

Метод анализа числа копий GC-богатых повторяющихся последовательностей генома в составе поврежденной ДНК. Определение увеличенного содержания рибосомных генов в циркулирующей внеклеточной ДНК лиц с длительным стажем курения табака

Честков И.В., Вейко Н.Н., Ершова Е.С., Сергеева В.А.,
Вейко Р.В., Ижевская В.Л., Костюк С.В.

Федеральное государственное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,
115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: ichestkov@yandex.ru

Анализ GC-богатых повторов в составе поврежденной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) дает сильно заниженные значения их содержания в геноме. Описана технология, позволяющая анализировать копийность умеренных GC-богатых повторов генома человека (рибосомного, теломерного и митохондриальной ДНК) в составе поврежденной ДНК. По сравнению с другими, эти последовательности генома наиболее сильно повреждаются в составе внеклеточной ДНК, в ДНК старых клеток, в длительно хранящихся образцах ДНК и в окисленной ДНК. В основе технологии лежат метод нерадиоактивной количественной гибридизации с битинированными ДНК-зондами и специально написанная программа расчета содержания повтора в геноме на основе автоматического анализа экспериментальных данных. Применение технологии проиллюстрировано на примере сравнительного анализа содержания рибосомного повтора в составе внеклеточной ДНК плазмы крови курящих и некурящих лиц. Показано, что в плазме крови людей с длительным стажем курения накапливаются в значительном количестве фрагменты рибосомного повтора, что может указывать на усиление процессов гибели клеток в организме и на развитие хронической патологии.

Ключевые слова: рибосомный повтор, анализ копийности, внеклеточная ДНК, нерадиоактивная гибридизация

Введение

В последние годы резко возрос интерес к исследованию вариации копийности различных последовательностей генома (англ. термин — copy number variation). Вариации копийности ряда последовательностей генома могут быть ассоциированы с развитием патологии [18]. Для количественного анализа повторов генома используются современные методы секвенирования и метод ПЦР в реальном времени. Методы секвенирования достаточно дороги и пока не позволяют одновременно исследовать большое количество образцов ДНК. Метод ПЦР эффективен при количественном анализе образцов неповрежденной ДНК. В случае повреждения ДНК-матрицы эффективность реакции синтеза цепи ДНК полимеразой значительно снижается. Окислительная модификация оснований и фрагментация цепей ДНК являются препятствием для работы ДНК-полимеразы. Если ДНК сильно повреждена, то определяемые количество последовательности могут быть значительно занижены по сравнению с реальным содержанием повтора в ДНК. Ранее было показано, что ДНК старых животных или ДНК облученных особей является плохой матрицей для Taq-полимеразы [14]. Известно также, что внеклеточная ДНК (вкДНК) сильно по-

вреждена: фрагментирована и содержит большое количество продукта окисления — 8-oxodG (8-oxo-2'-deoxyguanosine) [9]. Именно поэтому, определяемые методом ПЦР концентрации вкДНК в плазме на порядок меньше, чем концентрации, определяемые физико-химическими методами [10].

В ДНК наиболее низким потенциалом окисления обладает дезоксигуанозин, особенно в составе последовательностей Gn, где n больше или равно трем [12]. Соответственно GC — обогащенные последовательности потенциально могут повреждаться сильнее, чем AT-богатые последовательности. Геном человека содержит три умеренно повторяющихся последовательности с высоким содержанием GC-пар — это теломерный повтор, транскрибируемая область рибосомного повтора (рДНК) и митохондриальная ДНК (мтДНК). Теломерный повтор и рДНК содержат значительное количество легко окисляющихся последовательностей Gn. Кроме того, репарация рДНК значительно снижена по сравнению с другими последовательностями генома. МтДНК содержит на порядок меньше повтора GGG (72 на 16 573 оснований), чем рДНК (750 на 13314 оснований) и теломерный повтор ((TTAGGG)n). Надо иметь в виду, что уровень окисления мтДНК может быть высоким при нарушении функционирования митохондрий вследст-

вие увеличения уровня активных форм кислорода (АФК) [16].

Ранее мы показали, что метод ПЦР в реальном времени практически не применим для анализа копийности рДНК в составе сильно окисленной клеточной ДНК, в составе ДНК старых клеток, достигших предела Хейфлика, а также в составе вкДНК [5, 6]. При этом эффективность ПЦР уникальных генов — стандартов на поврежденной матрице снижалась не более чем в 2 раза по сравнению с соответствующими неповрежденными матрицами (неокисленная ДНК молодых клеток). Для анализа копийности рДНК в поврежденной ДНК человека было предложено использовать метод гибридизации [2, 5].

В настоящей работе описывается технология, которая позволяет определять копийность умеренных GC-повторов в ДНК человека методом нерадиоактивной количественной гибридизации. Данная технология применена для анализа содержания рДНК в составе вкДНК лиц с большим стажем курения табака. Ранее было показано, что увеличение содержания рДНК в составе вкДНК является маркером увеличения гибели клеток в организме вследствие хронического окислительного стресса [1].

Материалы и методы

Описание обследованных групп

Для исследования из коллекции образцов, ранее собранной в лаборатории, случайным образом были отобраны 2 группы образцов плазмы крови практически (условно) здоровых доноров — жителей Москвы. Группа 1 (32 чел.) — некурящие доноры в возрасте от 43 до 68 лет (медиана 56 лет). Группа 2 (32 чел.) — курящие доноры в возрасте от 43 до 68 лет (медиана 57 лет), стаж курения не менее 10 лет, количество выкуриваемых сигарет — не менее 20 в день.

Выделение вкДНК из плазмы крови

К 500 мкл плазмы крови, очищенной от клеток центрифугированием, добавляли: 1%-ный лаурилсаркозинат натрия («Sigma», США), 0,02 моль/л ЭДТА («ПанЭко», Россия) и 75 мкг/мл РНКазы А («Sigma», США). Далее образец инкубировали при 37°C в течение 45 мин, после чего вносили протеиназу К (200 мкг/мл, «Sigma», США) и оставляли на 24 ч при 37°C для гидролиза белков. Далее дважды проводили экстракцию ДНК насыщенным раствором фенола и осаждали ее 2 объемами этанола в присутствии насыщенного раствора (2 моль/л) ацетата аммония. Осадок промывали 75%-ным этанолом, высушивали и растворяли в деионизованной воде. Концентрацию ДНК измеряли с использованием ДНК-связывающего красителя Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent («MoViTec»), на люминесцентном спектрометре «LS 55» («PerkinElmer», Англия).

Нерадиоактивная дот-гибридизация

Для определения рибосомного повтора использовали олигонуклеотидный зонд на 28S рДНК (5'-TATCGGTCTCGTGCCGGTATTTAGCCTTAG-3') и на 18S рДНК (5'-CTGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC-3'). Синтез и биотинирование ДНК-зондов проводила фирма Синтол (Россия).

Денатурированные пробы вкДНК (2 мкл) наносили на фильтр (мембрана Extra C), предварительно смоченный 20X SSC и просушенный. Для каждой пробы наносили 3 параллельные точки. На этот же фильтр наносили стандартные образцы геномной ДНК с известным содержанием повторов для построения калибровочной зависимости сигнала от количества повтора в пробе. В качестве отрицательной контрольной пробы использовали ДНК фага λ. Гибридизацию проводили 1 ч при 55°C. Фильтр отмывали 0,2X SSC. Фильтр блокировали в растворе 0,05M Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% молоко, 0,1% желатин, 0,5M NaCl. Биотин выявляли с использованием конъюгата стрептавидина со щелочной фосфатазой («Merck»). В качестве субстратов для фермента использовали NBT (nitro blue tetrazolium chloride, «Sigma») и BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, «ApplChem»). Реакцию проводили в темноте при комнатной температуре, контролируя визуально появление окрашенных фиолетовых пятен. Высушенный фильтр сканировали. Для количественного анализа результата гибридизации использовали программу (ImageJ 6a, МГНЦ РАМН). Содержание рДНК в вкДНК приводится в расчете на всю транскрибируемую область рибосомного повтора длиной 13 314 п.н.

Статистические методы

Применили методы непараметрической статистики Манна—Уитни и Колмогорова—Смирнова. Значения p или $\alpha < 0,05$ говорили о достоверности различия между анализируемыми выборками. Для анализа использовали программу StatPlus2007 (<http://www.analystsoft.com>).

Результаты

Технология определения копийности умеренного повтора в составе образцов ДНК

На рис. 1 и 2 приведены данные, иллюстрирующие разработанную технологию, позволяющую определять копийность умеренных повторов в геноме человека. Перед нанесением на мембрану пробы ДНК с известными концентрациями денатурировали 0,1M NaOH. Гибридизацию осуществляли, используя два 30-звенных олигонуклеотидных зонда на гены 18S и 28S РНК, которые содержали остаток биотина на 5'-конце. Биотин выявляли конъюгатом стрептавидина и щелочной фосфатазы. На рис. 1 приводится фотография сканированного

фильтра. Пятна 1–32 (по три пятна на каждый из 32 образцов ДНК) на фильтре на рис. 1 получают при визуализации молекул щелочной фосфатазы путем ферментативной реакции с субстратами BCIP и NBT. Для количественного анализа необходимо использовать стандартные образцы ДНК с известным количеством копий анализируемого повтора. На мембране в строке К нанесен образец ДНК, содержащий 487 копий (или 2,1 пг рДНК/нг ДНК). Для определения числа копий рДНК в стандартном образце ранее использовали метод блот-гибридизации и модельные фрагменты рДНК [2].

Фильтр сканировали и его изображение анализировали, используя специально написанную для данной технологии программу «Imager ба». Программа вычисляет интегральную интенсивность (I) и площадь (S) каждого пятна, среднее значение и стандартное отклонение для пятен, соответствующих каждому образцу ДНК. Учитывается также возможный фоновый сигнал. Далее проводится расчет содержания последовательности в каждом образце ДНК на основании следующего алгоритма.

1. Строится калибровочная зависимость средней интегральной интенсивности пятна или средней плотности пятна (отношение I/S) от концентрации (C) нанесенного на фильтр контрольного образца ДНК (рис. 2). Концентрация образца ДНК прямо пропорциональна количеству анализируемой последовательности, которая гибридизуется с зондом на фильтре. Данные много-

численных опытов показали, что зависимость I или (I/S) от десятичного логарифма концентрации ДНК (lgC) имеет линейный характер и описывается уравнением (1):

$$I = a * \lg C + b. (1)$$

2. По уравнению (1) определяется концентрация опытного образца (C_{теор}), которая должна соответствовать интегральной интенсивности I в случае, если опытный образец содержит одинаковое с контрольным образцом число копий повтора. На рис. 2 приводятся два примера. Образец 1 дает больший сигнал, чем контрольный образец при той же концентрации (C1). Образец 3, наоборот, дает меньший сигнал, по сравнению с контролем при концентрации C3. Таким образом, образец 1 содержит больше копий повтора, а образец 3 — меньше копий рДНК, чем контрольный образец. Содержание повтора в опытном образце (K_i) рассчитывается по формуле (2):

$$K_i = C_i * K / C_{теор} = C_i * K * 10^{(b-I)/a}, (2)$$

где:

C_i — концентрация ДНК в пробе (нг/мкл);

K — содержание повтора в контрольном образце (число копий или пг рДНК /нг ДНК);

I — средняя интегральная интенсивность пятна опытного образца (px);

a, b — коэффициенты в уравнении (1) калибровочной прямой.

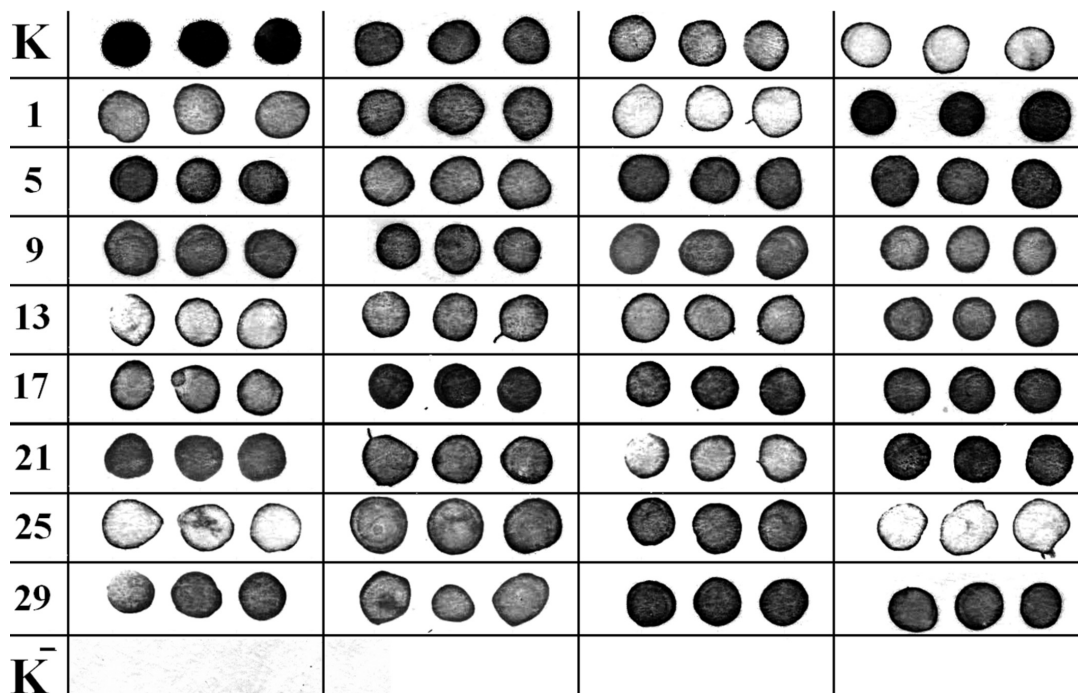


Рис. 1. Иллюстрация эксперимента по анализу содержания рДНК в вкДНК.

На фильтр нанесены 32 пробы вкДНК курящих людей, по 3 пятна для каждого образца, по 4 образца в ряду. Концентрация вкДНК в пробах варьировала от 5 до 30 нг/мкл. Ряд К — контрольный образец с концентрацией от 5 до 50 нг/мкл. Ряд К̄ — отрицательный контроль, ДНК фага λ с концентрацией 100 нг/мл.

Анализ содержания рДНК
в составе вкДНК курящих и некурящих лиц

Описанную выше технологию применили для анализа содержания рДНК в составе вкДНК плазмы крови курящих лиц по сравнению с некурящими. На фильтре, изображение которого представлено на рис. 1, нанесены 32 пробы вкДНК плазмы крови мужчин в возрасте 43—68 лет. Стаж курения составлял не менее 10 лет, интенсивность курения — не менее 20 сигарет в сутки. В качестве контроля исследовали 32 пробы вкДНК мужчин того же возраста, которые никогда не курили.

На рис. 3А приводятся кумулятивные распределения концентраций вкДНК в плазме крови в двух группах. В контрольной группе концентрация вкДНК варьировала от 36 до 575 нг/мл (медиана 190 нг/мл), у курящих концентрация варьировала от 30 до 537 нг/мл (медиана 141 нг/мл). Согласно непараметрическому критерию Манна—Уитни концентрации вкДНК в плазме крови курящих и некурящих лиц не различаются ($p > 0,05$).

На рис. 3Б приводятся кумулятивные распределения содержания рДНК в составе вкДНК, которые были определены с использованием описываемого метода. В контрольной группе содержание рДНК варьировало от 1 до 5,3 пг/нг вкДНК (медиана 3,4 пг/нг). У курящих содержание рДНК варьировало от 1 до 50 пг/нг вкДНК (медиана 6,0 пг/нг). У 16 курящих (50%) содержание рДНК превышало верхнюю границу нормы. Ранее было показано, что в составе геномной ДНК человека содержание рДНК варьирует от 0,82 до 2,99 пг/нг общей ДНК (среднее $1,72 \pm 0,50$ пг/нг). Таким образом, содержание рДНК в составе вкДНК в обеих группах выше, чем содержание в геноме человека. Содержание рДНК в вкДНК в плазме крови курящих лиц достоверно выше, чем некурящих ($p < 0,05$).

На рис. 3В приводятся кумулятивные распределения концентрации рДНК в плазме крови в двух группах. В контрольной группе концентрация рДНК варьировала от 72 до 1940 пг/мл плазмы (медиана 648 пг/мл). У курящих концентрация рДНК варьировала от 60 до 4938 пг/мл (медиана 1146 пг/мл). У 9 из 32 курящих (28%) концентрация вкДНК была выше верхней границы нормы. Концентрация рДНК в плазме курящих достоверно выше, чем у некурящих ($p < 0,05$).

Обсуждение

В работе приводится описание технологии, позволяющей проводить определение копийности умеренных повторов генома в составе поврежденных образцов ДНК. Интересно отметить, что, несмотря на интенсивное развитие метода ПЦР, в литературе до сих пор не проводился анализ копийности рДНК в геноме человека с помощью метода ПЦР. В современных обзорах даются ссылки на работы 1980 г., где копийность рДНК человека была определена радиоактивной дот-гибридизацией. Имеется только одна работа 2005 г., где авторы анализировали изменение содержания рДНК в геноме при старении методом ПЦР в реальном времени [17]. В этой работе не проводилось определение числа копий рДНК, авторы ограничились анализом разности величин ΔCt для гена стандарта и рДНК. Оказалось, что в составе ДНК даже молодых людей рДНК определяется намного менее эффективно, чем стандартный ген. Почти в половине приведенных анализов величина разности ΔCt была отрицательной. При нормальном же анализе со 100% эффективностью ΔCt должна быть не менее 8 (что соответствует 256 копий рДНК, нижняя граница распределения числа копий рДНК в геноме). Обнару-

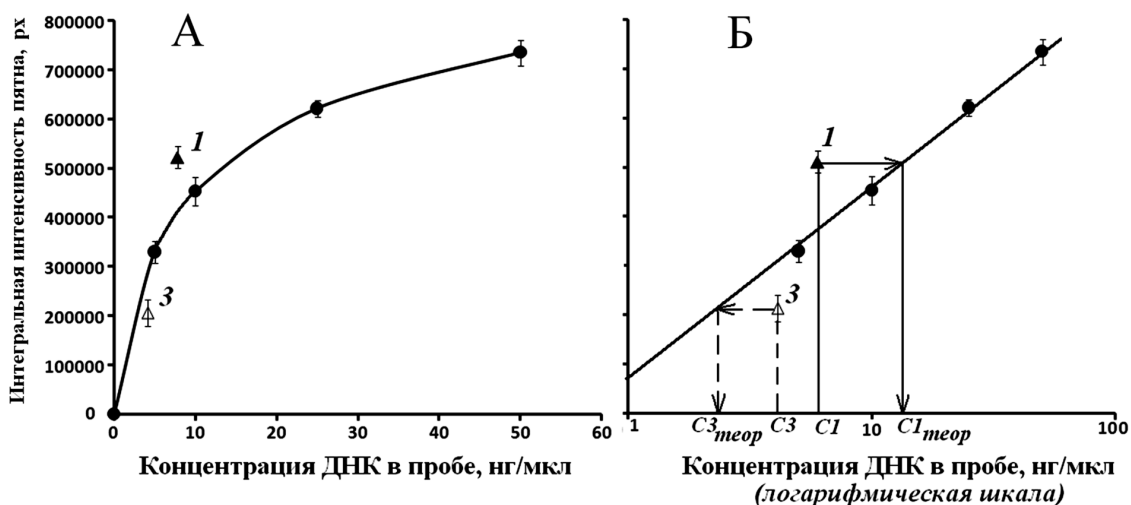


Рис. 2. Иллюстрация метода расчета содержания рДНК в вкДНК.

Зависимость средней интегральной интенсивности пятен, соответствующих контрольному образцу (см. рис. 1), от концентрации ДНК в пробе (А) или от десятичного логарифма концентрации ДНК (Б). На рисунке приводятся точки для двух опытных образцов вкДНК — с большим (№ 1) и с меньшим (№ 3) содержанием рДНК в пробе по сравнению с контрольным образцом.

женное с возрастом снижение количества рДНК в геноме может быть связано с увеличением уровня окисления матрицы, но не с потерей копий рДНК.

Очевидно, помимо повреждения матрицы имеются другие причины низкой эффективности анализа рДНК методом ПЦР. Одна из таких причин — тандемность рибосомных повторов в ДНК. В растворе создается локально повышенная концентрация последовательностей рДНК, которые могут конкурировать с праймерами, образуя внутримолекулярные комплексы. Кроме того, в составе рибосомных повторов присутствуют сильно метилированные копии. Известно, что температура плавления метилированных GC-богатых последовательностей превышает 100°C. При проведении анализа копии не денатурируют, вследствие чего они изымаются из анализа.

Всех перечисленных недостатков лишен метод гибридизации. Поскольку при проведении гибридизации не используется фермент, то повреждения матрицы не играют существенной роли в случае, если длина фрагментов ДНК не ниже 50—100 нуклеотидов, а длина зонда выше 20—25 нуклеотидов. Поскольку для денатурации ДНК-матрицы применяется щелочь, то уровень метилирования повтора не имеет значения. Этот метод позволяет одновременно анализировать большое число образцов и использовать несколько стандартных ДНК для калибровки, что повышает точность анализа. Вместе с тем метод имеет одно существенное ограничение — он позволяет надежно определять копийность только умеренных повторов. Для низкокопийных последовательностей метод малоприменим вследствие низкой чувствительности и не может соперничать с общепризнанным методом ПЦР.

Мы с успехом применяем метод гибридизации для анализа содержания рДНК в составе вкДНК в норме и при патологии. Известно, что вкДНК значительно фрагментирована и содержит много продуктов окислительной модификации [9]. В результате ПЦР-анализ не позволил нам адекватно оценить содержание рДНК в составе вкДНК [5]. Этот недостаток позволяет преодолеть описываемый в работе метод. Накопление рДНК в составе вкДНК является маркером интенсификации процесса апоптоза в организме вследствие хронических заболеваний или внешних, сравнительно небольших, хронических воздействий. Накопление рДНК в составе вкДНК плазмы крови тестировали у больных аутоиммунными и сердечно-сосудистыми заболеваниями [1, 3], у работников ядерных объектов, работающих в условиях хронически повышенного радиационного фона [5]. В рамках данной работы обнаружено значительное накопление рДНК в плазме крови лиц со значительным стажем курения табака. Этот факт указывает на повышение у некоторых лиц общего уровня гибели клеток в результате курения до уровня, сопоставимого с хроническим действием малых доз ионизирующего излучения. Известно, что курение, как и ионизирующая радиация, повышает окислительный стресс в организме [8], что приводит к повышению уровня гибели клеток организма. По-видимому, курящим людям, у которых обнаружено высокое содержание рДНК в составе вкДНК, можно порекомендовать пройти более тщательное медицинское обследование на предмет выявления скрытой хронической патологии.

Определение содержания рДНК в составе вкДНК важно еще и потому, что данная последовательность яв-

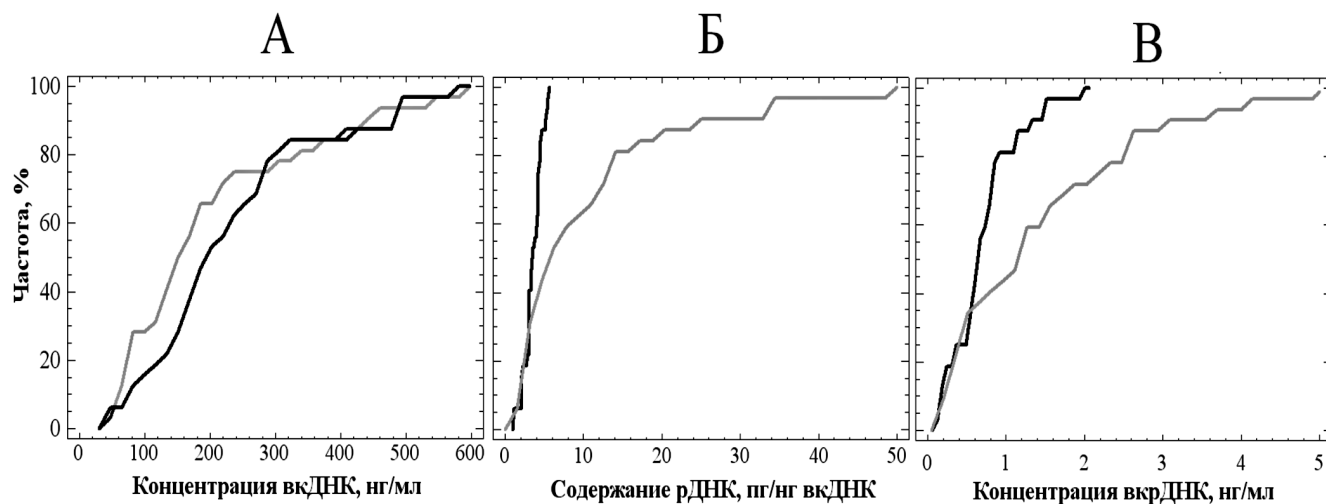


Рис. 3. Сравнение характеристик вкДНК курящих и некурящих людей:

А — кумулятивное распределение для двух групп концентрации вкДНК в плазме крови. Согласно критерию Колмогорова—Смирнова, распределения не различаются ($\alpha > 0,05$);

Б — кумулятивное распределение для двух групп содержания рДНК в составе вкДНК плазмы крови. Распределения различаются ($\alpha < 0,001$);

В — кумулятивное распределение для двух групп концентрации рДНК в плазме крови. Распределения различаются ($\alpha < 0,005$).

Черная линия — группа 1 (некурящие), серая — группа 2 (курящие).

ляется биологически активной и может влиять на функциональную активность генома в различных типах клеток организма человека, таких, как клетки эндотелия [4], лимфоциты [15], стволовые клетки [13], кардиомиоциты [7] и нейроны [11]. В высоких концентрациях рДНК может индуцировать в клетках крови активацию фактора NF- κ B, что приводит к повышению уровня провоспалительных цитокинов и может способствовать поддержанию хронического воспаления неинфекционной природы [15]. В эндотелиальных клетках внеклеточная окисленная рДНК может блокировать активность эндотелиальной NO-синтазы, отвечающей за синтез NO [4]. В мезенхимных стволовых клетках рДНК индуцирует адипогенез, что может приводить к развитию ожирения и остеопорозу [13]. При действии на культивируемые кардиомиоциты крысы рДНК снижает частоту сокращений клеток [7], а в нейронах крысы стимулирует синтез большого количества АФК [11].

Таким образом, определение количества рДНК в составе вкДНК плазмы крови с использованием описанной технологии можно рекомендовать в качестве стандартного анализа, позволяющего оценить наличие скрытой хронической патологии, которая приводит к повышению уровня гибели клеток в организме. Патология может быть вызвана внешним воздействием (курение, наркомания, облучение, вредное производство и т.д.).

Список литературы

1. Вейко Н.Н., Булычева Н.В., Рогинко О.А., Вейко Р.В., Ершова Е.С., Коздоба О.А., Кузьмин В.А., Виноградов А.М., Юдин А.А., Сперанский А.И. Фрагменты транскрибируемой области рибосомного повтора в составе внеклеточной ДНК — маркер гибели клеток организма // Биомедицинская химия. — 2008. — Т. 54, № 1. — С. 78—93.
2. Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г., Нурбаев С.Д., Косякова Н.В., Шубаева Н.О., Ляпунова Н.А. Количественное определение повторяющихся последовательностей в геномной ДНК человека. Обнаружение увеличенного количества рибосомных повторов в геномах больных шизофренией (результаты молекулярного и цитогенетического анализов) // Молекулярная биология. — 2003. — Т. 37, № 3. — С. 409—419.
3. Вейко Н.Н., Шубаева Н.О., Иванова С.М., Сперанский А.И., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М. ДНК сыворотки крови больных ревматоидным артритом значительно обогащена фрагментами рибосомных повторов, содержащих иммуностимулирующие CpG-мотивы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2006. — № 9. — С. 282—285.
4. Ефремова Л.В., Алексеева А.Ю., Конькова М.С., Костюк С.В., Ершова Е.С., Смирнова Т.Д., Конорова И.Л., Вейко Н.Н. Внеклеточная ДНК влияет на количество NO в эндотелиальных клетках человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — Т. 149, № 2. — С. 196—200.
5. Костюк С.В., Ершова Е.С., Вейко Н.Н. Хроническое действие ионизирующего излучения вызывает значительное сниже-

ние концентрации циркулирующей ДНК плазмы крови // Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, № 11 (137). — С. 29—35.

6. Малиновская Е.М., Смирнова Т.Д., Еголина Н.А., Цветкова Т.Г., Косякова Н.В., Мандрон И.А., Мхитарова Е.В., Костюк С.В., Терехов С.М., Местергази Г.М., Вейко Н.Н., Ляпунова Н.А. Изменение комплекса рибосомных генов человека при старении // Медицинская генетика. — 2008. — Т. 7, № 2. — С. 10—16.

7. Bulicheva N., Fidelina O., Mkrtumova N., Neverova M., Bogush A., Bogush M., Roginko O., Veiko N. Effect of cell-free DNA of patients with cardiomyopathy and rDNA on the frequency of contraction of electrically paced neonatal rat ventricular myocytes in culture // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2008. — Vol. 1137. — P. 273—277.

8. Carnevale R., Sciarretta S., Violi F., Nocella C., Loffredo L., Perri L., Peruzzi M., Marullo A.G., De Falco E., Chimenti I., Valentini V., Biondi-Zoccai G., Frati G. Acute impact of tobacco versus electronic cigarette smoking on oxidative stress and vascular function // Chest. — 2016. — Vol. S0012-3692, № 16. — P. 48562—4.

9. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells // Oxid. Med. Cell Longev. — 2013. — P. 649747.

10. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey // Biochim. Biophys. Acta. — 2007. — Vol. 1775, № 1. — P. 181—232.

11. Glebova K.V., Konorova I.L., Marakhonov A.V., Barskov I.V., Khaspekov L.G., Veiko N.N. Oxidative modification of ecDNA alter its biological action on rat neurons // Journal of Nucleic Acids Investigation. — 2011. — Vol. 2, № 1. — P. 28.

12. Kawanishi S., Hiraku Y., Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging // Mutat. Res. — 2001. — Vol. 488, № 1. — P. 65—76.

13. Kostyuk S., Smirnova T., Kameneva L., Porokhovnik L., Speranskij A., Ershova E., Stukalov S., Izevskaya V., Veiko N. GC-Rich Extracellular DNA Induces Oxidative Stress, Double-Strand DNA Breaks, and DNA Damage Response in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells // Oxid. Med. Cell Longev. — 2015. — Vol. 2015, Article ID 782123, 15 pages.

14. Ploskonosova I.I., Baranov V.I., Gaziev A.I. PCR assay of DNA damage and repair at the gene level in brain and spleen of gamma-irradiated young and old rats // Mutat. Res. — 1999. — Vol. 434, № 2. — P. 109—127.

15. Speranskij A.I., Kostyuk S.V., Kalashnikova E.A., Veiko N.N. Enrichment of extracellular DNA from the cultivation medium of human peripheral blood mononuclears with Genomic CpG rich fragments results in increased cell production of IL-6 and TNF α via activation of the NF- κ B signaling pathway // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry. — 2015. — Vol. 9, № 2. — P. 174—184.

16. Suter M., Richter C. Fragmented mitochondrial DNA is the predominant marker of oxidized DNA bases // Biochemistry. — 1999. — Vol. 38, № 1. — P. 459—464.

17. Zafiroopoulos A., Tsenteliero E., Linardakis M., Kafatos A., Spandidos D.A. Preferential loss of 5S and 28S rDNA genes in human adipose tissue during ageing // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2005. — Vol. 37, № 2. — P. 409—415.

18. Zhang F., Gu W., Hurler M.E., Lupski J.R. Copy number variation in human health, disease, and evolution // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. — 2009. — Vol. 10. — P. 451—481.

The method for analysis of the copy number variations of GC-rich repeat of human genome in damaged DNA.

Detection of increasing copy number of ribosomal genes in extracellular DNA circulating in blood plasma of smokers` humans

**Chestkov I.V., Veiko N.N., Ershova L.S., Sergeeva V.A.,
Veiko R.V., Izhevskaya V.L., Kostuyk S.V.**

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» (FSBI «RCMG»),
Moskvorechie 1, Moscow, 115478, Russia, e-mail: ichestkov@yandex.ru

Detection of copy number variations of GC-rich repeated sequences in the structure of damaged DNA by PCR method results in significant understatement of their quantity in genome. We have described the method for analysis of the copy number variations of GC-rich repeat of human genome (mitochondrial, ribosomal and telomeric repeat) in damaged DNA. Comparing to others, these sequences of genome are mostly damaged in extracellular DNA, in DNA of the old cells, in long-stored DNA-samples and in oxidized DNA. The technology is based on the method of non-radioactive quantified dot hybridization with biotin-labeled DNA-probes and on the software designed specially to calculate the copy number of ribosomal genes (genes for rRNA) in extracellular DNA circulating in blood plasma of smokers' and non-smokers' humans. We have shown that fragments of GC-rich ribosomal repeat accumulate in extracellular DNA of chronically smoking people, which can be a sign of the intensification of necrotic processes in cells and of the chronic pathology development.

Keywords: ribosomal repeat, copy number variation, extracellular DNA, non-radioactive hybridization