

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИМПЕДАНСНЫЙ ДНК-СЕНСОР ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА В ОБРАЗЦАХ ДЕГРАДИРОВАННОЙ ДНК

Г.В. Грушевская¹, Н.Г. Крылова², В.П. Егорова³, А.С. Бабенко⁴

¹Белорусский государственный университет, Минск, grushevskaja@bsu.by

²ООО «Умные ДНК технологии», Минск, nina-kr@tut.by

³Белорусский государственный педагогический университет, Минск, egorova_vp@bspu.by

⁴Белорусский государственный медицинский университет, Минск, labmdbt@gmail.com

Введение. В настоящее время достигнуто понимание того, что успешное лечение онкобольных возможно, если при назначении лечения учитывать генетический профиль опухоли и на его основе подбирать персонализированную терапию [1]. Однако, хотя считается, что раковая ткань разрастается из одной соматической клетки с точечной мутацией одного из двух аллелей гена, первичный клон клеток с таким однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) генома эволюционирует под действием микроокружения [2]. Возникающие клоны-потомки уже отличаются вариативными наборами огромного числа мутаций (генетических вариантов, альтернативных вариантов генома). Генетическая нестабильность и вариабельность гистологии различных участков опухолевой ткани снижают потенциал молекулярно-генетической диагностики, так как клоны потомки могут быть резистентными к терапии, что приводит к невосприимчивости опухоли к лечению или рецидиву заболевания.

Число клеток мутантных клонов относительно числа опухолевых клеток составляет до 1 % (метастазирующий рак) и менее 0.01 % (на ранней стадии, в начале клональной эволюции опухоли). Так как предельная чувствительность современных методов секвенирования (next-generation-sequencing, NGS методы) составляет 1-5 % мутантных ДНК от всего их анализируемого количества [3], они позволяют выявлять клональные мутации только на поздних стадиях рака. Чтобы повысить содержание мутантных нуклеиновых кислот в секвенируемом образце, производится дополнительный отбор по морфологическим признакам участков опухолевой ткани с высоким содержанием мутантных клонов.

Кроме того, изучение пространственного распределения различных мутантных клонов позволит воспроизвести мутантную историю, которая необходима для понимания механизмов прогрессии раковых заболеваний и, соответственно, разработки новых эффективных методов ее торможения. Границы между гистологически различными участками в свежемороженых срезах опухоли визуально слабо различимы и размываются в процессе хранения и пробоподготовки, поэтому их морфология теряется. Для долговременного хранения, чтобы сохранить морфологию ткани, срезы опухоли фиксируют. Наиболее распространенным методом является фиксация формалином с последующей пропиткой парафином (FFPE). При этом, однако, происходит образование внутри- и межмолекулярных связей, в том числе между аминокетонами нуклеотидных оснований, а также молекулами ДНК и аминокетонами белков [4]. Поэтому, изолируемая из таких образцов ДНК является фрагментированной и имеет высокую степень деградации.

Таким образом, секвенирование ДНК из биопсийных образцов продолжает оставаться нерешенной задачей из-за низкой чувствительности современных методов геномного анализа и плохого качества ДНК, изолированной из FFPE-образцов.

Целью нашей работы является разработка высокочувствительного импедансного ДНК-сенсора для генотипирования однонуклеотидного полиморфизма ДНК, полученной из FFPE-образцов опухолевой ткани.

Материалы и методы. В качестве таргетной ДНК использовалась нативная геномная ДНК, которая выделялась из плаценты здоровых доноров (образец 0) и ДНК из 12 FFPE-образцов колоректального рака, полученных от пациентов с метастазирующим раком толстой кишки (образцы 1-12).

Проводилось генотипирование однонуклеотидной замены (с.35G>A, р.G12D) гена KRAS, которая является одной из наиболее распространенных мутаций этого гена в экзоне 2, кодона 12. В качестве пробной ДНК (ДНК-зонда) использовались одноцепочечные олигонуклеотиды, состоящие из 19 и 20 пар нуклеотидных оснований с последовательностью дикого типа гена KRAS (KRAS_{wt})

и мутантного типа ($KRAS_m$), отличающегося от $KRAS_w$ заменой одного нуклеотида, соответственно.

Генотипирование выполнялось с использованием импедансного ДНК-сенсора, который представляет собой встречно-штыревую структуру электродов с высокочувствительным покрытием на основе конъюгатов углеродные нанотрубки (УНТ) – зондовая ДНК, декорированных органометаллическими комплексами [5-7]. ДНК-сенсор включался в качестве емкости в RC-автогенератор. Проводились измерения емкости сенсора (C) в режиме квазирезонанса в интервале частот (f) от 100 до 1000 кГц. Интегральная емкость определялась как площадь под кривой $C(f)$ во всем исследованном диапазоне частот.

Предварительно денатурированная при 95 °С двухцепочечная целевая ДНК выкапывалась на поверхность сенсора. Гибридизация целевой ДНК с зондовой проводилась в течение 20 мин. Измерения емкости сенсора проводились в деионизованной воде до и после гибридизации.

Интегральное изменение емкости (ΔC_{Σ}) ДНК-сенсора определялось как разность интегральных емкостей для образцов до и после гибридизации с ДНК. Т-критерий Стьюдента использовался для определения статистической значимости при сравнении ΔC_{Σ} для различных целевых ДНК с ΔC_{Σ} для гибридизации плацентарной ДНК с $KRAS_m$ (отрицательный контроль, нет связывания).

Результаты и их обсуждение. В таблице 1 представлены результаты генотипирования KRAS-гена для образцов ДНК, изолированных из плаценты здоровых доноров. Здоровая ткань имеет дикий тип онкогена KRAS по обоим аллелям. Гибридизация плацентарной ДНК в концентрации 5 нг/мкл с зондовой ДНК дикого типа ($KRAS_w$) приводила к незначительному повышению емкости. При увеличении концентрации плацентарной ДНК до 17,5 нг/мкл наблюдалось резкое снижение емкости во всем диапазоне частот.

Таблица 1. – Результаты генотипирования KRAS-гена для образцов ДНК дикого типа, изолированных из плаценты здоровых доноров

Номер образца	Интегральное изменение емкости ДНК сенсора			
	$\Delta C_{\Sigma, KRAS-w}$		$\Delta C_{\Sigma, KRAS-m}$	
	5 нг/мкл	17,5 нг/мкл	5 нг/мкл	17,5 нг/мкл
0	$-100 \pm 7^*$	$677 \pm 6^{**}$	-3 ± 8 нет связывания	18 ± 17 нет связывания

**P ≤ 0.001; *P ≤ 0.05

Снижение емкости обусловлено комплементарным связыванием плацентарной ДНК с $KRAS_w$ с образованием двухцепочечной ДНК. Двухцепочечная ДНК, связывая концы УНТ, имеющих металлический тип проводимости, приводит к формированию проводящей сети на поверхности сенсора, которая экранирует электрическое поле электродов. В результате этого происходит экспериментально регистрируемое уменьшение электрической емкости двойного слоя Гельмгольца. Небольшое повышение емкости при низких концентрациях плацентарной ДНК может быть обусловлено следующим. В силу того, что число пар оснований в изолированной плацентарной ДНК значительно превышает длину зондовой последовательности, остающиеся свободными концы плацентарной ДНК переходят в клубкообразное состояние и вносят дополнительный заряд в приэлектродную область сенсора, приводя к повышению емкости двойного слоя. При достаточных концентрациях целевой ДНК, большее количество молекул связывается с зондами на поверхности сенсора, вытесняя клубкообразные свободные концы из приповерхностной области, так что они не оказывают влияния на емкости сенсора.

Гибридизация плацентарной ДНК с зондовыми олигонуклеотидами мутантного типа ($KRAS_m$) не приводила к изменению емкости сенсора для обеих концентраций целевой ДНК. Это свидетельствует об отсутствии связывания плацентарной ДНК с $KRAS_m$.

В таблице 2 представлены результаты генотипирования гена KRAS для образцов ДНК, изолированной из FFPE-образцов колоректального рака. Исследуемая мутация гена KRAS является аллельной мутацией, поэтому в геномной ДНК, изолированной из опухолевой ткани, всегда содержится как нуклеотидная последовательность дикого типа, так и, при наличии, мутантная последовательность. Как видно из таблицы 2, при концентрациях опухолевой ДНК 1,56 нг/мкл и 5,62

нг/мкл регистрируется значительное снижение емкости после гибридизации с KRAS_w для 9 из 12 образцов. Уменьшение концентрации, при которой регистрируется снижение емкости, для целевой опухолевой ДНК по сравнению с плацентарной (с 17,5 нг/мкл до 1,56-5,62 нг/мкл) обусловлено большей фрагментацией образцов опухолевой ДНК и, соответственно, отсутствием длинных свободных концов, которые находятся в клубкообразном состоянии. Для образцов 4, 5, 6 наблюдается достоверное повышение емкости, что связано с преобладанием доли клубкообразного состояния.

Таблица 2. – Результаты генотипирования KRAS-гена для образцов ДНК, изолированных из FFPE-образцов колоректального рака

Номер образца	Интегральное изменение емкости ДНК сенсора				Результат генотипирования	
	$\Delta C_{\Sigma, KRAS-w}$		$\Delta C_{\Sigma, KRAS-m}$		ДНК-сенсор	ПЦР
	1,56 нг/мкл	5,62 нг/мкл	1,56 нг/мкл	5,62 нг/мкл		
1	303±5**	1302±6**	443±7**	1239±3**	+	+
2	1867±8**	1448±7**	1670±7**	1807±6**	+	+
3	10±4	318±4**	196±3**	224±5**	+	+
4	-293±7*	-407±7**	-127±3 [†]	-214±3*	другая мутация	+
5	-431±3**	-628±7**	-201±5*	-187±5*	другая мутация	-
6	-373±9**	-440±7**	-231±6*	279±7*	+	-
7	-63±6	784±5**	586±7**	626±4**	+	-
8	-303±7**	532±5**	-15±6	734±8**	+	-
9	1338±6**	1109±10**	497±5**	559±5**	+	+
10	545±5**	470±5**	287±8**	240±5**	+	+
11	1537±7**	1582±4**	1005±6**	485±3**	+	-
12	958±7**	1652±7**	806±5**	1116±4**	+	-

**P ≤ 0.001; *P ≤ 0.005; [†]P ≤ 0.02

При гибридизации опухолевой ДНК с KRAS_m комплементарное связывание (снижение емкости) регистрируется для 10 из 12 образцов. Для образцов 5, 6 наблюдается повышение емкости, как и в случае с олигонуклеотидом дикого типа.

Возможными причинами повышения емкости в образцах 5 и 6 могут быть другая мутация в исследуемой нуклеотидной последовательности, имеющиеся формалиновые сшивки, загрязненность образцов, значительная деградация и повреждение ДНК в процессе фиксации и изолирования.

Было проведено сравнение результатов, полученных методом импедансной спектроскопии, с результатами ПЦР в реальном времени. Методом ПЦР в реальном времени аллельная SNP мутация гена KRAS выявлена только в 6 из 12 (50 %) образцов ДНК, изолированной из FFPE-срезов ткани метастазирующей опухоли. С использованием импедансного ДНК-сенсора распознано аллельное SNP как достоверная мутация в 83,3 %, и как возможная в 16,7 % случаев.

Согласно современным представлениям, в процессе канцерогенеза толстой кишки вначале происходит инактивация гена APC, затем возникают мутации KRAS гена. Прогрессия опухоли сопровождается накоплением мутаций гена KRAS, делецией 18q хромосомы и инактивацией гена-супрессора TP53 [8]. Методами ПЦР анализа различные соматические мутации гена KRAS выявляются в 39 % случаев метастазирующего колоректального рака [9-10], методами NGS-секвенирования – в 50 % случаев [11]. Учитывая, что мутации KRAS гена являются одними из основных в прогрессии колоректального рака, высокую молекулярную гетерогенность KRAS, а также существенные расхождения в результатах, полученных различными методами, можно предположить, что частота мутаций KRAS при колоректальном раке остается недооцененной вследствие недостаточной чувствительности методов и низкого качества ДНК, изолируемой из FFPE образцов.

Результаты, полученные с использованием импедансного ДНК-сенсора, статистически достоверны. Принцип работы сенсора обуславливает его более высокую чувствительность и меньшую вос-

приимчивость к качеству ДНК-образцов без потери релевантности результатов детектирования. Эти преимущества делают его перспективным для генотипирования однонуклеотидного полиморфизма в ДНК, полученных из опухолей на ранних стадиях, а также в образцах частично деградированной ДНК, таких как изолированных из FFPE-срезов.

Список использованных источников

1. Recent advancements, limitations, and future perspectives of the use of personalized medicine in treatment of colon cancer / A. Dey [et al.] // *Technol Cancer Res Treat.* – 2023. – Vol. 22. – Article 15330338231178403.
2. Cellular interactions in the tumor microenvironment: the role of secretome / B. da Cunha [et al.] // *J. Cancer* – 2019. – Vol. 10. – P. 4574-4587.
3. Novel approach for clinical validation of the cobas KRAS mutation test in advanced colorectal cancer / A. Sharma [et al.] // *Mol. Diagn Ther.* – 2016. – Vol. 20. – P. 231-240.
4. Systematic evaluation of RNA quality, microarray data reliability and pathway analysis in fresh, fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples / I. Wimmer [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – Article 6351.
5. CNT-based label-free electrochemical sensing of native DNA with allele single nucleotide polymorphism / H.V. Grushevskaya [et al.] // *Semiconductors* – 2018. – Vol. 52(14). – P. 1836-1838.
6. Одномолекулярное EIS-секвенирование ДНК на композитах нанопористых структур: достижения и перспективы / Г. Грушевская, А. Бабенко, Н. Крылова, И. Липневич, В. Егорова // *Наука и инновации* – 2019. – № 4 (194). – С. 23-28.
7. Nanopore-penetration sensing effects for target DNA sequencing via impedance difference between organometallic-complex-decorated carbon nanotubes with twisted single-stranded or double-stranded DNA / A.S. Babenko [et al.] // Chapter 17. In: *Advanced Nanomaterials for Detection of CBRN*. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. / J. Bonca, S. Kruchinin (eds.). – Springer, Dorchester, 2020. – P. 247-258.
8. A genetic model for colorectal tumorigenesis / E.R. Fearon, B. Vogelstein // *Cell* – 1990. – Vol. 61(5). – P. 759-767.
9. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer / J. Neumann, E. Zeindl-Eberhart, T. Kirchner, A. Jung // *Pathol. Res. Pract.* – 2009. – Vol. 205. – P. 858-862.
10. Соматические мутации при колоректальном раке: опыт региона / Н.А. Огнерубов, Е.Н. Ежова // *Consilium Medicum* – 2022. – Т. 24(5). – С. 291-296.
11. Genetic characteristics of resectable colorectal cancer with pulmonary metastasis / Y.Y. Qiu [et al.] // *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2022. – Vol. 2022. – Article 2033876.