

— МЕТОДЫ —

УДК 571.27:577.218

## РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

© 2025 г. С. А. Саламайкина<sup>a, b, \*</sup>, В. И. Корчагин<sup>a</sup>, К. О. Миронов<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, 111123 Россия

<sup>b</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),  
Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

\*e-mail: salamatykina@cmd.su

Поступила в редакцию 07.03.2024 г.

После доработки 05.06.2024 г.

Принята к публикации 18.06.2024 г.

Анализу экспрессии генов иммунного ответа отводится важная роль в изучении взаимодействий организма-хозяина и инфекционного агента. Существует много подходов к проведению такого анализа, однако проблемой остается выбор единого стандарта для нормализации данных. В настоящей работе разработана основанная на мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени система анализа экспрессии генов *HPRT1*, *SDHA*, *GAPDH* и *TBP*, отобранных в качестве потенциальных референсных генов. С использованием алгоритмов *geNorm* и *BestKeeper* на основе экспрессии двух генов — *HPRT1* и *SDHA* сформирован стабильный индекс, который применили при расчете нормализации уровня экспрессии генов Toll-подобных рецепторов: *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* и *TLR8*. Значения экспрессии генов Toll-подобных рецепторов в выборке условно здоровых лиц характеризовались высокой стабильностью и положительной взаимной корреляцией (за исключением *TLR6*), что может указывать на общие механизмы регуляции экспрессии этих генов и подтверждает возможность использования разработанной мультиплексной системы для анализа экспрессии генов иммунного ответа.

**Ключевые слова:** Toll-подобные рецепторы, ОТ-ПЦР в режиме реального времени, гены домашнего хозяйства, экспрессия

**DOI:** 10.31857/S0026898425010129, **EDN:** HBYTDP

### ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в определении роли генетических факторов предрасположенности к мультифакторным заболеваниям играют особенности взаимодействия иммунной системы с патогенными микроорганизмами, которые могут быть связаны с механизмами регуляции экспрессии генов.

Распознавание патогенассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) происходит при взаимодействии с Toll-подобными рецепто-

рами (TLR) на поверхности клеток иммунной системы, что приводит к активации сигнальных путей NF-кB, MyD88 и IRAK4. Известно, что за распознавание грамотрицательных бактерий отвечает receptor TLR4 (взаимодействует с поверхностным липополисахаридом), а за распознавание грамположительных бактерий отвечают гетеродимерные комплексы TLR1:TLR2 и TLR2:TLR6 [1, 2]. Связь полиморфных вариантов генов иммунной системы с инфекционными заболеваниями активно изучается [3], однако в большинстве случаев ассоциативные исследова-

Сокращения: TLR (Toll-Like Receptors) — Toll-подобные рецепторы; ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene) — цитозольный адаптерный белок, один из пяти белков с TIR-доменом, участвующих в передаче сигнала от Toll-подобных рецепторов; PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) — патогенассоциированные молекулярные паттерны, или образы патогенности; IRAK4 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4) — киназа 4, ассоциированная с рецептором интерлейкина-1.

ния лишь констатируют наличие связи, не раскрывая ее природу.

Оценка уровня экспрессии генов играет важную роль в современных исследованиях. В последнее десятилетие одновременно с развитием технологии массового параллельного секвенирования широкое распространение получил метод определения уровня экспрессии генов на основе RNA-Seq [4]. Обладая преимуществами перед традиционными методами на основе ПЦР, RNA-Seq имеет и ряд недостатков, к которым можно отнести высокую стоимость и сложность, необходимость биоинформационической обработки результатов секвенирования, что делает крайне затруднительным внедрение RNA-Seq в рутинные лабораторные исследования. Поэтому, когда требуется анализ одного или нескольких генов, более предпочтителен метод, основанный на ПЦР в реальном времени [5, 6].

Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени с одновременным проведением обратной транскрипции в одной реакционной смеси обладает рядом преимуществ, включая высокую скорость и простоту проведения анализа, доступность реагентов, точную детекцию результатов в режиме реального времени. В связи с этим в настоящей работе разработана и апробирована методика определения уровня экспрессии генов *TLR* в формате мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Биологический материал.** В работе использовали 110 образцов цельной венозной крови, полученных от условно здоровых доноров, проживающих на территории г. Москвы и Московской области.

Все процедуры, выполненные с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года с ее последующими изменениями или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие.

Образцы крови собирали в пробирки с EDTA и хранили при температуре не выше +5°C. Нуклеиновые кислоты выделяли с использованием набора реагентов “РИБО-преп” после предварительной обработки образцов с использованием реагента “Гемолитик” (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструк-

ции производителя. Выделенный материал хранили при –20°C не более недели до использования.

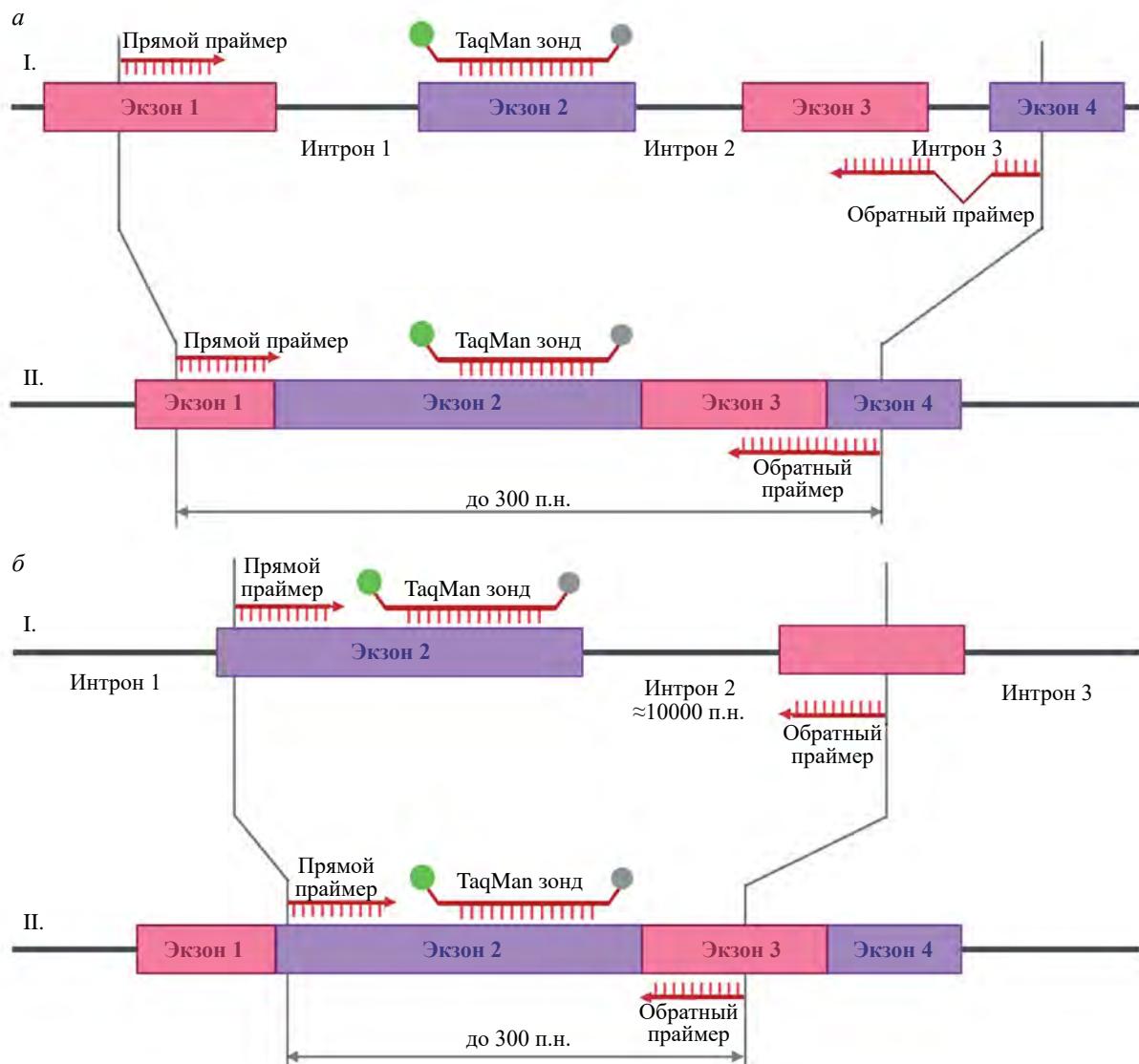
**Выбор генов.** В качестве референсных генов использовали гены домашнего хозяйства, которые характеризуются стабильной экспрессией в клетках периферической крови: *HPRT1* (гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза), *SDHA* (субъединица А сукцинатдегидрогеназного комплекса), *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа), *TBP* (транскрипционный фактор IID, связывающий белок с ТАТА-боксом) [7–9] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143764/>). Гены *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* и *TLR8* выбраны в качестве целевых для определения экспрессии.

**Дизайн олигонуклеотидов.** При разработке олигонуклеотидов руководствовались стандартными требованиями, использованными нами ранее [10]. Концентрации праймеров и зондов, подобранных эмпирически, составляли от 0.2 до 0.4 и от 0.06 до 0.12 мКМ соответственно. Для подбора температуры плавления и проверки возможности образования вторичных структур (димеров, шпилек) олигонуклеотидами использовали калькулятор idtDNA (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), специфичность праймеров к ДНК- и РНК-матрицам проверяли при помощи ресурса Primer-BLAST [11].

К каждому фрагменту гена подбирали пару праймеров и флуоресцентно-меченный зонд. Последовательности праймеров выбирали таким образом, чтобы они были специфичны только к активным вариантам сплайсинга, охарактеризованным в базе данных NCBI. Дизайн олигонуклеотидов выполнен так, чтобы исключить амплификацию ДНК за счет либо отжига одного из праймеров одновременно в двух соседних экзонах (*a*), либо взаимного расположения праймеров в экзонах, разделенных инtronом в несколько тысяч пар нуклеотидов (*b*), что не позволяет получить продукт амплификации ДНК с использованием TaqF-полимеразы.

Схема расположения олигонуклеотидов представлена на рис. 1.

**Условия проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени.** Реакционная смесь (25 мкл) содержала следующие компоненты: ПЦР-смесь с праймерами и зондами (табл. 1), содержащая dNTP (44 мКМ) — 1 мкл, “ОТ-ПЦР-смесь 2 FEP/FRT” — 10 мкл, “TaqF-полимераза” — 0.5 мкл, “Ревертаза (MMLV)” — 0.5 мкл, “RT-G микс 1” — 0.25 мкл, смесь нуклеиновых кислот, разведенная в “РНК-буфере” — 10 мкл. Все реагенты для



**Рис. 1.** Схема расположения олигонуклеотидов для детекции целевых участков и определения уровня экспрессии генов. *а* — Отжиг одного из праймеров в двух экзонах; *б* — размер фрагмента превышает возможную процессивность используемой Таq-полимеразы; I — последовательность ДНК; II — последовательность кДНК.

выделения нукleinовых кислот и ОТ-ПЦР произведены в ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Реакцию проводили на амплификаторе CFX96 (“BioRad”, США) по следующей программе: 50°C в течение 15 мин, 95°C — 10 мин, затем 45 циклов амплификации: 95°C — 5 с, 60°C — 20 с, 72°C — 15 с.

С целью подтверждения ожидаемых размеров амплифицированных фрагментов при проведении ОТ-ПЦР, отсутствия фрагмента при проведении реакции без обратной транскрипции (отрицательный контроль) и отсутствия неспецифических продуктов (в том числе димеров) проводили электрофорез продуктов

амплификации в 1.7%-ном агарозном геле. Специфичность амплифицированных фрагментов генов подтверждали путем секвенирования части образцов по методу Сэнгера с использованием реагентов и оборудования фирмы “Applied Biosystems” (США).

Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени (значения пороговых циклов ( $C_t$ )) получены с помощью программного обеспечения CFX Manager™ (“BioRad”).

**Статистический анализ.** Предварительную обработку результатов ОТ-ПЦР в реальном времени проводили в Microsoft Excel. Отбирали образцы с положительным сигналом хотя

**Таблица 1.** Олигонуклеотиды для определения экспрессии генов

Ген, ID*	Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина ПЦР-продукта, п.н.
<i>HPRT1</i> , 3251	HPRT1-F	TTGCTTCCTGGTCAGGCA	97
	HPRT1-R	CCAACAAAGTCTGGCTTATATCCAAC	
	HPRT1-Z	(FAM)CGTGGGGCCTTTCACCAAGCAAGC(BHQ2)	
<i>SDHA</i> , 6389	SDHA-F	GCGGCAACAGCAGACATGT	100
	SDHA-R	CTGTTGCAACACTGTTGGCC	
	SDHA-Z	(R6G)CCGGGGCCTGTCGCGGCTGCTG(BHQ1)	
<i>GAPDH</i> , 2597	GAPDH-F	GAAGGACTCATGCACCACAGTC	114
	GAPDH-R	GCAGGGATGATGTTCTGGAGA	
	GAPDH-Z	(ROX)GCCCGCGGCCATCACGCCACAG(BHQ)	
<i>TBP</i> , 6908	TBP-F	GGTTGCTGCGGTAATCATGA	100
	TBP-R	CAGTCTGGACTGTTCTCACTCTG	
	TBP-Z	(CY5)GAGAGCCACGAACCACGGCACT-CATTTC(BHQ2)	
<i>TLR1</i> , 7096	TLR1-F	TGGCAAAATGGAAGATGCTAGTC	297
	TLR1-R	AGACTGCCAAATGGAACAGACAA	
	TLR1-Z	(ROX)CCCGGAGGAAT(BHQ1)GCTGCTGTTCAGCTC	
<i>TLR2</i> , 7097	TLR2-F	AGGCAGCGAGAAAGCGCAGC	230
	TLR2-R	CCTTGGAGAGGCTGATGATGA	
	TLR2-Z	(Cy5.5)CCCCAAGACCCACACCATCCACAAAG(BHQ1)	
<i>TLR4</i> , 7099	TLR4-F	TTTCCCAGAACTGCAGGTGCTG	101
	TLR4-R	CTCTGGATGGGTTTCCTGTCA	
	TLR4-Z	(R6G)GGGCATATCAGAGCCTAACCCACCTCTAC-C(BHQ1)	
<i>TLR6</i> , 10333	TLR6-F	ATGATGTTGCAGTGGCTATCCTAAAG	97
	TLR6-R	CAAATCAGAGTTTCACTCTTCAAAG	
	TLR6-Z	(Cy5)GGGTTGTTCTTCT(BHQ1)TCAGAGCATCTGATTGAGTCC	
<i>TLR8</i> , 51311	TLR8-F	AGTTTCTCTCGGCCACCT	137
	TLR8-R	AGCAGGAAAATGCAGGTCAGC	
	TLR8-Z	(FAM)CCTGCATAGAGGGTACCAATTCTGCGCTGCTG-C(BHQ1)	

\*Идентификационный номер в базе данных Gene (NCBI).

бы в одном повторе из трех. Матрицу значений Ct экспортировали в среду R (версия 4.3.2) (<https://www.R-project.org/>). Усредненные значения Ct для каждого гена рассчитывали как среднее геометрическое (GM [Ct]) независимых повторов. Для определения характера распределения анализируемых значений использовали тест Шапиро–Уилка и построение графика квантиль–квантиль. Оценку межгенных взаимосвязей проводили в попарном корреляционном анализе, рассчитывая коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) при отсутствии в каждой из анализируемых выборок статистически значимого отклонения от нормального, и коэффициент корреляции Спирмена ( $\rho$ ) при значимых отклонениях. Результаты статистического анализа визуализировали в виде диаграмм с помощью пакета *ggplot2* [12]. В качестве критерия статистической значимости результатов использовали значение  $p < 0.05$ . При множественном сравнении применяли поправку Холма–Бонферрони.

**Анализ стабильности экспрессии генов домашнего хозяйства.** Стабильность экспрессии генов домашнего хозяйства определяли с использованием алгоритмов *geNorm* [13] и *BestKeeper* [14], реализованных в пакете *ctrlGene* (<https://rdrr.io/cran/ctrlGene/>). В *geNorm* средние значения стабильности экспрессии (M) анализируемых генов рассчитывают при поэтапном исключении в каждом раунде наименее стабильно экспрессирующими генов до тех пор, пока не останутся гены с наиболее стабильной экспрессией (наименьшие значения M). *BestKeeper* рассчитывает описательные статистики на основе данных Ct и парной корреляции между всеми анализируемыми генами с учетом стандартного отклонения (SD) значений Ct, где наименьший показатель представляет ген с наиболее стабильной экспрессией в индексе ранжирования. На основании значений Ct генов, наиболее стабильно экспрессирующими в каждом образце, рассчитывали индексы *BestKeeper*, используемые далее для нормализации при анализе экспрессии целевых генов.

**Анализ экспрессии генов-мишеней.** В качестве нормализованного показателя экспрессии генов-мишеней (Cq) использовали отношение среднего геометрического значений Ct независимых повторов (GM [Ct]) к индексу *BestKeeper*, рассчитанному на основании наиболее стабильных генов домашнего хозяйства. С целью характеристики разброса значений Cq в анализируемой выборке рассчитывали показатели описательных статистик и диаграммы размаха для каждого гена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Создание мультиплексных систем определения уровня экспрессии*

На основе анализа опубликованных данных отобраны четыре гена с постоянной экспрессией (для использования в качестве референсных) и пять генов Toll-подобных рецепторов, проведен анализ экзон–инtronной структуры и подобраны олигонуклеотиды для амплификации кДНК. При этом учитывали все описанные на момент исследования функционально активные варианты транскриптов.

В табл. 1 представлены последовательности олигонуклеотидов, полученные после оптимизации системы и размеры ПЦР-продуктов. Для выбора флуоресцентно-меченные зонды использован регион, лежащий внутри амплифицируемого локуса. Выбор определялся сравнительным тестированием праймеров и зондов при оптимизации методик.

Всего разработано восемь систем детекции продуктов экспрессии генов, ожидаемый размер и состав ПЦР-фрагмента которых соответствует получаемому, что подтверждено выборочным секвенированием продуктов амплификации. Разработанные смеси праймеров и флуоресцентно-меченные зонды распределены по двум реакционным смесям. Первая реакционная смесь (мультиплекс 1) содержит смесь олигонуклеотидов, детектирующих активные варианты сплайсинга генов с постоянной экспрессией: *HPRT1*, *SDHA*, *GAPDH* и *TBP*. Вторая (мультиплекс 2) содержит смесь олигонуклеотидов для детекции продуктов экспрессии генов *TLR*: *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR8*.

Схема проведения экспериментов представлена на рис. 2. Каждый образец амплифицировали в трех повторах с проведением реакции обратной транскрипции и в трех повторах без этапа обратной транскрипции.

Проведение амплификации без обратной транскрипции не приводило к образованию фрагментов в обоих мультиплексах, при этом продукты ожидаемой длины получены в реакциях с добавлением обратной транскриптазы.

### *Определение оптимальной комбинации генов домашнего хозяйства*

Сравнение значений GM [Ct] выявило самый высокий уровень экспрессии гена *GAPDH* со средним значением 24.2, а самое высокое

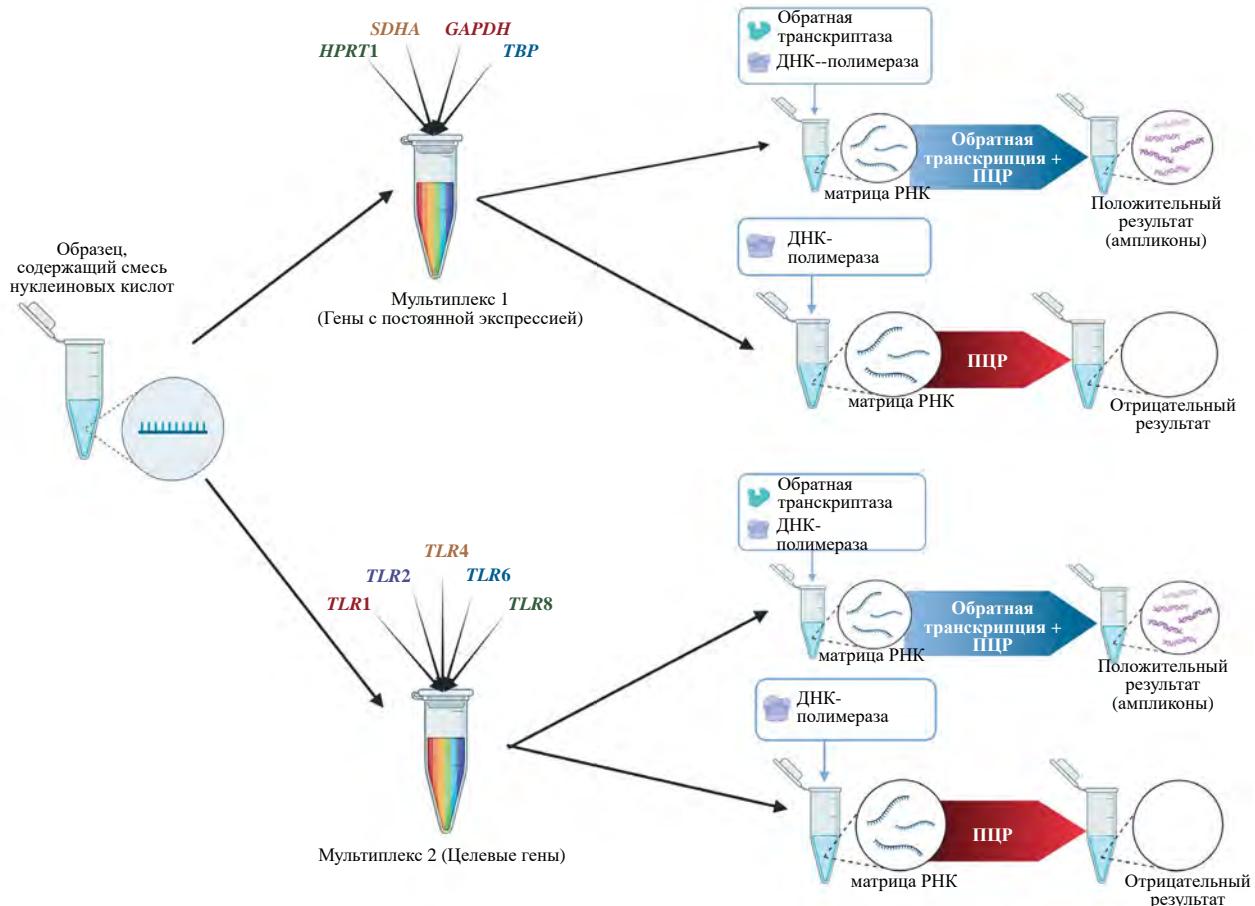


Рис. 2. Схема экспериментов для определения уровня экспрессии в двух мультиплексах.

среднее значение GM [Ct] (самая низкая экспрессия) было у *TBP* (31.2) (рис. 3).

Самый низкий разброс значений GM [Ct] характерен для генов *HPRT1* и *SDHA* (5.4 и 4.6 цикла соответственно), тогда как наибольший (18.9) наблюдался у *GAPDH*. В целом, распределение значений GM [Ct] у всех генов домашнего хозяйства не отклонялось значимо от нормального. Анализ попарной корреляции значений GM [Ct] (рис. 4) также выявил отсутствие статистически значимой корреляции *GAPDH* с парой *HPRT1* и *SDHA* и низкий коэффициент в паре *GAPDH* и *TBP*. Наиболее высокое значение коэффициента корреляции 0.75 наблюдалось между генами *HPRT1* и *SDHA*.

Расчет стабильности экспрессии с помощью алгоритма *geNorm* показал, что наибольшей стабильностью характеризуется пара *HPRT1* и *SDHA* — наименьшее значение M в которой составило 0.83 (*GAPDH* и *TBP* — 2.93 и 7.85 соответственно). С учетом полученных результатов проведен анализ стабильности трех индексов нормализации экспрессии *BestKeeper* — *BK<sub>4</sub>* на

основании всех четырех генов, *BK<sub>3</sub>* — по трем генам *HPRT1*, *SDHA* и *TBP*, и *BK<sub>2</sub>* — по двум генам *HPRT1* и *SDHA*. Все индексы *BestKeeper* сравнивали как между собой, так и с индексами, рассчитанными для входящих в них генов (табл. 2).

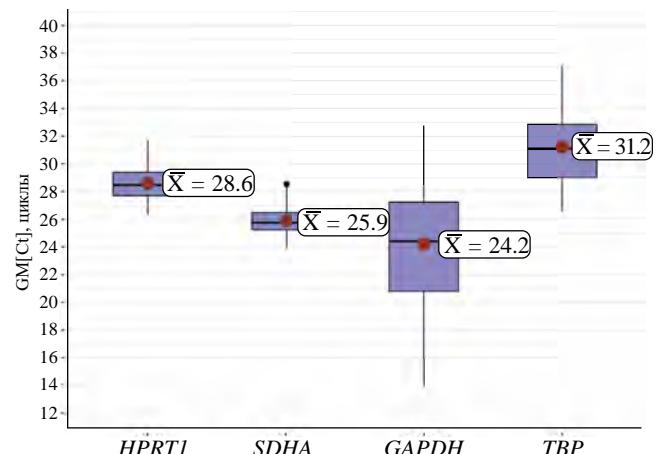
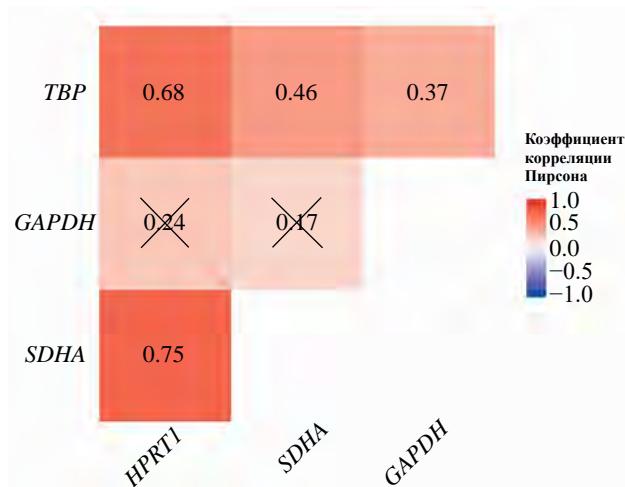


Рис. 3. Распределение значений GM [Ct] генов домашнего хозяйства.



**Рис. 4.** Диаграмма попарных корреляций значений GM [Ct] генов домашнего хозяйства. Отмечены статистически незначимые результаты.

Снижение дисперсии индекса *BestKeeper* наблюдается даже при включении генов с наименьшей стабильностью.

По результатам анализа для нормализации значений экспрессии целевых генов выбран

наиболее стабильный индекс,  $BK_2$ , стандартное отклонение (SD) у которого менее одного цикла Ct. Значение коэффициента корреляции Пирсона между GM [Ct] генов *HPRT1* и *SDHA* и индексом  $BK_2$  составило 0.94 [95% ДИ = = 0.89–0.96,  $p < 0.001$ ] и 0.93 [95% ДИ = 0.89–0.96,  $p < 0.001$ ] соответственно.

#### Анализ уровня экспрессии генов *TLR*

Анализ значений Ct генов *TLR* показал, что *TLR6* характеризуется самой низкой экспрессией (GM [Ct] = 31.6) и в среднем “отстает”: от остальных на 4–5 циклов, в то время как различия между усредненными значениями Ct остальных генов не превышали одного цикла (табл. 3) и были статистически значимыми ( $<0.05$  с учетом поправки Бонферрони) во всех попарных сравнениях, кроме пар *TLR1*–*TLR8* и *TLR2*–*TLR4*. Не обнаружено также корреляции между значениями GM [Ct] генов *TLR* и индексом  $BK_2$ , что указывает на различия в паттернах экспрессии генов домашнего хозяйства и генов *TLR*. Распределение значений относительной

**Таблица 2.** Описательные статистики значений Ct генов домашнего хозяйства (HKG) и рассчитанных на их основе индексов *BestKeeper* (BK)

Параметр	<i>HPRT1</i>	<i>SDHA</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>	$BK_4$ (n = 4)	$BK_3$ (n = 3)	$BK_2$ (n = 2)
GM [Ct]	28.6	25.9	23.9	31.1	27.2	28.4	27.2
Мин. [Ct]	26.3	23.9	13.9	26.5	23.3	25.6	25.2
Макс. [Ct]	31.7	28.5	32.8	37.1	31.3	32.2	29.9
SD [ $\pm$ Ct]	0.9	0.9	3.5	2.3	1.5	1.2	0.8
CV [%Ct]	3.3	3.3	14.3	7.5	5.4	4.1	3.1

Примечание. SD [ $\pm$  Ct] — стандартное отклонение Ct; CV [% Ct] — коэффициент вариации Ct, %.

**Таблица 3.** Описательные статистики значений Ct генов *TLR* и их корреляция с индексом  $BK_2$

Параметр	<i>TLR8</i>	<i>TLR4</i>	<i>TLR1</i>	<i>TLR6</i>	<i>TLR2</i>
GM [Ct]	26.0	27.1	26.3	31.6	27.4
Min [Ct]	23.2	24.2	24.1	29.2	24.1
Max [Ct]	30.9	30.9	30.4	40.2	30.1
SD [ $\pm$ Ct]	1.12	1.28	1.23	0.95	1.00
CV [%Ct]	4.3	4.71	4.67	3.01	3.66
Коэффиц. корреляции [ $\rho$ ]	0.34	0.37	0.32	0.10	0.23
$p^*$	0.22	0.18	0.22	0.59	0.40

\*С поправкой Холма Бонферрони.

экспрессии ( $C_q$ ) генов *TLR* после преобразования делением на индекс  $BK_2$  представлено на рис. 5. Нормализация уменьшила разброс значений для каждого гена, но не повлияла на общий характер распределения и имеющиеся “выбросы”. Относительная экспрессия *TLR6* ниже, чем у остальных генов, у которых она близка по среднему значению к уровню экспрессии генов домашнего хозяйства.

Диаграмма попарной корреляции между нормализованными значениями экспрессии генов *TLR* приведена на рис. 6. Статистически значимая положительная корреляция наблюдается между значениями экспрессии всех генов *TLR*, за исключением *TLR6*, у которого слабая корреляция с *TLR4* и *TLR8* не достигает статистической значимости. Наиболее высокая корреляционная связь выявлена для относительной экспрессии ( $C_q$ ) следующих пар генов — *TLR4*—*TLR8*  $\rho = 0.84$  [95% ДИ = 0.70–0.92,  $p < 0.001$ ] и *TLR1*—*TLR4*  $\rho = 0.79$  [95% ДИ = 0.61–0.89,  $p < 0.001$ ] (см. рис. 6). Для *TLR2* характерна положительная корреляция с остальными генами *TLR* — от средней (с *TLR4* и *TLR8*) до высокой (с *TLR1* и *TLR6*) силы.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка мультиплексных одноступенчатых систем определения уровня экспрессии в формате ОТ-ПЦР в реальном времени может оказаться достаточно нетривиальной задачей, связанной с необходимостью эмпирического подбора условий мультиплексной ПЦР из-за большого количества олигонуклеотидов, одновременно присутствующих в реакции. В на-

шей работе апробированы методики ОТ-ПЦР с пятью каналами флуоресцентной детекции; в этом случае условия были оптимизированы для одновременного присутствия 20 олигонуклеотидов в реакции. Кроме того, перед проведением анализа методом случай–контроль на разном биологическом материале важно выбрать число генов домашнего хозяйства, оптимальное для наиболее точного определения уровня экспрессии генов-мишеней.

Метод ОТ-ПЦР в режиме реального времени широко используется для определения уровня экспрессии генов, однако до настоящего времени не существует стандартных подходов к оценке результатов анализа разных типов биологического материала. Для валидации чаще всего используют методы, основанные на определении исходного количества кДНК и на сравнении с уровнями экспрессии референсных генов [15, 16]. В настоящей работе разработана методика определения экспрессии генов в клетках венозной крови. Главными особенностями этой методики являются одновременная детекция экспрессии нескольких целевых генов в одной реакционной смеси и проведение реакции обратной транскрипции, что дает возможность осуществлять амплификацию без предварительного использования ДНКаз для исключения амплификации выделенной ДНК. Одновременное использование нескольких мишеней для измерения уровня экспрессии в одной ОТ-ПЦР позволяет планировать экспериментальную работу оптимальным образом за счет уменьшения количества реакционных смесей и использования РНК-проб в равных концентрациях для одновременного количественного анализа.

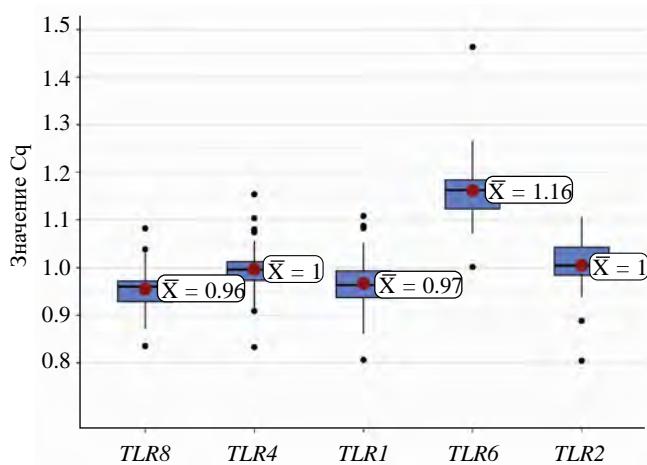


Рис. 5. Распределение значений относительной экспрессии ( $C_q$ ) генов *TLR*.

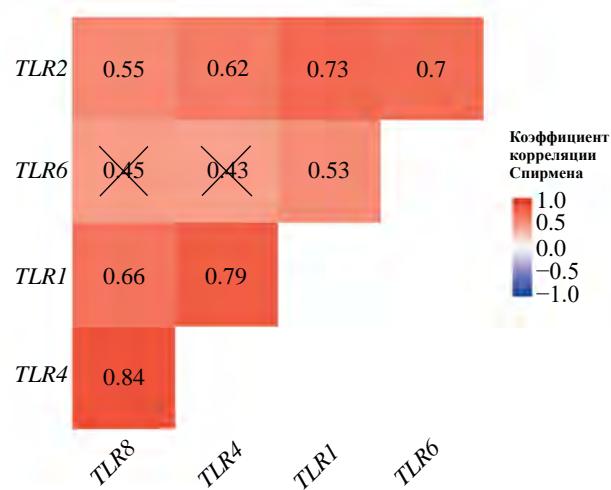


Рис. 6. Диаграмма попарных корреляций значений относительной экспрессии ( $C_q$ ) генов *TLR*.

Поскольку основная задача состоит не в определении точного количества мРНК целевых генов, а в установлении факта изменения уровня их экспрессии, то для такой относительной оценки используют референсные гены со стабильной экспрессией в исследуемых тканях. Как правило, в качестве референсных выступают гены домашнего хозяйства, экспрессия которых не меняется значимо в течение их жизни в клетках и практически не подвержена влиянию внешних факторов и условий эксперимента. Тем не менее выбор подходящих генов для нормализации проблематичен, поскольку ни одно из имеющихся решений не является универсальным, даже в пределах одного организма уровень экспрессии стабильных генов может значимо варьировать в разных тканях. Считается, что наиболее надежные методики анализа экспрессии генов должны использовать не менее двух генов домашнего хозяйства [17, 18]. Чаще всего дифференциальную экспрессию генов в образцах периферической крови изучают с использованием генов *HPRT1*, *SDHA*, *GAPDH*, *TBP* и *B2M* в качестве референсных. В то же время, достаточно спорные результаты получены при изучении экспрессии генов домашнего хозяйства *GAPDH* и *ACTB* в клетках крови [17, 19, 20]. Проведенный нами анализ стабильности экспрессии четырех генов — *HPRT1*, *SDHA*, *GAPDH*, *TBP* — с использованием *GeNorm* и *BestKeeper* показал, что самым нестабильным из них является ген *GAPDH*, что подтверждается независимыми исследованиями [21]. Результаты выбора референсных генов показали, что для формирования индекса нормализации *BestKeeper* достаточно двух генов домашнего хозяйства, что согласуется с ранее полученными результатами [22]. Однако стоит иметь в виду, что экспрессия референсных генов в разных тканях или культивируемых клеточных линиях может быть менее стабильной. Так, на независимой выборке показано, что для анализа экспрессии в образцах периферической крови лучше использовать другие сочетания генов домашнего хозяйства, чем выбранные в нашей работе [23]. Такие результаты могут быть связаны как с особенностями выборок, так и с различиями в используемых методиках.

Значения Ct генов *TLR* не коррелируют с Ct генов домашнего хозяйства, но при этом некоторые из *TLR* показывают высокую положительную корреляцию нормализованных значений экспрессии между собой. Подобная взаимосвязь предполагает общие механизмы регуляции экспрессии [24]. Экспериментально показано по-

вышение экспрессии и активация TLR2 и TLR4 на альвеолярных макрофагах и эпителиальных клетках дыхательных путей [25]. Обнаружен также высокий уровень коэкспрессии генов *TLR1* и *TLR4* у пациентов с хронической формой артерита Такаяси и *TLR4–TLR6* в контрольной группе. Интересно, что в группе пациентов с активным артритом подобные корреляции не выявлены [26]. Таким образом, изменения в уровне экспрессии генов *TLR* могут быть связаны как с особенностями их регуляции, так и с возможным состоянием иммунной системы донора на момент сбора биологического материала. Экспрессия генов *TLR* тесно коррелирует с особенностями течения не только инфекционных, но и ряда онкологических заболеваний. Например, экспрессия генов *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* и *TLR8* индуцирует последующую экспрессию генов *IL-6* и *IL-8* [27]. Изменения уровня экспрессии генов *TLR* связаны с воспалительным процессом и иммунной инфильтрацией тканей легких при мультифакторных заболеваниях [28]. Экспрессия *TLR3*, *TLR5* и *TLR9* ассоциирована с определенными подтипами рака молочной железы, а уровень экспрессии *TLR10* коррелирует со стадиями опухоли, указывая на возможность влияния TLR на прогрессирование заболевания [29]. Обнаружено также значительное повышение экспрессии *TLR3* и *TLR4* на ранней стадии плоскоклеточного рака почки [30]. Таким образом, изменение уровня экспрессии генов *TLR* может быть использовано в качестве маркеров как инфекционных, так и онкологических заболеваний.

Нами разработана мультиплексная система на основе одноступенчатой ОТ-ПЦР, которая успешно апробирована при анализе экспрессии генов Toll-подобных рецепторов в образцах цельной периферической крови. Полученные нами результаты коррелируют с имеющимися данными и подтверждают перспективность использования разработанной системы для изучения ассоциации изменений уровня экспрессии генов-кандидатов с риском развития и особенностями течения инфекционных и ассоциированных с ними заболеваний. Применение четырех генов для нормализации уровня экспрессии позволяет использовать представленный нами подход для изучения возможных связей генов иммунного ответа с разными патологическими состояниями в образцах различных тканей.

Исследование выполнено в рамках темы НИОКР государственного задания “Изучение генетической предрасположенности к мультифакторным заболеваниям” (рег. № ААА-А21-121011890130-7).

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены локальным этическим комитетом Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора России, протокол № 136 от 25 мая 2023 года.

От каждого включенного в исследование участника получено добровольное информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jin M.S., Kim S.E., Heo J.Y., Lee M.E., Kim H.M., Paik S.-G., Lee J.-O. (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell.* **130**(6), 1071–1082.
- Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Akira S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11**(4), 443–451.
- Саламайкина С.А., Миронов К.О. (2023) Однонуклеотидные полиморфизмы генов Толл-подобных рецепторов, ассоциированные с риском развития туберкулеза и другими заболеваниями нижних дыхательных путей. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* **4**, 57–61.
- Zielniok K., Burdzinska A., Murcia Pienkowski V., Koppolu A., Rydzanicz M., Zagódzon R., Paczek L. (2021) Gene expression profile of human mesenchymal stromal cells exposed to hypoxic and pseudohypoxic preconditioning—an analysis by RNA sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(15), 8160.
- Bednarczyk M., Muc-Wierzgoń M., Walkiewicz K., Kokot T., Fatyga E., Mazurek U. (2017) Profile of gene expression of TLR-signaling pathways in colorectal cancer tissues. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **30**(3), 322–326.
- Bliss T.W., Dohms J.E., Emara M.G., Keeler C.L. (2005) Gene expression profiling of avian macrophage activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **105**(3–4), 289–299.
- Otto E., Köhli P., Appelt J., Menzel S., Fuchs M., Bahn A., Jahn D. (2020) Validation of reference genes for expression analysis in a murine trauma model combining traumatic brain injury and femoral fracture. *Sci. Rep.* **10**(1), 15057.
- Herath S., Dai H., Erlich J., Au A.Y., Taylor K., Succar L., Endre Z.H. (2020) Selection and validation of reference genes for normalisation of gene expression in ischaemic and toxicological studies in kidney disease. *PLoS One.* **15**(5), e0233109.
- Osheim P., Alemu S.W., Tichý A., Sirák I., Davidková M., Stastna M.M., Abend M. (2022) Examining potential confounding factors in gene expression analysis of human saliva and identifying potential housekeeping genes. *Sci. Rep.* **12**(1), 2312.
- Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А. (2016) Сравнение трех молекуларно-генетических методик для определения основных мутаций в гене HFE, связанных с развитием наследственного гемохроматоза. *Клиническая лабораторная диагностика.* **61**(5), 316–320.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* **13**(1), 134.
- Wickham H. (2009) *Ggplot2: elegant graphics for data analysis.* New York: Springer.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**(7), research0034.1.
- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper — excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**(6), 509–515.
- Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immunity.* **6**(4), 279–284.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Wittwer C.T. (2009) The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**(4), 611–622.
- Thomas K.C., Zheng X.F., Garces Suarez F., Raftery J.M., Quinlan K.G.R., Yang N., Houweling P.J. (2014) Evidence based selection of commonly used RT-qPCR reference genes for the analysis of mouse skeletal muscle. *PLoS- L One.* **9**(2), e88653.
- Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques.* **37**(1), 112–119.
- Lyng M.B., Laenkholm A.-V., Pallisgaard N., Ditzel H.J. (2008) Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer.* **8**, 20.
- Suzuki T., Higgins P.J., Crawford D.R. (2000) Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques.* **29**(2), 332–337.
- Fu Y., Yang J., Fan S., Zhao S., Du R., Shah S.M.A., Yang Y. (2020) Selection and validation of optimal endogenous reference genes for analysis of quantitative PCR in four tissues pathologically associated with Kidney-yang deficiency syndrome following influenza A infection. *Exp. Ther. Med.* **20**(6), 244.
- Ohl F., Jung M., Radonić A., Sachs M., Loening S.A., Jung K. (2006) Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J. Urol.* **175**(5), 1915–1920.

23. Song R., He S., Wu Y., Chen W., Song J., Zhu Y., Tan S. (2023) Validation of reference genes for the normalization of the RT-qPCR in peripheral blood mononuclear cells of septic patients. *Heliyon*. **9**(4), e15269.
24. Huazhang A., Yizhi Y., Minghui Zh., Hongmei X., Runzi Q., Xiaoyi Y., Shuxun L., Wenya W., Zhenghong G., Jun G., Zhihai Q., Xuetao C. (2002) Involvement of ERK, p38 and NF- $\kappa$ B signal transduction in regulation of *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology*. **106**, 38–45.
25. Sidletskaya K., Vitkina T., Denisenko Y. (2020) The role of Toll-like receptors 2 and 4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **15**, 1481–1493.
26. Tian Y., Huang B., Li J., Tian X., Zeng X. (2022) Identification of the association between Toll-like receptors and T-cell activation in Takayasu's arteritis. *Front. Immunol.* **12**, 792901.
27. LuC.-C., Kuo H.-C., Wang F.-S., Jou M.-H., Lee K.-C., Chuang J.-H. (2015) Upregulation of TLRs and IL-6 as a marker in human colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**(1), 159–177.
28. Junjie Mastera Y., Haihua Masterb H., Chaoqun Masterc Y., Maofen Masterd J., Dongxiao Mastera D. (2023) Identification of TLRs as potential prognostic biomarkers for lung adenocarcinoma. *Medicine*. **102**(38), e34954.
29. Shi S., Xu C., Fang X., Zhang Y., Li H., Wen W., Yang G. (2020) Expression profile of Toll-like receptors in human breast cancer. *Mol. Med. Rep.* **21**, 786–794.
30. Xiong Z., Bingqian G., Qiang L., Mo Zengnan M. (2022) Toll-Like receptors serve as biomarkers for early diagnosis and prognosis assessment of kidney renal clear cell carcinoma by influencing the immune microenvironment: comprehensive bioinformatics analysis combined with experimental validation. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 832238.

## Development of Multiplex Real-Time RT-PCR to Determine the Expression Level of Toll-Like Receptor Genes

**S. A. Salamaikina<sup>1, 2, \*</sup>, V. I. Korchagin<sup>1</sup>, K. O. Mironov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Central Research Institute of Epidemiology Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-Being, Moscow, 111123 Russia*

<sup>2</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

*\*e-mail: salamaykina@cmd.su*

Immune response gene expression analysis is an important task in studies of interactions between host and an infectious agent. Many approaches to this task have been developed, but despite significant progress, the problem of selecting a single standard for data normalization remain unsolved. In the present work, *HPRT1*, *SDHA*, *GAPDH* and *TBP* were selected as candidates for reference genes with stable expression and a system for their analysis based on multiplex real-time RT-PCR was developed. The results of calculations using *geNorm* and *BestKeeper* algorithms allowed to create a stable index based on two genes — *HPRT1* and *SDHA*. It was used for normalization of expression level of target genes of Toll-like receptors: *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* and *TLR8*. The obtained expression values of Toll-like receptor genes in the sample of conditionally healthy individuals were characterized by high stability and positive mutual correlation (except *TLR6*), which may indicate common mechanisms of expression regulation and also confirms the possibility of using the developed multiplex system to analyze the expression of immune response genes.

**Keywords:** Toll-like receptors, real-time RT-PCR, housekeeping genes, gene expression