

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.1

УНИВЕРСАЛЬНАЯ СИСТЕМА СРАВНЕНИЯ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ПРОМОТОРЕ ГЕНА *TERT* НА ПРИМЕРЕ АНАЛИЗА ОПУХОЛЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**Варвара Даниловна Макарова¹, Эдуард Константинович Писарев^{1,2},
Светлана Андреевна Павлова³, Галина Валериевна Павлова^{3,4},
Мария Эмильевна Зверева¹**¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия³ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия⁴ НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко, Москва, Россия**Автор, ответственный за переписку:** Эдуард Константинович Писарев, e.pisarev@fbb.msu.ru

Аннотация: Проведено сравнение методов ПЦР в реальном времени и цифровой капельной ПЦР для определения мутаций промоторной области гена *TERT* с разными системами детектирующих зондов. Определены пределы обнаружения мутаций для этих методов, показано преимущество метода цифровой капельной ПЦР для анализа опухолевых поражений центральной нервной системы. Впервые проанализирована мутантная аллельная фракция изменений промотора гена *TERT* для геномной ДНК клеточных культур опухолевых образований головного мозга человека, которая составила 60% для глиобластом IV степени. Для сравнения методов была предложена универсальная система на основе рекомбинантных плазмид, которая проявила себя лучше, чем система на основе геномных ДНК-клеточных линий.

Ключевые слова: мутации промотора гена *TERT*, цифровая капельная ПЦР, теломеразная обратная транскриптаза, биомаркеры глиобластомы

Благодарности. Авторы выражают благодарность Т.С. Зацепину за техническую поддержку в осуществлении настоящей работы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Минобрнауки России «Развитие биоресурсной коллекции опухолей нервной системы человека с молекулярно-генетической паспортизацией для персонализированного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями» № 075-15-2021-1343 от 4 октября 2021 года.

Для цитирования: Макарова В.Д., Писарев Э.К., Павлова С.А., Павлова Г.В., Зверева М.Э. Универсальная система сравнения методов определения мутаций в промоторе гена *TERT* на примере анализа опухолевых поражений центральной нервной системы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 63. № 5. С. 344–354.

ORIGINAL ARTICLE

**UNIVERSAL SYSTEM FOR DETERMINING MUTATIONS
IN THE PROMOTER OF THE *TERT* GENE ON THE EXAMPLE
OF THE ANALYSIS OF TUMOR LESIONS OF THE CENTRAL NERVOUS
SYSTEM**

**Varvara D. Makarova¹, Eduard K. Pisarev^{1,2}, Svetlana A. Pavlova³,
Galina V. Pavlova^{3,4}, Maria I. Zvereva¹**

¹ Department of Chemistry of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² Faculty of Bioengineering and Bioinformatics of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

³ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russian Federation

⁴ NN Burdenko Neurosurgical Research Centre, Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Eduard K. Pisarev, e.pisarev@fbb.msu.ru

Abstract. In this work, we compared real-time PCR and droplet digital PCR methods for the promoter region of *TERT* gene mutations detection using various systems of detecting probes. The detection limits of mutations for these methods were determined, based on which the advantages of the droplet digital PCR method for future studies of tumor lesions of the central nervous system were described. For the first time, the mutant allele fraction of changes in the promoter of *TERT* gene for cell lines of tumor lesions of the central nervous system was analyzed as 60% for glioblastoma Grade IV *IDHI*. To compare these methods, a versatile system based on recombinant plasmids was proposed, which proved to be better than the system based on genomic DNA.

Keywords: *TERT* promoter mutations, droplet digital PCR, telomerase reverse transcriptase, cancer biomarkers

Acknowledgements. The authors express their gratitude to T.S. Zatsepin for technical support in the implementation of this work.

Financial Support. The work was carried out with the financial support of the grant of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation “Development of a bioresource collection of tumors of the human nervous system with molecular genetic certification for personalized treatment of patients with neuro-oncological diseases” No. 075-15-2021-1343 dated October 4, 2021.

For citation: Makarova V.D., Pisarev E.K., Pavlova S.A., Pavlova G.V., Zvereva M.I. Universal System for Determining Mutations in The Promoter of the *TERT* Gene on the Example of the Analysis of Tumor Lesions of the Central Nervous System // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 63. N 5. P. 344–354.

При канцерогенезе некоторых опухолевых поражений, к которым относятся и опухолевые поражения центральной нервной системы (ЦНС), возникают соматические мутации, нарушающие нормальное функционирование клетки и вызывающие опухолевую трансформацию [1]. Мутации в промоторе гена *TERT* чаще всего представлены одиночными нуклеотидными заменами в двух наиболее часто встречающихся позициях генома: в позиции –124 относительно стартового ко-

дона ATG гена *TERT* – 228 G > A (или C228T, согласно сборке генома человека GRCh37.p13, в сборке GRCh38 это соответствует положению –113) и в позиции –146 относительно стартового кодона – 250 G > A (или C250T, согласно сборке генома человека GRCh37.p13, в сборке GRCh38 это соответствует положению –135).

Известны также значительно более редкие соматические изменения для этой области [2]. По одной из гипотез происхождения опухолей ЦНС,

эти мутации вызывают активацию теломеразы в соматических клетках, что влечет за собой их неконтролируемую пролиферацию и является причиной их опухолевой трансформации [3]. Результаты изучения промотора обратной транскриптазы теломеразы *TERT* показали, что мутации С228Т и С250Т возникают преимущественно в таких видах опухолей, как опухоли центральной нервной системы, щитовидной и околощитовидной желез, мочевого пузыря и некоторых других [4]. В 2021 г. вышла новая классификация ВОЗ первичных опухолей ЦНС, имеющая важные изменения, которые повышают роль молекулярной диагностики в классификации опухолей ЦНС на основе мутаций в промоторной области гена *TERT* [5]. В частности, в трех типах первичных опухолей изменения последовательности промотора гена *TERT* становятся одним из ключевых диагностических маркеров [6]. Их появление приводит к образованию новых сайтов узнавания транскрипционными факторами, что было показано для клеток глиобластом и рассматривается как основа для направленной химиотерапии в этом случае [7]. В связи с этим возрастает актуальность разработки методов сравнения и анализа существующих экспериментальных подходов к определению мутаций в промоторной области гена *TERT* и проверки их применимости для анализа соматических мутаций клеток опухолевых образований ЦНС.

В настоящее время стандартным биологическим методом получения материала для анализа опухоли ЦНС на наличие специфических маркеров является биопсия ткани (объектом исследования с применением молекулярных технологий служит геномная ДНК), однако инвазивность, риск осложнений и высокая стоимость этого метода создают значительные ограничения для диагностики и мониторинга злокачественных образований. Поэтому разрабатываются высокочувствительные и все более специфические методы неинвазивной диагностики опухоли на основе определения соматических мутаций [8]. В настоящее время основным инструментом для определения мутаций служат молекулярные технологии на основе ПЦР благодаря их высокой эффективности амплификации целевой последовательности и доступности, а также наличие сертифицированного для клинического использования оборудования, необходимого для применения метода. В зависимости от региона генома, выбранного для тестирования, существуют случаи, когда ДНК опухоли (участок последовательности с однонуклеотидной заменой или другим изменением, характерным

для опухолевого генома) сложно детектируется из-за особенностей первичной структуры и геномной пространственной организации, характерной для клеток определенных тканей. Так, промотор гена *TERT* относится к сложноструктурированным областям генома человека с доказанной квадруплексной структурой [9]. Поэтому применяются подходы для проведения анализа в присутствии таких структур, в том числе на основе ПЦР (например, цифровой капельной ПЦР), позволяющие преодолеть эти ограничения [10]. Цель работы заключалась в том, чтобы предложить экспериментально обоснованный подход для сравнения и валидации методов определения мутаций С228Т и С250Т промоторной области гена *TERT* в образцах разной природы (геномная ДНК, внеклеточная ДНК, плазмидные конструкции и т.д.), который позволит получать надежные и воспроизводимые результаты и подойдет для стандартизации мультицентровых клинических исследований.

Результаты и обсуждение

В качестве первого метода был выбран ПЦР в реальном времени в варианте TaqMan как наиболее доступный, распространенный и наименее затратный количественный метод анализа нуклеиновых кислот (НК) в клинической диагностике [11]. На основе анализа литературы была выбрана система последовательностей детектирующих зондов и олигонуклеотидов для амплификации промоторной области гена *TERT*. Во время стадий отжига и элонгации детектирующий зонд гибридизуется с целевой ДНК. Далее при прохождении этого региона ДНК-полимеразой происходит расщепление зонда до мононуклеотидов из-за 5'-3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы. В итоге флуорофорная группа отделяется от тушителя, что приводит к разгоранию флуоресценции. Интенсивность сигнала флуоресценции зависит от количества расщепленного субстрата, поэтому результирующий сигнал пропорционален количеству амплифицированного продукта в образце. Были выбраны последовательности детектирующих зондов для двух систем на основании работ [10, 12]. Они содержали различные пары тушителя (BHQ1) и флуорофоров (флуоресцеин (FAM) или гексахлорфлуоресцеин (HEX)) с неперекрывающимся спектром флуоресценции, что теоретически позволяет провести определение наличия или отсутствия мутации в одной точке (табл. 1). При проверке использования выбранных детектирующих зондов в качестве матрицы для амплификации в системе были использованы

Т а б л и ц а 1

Последовательности и названия детектирующих зондов

Название зонда	Последовательность	Предложена в работе
<i>TERT</i> _228_wt_prb1	HEX-CGGAGGGGGCTGG-BHQ1	[10]
<i>TERT</i> _228_wt_prb2	HEX-AGCCCCCTCCGGGCCCTCCCA-BHQ1	[12]
<i>TERT</i> _250_wt_prb1	HEX -TCCCGACCCCTCCCGGGTC-BHQ1	[10]
<i>TERT</i> _250_wt_prb2	HEX-ACCCGGGAGGGGTCGGGACG-BHQ1	[12]
<i>TERT</i> _228_mut_prb1	FAM-CCCGGAAGGGGCTG-BHQ1	[10]
<i>TERT</i> _228_mut_prb2	FAM-AGCCCCCTCCGGGCCCTCCCA-BHQ1	[12]
<i>TERT</i> _250_mut_prb1	FAM-TCCCGACCCCTCCGGGT-BHQ1	[10]
<i>TERT</i> _250_mut_prb2	FAM-ACCCGGAAGGGGTCGGGACG-BHQ1	[12]

плазмиды, несущие участок ДНК промоторной области гена hTERT, длиной нуклеотидных пар 235, с мутациями C228T, C250T и без мутаций, названные соответственно pUC19_235_C228T, pUC19_235_C250T и pUC19_235_wt. Плазмиды были получены ранее на основе вектора pUC19 и запатентованы МГУ имени М.В. Ломоносова [13].

В первую очередь для детектирующих зондов подбирали оптимальные значения температуры гибридизации, при которых специфически появляется сигнал только от целевой плазмиды. Для каждого зонда готовили две смеси: с целевой плазмидой и с плазмидой с однонуклеотидной заменой. Далее проводили ПЦР в реальном времени, с использованием градиента температур на стадии отжига в цикле ПЦР от 54 до 72 °С.

В методе ПЦР в реальном времени количество ДНК измеряется после каждого цикла амплификации с помощью детекции сигнала флуоресценции. Флуоресцентный сигнал прямо пропорционален количеству образованных продуктов ПЦР (ампликонов). По полученным зависимостям были определены оптимальные значения температуры гибридизации для получения специфического сигнала каждого из зондов (табл. 2).

Далее при оптимальной температуре гибридизации для каждого детектирующего зонда были получены калибровочные кривые с использованием специфической матрицы. В целях построения калибровочных кривых для

определения зависимости появления сигнала флуоресценции (пороговый номер цикла) от количества матрицы для амплификации готовили семь образцов плазмид последовательным разведением в 10 раз и один образец без добавления ДНК (с водой) в качестве отрицательного контроля. Эксперимент проводили независимо для каждого детектирующего зонда (табл. 1), используя две ДНК-полимеразы разных производителей, обладающие 5'-3'-экзонуклеазной активностью.

Для каждого зонда были построены калибровочные кривые и проведен статистический анализ полученных результатов (определены среднее и стандартное отклонения, доверительные интервалы). Получены уравнения и коэффициент аппроксимации для линейного участка калибровочной кривой (табл. 3). По этим калибровочным кривым был определен нижний предел обнаружения. Плазмидная ДНК определяется достоверно до концентрации 1 пкг/мкл. Такой результат получен для всех восьми зондов.

После этого проводили оценку возможности применения метода с использованием в качестве ДНК-матрицы геномной ДНК клеточных культур глиобластом человека. Сигнал от образцов клеточных культур при сравнении с калибровочным графиком на основе плазмид как матрицы ПЦР возникает на уровне нижнего предела обнаружения, т.е. в области потери линейности зависимости числа циклов от концентрации матрицы, что может привести к неточности вы-

Оптимальные значения температуры гибридизации зондов, при которых наблюдается специфический сигнал

Зонд	Оптимальная температура, °С
<i>TERT</i> _228_wt_prb1	57,6
<i>TERT</i> _228_wt_prb2	71
<i>TERT</i> _250_wt_prb1	65,4
<i>TERT</i> _250_wt_prb2	69,5
<i>TERT</i> _228_mut_prb1	61
<i>TERT</i> _228_mut_prb2	72
<i>TERT</i> _250_mut_prb1	65,4
<i>TERT</i> _250_mut_prb2	65,4

числения доли мутантной аллельной фракции (рисунок, табл. 4).

Промоторный регион *TERT* представляет собой сложную для анализа геномную область из-за высокого содержания GC (~80%). Возможно, в богатой гуанином цепи геномной ДНК образуются G-квадруплексы – неканонические вторичные структуры ДНК, состоящие из уложенных слоями G-тетрад – плоских структур, состоящих из четырех остатков гуанина, зафиксированных с помощью водородных связей. Это обстоятельство на фоне присутствия полной геномной ДНК человека может быть одной из причин несогласованности опубликованных данных, полученных с применением разных методов [14]. Такие структуры могут мешать эффективной гибридизации детектирующих зондов или влиять на прохождение участка ДНК-полимеразой при элонгации. Мы проверили различные методы, которые теоретически могли бы облегчить ПЦР-амплификацию. К ним относятся фрагментация ДНК, использование добавок в реакционные буферы, ослабляющие внутримолекулярные водородные связи, дестабилизирующие G-квадруплексы и облегчающие денатурацию ДНК (диметилсульфоксид (ДМСО), 7-деаза-2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфат (7-deaza-dGTP) и коммерчески доступная смесь Q5 High-Fidelity GC-enhancer (буфер, содержащий неорганические ионы и/или детергенты), что не привело к существенному изменению результатов.

Ранее нами была показана возможность использования цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) для определения этих мутаций в промоторном регионе гена *TERT* с детектирующими зондами той же первичной структуры для неинвазивной диагностики рака мочевого пузыря [10]. Количественный и высокочувствительный метод на основе цкПЦР идеально подходит для определения мутаций в сверхмалых количествах ДНК, характерных для опухолевой ДНК во внеклеточных жидкостях, и оптимален для разработки методов неинвазивной диагностики. Ключевая особенность метода цкПЦР заключается в разбиении реакционной смеси на 10 000 и более капель с помощью автоматического генератора капель при использовании специально разработанных реагентов и микрофлюидики за счет образования водно-масляной эмульсии. Генерация капель приводит к образованию одинаковых по размеру капель. В тех каплях, куда попала целевая ДНК, образуется ПЦР-продукт, что вызывает увеличение уровня флуоресцентного сигнала при использовании детектирующих зондов по механизму, аналогичному ПЦР в реальном времени. Далее капли попадают в счетчик капель, где происходит регистрация сигнала флуоресценции независимо в каждой капле. В цкПЦР количественное определение ДНК-матрицы проводят не относительно, используя калибровочную кривую, как в случае с ПЦР в реальном времени, а прямым подсчетом капель с наличием или отсутствием в них сигнала. Это существенно увеличивает чувствительность

Т а б л и ц а 3

Статистический анализ результатов ПЦР в реальном времени и определение предела обнаружения

Зонд	Уравнение линейного участка калибровочной кривой	Коэффициент аппроксимации R ²	Предел обнаружения, пкг/мкл	Ошибка предела обнаружения
1	$y = 3,3575x + 14,153$	0,9841	0,1	0,008
2	$y = 3,0982x + 15,439$	0,993	0,1	0,06
3	$y = 3,4877x + 14,218$	0,9942	0,1	0,03
4	$y = 2,9423x + 13,98$	0,9903	0,1	0,05
5	$y = 6,712x + 13,964$	0,986	0,1	0,06
6	$y = 5,11x + 19,153$	0,9985	1	нд*
7	$y = 4,375x + 19,555$	0,981	нд*	нд*
8	$y = 3,8063x + 14,779$	0,9893	0,1	9E-4

* Нет данных.

Т а б л и ц а 4

Сравнение полученных значений мутантных аллельных фракций для разных клеточных культур и линий для ПЦР в реальном времени с использованием зонда *TERT_228_wt_rpb2* и цифровой капельной ПЦР

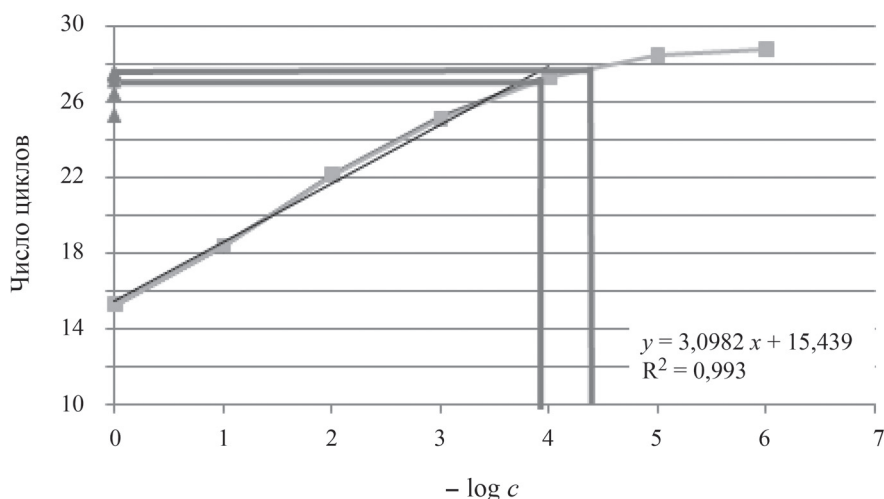
Клеточные культуры и линия опухолей человека	Sus	B1	40	A549	HepG2
Мутантная аллельная фракция ПЦР в реальном времени, %	87,4	86,6	83,2	33,2	нд*
Мутантная аллельная фракция цифровая капельная ПЦР, %	60	63	60	23	71

* Нет данных.

системы и эффективность амплификации, а также способствует увеличению разрешающей способности и детектированию последовательностей, различающихся на один нуклеотид.

Перед анализом геномных ДНК клеточных культур глиобластом человека было необходимо убедиться, что система определения мутаций в промоторе гена *TERT* работает на синтезированных зондах. Для этого в качестве ДНК-матрицы

использовали описанные выше плазмиды, а последовательности детектирующих зондов были взяты из работы [12]. В случае цкЦПР, 7-deaza-dGTP концентрация, рекомендуемая в работах [10, 12], составила 200 мкМ. В нашем случае разделение кластеров начиналось с концентрации 50 мкМ и выше. После этого была проанализирована геномная ДНК клеточных культур глиобластом при использовании 0,7 нг геномной



Интервал определения ПЦР в реальном времени образцов геномной ДНК клеточных культур глиобластом человека с использованием калибровочной иллюстрации зонда *TERT_228_wt_prb2* и плазмиды *pUC19_235_wt*

ДНК на реакцию. В результате была рассчитана мутантная аллельная фракция (МАФ) для трех-геномных ДНК клеточных культур, полученных из опухолевой ткани глиобластом пациентов (все Grade IV *IDH1*-) Sus, B1, 40, а также для клеточных линий A549 (аденокарцинома легкого человека) и HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), использованных в качестве отрицательного и положительного контроля соответственно.

Для клеточной линии A549 оценку МАФ мутаций промотора гена *TERT* ранее не проводили, так как исходные клетки этой линии получены из опухоли легкого, для которого такой тип мутаций является редким. Для клеточных культур глиобластом и для клеточных линий A549 и HepG2 МАФ составил соответственно 60–63 и 23–71% (табл. 4). Это хорошо согласуется с данными других исследований (~51% для глиом и 78% для олигодендроглиом) [15]. Для геномной ДНК клеточной линии HepG2 полученная МАФ полностью согласуется с результатом в работе [11], а невысокое значение МАФ для A549 соответствует ожидаемому.

Проведение сравнения определения мутаций в промоторной области гена *TERT* методом ПЦР в реальном времени и цкПЦР с общей системой детектирующих зондов при использовании в качестве ДНК-матрицы рекомбинантных плазмид с промоторной областью гена *TERT* показало, что оба метода работают. Использование в качестве стандартной матрицы геномной ДНК дает неоднозначный результат. И если в случае с цкПЦР преодолеть эти недостатки можно, то в случае с ПЦР в реальном времени сложное строение промоторно-

го региона *TERT* не позволяет использовать такой вариант анализа с этой системой зондов в качестве метода определения мутаций для анализа геномной ДНК опухолевого образца.

Методы

Получение перевиваемых культур клеток

Полученный образец опухоли помещали в чашку Петри с холодным раствором Хенкса, чтобы очистить ткань от кровеносных сосудов, оболочек и т.д. Затем в другой чашке Петри образец измельчали с помощью скальпеля и стеклянной пипеткой переносили в пробирку (15 мл). После осаждения всех фрагментов образца убирали раствор Хенкса и добавляли 0,25%-й раствор трипсина. После повторного осаждения ткани отбирали трипсин и добавляли свежий, после чего помещали на подогреваемый до 37 °С шейкер до размягчения ткани. В случае с глиобластомами на это требуется около 20 мин. Для остановки трипсинолиза в пробирку добавляли культуральную среду в соотношении 1:1, после чего вновь ждали осаждения образца и отбирали жидкость, не захватывая осадок. Диссоциацию ткани проводили в растворе Хенкса, добавляя его в пробирку и ресуспендируя ткань стеклянной пипеткой. После осаждения оставшихся крупных фрагментов взвесь образовавшихся клеток переносили в чистую пробирку. К оставшейся ткани вновь добавляли раствор Хенкса. Процесс диссоциации образца повторяли столько раз, сколько требовалось для получения максимально возможного числа клеток. Взвесь клеток процежи-

вали через ситечко в пробирку (50 мл) для лучшей очистки от оставшихся крупных фрагментов, а затем пипеткой переносили в чистую пробирку объемом 15 мл и центрифугировали при 1000 об/мин (~180 g) в течение 10 мин. Отбирали жидкость, добавляли культуральную среду и рассеивали на флаконы для дальнейшей культивации.

Культивирование клеток

Линии и первичные культуры клеток, используемые в эксперименте, культивировали в ростовой среде DMEM/F12 с пируватом натрия, добавляя 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% раствора HEPES для поддержания pH, 1% GlutaMAX и 1% антибиотика/антимикотика (раствор пенициллина/стрептомицина/амфотерицина). Флаконы с клетками помещали в CO₂-инкубатор, поддерживающий температуру 37 °С. При пересеве клетки снимали 0,25%-м раствором трипсина, добавляя 1 мл во флакон с клетками, отмытыми фосфатно-солевым буфером (PBS). Трипсинолиз останавливали добавлением во флакон 1 мл ростовой среды. Клетки отбирали в пробирку и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин (~180 g). Жидкость убирала, добавляли свежую среду и в зависимости от задачи клетки пересевали в новые флаконы для дальнейшего культивирования и последующей заморозки или использовали в эксперименте.

Выделение и очистка геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из клеток клеточных линий Sus, 40, B1 (биоресурсная коллекция тканей и полученных из тканей клеточных культур глиом человека при НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко), A549 (CCL-185, ATCC), HepG2 (HB-8065, ATCC, валидирована по экспрессии *ASGPR*).

Для выделения 10⁶–10⁷ клеток образец гомогенизировали в 1 мл реагента для выделения нуклеиновых кислот ExtractRNA (BC032, «Евроген»). Добавляли 0,2 мл хлороформа и инкубировали смесь в течение 3–5 мин при комнатной температуре при перемешивании. Образец центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при 4 °С, убирала водную фазу, содержащую РНК, и отбирали интерфазу, содержащую ДНК, в отдельную пробирку.

Для очистки полученной ДНК к образцу добавляли 0,5 мл 96%-го этанола, инкубировали на воздухе в течение 2–3 мин и центрифугировали при 2000 g в течение 5 мин при 4 °С; супернатант перемещали в новую пробирку. Дважды повторя-

ли следующие действия: смесь ресуспендировали в 1 мл 0,1 М раствора цитрата натрия в 10%-м этаноле, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном перемешивании, центрифугировали при 2000 g в течение 5 мин при 4 °С и удаляли супернатант. Смесь промывали 2 мл 75%-го этанола, инкубировали в течение 20 мин при постоянном перемешивании, центрифугировали при 2000 g в течение 5 мин при 4 °С и удаляли супернатант.

После очищенную ДНК высушивали на воздухе в течение 5 мин, ресуспендировали 0,5 мл 8 мМ NaOH и центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин при 4 °С; супернатант переносили в новую пробирку. Оценивали концентрацию геномной ДНК спектрофотометрически.

Обработка геномной ДНК ДНКазой I с разбиением по времени

Во льду в 11 пробирках смешивали 3 мкг геномной ДНК, 1 мкл 10X реакционного буфера для ДНКазы I, 1 ед. акт. ДНКазы I (EN0521, «ThermoFisher») и воду (до 10 мкл). Полученные смеси инкубировали при 37 °С в течение 30 с и 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 мин. Добавляли 1 мкл 0,5 М ЭДТА и нагревали полученные смеси при 75 °С в течение 10 мин.

Методы на основе ПЦР

Для проведения экспериментов использовали систему праймеров, синтезированных в компании «Евроген», для амплификации фрагмента двумя способами:

1) прямой *TERT_fw2* с последовательностью АСАСТGACGACATGGTTCTACAGCAGCG CTGCCTGAAACTCG (температура плавления 74 °С)

2) обратный *TERT_rev2* с последовательностью TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCG TCCTGCCCCTCACCTTC (температура плавления 74 °С).

Для проведения экспериментов были использованы две системы зондов (табл. 1). В качестве ДНК-матрицы использовали:

- 1) плазмидные ДНК: pUC19_235_wt, pUC19_235_C228T, pUC19_235_C250T;
- 2) геномную ДНК человека (Roche);
- 3) выделенную ДНК клеточных линий.

Метод ПЦР в реальном времени. Для амплификации составляли следующие ПЦР-смеси с использованием двух типов полимераз: Hot Start Taq ДНК-полимеразы (E352, «СибЭнзим») и Luna (M3004S, «New England Biolab»).

Смесь 1

0,8 мМ dNTP; 0,4 мкМ смесь праймеров (*TERT_fw2* и *TERT_rev2*); 10X Hot Start Taq буфер, 2 мМ MgCl₂; 0,13 мкМ зонд; ДНК-матрица; Hot Start Taq ДНК-полимераза (0,04 ед.акт./мкл), вода (до 25 мкл).

Смесь 2

1X Luna Мастер Микс; 0,4 мкМ смесь праймеров (*TERT_fw2* и *TERT_rev2*); 0,13 мкМ зонд; ДНК-матрица; вода (до 20 мкл).

Метод ПЦР в реальном времени с использованием добавок в буферы, ослабляющих внутримолекулярные водородные связи и облегчающих денатурацию ДНК. ДМСО (D12345, «ThermoFisher»), 7-deaza-dGTP (520100, «Биосан»), GC-enhancer (B9028AVIAL, «New England Biolab»).

Для амплификации составляли 6 типов ПЦР-смесей: 0,8 мМ dNTP; 0,4 мкМ смесь праймеров (*TERT_fw2* и *TERT_rev2*); 10X Hot Start Taq-буфер, 2 мМ MgCl₂; 0,13 мкМ зонд; ДНК матрица; Hot Start Taq ДНК-полимераза (0,04 ед.акт./мкл), разное количество реагентов в буфере и вода (до 25 мкл). Разные смеси в качестве дополнительного компонента содержали 1, 3 и 10% ДМСО; 10 мкМ 7-deaza-dGTP; 20% GC-enhancer.

Смеси перемешивали и помещали в амплификатор «Real-Time CFX96 Touch» (1855195, «Bio-Rad»). Параметры амплификации: 95 °С – 3 мин (1 цикл); далее циклически 95 °С – 50 с; температура отжига, определяемая зондом, составляла 1 мин, 72 °С – 1 мин (с повторением 45 раз); 72 °С – 5 мин (1 цикл). Для проведения анализа результатов использовали программное обеспечение CFX Manager Software («Bio-Rad»).

Метод цкПЦР. Собирали смесь следующего состава: цк-ПЦР Супермикс (1863023, «Bio-Rad»); праймеры; зонд, детектирующий последовательность, не содержащую мутацию; зонд, детектирующий последовательность, несущую мутацию; ДНК-матрица; 7-deaza-dGTP, RsaI 10 ед./мкл (ER1121, «ThermoFisher»), вода. Итоговые ПЦР-смеси использовали для формирования водно-масляных эмульсий, которые термоциклировали в соответствии со следующими параметрами: предварительная денатурация 95 °С – 10 мин; циклическая амплификация (40 раз) 94 °С – 30 с; 55 °С – 60 с; термоинактивация фермента 98 °С – 10 мин.

Статистический анализ полученных результатов

Определение нижнего предела обнаружения метода ПЦР в реальном времени для каждого зонда проводили, анализируя калибровочные кривые, полученные для плазмид. В целях определения линейных участков калибровочных кривых проводили аппроксимацию методом наименьших квадратов и вычисляли коэффициент аппроксимации. Нижний предел обнаружения определяли как область потери линейности зависимости числа циклов от концентрации матрицы. Далее выявляли ошибку полученного предела обнаружения [16]. Для этого определяли значения концентрации матрицы для крайних значений числа циклов и вычисляли для полученных значений доверительный интервал.

Для цкПЦР с помощью программного обеспечения были получены соотношения числа копий мутантной и немутантной форм. Из этого соотношения вычисляли МАФ для 3-геномных ДНК клеточных культур, полученных из опухолевой ткани глиобластом пациентов Sus, B1, 40, а также для клеточных линий A549 (аденокарцинома легкого человека) и HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека).

Вывод

Сравнение и валидацию методов определения мутаций в промоторной области гена *TERT* методом ПЦР в реальном времени и цкПЦР с общей системой детектирующих зондов необходимо проводить с использованием в качестве ДНК-матрицы рекомбинантных плазмид с фрагментом промоторной области гена *TERT*. Использование в качестве стандартной матрицы геномной ДНК дает неоднозначный результат, который исключает ПЦР в реальном времени для анализа геномной ДНК опухолевого образца. Это ставит под сомнение возможность его применения для других приложений, например для анализа внеклеточной ДНК. В свою очередь метод цкПЦР может быть использован для анализа даже таких сложноструктурированных GC-богатых областей генома, как *TERT*, что может быть использовано для генотипирования клеточных линий и в перспективе для клинической диагностики рака.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shay J.W., & Wright W.E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase // *Carcinogenesis*. 2004. Vol. 26. N 5. P. 867–874.
2. Powter B., Jeffreys S.A., Sareen H., Cooper A., Brungs D., Po J., Roberts T., Koh E.S., Scott K.F., Sajinovic M., Vessey J.Y., de Souza P., Becker T.M. Human *TERT* promoter mutations as a prognostic biomarker in glioma // *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 2021 Apr.; 147 (4).
3. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. // *Science*. 1994 Dec. 23; 266 (5193): 2011–5.
4. Ma Z.X., Yang C.M., Li M.G., Tu H. // *Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in hepatocellular carcinoma*. *Hepatoma Res.* 2019; 5: 8.
5. Louis D.N., Perry A., Wesseling P., Brat D.J., Cree I.A., Figarella-Branger D., Hawkins C., Ng H.K., Pfister S.M., Reifenberger G., Soffietti R., von Deimling A., Ellison D.W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary // *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2; 23(8): 1231–1251.
6. Powter B., Jeffreys S.A., Sareen H., Cooper A., Brungs D., Po J., Roberts T., Koh E.S., Scott K.F., Sajinovic M., Vessey J.Y., de Souza P., Becker T.M. Human *TERT* promoter mutations as a prognostic biomarker in glioma // *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 2021 Apr; 147(4): 1007–1017.
7. Juul R.I., Nielsen M.M., Juul M., Feuerbach L., Pedersen J.S. The landscape and driver potential of site-specific hotspots across cancer genomes // *NPJ Genom. Med.* 2021 May 13; 6 (1): 33.
8. Forshew T., Murtaza M., Parkinson C., Gale D., Tsui D.W., Kaper F., Dawson S.J., Piskorz A.M., Jimenez-Linan M., Bentley D., Hadfield J., May A.P., Caldas C., Brenton J.D., Rosenfeld N. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA // *Sci. Transl. Med.* 2012. May 30; 4 (136): 136ra68.
9. Monsen R.C., DeLeeuw L., Dean W.L., Gray R.D., Sabo T.M., Chakravarthy S., Chaires J.B., Trent J.O. The *hTERT* core promoter forms three parallel G-quadruplexes // *Nucleic. Acids. Res.* 2020 Jun. 4; 48 (10): 5720–5734.
10. Hosen M.I., Forey N., Durand G., Voegelé C., Bilici S., Avogbe P.H., Delhomme T.M., Foll M., Manel A., Vian E., Meziani S., De Tilly B., Polo G., Lole O., Francois P., Boureille A., Pisarev E., Salas Arose, Monteiro-Reis S., Henrique R., Byrnes G., Jeronimo C., Scelo G., Mc Kay J.D., Calvez-Kelm F.L., Zvereva M. Development of Sensitive Droplet Digital PCR Assays for Detecting Urinary *TERT* Promoter Mutations as Non-Invasive Biomarkers for Detection of Urothelial Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020. Nov. 27; 12 (12): 3541.
11. Seifi M., Ghasemi A., Heidarzadeh S., Khosravi M., Namipashaki A., Mehri V., Danaei N. Book: Polymerase Chain Reaction, Chapter 19, Overview of Real-Time PCR Principles IntechOpen. L., 2012.
12. Colebatch A.J. Investigation of clustered hypermutation in cutaneous Melbourne, Australia, 2017.
13. Веселова И.А., Еремина О.Е., Зацепин Т.С., Зверева М.Э., Фарзан В.М. Способ обнаружения и определения ДНК с заданной последовательностью методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. Пат. РФ. 15 августа 2019.
14. Zvereva M., Pisarev E., Hosen I., Kisil O., Matskeplishvili S., Kubareva E., Kamalov D., Tivtikyan A., Manel A., Vian E., Kamalov A., Kamalov A., Ecke T., Calvez-Kelm F.L. Activating telomerase *TERT* promoter mutations and their application for the detection of bladder cancer. 2020; *International Journal of Molecular Sciences*, издательство MDPI (Basel, Switzerland). T. 21. № 17. С. 6034–6052.
15. Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y., Bettegowda C., Agrawal N., Diaz L.A., Yan, H. (). *TERT* promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. Vol. 110 N 15. P. 6021–6026.
16. Ruiz-Villalba A., Ruijter J.M., van den Hoff M.J.B. Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life (Basel)*. 2021 May 29; 11 (6): 496.

Информация об авторах

Макарова Варвара Даниловна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (makarena2001@yandex.ru);

Писарев Эдуард Константинович – аспирант факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, e.pisarev@fbb.msu.ru;

Павлова Светлана Андреевна – аспирант, ст. лаборант с высшим образованием ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, pavlova.sweti@yandex.ru;

Павлова Галина Валериевна – профессор РАН, зав. лабораторией нейрогенетики и генетики развития Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, зав. лабораторией молекулярно-клеточной нейрогенетики НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко. докт. биол. наук, pavlova_g_v@staff.sechenov.ru;

Зверева Мария Эмильевна – профессор кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, mzvereva@chem.msu.ru.

Вклад авторов

Макарова В.Д., Писарев Э.К.: валидация методов ПЦР;

Писарев Э.К., Зверева М.Э., Павлова Г.В.: разработка концепции настоящей работы;

Зверева М.Э.: методология;

Павлова Г.В., Павлова С.А., Писарев Э.К.: создание и подготовка клеточных линий;

Макарова В.Д., Павлова С.А.: написание исходного текста;

Писарев Э.К., Зверева М.Э., Павлова Г.В.: редактирование текста;

Макарова В.Д.: статистический анализ;

Павлова Г.В., Зверева М.Э.: руководство проектом и получение финансирования;

Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 16.09.2021;

одобрена после рецензирования 12.10.2021;

принята к публикации 14.10.2021.