

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.214.6

**ВЫБОР ЭНДОГЕННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ
ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА#**

© 2013 г. S. W. Fong¹, S. Ibrahim², M. S. Mohamed³, L. L. Few¹, W. C. S. Too¹, B. Y. Khoo⁴,
Z. Yussof², A. R. A. Rahman⁵, G. B. Yvonne-Tee^{1*}

¹School of Health Sciences, University Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia

²School of Medical Sciences, University Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia

³Department of Cardiology, Hospital Sultanah Nur Zahirah, 20400 Kuala Terengganu Terengganu, Malaysia

⁴Institute for Research in Molecular Medicine (INFORMM), University Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia

⁵Cyberjaya University College of Medical Sciences, 63000 Cyberjaya, Selangor, Malaysia

Поступила в редакцию 26.07.2012 г.

Принята к печати 15.08.2012 г.

Выбор стабильно экспрессируемых эндогенных контрольных генов исключительно важен для нормирования данных количественной ПЦР в реальном времени. В представленной работе отобран набор генов, которые могут использоваться в качестве внутреннего контроля при анализе экспрессии генов в образцах периферической крови больных ишемической болезнью сердца. У пяти больных ишемической болезнью сердца и у пяти больных стабильной стенокардией определены уровни экспрессии 12 эндогенных контрольных генов, предлагаемых Биоцентром ТАТАА (Гетеборг, Швеция). Стабильность экспрессии оценивали с использованием двух пакетов программ – geNorm и NormFinder. Показано, что лучший (наиболее стабильный) эндогенный контроль – ген β -глюкуронидазы, за ним следует ген гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы. Программой NormFinder подтверждено, что в проанализированном наборе, состоящем из контрольных генов, а также гена кислого рибосомного белка P0 60S субчастиц, наиболее стабильно экспрессируются гены этих двух ферментов. Оказалось, что уровень экспрессии гена 18S рРНК значительно варьирует у больных ишемической болезнью сердца. Мы рекомендуем использовать гены β -глюкуронидазы и гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы в качестве референсных для точного нормирования относительных уровней экспрессии генов, измеряемых с использованием ПЦР в реальном времени, у больных ишемической болезнью сердца. Ген 18S рРНК не следует использовать в качестве контрольного.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, ишемическая болезнь сердца, стабильная стенокардия, периферическая кровь, эндогенные контрольные гены, экспрессия генов.

IDENTIFICATION OF ENDOGENOUS CONTROL GENES FOR GENE EXPRESSION STUDIES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE, by Siew Wai Fong¹, Suhairi Ibrahim², Mohd Sapawi Mohamed³, Ling Ling Few¹, Wei Cun See Too¹, Boon Yin Khoo⁴, Zurkurnai Yusof², Abdul Rashid Abdul Rahman⁵, Get Bee Yvonne-Tee^{1*} (¹School of Health Sciences, University Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia, *e-mail: Yvonne@kb.usm.my; ²School of Medical Sciences, University Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia; ³Department of Cardiology, Hospital Sultanah Nur Zahirah, 20400 Kuala Terengganu Terengganu, Malaysia; ⁴Institute for Research in Molecular Medicine (INFORMM), University Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia; ⁵Cyberjaya University College of Medical Sciences, 63000 Cyberjaya, Selangor, Malaysia). The selection of stable endogenous control genes is critical for normalization of quantitative real-time PCR (qPCR) data. In this study, we aimed to identify a suitable set of control genes to be used as endogenous references for gene expression evaluation in human peripheral blood samples among coronary artery disease patients. The expression levels of 12 endogenous control genes procured from TATAA Biocenter (Goteborg, Sweden) were measured in five acute coronary syndrome patients and five chronic stable angina patients. Gene expression stability was analyzed using two different software applications i.e geNorm and NormFinder. Results suggested that β -glucuronidase is the most stable endogenous control, followed by hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. The NormFinder analysis further confirmed that β -glucuronidase and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase were on

Текст был представлен авторами на английском языке.

* Эл. почта: Yvonne@kb.usm.my

the first rank order with the most stable expression among endogenous control genes analyzed and 60S acidic ribosomal protein P0. Besides this, the expression levels of 18S rRNA were revealed to be highly variable between coronary heart disease patients. We thus recommend the use of β -glucuronidase and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as reference genes for accurate normalization of relative quantities of gene expression levels in coronary artery disease patients using qPCR. Also the use of 18S rRNA as a control gene should be avoided.

Keywords: acute coronary syndrome, chronic stable angina, coronary artery disease, peripheral blood, endogenous control gene, gene expression.

DOI: 10.7868/S0026898413020067

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ишемическая болезнь сердца (ИБС) занимает первое место в структуре смертности в развивающихся странах. Самое опасное проявление ИБС – острый коронарный синдром (ОКС), развитие которого обычно обусловлено образованием в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек, что приводит к формированию тромбов [1]. Количественное определение экспрессии генов в образцах крови считается наиболее удобным способом изучения патофизиологических процессов, лежащих в основе ОКС. Более того, цельная кровь человека представляет собой доступный источник РНК, пригодной для изучения патогенеза ОКС, поскольку компоненты крови поддерживают гомеостаз, влияют на иммунные и воспалительные процессы [2] или действуют как посредники стрессовых сигналов [3, 4] и межклеточных взаимодействий, опосредуемых медиаторами воспаления [5, 6].

Наиболее часто для определения экспрессии генов используют количественную ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Этот метод обеспечивает широкий динамический диапазон измерений, отличается чрезвычайно высокой чувствительностью, не требует или почти не требует постаmplификационной обработки образцов и поддается масштабированию анализа образцов [7]. Стратегии количественного анализа результатов ПЦР-РВ позволяют определять как абсолютные, так и относительные уровни экспрессии генов-мишеней. При нормировании относительных данных с целью коррекции различий между образцами (количество и качество исходного материала, методики выделения РНК, эффективность обратной транскрипции) используют эндогенные контрольные гены. Идеальные эндогенные контрольные гены должны стабильно и на постоянном уровне экспрессироваться в исследуемых клетках и тканях независимо от условий эксперимента и статуса заболевания. Результаты нормирования с использованием только одного гена могут отклоняться от истинных значений, поэтому Vandessompele и соавт. [8] предложили метод нормирования, в котором для повышения точности

относительных количественных результатов ПЦР-РВ применяют среднее геометрическое результатов, полученных для нескольких эндогенных контрольных генов.

В настоящей работе мы попытались оценить экспрессию 12 эндогенных контрольных генов в образцах периферической крови больных стабильной стенокардией (СС) и больных с ОКС (с нестабильными атеросклеротическими бляшками). Стабильность экспрессии эндогенных контрольных генов анализировали при помощи программ *geNorm* и *NormFinder*. Для валидации результатов выбрали экспрессию гена миелопероксидазы (МРО), по отношению к которому оценивали влияние потенциальных эндогенных контрольных генов на нормирование данных ПЦР-РВ. Этот выбор был основан на ранее установленной роли МРО в образовании нестабильных бляшек. МРО считается маркером воспаления и окислительного стресса, повышенных, как неоднократно показано, при ОКС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коллекция образцов крови. Перед началом работы было получено разрешение Этического комитета университета Sains (Human Research Ethics Committee, University Sains Malaysia). Для выбора лучших контрольных генов использовали образцы крови пяти больных ОКС и пяти больных СС, которым должны были проводить ангиопластику. Образцы крови 20 больных (10 ОКС и 10 СС) использовали для определения уровня экспрессии гена *МРО*. После получения информированного согласия по 5 мл периферической венозной крови отобрали в ВД-вакутейнеры, содержащие раствор EDTA.

Выделение суммарной РНК и синтез кДНК. Суммарную РНК выделяли из ~1.5 мл периферической венозной крови с использованием набора *QIA amp RNA Blood Mini Kit* (“*QIAGEN*”). Генетическую ДНК удаляли при помощи ДНКазы I, свободной от РНКазы (“*QIAGEN*”). Оценивали качество и целостность выделенной РНК. Затем 1 мкг РНК обрабатывали обратной транскриптазой, используя смесь праймеров, состоящую из олиго-dT и случайных праймеров из набора для

синтеза первой цепи кДНК для обратной транскрипции–ПЦР (“Fermentas”, США).

Отбор референсных генов и РВ-ПЦР. Уровни экспрессии 12 генов — *GADPH*, *TUBB*, *PPIA*, *ACTB*, *YWHAZ*, *RRN18S*, *B2M*, *GUSB*, *UBC*, *TBP*, *RPLP* и *HPRT1* (Human Endogenous Control Gene Panel, предоставленная Биоцентром ТАТАА; Гетеборг, Швеция) — определяли в 96-луночных планшетах, используя систему ABI Prism 7500 Sequence Detection System (“Applied Biosystems”, США). Около 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг кДНК, подвергали процедуре ПЦР-РВ. По завершении амплификации для подтверждения специфичности продукта сразу же анализировали кривые плавления. Каждый образец анализировали в трех повторностях.

Эффективность ПЦР-амплификации. При построении калибровочной кривой использовали пул растворов кДНК 10 больных, из которого готовили шесть серийных разведений, начиная со 100 нг. Эффективность ПЦР для каждого эндогенного контрольного гена рассчитывали по формуле $E = (10 - 1/\kappa - 1) \times 100$, где κ — наклон кривой.

Анализ данных. В программе geNorm используется алгоритм расчета меры стабильности экспрессии генов (M). Значение M определяется как средняя попарная вариация экспрессии данного гена по сравнению со всеми другими контрольными генами. Следовательно, чем выше значение M , тем менее стабилен уровень экспрессии гена. Программа geNorm ранжирует гены в соответствии со стабильностью экспрессии, путем последовательного исключения генов с наибольшими значениями M . Факторы нормирования (NF_n), основанные на средней геометрической величине уровней экспрессии набора лучших референсных генов, рассчитывали путем последовательного исключения дополнительных менее стабильно экспрессирующихся референсных генов, чтобы определить, сколько референсных генов следует использовать. Для сравнения полученных результатов использовали другую программу — NormFinder, основанную на другом алгоритме инструмент для идентификации оптимальных референсных генов в наборе генов-кандидатов.

Уровень экспрессии гена *MPO* определяли у 10 больных СС и 10 больных ОКС. Относительный уровень экспрессии гена *MPO* рассчитывали по отношению к двум идентифицированным эндогенным контрольным генам с использованием программы Microsoft Excel (Microsoft office 2007). Применяли метод $\Delta\Delta Ct$. $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{гена-мишени в анализируемом образце}} - Ct_{\text{эндогенного контрольного гена в анализируемом образце}}) - (Ct_{\text{гена-мишени в калибровочном образце}} - Ct_{\text{эндогенного контрольного гена в калибровочном образце}})$. В случае более одного эндогенного контрольного гена кратность измене-

ний экспрессии рассчитывали, используя среднее геометрическое значение, относительно калибровочного образца с самым низким уровнем экспрессии. Для сравнения уровней экспрессии гена *MPO* при ОКС и СС использовали независимый t -тест. Значения P менее 0.05 считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Контроль качества и эффективности амплификации

Суммарную РНК успешно выделяли из ядерных клеток крови. кДНК синтезировали на образцах РНК. Отношение A_{260}/A_{280} во всех образцах РНК варьировало в диапазоне 1.82-2. Для ПЦР-РВ использовали метод 84BR Green, специфичность амплификации 12 генов, проанализированных в 10 образцах, подтверждалась появлением одного пика на кривой плавления. Определяли эффективность ПЦР для каждого гена, чтобы удостовериться в соответствии результатов 12 ПЦР-амплификаций — коэффициенты корреляции (r^2) составляли 0.95–0.99. Эффективность амплификации варьировала в пределах 99.55–115.38%.

Уровни экспрессии эндогенных контрольных генов-кандидатов

Обнаружены значительные различия в уровне экспрессии 12 контрольных генов, величина Ct варьировала от 6.76 до 30.58. Наиболее представленными были транскрипты гена 18S рРНК ($Ct = 7.64 \pm 0.55$), за которыми следовали транскрипты *B2M* (14.71 ± 0.72), *ACTB* (16.00 ± 1.01), *UBC* (18.72 ± 0.54), *GAPDH* (19.16 ± 0.96), *YWHAZ* (19.70 ± 1.01), *RPLP* (20.55 ± 0.87), *PPIA* (20.87 ± 0.82), *GUSB* (23.98 ± 0.85), *TBP* (24.44 ± 0.64), *HPRT1* (25.60 ± 0.89) и *TUBB* (29.05 ± 1.13).

Определение стабильности экспрессии эндогенных контрольных генов

Стабильность экспрессии эндогенных контрольных генов в образцах периферической крови больных ИБС анализировали, используя программы geNorm и NormFinder. Программа geNorm ранжирует эндогенные контрольные гены по величине значений M . Эта программа анализирует данные путем ступенчатого (последовательного) исключения генов с самым высоким значением M и пересчитывает значения M оставшихся генов, оставляя два гена с наиболее стабильной экспрессией. Наиболее стабильно экспрессируемыми оказались гены *GUSB* и *HPRT*.

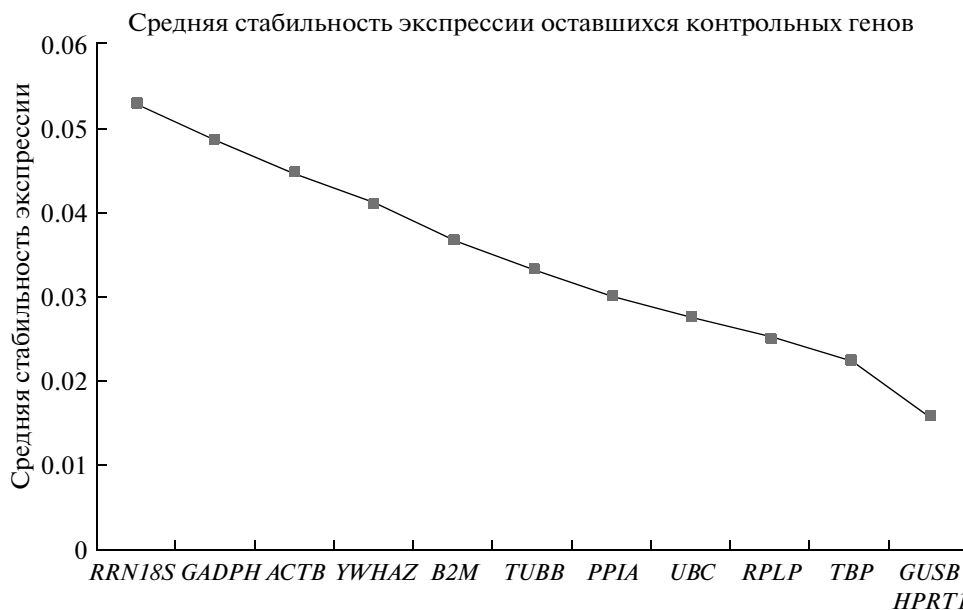


Рис. 1. Средние значения стабильности экспрессии (M) референсных генов-кандидатов. Средние значения стабильности экспрессии (M) контрольных генов в ходе последовательного (поэтапного) исключения наименее стабильно экспрессирующихся референсных генов. Гены расположены в порядке убывания значений M , вычисленных программой geNorm, — от гена с менее стабильной экспрессией до гена с наиболее стабильной экспрессией.

Напротив, ген *RRN18S* проявил себя как ген с наименее стабильной экспрессией (рис. 1).

Кроме того, с использованием geNorm рассчитан фактор нормирования (NF) для определения оптимального числа референсных генов. Сначала рассчитали NF для двух наиболее стабильных генов, а затем попарные вариации (V) между NF_n и $NF_n + 1$. По нашим данным, при добавлении третьего гена к двум наиболее стабильным эндогенным контрольным генам, *GUSB* и *HPRT1*, значение V составило 0.008 (меньше точки исключения 0.15), что указывало на отсутствие необходимости использовать дополнительные референсные гены для нормирования результатов (данные не приведены). Программа NormFinder рассчитывает стабильность значений на основе анализа внутригрупповых вариаций и учитывает, если необходимо, межгрупповые вариации. Эндогенные контрольные гены располагаются в соответствии со значениями стабильности их экспрессии. По данным программы NormFinder наиболее стабильно экспрессируется ген *GUSB* ($M = 0.007$), а наименее — ген *RRN18S* ($M = 0.017$). Программа NormFinder выявила также лучшую комбинацию двух генов — *GUSB* и *HPRT1*.

Нормирование уровней экспрессии гена *MPO*

На рис. 2 показаны относительные уровни экспрессии генов (кратность изменения) у больных ОКС и СС, нормированные с использованием

двух эндогенных контролей (*HPRT1* и *GUSB*). Результаты, представленные на рис. 2, указывают на значительное увеличение уровня экспрессии гена *MPO* у больных ОКС по сравнению с больными СС (10.33 ± 9.90 против 3.16 ± 2.16).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе предпринята попытка создать панель эндогенных контрольных генов, подходящих для нормирования результатов определения при помощи ПЦР-РВ экспрессии генов в периферической крови больных ИБС. До недавнего времени не было сообщений об использовании ПЦР-РВ для изучения экспрессии генов при этом заболевании. В программе geNorm используется метод анализа попарных вариаций, в котором контрольные гены отбирают на основе средних геометрических значений уровней экспрессии. Таким образом, этот метод пригоден для идентификации по меньшей мере двух контрольных генов, которые имеют лучшие средние геометрические значения, вместо одного [8]. В программе NormFinder подгруппы анализируются по отдельности, и определяются внутри- и межгрупповые вариации в уровнях экспрессии. При помощи такого подхода рассчитываются значения стабильности экспрессии генов-кандидатов [9], и выбирается контрольный ген с наиболее стабильной экспрессией (наименее вариабельной) как при внутри-, так и при межгрупповом сравнении.

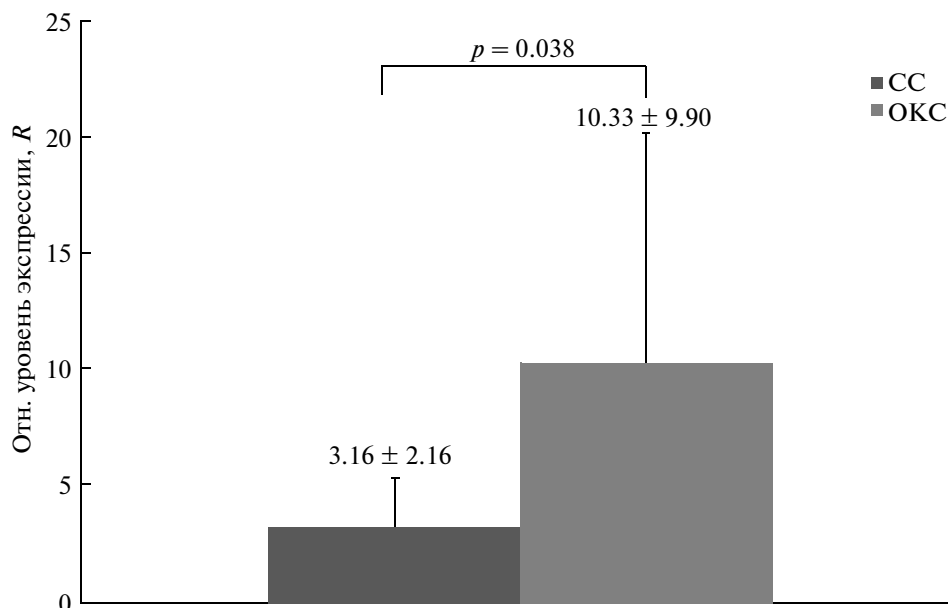


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии (R) гена *MPO* (кратность изменений) в образцах периферической крови больных острым коронарным синдромом и стабильной стенокардией. Приведены средние значения \pm SD. Существенные различия выявлены с использованием для нормирования комбинации генов *HPRT1* и *GUSB*.

В панели из 12 контрольных генов, использованной нами, программой geNorm отобраны два гена с наиболее стабильной экспрессией *GUSB* и *HPRT1*, за которыми следует ген *TBP*. Геном с наименее стабильной экспрессией признан *RRN18S*. Для определения оптимального числа эндогенных контрольных генов использовали значение точки исключения, установленное при анализе попарных вариаций [8]. Оказалось, что добавление к *GUSB* и *HPRT* третьего гена не приводит к получению более точных результатов. При помощи geNorm показано, что использование пары генов *GUSB* и *HPRT* в качестве эндогенного контроля при проведении ПЦР-РВ позволяет получить адекватные результаты.

Сообщалось, что патологические изменения клеток эпителия и фибробластов молочной железы могут влиять на экспрессию рРНК [10]. В нашей работе установлено, что транскрипция гена 18S рРНК изменяется в периферической крови больных ИБС. Эти данные подтверждают, что рРНК не может служить эндогенным контролем при проведении ПЦР-РВ образцов, полученных от больных ИБС.

Кроме того, согласно [11], уровень экспрессии мРНК *GADPH* широко варьирует в ядерных клетках крови больных раком толстой и прямой кишки. Мы также подтвердили, что еще один ген, нестабильно экспрессируемый в периферической крови больных ИБС, это ген *GADPH*.

Сходные результаты получены и при использовании программы NormFinder: в качестве наи-

более стабильных контрольных генов отобраны *GUSB*, *TBP* и *HPRT*, а наименее стабильным назван *RRN18S*, что в целом хорошо согласуется с результатами программы geNorm. Это предопределило окончательный выбор двух эндогенных контрольных генов – *GUSB* и *HPRT* – для разработки в дальнейшем способа молекулярной диагностики ИБС и исключило использование гена *RRN18S* в качестве контрольного.

Применив комбинацию генов *GUSB* и *HPRT1* для нормирования данных ПЦР-РВ мы установили, что уровень экспрессии гена *MPO* у больных ОКС значительно выше, чем у больных СС ($P < 0.05$). Это еще раз подтвердило правильность выбора пары эндогенных контрольных генов для нормирования данных ПЦР-РВ.

Суммируя результаты представленной работы, мы рекомендуем использовать *GUSB* и *HPRT1* в качестве эндогенных контрольных генов для точного нормирования данных ПЦР-РВ при изучении экспрессии генов в образцах периферической крови больных ИБС. Этот вывод подтвержден при помощи точного измерения уровня экспрессии гена *MPO*.

Авторы выражают благодарность Министерству науки, технологий и инноваций Малайзии за финансовую поддержку из средств Национального научного фонда.

Работа поддержана исследовательским университетским грантом (University Sains Malaysia, 1001/PPSK/812016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schroeder A.P., Falk E. 1996. Pathophysiology and inflammatory aspects of plaque rupture. *Cardiol. Clin.* **14**, 211–220.
2. Oppenheimer S.J., Hill A.V., Gibson F.D., Macfarlane S.B., Moody J.B., Pringle J. 1987. The interaction of alpha thalassaemia with malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**, 322–326.
3. Kurrer M.O., Kopf M., Penninger J.M., Eriksson U. 2002. Cytokines that regulate autoimmune myocarditis. *Swiss Med. Wkly.* **132**, 408–413.
4. Mann D.L. 2003. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 81–101.
5. Rivest S. 1999. What is the cellular source of prostaglandins in the brain in response to systemic inflammation? Facts and controversies. *Mol. Psychiatry.* **4**, 500–507.
6. Anisman H., Merali Z. 2002. Cytokines, stress, and depressive illness. *Brain. Behav. Immun.* **16**, 513–524.
7. Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* **39**, 75–85.
8. Vandesompele J., de Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., de Paepe A. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034.
9. Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–5250.
10. Spanakis E. 1993. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3809–3819.
11. Bustin S.A., Gyselman V.G., Williams N.S., Dorudi S. 1999. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer.* **79**, 1813–1820.