



УДК 577.29

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МИКРОЧИП ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗ 1 И 2

© 2023 г. В. О. Варачев*, Д. А. Гуськов*, А. П. Шехтман**, Д. В. Рогожин**, С. А. Поляков*, А. В. Чудинов*, А. С. Заседателев*, Т. В. Наседкина*,#

*ФГБУН “Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта” РАН,
Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

**Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Россия, 119117 Москва, Ленинский просп., 117

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) – важные диагностические и прогностические маркеры при целом ряде опухолей (хондроидные опухоли, опухоли головного мозга, лейкозы). Для определения мутаций в генах *IDH1/2* разработан метод аллель-специфичной гибридизации на биологическом микрочипе, позволяющий определять наличие мутации в образце опухоли (хондроидные опухоли, глиобластома) и вариант нуклеотидной замены. При сравнении методов определения мутаций *IDH1/2* с помощью биологического микрочипа и анализа кривых плавления с TaqMan-зондом получено полное совпадение результатов, при этом метод с использованием биочипа позволяет не только выявлять наличие мутантного генотипа, но и идентифицировать тип нуклеотидной замены без дополнительного этапа секвенирования.

Ключевые слова: изоцитратдегидрогеназа 1 и 2, мутации, глиобластома, хондроидные опухоли, диагностика, биологический микрочип

DOI: 10.31857/S0132342323050093, **EDN:** ABXFZT

ВВЕДЕНИЕ

Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) играют существенную роль в развитии ряда опухолей (глиомы, хондроидные опухоли, лейкозы) и представляют интерес в целях диагностики и выбора терапии [1]. Изоцитратдегидрогеназы участвуют в окислительном декарбоксилировании изоцитрата, превращая его в α -кетоглутарат, промежуточный продукт цикла Кребса. Соматические мутации в генах *IDH1* и *IDH2* представляют собой гетерозиготные нуклеотидные замены в каталитическом домене, приводящие к потере нормальной функциональной активности фермента, снижению уровня α -кетоглутарата и образованию 2-гидроксиглутарата, обладающего онкогенной активностью [2]. Мутации в гене *IDH1* происходят в кодоне R132, причем при глиомах >90% мутаций связано с заменой аргинина на гистидин (R132H), в то время как при хондроидных опухолях наблюдают более широкий спектр аминокислотных замен [3, 4]. В

гене *IDH2* мутации затрагивают кодон R172, чаще всего происходит замена аргинина на лизин (R172K). Мутации в гене *IDH1* встречаются гораздо чаще по сравнению с мутациями в гене *IDH2* и составляют >95% всех случаев мутантного генотипа *IDH1/2* [4]. Мутации генов *IDH1/2* – одни из наиболее значимых и клинически актуальных маркеров в современной онкологии, прежде всего, в нейроонкологии.

Прямое секвенирование – “золотой” стандарт в оценке мутационного статуса генов *IDH1/2*. Однако чувствительность этого метода зависит от качества образца, кроме того, порог обнаружения мутантной ДНК на фоне ДНК дикого типа составляет ~25% [5]. Иммуногистохимический анализ (ИГХ) требует разработки специфических антител для определения типа мутации, также наблюдаются гетерогенность окрашивания препаратов и перекрестная реактивность антител [5]. Такие методы определения мутаций, как пиросеквенирование [6] или основанный на ПЦР метод SNaPshot [7], применяются в клинической практике, но не имеют значительных преимуществ по сравнению с традиционным секвенированием. Метод плавления ДНК с использованием TaqMan-зондов

Сокращения: IDH – изоцитратдегидрогеназа; ИГХ – иммуногистохимический анализ.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-46; эл. почта: tanased06@biochip.ru).

позволяет определять мутации с чувствительностью 5%, однако для идентификации нуклеотидной замены дополнительно требуется секвенирование по Сэнгеру [8]. Биологические микрочипы — эффективный диагностический инструмент для анализа мутаций в геноме человека. Ранее были разработаны биочипы для определения соматических мутаций при раке легкого, меланоме, колоректальном раке [9, 10].

Цель данного исследования — разработка биологического микрочипа для определения соматических мутаций в генах *IDH1/2* на основе комбинации ПЦР и аллель-специфичной гибридизации с иммобилизованными зондами, его апробации и сравнительном анализе с альтернативными методами определения мутаций. Для апробации биочипа использовали контрольные образцы ДНК, выделенные из парафинизированной ткани хондронидных опухолей и глиобластомы. Проведен сравнительный анализ определения мутаций *IDH1/2* с помощью биочипа и метода плавления ДНК с использованием TaqMan-зондов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была сформирована коллекция контрольных образцов ДНК, выделенных из тканей хондронидных опухолей и глиобластомы, заключенных в парафиновые блоки. Для определения мутационного статуса генов *IDH1/2* использовали модифицированный метод анализа кривых плавления ДНК с TaqMan-зондами. В качестве зондов были выбраны олигонуклеотиды длиной 29 нт (ген *IDH1*) и 18 нт (ген *IDH2*), комплементарные

участку ДНК, в котором находится мутация, и содержащие на концах молекулы флуорофора (ROX) и гасителя флуоресценции (BHQ2). Проводили асимметричную ПЦР для участков генов *IDH1* и *IDH2*, далее продукты ПЦР подвергали плавлению в присутствии TaqMan-зондов. Кривые плавления позволяют отличить полностью комплементарные гомодуплексы (гибрид зонда с последовательностью дикого типа) и частично комплементарные гетеродуплексы (гибрид зонда с мутантной последовательностью). Симметричный пик плавления указывает на наличие в образце ДНК одной определенной последовательности, дополнительный пик с более низкой температурой плавления свидетельствует о присутствии мутантной последовательности. В качестве примера приведены кривые плавления для образца с генотипом дикого типа и мутантным генотипом для гена *IDH1* (рис. 1).

При выявлении мутации в образце далее проводили секвенирование по Сэнгеру для определения типа нуклеотидной замены. Результаты секвенирования образцов с мутациями генов *IDH1* и *IDH2* представлены на рис. 2. Таким образом, была сформирована выборка из 15 контрольных образцов, которая включала шесть образцов с генотипами дикого типа по R132 (ген *IDH1*) и R172 (ген *IDH2*), восемь образцов с мутациями гена *IDH1* (по два образца с генотипом R132H, R132C, R132L и по одному с R132G и R132S) и один образец с мутацией гена *IDH2* R172K. Мутации генов *IDH1* и *IDH2* — взаимоисключающие.

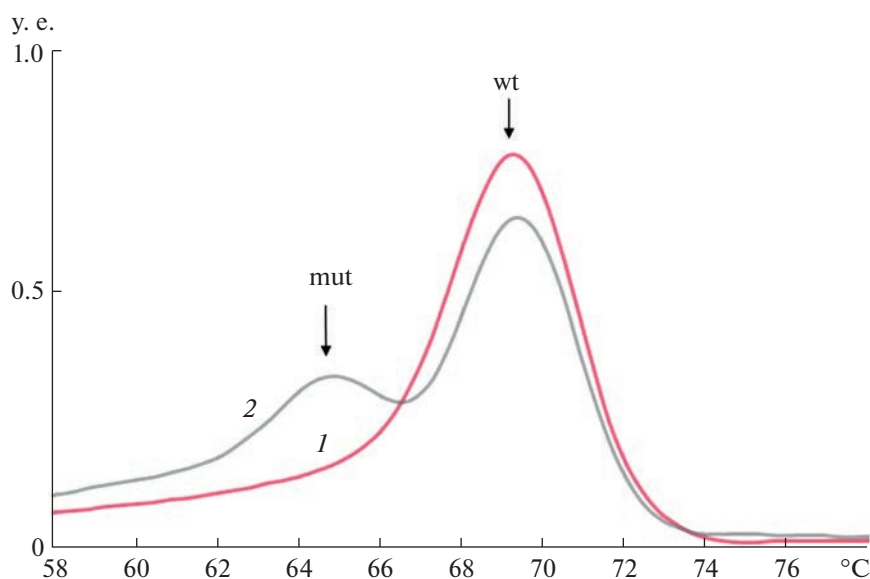


Рис. 1. Кривые плавления ПЦР-продукта гена *IDH1* в присутствии TaqMan-зонда: 1 — образец с генотипом дикого типа, 2 — образец с мутацией. Отмечены пики флуоресценции, соответствующие последовательности дикого типа (wt) и мутантной последовательности (mut).

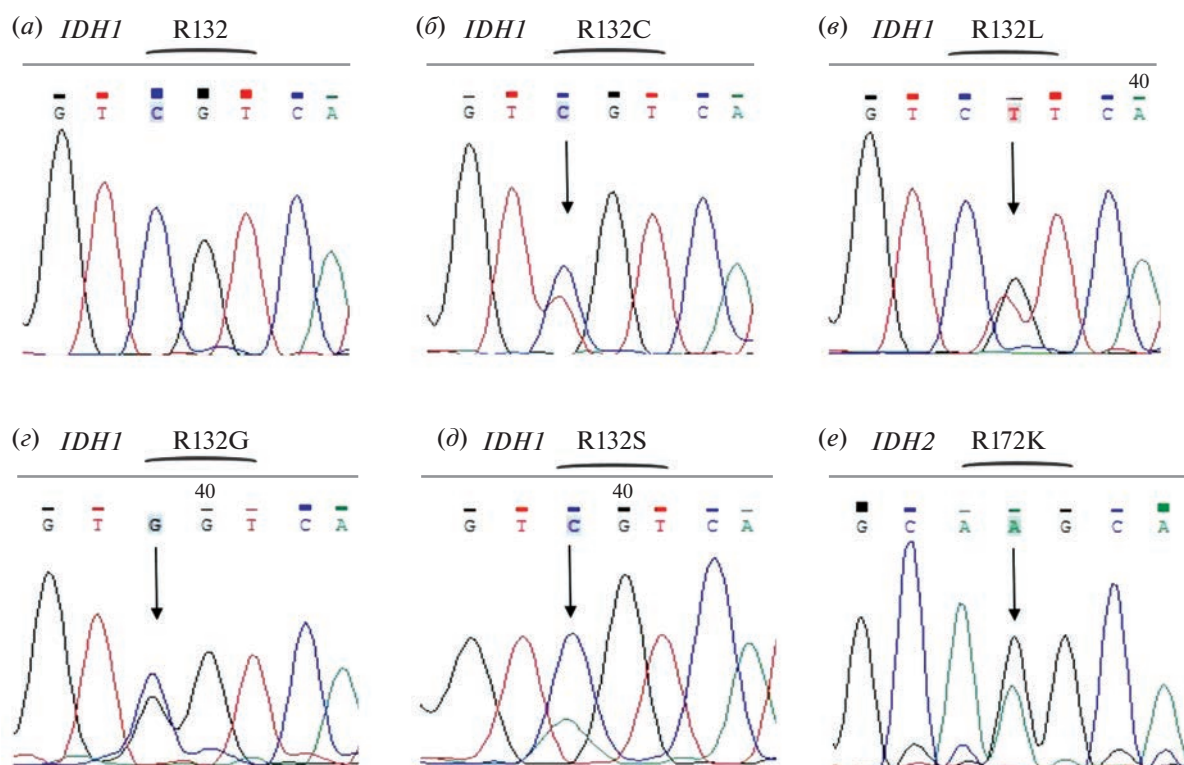


Рис. 2. Определение мутаций в кодоне R132 гена *IDH1* и кодоне R172 гена *IDH2* методом секвенирования по Сэнгеру: (а) – генотип дикого типа гена *IDH1*; (б) – мутация *IDH1* R132C (замена аргинина на цистеин); (в) – мутация *IDH1* R132L (замена аргинина на лейцин); (г) – мутация *IDH1* R132G (замена аргинина на глицин), (д) – мутация *IDH1* R132S (замена аргинина на серин), (е) – мутация *IDH2* R172K (замена аргинина на лизин). Пики, соответствующие мутациям, отмечены стрелками.

В дальнейшем контрольные образцы использовали для оптимизации работы биологического микрочипа. Для определения мутаций *IDH1/2* проводили двухэтапную “гнездовую” ПЦР с включением на втором этапе меченого дезоксиуридинфосфата (Cy5-dUTP) в растущую цепь ДНК. Флуоресцентно-меченый ПЦР-продукт гибридизовали на биочипе с иммобилизованными зондами. На рис. 3 представлены примеры картин гибридизации с различными генотипами гена *IDH1* и гена *IDH2*. В ходе разработки метода варьировали условия ПЦР, последовательности праймеров и иммобилизованных зондов для достижения однозначно интерпретируемых результатов гибридизации. Результаты определения мутаций на биочипе совпали с результатами, полученными с помощью анализа кривых плавления с TaqMan-зондом, при этом биочип позволяет сразу идентифицировать вариант нуклеотидной (и, соответственно, аминокислотной) замены. Это дает возможность проводить анализ без дополнительного этапа секвенирования в отличие от метода плавления ДНК с TaqMan-зондом [8]. Также метод с использованием биочипов имеет определенные преимущества перед методом ИГХ с моноклональными антителами [5], т.к. позволяет в одной

пробирке проводить одновременный анализ на наличие всех возможных мутаций в обоих генах. Использование в ИГХ-анализе поликлональных антител не дает возможности определить тип мутации, а также анализировать мутации сразу в двух генах *IDH1* и *IDH2*.

Исследованные образцы ДНК были выделены из парафиновых срезов участков опухолевой ткани, выбранных под гистологическим контролем, и содержали не менее 15–20% опухолевых клеток. Дальнейшее развитие метода анализа на разработанном *IDH*-биочипе предполагает использование блокирующих олигонуклеотидов на этапе ПЦР для подавления амплификации ДНК дикого типа [10, 11]. Это позволит повысить аналитическую чувствительность метода до выявления 0.5% опухолевой ДНК в образце, что делает принципиально возможным применение метода аллель-специфичной гибридизации на биочипе в жидкостной биопсии [12].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы. В исследование было включено 15 пациентов: 13 пациентов с краниальными хондроидами (хондросаркома) в воз-

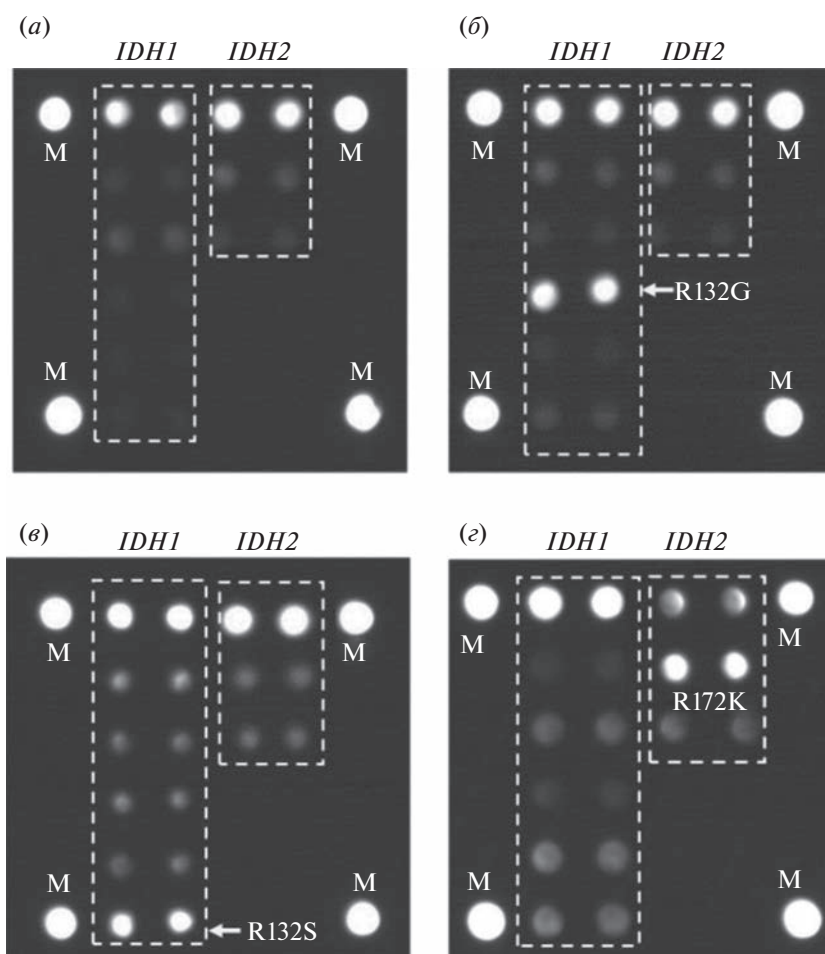


Рис. 3. Гибридизационные картины образцов ДНК опухолей, полученные на биочипе: (а) — генотип дикого типа *IDH1* R132, *IDH2* R172; (б) — в образце опухоли присутствует мутация *IDH1* R132G (замена аргинина на глицин); (в) — мутация *IDH1* R132S (замена аргинина на серин), (г) — мутация *IDH2* R172K (замена аргинина на лизин). Пунктирными линиями обозначены области расположения иммобилизованных зондов для генов *IDH1* и *IDH2*. М — маркер (ячейка содержит цианиновый краситель Cy-5).

расте от 17 до 54 лет и 2 пациента с глиобластомой, возраст 42 и 63 года. Материал опухоли фиксировали 4%-ным раствором формальдегида и заключали в парафиновые блоки по стандартной методике приготовления гистологических препаратов.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из парафиновых срезов опухолевых тканей с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя.

ПЦР с использованием TaqMan-зонда. Для проведения ПЦР в реальном времени и определения профиля плавления ПЦР-продукта использовали модификацию метода, описанного ранее [8]. Определение мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* проводили в различных пробирках. При подборе праймеров использовали программу Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Последовательности праймеров и зондов: *IDH1*

F — 5'-AAAATATCCCCCGGCTTGTGA-3', R — 5'-GCAAATCACATTATTGCCAACA-3', зонд 5'-ROX-CCCATAAGCATGACGACCTATGATGATAG-BHQ2-3'; *IDH2* F — 5'-AAACATCCCACGCCCTAGTCC-3', R — 5'-AAAGTCTGTGGCCTTG-TACTGC-3', зонд 5'-ROX-TGGGCGTGCCCTGCAATG-BHQ2-3' (подчеркнуты кодоны, соответствующие аргинину в положении 132 в гене *IDH1* и 172 в гене *IDH2*). Реакцию проводили в амплификаторе LightCycler 96 (Roche, Швейцария) для обеих пар праймеров: 95°C — 5 мин, далее (95°C — 13 с, 57°C — 40 с, 72°C — 20 с) × 53 цикла; плавление продуктов ПЦР: 95°C — 1 мин, 55°C — 4 мин, далее от 55 до 90°C повышение температуры на 0,2°C при каждом шаге с продолжительностью шага 12 с. Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Таблица 1. Последовательности зондов, иммобилизованных на биочипе

№	Ген	Название зонда	Участок последовательности зонда, содержащий мутацию (5'–3')	Длина, нт
1	<i>IDH1</i>	IDH1-wt	TCATAGGTCGTCATGCTT-NH ₂	18
2		IDH1-R132H	CTCATAGGTCATCATGCTT-NH ₂	19
3		IDH1-R132C	CTCATAGGTTGTCATGCTT-NH ₂	19
4		IDH1-R132G	TCATAGGTGGTCATGCTT-NH ₂	18
5		IDH1-R132L	CTCATAGGTCCTCATGCTT-NH ₂	19
6		IDH1-R132S	CTCATAGGTAGTCATGCTT-NH ₂	10
7	<i>IDH2</i>	IDH2-wt	ATTGGCAGGCACGC-NH ₂	14
8		IDH2-R172K	ATTGGCAAGCACGC-NH ₂	14
9		IDH2-R172S	ATTGGCAGTCACGC-NH ₂	14

Примечание: зонды содержали на 3'-конце аминогруппу (жирным шрифтом выделены кодоны R132 в гене *IDH1* и R172 в гене *IDH2*, нуклеотидная замена подчеркнута).

Гибридизационный анализ с использованием биочипа. Для наработки одноцепочечного и флуоресцентно-меченого фрагмента ДНК для гибридизации на биочипе использовали метод “гнездовой” ПЦР в два этапа, как описано ранее [9]. В ходе первого этапа происходила наработка двухцепочечного продукта, на втором этапе использовали в качестве матрицы продукт первого этапа и проводили асимметричную ПЦР с одновременным включением в ПЦР-продукт флуоресцентной метки в виде Cy5-dUTP. Флуоресцентно-меченый продукт второго этапа ПЦР гибридизовали на биочипе. Биочипы изготавливали методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов акриламидного геля, как описано ранее [13]. Гибридизацию флуоресцентно-меченого продукта на биочипе проводили в условиях, описанных ранее [10]. Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью анализатора биочипов, анализ изображения проводили с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия). Последовательности праймеров 1-го и 2-го этапов ПЦР для генов *IDH1* и *IDH2* могут быть предоставлены авторами по запросу. Последовательности зондов, иммобилизованных на биочипе, приведены в табл. 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод определения соматических мутаций с использованием биологического микрочипа, который позволяет проводить одновременный анализ на наличие мутаций в генах *IDH1/2* в образцах различных опухолей (хондронидные опухоли, глиобластомы), в том числе в фиксированных формалином парафинизированных тканях. При сравнении с методом анализа кривых плавления с TaqMan-зондом показано, что метод с использованием биочипа не менее

специфичен, при этом биочип позволяет не только выявлять наличие мутантного генотипа, но и идентифицировать вариант нуклеотидной замены без дополнительного этапа секвенирования. Дальнейшее развитие этого направления предполагает повышение аналитической чувствительности метода биочипов для применения в жидкостной биопсии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00304).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От всех пациентов получено письменное добровольное информированное согласие на использование результатов исследования в обезличенной форме в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dang L., White D.W., Gross S., Bennett B.D., Bittinger M.A., Driggers E.M., Fantin V.R., Jang H.G., Jin S., Keenan M.C., Marks K.M., Prins R.M., Ward P.S., Yen K.E., Liao L.M., Rabinowitz J.D., Cantley L.C., Thompson C.B., Vander Heiden M.G., Su S.M. // Nature. 2009. V. 462. P. 739–744. <https://doi.org/10.1038/nature08617>

2. Cairns R.A., Mak T.W. // *Cancer Discov.* 2013. V. 3. P. 730–741.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0083>
3. Chen S., Fritchie K., Wei S., Ali N., Curless K., Shen T., Brini A.T., Latif F., Sumathi V., Siegal G.P., Cheng L. // *Hum. Pathol.* 2017. V. 65. P. 239–246.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.05.015>
4. Hartmann C., Meyer J., Balss J., Capper D., Mueller W., Christians A., Felsberg J., Wolter M., Mawrin C., Wick W., Weller M., Herold-Mende C., Unterberg A., Jeuken J.W., Wesseling P., Reifenberger G., von Deimling A. // *Acta Neuropathol.* 2009. V. 118. P. 469–474.
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0561-9>
5. Agarwal S., Sharma M.C., Jha P., Pathak P., Suri V., Sarkar C., Chosdol K., Suri A., Kale S.S., Mahapatra A.K., Jha P. // *Neuro Oncol.* 2013. V. 15. P. 718–726.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/not015>
6. Arita H., Narita Y., Matsushita Y., Fukushima S., Yoshida A., Takami H., Miyakita Y., Ohno M., Shibui S., Ichimura K. // *Brain Tumor Pathol.* 2015. V. 32. P. 22–30.
<https://doi.org/10.1007/s10014-014-0186-0>
7. Perizzolo M., Winkfein B., Hui S., Krulicki W., Chan J.A., Demetrick D.J. // *Brain Pathol.* 2012. V. 22. P. 619–624.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00579.x>
8. Табаков Д.В., Катаргин А.Н., Строганова А.М., Сендерович А.И., Насхлеташвили Д.Р., Киселева Н.П. // *Усп. мол. онкол.* 2017. Т. 4. С. 53–59.
<https://doi.org/10.17650/2313-805X-2017-4-1-53-59>
9. Emelyanova M., Arkhipova K., Mazurenko N., Chudinov A., Demidova I., Zborovskaya I., Lyubchenko L., Zasedatelev A., Nasedkina T. // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2015. V. 23. P. 255–265.
<https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000084>
10. Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I., Ryabaya O., Stepanova E., Kudryavtseva A., Sadritdinova A., Dzhu-makova C., Belysheva T., Surzhikov S., Lyubchenko L., Zasedatelev A., Nasedkina T. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 52304–52320.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17014>
11. Lee D., Suh Y.L., Kang S.Y., Park T.I., Jeong J.Y., Kim S.H. // *Brain Pathol.* 2013. V. 23. P. 285–293.
<https://doi.org/10.1111/bpa.12000>
12. Emelyanova M.A., Telysheva E.N., Orlova K.V., Ryabaya O.O., Snigiryova G.P., Abramov I.S., Mikhailovich V.M. // *Cancer Genet.* 2021. V. 250–251. P. 25–35.
<https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2020.11.005>
13. Gryadunov D.A., Shaskolskiy B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.Y., Zasedatelev A.S. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. P. 4–18.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-4-18>

Biological Microarray for Detection of Somatic Mutations in the Genes of Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2

V. O. Varachev*, D. A. Guskov*, A. P. Shekhtman, D. V. Rogozhin**, S. A. Polyakov*, A. V. Chudinov*, A. S. Zasedatelev*, and T. V. Nasedkina*.,#**

#Phone: +7 (495) 135-98-46; e-mail: tanased06@rambler.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Russian Children's Clinical Hospital, Leninsky prosp. 117, Moscow, 119117 Russia

Mutations in isocitrate dehydrogenases 1 and 2 (IDH1 and IDH2) genes are important diagnostic and prognostic markers in a number of tumors (chondroid tumors, brain tumors, leukemia). To determine mutations in the *IDH1/2* genes the method of allele-specific hybridization on a biological microarray was developed, which makes it possible to determine the presence of a mutation in a tumor sample (chondroid tumors and glioblastoma) and the variant of nucleotide substitution. When comparing *IDH1/2* mutation detection methods using a biological microarray and DNA melting analysis with a TaqMan probe, full coincidence of results was obtained, with the biochip method making it possible to determine the type of nucleotide substitution without an additional sequencing step.

Keywords: isocitrate dehydrogenase 1 and 2, mutations, glioblastoma, chondroid tumors, diagnosis, biological microarray