АЛГОРИТМ ПОШУКУ ТКАНИНОСПЕЦИФІЧНИХ ГЕНІВ, ПРОДУКТИ ЯКИХ СЕКРЕТУЮТЬСЯ У КРОВ, НА ПРИКЛАДІ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ

Кукуруза Є.О.[1], Лихенко О.К.[2], Оболенська М.Ю.[2]
[1]КПІ ім. Ігоря Сікорського, kukuruza.yevhenii@lll.kpi.ua
[2]Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Вступ. Пошук тканиноспецифічних маркерів, які секретуються в кров, був, є і залишається актуальним для медицини. В роботі було зосереджено увагу на плаценті людини, порушення функцій якої пов'язані з кількома ускладненнями вагітності (викидні, прееклампсія, затримка внутрішньоутробного росту). Особливо важливим пошук маркерів є у разі прееклампсії, яка є поширеною у світі (2-8% усіх вагітностей) та спричиняє від 9 до 26% материнських смертей [1]. Діагностика ускладнення базується на клінічних симптомах, таких як прогресуюче підвищення артеріального тиску і протеїнурія, які з'являються після 20-го тижня вагітності. Надійна рання діагностика відсутня. Існуючі методи мають незадовільну специфічність та чутливість [2].

Метою нашою роботи є розробка методу пошуку тканиноспецифічних маркерів на основі аналізу диференційно експресованих генів між другим і першим триместрами неускладненої вагітності; використання даного методу для визначення генів, які кодують плацентоспецифічні білки крові.

Матеріали та методи. Для пошуку генів, які кодують плацентоспецифічні секреторні білки, було використано перелік із 266 диференційно експресованих генів між другим і першим триместрами неускладненої вагітності із абсолютним значенням кратності зміни експресії $|\lg \mathrm{FC}| > 1,0$. Цей перелік було отримано раніше внаслідок інтегративного аналізу експресії генів у 22 зразках плацентарної тканини (13 зразків з першого і 9 зразків з другого триместру) [3]. Інформація щодо тканиноспецифічності білків, що кодуються даними генами, та факту їх секреції була отримана з відкритої бази даних Human Protein Atlas (HPA) [4].

Для пошуку було створено програму мовою Python із застосуванням бібліотек *openpyxl*, *requests* і *re*. Бібліотека *openpyxl* була використана для зчитування символу гена, його коду Ensembl та значення $\lg \mathrm{FC}$ (Fold Change) з вихідного ряду даних. Бібліотека *requests* була використана для програмованого доступу до бази даних HPA [5] для отримання з неї відомостей щодо тканиноспецифічності продуктів експресії генів (поле *RNA tissue specificity*) та даних щодо місця, куди вони секретуються (поле *Secretome location*). Згідно з класифікацією, що використовується HPA, тканиноспецифічними називаються такі білки, концентрація мРНК яких у відповідній тканині у чотири рази перевищує середню концентрацію мРНК у всіх інших тканинах [6]. Бібліотека *re* була використана для пошуку серед отриманого списку генів таких, поле *RNA tissue specificity* яких містило рядок «placenta», а поле *Secretome location* – рядок «Secreted to blood».

Результати та обговорення. Було проаналізовано 266 диференційно експресованих генів між першим та другим семестром вагітності і виокремлено п’ять генів, *CSHL1*, *EBI3*, *LIPG*, *CSH1* та *F13A1*, продукти яких тканиноспецифічні для плаценти і потенційно секретуються у кров. Експресія усіх наведених генів збільшується між першим та другим триместром (табл. 1).

Таблиця 1. Кратність змін в експресії генів, продукти яких потенційно секретуються у кров і є плацентоспецифічними

Символ гена	CSHL1	CSH1	EBI3	LIPG	F13A1
lg FC	2,251	1,637	1,894	1,385	1,287

CSHL1 відноситься до кластеру генів людського гормону росту та людського плацентарного лактогена (*hGH/hCS* кластер), який містить 5 генів: *GH1*, *GH2*, *CSH1*, *CSH2* та *CSHL1* [7]. Функція білка, що кодується геном *CSHL1*, на цей час невідома. Відсутність досліджень даного білка першочергово пояснюються його застарілій класифікації як псевдогена та високою гомологією з іншими представниками кластеру. Функція інших білків кластера полягає у стимулюванні росту й енергетичного обміну (*GH1*)[8] та регуляції метаболізму матері під час вагітності для сприяння забезпечення плоду енергією (*GH2*, *CSH1* та *CSH2*)[9, 10]. Відповідно, можна припустити, що білок гена *CSHL1* також бере участь у процесах регуляції метаболізму організму матері. Значення $\lg FC$ свідчить про підвищення експресії гена під час переходу від першого до другого триместру, згідно з чим можна зробити припущення і про збільшення концентрації цього білка у сироватці крові.

Окрім регуляції метаболізму матері, продукт гена *CSH1* також бере участь у регуляції проліферації клітин молочної залози [10, 11]. Білок, який він кодує, є гормоном під назвою плацентарний лактоген людини. Збільшення експресії *CSH1* між першим та другим триместром відповідає існуючим дослідженням стосовно зміни концентрації плацентарного лактогена у крові упродовж вагітності [11].

Ген *EBI3* кодує субодиниці інтерлейкінів 27 та 35, які утворюються у разі комбінації його продукту з білками p28 та IL-12p35, відповідно [12], і які беруть участь у регуляції диференціації Т-клітин та інгібуванні розвитку запалення [13]. Встановлене збільшення експресії даного гена відповідає результатам інших досліджень, які повідомляють про послаблення активності $CD4^+$ Т-лімфоцитів, пов’язаної з підтриманням розвитку запальних процесів, на другому триместрі [14].

Ген *LIPG* кодує ендотеліальну ліпазу людини – білок, основна функція якого полягає у гідролізі ліпопротеїнів високої щільності (ЛВЩ, англ. *High Density Lipoprotein*) [15]. Збільшення експресії даного гена між першим та другим триместром, скоріше за все, пов’язане зі змінами у метаболізмі ліпідів, необхідними для забезпечення ембріону енергією. Оскільки ЛВЩ беруть участь у зменшенні вмісту холестерину у клітинах ендотелію, то вважається що збільшення рівня експресії *LIPG* може мати атерогенну дію [15].

Продуктом експресії *F13A1* є фактор зсідання крові XIII, також відомий як фактор стабілізації фібрину. Даний білок забезпечує останню стадію утворення тромбу. Вважається, що його накопичення у плаценті сприяє формуванню цитотрофобласту між п’ятим та десятим тижнем вагітності [16], що відповідає

встановленому часовому проміжку збільшення його експресії. За мутації, яка деактивує даний ген, спостерігається передчасне відшарування плаценти та ранні пологи [16, 17].

Висновки. На основі даних диференційної експресії генів у конкретній тканині за певних умов було розроблено метод пошуку генів, продукти експресії яких є тканиноспецифічними та можуть секретуватися у кров. Такі продукти є потенційними маркерами стану даної тканини або органу.

У плаценті людини під час переходу від першого триместру нормальної вагітності до другого було виявлено п’ять диференційно експресованих генів, продукти яких можуть секретуватися у кров та є плацентоспецифічними: *CSHL1*, *EBI3*, *LIPG*, *CSH1* і *F13A1*. Білки, які кодуються даними генами, можуть бути маркерами здорового проходження вагітності на даному етапі розвитку плаценти за підтвердження факту їх секреції і розробці чутливих методів визначення їх концентрації.

Розроблений нами метод пошуку тканиноспецифічних генів, продукти яких потенційно секретуються у кров, також може бути використаний для пошуку маркерів ускладнень вагітності, пов’язаних з порушенням функцій плаценти.

Список використаної літератури:

1. Karrar S. A., Hong P. L. Preeclampsia. Treasure Island (FL): StatPearls, 2023.
2. External validation of prognostic models predicting pre-eclampsia: individual participant data meta-analysis / K. I. E. Snell et al. BMC Medicine. 2020. Vol. 18, no. 1.
3. Lykhenko O., Frolova A. O., Obolenskaya M. Y. Creation of gene expression database on preeclampsia-affected human placenta. Biopolymers and Cell. 2018. Vol. 33, no. 6. P. 442–452.
4. The human secretome / M. Uhlén et al. Science Signaling. 2019. Vol. 12, no. 609.
5.Programmatic data access. The Human Protein Atlas. URL: https://www.proteinatlas.org/about/help/dataaccess (date of access: 25.04.2023).
6.Assays and annotation. The Human Protein Atlas. URL: https://www.proteinatlas.org/about/assays+annotation (date of access: 25.04.2023).
7. Misra-Press A., Cooke N. E., Liebhaber S. A. Complex alternative splicing partially inactivates the human chorionic somatomammotropin-like (hCS-L) gene. Journal of Biological Chemistry. 1994. Vol. 269, no. 37. P. 23220–23229.
8. Rosenfeld R. G., Hwa V. The Growth Hormone Cascade and Its Role in Mammalian Growth. Hormone Research in Paediatrics. 2009. Vol. 71, no. 2. P. 36–40.
9. Human Placental Growth Hormone–A Review / M. C. Lacroix et al. Placenta. 2002. Vol. 23. P. S87–S94.
10. Walsh S. T. R., Kossiakoff A. A. Crystal Structure and Site 1 Binding Energetics of Human Placental Lactogen. Journal of Molecular Biology. 2006. Vol. 358, no. 3. P. 773–784.
11. The Human Placental Lactogen Genes: Structure, Function, Evolution and Transcriptional Regulation / W. H. Walker et al. Endocrine Reviews. 1991. Vol. 12, no. 4. P. 316–328.
12. Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORγt / J. Yang et al. European Journal of Immunology. 2008. Vol. 38, no. 5. P. 1204–1214.
13. Epstein–Barr virus-induced gene 3 commits human mesenchymal stem cells to differentiate into chondrocytes via endoplasmic reticulum stress sensor / T. Zhang et al. PLOS ONE. 2022. Vol. 17, no. 12.
14. Characterizing the Pregnancy Immune Phenotype: Results of the Viral Immunity and Pregnancy (VIP) Study / T. A. Kraus et al. Journal of Clinical Immunology. 2011. Vol. 32, no. 2. P. 300–311.
15. The Role of Endothelial Lipase in Lipid Metabolism, Inflammation, and Cancer / J. E. Yu et al. Histol Histopathol. 2018. Vol. 33, no. 1. P. 1–10.
16. Maternal Blood Coagulation Factor XIII is Associated with the Development of Cytotrophoblastic Shell / T. Asahina et al. Placenta. 2000. Vol. 21, no. 4. P. 388–393.
17. Coagulation factor XIII deficiency – Report of a newborn F13A1 Val34Leu polymorphism carrier / G. N. Katsaras et al. JPNIM. 2022. Vol. 11, no. 2.