

ХРОМОСОМА 2015¹

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПОМОЖЕТ ПРОЛИТЬ СВЕТ НА НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ТЕОРИИ ЭВОЛЮЦИИ

© О. И. Подгорная

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,
С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034,
и Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, 690922;
электронный адрес: oprodg@yahoo.com*

Чтение геномов и новые методы секвенирования позволяют по-новому взглянуть на проблему внеклеточной ДНК (внДНК). Приведены последние данные о составе и включении внДНК. Показано асимметричное обогащение повторяющихся элементов во внДНК: 1) обогащение внДНК перцентромерными тандемными повторами (TR), но обеднение центромерным (CEN) TR альфа-сателлитом; 2) обогащение внДНК Alu (SINE)-элементом, но обеднение LINEs. Alu-элементы (SINE) расположены в основном в богатых генами районах, тогда как LINEs тяготеют к факультативному гетерохроматину. Человек по сравнению с мышью обнаруживает более высокий уровень экспрессии тканеспецифичных генов по отношению к генам «домашнего хозяйства» во всех тканях. Более высокий уровень клеточной дифференцировки (специализации) у человека коррелирует с заменой 4x SINE мыши на Alu (SINE)-повтор. Возможность опосредованного сперматозоидами переноса экзогенной ДНК, обогащенной SINE, убирает два из противоречий синтетической теории эволюции: 1) негенные мутации необходимы для прогрессивной эволюции, но замена повторяющихся элементов; 2) древние млекопитающие имели в помете несколько измененных потомков из-за трансформации их внДНК; тогда близкородственное скрещивание оказывалось возможным для измененных особей.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, тандемные повторы, Alu-повторы, эволюция, синтетическая теория.

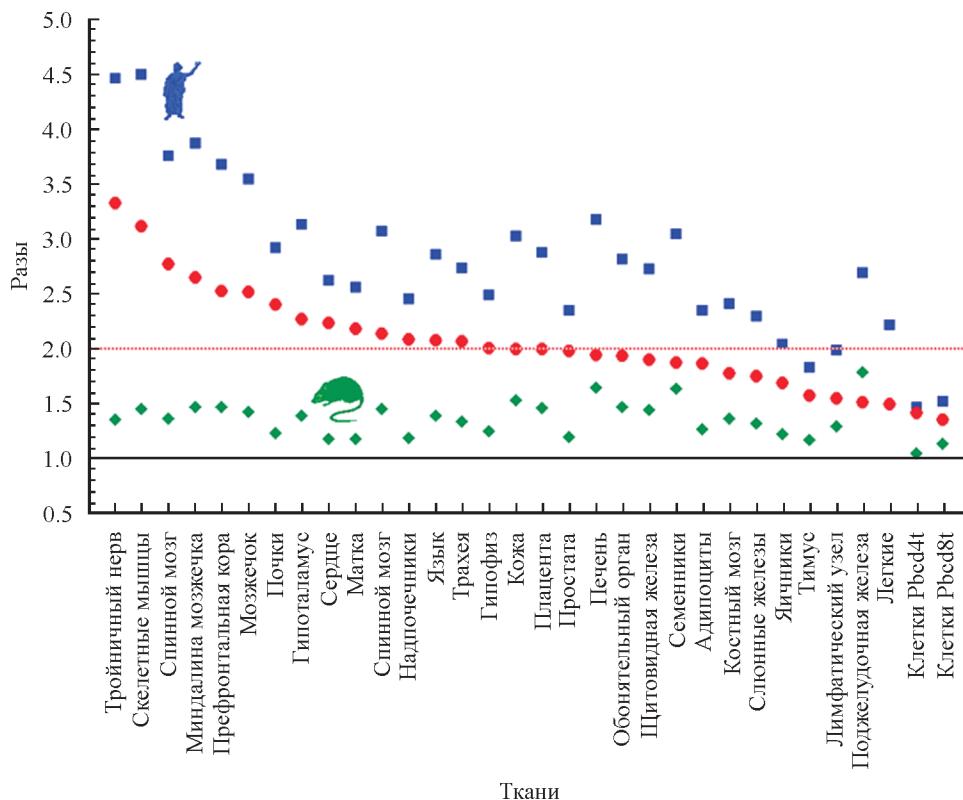
В жидкостях тела высших позвоночных циркулирует ДНК (внеклеточная ДНК, или внДНК), но интересуются этим фактом в основном медики, а не биологи (Anker et al., 1975; Vasioukhin et al., 1991, 1994). Чтение геномов и новые методы секвенирования позволяют по-новому взглянуть на проблему внДНК (Murtaza et al., 2013). В первой работе с применением тотального секвенирования ДНК плазмы использована раковая модель: при терапевтическом воздействии происходит эволюция раковых клеток. Секвенировали ДНК плазмы раковых больных в процессе терапии, оттуда экстрагировали только гены (экзом), гены из плазмы сравнивали с ДНК половых клеток, чтобы учесть все происходящие перестройки. Количественный учет мутантных аллелей в ДНК плазмы показал, что возрастание количества перестроенных вариантов коррелирует с возрастанием резистентности к терапии. Клональная эволюция раковых клеток в организме вполне прослеживается в ДНК плазмы (Murtaza et al., 2013). К сожалению, подобные работы для нормальных клеток отсутствуют.

Основными источниками внДНК в организме являются экзосомы покоящихся клеток, микровезикулы активированных клеток и апоптотические клетки (Rykova et al., 2012). Показаны захват внДНК клетками культуры и ее включение в хроматин клетки-хозяина (Mittra et al.,

2015). В этой работе также использовали ДНК раковых больных, причем как очищенную (DNAfs), так и в виде фрагментов хроматина (Cfs); их метили и добавляли в культуральную среду мышиных фибробластов постоянной линии NIH3T3. Оказалось, что как фрагменты DNAfs, так и Cfs быстро мигрируют в ядро и сохраняются там настолько долго, что удалось выявить трансформированные клонды. За вставками ДНК человека в геном мыши следили с помощью гибридизации с тотальной ДНК человека и с пан-центромерной пробой. Провели также секвенирование генома трансформантных клонов и обнаружили множественные копии встроившихся фрагментов. Гибридизация с пан-центромерной пробой заставляет думать, что тандемные повторы составляют значительную часть ДНК плазмы. Cfs встраивались гораздо лучше, чем DNAfs; оба препарата из раковых больных встраивались активнее, чем такие же из здоровых доноров. Доказана и трансформация *in vivo* при инъекции ДНК человека мышам. Авторы заключают, что циркулирующая внДНК является постоянным физиологичным повреждающим агентом, в норме индуцирующим апоптоз, но иучаствующим в развитии множества патологий, включающих в себя старение и индукцию рака (Mittra et al., 2015).

Апоптоз как источник внДНК корректно охарактеризован. Апоптоз экспериментально индуцировали в культуре эндотелиальных клеток пуповинной крови человека

¹ См. журнал «Цитология», № 4, 2016.



Отношение суммарной экспрессии тканеспецифичных генов к суммарной экспрессии общеклеточных (housekeeping) генов у человека (синие квадраты) и мыши (зеленые ромбы), а также отношение первой величины ко второй (красные кружки) в 32 парах гомологичных тканей.

Данные получены на основании анализа 11 534 пар ортологичных генов. Видно, что все синие точки выше, чем соответствующие зеленые, и, следовательно, все красные точки выше единицы. Красная пунктирная линия показывает медиану красных кружков для всех 32 тканей. Рисунок публикуется с любезного разрешения авторов (Vinogradov, Anatskaya, 2007).

(HUVEC), и пул ДНК, присутствующей в культуральной среде (внДНК), был секвенирован и использован как проба для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH; Morozkin et al., 2012). Оба метода показали асимметричное обогащение повторяющихся элементов во внДНК: 1) обогащение внДНК перицентромерными tandemными повторами (TR), основным из которых оказался HS3 (human satellite 3), но обеднение центромерным (CEN) TR альфа-сателлитом; 2) обогащение внДНК Alu (SINE)-элементом, но обеднение LINEs. Сходными характеристиками отличается сыворотка крови здоровых доноров (Beck et al., 2009).

Для сравнения с внДНК, как правило, используют собранный геном человека. Районы классического гетерохроматина не отражены в собранном геноме: длинные поля TR в перицентромерном и субтеломерном районах не собраны. В собранных геномах сборка хромосом обрывается на дыре в 3 Mb, зарезервированной на центромерный район. TRs человека классифицированы весьма грубо. Про TR известно, однако, что именно они прикреплены к внутренней стороне цитоплазматической мембрany как фрагменты размером около 6 тыс. н. п., что определили при сравнении с исходными базами данных WGS/WGA (Chen et al., 2012). Именно поэтому, вероятно, возможно обогащение ими внДНК, в первую очередь в апоптотических клетках. В этой удивительной работе на основе линии диплоидных В-лимфоцитов человека WIL₂ сконструировали линию WIL₂-CG, которая экспрессировала на поверхности хитинсвязывающий домен. Домен

позволил выделить клеточную мембрану, не разрушая ядра, и, таким образом, снять вопрос о ее загрязнении геномной ДНК. Глубокое секвенирование показало обогащение мембранный фракции как перицентромерными «большими» сателлитами (TR), так и альфоидным сателлитом. Тип альфоидного сателлита, правда, не определен, не определена и его принадлежность истинному центромеру. Выявлен особый тип полимеразы II, который транскрибирует мембранный ДНК, именно альфоидный сателлит (Chen et al., 2012). Таким образом, эта работа положительно решила долго дискутирувшийся вопрос о наличии мембранный фракции ДНК, однако удивила обогащением фракции TR. Гетерохроматин, обогащенный TR, остается самой загадочной частью генома, классификация TR только начинается (Komissarov et al., 2011); присутствие TR в мембранный фракции ДНК делает функции TR еще более загадочными.

Диспергированные повторы составляют до 50 % собранных геномов эукариот, существует их классификация, однако степень их изученности невелика, учитывая их количество в геномах. Повторы класса транспозонов (transposable elements; TE) составляют не менее 48 % собранного генома человека, и их позиции определены. Alu элементы (SINE) расположены в основном в богатых генами районах, тогда как LINEs тяготеют к факультативному гетерохроматину. Об этом свидетельствуют данные биоинформатики (Waterston et al., 2002) и цитогенетики (FISH, Solovei et al., 2009). Положение TE в геномах как человека, так и мыши фиксировано и сходно, что и при-

водит к синтезу геномов вместе с другими элементами (генами) (Waterston et al., 2002). В геноме человека Alu-повторы замещают собой четыре SINE мыши (B1, B2, B4 и ID).

Сравнение геномов человека и мыши представляет собой идеальную модель для поиска молекулярных и клеточных механизмов, обеспечивающих различие в уровне организации, поскольку оба вида принадлежат к одному и тому же классу животных, т. е. имеют гомологичные ткани и много ортологичных генов. Мыши имеют более низкий уровень организации вследствие отбора на скорость размножения, а не на сложность организации. Геномы обоих модельных видов хорошо изучены, для них имеются обширные данные по транскриптомам, полученные с помощью схожих методов. Сначала определили, что по сравнению с мышью у человека относительно большее число тканеспецифичных генов (Vinogradov, 2003). Это указывает на более высокую специализацию (дифференцировку) клеток. Увеличение степени специализации элементов системы («разделения труда») давно признано в качестве основной черты прогрессивной эволюции социальных и биологических систем (McShea, 1996; Gould, 2002). Однако этот эффект не был показан на молекулярном («комиксном») уровне, на уровне транскрипции генов. Провели подробный анализ транскриптов, используя новые, более обширные данные для большего числа генов и тканей (Vinogradov, Anatskaya, 2007). Определили долю тканеспецифичных генов и отношение суммарной экспрессии тканеспецифичных генов к суммарной экспрессии общеклеточных (housekeeping) генов у человека и мыши. При этом применяли различные индикаторы степени тканеспецифичности генов.

Провели сравнение интенсивности транскрипции ~12 000 ортологичных генов в 32 тканях человека и мыши по базам данных транскриптомов. Человек обнаруживает более высокий уровень экспрессии тканеспецифичных генов по отношению к генам «домашнего хозяйства» во всех исследованных тканях, что говорит о более высоком эволюционном уровне клеточной дифференцировки (специализации) (см. рисунок).

Тотальный вклад TE в функционирование и эволюцию геномов до сих пор неясен, несмотря на их количество в геноме (del Rosario et al., 2014). Определен вклад TE в происхождение, определение разнообразия и регуляцию длинных некодирующих РНК (Kelley, Rinn, 2012; Kapusta et al., 2013; Lu et al., 2014). Кажется, что позиции TE, фиксированные в течение ~65 млн лет (расхождение линий грызунов и приматов), и тяготение SINEs и LINEs к потенциально активным или неактивным районам генома могут быть ответственными за определение хроматинового ландшафта этих районов. Замена SINE'ов в геноме человека очевидно коррелирует с увеличением уровня транскрипции в активном ландшафте. В любом случае замена SINE произошла при разделении грызунов и приматов.

Тот факт, что внДНК обогащена SINE, поможет понять, как такая замена могла произойти в геномах одного помета (выводка). Известно, что трансформантные мыши могут получиться после инкубации сперматозоидов с экзогенной ДНК (Lavitrano et al., 1989). Опосредованный сперматозоидами перенос экзогенной ДНК стал тривиальным методом ветеринарии (Smith, Spadafora, 2005; Spadafora, 2008; Simoes et al., 2013). При экспериментах на кроликах с их многочисленным потомством можно учесть количество трансгенных потомков в помете. При совместной инкубации сперматозоидов с экзогенной

ДНК, DMSO и при нагревании (heat shock) некоторые пометы на 100 % состояли из трансгенов. Но еще более удивительно то, что никак не поврежденные сперматозоиды (только инкубация с ДНК плазиды) давали до 30 % трансгенов в потомстве (Kuznetsov et al., 2000). Неважно точное количество трансгенных потомков в помете; важно то, что трансген (измененный потомок) никогда не будет одинок, он найдет себе измененную пару в том же помете, т. е. возможен имбридинг. Сходство участков В-элемента мыши и Alu-элемента человека делает возможной замену всех элементов генома посредством рекомбинации. Ортологичные гены не затронуты при такой замене, вместо изменения генов меняется хроматиновый ландшафт, что и приводит к интенсификации транскрипции и дает эволюционное преимущество вновь возникшему виду.

TR также присутствуют в внДНК, и именно TR являются максимальной изменчивой частью генома. Тот факт, что TR изменены даже у близких видов (Остромышленский и др., 2011; Melters et al., 2013), говорит о том, что изменения TR фиксируют новый вид. Мы рассмотрели возможный ход видообразования на примере TE, потому что степень неизученности TR не дает возможности привести литературные примеры. Однако факт наличия TR в внДНК дает основания полагать, что предложенная схема одномоментной замены полей TR может быть справедлива и в этом случае.

Предложенная схема убирает два из противоречий синтетической теории эволюции: 1) негенные мутации необходимы для прогрессивной эволюции, но замена повторяющихся элементов; 2) древние млекопитающие имели в помете не одного измененного потомка, но несколько, если не всех, из-за трансформации их внДНК; тогда близкородственное скрещивание оказывалось возможным для измененных особей.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского научного фонда (проект 15-15-20026).

Список литературы

- Vasjukhin V. I., Lipskaya L. A., Tsvetkov A. G., Podgornaya O. I. 1991. ДНК, выходящая из лимфоцитов человека, содержит последовательности иммуноглобулинового гена κ. Молекулар. биол. 25 (2) : 405—412. (Vasjukhin V. I., Lipskaya L. A., Tsvetkov A. G., Podgornaya O. I. 1991. DNA from human lymphocytes contains a sequence, homologous to immunoglobulin gene kappa. Mol. Biol. (Moscow). 25 (2) : 405—412.)
- Ostromышленский Д. И., Кузнецова И. С., Голенищев Ф. Н., Маликов В. Г., Подгорная О. И. 2011. Применимость сателлитной ДНК как филогенетического маркера на примере трех родов подсемейства Murinae. Цитология. 53 (7) : 564—571. (Ostromyshenskii D. I., Kuznetsova I. S., Golenischev F. N., Malikov V. G., Podgornaya O. I. 2011. Satellite DNA as a phylogenetic marker: case study of three genera of the Murinae subfamily. Cytologia. 53 (7) : 564—571.)
- 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.
- 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.
- 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.

- Gould S. J. 2002. The structure of evolutionary theory. Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press. 1464 p.
- Kapusta A., Kronenberg Z., Lynch V. J., Zhuo X., Ramsay L., Bourque G., Yandell M., Feschotte C. 2013. Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet.* 9 : e1003470.
- Kelley D., Rinn J. 2012. Transposable elements reveal a stem cell-specific class of long noncoding RNAs. *Genome Biol.* 13 : R107.
- Komissarov A. S., Gavrilova E. V., Demin S. J., Ishov A. M., Podgornaya O. I. 2011. Tandemly repeated DNA families in the mouse genome. *BMC Genomics.* 12 : 531.
- Kuznetsov A. V., Kuznetsova I. V., Schit I. Y. 2000. DNA interaction with rabbit sperm cells and its transfer into ova *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Reprod. Develop.* 56 : 292—297.
- Lavitrano M., Camaiori A., Fazio V. M., Dolci S., Farace M. G., Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell.* 57 : 717—723.
- Lu X., Sachs F., Ramsay L., Jacques P. E., Goke J., Bourque G., Ng H. H. 2014. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 : 423—425.
- McShea D. W. 1996. Metazoan complexity and evolution: is there a trend? *Evolution.* 50 : 477—492.
- Melters D. P., Bradnam K. R., Young H. A., Telis N., May M. R., Ruby J. G., Sebra R., Peluso P., Eid J., Rank D., Fernando Garcia J., Derisi J. L., Smith T., Tobias C., Ross-Ibarra J., Korf I., Chan S. W. 2013. Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. *Genome Biol.* 14 : R10.
- Mitra I., Hare N. K., Raghuram G. V., Chaubal R., Khambatti F., Gupta D., Gaikwad A., Prasannan P., Singh A., Iyer A., Singh A., Upadhyay P., Nair N. K., Mishra P. K., Dutt A. 2015. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J. Biosci.* 40 : 91—111.
- 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 : S11—S17.
- Murtaza M., Dawson S.-J., Dana W. Y., Tsui D. W. Y., Gale D., Forshewet 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.
- Rosario R. C. H., del Rayan N. A., Prabhakar S. 2014. Noncoding origins of anthropoid traits and a new null model of transposon functionalization. *Gen. Res.* 24 : 1469—1484.
- Rykova E. Y., Morozkin E. S., Ponomaryova A. A., Loseva E. M., Zaporozhchenko I. A., Cherdynseva 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 : S141—S153.
- Simoes R., Nicacio A. C., Binelli M., de Paula-Lopes F. F., Mazzotto M. P., Visintin J. A., D'Avila Assumpcao M. E. 2013. Sperm-mediated gene transfer: effect on bovine *in vitro* embryo production. *Zygote.* 21 : 325—329.
- Smith K., Spadafora C. 2005. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *BioEssays* 27 : 551—562.
- Solovei I., Kreysing M., Lanctot C., Kosem S., Peichl L., Cremer T., Guck J., Joffe B. 2009. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell.* 137 : 356—368.
- Spadafora C. 2008. Sperm-mediated «reverse» gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. *Hum. Reprod.* 23 : 735—740.
- Vasioukhin V., Anker P., Maurice O., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. 1994. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* 84 : 774—791.
- Vinogradov A. E. 2003. Isochores and tissue-specificity. *Nucl. Acids Res.* 31 : 5212—5220.
- Vinogradov A. E., Anatskaya O. V. 2007. Organismal complexity, cell differentiation and gene expression: human over mouse. *Nucl. Acids Res.* 35 : 6350—6356.
- Waterston R. H. et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 420 : 520—562.

Поступила 1 XII 2015

EXTRA-CELLULAR DNA FOR THE UNSOLVED EVOLUTIONAL PROBLEMS

O. I. Podgornaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, St. Petersburg State University, 199034,
and Biomedicine School of Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690922;
e-mail: opodg@yahoo.com

The genome assembly and new sequencing methods shed light on extra-cellular DNA (ecDNA) content and uptake. The recent data are described. The asymmetry in repetitive sequences distribution in ecDNA are shown: 1) significant enrichment in pericentromeric tandem repeats (TR), but decrease of centromeric alpha-satellite; 2) enrichment in Alu (SINE) but decrease of LINEs. In the genomes, Alu repeats (SINE) are located mostly to the gene-rich regions, while LINEs enrich facultative heterochromatin as evidenced by bioinformatics and cytological data (FISH). Human shows a greater fraction of tissue-specific genes and a greater ratio of the total expression of tissue-specific genes to housekeeping genes in each tissue studied. A higher level of evolutionary cell differentiation (specialization) in human correlates with the substitution of 4 mouse SINEs with Alu (SINE) repeat. Sperm-mediated gene transfer became the ordinary methods of the veterinary. The overall substitution of ecDNA SINEs in the whole genome by recombination is possible due to Alu element and mouse B1 (SINE) sequence similarity. The orthologous genes are not altered initially but chromatin landscape change lifts up the transcription and provides the evolutionary advantage for the newly born species. So, the scheme suggested may remove two of the contradictions of the Modern evolutionary synthesis theory: 1) gene mutations are not necessary for the progressive evolution but repetitive elements substitution; 2) ancient mammalians could have litters with the number of offspring altered by ecDNA and inbred mating was possible for the descendant altered.

Key words: extra-cellular DNA, tandem repeats, Alu-repeats, evolution, synthesis theory.