

Г.В. Бондарь, В.Х. Башеев, Ю.В. Думанский, О.В. Кайряк¹

ФУНКЦІЯ НУКЛЕІНОВИХ КІСЛОТ В ЕРІТРОЦИТАХ: РОЛЬ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ LINE1 В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТІ К ХІМИОТЕРАПІЇ

*Донецький національний медичинський університет ім. М. Горького, Україна,
Донецький обласний протиоопухоловий центр, Донецьк, Україна¹*

Реферат. Обследовано 28 больных раком различных локализаций. В исследовании выявлен факт наличия 3-4 высокомолекулярных последовательностей при проведении ПЦР с праймерами к 3' участку L1 в эритроцитарной фракции крови пациентов в случае ответа (полная либо частичная регрессия) на проведение химиотерапии. Аналогичные результаты получены у больных, получавших адьювантную терапию без признаков продолжения болезни в течение 2 лет. Благодаря эндоклетической активности, продукты данной последовательности в эритроцитах выполняют функцию деградации внеклеточных нуклеиновых кислот. Не приходит ли проведение химиотерапии у больных с дефектом 3' участка L1 к эскалации генетической нестабильности и опухолевой прогрессии в более быстром темпе? Возможно, этим больным изначально стоит отдавать предпочтение в назначении гормонотерапии? Очевидно, высказывание является основанием для проведения рандомизированных клинических исследований.

Ключевые слова: ретротранспозоны, внеклеточные нуклеиновые кислоты, химиорезистентность

В последние годы в области молекулярной биологии были сделаны открытия, во многом изменившие представления человечества о функционировании генетического аппарата клетки. Тем не менее до окончательного понимания строения и основных закономерностей функционирования живого еще довольно далеко. Сложившаяся ситуация напоминает положение, существовавшее в науке о Земле накануне эпохи Великих географических открытий.

Одним из белых пятен на карте современной молекулярной и клинической онкологии является феномен внеклеточных нуклеиновых кислот. Вторым белым пятном служит наше недостаточное знание о роли повторяющихся последовательностей нуклеиновых кислот как на клеточном, так и на организменном уровне. Наконец, третьей полоской «terra incognita» является осмысление факта наличия нуклеиновых кислот во фракции эритроцитов как в норме, так и при опухолевом росте и определение их физиологического значения.

Внеклеточные нуклеиновые кислоты являются одним из маркеров опухолевого процесса. Тем не менее, до сегодняшнего времени неизученным остается вопрос об источниках внеклеточных нуклеиновых кислот как в норме, так и при патологических состояниях. Несмотря на многочисленные исследования, не обнаружено четкой корреляции между уровнем экстрацеллюлярных нуклеиновых кислот и основными клиническими характеристиками больного при опухолевом росте. Пожалуй, единственным весомым пара-

метром, указанным еще в одной из первых публикаций по данной проблеме, является зависимость между уровнем внеклеточных нуклеиновых кислот и распространностью опухолевого процесса. Отмечено снижение концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот при оперативном вмешательстве в радикальном объеме и ответе на проведение химиотерапии и лучевой терапии полными либо частичными регрессиями [17].

В более поздних работах, посвященных исследованию биологии опухолевого роста при использовании спектрофотометрического метода детекции, отмечен факт наличия на эритроцитах нуклеиновых кислот обоих типов – как ДНК, так и РНК, причем для больных опухолевой болезнью характерен более высокий уровень нуклеиновых кислот в эритроцитарной фракции, по сравнению с пациентами неопухолевой патологии [6]. В то же время при использовании для детекции ДНК метода ПЦР-амплификации, как более чувствительного, отмечен рост метилированных последовательностей генов-онкосупрессоров на поверхности форменных элементов крови онкобольных, по сравнению со здоровыми. Метод предложен для ранней диагностики онкозаболеваний [20]. К сожалению, авторами незаслуженно забыт опыт исследований 60-80 годов 20 века. В.М. Дильман в одной из своих монографий, ставших классикой, приводит факт наличия неканонических нуклеозидов в сыворотке крови больных раком молочной железы в качестве диагностического критерия.

Ранее считалось, что в клетках высших организмов транскрибируется около 5% ДНК, соответствующих, в основном, уникальным белковым последовательностям. В настоящий момент известно, что транскрибируется около 70% генома, в том числе, иногда, и прицентромерный гетерохроматин. Любопытно, что транскрипты представлены, как с кодирующей, так и с антисмысловой нитью ДНК [14]. Долгое время считалось, что так называемая «некодирующая ДНК» не несет никакой функциональной нагрузки в клетке и является «генетическим грузом», недаром ее наградили такими эпитетами, как мусорная, эгоистичная ДНК. Однако ряд открытый позволил пересмотреть данное представление.

Роль короткой РНК в регуляции генной экспрессии была впервые показана на модели гена Lin-4 *Caenorhabditis elegans* [16]. Направляемое РНК метилирование ДНК было открыто в

1994 г. на растениях, инфицированных вирионами [19]. Специфическое ингибирование транскрипции искусственно введенной дуплексной РНК было впервые обнаружено в опытах на *C. elegans* в 1998 г. [12]. В дальнейших исследованиях уточнялись детали механизма сайленсинга. Были выявлены белковые комплексы, осуществляющие процессинг дуплексной РНК и образование малых интерферирующих РНК (Dicer, Argonaut), а также комплексы RISC и RITC.

В конце концов «мусорная» ДНК в геноме оказалась регуляторной, определяющей как структуру хроматина, так и генную активность. Ключевым моментом настоящих и будущих исследований в этой области является ответ на вопрос об источниках и условиях образования дуплексной РНК.

Из школьного курса биологии известно, что эритроциты являются безъядерными клетками. Следуя линейной логике, резонно предположить, что в эритроцитах не должно быть и намека на наличие нуклеиновых кислот, а особенно ДНК. Тем не менее, в 1964 г. Philipson и Zetterqvist в мембранах эритроцитов человека была обнаружена двунитевая ДНК [2]. Характерной особенностью этой ДНК является довольно высокое содержание Г+Ц (39-42%), что является основанием для предположения о принадлежности этой ДНК к высококонсервативной junc DNA. Однако, о функциональной роли этой ДНК до сего дня неизвестно.

Целью работы явился поиск связи представительства ретротранспозонов L1 в эритроцитарной фракции крови онкобольных с клиническими параметрами течения заболевания.

Материал и методы

Обследовано 28 больных раком различных локализаций, в том числе раком молочной железы T1-3N0-2M0-1 – 11, яичников T3cN2-3M0 – 2, меланомой T1-4N0-2M0-1 – 6, толстой кишки T2-3N1-2M – 3, желудка T4N3M0 – 3, легкого T2N2M1 – 1, тела матки T1N0M0 – 1, поджелудочной железы T2N2M0 – 1. Кровь для исследования забиралась до начала лечения либо до начала одного из этапов лечения. Среди обследованных больных 18 человек были пролечены по поводу прогрессирования опухолевого процесса на этапе проявления рецидивов или метастазов. Эффект от химиотерапии оценивался согласно критериям ВОЗ: полная либо частичная регрессия, стабилизация процесса и прогрессирование. Ретроспективно были сформированы группы с ответом на лечение (полная либо частичная регрессия) – 7 и с отсутствием результатов лечения – 11. Больные, получавшие химиотерапию в адьювантном режиме без признаков продолжения болезни в течение 2 лет, отнесены также к первой группе. В сформированных группах оценивали наличие либо отсутствие последовательностей, полученных в результате амплификации с праймерами к 5' и 3' L1.

Кровь для исследования забиралась из локтевой вены в количестве 10 мл для получения сыворотки – в сухую стерильную пробирку, для получения эритроцитов – в пробирку, содержащую трилон Б. Выделение нуклеиновых кислот

из 100 мкл сыворотки и эритроцитов осуществляли путем сорбции на 100 мкл мелкодисперсного стекла с последующей трехкратной отмыvkой солевым буфером, содержащим этанол. ПЦР проводилась на программируемом термоциклире «Appl biosystems». Праймеры для ПЦР синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва). Были использованы праймеры для участков 5' и 3' элемента LINE собственного дизайна. Режим амплификации был следующий: горячий старт, денатурация при 95° 40 сек, отжиг праймеров при 58° 40 сек, элонгация при 74° 60 сек (всего 35 циклов). Продукты ПЦР-амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле. Для оценки величин продуктов ПЦР использовали маркеры молекулярной массы ДНК.

Статистическую обработку результатов осуществляли путем применения критерия Вилконсона.

Результаты и обсуждение

Современные семейства повторов L1 произошли от одного общего предшественника. В секвенированных геномах человека, мыши и крысы присутствует более 500000 копий повторов L1 [15]. Последовательность L1 кодирует 2 белка и имеет, соответственно, 2 открытых рамки считывания ORF1 и ORF2. ORF1, расположена ближе к 5' концу последовательности, кодирует белок 40 кДа, обладающий способностью связываться с однонитевой РНК. ORF2 располагается правее ORF1 и является матрицей для белка 150 кДа с активностями эндонуклеазы. Механизм инкорпорации ретротранспозонов в геномную ДНК детально описан Р.Б.Хесиным [7].

Функции L1 повторов в клетке и на уровне макроорганизма во многом являются загадкой.

Известно, что активные ретротранспозоны способствуют рекомбинации и могут быть вовлечены в такие процессы, как репарация поврежденной ДНК, одним из этапов которой является рекомбинация [18]. В то же время, рекомбинация является одним из пусковых моментов нестабильности генома, приводя к делециям и дупликациям, которые являются несовместимыми с нормальной жизнедеятельностью клетки [11]. Кроме того, ретротранспозоны, возможно в кооперации с ALU повторами, участвуют в ремоделировании структуры хроматина, переводя эухроматиновые участки в гетерохроматиновые. Наиболее хорошо изученным феноменом, демонстрирующим участие L1 повторов в регуляции генной экспрессии, является импринтинг X-хромосомы у самок млекопитающих [10]. Распределение L1 повторов на X хромосоме неравномерно. Область, с которой транскрибируется РНК, определяющая импринтинг второй X хромосомы в женских соматических клетках, обогащена L1, в то время как районы, не подвергающиеся инактивации, обеднены L1 повторами. Предполагают, что обогащение L1 повторами участков аутосом также определяет состояние хроматина и, таким образом, определяет генную экспрессию [8]. Наконец, активация ретротранспозонов наблюдается при опухолевом росте. Таким образом, функция повторов L1 неоднозначна.

В исследовании выявлен факт наличия 3-4 высокомолекулярных последовательностей при проведении ПЦР с праймерами к 3' участку L1 в эритроцитарной фракции пациентов в случае ответа (полная либо частичная регрессия) на проведение химиотерапии. Аналогичные результаты получены у больных, получавших адьюvantную терапию без признаков продолжения болезни в течение 2 лет. Амплификаты к 5' участку L1 в эритроцитарной фракции пациентов в исследуемых группах не отличались. Целью и смыслом проведения химиотерапии при опухолевом росте является индукция программируемой клеточной гибели в опухолевых клетках. Продукты распада опухолевой ткани, в конечном счете, попадают в кровоток и идентифицируются в виде апоптотических телцей. По данным Fourtie G.J. [13], львиную долю нуклеиновых кислот сыворотки составляют продукты опухолевой природы. Также отмечен факт образования лейко-тромбоцитарных и тромбоэритроцитарных розеток при опухолевом росте. Известно, что нуклеиновые кислоты обладают мутагенным действием, оказывают стимулирующее либо ингибирующее влияние на иммунную систему в зависимости от последовательности и профиля метилирования и связи с белковыми комплексами. Известен факт передачи «злокачественности» нуклеиновыми кислотами, благодаря которому осуществляется трансфекция [7]. Упаковка в клеточную мембрану предохраняет нуклеиновые кислоты от действия нуклеаз. Апоптотические тельца опухолевой природы, циркулирующие в кровотоке, могут прикрепляться и затем фагоцитироваться лейкоцитами. Трансфекционные лейкоциты являются переносчиками нуклеиновых кислот опухолевого происхождения, формируя преметастатические ниши и способствуя, тем самым, появлению рецидивов и метастазов [1]. В нашей предыдущей работе показано, что при неблагоприятном течении заболевания в лейкоцитах онкобольных содержится большее количество нуклеиновых кислот, чем в группе с хорошим прогнозом. Более того, при отсутствии ответа на химиотерапию наблюдается рост количества нуклеиновых кислот в лейкоцитарной фракции [3]. Применение препаратов кальция способствует образованию эритроцитарных розеток с апоптотическими тельцами [4, 5].

В случае нормального функционирования эндогенных эритроцитарных эндонуклеаз в составе L1 внеклеточные нуклеиновые кислоты опухолевой природы расщепляются и, возможно, уничтожают или искают смысл первоначальной нуклеиновой последовательности. Таким образом, в норме осуществляется один из заключительных аккордов в фуге под названием «гомеостаз».

Проведенное исследование ставит больше вопросов, чем дает ответов.

Первый вопрос относится к происхождению L1 в эритроцитарной фракции. С одной стороны, в эритроцитах может происходить процесс обратной транскрипции с кольцевых цитоплазматических L1 РНК, оставшихся в эритроците после

стадии «выбрасывания» ядра из клетки-предшественника в костном мозге. С другой стороны, донором L1 РНК и ДНК могут быть лимфоциты, для которых описан феномен прижизненного «выброса» нуклеиновых кислот [9, 2].

Второй вопрос относится к месту утилизации внеклеточных нуклеиновых кислот. Наиболее вероятным органом для этого является селезенка.

Наконец, имеет ли смысл проведение химиотерапии больным с неадекватно функционирующей системой эндогенных нуклеаз в составе L1? Не приводит ли проведение химиотерапии у таких больных к эскалации генетической нестабильности и опухолевой прогрессии в более быстром темпе? Возможно, этим больным изначально стоит отдавать предпочтение в назначении гормонотерапии? Очевидно, вышеизложенное является основанием для проведения рандомизированных клинических исследований с учетом молекулярно-биологических критериев.

Таким образом, во фракции нуклеиновых кислот эритроцитов человека содержатся высокомолекулярные двунитевые последовательности, характерные для ретротранспозонов L1. Благодаря эндонуклеазной активности продукты данной последовательности в эритроцитах выполняют функцию деградации внеклеточных нуклеиновых кислот. Впервые отмечена положительная корреляция между отсутствием высокомолекулярных фрагментов при проведении ПЦР с праймерами к 3' последовательности L1 в эритроцитарной фракции крови онкобольных и отсутствием эффекта (полные и частичные регрессии) при проведении химиотерапии.

G.V.Bondar, V.H.Basheev, Yu.V.Dumanskiy,
O.V.Kajrjak

Function of nucleic acids in erythrocytes: role of retrotransposons line 1 in sensitivity to chemotherapy

It is surveyed 28 various localizations sick by a cancer. In research the fact of presence of 3-4 high-molecular sequences is elicited at carrying out PCR with primers to 3' to field L1 in erythrocytes fractions of blood of patients in case of the answer (full or partial regression) to chemotherapy carrying out. Similar results are received at the patients receiving adjuvant therapy without signs of continuation of illness within 2 years. Thanking endonuclease activity products of the yielded sequence in erythrocytes carry out function of degradation of extracellular nucleic acids. Whether results carrying out of chemotherapy at patients with defect 3' field L1 in escalation of genetical instability and a tumoral progression in faster rate? Probably, this patient initially should be preferred in appointment hormonalterapy? Obviously, the aforesaid is the establishment for carrying out randomized clinical researches (University clinic. — 2013. — Vol.9, №2. — P. 201-204).

Key words: retrotransposones, extracellular nucleic acids, chemotherapyrezieyshion.

Г.В. Бондар, В.Х. Башеев, Ю.В. Думанський,
О.В. Кайряк

Функція нуклеїнових кислот в еритроцитах: роль ретротранспозонів line 1 в чутливості до хіміотерапії

Обстежено 28 хворих на рак різних локалізацій. У дослідженні виявлений факт наявності 3-4 високомолекулярних послідовностей при проведенні ПЦР з праймерами до 3' ділянки L1 в еритроцитарної фракції крові пацієнтів у випадку відповіді (повна або часткова регресія) на проведення хіміотерапії. Аналогічні результати отримані у хворих, які одержували ад'ювантну терапію без ознак продовження хвороби протягом 2 років. Завдяки ендонуклеазній активності продукти даної послідовності в еритроцитах виконують функцію деградації позаклітинних нуклеїнових кислот. Чи не призводить проведення хіміотерапії у хворих з дефектом 3' ділянки L1 до ескалації генетичної нестабільності та пухлинної прогресії в більш швидкому темпі? Можливо, цим хворим з початку лікування варто віддавати перевагу в призначенні гормонотерапії? Очевидно, вищесказане є підставою для проведення рандомізованих клінічних досліджень (Університетська клініка). — 2013. — Т.9, №2. — С. 201-204).

Ключові слова: ретротранспозони, позаклітинні нуклеїнові кислоти, хіміорезистентність.

ЛІТЕРАТУРА

- Бондарь Г.В. Опухолевая болезнь – элемент эволюции органического мира / Г.В.Бондарь, И.Е.Седаков, О.В.-Кайряк // Онкология. — 2010. — Т. 12, № 3. — С. 213 – 218.
- Гершкович И. Генетика / И.Гершкович. — Москва: Наука, 1968. — 697 с.
- Кайряк О.В. Содержание нуклеиновых кислот в лейкоцитах периферической крови и сыворотке у больных солидными опухолями при проведении эндолимфатической химиотерапии / О.В.Кайряк // Архив клин. и эксперим. медицины. — 2000. — Т. 9, № 4. — С. 504 – 507.
- Кайряк О.В. Использование модификаторов при проведении эндолимфатической химиотерапии больным злокачественными опухолями / О.В.Кайряк, Н.Ю.Лисовская, Я.В.Кузьменко // Эксп. онкология. — 2000. — С. 324.
- Кайряк О.В. Використання препаратів кальцію як терапія супроводження при застосуванні хіміотерапії в онкологічних хворих / О.В.Кайряк, П.В.Ліфарь // Вісник наукових досліджень. — 2009. — № 4. — С. 126 – 129.
- Уровень внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме крови здоровых доноров и больных с опухолями молочной железы / С.Н.Тамкович, П.П.Лактионов, Е.Ю.Рыкова [и др.] // Бюл. эксп. биол. и мед. — 2005. — № 4. — С. 462 – 464.
- Хесин Р.Б. Непостоянство генома / Р.Б.Хесин. — Москва: Наука, 1985. — 472 с.
- High concentrations of long inserted nuclear element sequence distinguish monoallelically expressed genes / E.Allen, S.Horvath, F.Tong [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2003. — V. 100. — P. 9940 – 9945.
- Anker P. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes in the course of as shown in an in vitro system / A.Panker, M.Stroun, P.A.Mourice / Cancer Res. — 1975. — V. 35 (9). — P. 2375–2382.
- Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis / J.A.Bailay, L.Carrel, A.Chakravarti, E.E.Eichler // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — V. 97. — P. 6634 – 6639.
- Burwinkel B. Unequal homologous recombination between LINE-1 elements as a mutational mechanism in human genetic disease / B.Burwinkel, M.W.Kilimann // J.Mol. Biol. — 1998. — V. 277. — P. 513 – 517.
- Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* / A.Fire, S.Xu, M.K.Montgomery [et al.] // Nature. — 1998. — V. 391. — P. 806 – 811.
- Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours / G.J.Fournie, C.J.P.Ourtin, F.Laval [et al.] // Cancer letters. — 1995. — V. 91. — P. 221 – 227.
- Kapranov P. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization / P.Kapranov, A.T.Willingham, T.R.Gingeras // Nat. Rev. Genet. — 2007. — V. 8. — P. 413 – 423.
- Initial sequencing and analysis of the human genome / E.S.Lander, L.M.Linton, B.Birren [et al.] // Nature. — 2001. — V. 409. — P. 860 – 921.
- The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementary to lin-14 / R.C.Lee, R.L.Feinbaum, V.Ambros // Cell. — 1999. — V. 75. — P. 843 – 854.
- Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy / S.A.Leon, B.Shapiro, D.M.Sklaroff, M.J.Yaros // Cancer Res. — 1977. — V. 37. — P. 646 – 650.
- DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition / T.A.Morrish, N.Gilbert, J.S.Myers [et al.] // Nat. Genet. — 2002. — V. 31. — P. 159 – 165.
- RNA-dereceted de novo methylation of genomic sequences in plants / M.Wassenegger, S.Neimes, L.Riedel, H.L.Sanger // Cell. — 1994. — V. 76. — P. 567 – 576.
- Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumor-related gene methylation / T.E.Skvortsova, E.Y.Rykova, S.N.Tamkovich [et al.] // British Journal of Cancer. — 2006. — V. 94. — P. 1492 – 1495.

