

АНАЛИЗ БИОФУНКЦИЙ КЛЕТКИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНТЕРФЕРОНА $INF-\gamma$ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЧИПОВ ДНК

Саечников А. В., Назаров П. В., Яцков Н. Н., Апанасович В. В.

Кафедра системного анализа и компьютерного моделирования, Белорусский государственный университет

Genomics Research Unit, Centre de Recherche Public de la Sante

Минск, Республика Беларусь; Luxembourg, Luxembourg

E-mail: saetchnikov.anton@tut.by

В работе приводятся результаты исследования значимых биофункций клетки меланомы в время зависимом эксперименте с воздействием $INF-\gamma$ на данную клетку. Приведены результаты, как для кластеров генов, так и для отдельных временных точек проведенного эксперимента. Анализ проводился при помощи разработанного программного обеспечения GeneExpressionAnalyser.

ВВЕДЕНИЕ

Микрочипы ДНК позволяют изучать экспрессию генов [1]. Анализ данных с микрочипов ДНК дает возможность выявить функциональные связи генов, определить доминирующие биофункции клетки. Обработка результатов, полученных с микрочипа ДНК, требует много машинного времени и эксперименты достаточно разнородны, т.к. даже результаты предварительной обработки изображений биочипов зависят от типа микрочипа. Данные проблемы возникают в ходе анализа реальных экспериментальных систем, таких как воздействия $INF-\gamma$ на клетку человека. Известно, что наиболее изученным свойством интерферона является его способность препятствовать размножению вирусов. Интерферон способен вызывать такие изменения в клетках, которые препятствуют размножению вируса, формированию вирусных частиц и дальнейшему его распространению. Целью работы является качественный анализ воздействия $INF-\gamma$ на клетку и количественный сравнительный анализ полученных результатов с опубликованными в работе [2].

I. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

В работе выполнен анализ время-разрешенные данные полученные в работе [2]. В эксперименте изучалось влияние интерферона гамма ($INF-\gamma$) на клеточную линию A375 (меланомы). Клетки помещались в лунки с пищевым субстратом и культивировались в течение 96 часов. В определенные моменты времени лунки однократно подвергались воздействию $INF-\gamma$ (концентрация – 50 нг/мл). В качестве контрольных использовались лунки, не подвергавшиеся воздействию интерферона, а также лунки, в которых сигнальная система JAK-STAT заблокирована с помощью воздействия JAK inhibitor I. Таким образом, были получены по три репликантных культуры клеток со следующими характеристиками: контроль без воздействия $INF-\gamma$

(ctrl), контроль с заблокированным сигнальным путем JAK-STAT (JIctrl), а также культуры, культивированные в течение 3, 12, 24, 48 и 72 часов (03H, 12H, 24H, 48H, 72H) после добавления $INF-\gamma$. Для экспериментов с биочипами реализованы по 2 репликанта для состояний ctrl, JIctrl, 03H, 12H и по 3 репликанта для 24H, 48H и 72H. Из клеточного материала было выделено РНК, которое после соответствующей обработки помещали на микрочипы Affymetrix Gene Chip HumanGene 1.0 STArray.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспериментальные данные обработаны при помощи разработанной программы GeneExpressionAnalyser [3,4]. Исследовались 17 микроматриц (разные временные точки и технические репликанты) с 33252 генами. Проведены необходимые этапы анализа, в соответствии с разработанной методологией [3].

Максимальный эффект воздействия на клетку $INF-\gamma$ наблюдался в промежуток времени с 12 до 24 часов после начала лечения, причем в 24 часа около 70% всех значимых генов являлись подавленными генами. Первая реакция клетки на $INF-\gamma$ наблюдается через 12 часов. Эффективность воздействия интерферона падает в 48 часов (изменение количества значимых генов с 48 до 72 часов мало).

Определены три главных кластера генов: Первый кластер (305 генов) характеризует первоначально подавленные гены, экспрессия которых оставалась неизменной в течение первых 12 часов, далее экспрессии достигают определенного значения в промежуток времени от 12 до 48 часов и уже не изменяют свое состояние. Противоположную реакцию на лечение можно наблюдать при анализе воздействия $INF-\gamma$ на гены 2 кластера (637 генов). Гены 3 кластера (149 генов) начинают реагировать с $INF-\gamma$ с началом лечения и меняют свое состояние с подавленного на выраженное за 12 часов с начала лечения. С 12 до 24 часов практически не меняют свое

состояние, а потом с 24 часов становятся подавленными.

Экспрессия всех генов, обработанных ингибитором, блокирующим сигнал от интерферона, совпадают с экспрессией с самого начала обработки. Это значит, что изменения экспрессии обусловлены воздействием $INF-\gamma$ на клетку, а не изменениями в самой клетке со временем.

Определены значимые биофункции с течением времени: 2419 значимых биофункций, которые характерны для выраженных генов и определено 1487 значимых биофункций для подавленных генов. В 3 часа пик выраженности достигается 6,6% всех значимых биофункций, в 12 часов – 22,9%, в 24 часа – 44,9%, в 48 часов – 14,2%, в 72 часа – 9,2%, в 72 часа с ингибитором – 2,2% всех выраженных биофункций. Для подавленных биофункций пик подавленности в 12 часов после начала лечения достигается 3,5 процентами биофункций, в 24 часа – 19,2%, в 48 часов – 25,3%, в 72 часа – 52% всех выраженных биофункций. В начале процесса лечения (3–12 часов) выражены биофункции, связанные с реакцией на $INF-\gamma$, с реакцией иммунной системы. В 24 часа преимущественно выражены биофункции связывания, в основном, биофункции связывания протеинов, при этом похожее доминирование можно наблюдать в 72 часа для подавленных биофункций. В 48 часов можно отдельно выделить группу выраженных биофункций, связанных с положительной регуляцией на процессы и активность. Промежутку времени от 48 до 72 часов с начала лечения характерны выраженные биофункции связанные с регуляцией экспрессии генов. Для подавленных генов в 48 часов – биофункции, связанные с метаболическими процессами в клетке. Для 24 часов – связанные с метаболическими процессами и биофункции, связанные с процессами в мембране ретикулума.

Гены, которые попали в первый кластер, имеют 554 значимых биофункций; во второй кластер – 788; в третий – 838. В 1 кластере большинство наиболее значимых биофункций составляют процессы биосинтеза аминокислот. Во 2 кластере нету группы похожих биофункций, но можно отдельно выделить функцию клеточного компонента и межклеточной адгезии. Для 3 кластера характерны биофункции, описывающие иммунную реакцию клетки и пути передачи сигнала.

III. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном разделе приводится сравнение опубликованных результатов [2] и результатов данной работы. В силу того, что данные обрабатывались по разным методикам и в различных программных обеспечениях, непосредственно сравнить их не получилось, поэтому был

использован веб-ресурс <http://biocompendium.embl.de/>. При помощи данного ресурса осуществлен поиск значимых биофункций для каждого момента времени. Результаты представлены на Таб. 1.

Таблица 1 – Результаты сравнения количества значимых биофункций по временным точкам

| Временная точка | | 03Н | 12Н | 24Н | 48Н | 72Н |
|---------------------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Количество значимых био функций | Результаты из работы [2] | 4 | 16 | 24 | 47 | 34 |
| | Результаты данной работы | 3 | 17 | 47 | 66 | 48 |
| | Общих | 3 | 12 | 15 | 31 | 24 |

Почти по всем временным точкам было получено большее число значимых биофункций (в среднем на 44%). Процент совпадающих биофункций в среднем составляет 68%. В рамках приведенного анализа было выделено больше значимых функций клетки. Данный результат можно объяснить тем, что в рамках работы использовались самые свежие официальные базы данных по GO-аннотациям, методологией получения списка значимых генов, которая описана в работах [3,4]. Различие количества биофункций веб-ресурса <http://biocompendium.embl.de/> и данной работы объясняется свойством сторонних программ и ресурсов группировки некоторых биофункций в одну.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках работы подтверждено, что биофункции выраженных/подавленных генов имеют доминирующую значимость в определенный момент времени. Результаты сравнения с опубликованными данными подтверждают правильность выводов. В результате анализа определено несколько значимых биофункций неизвестных ранее.

V. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Свешникова, А. Н. Экспрессия генов и микрочипы: проблемы качественного анализа / А. Н. Свешникова, П. С. Иванов // Рос. Хим. Ж. – 2007. – Т. 51(1).
2. Nazarov, P. V. Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: linking dynamic expression changes to function / P. V. Nazarov [et al] // Nucleic Acids Research – 2013. – № 41(5). – P. 1–15.
3. Саечников, А. В. Разработка метода главных компонент для анализа микрочипов ДНК / А. В. Саечников // Сборник работ 69-й научной конференции студентов и аспирантов БГУ – 2012. – С. 268–272.
4. Саечников, А. В. Программный пакет GeneExpressionAnalyser для анализа микрочипов ДНК / А. В. Саечников [и др.] // Сборник тезисов докладов «Медэлектроника 2012» – 2012. – С. 79–81.