

УДК 57.089

## ОПТИМИЗИРОВАННЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА

Д.А. Скворцов<sup>1</sup>, М.Э. Зверева<sup>1</sup>, М.П. Рубцова<sup>1</sup>, Л.С. Павлова<sup>2</sup>, А.А. Петренко<sup>2</sup>,  
Ф.Л. Киселев<sup>2</sup>, О.А. Донцова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ; <sup>2</sup>НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; e-mail: skvorrtd@mail.ru

Теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, который синтезирует по входящей в его состав РНК теломерную ДНК. Теломераза активна в 90% опухолей и может использоваться как диагностический маркер. Оптимизированы условия получения экстрактов маленьких образцов (<0,05 г) тканей поражений шейки матки для анализа теломеразной активности и выбраны оптимальные концентрации экстрактов. Для учета присутствия в экстрактах возможных ингибиторов теломеразы и Taq-полимеразы в реакциях использованы экстракты в разных концентрациях. При использовании клинических материалов поражений легкого и почки показано, что эти условия применимы для оценки теломеразной активности в различных типах рака. Существует множество исследований теломеразной активности с использованием разных вариантов ТРАП-теста, и остается открытым вопрос, можно ли сравнивать данные по клиническим материалам, полученные с помощью ТРАП-теста, с системами детекции, основанными на применении радиоактивности и *Sybr green*. Мы сравнили эти два типа детекции на ряде образцов предопухолевых поражений шейки матки (цервикальных интраэпителиальных неоплазий) и сделали вывод об их одинаковой чувствительности.

**Ключевые слова:** метод детекции теломеразной активности, ТРАП-анализ, рак шейки матки, рак почки, рак легкого, теломераза.

### Введение

Теломераза – это РНК-белковый комплекс, основными компонентами которого являются РНК-компонент теломеразы (матрица для синтеза теломер), выполняющий также структурную функцию, и теломеразная обратная транскриптаза [1].

Активность теломеразы не проявляется в подавляющем большинстве нормальных клеток человека за редким исключением. Так, она выявлена в стволовых клетках крови, в репродуктивных тканях и некоторых быстро обновляющихся тканях. В случае, когда активность теломеразы проявляется в нормальных клетках, уровень ее ниже, чем в раковых. Теломераза активна в 80–90% случаев рака, являясь одним из наиболее универсальных онкомаркеров. В доброкачественных опухолях частота ее обнаружения и активность заметно ниже [2].

### Теоретический анализ методов определения активности теломеразы

На данный момент существует несколько методик определения теломеразной активности. Они предназначены для тестирования активности теломеразы в самых разных образцах: экстракты клеток, тканей,

смешанных популяций клеток. Их можно разбить на две группы: 1) методы с непосредственной детекцией продуктов удлинения теломеразой теломерного субстрата (ТС); 2) методы с различными схемами усиления детектируемого сигнала, обладающие большей чувствительностью, но могущие давать большую ошибку при оценке активности.

До сих пор прямой метод определения активности с детекцией по включению теломеразой радиоактивно меченых дезоксирибонуклеотидов используется для количественного анализа [3]. Существует вариант детекции продуктов удлинения ТС без радиоавтографии, когда с продуктами реакции гибридируют дигоксигенин-меченый олигонуклеотид и определяют наличие получившегося комплекса с помощью иммуноферментного анализа. При использовании экстрактов клеток линии 293Т предел чувствительности составлял 37500 клеток [4]. Еще один оригинальный метод основан на определении удлинения теломеразой субстрата с помощью магнитной силовой микроскопии по изменению намагниченности наночастиц, с которыми связан теломеразный субстрат при его удлинении теломеразой [5].

Общий недостаток методов с непосредственной детекцией удлинения ТС теломеразой – недостаточная чувствительность. Кроме того, если на модельных системах для фундаментальных исследований или поиска ингибиторов теломеразы используются однородные по составу клеточные линии, то в случае клинических материалов опухолевые клетки с активной теломеразой могут составлять всего несколько процентов образца. В этом случае нужно, чтобы метод позволял детектировать активность теломеразы на фоне еще большего количества других биомолекул.

Наиболее распространенным методом определения активности теломеразы является протокол амплификации теломерных повторов (в дальнейшем ТРАП-тест), благодаря некоторым модификациям получивший возможности полуколичественного метода. Метод состоит из трех основных шагов: удлинение праймера теломеразой, амплификация получившегося продукта (продуктов) с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция), их разделение и детекция.

Выбор метода детекции теломеразной активности определяется качеством и количеством образцов, доступностью оборудования и реагентов, временем, отводимым на анализ. В силу этого развитие получил ряд методов.

Метод связывания со сцинциллянтом (SPA-протокол) позволяет увеличить скорость анализа теломеразной активности. Его недостатком является необходимость работы с тритием [6]. Более безопасна модификация ТРАП-теста, в которой используется метод “защиты гибридизацией”, т.е. для детекции продуктов амплификации применяют зонды, меченные ковалентно связанным акридином [7]. Другой подход состоит во встраивании флуоресцентных компонентов в обратные праймеры. Их развитие привело к использованию праймеров с энергопереносом. Флуоресценция появляется только в случае встраивания праймера в продукт [8]. Существует вариант ТРАП, основанный на иммуноферментной детекции. Относительно ТРАП-метода, основанного на разделении продуктов амплификации в геле, он более чувствительный и быстрый. Недостаток этого метода состоит в том, что из-за отсутствия внутренних контролей могут возникнуть сложности с разделением теломераза-положительных и теломераза-отрицательных контролей [8], и могут появиться ложноположительные сигналы.

“Двухпраймерный” ТРАП является модификацией стандартного ТРАП-метода с двумя обратными праймерами разной длины для ПЦР, предназначенной для уменьшения ложных сигналов. Преимущество этого метода в том, что благодаря низкой концентрации длинного праймера уменьшается количество продуктов взаимодействия между праймерами, а благодаря присутствию стандартного количества короткого праймера достигается значительная степень амплификации теломеразных продуктов [9].

Комбинация стандартного ТРАП-метода с ПЦР в реальном времени и использование основанных на флуоресценции методов детекции (например, *Sybr green*) делает этот подход безопасным и количественным. Поэтому его можно применять для изучения ингибиторов теломеразы и анализа больших серий образцов [8]. Сравнение с традиционным ТРАП показывает, что последний может завывать теломеразную активность и сглаживать небольшие отличия в активности из-за насыщения ПЦР-реакции на последних циклах. Однако этот вариант ТРАП, как и все методы без разделения продуктов ПЦР в геле, имеет высокий уровень ложноположительных сигналов, появляющихся из-за самоотжига праймеров.

Опухолевые ткани состоят из нескольких типов клеток и могут содержать вещества, влияющие на количественную и даже качественную оценку теломеразной активности. В ТРАП-методе с экстракцией магнитными шариками перед ПЦР изолируют полученный продукт теломеразы от примесей: продукты реакции удлинения обрабатывают (СССТАА)<sub>2</sub> (С-богатым биотинилированным праймером) и отделяют от небитинилированных продуктов с помощью покрытых стрептавидином магнитных шариков. По сравнению со стандартным ТРАП эта модификация имеет на порядок меньшую чувствительность к ингибиторам ПЦР и большую эффективность при анализе тканевых и других комплексных образцов [10].

Таким образом, наиболее достоверную информацию о наличии теломеразной активности в клинических образцах может дать метод ТРАП, однако для избежания появления ложноположительных сигналов необходимо разделение продуктов амплификации в геле [11]. При этом радиоактивный вариант метода является достаточно трудоемким, а оптимальным представляется метод с разделением ПЦР-продуктов в геле при нерадиоактивном окрашивании [12].

но и он требует оптимизации при исследовании конкретного типа рака.

### Методики

В работе использовали материалы от больных раком шейки матки, полученные после плановых хирургических вмешательств в клиниках ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Материалы верифицировали по патоморфологическим критериям и хранили в жидком азоте.

#### Приготовление контрольных экстрактов.

Клетки клеточных линий смывали с подложки раствором трипсина и осаждали центрифугированием (10 мин, 2000g). Дважды промывали фосфатно-солевым буфером (1,7 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,2 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 мМ  $\text{NaCl}$ ). Ресуспендировали в лизирующем буфере: 10 мМ Трисгидроксиметиламиноэтан-НСI (Трис-НСI), рН 7,5; 1,0 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 1 мМ ЭГТА (этиленгликольтетраацетат, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 5% глицерин, 0,5% ЧАПС (3-((3-холамидопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфонат); 0,1 мМ ФМСФ (фенилметилсульфонилфлюорид), 1 мл на 0,3–10 млн клеток, в зависимости от необходимой концентрации. Инкубировали в течение 30 мин во льду. Центрифугировали 10 мин при 4°C на 16000 g и отбирали надосадочный раствор. Экстракт делили на аликвоты и замораживали в жидком азоте.

**Приготовление экстрактов из образцов операционных материалов.** Замороженные образцы тканей (~0,01–0,10 г) разрушали до клеточного размера на дисмембраторе “*Micro-Dismembrator U*” фирмы “*B. Braun Biotech International*” при охлаждении жидким азотом. Если образец был меньше 0,05 г, то к нему в кювету добавляли 10 мкл замороженного лизирующего буфера. В гомогенизатор Даунса во льду наливали 1,5–2,0 мл лизирующего буфера на 0,1 г ткани, холодным шпателем ( $\text{N}_2$ ) соскребали порошок из кюветы и высыпали в гомогенизатор Даунса, прокачивали Даунс 5–7 раз пестиком “В”. Переносили в пробирку объемом 1,5 мл и оставляли во льду на 30 мин. Образцы центрифугировали (16000g, 15 мин, 4°C). Надосадочный раствор разделяли на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

Экстракт нормировали по количеству суммарного белка, которое определяли методом Бредфорда. Для проведения реакции определения теломеразной активности брали для каждого опыта одинаковое количество (0,5 или 5 мкг) экстракта из разных тканей.

**Проведение ТРАП-теста.** ТРАП-тест проводили, как описано ранее [3], с некоторыми модификациями. На первом этапе готовили смесь N1: 49 мкл смеси ТРАП, содержащей ТРАП-буфер [20 мМ Хепес-КОН (Хепес-N-гидроксиэтилпиперазин-N-этансульфонат)]; 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 63 мМ  $\text{KCl}$ ; 1 мМ ЭГТА; 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 0,005% v/v полиоксиэтилен(20)сорбитан монолаурата; 20 мкМ дНТФ, за исключением дГТФ; 4 мкМ дГТФ; 1,6 мкМ олигонуклеотида TC (aatccgctcgagcagagt) и экстракт клеток клеточных линий или тканей. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 30°C.

На втором этапе к смеси добавляли 2 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы (“*Хеликон*”); 0,1 мкг олигонуклеотида АСХ, gcgcggcttacccctaccctaccctaacc, 2 мкКи [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]дГТФ (3000 Ки/ммоль, “*Amersham*”) и проводили ПЦР по следующей схеме: 35 с (94°C), 35 с (50°C), 90 с (72°C) (30 циклов, амплификатор *Mastercycler* (“*Eppendorf*”, Германия)).

На третьем этапе к полученному после амплификации раствору смеси фрагментов ДНК добавляли деионизированную воду до объема 100 мкл и последовательно экстрагировали 100 мкл фенола, насыщенного ТЕ-буфером (10 мМ Трис-НСI (рН 7,5), 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)), повторяли экстракцию. Добавляли 10 мкл 3 М  $\text{NaOAc}$  и 300 мкл 96%-го этанола. Смесь инкубировали 5 мин в жидком азоте или 30–60 мин при –20°C и осаждали ДНК-центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 мин. Осадок ДНК промывали 100 мкл 80%-го раствора этанола, подсушивали на воздухе в течение 15–20 мин и растворяли в 16 мкл формамидной краски. Денатурировали ДНК выдерживанием 3–4 мин при 95°C с последующим охлаждением во льду, 8 мкл раствора наносили на полиакриламидный 10%-й гель (7 М мочевины; акриламид: бис-акриламид (1:19, 10%), ТВЕ 1x (0,1 М Трис; 0,1 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2 мМ  $\text{Na}_2$  ЭДТА); 0,1% TEMED (N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин), 0,1% персульфата аммония). В качестве электродного буфера использовали ТВЕ 1x. Проводили электрофорез, пока ксиленицианол не пройдет 15–20 см. Ксиленицианол на геле соответствует примерно второму повтору на рентгеновском снимке. Гель засушивали и фотографировали с помощью фосфоримиджера (“*Fuji*”).

При использовании ТРАП-теста на клеточных линиях без радиоактивной метки на первом этапе при-

ливали дГТФ в том же количестве, что и остальные дНТФ. На втором этапе не приливали  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{дГТФ}$ . После ПЦР препарат без очистки фенолом разделяли с помощью 20%-го неденатурирующего полиакриламидного геля (акриламид: BIS-акриламид (1:19, 20%), 0,1% ТВЕ1х TEMED, 0,1% персульфата аммония) длиной 80 мм. В качестве электродного буфера использовали ТВЕ 1х. Гель окрашивали раствором *Sybr green* (концентрат в диметилсульфоксиде фирмы "Sigma-Aldrich", разведенный в 10000 раз 0,1 М буфером Трис-НСl с рН 8,5). Окраску детектировали с помощью фосфоримиджера.

### Экспериментальная часть

Мы провели сравнение чувствительности методов определения теломеразной активности в радиоактивном варианте и с помощью флуоресцентной детекции с упрощенным способом разделения продуктов амплификации. Для этого были использованы клинические образцы ряда поражений шейки матки, почек и легкого. Данные представлены на рис. 1, 2.

В первую очередь мы разработали оптимальный метод пробоподготовки, позволяющий исследовать минимальное количество тканевого образца. Для этого использовали механический дисмембратор и последующую обработку в гомогенизаторе Даунса в присутствии буфера с мягким детергентом [3], что позволяет получать более стабильные результаты, нежели ручное перетирание замороженных образцов с последующей или одновременной обработкой буфером с мягким детергентом. В отличие от других методов, в этих условиях можно разрушать даже очень маленькие образцы (например, биоптаты) без

потери материала за счет использования в случае образцов меньше 0,05 г замороженного лизирующего буфера в качестве носителя.

Для того чтобы без дополнительных стадий и контроля учесть влияние содержащихся в экстракте веществ на количественную и качественную оценку теломеразной активности, а также учесть возможное ингибирование ПЦР и пренебречь теломеразной активностью крови, мы проводили анализ по нескольким точкам с добавлением 0,5–5,0 мкг суммарного белка в образце реакционной смеси (т.е. оптимальный диапазон концентраций составил 2–100 мкг/мл).

Серия образцов поражений шейки матки была исследована с помощью двух модификаций ТРАП-анализа с системами детекции, основанными на применении радиоактивности с использованием  $^{32}\text{P}$ -содержащего радиоактивного дезоксирибонуклеотида и наборов для гелеэлектрофореза в денатурирующих условиях [3] и красителя *Sybr green* [12] с разделением образцов на гелях малой площади с небольшой длиной пробега. Мы сравнили эти две методики и пришли к выводу, что они обладают практически одинаковой чувствительностью (рис. 1, а, б). Количество и размер амплифицированных теломерных повторов (так называемая "лесенка") варьирует для разных опухолевых образцов. Это может быть связано с разным соотношением числа опухолевых клеток к общему числу стромальных и других неопухолевых клеток в образце, который использовали для анализа. В тех же условиях были выбраны для анализа несколько образцов опухоли почек и легкого. Данные по тестированию теломеразной активности представлены на рис. 2.

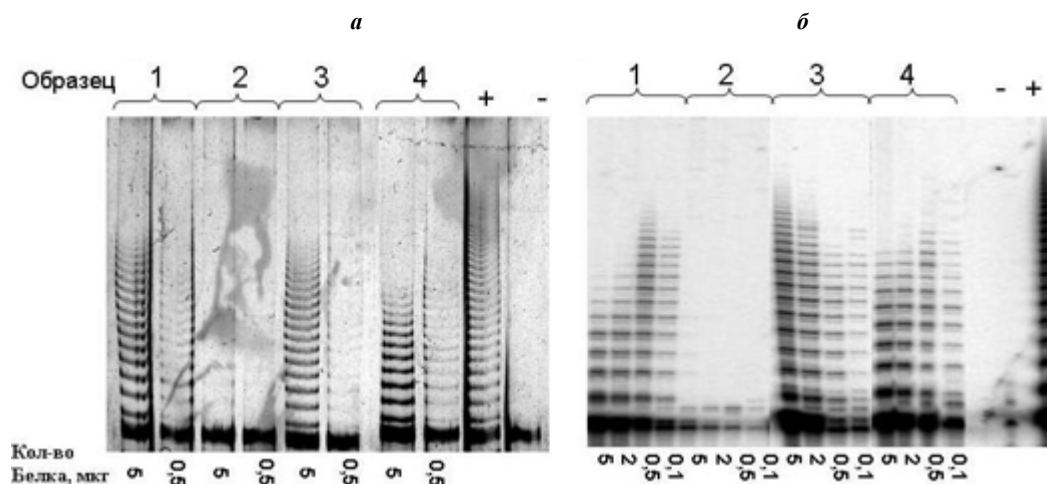


Рис. 1. Сравнение серии четырех поражений шейки матки, проанализированных в наших условиях на малом геле с окрашиванием *Sybr I* (панель а) и с использованием радиоактивной метки и сиквенного геля (панель б); 1, 2, 3, 4 – образцы тканей, (+) – контроль с экстрактом клеток теломераза-положительной клеточной линии, (-) – контроль без образца

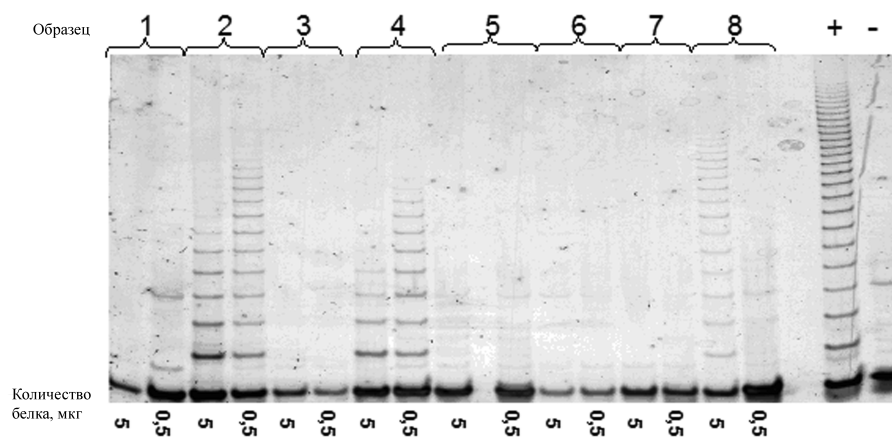


Рис. 2. ТРАП-анализ образцов нормальных и опухолевых тканей легкого и почек. 2, 4, 6, 8 – образцы опухолей; 1, 3, 5, 7 – образцы соответствующих условно-нормальных тканей; 1, 2, 3, 4 – ткани легкого, 5, 6, 7, 8 – ткани почек. (+) – контроль с экстрактом клеток теломеразы-положительной клеточной линии, (-) – контроль без образца

### Обсуждение результатов

Для измерения теломеразной активности необходимо, во-первых, получить клеточный экстракт из опухолевого образца, при этом сохранив активность теломеразы, и, во-вторых, провести реакцию удлинения теломерного субстрата и детектировать сигнал амплификации. Получение активного клеточного экстракта из опухолевых образцов мы оптимизировали ранее для образцов рака шейки матки [11]. После проведения реакции удлинения теломерного субстрата теломеразой в клеточном экстракте необходимо провести разделение продуктов реакции и их последующую детекцию. Переход от разделения продуктов реакции в денатурирующих условиях к короткому неденатурирующему гелю позволяет существенно сократить время и стоимость эксперимента, оптимизируя таким образом условия проведения эксперимента. Сравнение вариантов детекции продуктов удлинения теломеразой субстрата в экстрактах опухолевых поражений было проведено на образцах операционных материалов, содержащих разные типы клеток и биологические примеси. Сравнение детекции с помощью окрашивания продуктов реакции флуоресцентным красителем и на основе радиоавтографии показало одинаковую чувствительность обоих подходов (рис. 1), что свидетельствует о возможности замены радиоавтографии на более безопасную детекцию. Метод измерения теломеразной активности с разделением продуктов удлинения теломерного субстрата теломеразой в неденатурирующем геле с коротким пробегом и детекцией флуоресцентным красителем был использо-

ван для других типов опухолевых поражений (рис. 2). Теломеразная активность при анализе опухолевых образцов почек и легкого предполагает широкое применение метода и возможность переноса методики пробоподготовки, отработанной для одного типа опухолевых поражений, на другие. На рис. 2 видно, что более высокая «лесенка» при детекции теломеразной активности в опухолевом образце почки при более низком суммарном количестве экстракта, вносимого в реакцию, свидетельствует о присутствии ингибитора теломеразной активности в этом типе экстракта. На рис. 2 также видно, что в случае поражения тканей почки теломеразная активность детектируется только в одном из операционных образцов, что говорит о необходимости набора статистических данных измерения теломеразной активности в опухолевых поражениях этого типа, а также о необходимости проверки более широкой концентрационной зависимости от количества вносимого в реакцию экстракта.

### Заключение

Использование метода измерения теломеразной активности с разделением продуктов удлинения теломерного субстрата теломеразой в неденатурирующем геле с коротким пробегом и детекцией флуоресцентным красителем возможно для разных типов опухолевых поражений. Такая комбинация методов разделения и детекции делает измерение теломеразной активности более доступным для широкого использования.

Данная работа была проведена при финансовой поддержке в рамках государственного контракта № 02.512.11.2243 и государственного контракта № П1390 от 02.09.2009.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blackburn E.H. // Nature. 1991. **350**. P. 569.
2. Киселев Ф.Л. // Канцерогенез. М., 2004. С. 179.
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. **266**. P. 2011.
4. Kha H., Zhou W., Chen K., Karan-Tamir B., San Miguel T., Zeni L., Kearns K., Mladenovic A., Rasnow B., Robinson M., Wahl R.C. // Anal. Biochem. 2004. **331**. P. 230.
5. Grimm J., Perez J.M., Josephson L., Weissleder R. // Cancer Res. 2004. **64**. P. 639.
6. Savovskiy E., Akamatsu K., Tsuchiya M., Yamazaki T. // Nucleic Acids Res. 1996. **24**. P. 1175.
7. Hirose M., Abe-Hashimoto J., Ogura K., Tahara H., Ide T., Yoshimura T. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1997. **123**. P. 337.
8. Saldanha S.N., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. // Anal. Biochem. 2003. **315**. P. 1.
9. Szatmari I., Aradi J. // Nucleic Acids Res. 2001. **29**. P. 3.
10. Gollahon L.S., Holt S.E. // Cancer Lett. 2000. **159**. P. 141.
11. Скворцов Д.А., Гаспарьян Н.М., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Федорова М.Д., Павлова Л.С., Богданов А.А., Донцова О.А., Киселев Ф.Л. // ДАН. 2006. **408**. С. 556.
12. Zhang R.G., Wang X.W., Yuan J.H., Guo L.X., Xie H. // Cell Res. 2000. **10**. P. 71.

Поступила в редакцию 20.01.10

## OPTIMIZED DETECTION METHOD OF TELOMERASE ACTIVITY IN CANCER DIAGNOSTIC

D.A. Skvortsov, M.I. Zvereva, M.P. Rubtsova, L.S. Pavlova, A.A. Petrenko, F.L. Kissel'ov, O.A. Dontsova

(Division of Chemical Enzymology; Institute of Carcinogenesis, NN Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia)

**Telomerase is a ribonucleoprotein complex, which copy an internal RNA template to synthesize telomere DNA, which are shortened during cell divisions. Telomerase active in about 80-90% of cancers, but not in most of somatic tissues. We optimized conditions for extraction from small tissue samples (<0,05 g) and selected optimal concentrations of tissue extract concentration for cervical lesions. Two concentrations of extracts in reaction were used to take into account in-sample inhibitors. We use these conditions for several cancerous and normal samples of lung and kidney, these conditions are identical for different types of cancer. There are a lot of investigations of telomerase activity using different types of TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol). The question of this study is could we compare results for clinical materials received by TRAP with radioactive and Sybr green detection. We compare this two types of detection on the several samples of cervical intraepithelial neoplasias and conclude, that sensibility is equal.**

**Key words:** *Telomerase activity measurement assay, TRAP assay, cervical cancer, kidney cancer, lung cancer, telomerase.*

**Сведения об авторах:** Скворцов Дмитрий Александрович – мл. науч. сотр. кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, канд. хим. наук (skvorrtd@mail.ru); Зверева Мария Эмильевна – доцент кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, канд. хим. наук (zvereva@libro.genebee.msu.ru); Рубцова Мария Петровна – ст. науч. сотр. кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@libro.genebee.msu.ru); Павлова Лариса Сергеевна – науч. сотр. НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН ((495)323-58-11); Петренко Анатолий Анатольевич – ст. науч. сотр. НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, канд. биол. наук (mragvey66@yandex.ru); Киселев Федор Львович – зав. лабораторией молекулярной биологии вирусов НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, докт. биол. наук, акад. РАМН (f\_kiss@crs.umos.ru); Донцова Ольга Анатольевна – зав. кафедрой химии природных соединений химического факультета МГУ, чл-корр. РАН, докт. хим. наук (dontsova@genebee.msu.ru).