

ТЕХНОЛОГІЯ ПІРОСЕКВЕНУВАННЯ ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ В КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Одеський державний медичний університет

Вступ

Поліморфізм одиничних нуклеотидів (single nucleotide polymorphism, далі — SNP) лежить в основі популяційної різноманітності і являє собою найпоширеніший тип поліморфізму в геномі людини [1]. Нуклеотидна основа вважається поліморфною, якщо вона зустрічається у певній позиції в послідовності ДНК як мінімум у двох варіантах з частотою не менше 1 % для найрідкіснішого варіанта [2]. Як і мікросателітні маркери, SNP можна використовувати при картуванні таких ознак, як генетично детерміновані захворювання та індивідуальна сприйнятливість до ліків, для ідентифікації збудників захворювань, у судовій медицині. Перевага використання одиничних поліморфних нуклеотидів як маркерів полягає в тому, що вони значно перевершують мікросателіти в кількісному відношенні: у геномі людини один поліморфний нуклеотид зустрічається в середньому на тисячу пар нуклеотидних основ [2; 3].

В останні роки основні зусилля дослідників було спрямовано на ідентифікацію і каталогізацію SNP. У зв'язку з нагромадженням інформації щодо поліморфних одиничних нуклеотидів виникла необхідність у розробленні системи їхнього швидкого автоматизованого розпізнавання. При вивченні SNP традиційний спосіб визначення послідовності ДНК — секвенування за методом, запропонованим Sanger і спів-

авт. [4], — було за загальною думкою визнано надзвичайно трудомістким і витратним процесом. Секвенування з використанням гель-електрофорезу, яким є даний метод, генерує надлишкову інформацію, тимчасом як для виявлення SNP, а також інсерцій та делецій однієї та більше основ досить проаналізувати послідовність з кількох нуклеотидів [1]. Можливість швидко й ефективно проаналізувати невеликі ділянки ДНК виникла в результаті розроблення технології піросеквенування.

Мета даної роботи — аналіз останніх досягнень в розробленні технології піросеквенування, огляд зразків впровадження даної технології у клінічну практику.

Принцип піросеквенування

Процес піросеквенування, або секвенування за допомогою синтезу, складається з кількох ферментативних реакцій, спрямованих на облік кількості неорганічного пірофосфату, що виділяється в процесі приєднання нуклеотидів до синтезованого ланцюга ДНК [5–7]. До переваг даної технології зараховують точність і автоматичність процесу, а також відсутність необхідності використовувати мічені нуклеотиди та гель-електрофорез.

У процесі піросеквенування ампліфікована методом ПЛР матриця ДНК гібридується з праймером для секвенування та інкубується з ДНК-полімеразою, АТФ-сульфурилазою, люциферазою і апіразою, а та-

кож з субстратами — аденозин-5'-фосфосульфатом і люциферином. У реакційну суміш подається один із чотирьох дезоксинуклеотид трифосфатів (дНТФ), що за допомогою ДНК-полімерази включається в синтезований ланцюг ДНК у випадку комплементарності основи в ланцюзі матриці. Приєднання дНТФ приводить до виділення деякої кількості неорганічного пірофосфату. АТФ-сульфурилаза в присутності аденозин-5'-фосфосульфату перетворює пірофосфат на АТФ, необхідний для перетворення люциферину на оксилюциферин, що каталізується люциферазою. При цьому оксилюциферин виділяє кванти видимого світла у кількості, пропорційній кількості АТФ. Виділене світло фіксується приладом із зарядовим зв'язком (CCD-камера) і відмічається піком на пірограмі, висота якого пропорційна кількості послідовно включених однакових нуклеотидів. Гетерогенність ДНК-матриці (у випадку гетерозиготності за певним одиничним нуклеотидом) призводить до зменшення світлового сигналу при подачі в реакційну суміш певного дНТФ, що віддзеркалюється у зниженні висоти піка на пірограмі порівняно з пірограмою гомогенної матриці. Даний феномен дозволяє ідентифікувати гетерозиготний стан поліморфного нуклеотиду. У разі некомплементарності дНТФ, що подається в реакційну суміш, нуклеотидній основі в ланцюзі матриці він не включається в ланцюг,

що синтезується, і світло не випромінюється. Весь процес від полімеризації до детекції світла триває 3–4 с при кімнатній температурі [8].

Надлишкові невбудовані дНТФ руйнуються ферментом апіразою, після чого відновлюється вихідний реакційний розчин і в суміш подається наступний дНТФ. Активність апірази дозволяє додавати новий дНТФ у реакційну суміш кожні 65 с. На даний час процес цілком автоматизовано [1].

Оскільки дезоксиаденозин трифосфат (дАТФ) є субстратом для люциферази, замість нього як дНТФ використовують α -тіотрифосфат дезоксиаденозин (дАТФ α S). Спочатку ефективний вихід піросеквенування складав ланцюг ДНК з не більше як 30 пар нуклеотидів через зниження здатності апірази руйнувати дНТФ, що послідовно подаються в реакційну суміш і постійно її розбавляють [1; 9]. За даними Garizadeh і співавт. [9], використання Sp-ізомеру дАТФ α S значно підвищує ефективність дії ДНК-полімерази й апірази, та, відповідно, дозволяє збільшити довжину продукту піросеквенування до 50–100 нуклеотидів. Ефективність піросеквенування можна підвищити також варіюванням послідовності подавання дНТФ у реакційну суміш.

При використанні технології піросеквенування традиційно застосовується одноланцюгова ДНК-матриця [7], яку одержують шляхом іммобілізації продуктів ПЛР на поверхні покритих стрептавідином магнітних бусин. Як попередній етап необхідно біотинілювати один із ПЛР-праймерів, оскільки біотин має високу спорідненість до стрептавідину [8]. Після іммобілізації біотинільованих продуктів ПЛР магнітні бусини тричі промивають для видалення праймерів і нуклеотидів, що залишилися після ампліфікації, та об-

робляють лугом для поділу ланцюжків. Кожен із ланцюжків ДНК згодом може слугувати матрицею для синтезу.

До недоліків методики приготування одноланцюгової ДНК зараховують витратну процедуру іммобілізації ПЛР-продуктів і біотинілювання ПЛР-праймерів, специфічних до певної ділянки ДНК. Guo і Milewicz [10] запропонували використовувати універсальний біотинільований праймер з послідовністю з 20 нуклеотидів, яка не комплементарна жодній послідовності людського геному. У цьому разі в процесі ПЛР універсальний біотинільований праймер приєднується до специфічних ПЛР-праймерів, що попередньо синтезуються таким чином, щоб їхні 5'-кінці були комплементарні 3'-кінцю універсального праймера. Використання універсального біотинільованого праймера дозволяє значно скоротити часові та матеріальні витрати, пов'язані з необхідністю біотинілювання кожної пари специфічних ПЛР-праймерів.

Застосування піросеквенування для вивчення генетичної обумовленості захворювань та ефективності лікарської терапії

До сьогодні ідентифіковано більше двох мільйонів поліморфних одиничних нуклеотидів [11], здійснюються спроби асоціювати подібні випадки поліморфізму зі схильністю до цілої низки хвороб. Використання піросеквенування як методу експрес-генотипування великої кількості пацієнтів дозволяє визначити й уточнити роль SNP у патогенезі конкретних захворювань.

Кілька досліджень подібного плану було присвячено вивченню зв'язку поліморфізму генів, що кодують інтерлейкіни, з розвитком пухлинних захворювань. Rivera-Chavez та співавт. [12] використовували піросеквенування для дослі-

дження впливу трьох нуклеотидних замін (597G→A, 572G→C і 174G→C) у промоторі гена IL-6 на синтез інтерлейкіну-6. Збільшення рівня даного білка звичайно супроводжує пухлинну прогресію при пухлинах голови, шиї, гортані, шлунка, печінки, підшлункової залози, кишечника, нирок, яєчника. Встановлено, що найменший рівень експресії гена IL-6 спостерігається у гомозиготі з гаплотипом, що містить аденін у позиції 597 і цитозин — у позиції 174. Відповідно до цих даних виявлено зв'язок між дозою алеля 174C і тривалістю життя при раку яєчника [13]. Наявність цього алеля асоціюється з ранньою стадією раку і, на думку авторів, може слугувати індикатором більш сприятливого результату захворювання. Проте при аналізі методом піросеквенування G174C поліморфізму в промоторі IL-6 у хворих на ендометріоз не вдалося виявити зв'язок між генотипом і рівнем інтерлейкіну-6 у сироватці, хоча у хворих він був вищим, ніж у контрольній групі [14]. Автори вважають, що генотип у позиції 174 не вносить істотного вкладу у патогенез ендометріозу в цілому, однак алель 174G підвищує ризик розвитку одного з його різновидів — ендометріозу з утворенням шоколадних кіст.

Sivertsson et al. [15] провели порівняння ефективності піросеквенування та SSCP (single-strand conformation polymorphism)-аналізу при детекції мутацій у кодонах 12, 13 і 16 N-ras гена, що впливають на розвиток злоякісної меланоми. Відзначено, що піросеквенування якісно не поступається SSCP-аналізу при ідентифікації даних мутацій, дозволяючи здійснити цей процес простіше і швидше. Ефективність піросеквенування як методу вивчення SNP підтверджена й у дослідженнях, присвячених детекції G/C поліморфізму в

кодони 72 гена p53, що пригнічує пухлиноутворення [16; 17].

Ellnebo-Svedlund et al. [18] оптимізували умови піросеквенування для ідентифікації пов'язаного з остеопорозом G→C поліморфізму в першому інтроні регуляторної ділянки COL1A1 гена, що кодує колаген типу I. Е-алель даного гена асоціюється з низькою мінеральною щільністю і підвищеною ламкістю кісток.

Ferraris і співавт. [19] вивчали можливість застосування піросеквенування для ідентифікації SNP, пов'язаних зі спадковою туговухістю. У деяких етнічних групах близько 50 % випадків автосомної рецесивної несиндромної втрати слуху і 20 % усіх випадків втрати слуху в дітей викликаються мутаціями в соннехін 26 (СХ26) гені. Використання піросеквенування дозволило правильно ідентифікувати 41 мутацію в СХ26 гені, а також мітохондріальну мутацію А1555G у гені 12S рРНК, що асоціюється з 50 % сімейних випадків прогресуючої глухоти. Одночасне додавання декількох праймерів у реакційну суміш при визначеному порядку подачі дНТФ дає можливість детектувати в перебігу однієї реакції піросеквенування до 6 близько розташованих мутацій СХ26 гена [20].

Розроблено засновану на піросеквенуванні методику діагностики генералізованої ендокринної неоплазії типу 2 (ГЕН2), що асоціюється з mis-sense-мутаціями в 15 кодонах RET-гена [21]. Дана методика дозволила підтвердити раніше поставлений діагноз ГЕН2 у 99,6 % випадків.

Поряд зі схильністю до різного роду захворювань генотип також може визначати ступінь чутливості пацієнтів до лікарської терапії. Інформація про генетично детермінований поліморфізм у мішенях лікарських засобів дає можливість підібрати відповідну те-

рапію і дозу для конкретного пацієнта, звівши до мінімуму побічні ефекти.

Технологія піросеквенування знайшла своє застосування й у сфері трансплантації органів і стовбурових клітин, зокрема при доборі пари «донор-реципієнт», який надзвичайно ускладнює висока варіабельність генів, що кодують антигени лейкоцитів людини (HLA-гени). Нещодавно розроблено методику заснованої на піросеквенуванні ідентифікації алелів HLA-генів, що дозволяє провести повне типування системи HLA-локусів у сотень пацієнтів протягом одного дня [22; 23].

Ефективність антимікробної терапії багато в чому визначається швидкістю ідентифікації патогенних мікроорганізмів, яка з моменту виникнення клінічної мікробіології ґрунтується головним чином на фенотипових характеристиках колоній і результатах фенотипових тестів, адаптованих до індивідуальних ізолятів. При цьому деякі бактерії, вирощування яких у лабораторних умовах є проблематичним, можуть залишитися неідентифікованими. Відносно недавно з'явилися дані про можливість використання рибосомальних генів, особливо гена, що кодує 16S рРНК, для таксономічного аналізу. Нещодавно розроблено принцип типування бактеріальних колоній на засадах піросеквенування варіабельних ділянок V1 і V3 гена 16S рРНК [24; 25]. При цьому бактеріальна колонія поміщається безпосередньо в пробірку для ПЛР, яка здійснюється за допомогою двох універсальних праймерів, що фланкують варіабельну ділянку. У подальшому один із ПЛР-праймерів використовується як праймер для піросеквенування. Після секвенування за допомогою синтезу нуклеотидного ланцюжка з 10–60 основ проводиться пошук аналогічних послідовнос-

тей у загальнодоступних базах даних, де на даний момент каталогізовано тисячі послідовностей варіабельних ділянок гена 16S рРНК. Сучасна автоматизація процесу дозволяє проаналізувати протягом кількох годин близько 100 різних зразків одночасно. Дана технологія може бути застосована також при оцінці бактеріального забруднення питної води і харчових продуктів. За аналогічним принципом за допомогою піросеквенування можна ідентифікувати грибкуву інфекцію. При цьому інформативним регіоном слугує варіабельна ділянка 18S рРНК гена, що ампліфікується за допомогою пари універсальних ПЛР-праймерів. Для ідентифікації грибкових патогенів досить просеквенувати за допомогою універсального праймера до сорока основ даної ділянки [26].

При виборі терапевтичної стратегії великого значення набуває швидка детекція патогенів, стійких до лікарських препаратів. Зокрема, поява стійких вірусних варіантів є неминучим наслідком неповного пригнічення реплікації вірусу імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1) при лікуванні антивірусними засобами. О'Меага та колеги [27] розробили процедуру піросеквенування для експрес-оцінки стійкості до інгібіторів протеази (ІП) ВІЛ-1, що дозволила ідентифікувати 8 первинних і кілька вторинних мутацій, пов'язаних зі стійкістю до ІП. Sinclair et al. [28] застосували піросеквенування для оцінки кількості копій гена 23S рРНК з мутацією G2576T у стійких і чутливих до лінезоліду клінічних ізолятах ентерококів. Результати секвенування при визначенні 2576 G/T гомозиготних і гетерозиготних ізолятів на 100 % збіглися з даними, отриманими в результаті ПЛР–ПДРФ аналізу. Це вкотре підтверджує точність і надійність технології піросеквенування.

Висновки

Технологія піросеквенування дозволяє встановити нуклеотидну послідовність невеликих ділянок ДНК (до 100–150 п. н.), а також ідентифікувати заміни, інсерції та делеції одного та більше нуклеотидів у послідовностях ДНК відомого складу. Принцип піросеквенування базується на детекції неорганічного фосфату, що виділяється при включенні дНТФ у синтезований ланцюг ДНК. Весь процес зводиться до кількох ензиматичних реакцій в одній пробірці без використання мічених праймерів і гел-електрофорезу. Сучасне устаткування і програмне забезпечення (див. сайт www.pyrosequencing.com) дозволяє проаналізувати понад тисячу зразків на день, що дає можливість швидко і без значних матеріальних витрат зробити генотипування великих популяцій для виявлення асоціації конкретних випадків генетичного поліморфізму, зокрема SNP, зі схильністю до захворювань і сприйнятливостю до лікарської терапії. У рутинній клінічній практиці дана технологія може використовуватися для генотипування пацієнтів, ідентифікації патогенних мікроорганізмів і вірусної інфекції, детекції стійких до лікарських засобів патогенів. Результати генотипування, у свою чергу, дозволяють визначити ступінь ризику виникнення захворювання, спрогнозувати характер його розвитку і здійснити вибір терапевтичної стратегії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Berg L. M., Sanders R., Alderborn A. Pyrosequencing technology and the need for versatile solutions in molecular clinical research // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* — 2002. — Vol. 2, N 4. — P. 361-369.
2. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome / D. C. Wang, J. B. Fan, C. J. Siao et al. // *Science.* — 1998. — Vol. 280. — P. 1077-1082.
3. Landegren U., Nilsson M., Kwok P. Y. Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis // *Genome Res.* — 1998. — Vol. 280. — P. 769-776.
4. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1977. — Vol. 74, N 12. — P. 5463-5467.
5. Nyrén P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity // *Anal. Biochem.* — 1982. — Vol. 167, N 2. — P. 235-238.
6. Hyman E. D. A new method of sequencing DNA // *Anal. Biochem.* — 1988. — Vol. 174, N 2. — P. 423-436.
7. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release / M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson et al. // *Anal. Biochem.* — 1996. — Vol. 242, N 1. — P. 84-89.
8. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing // *Genome Res.* — 2001. — Vol. 11, N 1. — P. 3-11.
9. Long-read pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-isomer / B. Gharizadeh, T. Nordstrom, A. Ahmadian et al. // *Anal. Biochem.* — 2002. — Vol. 301, N 1. — P. 82-90.
10. Guo D. C., Milewicz D. M. Methodology for using a universal primer to label amplified DNA segments for molecular analysis // *Biotechnology Letter.* — 2003. — Vol. 25. — P. 2079-2083.
11. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping / D. C. Chen, J. Saarela, I. Nuotio et al. // *J. Mol. Diagn.* — 2003. — Vol. 5, N 4. — P. 243-249.
12. Pettersson M., Bylund M., Alderborn A. Molecular haplotype determination using allele specific PCR and pyrosequencing technology // *Genomics.* — 2003. — Vol. 82, N 3. — P. 390-396.
13. An interleukin-6 gene promoter polymorphism influences the biological phenotype of ovarian cancer / L. A. Hefler, C. Grimm, S. Ackermann et al. // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63, N 12. — P. 3066-3068.
14. Analysis of an interleukin-6 gene promoter polymorphism in women with endometriosis by pyrosequencing / F. Wieser, G. Fabjani, C. Tempfer et al. // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2003. — Vol. 10, N 1. — P. 32-36.
15. Pyrosequencing as an alternative to single strand conformation polymorphism analysis for detection of N-ras mutations in human melanoma metastases / A. Sivertsson, A. Platz, J. Hansson, J. Lundeberg // *Clin. Chem.* — 2001. — Vol. 48, N 12. — P. 167-170.
16. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing / A. Ahmadian, B. Gharizadeh, A. C. Gustafsson et al. // *Analytical Biochemistry.* — 2000. — Vol. 280. — P. 103-110.
17. Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene / C. A. Garcia, A. Ahmadian, B. Gharizadeh et al. // *Gene.* — 2000. — Vol. 253, N 2. — P. 249-257.
18. Rapid genotyping of the osteoporosis-associated polymorphic transcription factor Sp1 binding site in the COL1A1 gene by pyrosequencing / K. Ellnebo-Svedlund, L. Larsson, J. Jonasson, P. Magnusson // *Mol. Biotechnol.* — 2004. — Vol. 26, N 1. — P. 87-90.
19. Determination of hepatitis C virus genotype by Pyrosequencing / E. Elahi, N. Pourmand, R. Chaung et al. // *J. Virol. Methods.* — 2003. — Vol. 109, N 2. — P. 171-176.
20. Pyrosequencing for detection of mutations in the connexin 26 (GJB2) and mitochondrial 12S rRNA (MTRNR1) genes associated with hereditary hearing loss / A. Ferraris, E. Rappaport, R. Santacrose et al. // *Hum. Mutat.* — 2002. — Vol. 20, N 4. — P. 312-320.
21. Kruckeberg K. E., Thibodeau S. N. Pyrosequencing technology as a method for the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2 // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 50. — P. 522-529.
22. Lack of association between CCND1 G870A polymorphism and the risk of breast and colorectal cancers / F. Grieu, S. Malaney, R. Ward et al. // *Anticancer Res.* — 2003. — Vol. 23, N 5b. — P. 4257-4259.
23. Lotsch J., Skarke C., Geisslinger G. Simultaneous screening for three mutations in the ABCB1 gene // *Genomics.* — 2003. — Vol. 82, N 5. — P. 503-510.
24. Monstein H., Nikpour-Badr S., Jonasson J. Rapid molecular identification and subtyping of *Helicobacter pylori* by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2001. — Vol. 199, N 1. — P. 103-107.

25. Jonasson J., Olofsson M., Monstein H. J. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments // *APMIS*. — 2002. — Vol. 110, N 3. — P. 263-272.

26. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing

TM technology / B. Gharizadeh, E. Norberg, J. Loffer et al. // *Mycoses*. — 2004. — Vol. 47, N 1-2. — P. 29-33.

27. Monitoring resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors by pyrosequencing / D. O'Meara, K. Wilbe, T. Leitner et al.

// *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39, N 2. — P. 464-473.

28. Sinclair A., Arnold C., Woolford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2003. — Vol. 47, N 11. — P. 3620-3622.

УДК 616-7:577.212.2

К. В. Літовкін, В. В. Бубнов, В. Г. Дубініна

ТЕХНОЛОГІЯ ПІРОСЕКВЕНУВАННЯ ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ В КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Технологія піросеквенування дозволяє встановити нуклеотидну послідовність невеликих ділянок ДНК (до 100–150 п. н.), а також ідентифікувати заміни, інсерції та делеції одного і більше нуклеотидів у послідовностях ДНК відомого складу. Принцип піросеквенування ґрунтується на детекції неорганічного фосфату, що виділяється при включенні дНТФ у синтезований ланцюг ДНК. Весь процес зводиться до декількох ензиматичних реакцій в одній пробірці без використання мічених праймерів і гель-електрофорезу. У рутинній клінічній практиці дана технологія може бути використана для швидкого генотипування великої кількості пацієнтів, ідентифікації патогенних мікроорганізмів і вірусної інфекції, детекції стійких до лікарських засобів патогенів.

Ключові слова: піросеквенування, SNP, генотипування.

UDC 616-7:577.212.2

K. V. Litovkin, V. V. Bubnov, V. G. Dubinina

PYROSEQUENCING TECHNOLOGY AND ITS APPLICATION TO CLINICAL PRACTICE

Pyrosequencing technology allows to determine short DNA sequences (100–150 b. p.) that meets the demands of SNP assessment and mutation detection. This is a newly developed non-electrophoretic method based on sequencing by synthesis and relies on real-time quantification of phosphate release during DNA synthesis. Systems for automated pyrosequencing reactions enable analysis of more than 1,000 samples per 24 hours in a single machine. It can be used in routine clinical practice for rapid identification of infectious agents and inherited predisposition for complex disease and individual drug responses.

Key words: pyrosequencing, SNP, genotyping.