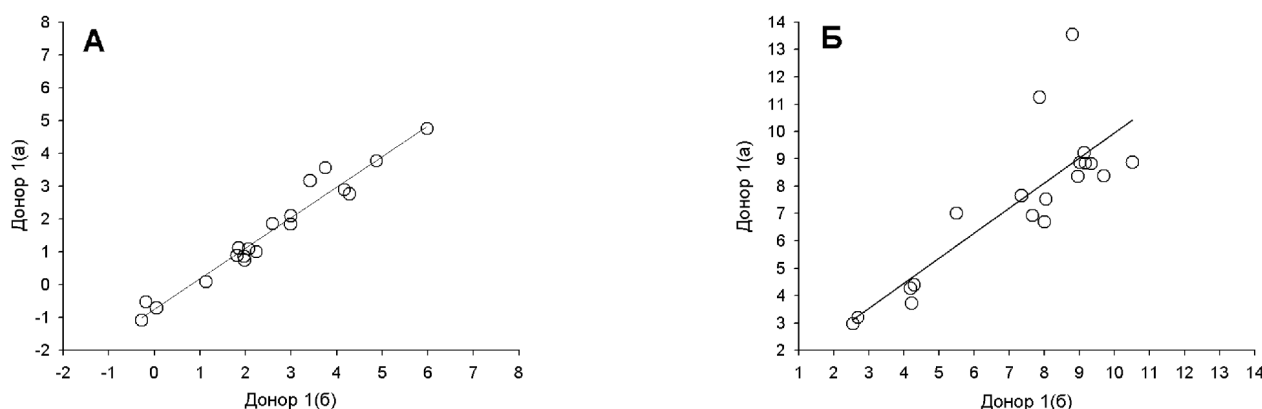


Рисунок 5. Корреляции между значениями ΔCt для кДНК транскриптов генов Xp18 человека разных образцов ткани печени донора 1. Образцы указаны буквами а и б в скобках. Панели А и Б — высокоэкспрессированные и низкоэкспрессированные гены соответственно.

как для высоко-, так и низкопредставленных транскриптов, но заметно ниже наблюдавшейся нами межиндивидуальной вариабельности экспрессии генов (табл. 1 и 2). Полученные результаты согласуются с показанной недавно гетерогенностью транскриптомов единичных гепатоцитов человека, локализованных в участках печени с различными метаболическими функциями [22].

Дифференциальная экспрессия генов Xp18 в ткани печени разных доноров

Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили, используя подход, основанный на установлении фиксированного порога относительного изменения экспрессии [23]. Относительную экспрессию для 244 генов Xp18

вычисляли делением представленности соответствующего транскрипта у одного донора на его представленность у другого (парное сравнение). Для того, чтобы повысить достоверность различия в экспрессии генов, значение порога принимали равным 4, как и в предыдущем исследовании [3]. Суммарно по всем донорам количество генов более чем с 4-кратным изменением экспрессии равнялось 47 (дополнительные материалы, табл. S3). Это контрастирует с количеством генов Xp18, для которых число копий транскриптов на клетку в суммарном образце печени отличалось от соответствующих значений в клетках линии HepG2 в 4 и более раз, которое составляло 170 (141 ген с повышенной и 29 генов с пониженной экспрессией в клетках HepG2 по сравнению с клетками печени) [3].

Поскольку различие в эффективности обратной транскрипции для препаратов суммарной РНК разных доноров не может быть исключено, дифференциальную экспрессию генов Xp18 анализировали также с учётом нормировки представленности транскриптов, которую выполняли делением значений представленности на 0,88 и 1,44 для доноров 2 и 3 соответственно, оставляя значения представленности для донора 1 неизменными. Такая нормировка сдвигает зависимости на рисунке 1 вдоль абсциссы и ординаты таким образом, что регрессионные прямые проходят практически через центр координат для всех пар доноров, при этом их наклон не меняется. При анализе нормированных таким образом значений экспрессии было обнаружено 32 гена, чья экспрессия различалась более чем в 4 раза по крайней мере для одной пары доноров, при этом 29 генов совпадали для обоих подходов к анализу дифференциальной экспрессии (дополнительные материалы, табл. S3).

Анализ того, как гены с изменённой экспрессией распределены среди всех генов Xp18 показал, что доля таких генов, наивысшая среди низкоэкспрессированных генов, уменьшается с увеличением уровня экспрессии (рис. 6). Представленные распределения для 47 и 32 генов, выявленных без и с нормированием абсолютных значений экспрессии, качественно не отличаются. Как можно видеть, для генов, чьи транскрипты имеют представленность более 10 копий кДНК на клетку, 4-кратных изменений экспрессии между донорами не наблюдалось в обоих подходах. Следует отметить, что наблюдаемая для низкопредставленных транскриптов большая количественная вариабельность

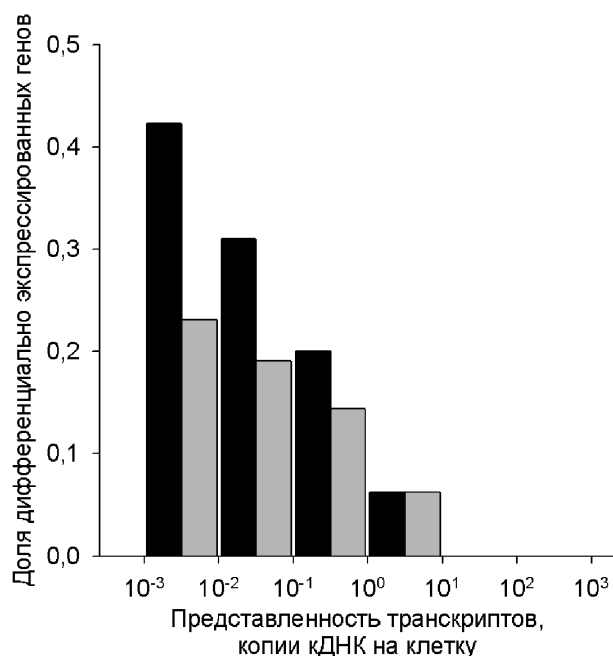


Рисунок 6. Распределение доли дифференциально экспрессированных генов по средней представленности транскриптов. Чёрные столбцы — гены, отобранные без нормирования абсолютных значений экспрессии генов, серые — с нормированием абсолютных значений экспрессии (в копиях кДНК на клетку).

не может быть отнесена на счёт процедуры пробоподготовки и ПЦР *per se*, так как их влияние скорее незначительно (табл. 2), а имеет биологическую природу. Вероятно, низкопредставленные транскрипты могут преимущественно кодировать белки, вовлечённые в регуляторные процессы, в силу чего их экспрессия меняется во времени в значительном диапазоне.

С целью выявления биологических процессов, в которых участвуют гены Xp18, дифференциально экспрессированные у разных доноров, полученные группы из 47 и 32 генов (дополнительные материалы, табл. S3) анализировали как описано в разделе МЕТОДИКА для выявления возможности их функциональной классификации в соответствующих терминах категорий онтологии генов. Однако нам не удалось выявить среди них статистически значимых групп генов, относящихся к определённым биологическим процессам. В отличие от этого, для генов, высоко экспрессированных в клетках HepG2 по сравнению с клетками печени (141 ген), ранее удалось выявить статистически значимые функциональные группы генов: “Клеточное деление” (GO:0051301), “Клеточный цикл” (GO:0022402), а также группы генов, вовлечённых в клеточные метаболические процессы (GO:0044267) и клеточную адгезию (GO:0098609) [3]. Первые две и последняя группы с очевидностью отражают тот факт, что, в отличие от гепатоцитов, клетки линии HepG2 являются активно пролиферирующими, причём данная линия относится к так называемым “субстрат-зависимым”, то есть растёт и делится при культивировании только при контакте с инертной поверхностью (как правило, стекло или пластик) [24]. Это может требовать, в том числе, и активного синтеза белков, участвующих в процессах клеточной адгезии. В случае ткани печени такого разительного контраста между гепатоцитами у разных доноров нет, и наблюдаемая дифференциальная экспрессия генов отражает, по-видимому, в основном временную реакцию клеток данного индивидуума на конкретные внешние стимулы.

Среди дифференциально экспрессированных генов в группе из 32 генов можно выделить восемь с особенно высокими различиями в представленности транскриптов — не менее чем 10-кратными по крайней мере для одной пары доноров. Так, экспрессия гена *CIDEA* (кодирует белок “cell death activator CIDE-A”) более чем в 16 и 60 раз выше у донора 1 по сравнению с донорами 2 и 3 соответственно. Экспрессия генов *MC5R*, *TNFRSF11A* и *CTIF* (кодируют белки “melanocortin receptor 5”, “tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A” и “CBP80/20-dependent translation initiation factor” соответственно) различается в 10-16 раз по крайней мере для одной пары доноров. Согласно базе данных UniProt (www.uniprot.org), белковые продукты вышеперечисленных генов вовлечены в разнообразные регуляторные процессы. Ген *ELOA3D* кодирует белок “elongin-A3 member D”, являющийся регулятором транскрипции — его экспрессия у доноров 2 и 3 отличалась более чем в 11 раз. Также высокие различия

в экспрессии (10- и 12-кратные) были обнаружены для генов *PIEZO2* и *CFAP53*, которые кодируют белки “piezo-type mechanosensitive ion channel component 2” и “cilia- and flagella-associated protein 53”, участвующие в ионном транспорте и процессах развития. В число генов с высокими различиями экспрессии также вошёл ген *GTSCR1* (11-кратное различие между донорами 1 и 2), кодирующий белок “Gilles de la Tourette syndrome chromosomal region candidate gene 1 protein”, чьи функции пока не определены. Таким образом, по меньшей мере 5 из 8 генов Xp18 с особенно высоким уровнем дифференциальной экспрессии вовлечены в регуляторные процессы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе на примере генов Xp18 человека проведён ПЦР-анализ межиндивидуальной вариабельности экспрессии генов в ткани печени. Хотя в целом количественные профили транскриптома Xp18, выраженные в количестве копий кДНК на единичную клетку, показывают высокую степень корреляции, экспрессия существенного количества генов (от 13% до 19% в зависимости от способа нормировки экспериментальных данных) различается более чем 4-кратно при попарном сравнении доноров. При этом доля дифференциально экспрессированных генов возрастает с понижением уровня их экспрессии. Более высокая количественная вариабельность низкопредставленных транскриптов имеет в основном не техническую, а биологическую причину. Распределение транскриптов по уровню их количественной представленности у всех исследованных доноров было унимодальным, в то время как в клетках линии HepG2 оно было бимодальным. В отличие от сравнения с клетками линии HepG2, биоинформатический анализ межиндивидуальной вариабельности дифференциальной экспрессии генов Xp18 в ткани печени человека не выявил каких-либо статистически значимых групп генов, относящихся к определённым биологическим процессам, что указывает на скорее временную природу межиндивидуальной вариабельности их экспрессии, вероятно отражающую реакцию клеток данного индивидуума на конкретные внешние стимулы в пределах некоторого временного интервала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол сбора образцов ткани печени человека был одобрен этическим комитетом Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова (протокол № 3 от 15.03.2018 г.). От представителей доноров было получено информированное согласие на проведение исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Adamski M.G., Gumann P., Baird A.E. (2014) PLoS One, **9**, e103917. DOI: 10.1371/journal.pone.0103917.
2. Gadkar V., Filion M. (2014) Curr. Issues Mol. Biol., **16**, 1-6.
3. Киселева Я.Ю., Птицын К.Г., Тихонова О.В., Радько С.П., Курбатов Л.К., Вахрушев И.В., Згода В.Г., Пономаренко Е.А., Лисица А.В., Арчаков А.И. (2017) Биомедицинская химия, **63**(2), 147-153. [Kiseleva Y.Y., Ptitsyn K.G., Tikhonova O.V., Radko S.P., Kurbatov L.K., Vakhrushev I.V., Zgoda V.G., Ponomarenko E.A., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2017) Biomeditsinskaya Khimiya, **63**(2), 147-153.] DOI: 10.18097/PBMC20176302147.
4. Киселева Я.Ю., Птицын К.Г., Радько С.П., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2016) Биомедицинская химия, **62**(4), 403-410. [Kiseleva Y.Y., Ptitsyn K.G., Radko S.P., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2016) Biomeditsinskaya Khimiya, **62**(4), 403-410.] DOI: 10.18097/PBMC20166204403.
5. Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Ponomarenko E.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Radko S.P., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2017) J. Proteome Res., **16**(12), 4311-4318.
6. Radko S.P., Poverennaya E.V., Kurbatov L.K., Ponomarenko E.A., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2019) J. Proteome Res., **18**(12), 4273-4276.
7. Zgoda V.G., Kopylov A.T., Tikhonova J.V., Moisa A.A., Pyndyk N.V., Farafonova T.E., Novikova S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Radko S.P., Khmeleva S.A., Kurbatov L.K., Filimonov A.D., Bogolyubova N.A., Ilgisonis E.V., Chernobrovkin A.L., Ivanov A.S., Medvedev A.E., Mezentshev Y.V., Moshkovskii S.A., Naryzhny S.N., Ilina E.N., Kostjukova E.S., Alexeev D.G., Tyakht A.V., Govorun V.M., Archakov A.I. (2013) J. Proteome Res., **12**(1), 123-134.
8. Ponomarenko E.A., Kopylov A.T., Lisitsa A.V., Radko S.P., Kiseleva Y.Y., Kurbatov L.K., Ptitsyn K.G., Tikhonova O.V., Moisa A.A., Novikova S.E., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Filimonov A.D., Bogolyubova N.A., Averchuk V.V., Karalkin P.A., Vakhrushev I.V., Yarygin K.N., Moshkovskii S.A., Zgoda V.G., Sokolov A.S., Mazur A.M., Prokhortchouck E.B., Skryabin K.G., Ilina E.N., Kostjukova E.S., Alexeev D.G., Tyakht A.V., Gorbachev A.Y., Govorun V.M., Archakov A.I. (2014) J. Proteome Res., **13**(1), 183-190.
9. Poverennaya E.V., Kopylov A.T., Ponomarenko E.A., Ilgisonis E.V., Zgoda V.G., Tikhonova O.V., Novikova S.E., Farafonova T.E., Kiseleva Y.Y., Radko S.P., Vakhrushev I.V., Yarygin K.N., Moshkovskii S.A., Kiseleva O.I., Lisitsa A.V., Sokolov A.S., Mazur A.M., Prokhortchouck E.B., Skryabin K.G., Kostjukova E.S., Tyakht A.V., Gorbachev A.Y., Ilina E.N., Govorun V.M., Archakov A.I. (2016) J. Proteome Res., **15**(11), 4030-4038.
10. Legrain P., Aebersold R., Archakov A., Bairoch A., Bala K., Beretta L., Bergeron J., Borchers C.H., Corthals G.L., Costello C.E., Deutsch E.W., Domon B., Hancock W., He F., Hochstrasser D., Marko-Varga G., Salekdeh G.H., Sechi S., Snyder M., Srivastava S., Uhlén M., Wu C.H., Yamamoto T., Paik Y.K., Omenn G.S. (2011) Mol. Cell. Proteomics, **10**(7), M111.009993. DOI: 10.1074/mcp.M111.009993.

11. Пономаренко Е.А., Згода В.Г., Копылов А.Т., Покоренная Е.В., Ильгисонис Е.В., Лисица А.В., Арчаков А.И. (2015) Биомедицинская химия, **61**(2), 169-175. [Ponomarenko E.A., Zgoda V.G., Kopylov A.T., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2015) Biomeditsinskaya Khimiya, **61**(2), 169-175.] DOI: 10.18097/PBMC20156102169.
12. Ilgisonis E., Vavilov N., Ponomarenko E., Lisitsa A., Poverennaya E., Zgoda V., Radko S., Archakov A. (2021) Front. Genet., **12**, 674534. DOI: 10.3389/fgene.2021.674534.
13. Donato M.T., Lahoz A., Castell J.V., Gomez-Lechon M.J. (2008) Curr. Drug. Metab., **9**(1), 1-11.
14. Deinichenko K., Krasnov G., Radko S., Ptitsyn K., Shapovalova V., Timoshenko O., Khmeleva S., Kurbatov L., Kiseleva Y., Ilgisonis E., Pyatnitskiy M., Poverennaya E., Kiseleva O., Vakhrushev I., Tsvetkova A., Buromski I., Markin S., Zgoda V., Archakov A., Lisitsa A., Ponomarenko E. (2021) Biomedical Chemistry: Research and Methods, **4**(1), e00144. DOI: 10.18097/BMCRM00144.
15. Krasnov G., Shkrigunov T., Radko S., Ptitsyn K., Shapovalova V., Timoshenko O., Khmeleva S., Kurbatov L., Kiseleva Y., Ilgisonis E., Kiseleva O., Vakhrushev I., Tsvetkova A., Buromski I., Markin S., Archakov A., Lisitsa A., Ponomarenko E. (2021) Data Brief., **36**, 107130. DOI: 10.1016/j.dib.2021.107130.
16. Riedel G., Rüdric U., Fekete-Drimusz N., Manns M.P., Vondran F.W., Bock M. (2014) PLoS One, **9**, e93031. DOI: 10.1371/journal.pone.0093031.
17. Eden E., Navon R., Steinfeld I., Lipson D., Yakhini Z. (2009) BMC Bioinformatics, **10**, 48. DOI: 10.1186/1471-2105-10-48.
18. Reimand J., Arak T., Adler P., Kolberg L., Reisberg S., Peterson H., Vilo J. (2016) Nucleic Acids Res., **44**(W1), W83-W89. DOI: 10.1093/nar/gkw199.
19. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., Mering C.V. (2019) Nucleic Acids Res., **47**(D1), D607-D613. DOI: 10.1093/nar/gky1131.
20. Wu J., Xiao J., Zhang Z., Wang X., Hu S., Yu J. (2014) Genomics Proteomics Bioinformatics. **12**(2), 57-63.
21. Tyakht A.V., Ilina E.N., Alexeev D.G., Ischenko D.S., Gorbachev A.Y., Semashko T.A., Larin A.K., Selezneva O.V., Kostryukova E.S., Karalkin P.A., Vakhrushev I.V., Kurbatov L.K., Archakov A.I., Govorun V.M. (2014) BMC Genomics, **15**, 1108. DOI: 10.1186/1471-2164-15-1108.
22. Payen V.L., Laverne A., Sarika N.A., Colonval M., Karim L., Deckers M., Najimi M., Coppieters W., Charlotiaux B., Sokal E.M., Taghdouini A.E. (2021) JHEP Reports, **3**(3), 100278. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100278.
23. Zhao B., Erwin A., Xue B. (2018) Genomics, **110**(1), 67-73.
24. Ditturi F., Mazzocca A., Fernando J., Papappicco P., Fabregat I., de Santis F., Paradiso A., Sabba C., Giannelli G. (2013) PLoS One, **8**, e67109. DOI: 10.1371/journal.pone.0067109.

Поступила в редакцию: 01. 07. 2021.
После доработки: 24. 08. 2021.
Принята к печати: 25. 08. 2021.

PCR ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF CHROMOSOME 18 GENES IN HUMAN LIVER TISSUE: INTERINDIVIDUAL VARIABILITY

O.S. Timoshenko¹, S.A. Khmeleva¹, E.V. Poverennaya¹, Y.Y. Kiseleva², L.K. Kurbatov¹, S.P. Radko^{1*}, I.V. Buromski³, S.S. Markin¹, A.V. Lisitsa¹, A.I. Archakov¹, E.A. Ponomarenko¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: radkos@yandex.ru

²Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Using human chromosome 18 (Ch18) genes as an example, a PCR analysis of the interindividual variability of gene expression in liver tissue was performed. Although the quantitative profiles of the Ch18 transcriptome, expressed in the number of cDNA copies per single cell, showed a high degree of correlation between donors (Pearson correlation coefficients ranged from 0.963 to 0.966), the expression of the significant number of genes (from 13% to 19%, depending on the method of experimental data normalization) varied by more than 4-fold when comparing donors pairwise. At the same time, the proportion of differentially expressed genes increased with a decrease in the level of their expression. It is shown that the higher quantitative variability of low-abundance transcripts is mainly not technical, but biological. Bioinformatic analysis of the interindividual variability of the differential expression of chromosome 18 genes in human liver tissue did not reveal any statistically significant groups of genes related to certain biological processes that indicated a rather transient nature of the interindividual variability of their expression, probably reflecting the response of cells of an individual to specific external stimuli.

Key words: transcriptome; quantitative PCR; chromosome 18; human liver tissue

Funding. The study was supported by the Program of Fundamental Research in the Russian Federation for the long-term period for 2021-2030.

Received: 01.07.2021, revised: 24.08.2021, accepted: 25.08.2021.