

РЕФЕРЕНСНЫЕ ГЕНЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. Л. Класс^{1,*}, А. Х. Алиева¹, М. М. Руденко¹, А. В. Лысенко², Г. И. Салагаев²,
М. И. Шадрина¹, П. А. Сломинский¹, Е. В. Филатова¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

*E-mail: ania.klass@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.03.2024 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 05.04.2024 г.

Активное изучение молекулярных механизмов возникновения и развития различных патологий сердца с помощью оценки экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени необходимо для решения проблемы поиска и выбора адекватных референсных генов. Проведен поиск наиболее стабильно экспрессирующихся потенциально референсных генов в прижизненных образцах миокарда пациентов с тяжелой сердечной недостаточностью, обусловленной гипертрофической кардиомиопатией или ишемической болезнью сердца. Анализ экспрессии генов проводился с помощью реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Оценка стабильности экспрессии генов проводилась с помощью ресурса RefFinder. Показано, что наиболее стабильно в миокарде человека при сердечной недостаточности экспрессируются гены *PSMD6*, *PSMD7*, *SARS1* и *AARS1*. В связи с этим рекомендуем включать их в панель генов при поиске и валидации потенциальных референсных генов для оценки экспрессии генов-кандидатов в тканях миокарда.

DOI: 10.56304/S1992722324602106

ВВЕДЕНИЕ

Изучение экспрессии генов — один из основных столпов современной молекулярной биологии. В комбинации с протеомным анализом это позволяет выяснить молекулярно-генетические механизмы, протекающие в клетке как в норме, так и при патологии. “Золотым стандартом” при изучении экспрессии генов является анализ относительных уровней транскриптов с помощью реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР в реальном времени. В последние десятилетия был разработан целый свод рекомендаций для планирования таких экспериментов [1]. Особое внимание уделяют так называемым референсным генам [2]. Основное требование, предъявляемое к таким генам, заключается в том, что их экспрессия должна быть постоянна вне зависимости от условий эксперимента или иметь очень низкий уровень вариабельности во всех изучаемых образцах. К сожалению, не найдено универсальных референсных генов, и в каждом случае необходимо подбирать специфичные референсные гены, стабильно экспрессирующиеся в условиях конкретного эксперимента.

В настоящее время ведутся активные исследования молекулярных механизмов возникновения и развития различных патологий сердца, поскольку знание патогенеза заболевания на клеточном и молекулярном уровнях позволяет разрабатывать более эффективную терапию. Особую актуальность представляет изучение заболеваний, приводящих к сердечной недостаточности, например ишемическая болезнь сердца (ИБС) и различные кардиомиопатии, в частности гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП). К сожалению, в силу малой доступности тканей сердца человека при жизни, очень ограничено количество работ, освещающих изменения экспрессии генов в сердце при жизни человека [3–5]. В связи с этим до сих пор существует проблема выбора адекватных референсных генов для подобного рода исследований [4]. Поэтому целью настоящей работы стал поиск наиболее стабильно экспрессирующихся потенциально референсных генов в прижизненных образцах миокарда пациентов с тяжелой сердечной недостаточностью, обусловленной ГКМП или ИБС.

Таблица 1. Клинические характеристики пациентов, вовлеченных в исследование

Клиническая характеристика	Количество пациентов
Клиническая смерть	0
Использование имплантируемого кардиовертера-дефибриллятора	0
История внезапной остановки сердца: инфаркт миокарда	1
Боль в груди: стенокардия, кардиалгия	8
Синкопа/история синкоп	3
Головокружение	2
Одышка	14
Шумы в сердце	10
Трепетания	10
Аномалии ЭКГ	15
Гипертония	9
I	0
II	9
III	5
IV	0

Примечание. I–IV – функциональный класс сердечной недостаточности.

МЕТОДЫ

Пациенты были отобраны в кардиохирургическом отделении лечения дисфункций миокарда и сердечной недостаточности ФГБНУ “РНЦХ им. академика Б.В. Петровского”. Выборка состояла из 15 неродственных друг другу пациентов из России. Пяти пациентам был поставлен диагноз ИБС, у остальных десяти была тяжелая форма ГКМП. Критерии отбора пациентов с ГКМП описаны в [6]. У двоих пациентов с ГКМП выявлен патогенный вариант rs397516037 в гене *MYBPC3*, приводящий к формированию стоп-кодона в 1233-м положении в белке. Средний возраст пациентов составил 56.5 ± 13.2 , соотношение полов было 9 : 6 (М : Ж). Клиническая характеристика исследованной выборки пациентов представлена в табл. 1. Письменное информированное согласие на участие в исследовании было получено от всех пациентов и членов их семей в соответствии с Хельсинкской декларацией. Исследование одобрено этическим комитетом Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”.

Образцы миокарда получены в ходе септальной миэктомии в случае ГКМП и аорто-коронарного шунтирования в случае ИБС. Сразу после иссечения образцы помещали в консервирующий раствор DNA/RNA-Shield (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA), выдерживали сутки при $+4^{\circ}\text{C}$ и замораживали при -20°C для транспортировки. После транспортировки образцы хранили при -80°C .

Выделение тотальной РНК из миокарда проводили с помощью с помощью реагента TRIzol (Invitrogen, USA) и набора Direct-zol™ RNA Mini-Prep (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA). Из-

мерение концентрации, оценку качества тотальной РНК, реакцию обратной транскрипции проводили, как описано в [7]. ПЦР проводили с использованием прибора QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific) и реактивов для ПЦР (“Синтол”, “Евроген”, “ДНК-Синтез”). В состав смеси для ПЦР входили: 0.2 мкл Taq-полимеразы (5 е.а./мкл), 3 мкл буферного раствора ($\times 10$), 3 мкл смеси дНТФ (по 2 нмоль/мкл каждого), 1.5 мкл MgCl_2 (25 нмоль/мкл), 1 мкл праймеров (10 пмоль/мкл), 1 мкл зондов (5 пмоль/мкл), 5 мкл кДНК (0.02 нг/мкл), до 30 мкл доводили ультрачистой водой. Условия амплификации следующие:

– 180 с при 95°C ;

– 45 циклов по 5 с при 95°C , 20 с при 60°C .

Все реакции повторяли трехкратно для каждой кДНК.

Праймеры и зонды были подобраны на основе последовательности генома человека в базе данных NCBI (первичная сборка GRCh38.p13). Последовательности праймеров и зондов описаны в [7]. Оценку экспрессии референсных генов проводили с использованием параметра “пороговый цикл” (Ct) и программного обеспечения MS Excel 2010 (Microsoft), Statistica 12 (StatSoft) и RefFinder tool [8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящей работе проведены поиск и анализ стабильности экспрессии потенциальных референсных генов в образцах миокарда человека, полученных в ходе хирургического лечения дисфункций миокарда и сердечной недостаточности у пациентов с ИБС и ГКМП.

Первым этапом работы по поиску оптимальных референсных генов-кандидатов для исследования их уровней экспрессии стал анализ литературы. Для этого в базе данных National Library of Medicine (NCBI) провели поиск по ключевым словам “Heart”, “Gene Expression Profiling”, “reference genes”, “normalization genes”, “housekeeping genes” с использованием фильтра “вид: человек”. Было сформировано несколько запросов. По запросу (“Heart” [Mesh]) AND “Gene Expression Profiling” [Mesh] AND (“reference genes” [tiab] OR “normalization genes” [tiab] OR normalization[tiab]) было получено 24 результата, по запросу (“Heart” [Mesh]) AND (“reference genes” [tiab] OR “normalization genes” [tiab]) – 19, по запросу “Heart” [Mesh] AND “housekeeping genes” [tiab] – 14. Всего было проанализировано 42 источника литературы. Кроме того, в анализ включили результаты подобного поиска, полученные в [7]. На данном этапе было отобрано 30 генов: *ACTB* [10], *GAPDH* [5, 10–13], *UBC* [10], *TPT1* [14], *SRP14* [14], *GUSB* [5], *IPO8* [4, 5], *POLR2A* [4, 5, 7, 15], *PPIA* [3, 5, 11, 16], *RPLP0* [5, 11], *YWHAZ* [3, 5], *RPL13A* [3], (*GPS1*, *PSMB2*) [15], (*RPL32*, *PGK1*) [17], (*RPL5*, *PSMB4*, *REEP5*, *RAB7A*) [12], (*TBP*, *HMBS*, *SDHA*) [16], (*BCAT2*, *SARS1*, *HPRT1*, *AARS1*, *PSMD6*, *PSMD7*, *POLR2F*, *PSMA5*) [7]. При этом учитывали минимальную вовлеченность белков, кодируемых этими генами, в непосредственное функционирование миокарда/саркомера. Особое внимание уделяли генам, принимающим участие в самых общих клеточных процессах.

Для отобранных генов оценивали наличие псевдогенов, поскольку при их существовании в геноме сложно гарантировать достаточную специфичность праймеров и зондов для анализа экспрессии этих генов с помощью ПЦР в реальном времени. Поэтому из дальнейшего анализа были исключены гены *ACTB*, *GUSB*, *PPIA*, *YWHAZ*, *RPL30*, *GAPDH*, *RPLP0*, *TPT1*, *IPO8*, *RPL13A*, *GPS1*, *RPL32*, *PGK1*, *RPL5* и *SDHA*.

Для оставшихся генов с помощью базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> был оценен уровень мРНК этих генов в сердце. Для анализа отбирали те гены, чей уровень экспрессии был сходным. Так, уровни мРНК генов *UBC*, *PSMB4*, *RAB7A*, *PGK1*, *SDHA* оказались слишком высокими, а уровни мРНК генов *IPO8*, *PSMB2*, *TBP*, *HMBS* – слишком низкими. При оценке относительной экспрессии генов интереса важно, чтобы уровни экспрессии генов интереса и референсных генов были близки, так как слишком большая разница (более чем в 10 раз) может искажать результаты расчетов относительных уровней экспрессии генов интереса.

В итоге был проведен анализ уровней мРНК генов *PSMD6*, *PSMD7*, *SARS1*, *HPRT1*, *PSMA5*, *POLR2A*, *AARS1*, *BCAT2*. На рис. 1 показаны дан-

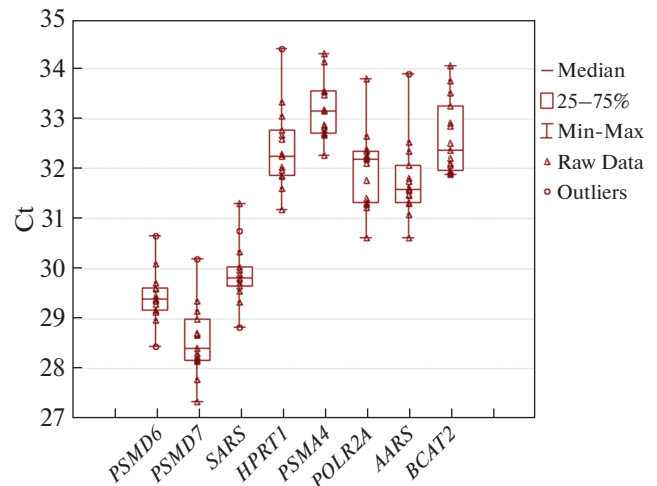


Рис. 1. Средние индивидуальные значения пороговых циклов ПЦР в реальном времени по каждому образцу для исследуемых генов. Ct – пороговый цикл, Median – медиана, 25–75% – квартили, Min–Max – минимальное и максимальное значения, Raw data – усредненные по трем повторам индивидуальные значения, Outliers – выбросы.

ные усредненные пороговых циклов для индивидуальных образцов по анализируемым генам.

Затем данные усредненных пороговых циклов для индивидуальных образцов были проанализированы с помощью ресурса RefFinder. Результаты представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, наиболее стабильно экспрессирующимися генами в данных условиях оказались *PSMD6*, *PSMD7*, *SARS1* и *AARS1*. Последовательности ген-специфичных праймеров и зондов для детекции транскриптов методом ПЦР в реальном времени представлены в табл. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на многолетние исследования, проблема выбора адекватных референсных генов для анализа относительной экспрессии генов интереса в самых разных экспериментах остается очень актуальной.

К сожалению, во многих работах по изучению экспрессии различных генов в миокарде до сих пор используют в качестве референсных такие гены, как *ACTB*, *YWHAZ* или *GAPDH* [3, 5, 10, 12, 13], даже несмотря на то, что для них многократно показана нестабильная экспрессия в различных экспериментальных условиях [4, 14, 18–21]. Кроме того, наличие большого количества псевдогенов у этих генов ставит под сомнение качество нормализации таких экспериментов, поскольку ни один из методов выделения РНК не гарантирует полного отсутствия геномной ДНК в образце тотальной РНК. Поэтому из анализа намеренно

Таблица 2. Порядок ранжирования исследуемых генов по методам, используемым ресурсом RefFinder

Порядок ранжирования: лучший—хороший—средний	Метод (параметр)				
	Delta CT (STDEV)	Best-Keeper (std dev)	Norm-finder (Значение стабильности)	Genorm (Значение стабильности)	Рекомендуемый комплексный рейтинг
1	<i>PSMD7</i> 0.463	<i>PSMD6</i> 0.35	<i>PSMD7</i> 0.239	<i>SARS1</i> <i>AARS1</i> 0.335	<i>PSMD6</i> 1.861
2	<i>PSMD6</i> 0.474	<i>SARS1</i> 0.51	<i>PSMD6</i> 0.277		<i>PSMD7</i> 2
3	<i>AARS1</i> 0.5	<i>PSMA5</i> 0.39	<i>AARS1</i> 0.334	<i>PSMD6</i> 0.397	<i>SARS1</i> 2.515
4	<i>SARS1</i> 0.534	<i>PSMD7</i> 0.6	<i>POLR2A</i> 0.396	<i>PSMD7</i> 0.432	<i>AARS1</i> 2.59
5	<i>POLR2A</i> 0.543	<i>AARS1</i> 0.47	<i>SARS1</i> 0.398	<i>POLR2A</i> 0.458	<i>POLR2A</i> 4.949
6	<i>HPRT1</i> 0.564	<i>POLR2A</i> 0.58	<i>HPRT1</i> 0.431	<i>HPRT1</i> 0.485	<i>HPRT1</i> 6.236
7	<i>BCAT2</i> 0.581	<i>HPRT1</i> 0.51	<i>BCAT2</i> 0.459	<i>BCAT2</i> 0.512	<i>PSMA5</i> 6.26
8	<i>PSMA5</i> 0.59	<i>BCAT2</i> 0.62	<i>PSMA5</i> 0.479	<i>PSMA5</i> 0.531	<i>BCAT2</i> 7.238

Таблица 3. Последовательности ген-специфичных праймеров и зондов для детекции транскриптов методом ПЦР в реальном времени

Ген	Олигонуклеотидные последовательности (прямой праймер, обратный, зонд)
<i>PSMD6</i> NM_001271779.1	5'-AACACAGAAAAGGCCAAAAGCTTAAT-3' 5'-AATAGCCACACAATAAAGACCCTGAT-3' 5'-FAM-AGGCGGTTTCTCCTGTCCCAGTCTCCTC-BHQ1-3'
<i>PSMD7</i> NM_002811.4	5'-TGTCCTAATTCCGTATTGGTCATCATTG-3' 5'-CGTGTTCAAATGTTTTCGAGGTTGG-3' 5'-FAM-GCTTCTGTAGGCAGCCCTAGGTCCTTCGG-BHQ1-3'
<i>SARS1</i> NM_001330669.1	5'-CCCAGCCCTCATCCGAGAG-3' 5'-TGTTCAAGTTGTCTGCCCCGAAATC-3' 5'-VIC-TCGCCACTCGCTGTCTGCCTTCACCA-BHQ2-3'
<i>AARS1</i> NM_001605.2	5'- CGGCAGCGATTTATAGATTTCTTCAAG-3' 5'- GGTGAGATGGGTCAATTGTGTTCA-3' 5'-FAM-TATGTTCACTCGTCTGCCACCATCCCAT-BHQ1-3'

исключили целый ряд генов, для которых было показано большое количество псевдогенов в геноме.

Еще одним критерием отбора генов для анализа стал уровень мРНК генов в различных тканях. Внимание решили сконцентрировать на генах со средним и сходным в большинстве тканей уровнем экспрессии, поскольку такие гены с большей вероятностью могут оказаться “универсальными” референсными генами. Кроме того, данный подход частично решает проблему тканеспецифичной экспрессии потенциального референсного гена [22].

Также важным критерием отбора потенциальных референсных генов для анализа относительно

ной экспрессии генов интереса является анализ их вовлеченности в специфичные для тканей, отобранных в эксперимент, клеточные процессы. Например, было показано, что *ACTB* может принимать участие в патогенезе сердечной недостаточности [4], поскольку данный белок участвует в формировании цитоскелета [23]. Аналогично из выполненного анализа был исключен ген *REEP5*, поскольку белок, кодируемый им, расположен в канальцевой сети эндоплазматического ретикулума и непосредственно участвует в регуляции организации сарко-эндоплазматического ретикулума и клеточных стрессовых реакциях в кардиомиоцитах [24].

С другой стороны, гены белков, катализирующих перенос аминокислот на тРНК, экспрессируются во всех тканях организма, где проходит активный синтез белка. В связи с этим такие гены, как *SARS1* и *AARS1*, могут оказаться наиболее стабильно экспрессирующимися в подавляющем большинстве тканей. То же самое может быть применимо к генам *PSMD6*, *PSMD7*, *PSMA5*, *POLR2A*, поскольку *PSMD6*, *PSMD7*, *PSMA5* кодируют субъединицы протеасом, а *POLR2A* – субъединицу РНК-полимеразы.

Тем не менее не все гены “домашнего хозяйства” могут оказаться достаточно стабильно экспрессирующимися в выбранных экспериментальных условиях. Так, изученные гены *HPRT1*, *POLR2A* и *BCAT2* в использованных образцах оказались менее стабильными. Это также было продемонстрировано в работах [3–5, 11, 16, 17]. Более того, для *BCAT2* показано участие в патологических процессах в миокарде [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ стабильности экспрессии ряда потенциальных референсных генов показал, что наиболее стабильно в миокарде человека при сердечной недостаточности экспрессируются гены *PSMD6*, *PSMD7*, *SARS1* и *AARS1*. Более того, продемонстрировано, что при планировании экспериментов по изучению изменений экспрессии генов всегда нужно проводить поиск и тщательно отбирать адекватные референсные гены для нормализации экспрессионных данных.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00243) и частично в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bustin S.A., Benes V., Garson J.A. et al. // Clin. Chem.* 2009. V. 55 (4). P. 611.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
2. *Kozera B., Rapacz M. // J. Appl. Genet.* 2013. V. 54 (4). P. 391.
<https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
3. *Caselli C., D'Amico A., Caruso R. et al. // Cytokine.* 2013. V. 63 (2). P. 113.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.04.021>
4. *Červenák Z., Červenák F., Adamičková A. et al. // BMC Cardiovasc. Disord.* 2022. V. 22 (1). P. 180.
<https://doi.org/10.1186/s12872-022-02614-9>
5. *Molina C.E., Jacquet E., Ponien P. et al. // Cardiovasc. Res.* 2018. V. 114 (2). P. 247.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvx182>
6. *Filatova E.V., Krylova N.S., Vlasov I.N. et al. // Mol. Genet. Genomic Med.* 2021. V. 9 (11). P. e1808.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.1808>
7. *Alieva A.K., Filatova E.V., Rudenok M.M. et al. // Cells.* 2021. V. 10 (9). P. 2252.
<https://doi.org/10.3390/cells10092252>
8. *Xie F., Xiao P., Chen D., et al. // Plant. Mol. Biol.* 2012. V. 80 (1). P. 75.
<https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
9. *Xie F., Wang J., Zhang B. // Funct. Integr. Genomics.* 2023. V. 23 (2). P. 125.
<https://doi.org/10.1007/s10142-023-01055-7>
10. *Harrison O.J., Moorjani N., Torrens C. et al. // PLoS ONE.* 2016. V. 11 (10). P. e0164329.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164329>
11. *Pérez S., Royo L.J., Astudillo A. et al. // BMC Mol. Biol.* 2007. V. 8 (1). P. 114.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-114>
12. *Li M., Rao M., Chen K. et al. // Gene.* 2017. V. 620. P. 30.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.04.006>
13. *González-Herrera L., Valenzuela A., Marchal J.A. et al. // Forensic. Sci. Int.* 2013. V. 232 (1). P. 218.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.08.001>
14. *Pilbrow A.P., Ellmers L.J., Black M.A. et al. // BMC Med. Genomics.* 2008. V. 1 (1). P. 64.
<https://doi.org/10.1186/1755-8794-1-64>
15. *Lakics V., Karran E.H., Boess F.G. // Neuropharmacology.* 2010. V. 59 (6). P. 367.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.05.004>
16. *Koppelkamm A., Vennemann B., Fracasso T. et al. // Int. J. Legal. Med.* 2010. V. 124 (5). P. 371.
<https://doi.org/10.1007/s00414-010-0433-9>
17. *Brattelid T., Winer L.H., Levy F.O. et al. // BMC Mol. Biol.* 2010. V. 11 (1). P. 22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-22>
18. *Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A. et al. // BioTechniques.* 2004. V. 37 (1). P. 112.
<https://doi.org/10.2144/04371RR03>
19. *Ruiz-Villalba A., Mattiotti A., Gunst Q.D. et al. // Sci. Rep.* 2017. V. 7 (1). P. 24.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00043-9>
20. *Li Q., Hu T., Chen L. et al. // Mol. Med. Rep.* 2015. V. 11 (1). P. 393.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2750>
21. *Simmons A.D., Palecek S.P. // Tissue Eng. C. Methods.* 2021. V. 27 (5). P. 322.
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2021.0023>
22. *Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. // Genome Biol.* 2002. V. 3 (7).
<https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
23. *Pollard T.D., Cooper J.A. // Science.* 2009. V. 326 (5957). P. 1208.
<https://doi.org/10.1126/science.1175862>
24. *Lee S.H., Hadipour-Lakmehsari S., Murthy H.R. et al. // Nat. Commun.* 2020. V. 11 (1). P. 965.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-14143-9>
25. *Portero V., Nicol T., Podliesna S. et al. // Cardiovasc. Res.* 2022. V. 118 (7). P. 1742.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvab207>