РАЗДЕЛ XXXI. БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Вейко Н.Н.¹, Жесткова Е.М.², Мартынов А.В.¹, Ершова Е.С.¹, Малиновская Е.М.¹,
Костюк С.В.¹

**Циркулирующая внеклеточная ДНК здоровых людей значительно отличается от
клеточной ДНК по относительному содержанию GC- и AT- богатых tandemных
повторов**

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

² ГБУ «Психиатрическая клиническая больница № 4 им. П.Б. Ганнушкина» Департамента
здравоохранения города Москвы
(Россия, Москва)

doi: 10.18411/trnio-10-2021-103

Аннотация

Известно, что в плазме крови человека содержатся фрагменты ДНК (внеклеточная ДНК, вкДНК). Концентрацию вкДНК часто используют в качестве маркера патологии в организме. Как правило, для анализа концентрации фрагментов генома в составе вкДНК применяют метод количественной ПЦР. При этом подразумевается, что вкДНК идентична геномной ДНК (клеточной ДНК, клДНК) по количественному содержанию различных последовательностей. В данной работе мы показали, что вкДНК здоровых людей значительно отличается от клДНК по относительному содержанию GC - и AT- богатых повторяющихся последовательностей, причем, содержание повторов в вкДНК зависит от общей концентрации всех фрагментов вкДНК в плазме крови.

Ключевые слова: копийность, рДНК, сателлит III, вкДНК.

Abstract

It is known that human blood plasma contains DNA fragments (extracellular DNA, cfDNA). The cfDNA concentration is often used as a marker of pathology. As a rule, quantitative PCR is used to analyze the concentration of genome fragments in cfDNA. This assumes that cfDNA is identical to genomic DNA (cellular DNA, cDNA) in terms of the quantitative content of various sequences. In this work, we have shown that cfDNA of healthy people differs significantly from genomic DNA in the relative content of GC- and AT-rich repetitive sequences; moreover, the content of repeats in cfDNA depends on the total concentration of all cfDNA fragments in blood plasma.

Keywords: Copy Number Variation, Ribosomal DNA, satellite III, extracellular DNA.

ВкДНК в последние годы широко используется в качестве маркера различных заболеваний человека [1]. Источником вкДНК являются погибшие клетки организма. Кроме того, живые клетки могут выбрасывать в кровотоки фрагменты вкДНК в виде различных структур и комплексов с белками [2]. Несмотря на то, что источником вкДНК являются клетки того же организма, состав вкДНК потенциально может значительно отличаться от состава клДНК. Мы проверили это предположение, проанализировав отношение содержания двух tandemных повторов в составе клДНК и вкДНК одних и тех же практически здоровых людей. Транскрибируемая область рибосомного повтора (рДНК) содержит около 70% GC-пар. Повтор локализован в р-районах акроцентрических хромосом. Геном человека содержит от 200 до 700 копий рДНК [3]. AT-богатый повтор (62 % AT-пар) – фрагмент (длина 1770 пар нуклеотидов) сателлита III (SatIII) локализован в районе 1q12 первой хромосомы. Геном содержит от 5 до 40 пг SatIII на 1 нг клДНК [4]. Мы обнаружили, что отношение содержания рДНК к содержанию SatIII в составе вкДНК значительно увеличено по сравнению с клДНК и зависит от общей концентрации фрагментов вкДНК в плазме крови.

Методы.

В исследовании приняли участие 95 добровольцев: психически и соматически здоровые мужчины (N=81) и женщины (N=14) в возрасте от 18 до 78 лет. От каждого получено письменное согласие на участие в эксперименте.

Протокол количественного анализа двух повторов в составе ДНК человека описан ранее [3,4]. Из кубитальной вены забирали 5 мл крови в пробирки с ЭДТА. Плазму и красный осадок разделяли методом центрифугирования и добавляли лизирующий буфер с РНКазой А и, далее, с протеиназой К. Из гидролизатов плазмы и осадка выделяли вкДНК и клДНК. Концентрация ДНК в выделенных образцах определена с использованием флуоресцентного красителя PicoGreen. Содержание рДНК и SatIII определяли методом нерадиоактивной количественной гибридизации (NQН) с ДНК-зондом на фрагмент рДНК (pBR322-rDNA-bio) и на сателлит III (1.77pBR322-bio).

Анализ проводили для трех независимых экспериментов. Ошибка эксперимента в определении рДНК составила 5 ± 2 % и в определении SatIII - 7 ± 2 % от измеряемой величины. Для каждого образца приводятся средние значения для трех опытов. Сравнение выборок образцов вкДНК и клДНК проводили с использованием методов непараметрической статистики Колмогорова-Смирнова (D и α) и Манна-Уитни (p).

Результаты и обсуждение.

Концентрация вкДНК в плазме крови 95 человек варьировала от 51 нг/мл до 1698 нг/мл (среднее 464 ± 336 нг/мл, медиана 428 нг/мл). На рисунке 1(А и Б) приводятся данные количественного анализа двух повторов в составе вкДНК плазмы крови. Содержание обоих повторов в вкДНК зависит от общей концентрации фрагментов вкДНК в плазме. Количество рДНК в вкДНК снижается, а количество SatIII возрастает при увеличении концентрации вкДНК в образце плазмы крови.

Рисунок 1. Зависимость содержания рДНК (А) и SatIII (Б) в составе вкДНК от общей концентрации фрагментов вкДНК в плазме крови. Приводятся данные корреляционного анализа. В. Распределения отношения (r) количеств двух повторов в ДНК лейкоцитов и в ДНК плазмы крови. Обозначения приводятся на графике. В рамке: сравнение выборок методами Колмогорова-Смирнова (D и α) и Манна-Уитни (p). Г. Зависимость отношения r от общей концентрации фрагментов вкДНК в плазме крови

На рисунке 1В приводятся кумулятивные распределения для отношения содержания (г) рДНК и SatIII в составе геномной ДНК и вкДНК. Очевидно, что значения г для вкДНК значительно превышает значения г для клДНК. Содержание GC-богатого повтора рДНК в составе вкДНК повышается на фоне снижения AT-богатого повтора SatIII. Таким образом, мы наблюдали значительное диспропорционирование фрагментов вкДНК по содержанию GC- и AT- повторов. Этот факт говорит о существенном качественном изменении состава вкДНК по сравнению с составом клДНК. Иными словами, ДНК клеток не эквивалентна вкДНК того же человека по представленности различных фрагментов генома. Более того, изменение состава вкДНК, характеризуемое отношением г, зависит от общей концентрации фрагментов ДНК (рисунок 1Г). Максимальные изменения состава вкДНК мы наблюдали при концентрациях вкДНК менее 300 нг/мл (47 образцов, 49%).

Отношение $г(вкДНК)/г(клДНК)$ для этой подгруппы варьировало от 1 до 36 раз (медиана 4,7 раза). Для остальных образцов вкДНК это отношение варьировало от 0,42 до 12, 1 раза (медиана 1,08 раза). В 18 образцах вкДНК (19%), значение отношения $г(вкДНК)/г(клДНК)$ было меньше 1 (0,42 – 0,96), т.е. вкДНК обогащалась фрагментами SatIII относительно клДНК. По-видимому, в случае активного процесса апоптоза клеток организма на фоне пока не активированных систем элиминации повтор SatIII поступает из клеток в циркуляцию в относительно большем количестве, чем рДНК. Известно, что SatIII локализован на поверхности ядра и более доступен эндонуклеазам ядра, чем рДНК, который локализован в закрытой структуре ядрышка [5].

Наблюдаемые различия в содержании соотношения двух повторов при различных концентрациях вкДНК, вероятно, обусловлены динамикой процессов поступления фрагментов вкДНК в кровоток и элиминации этих фрагментов. Ранее мы показали, что GC-богатые последовательности более устойчивы к фрагментации до низкомолекулярных фрагментов эндонуклеазами крови, чем AT-богатые. Следствием этого различия является более эффективная элиминация низкомолекулярных AT- ДНК из кровотока [6]. Высокие концентрации вкДНК в плазме здоровых людей, по-видимому, отражают активно протекающий процесс гибели клеток и/или недостаточную активацию систем элиминации вкДНК из кровотока.

Полученные результаты показывают, что метод ПЦР, который предполагает применение внутреннего стандарта при анализе фрагментов генома, например, ДНК митохондрий в составе вкДНК, не всегда может дать реальную информацию. Соотношение количества внутреннего стандарта и количества определяемой последовательности в вкДНК может быть сильно изменено по сравнению с клДНК и может варьировать у одного и того же человека в различные периоды.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 18-15-00437 (П).

1. de Miranda F.S. Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker. / de Miranda F.S., Barauna V.G., Dos Santos L., Costa G., Vassallo P.F., Campos L.C.G. // Int J Mol Sci. 2021 Aug 24;22(17):9110. doi:10.3390/ijms22179110.
2. Kustanovich A. Life and death of circulating cell-free DNA. / Kustanovich A., Schwartz R., Peretz T., Grinshpun A. // Cancer Biol Ther. 2019;20(8):1057-1067. doi: 10.1080/15384047.2019.1598759.
3. Smirnov E. Variability of Human rDNA. / Smirnov E., Chmúrčiaková N., Liška F., Bažantová P., Cmarko D. // Cells. 2021 Jan 20;10(2):196. doi: 10.3390/cells10020196.
4. Ershova E.S. Copy Number Variation of Human Satellite III (1q12) With Aging. // Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Konkova M.S., Veiko R.V., Umriukhin P.E., Martynov A.V., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. // Front Genet. 2019 Aug 7;10:704. doi: 10.3389/fgene.2019.00704.
5. Bersaglieri C. Genome Organization in and around the Nucleolus. / Bersaglieri C, Santoro R. // Cells. 2019 Jun 12;8(6):579. doi: 10.3390/cells8060579.
6. Вейко Н.Н. Накопление одиночных разрывов не приводит к парному разрыву ДНК – особенность транскрибируемого фрагмента рибосомного оперона человека, позволяющая его детектировать в биологических жидкостях при гибели различных клеток организма. / Вейко Н.Н. Спитковский Д.М. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т.40. С.396-404.