

УДК 616.98:579.852.11

Система *in vitro* для детекции маркеров рака предстательной железы методом LAMP© 2020 К. А. ФОМИЧЕВА¹, Ю. А. МАКАРОВА^{1,2,3,*}¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, 125284²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991³Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, 101000

*e-mail: j-makarova@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

После доработки 03.12.2019 г.

Принята к публикации 05.02.2020 г.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) – это метод быстрой и высокоспецифичной амплификации нуклеиновых кислот, позволяющий детектировать продукты реакции уже через 10–20 мин после ее начала. На его основе разработан интраоперационный способ определения метастазов в лимфатических узлах, получивший название одноэтапная амплификация нуклеиновых кислот (OSNA) и заключающийся в быстрой детекции мРНК эпителийсpezifического гена *KRT19*. Протокол OSNA был разработан более 10 лет назад для детекции метастазов рака молочной железы в лимфатических узлах. За это время появилась новая версия ключевого фермента, задействованного в реакции – Bst-полимеразы, которая теперь обладает одновременно активностью обратной транскриптазы, а также назрела необходимость адаптировать метод для других видов злокачественных заболеваний, в частности рака предстательной железы (РПЖ). Первым шагом является создание *in vitro* системы, моделирующей условия OSNA и позволяющей проводить LAMP на клеточных линиях РПЖ. В исследовании подобраны клеточные линии: модель РПЖ DU-145 и отрицательный контроль Molt-4, – имитирующие реальные условия проведения OSNA. Кроме того, проведена оптимизация работы новой версии Bst-полимеразы, Bst 3.0, в условиях LAMP: подобраны оптимальные концентрации нуклеозидтрифосфатов и отработана постановка LAMP без применения обратной транскриптазы. В результате получена *in vitro* система, позволяющая детектировать мРНК гена-маркера РПЖ *KRT19* методом LAMP.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация, LAMP, одноэтапная амплификация нуклеиновых кислот, OSNA, рак предстательной железы

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-3-6

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований у мужчин. Важным прогностическим факторам течения заболевания считается наличие или отсутствие метастазов в тазовых лимфатических узлах (ЛУ), что определяет и стратегию лечения [1–3].

К настоящему времени разработан интраоперационный способ определения метастазов в ЛУ, который основан на быстрой детекции мРНК цитокератина-19, кодируемого эпителийсpezifическим

геном *KRT19*, методом одноэтапной амплификации нуклеиновых кислот (one step nucleic acid amplification, OSNA). OSNA базируется на технологии петлевой изотермической амплификации (loop-mediated amplification, LAMP) [4]. В ходе OSNA на лизированном биоптате ЛУ (биоптат получают во время оперативного вмешательства) проводят реакцию обратной транскрипции, а затем в той же пробирке LAMP. В реакции LAMP, проходящей при постоянной температуре (обычно 65 °C), используют Bst-полимеразу – фермент из термофильной

Список сокращений: ЛУ – лимфатический узел; РПЖ – рак предстательной железы; LAMP (loop-mediated isothermal amplification) – петлевая изотермическая амплификация; OSNA (one step nucleic acid amplification) – одноэтапная амплификация нуклеиновых кислот.

бактерии *Geobacillus stearothermophilus*, синтезирующий ДНК по механизму вытеснения цепи. Благодаря этому стадия плавления не нужна. Более того, специальным образом сконструированные 3 пары праймеров, содержащие 8 специфически сконструированных 20-нуклеотидных участков, комплементарных целевому гену, обеспечивают очень высокую специфичность и скорость реакции (подробнее о LAMP см. обзор [2]), так что продукт детектируют уже через 10–20 мин после ее начала. Такая высокая скорость реакции позволяет проводить диагностику прямо во время операции. По чувствительности и специфичности OSNA не уступает существующим иммуногистохимическим методам интраоперационной диагностики и при этом существенно проще, быстрее и дешевле их [5].

Стандартный протокол OSNA был разработан более 10 лет назад для интраоперационной детекции метастазов в ЛУ больных раком молочной железы. За это время появилась новая версия Bst-полимеразы, Bst 3.0, обладающая одновременно активностью обратной транскриптазы. Ее применение в условиях OSNA остается неисследованным, хотя отказ от использования дорогостоящей и нестабильной при высоких температурах обратной транскриптазы позволит существенно упростить и снизить себестоимость процесса. Назрела также необходимость проанализировать применимость метода для других видов злокачественных заболеваний, в частности РПЖ, а также поиска и тестирования новых генов-маркеров и генов «положительного контроля», что позволит создать отечественную диагностическую систему детекции метастазов РПЖ в ЛУ. В настоящее время положительный контроль за редкими исключениями не ставят, а для диагностики метастазов в сторожевых ЛУ используют только праймеры к мРНК гена *KRT19*, который в норме экспрессируется в эпителиальных тканях и не экспрессируется в ЛУ. Следует отметить, что разработка праймеров для LAMP – сложная методическая задача, решаемая в ходе большой экспериментальной работы, в которой целесообразно использовать не дефицитный материал ЛУ, а модельные клеточные линии. В связи с этим становится актуальной разработка системы *in vitro* для оптимизации работы новой версии Bst-полимеразы в условиях LAMP и в последствии OSNA применительно к РПЖ, а также подбор клеточных линий РПЖ и линий, не экспрессирующих простатспецифичные гены (в частности *KRT19*), для постановки отрицательного контроля. Такая *in vitro* система позволит отработать диагностику существующих и перспективных маркеров РПЖ методом LAMP и затем создать тест-системы для интраоперационной диагностики этих маркеров с помощью OSNA.

Целью работы было создание системы *in vitro*, моделирующей условия OSNA и позволяющей проводить LAMP на клеточных линиях РПЖ. Задачи исследования включали оптимизацию полимеразы Bst 3.0 в условиях LAMP и подбор клеточных линий для использования их в качестве модели РПЖ и отрицательного контроля при проведении LAMP и OSNA.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клетки

Клетки линии DU-145 (ATCC HTB-81) РПЖ культивировали в среде MEM (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; Thermo Fisher Scientific) и 50 ед/мл антибиотиков (пенициллин, стрептомицин). Клетки Т-лимфобластного лейкоза Molt-4 (ATCC CRL-1582) культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 20% FBS и 50 ед/мл антибиотиков (пенициллин, стрептомицин). Через 3 суток клетки гомогенизировали в буфере QIAzol (QIAGEN, США).

Выделение РНК и проведение LAMP

Выделение тотальной РНК из клеток проводили с помощью miRNeasy Mini Kit (QIAGEN), как описано ранее [6, 7].

Для проведения LAMP использовали следующие праймеры к гену *KRT19* [5]:

F3: 5'-TGGTACCAGAAGCAGGGG-3';
 B3: 5'-GTTGATGTCGGCCTCCACG-3';
 FIP: 5'-GGAGTTCTCAATGGTGGCACCААСТ
 АСТАСАСGACCАТССА-3';
 BIP: 5'-GTCCTGCAGATCGACAACGCCTCCG
 TCTCAAАСТTGGTTСG-3';
 FLP: 5'-AGAATCTTGTCСCGCAGG-3';
 RLP: 5'-CGTCTGGCTGCAGATGA-3'.

LAMP проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой [5] в приборе для ПЦР в реальном времени («ДНК-технология», Россия). Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава, мкМ: F3 – 5; B3 – 5; FIP – 40; BIP – 40; FLP – 10; RLP – 10; MgSO₄ – 100; а также каждого dNTPs – по 0,9 или 1,4 мМ, SYBR Green – 0,1 мкл; Bst-полимераза 3.0 – 8 ед.; Isothermal Amplification Buffer (Tris-HCl – 20 мМ, (NH₄)₂SO₄ – 10 мМ, MgSO₄ – 2 мМ, Tween-20 – 0,1%) (New England Biolabs, Великобритания). Матрицей служили 850 нг суммарной РНК клеток DU-145 или Molt-4 или 1 мкл кДНК DU-145 (1/25 реакционной смеси для синтеза кДНК) [8].

Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле при напряженности поля 5 В/см.

Значимость различий рассчитывали по *T*-критерию Уилкоксона при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация работы Bst-полимеразы 3.0

LAMP и его модификация OSNA разработаны для исходной версии Bst-полимеразы, которая использует в качестве матрицы только ДНК, в связи с чем реакцию Bst-полимеразы проводят в присутствии обратной транскриптазы. В настоящее время разработана новая модификация фермента – Bst 3.0. Этот фермент обладает также активностью обратной транскриптазы. С целью проверить, применима ли эта новая функция Bst-полимеразы для условий OSNA, в реакции использовали праймеры к мРНК *KRT19*, а в качестве матрицы как кДНК, так и суммарную РНК. Анализ проводили на клеточных линиях РПЖ DU-145 и VCap. Оказалось, что реакция проходит на всех матрицах, хотя при использовании суммарной РНК продукты реакции появляются на 10 мин позже.

Таким образом, возможности проведения OSNA существенно расширяются. В крупных, хорошо оснащенных клиниках можно по-прежнему использовать Bst-полимеразу вместе с обратной транскриптазой. Это более дорогой вариант, но он вполне оправдан, поскольку дает результат очень быстро – через 3 мин после начала реакции. В то же время использование только Bst-полимеразы в варианте Bst 3.0 имеет ряд преимуществ. Тот же результат и почти за то же время – 12 мин после начала реакции – получают дешевле и с большей точностью, так как полимеразы Bst 3.0 гораздо стабильнее обратной транскриптазы в условиях проведения LAMP – при температуре 65 °С.

Оптимизация концентрации нуклеозидтрифосфатов

При постановке LAMP стандартно используют dNTPs в концентрации 0,4 мМ каждого [9], при постановке OSNA – 0,9 мМ [4]. Для Bst-полимеразы 3.0 рекомендованная производителем концентрация составляет 1,4 мМ. В настоящей работе реакцию LAMP проводили с двумя концентрациями: 0,9 и 1,4 мМ каждого dNTP, используя в качестве матрицы суммарную РНК, – и выяснили, что реакция эффективно проходит в обоих случаях, но скорость реакции при концентрации 1,4 мМ выше. Так, время до появления продукта при концентрации 1,4 мМ каждого dNTP составляет $13,0 \pm 0,5$ мин, а при концентрации 0,9 мМ – $15,0 \pm 1,3$ мин ($p \leq 0,05$).

Выбор клеточной линии для отрицательного контроля

При постановке LAMP в лабораторных условиях важно не только наличие отрицательного контроля без матрицы, но также отрицательного контроля, который имитировал бы естественную

популяцию РНК, что позволяет смоделировать реальные условия проведения OSNA.

На основе предварительных данных ПЦР установлено, что в линии Т-лимфобластного лейкоза Molt-4 содержание мРНК гена *KRT19* существенно ниже, чем в линии РПЖ DU-145. Действительно, в результате проведения LAMP показано, что разница во времени появления продуктов составляет более 45 мин: $9,6 \pm 0,3$ мин ($p \leq 0,05$) для линии DU-145 и $57,6 \pm 1,8$ мин ($p \leq 0,05$) для линии Molt-4. Это значительно превышает время интраоперационной диагностики (15–20 мин) и потому удовлетворяет критериям отрицательного контроля. Более того, на электрофореграмме видно, что при проведении LAMP на суммарной РНК линии Molt-4 специфический продукт не образуется, тогда как при использовании суммарной РНК линии DU-145 образуется характерный для LAMP набор конкатемерных продуктов (рис. 1).

Таким образом, впервые проведена оптимизация условий LAMP с использованием новой версии Bst-полимеразы Bst 3.0 для детекции мРНК гена *KRT-19* в клеточных линиях РПЖ. Как показано, реакция может проходить без использования обратной транскриптазы, что существенно

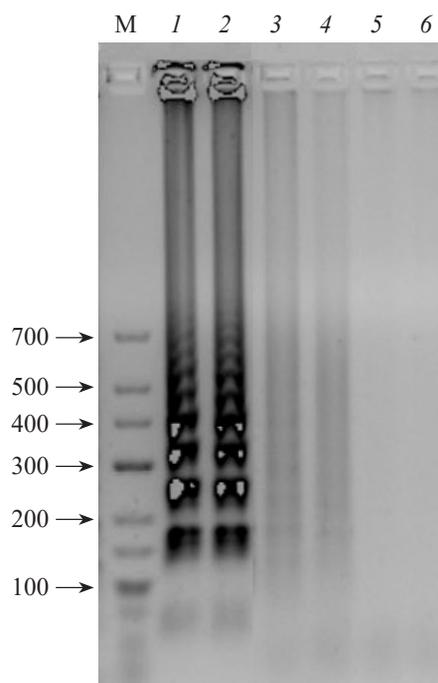


Рис. 1. Электрофорез продуктов LAMP в 2%-ном агарозном геле (в двух повторностях). В качестве матрицы использована суммарная РНК клеточных линий DU-145 (дорожки 1, 2) и Molt4 (дорожки 3, 4). Дорожки 5, 6 – реакция без матрицы. Концентрация каждого dNTP – 1,4 мМ. М – маркер молекулярной массы ДНК, пп

Fig. 1. Electrophoresis of LAMP products in 2% agarose gel. The total RNAs of DU-145 (lanes 1, 2) and Molt-4 (lanes 3, 4) cell lines were used as matrixes. Lanes 5, 6 – negative control without a matrix. M – DNA ladder, bp

упрощает и удешевляет реакцию. Это также повышает достоверность результатов, поскольку по сравнению с обратной транскриптазой Bst-полимеразы 3.0 намного стабильнее и при комнатной температуре, и при температуре проведения ЛАМР. Подобраны клеточные линии РПЖ для отработки ЛАМР в лабораторных условиях, в том числе клеточная линия для отрицательного контроля. В результате разработана система *in vitro* для постановки ЛАМР с Bst-полимеразой 3.0, которая может быть использована для детекции маркеров метастазов РПЖ в сторожевых лимфатических узлах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-1906.2019.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Князев Е.Н., Фомичева К.А., Нюшко К.М., др. Актуальные вопросы молекулярной диагностики рака предстательной железы. *Онкоурология*, 2014, 4, 14–22.
2. Makarova Y.A., Zotikov A.A., Belyakova G.A., et al. Loop-mediated isothermal amplification: an effective method for express-diagnostics of cancer. *Cancer Urol.*, 2018, 14(2), 88–99 (In Russ.).
3. Shkurnikov M.Y., Zotikov A.A., Belyakov M.M., et al. Application of loop-mediated isothermal amplification of DNA for diagnosis of prostate cancer micrometastases in the lymph nodes. *Cancer Urol.*, 2017, 13(2), 63–66 (In Russ.).
4. Taniyama K., Motoshita J., Sakane J., et al. Combination analysis of a whole lymph node by one-step nucleic acid amplification and histology for intraoperative detection of micrometastasis. *Pathobiology*, 2006, 73(4), 183–191.
5. Tsujimoto M., Nakabayashi K., Yoshidome K., et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13(16), 4807–4816.
6. Shkurnikov M.Y., Knyazev E.N., Fomicheva K.A., et al. Analysis of plasma microRNA associated with hemolysis. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, 160(6), 748–750.
7. Sakharov D.A., Stepanov A.V., Shkurnikov M.Y., et al. Short-term highly intense physiological stress causes an increase in the expression of heat shock protein in human leukocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2009, 147(3), 361–365.
8. Sakharov D.A., Maltseva D.V., Riabenko E.A., et al. Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2012, 112(3), 963–972.
9. Mori Y., Kitao M., Tomita N., et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2004, 59(2), 145–157.

In vitro system for detection of prostate cancer markers by loop-mediated isothermal amplification

K.A. FOMICHEVA¹, J.A. MAKAROVA^{1,2,3,*}

¹*P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, National Center of Medical Radiological Research, Moscow, 125284 Russia*

²*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

³*National Research University Higher School of Economics, Faculty of Biology and Biotechnologies, Moscow, 101000 Russia*

**e-mail*: j-makarova@yandex.ru

Received November 15, 2019

Revised December 03, 2019

Accepted February 05, 2020

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of nucleic acids enables detection of amplification products in 10–20 min after the reaction begins. An intraoperative method for detection of metastases in lymph nodes is based on LAMP and is called one-step nucleic acid amplification (OSNA). It allows rapid detection of the epithelial-specific marker *KRT19* in lymph nodes. The standard protocol for OSNA was developed more than 10 years ago. Since that, a new version of the key enzyme involved in the reaction (Bst-polymerase) was obtained, but its use in OSNA remains unexplored. Moreover, the time has come to apply OSNA to the detection of other cancer types, in particular prostate cancer. The first step is to create an *in vitro* system that allows LAMP to be carried out on prostate cancer cell lines. Here, LAMP protocol for the new Bst 3.0 polymerase with optimized dNTPs concentration and without reverse transcriptase was developed, and cell lines (DU-145 for prostate cancer and Molt-4 for negative control) were selected. In summary, a new *in vitro* system for LAMP-based detection of prostate cancer marker *KRT19* was developed.

Key words: LAMP, OSNA, prostate cancer

Funding – This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists (МК-1906.2019.4).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-3-6