

НУКЛЕОСОМНАЯ ФРАКЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АПОПТОЗА

© И. Н. Васильева,^{1,*} О. И. Подгорная,² В. Г. Беспалов¹

¹ Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова
и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; * e-mail: iravasilyeva@hotmail.com

Обзор посвящен анализу изменений внеклеточной ДНК (внкДНК) при патологических состояниях, сопровождающихся процессом апоптоза, и возможности применения внкДНК в диагностике и оценке течения различных заболеваний. Апоптоз является основным механизмом появления нуклеосомной внкДНК в циркуляции. ВнкДНК обнаруживается в норме, ее функцией считают участие в иммунном ответе. Содержание внкДНК существенно возрастает при индукции процессов апоптоза. При инсультах динамика увеличения содержания внкДНК позволяет диагностировать характер заболевания и массивность поражения мозговой ткани. Пониженное содержание внкДНК связано с ингибированием апоптоза, при таких состояниях показано изменение состава внкДНК. Исследование характера изменений внкДНК при развитии и лечении злокачественных опухолей обосновывает возможность проведения ранней оценки эффективности лечения. Экспериментально показано иммунодепрессивное действие внкДНК опухоли и ее трансформирующее действие на клетки. На примере ионизирующего облучения продемонстрирована связь индукции процессов апоптоза с выделением внкДНК. Охарактеризованы некоторые последовательности генома, полученные при секвенировании внкДНК. На основе исследования внкДНК создаются тесты минимально инвазивной диагностики, потенциально применимые в онкологии и других областях медицины. Изучение tandemных повторов, которые отсутствуют в эталонном геноме, но есть в составе внкДНК, позволит создать тесты для диагностики онкологических заболеваний на ранних стадиях.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, апоптоз, нуклеосома, сателлитная ДНК, злокачественные опухоли, облучение, инсульт, минимально инвазивная диагностика.

Принятые сокращения: внкДНК — внеклеточная ДНК, ТП — tandemные повторы, т. п. н — тысячи пар нуклеотидов, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких, NOD-SCID — линия мышей с диабетом и тяжелым иммунодефицитным состоянием, не страдающих ожирением, *K-ras* — связанный с клеточными мембранами протоонкоген семейства *ras*, *MyD88* — ген первичного ответа миелоидной дифференцировки 88, SW480 — клеточная линия рака толстой кишки человека, TLR9 — toll-подобный рецептор 9.

Нарушения процесса апоптоза лежат в основе патогенеза ряда заболеваний и патологических состояний организма. Согласно одной из классификаций, заболевания разделяют на ассоциированные с индукцией или ингибированием апоптоза (Thompson, 1995). С индукцией апоптоза связывают СПИД, нейродегенеративные заболевания, миелодиспластический синдром, ишемические поражения различных органов и токсические поражения печени, а с ингибированием — онкологические и аутоиммунные заболевания, вирусные инфекции. Последствием апоптоза ядродержащих клеток является фрагментация ДНК. Изначально образуются крупные (30—700 т. п. н.) фрагменты, которые расщепляются в межнуклеосомной области на фрагменты из 160—180 п. н. или кратные этим величинам. Вне зависимости от инициирующего сигнала апоптозного пути — рецепторного или митохондриального — происходит активация каспазного каскада, который приводит к расщеплению ингибитора фактора фрагментации, препятствующего активации ДНКаз каспазами.

Происходит деградация клетки фрагментацией на ограниченные плазматической мембраной апоптотические тельца. В организме взрослого человека в норме в результате апоптоза погибает ежедневно порядка 50—70 млрд клеток (Лушников, Абросимов, 2001).

Вопрос о том, вся ли ДНК, циркулирующая в биологических жидкостях организма, выделяется в результате апоптоза, находится в процессе обсуждения. Полагают, что клетки многоклеточного организма способны избирательно выделять ДНК в межклеточное пространство. Возможность выделения ДНК делящимися клетками показана в классических экспериментах на лимфоцитах, культивируемых в присутствии фитомитогена (Distelhorst, Rogers, 1979). Независимо от происхождения — в результате апоптоза или в результате активной экскреции — ДНК биологических жидкостей принадлежит конкретным участкам генома, которые могут быть идентифицированы при сравнении с прочитанным и собранным эталонным геномом (Weinstock, 2007). Определение набора фрагмен-

тов ДНК при определенных заболеваниях перспективно для создания методов минимально инвазивной диагностики (Murtaza et al., 2013). Отмечено, что многие патологические состояния сопровождаются увеличением содержания внкДНК, состав которой отличается от обнаруживаемой в норме. Анализу этих различий и возможности использования их в диагностике посвящен настоящий обзор.

Количество и состав внкДНК в норме

ДНК циркулирует в организме в виде ограниченных мембранами везикул различной величины. Самые крупные, апоптотные тельца, имеют диаметр 1—5 мкм; более мелкие, микрочастицы диаметром 200—1000 нм, образуются выпячиванием плазматической мембраны в ответ на активацию, повреждение или в начале апоптоза различных типов клеток; самые маленькие, экзосомы диаметром 30—90 нм, секретируются различными клетками млекопитающих и содержат в основном РНК (Rykova et al., 2012).

Исследование внкДНК, обнаруженной в количестве 11 мкг/мл в среде культивирования интактных лимфоцитов, методами фенольной депротеинизации и центрифугирования в 5—20%-ном градиенте сахарозы показало, что внкДНК состоит преимущественно из двух фракций с коэффициентами седиментации 16 и 6 S (Anker et al., 1975). Развитие методологии и расширение объектов исследования позволили обнаружить у человека и экспериментальных животных аналогичные фракции внкДНК (Belokhvostov, Zelenkova, 1978; Vladimirov et al., 1992). Фракционный анализ с применением горизонтального электрофореза в 1%-ной агарозе и вертикального электрофореза в 2—16%-ном градиенте ПААГ показал, что длина молекул высокомолекулярной фракции ДНК лежит в интервале 3.5—6 т. п. н., а низкомолекулярной — 160—180 п. н. Длина фрагментов низкомолекулярной фракции соответствует ДНК нуклеосомы. Содержание внкДНК в крови здоровых доноров составляет 3—44 нг/мл плазмы и 50—100 нг/мл сыворотки (Laktionov et al., 2004; Fleischaker, Schmidt, 2007).

Содержание внкДНК связано с возрастом донора, у молодых людей оно ниже, чем у пожилых. В возрастной группе 26—49 лет содержание низкомолекулярной внкДНК составило 21 нг/мл плазмы крови, в группе 51—75 лет — 41 нг/мл. В плазме крови интактных крыс Вистар (12 нед, масса 210 ± 35 г) содержание внкДНК составляет 26 нг/мл,

из этого количества около 14 нг/мл образовано низкомолекулярной внкДНК (Vasilyeva, Zinkin, 2012). Обнаружение свободных нуклеосом свидетельствует об участии апоптоза в образовании внкДНК.

Во внкДНК обнаружены фрагменты генов. Методом Саузерн-блот-гибридизации показано присутствие С-каппа фрагмента гена иммуноглобулина человека в кольцевых фрагментах ДНК культуральной жидкости, выделяемой лимфоцитами. Аналогичный фрагмент был обнаружен во внкДНК плазмы крови человека (Васюхин и др., 1991). Этот фрагмент образуется в результате рекомбинации легких цепей иммуноглобулинового гена. Обнаружение такого фрагмента во внкДНК свидетельствует о существовании механизма выделения ДНК из клеток в процессе нормальной перестройки генов иммуноглобулинов.

Показано участие внкДНК в иммунном ответе. Введение внкДНК одновременно с лигандом TLR9 ингибирует продукцию интерлейкинов в первичных эндотелиальных клетках (Cherapanova et al., 2011). Накапливающийся во внкДНК фрагмент транскрибируемой области рибосомного повтора, обогащенный GC-парами, стимулирует транскрипцию стволовых клеток мезенхимы и ингибирует дифференцировку мезенхимных клеток в адипоциты, активируя TLR9 и *MuD88*-зависимые сигнальные системы.

Внеклеточная ДНК при патологиях, ассоциированных с активацией апоптоза

В бесклеточной части крови пациентов с инсультами обнаружена внкДНК в повышенной концентрации. Исследование динамики изменения содержания внкДНК проводили методом ПЦР в реальном времени с праймерами к гену β -глобина (Rainer et al., 2003; Lam et al., 2006), методом электрофореза, позволяющим визуализировать низкомолекулярную фракцию (Vasilyeva et al., 2011), а также иммуноферментным методом, обнаруживающим нуклеосомную ДНК (Geiger et al., 2006). Выявлены различия у больных с ишемическим и геморрагическим типами инсульта (табл. 1). В первые часы после инсульта уровень низкомолекулярной внкДНК в плазме крови при геморрагии достоверно выше, чем при ишемии. У больных ишемическим инсультом содержание внкДНК достигает максимальных значений через 24 ч (Geiger et al., 2006; Vasilyeva et al., 2011).

Таблица 1

Содержание внкДНК у пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения

| Тип инсульта | Время от начала заболевания, ч | Образец | Метод определения | Количество ДНК | Литературный источник |
|-----------------|--------------------------------|---------------------|--|----------------------------|---|
| Геморрагический | 3 | Плазма | ПААГ электрофорез | 81 нг/мл | Vasilyeva et al., 2011 Rainer et al., 2003 |
| | | » | ПЦР | До 460 килогеномных экв./л | |
| Ишемический | 24 | » | ПААГ электрофорез | 78 нг/мл | Vasilyeva et al., 2011 Geiger et al., 2006 Vasilyeva et al., 2011 |
| | | Сыворотка | Cell Death Detection-ELISA ^{plus} | 100 нг/мл | |
| | | Спинальная жидкость | ПААГ электрофорез | 72 нг/мл | |

Исследование спинномозговой жидкости у больных с ишемическим характером острого нарушения мозгового кровообращения в период от 12 ч до 3 нед позволило обнаружить фракцию низкомолекулярной внкДНК в количестве 72 нг/мл через 24 ч от начала инсульта (Vasilyeva et al., 2011). Повышение содержания ДНК в плазме коррелирует с объемом инфаркта у больных с ишемией (Geiger et al., 2006) и с объемом церебральной гематомы у больных с геморрагическим типом инсульта (Lam et al., 2006). Если определение методом ПЦР не позволяет однозначно связать повышение содержания ДНК в циркуляции с типом гибели клетки (некроз или апоптоз), то определение повышения уровня нуклеосомной ДНК методом электрофореза или иммуноферментным методом свидетельствует об апоптотической гибели и подтверждает роль апоптоза в развитии инсульта.

Увеличение содержания внкДНК наблюдают и в других случаях, связанных с активацией апоптоза: при воздействии ионизирующей радиации, низкочастотного шума (Vasilyeva, Zinkin, 2012), травме (Lam et al., 2003; Laktionov et al., 2004), сепсисе с выраженным системным поражением (Moore et al., 2012), тяжелых физических нагрузках (Atamaniuk et al., 2008) и беременности (Fan et al., 2008).

ВнкДНК при патологиях, связанных с ингибированием апоптоза

У пациентов с ХОБЛ в состоянии ремиссии содержание в плазме крови низкомолекулярной внкДНК составляет 7.8 нг/мл, что значительно ниже, чем в норме. Кроме того, обнаружено, что содержание низкомолекулярной внкДНК у больных ХОБЛ ниже, чем у больных хроническим необструктивным бронхитом (23.5 нг/мл) в состоянии ремиссии. Содержание внкДНК плазмы крови близких родственников больных ХОБЛ меньше, чем у родственников больных хроническим необструктивным бронхитом. Эти данные свидетельствуют о возможной наследуемости пониженного содержания внкДНК (Vasilyeva et al., 2011).

Снижение содержания фрагментированной до нуклеосом ДНК в плазме крови пациентов с ХОБЛ указывает на угнетение процессов апоптоза и соответствует представлениям о повышении выживаемости клеток путем мобилизации генов, активирующих митоз. Действие воздушных поллютантов вызывает в клетках дыхательного эпителия экспрессию белка Ras, соединяющего сигнальный путь рецепторов факторов роста с каскадом протеинкиназ, активирующих митоз (Li et al., 2009). Показано, что соматические мутации генов *Ras* и *EGRF*, кодирующего рецептор эпидермального фактора роста, как врожденные, так и приобретенные, ассоциируются с ХОБЛ и способствуют развитию злокачественных новообразований путем активации мутантных аллелей (Modhaffan et al., 2009). Механизм нарушения передачи пролиферативного сигнала от рецепторов к ядру клетки, связанный с наличием мутаций в онкогенах *K-ras* и *EGRF*, описан у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (Cabral et al., 2010).

У пациентов с немелкоклеточным раком легкого количество внкДНК в плазме крови не отличается от контроля — 36 нг/мл (Tamkovich et al., 2008), а содержание внкДНК, связанной с поверхностью форменных элементов крови, ниже, чем у здоровых доноров. Во фракциях

свободной и связанной с поверхностью клеток ДНК этих больных повышено содержание метилированного (по сравнению с неметилированным) фрагмента гена *RARβ2* — гена рецептора β2 ретиноевой кислоты, что связывают с наследуемой эпигенетической модификацией генома (Ryukova et al., 2012). Совокупность приведенных данных свидетельствует о возможности использовать определение низкомолекулярной, нуклеосомной ДНК плазмы крови как интегрального показателя апоптоза в медицине для формирования групп риска к заболеваниям, ассоциированным с ингибированием процессов апоптоза.

Особенности изменения содержания внкДНК при онкологических заболеваниях

Повышение количества внкДНК наблюдают в процессе обострения заболеваний, патогенез которых связан с ингибированием апоптоза. Так, повышенное содержание внкДНК обнаруживают у онкологических больных (Зеленкова и др., 1978; Stroun et al., 1987; Holdenrieder, Stiber, 2009; Schwarzenbach et al., 2011; Rykova et al., 2012). У пациентов с немелкоклеточным раком легких содержание внкДНК в плазме варьирует от нормального (24 нг/мл) до многократно повышенного (100—700 нг/мл). У больных аденокарциномой поджелудочной железы содержание внкДНК повышено по сравнению с больными хроническим панкреатитом. Уровень внкДНК больных колоректальным раком повышается в зависимости от стадии заболевания (Васильева, Беспалов, 2013).

У онкологических больных повышение содержания свободных нуклеосом, ассоциированное с процессом апоптоза, часто свидетельствует о прогрессировании опухоли. Повышение уровня нуклеосомной внкДНК после проведения курсов терапии и высокий уровень внкДНК до начала терапии позволяют сделать негативный прогноз. В процессе успешного лечения происходит гибель опухолевых клеток, индуцированная терапией. Снижение содержания нуклеосом в сыворотке крови больных немелкоклеточным раком легкого через 8 ч после курсов цитостатической терапии является свидетельством эффективности лечения и включено в комплексный анализ эффективности лечения (Holdenrieder, Stiber, 2009).

На примере пациентов с колоректальным раком и раком поджелудочной железы показано, что повышение концентрации свободных нуклеосом в крови через 4 ч после первого сеанса радиотерапии и через 24—48 ч после начала цитостатической терапии с последующим снижением ниже исходного уровня свидетельствует об эффективности лечения (Holdenrieder, Stiber, 2009). Аналогичные сдвиги наблюдаются и при современных методах терапии рака — трансартериальной химиоэмболизации и селективной внутренней радиационной терапии с адресной доставкой меченных Yttrium-90 микросфер. Такую терапию, в частности, применяют для лечения онкологических пациентов с выраженной гепатоцеллюлярной карциномой или с метастазами в печени (Fehr et al., 2011; Kohles et al., 2012). ВнкДНК считают неспецифическим онкологическим маркером, применяемым для диагностики в совокупности с другими клиническими данными или специфическими онкомаркерами (Schwarzenbach et al., 2011).

Апоптотическая гибель клеток показана в опухолях человека и животных, в культурах опухолевых тканей *in vitro*. Опухолевый рост характеризуется соотношением

апоптозного и митотического индексов. В некоторых опухолях (саркома мышей линии S180, SaF и карцинома крыс линии Walker 256) апоптозный индекс ниже митотического, время удвоения опухоли составляет 1.5 сут (Лушников, Абросимов, 2001).

Развитие злокачественной опухоли связывают с подавлением иммунитета. ВнкДНК была обнаружена в плазме крови и асцитической жидкости крыс с перевитой гепатомой Зайдела и мышей с опухолью Эрлиха (Belokhvostov, Zelenkova, 1978). Показано, что ДНК асцитической жидкости животных с опухолью Эрлиха и гепатомой Зайдела оказывает неспецифическое иммунодепрессивное действие. Наблюдали снижение способности к трансплантационному иммунитету, выразившееся в замедлении отторжения трансплантата. Снижение цитотоксичности иммунных лимфоцитов оценивали по снижению способности лимфоцитов животных, иммунизированных аллоантигенами, разрушать аллогенные клетки и предотвращали обработкой препаратов ДНКазой. ДНК асцитической жидкости опухоли Эрлиха отличалась от нативной, в частности, наличием непараллельных разрывов и одиночных участков (Белохвостов, Зеленкова, 1978).

Одним из объяснений иммунодепрессивного действия опухолевой ДНК считают конкуренцию с ДНК, обычно участвующей в иммунном ответе. Показано, что внкДНК играет роль в развитии адаптивного ответа после облучения лимфоцитов человека в малых дозах. Развитие адаптивного ответа вызывает инкубация необлученных лимфоцитов не только с внкДНК культуральной среды облученных лимфоцитов, но и с окисленной *in vitro* геномной ДНК человека; повышение уровня реактивных форм кислорода (НО и АФК) считают промежуточным звеном в этом процессе (Kostyuk et al., 2013). В результате развития адаптивного ответа достоверно повышается уровень экспрессии антиапоптотических генов, гена репарации ДНК *BRCA-1*, мутации в котором приводят к раку молочной железы, генов сигнального пути фактора транскрипции NF-κB и ряда других генов.

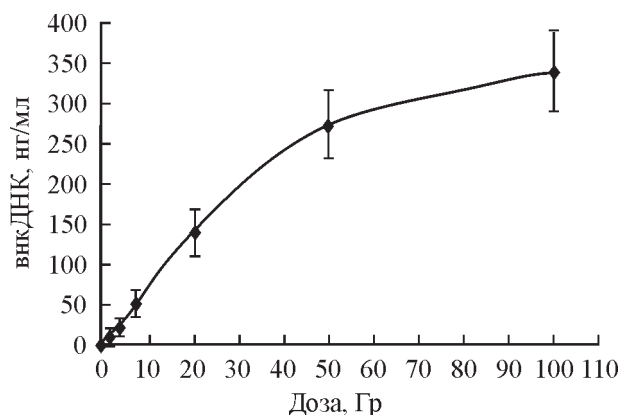
Существует возможность злокачественной трансформации клеток внкДНК. Клетки мышинной эмбриональной культуры фибробластов NIH/3T3 оказались трансформированными в опухолевые после инкубации с плазмой пациентов — носителей колоректальной опухоли с мутантным геном *K-ras*. Трансформированные клетки содержали последовательности генов человека, в частности мутантный *K-ras*. Инъекция этих клеток вызвала развитие карциномы у мышей линии NOD-SCID. Сиквенсы мутантного *K-ras* человека обнаружены не только в тканях опухоли инъецированных мышей, но и в тканях легких, печени, а также в плазме крови. Сиквенсы генов человека, за исключением мутантного *K-ras*, были обнаружены в тканях мышей, инъецированных клетками NIH/3T3, инкубированными с плазмой здоровых людей — доноров. Развития опухоли в этом случае, как и после инъекции нетрансформированными клетками NIH/3T3, не наблюдалось (Garcia-Olmo et al., 2010). В другом исследовании после инъекции клеток SW480 карциномы человека иммунокомпетентным крысам, подвергнутым воздействию канцерогена 1,2-диметилгидразина, у них возникла кишечная карцинома. Карцинома не развивалась в случае введения животным ДНКазы I и протеазы. Таким образом, клетки SW480 карциномы человека явились источником онкогенной ДНК в кровотоке (Trejo-Becerril et al., 2012). Эти работы являются прямым подтверждением возможности ДНК, выделяемой опухо-

левыми клетками, не только подавлять иммунитет, но и вызывать метастазы или образование вторичных опухолей (Garcia-Olmo et al., 2010).

ВнкДНК и апоптоз при ионизирующем облучении

Установлено, что действие ионизирующего излучения вызывает разрывы ДНК, и белок p53 на уровне транскрипции блокирует клеточный цикл в фазе G₁, взаимодействует с комплексами репарации ДНК, а если активность репарационных систем недостаточна для восстановления повреждений, то вызывает апоптоз для защиты организма от появления клеток с повреждениями генома (Mathieu et al., 1999). Апоптоз опухолевых клеток происходит во всех опухолях в разные сроки после облучения в дозах 10, 20 и 50 Гр, однако максимальное превышение апоптотического индекса над митотическим наблюдают через 4 ч после облучения. При массивной гибели клеток их фрагменты не успевают быстро фагоцитироваться макрофагами или соседними клетками и циркулируют в бесклеточной части крови и других биологических жидкостях.

ВнкДНК была обнаружена в плазме крови облученных крыс. Воздействие общего однократного γ-облучения в диапазоне доз 2—100 Гр вызывало повышение количества внкДНК через 2 ч после облучения крыс с максимумом через 5 ч и достоверным снижением через 24 ч (Belokhvostov, Zelenkova, 1978; Vladimirov et al., 1992). Содержание внкДНК увеличивается преимущественно за счет низкомолекулярной фракции. Уровень низкомолекулярной внкДНК через 5 ч после воздействия находится в прямой зависимости от дозы облучения (см. рисунок). В диапазоне доз до 20 Гр наблюдается линейная зависимость содержания ДНК от дозы облучения, в диапазоне 20—100 Гр — логарифмическая зависимость. Содержание исследуемой ДНК в плазме крови после облучения в дозах 8 и 100 Гр значительно различается и составляет 53 и 338 нг/мл соответственно. Облучение в дозе 8 Гр приводит к костномозговой, а в дозе 100 Гр — к церебральной форме лучевой болезни, и исследуемый показатель уже через 5 ч позволяет дифференцировать эти принципиально различные состояния организма. Многократное изменение содержания низкомолекулярной внкДНК в зависимости от состояния организма позволяет использовать этот показатель в качестве интегрального показателя апоптоза.



Содержание низкомолекулярной фракции внкДНК плазмы крови крыс через 5 ч после облучения.

Последовательности генома, определенные при секвенировании внкДНК

К настоящему времени секвенирована внкДНК здоровых доноров (Beck et al., 2009), беременных женщин (Fan et al., 2008), больных раком простаты (Van der Vaart et al., 2009) и системной красной волчанкой (Van Helden, 1985; Herrman et al., 1989), а также внкДНК культуры эпителиальных клеток пупочной вены человека HUVEC (Morozkin et al., 2012). Секвенирована внкДНК облученных крыс (Vasilyeva, Zinkin, 2012). Установлено, что основная часть внкДНК человека принадлежит к различным участкам генома человека, а внкДНК облученных крыс — известным участкам геномов грызунов (табл. 2).

ВнкДНК обогащена GC-парами. Содержание GC-пар у человека достигает 43—51 % по отношению к 41 % в ДНК генома, у крысы — 48 % по отношению к 43 % в ДНК генома. В составе сиквентов внкДНК человека больше коротких повторов Alu и меньше LINE по сравнению с эталонным геномом (табл. 2). Данные секвенирования соответствуют результатам гибридизации внкДНК сыворотки и плазмы крови онкологических пациентов с ДНК Alu-элемента (Stroun et al., 2001). Дот-гибридизация клонов внкДНК больших системной красной волчанкой показала, что содержание Alu-элементов повышено до 55 % по сравнению с 13 % в ДНК генома (Li, Steinman, 1989). Сравнительный анализ результатов полногеномного секвенирования ДНК среды культивирования и генома HUVEC показал пониженное содержание LINE-элементов во внкДНК (Morozkin et al., 2012). Полагают, что обнаруженные особенности внкДНК связаны со свойствами ДНК в циркуляции или с механизмом апоптоза. Создан тест обнаружения внкДНК на основе ПЦР к Alu-повторам (Lehner et al., 2013). Повышенное содержание Alu во внкДНК человека свидетельствует о нахождении в циркуляции в основном транскрибируемой части генома. Вероятно, активно транскрибируемая ДНК прежде всего подвергается межнуклеосомной деградации из-за доступности хроматина для нуклеаз. К особенностям внкДНК

облученных крыс относится значительное содержание фрагментов длинных повторов LINE по сравнению с внкДНК человека (табл. 2). Повышенное содержание LINE-элементов во внкДНК облученных крыс может быть связано как с межвидовыми различиями, так и с воздействием облучения. Показано, что воздействием ультрафиолета и ионизирующей радиации вызывают многократное повышение содержания LINE-элементов в гибнущих путем апоптоза клетках хлоролейкемии крыс (Servomaa, Rytomaa, 1990). По-видимому, воздействие высоких доз ионизирующей радиации вызывает глубокое разрушение хроматина и появление в циркуляции фрагментов факультативного гетерохроматина, обогащенного LINE.

Длина секвенированных фрагментов внкДНК кратна величине нуклеосомы — 160—180 п. н. (табл. 2). Полагают, что сиквенты с повышенным содержанием GC-пар характерны для хроматина, организованного в виде нуклеосом (Tillo, Huges, 2009). Сиквенты внкДНК обогащены динуклеотидом CpG (Van Helden, 1985; Vasilyeva, Zinkin, 2012). Статистический анализ внкДНК облученных крыс по программе RECON показал, что по расположению динуклеотидов внкДНК имеет высокую вероятность формирования нуклеосом (Levitsky, 2004). Эта вероятность определяется чередованием CG-обогащенных участков приблизительно через каждые 10 п. н. с динуклеотидом ApT, определяющим искривление молекулы ДНК, которое считают оптимальным для позиционирования нуклеосом. Наличие промотора ТАТА-бокс внутри нуклеосомы нарушает искривление молекулы ДНК (Bettesken, Trifonov, 2009), поэтому наличие сайта старта транскрипции в начале, а не в ядре последовательности свидетельствует о хорошем позиционировании нуклеосомы (Fan et al., 2008).

В результате анализа сиквентов внкДНК по программе EpiGRAPH обнаружена повышенная частота сайтов связывания с гистоном H3 изоформы K27me (van der Vaart et al., 2009). Метилирование лизина 27 гистона H3 ассоциировано с репрессией генов. Эта модификация играет критическую роль в регуляции экспрессии генов,

Таблица 2

Характеристика сиквентов внкДНК

| Материал | Образец | Метод | Длина, п. н. | GC, % | Alu/ LINE/ ДНК генома | | Литературный источник |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------|-------|-----------------------|------------------|----------------------------|
| | | | | | Alu/ ДНК генома | LINE/ ДНК генома | |
| Человек | | | | | | | |
| Здоровые доноры | Сыворотка | Платформа 454 Life Science | 175 | 51 | 1.4 | 0.6 | Beck et al., 2009 |
| Беременные женщины | Плазма | Платформа Solexa/Illumina | 169 | 51 | — | — | Fan et al., 2008 |
| Больные раком простаты | » | Платформа 454 Life Science | 160—180 [80—300] | 45 | 1 | <1 | Van der Vaart et al., 2009 |
| Больные системной красной волчанкой | Сыворотка | Клонирование и секвенирование | 150—250 | 43 | — | — | Van Helden, 1985 |
| | Плазма | То же | 500 | 50 | — | — | Herrman et al., 1989 |
| Культура HUVEC | Среда культивирования | Платформа SOLiD | 100 | — | 2.79 | 0.7 | Morozkin et al., 2012 |
| Крыса | | | | | | | |
| Облученные крысы | Плазма | Клонирование и секвенирование | 160—180 [80—40] | 48 | 0.4 | 1.5 | Vasilyeva, Zinkin, 2012 |

определяющих баланс между дифференцировкой клеток и пролиферацией (Ezponda, Licht, 2014). Согласно этим данным, внкДНК по повышенному содержанию Alu-элементов соответствует активному хроматину, а по гистоновым маркам и нуклеосомной структуре — неактивному хроматину. Возможно, причиной противоречий является фрагментарность исследований: далеко не все фрагменты внкДНК секвенированы (утрачены при клонировании), а среди секвенированных идентифицированы только те, которые относятся к эталонному геному.

В диагностических целях важно найти различия в сиквенсах ДНК, выделенной при принципиально различающихся состояниях организма. Чтение геномов сделало возможным ее классификацию. Большой класс ДНК, составляющий основу гетерохроматина, ТП или сателлитная ДНК остаются за рамками возможностей аннотаторов генома, т. е. эталонный геном неполон (Weinstock, 2007). Известно, что ДНК именно этого класса начинает транскрибироваться и попадает в кровоток при патологических и стрессорных для организма состояниях. Отсутствие ТП в эталонном геноме приводит к тому, что часть сиквенсов не дает значимых гомологий при сравнении. ВнкДНК крыс, облученных в дозах 8 и 100 Гр, различалась по распределению динуклеотидов и наличию идентификации по эталонному геному. Значимые гомологии во внкДНК, клонированной после облучения в дозе 8 Гр, составили 36 %, после облучения в дозе 100 Гр — лишь 25 % (Vasilyeva, Zinkin, 2012). На уровне организма такие различия могут быть связаны с гибелью клеток различных популяций, на молекулярно-биологическом уровне — с большим количеством одно- и двухнитевых разрывов после воздействия в дозе 100 Гр.

Исследование ДНК плазмы крови онкологических больных показало, что неклассифицированных фрагментов генома несколько больше у больных раком простаты, чем в группе контроля. ВнкДНК онкологических пациентов выделяется из нормальных тканей организма, из тканей, окружающих опухоль, и клеток опухоли, поэтому содержит некоторое количество специфических последовательностей, выделяемых опухолью. Последовательности ТП (сателлитных повторов) обнаружены преимущественно в ДНК больных раком простаты, из них наиболее представлены центромерные участки хромосомы 12, наименее — хромосомы 9 по сравнению с контрольной группой (Van der Vaart et al., 2009). Полагают, что чем длиннее хромосома, тем более она представлена во внкДНК. По рукам хромосом ТП локализованы в С-бандах, состоящих из репрессированного конститутивного гетерохроматина. Основная масса ТП сосредоточена в центромерных, перичентромерных и субтеломерных участках, т. е. в области конститутивного гетерохроматина.

В результате исследования среды культивирования HUVES методом FISH-гибридизации обнаружено повышенное содержание фрагментов прицентромерных участков хромосом в апоптотической ДНК среды культивирования. В интерфазе такие участки ДНК прилегают к ядерной мембране и, по-видимому, вместе с ней попадают в апоптотические гранулы. Секвенирование на платформе SOLID показало обогащение апоптотической ДНК не только ТП, но и Alu-повторами и активно транскрибируемыми рибосомными генами (Morozkin et al., 2012). В цитоплазме апоптотических клеток обнаруживают связанную с мембраной ДНК, обогащенную простыми (ССАТТ)_n повторами перичентромерных регионов хромосом и α -сателлитным центромерным повтором 171 п. н. Эта ДНК

находится в комплексе с РНК-полимеразой II и представляет собой отдельную транскрипционную систему (Cheng et al., 2012).

ТП как основа конститутивного гетерохроматина долгое время считалась молчащей, транскрипционно неактивной (Podgornaya et al., 2013). В последнее время показана взрывная транскрипция мажорного ТП мыши, принципиально необходимая в эмбриогенезе для объединения родительских геномов (Probst et al., 2010). Повышенную экспрессию обычно молчащих участков сателлитной ДНК наблюдают в опухолях. Смысл транскрипции ТП в соматических клетках пока неясен и возможность для ТП попасть во внкДНК в результате обратной транскрипции не определена, однако безусловно, что ТП входят в апоптотические тельца. Таким образом, присутствие ТП во внкДНК ожидаемо и может иметь диагностическое значение, если удастся доказать обогащение определенным ТП при конкретном заболевании или воздействии.

Заключение

Многие вопросы относительно образования, выделения и функционирования внкДНК еще неясны, однако показано, что внкДНК меняет биологию клеток, связываясь с рецепторами на поверхности клеточной мембраны или поглощаясь клетками. Функцией внкДНК полагают участие в иммунном ответе, кроме того, экспериментально показана возможность трансформации клеток с помощью ДНК опухоли. Содержание внкДНК увеличивается в процессе апоптоза и уменьшается при состояниях, связанных с ингибированием апоптоза. Это позволяет использовать количественное определение внкДНК для диагностики, оценки течения и исследования патогенеза ряда заболеваний. В настоящее время создаются тесты минимально инвазивной диагностики, основанные на определении специфичных участков внкДНК в крови и других биологических жидкостях. Такие тесты особенно необходимы для онкологии. Существующие тесты основаны на определении известных участков генома, в основном экзома, т. е. только кодирующих участков, которые составляют около 1 % генома. Представляется перспективным исследование во внкДНК некодирующей части генома, которая, по последним данным, попадает в кровоток при индуцированном апоптозе. Исследования в этой области представляются перспективными для изучения механизмов малигнизации и создания тестов минимально инвазивной диагностики рака на ранних стадиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01700) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Белохвостов А. С., Зеленкова Н. К. 1978. Некоторые особенности нуклеинового фактора из асцитной жидкости при опухолях. Молекуляр. биол. 12 (6): 1256—1263. (Belokhvostov A. S., Zelenkova N. K. 1978. The structural peculiarities of the nucleic factor from ascitic fluid of tumors. Mol. Biol. 12 (6): 1256—1263.)
- Васильева И. Н., Беспалов В. Г. 2013. Роль внеклеточной ДНК в возникновении и развитии злокачественных опухолей и

- возможности ее использования в диагностике и лечении онкологических заболеваний. *Вопр. онкол.* 59 (6) : 673—681. (Vasiulyeva I. N., Bepalov V. G. 2013. Role of extracellular DNA in the appearance and development of malignant tumors and possibilities of its use in the diagnosis and treatment of cancer. *Vopr. Oncol.* 59 (6) : 673—681.)
- Васюхин В. И., Липская Л. А., Цветков А. Г., Подгорная О. И. 1991. ДНК лимфоцитов человека содержит сиквенсы, гомологичные иммуноглобулиновому гену kappa. *Молекуляр. биол.* 25 (2) : 405—412. (Vasiukhin V. I., Liskaia L. A., Tsvetkov A. G., Podgornaia O. I. 1991. DNA from human lymphocytes contains a sequence, homologous to immunoglobulin gene kappa. *Mol. Biol.* 25 (2) : 405—412.)
- Зеленкова Н. К., Белохвостов А. С., Липова В. А., Айнбиндер Н. М. 1980. Нуклеиновый фактор в асцитической жидкости при опухолях яичника человека. *Вопр. онкол.* 26 (8) : 45—48. (Zelenkova N. K., Belokhvostov A. S., Lipova V. A., Ainbinder N. M. 1980. The nucleic factor in ascitic fluid in human ovarian tumors. *Vopr. onkologii.* 26 (8) : 45—48.)
- Лушников Е. Ф., Абросимов А. Ю. 2001. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина. 192 с. (Lushnikov Y. F., Abrosimov A. Y. 2001. Cell death (apoptosis). Moscow: Meditsina. 192 p.)
- Anker P., Stroun M., Maurice P. A. 1975. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an *in vitro* system. *Cancer Res.* 35 : 2375—2382.
- Atamaniuk J., Stuhlmeier K. M., Vidotto C., Tschan H., Dossenbach-Glaninger A., Mueller M. M. 2008. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur. J. Appl. Physiol.* 104 : 711—717.
- Beck Y., Urnovitz H. B., Riggert J., Clerici M., Schutz E. 2009. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clin. Chem.* 55 : 730—738.
- Belokhvostov A. S., Zelenkova N. K. 1978. Low-molecular weight nucleic acids in the blood of rats Zajdela's hepatoma. *Cancer Lett.* 5 : 351—356.
- Bettecken T., Trifonov E. N. 2009. Repertoires of the nucleosome-positioning dinucleotides. *PLoS ONE.* 4 (11) : e7654.
- Cabral R. E. C., Cabral Neto J. B., Costa Carvalho M. D. 2010. Circulating DNA as a biomarker for early detection of cancer: a brief update with an emphasis on lung cancer. *Open Lung Cancer J.* 3 : 38—44.
- Cheng J., Torkamani A., Peng Y., Jones T. M., Lerner R. A. 2012. Plasma membrane associated transcription of cytoplasmic DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 10 827—10 831.
- Cherepanova A. V., Bushuev A. V., Vlassov V. V., Laktionov P. P. 2011. Cell-surface-bound DNA inhibits poly(I:C)-activated IL-6 and IL-8 production in human primary endothelial cells and fibroblasts. In: *Circulating nucleic acids in plasma and serum.* New York: Springer. 207—211.
- Distelhorst C. W., Rogers J. C. 1979. Glucocorticoids inhibit trypsin-induced DNA release from phytohemagglutinin-stimulated blood lymphocytes. *J. Immunol.* 123 : 487—495.
- Ezponda T., Licht J. D. 2014. Molecular pathways: deregulation of histone 3 lysine 27 methylation in cancer-different path, same destination. *Clin. Cancer Res.* 20 : 5001—5008.
- Fan H. C., Blumenfeld Y. J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S. R. 2008. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 : 16 266—16 271.
- Fehr Y., Holdenrieder S., Hoffman R.-Th., Tatsh K., Jakobs T., Nagel D., Stieber P. 2011. Circulating nucleosomes in cancer patients with liver metastases undergoing selective internal radiation therapy using Yttrium-90 labelled microspheres. In: *Circulating nucleic acids in plasma and serum.* New York: Springer. 91—96.
- Fleischhaker M., Schmidt B. 2007. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — a survey. *Biochim. biophys. acta.* 1775 : 181—232.
- Garcia-Olmo D. C., Dominguez C., Garcia-Arranz M., Anker P., Stroun M., Garcia-Verdugo J. M., Garcia-Olmo D. 2010. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* 70 : 560—567.
- Geiger S., Holdenrieder S., Stieber P., Hamann G. F., Brueining R., Ma J., Nagel D., Seidel D. 2006. Nucleosomes in serum of patients with early cerebral stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 21 : 32—37.
- Herrman M., Leitmann W., Krapf E. F., Kalden J. R. 1989. Molecular characterization and *in vitro* effects of nucleic acids from plasma of patients with systemic lupus erythematosus. In: *Molecular and cellular mechanisms of human hypersensitivity and autoimmunity.* New York: John Wiley and Sons. 147—157.
- Holdenrieder S., Stieber P. 2009. Clinical use of circulating nucleosomes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 46 : 1—24.
- Kohles N., Nagel D., Jüngst D., Durner J., Stieber P., Holdenrieder S. 2012. Prognostic relevance of oncological serum biomarkers in liver cancer patients undergoing transarterial chemoembolization therapy. *Tumour Biol.* 33 : 33—40.
- Kostyuk S. V., Ermakov A. V., Alekseeva A. Yu., Smirnova T. D., Glebova K. V., Efremova L. V., Baranova A., Veiko N. N. 2012. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endotheliocytes. *Mut. Res.* 729 : 52—60.
- Laktionov P. P., Tamkovich S. N., Rykova E. Y., Bryzgunova O. E., Starikov A. V., Kuznetsova N. P., Sumarokov S. V., Kolomiets S. A., Sevostianova N. V., Vlassov V. V. 2004. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 23 : 879—883.
- Lam N. Y., Rainer T. H., Chan L. Y., Joynt G. M., Lo Y. M. 2003. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.* 49 : 1286—1291.
- Lam N. Y., Rainer T. H., Wong L. K., Lam W., Lo Y. M. 2006. Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset. *Resuscitation.* 68 : 71—78.
- Lehner J., Stötzer O. J., Fersching D. M., Nagel D., Holdenrieder S. 2013. Plasma DNA integrity indicates response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally confined breast cancer. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 51 : 59—62.
- Levitsky V. G. 2004. RECON: a program for prediction of nucleosome formation potential. *Nucl. Acids Res.* 32 : W346—W349.
- Li J., Ghio A. J., Cho S. H., Brinckerhoff C. E., Simon S. A., Liedtke W. 2009. Diesel exhaust particles activate the matrix-metalloproteinase-1 gene in human bronchial epithelia in a beta-arrestin-dependent manner via activation of RAS. *Environ. Health Perspect.* 117 : 400—409.
- Li J. Z., Steinman C. R. 1989. Plasma DNA in systemic lupus erythematosus. Characterization of cloned base sequences. *Arthritis Rheum.* 32 : 726—733.
- Mathieu J., Richard S., Ballester B., Chancerelle Y., Mul-ton E. 1999. Apoptosis and gamma rays. *Ann. Pharm. Fr.* 57 : 314—323.
- Modhatten S. J., Li H., Cho S. H. 2009. Obstructive pulmonary disease-like airway inflammation in a K-ras-induced mouse model. *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 40 : 443—453.
- Moore D. J., Greystoke A., Butt F., Wurthner J., Growcott J., Hughes A., Dive C. 2012. A pilot study assessing the prognostic value of CK18 and nDNA biomarkers in severe sepsis patients. *Clin. Drug Investig.* 32 : 179—187.
- Morozkin E. S., Loseva E. M., Morozov I. V., Kurilshikov A. M., Bondar A. A., Rykova E. Yu., Rubtsov N. B., Vlassov V. V., Laktionov P. P. 2012. A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12 (S1) : S11—S17.
- Murtaza M., Dawson S. J., Tsui D. W., Gale D., Forshew T., Piskorz A. M., Parkinson C., Chin S. F., Kingsbury Z., Wong A. S., Marass F., Humphray S., Hadfield J., Bentley D., Chin T. M., Brenton J. D., Caldas C., Rosenfeld N. 2013. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 497 : 108—112.
- Podgornaya O., Gavrilova E., Stephanova V., Demin S., Komissarov A. 2013. Large tandem repeats make up the chromosome bar code: a hypothesis. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 90 : 1—30.

- Probst A., Okamoto I., Casanova M., El Marjou F., Le Baccon P., Almouzni G. 2010. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Develop. Cell.* 19 : 625—638.
- Rainer T. H., Wong L. K., Lam W., Yuen E., Lam N. Y., Metreweli C., Lo Y. M. 2003. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin. Chem.* 49 : 562—569.
- Rykova E. Y., Morozkin E. V., Ponomareva A. A., Loseva E. M., Zaporozhchenko I. A., Cherdyntseva N. V., Vlassov V. V., Laktionov P. P. 2012. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12 (S1) : S141—S153.
- Schwarzenbach H., Hoon D. S. B., Pantel K. 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer.* 11 : 426—437.
- Servomaa K., Rytömaa T. 1990. UV light and ionizing radiations cause programmed death of rat chloroleukaemia cells by inducing retropositions of a mobile DNA element (L1Rn). *Int. J. Radiat. Biol.* 57 : 331—343.
- Stroun M., Anker P., Lyautey J., Lederrey C., Maurice P. A. 1987. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 23 : 707—712.
- Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Mulcahy H., Anker P. 2001. Alu repeat sequence are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for preferential release from viable cells? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 945 : 258—264.
- Tankovich S. N., Litviakov N. V., Bryzgunova O. E., Dobrodeev A. Y., Rykova E. Y., Tuzikov S. A., Zav'ialov A. A., Vlassov V. V., Cherdyntseva N. V., Laktionov P. P. 2008. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1137 : 214—217.
- Thompson C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267 : 1456—1462.
- Tillo D., Huges T. R. 2009. G+C content dominates intrinsic nucleosome occupancy. *BMC Bioinformatics.* 10 : 442.
- Trejo-Becerril C., Pérez-Cárdenas E., Taja-Chayeb L., Anker P., Herrera-Goepfert R., Medina-Velázquez L. A., Hidalgo-Miranda A., Pérez-Montiel D., Chávez-Blanco A., Cruz-Velázquez J., Díaz-Chávez J., Gaxiola M., Dueñas-González A. 2012. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an *in vivo* model. *PLoS ONE.* 7 : e52754.
- Van der Vaart M., Semenov D. V., Kuligina E. V., Richter V. A., Pretorius P. J. 2009. Characterization of circulating DNA by parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Clin. Chim. Acta.* 409 : 21—27.
- Van Helden P. D. 1985. Z-DNA-forming elements in serum DNA from human systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 134 : 177—179.
- Vasilyeva I. N., Ivchik T. V., Voznyuk I. A. 2011. Low-molecular-weight DNA of blood plasma as an indicator of pathological process. In: *Circulating nucleic acids in plasma and serum.* New York: Springer. 165—170.
- Vasilyeva I. N., Zinkin V. N. 2012. The value of blood plasma low-molecular-weight DNA for diagnostics of pathological processes of different genesis. *Biochem. Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* 6 : 278—287.
- Vladimirov V. G., Belokhvostov A. S., Sherlina S. S., Vasilyeva I. N., Voskresensky A. M. 1992. Extracellular DNA level in the blood of irradiated rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 62 : 667—671.
- Weinstock G. M. 2007. ENCODE: more genomic empowerment. *Genome Res.* 17 : 667—668.

Поступила 26 VIII 2014

NUCLEOSOME FRACTION OF EXTRACELLULAR DNA AS THE INDEX OF APOPTOSIS

I. N. Vasilyeva,¹ * O. I. Podgornaya,² V. G. Bespalov¹

¹ N. N. Petrov Research Institute of Oncology and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

* e-mail: iravasilyeva@hotmail.com

Review is devoted to the analysis of changes of the extracellular DNA (excDNA) in pathological conditions involving the process of apoptosis, and the possibility of using of excDNA in the diagnosis and evaluation of course of various diseases. Apoptosis is the main mechanism of the appearance of the DNA in the circulation. ExcDNA found in the norm, its function is considered to be the part of the immune response. The excDNA content increases substantially during the induction of apoptosis. Dynamics of increase of excDNA content in stroke allows to diagnose the form of stroke and massiveness of destruction of brain tissue. Reduced content of excDNA is associated with the inhibition of apoptosis, it was shown that under such conditions there is a change of composition of excDNA. Investigation of excDNA character changes in the progression and treatment of cancer substantiates the possibility of early assessment of the effectiveness of treatment. It is experimentally shown the immunosuppressive action of excDNA of tumor and its transforming effect on the cells. Ionizing radiation is an examples that demonstrated the association of induction of apoptosis and the release of excDNA. It is characterize some of the genome sequences of excDNA. Created on the basis of excDNA study tests of minimally invasive diagnostics are potentially useful in oncology and other areas of medicine. The study of tandem repeats, which are absent in the assembled genome, but there is a part of excDNA, will create tests for the diagnosis of cancer in the early stages.

Key words: extracellular DNA, apoptosis, nucleosomes, cancer, stroke, minimum invasive diagnostics.