

На правах рукописи

Кулигина Елена Владимировна

Нуклеиновые кислоты человеческого молока.

Структура и возможные функции.

03.00.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2005



Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

Научный руководитель: к.б.н. Владимир Александрович Рихтер

Официальные оппоненты: д.х.н., профессор Галина Георгиевна Карпова
д.б.н. Николай Борисович Рубцов

Ведущая организация: Институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского (МГУ)

Защита состоится « 2 » ноября 2005 г. в 10⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01
при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, г. Новосибирск 90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « 28 » сентября 2005 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
д.х.н.



Фёдорова О. С.

2006-4
14831

2178449

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время нуклеиновые кислоты (НК) и их синтетические аналоги получают все большее распространение в научной и медицинской практике не только как инструменты исследования, но и как потенциальные лекарственные средства. Именно поэтому усилия многих научных лабораторий сегодня сосредоточены на изучении способов проникновения нуклеиновых кислот и их производных внутрь клетки, их взаимодействия с биологическими макромолекулами и влияния на физиологические процессы.

В то же время, в последние годы во внеклеточных жидкостях организма млекопитающих были обнаружены собственные соединения нуклеотидной природы, в том числе высокополимерные фрагменты нуклеиновых кислот. Было показано, что некоторые из них играют важную роль в регуляции механизмов функционирования клеток и организма в целом. Эти соединения являются не только необходимыми метаболитами, но выступают как биоактивные вещества, участвующие в регуляции многих процессов. Известно, например, что нуклеотиды и нуклеозиды молока обладают иммуномодулирующим действием, стимулируя выработку антител, способствуют адсорбции металлов в кишечнике и влияют на синтез полиненасыщенных жирных кислот на ранних стадиях развития новорожденных.

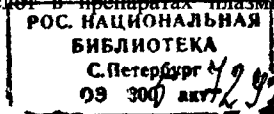
Кроме того, к настоящему моменту накоплены многочисленные данные о повышении концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в организме при онкологических заболеваниях и при аутоиммунных и пульмонологических расстройствах.

Тем не менее, вопросы о механизмах появления, составе и возможных функциях собственных внеклеточных нуклеиновых кислот здорового организма во многом остаются открытыми.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы являлось выделение и характеристика внеклеточных нуклеиновых кислот молока человека, а также исследование их возможных биологических функций.

В ходе исследования решались следующие задачи:

- выделение внеклеточных нуклеиновых кислот плазмы молока человека и сравнение их с наборами внеклеточных нуклеиновых кислот других жидкостей организма;
- определение концентрации нуклеиновых кислот в препаратах плазмы молока человека;



- определение нуклеотидной последовательности внеклеточных нуклеиновых кислот плазмы человеческого молока;
- анализ влияния внеклеточных РНК молока человека на физиологические процессы, происходящие в молоке и культуре клеток молочной железы.

Научная новизна и практическая ценность работы. Работа представляет собой первое систематическое исследование внеклеточных нуклеиновых кислот молока человека. Впервые проведено выделение набора нуклеиновых кислот молока и их сравнение с наборами внеклеточных нуклеиновых кислот спинномозговой жидкости и плазмы крови. Установлено, что основной формой нуклеиновых кислот плазмы человеческого молока являются фрагменты РНК длиной до 100 нуклеотидных звеньев, обладающие развитой вторичной структурой. Показано, что концентрация нуклеиновых кислот в плазме молока варьирует в интервале от 16 до 58 мкг/мл и является индивидуальной характеристикой донора. Впервые определены нуклеотидные последовательности ряда олигорибонуклеотидов плазмы человеческого молока и показано, что эти олигорибонуклеотиды являются фрагментами рибосомных и транспортных РНК. Установлено, что олигорибонуклеотиды человеческого молока участвуют в процессах фосфорилирования/дефосфорилирования белков молока. Показано, что препараты суммарной РНК человеческого молока оказывают цитопротективное действие на клетки MCF-7 в условиях холодового шока, которое проявляется при низкой плотности клеток. Цитопротективными свойствами обладают фрагменты РНК длиной не менее 30 нуклеотидов.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Результаты работы были представлены на международных конференциях "RNA as therapeutic and genomic target" (Новосибирск, 2001), "Chemical and Biological Problems of Proteomics" (Новосибирск, 2004), "Chemical Biology" (Новосибирск, 2005) и 5-ой международной конференции им. Я. Парнаса "Molecular Mechanisms of Cellular Signaling" (Киев, Украина, 2005).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 128 страницах, содержит 23 рисунка. Библиография включает 237 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Нуклеиновые кислоты плазмы молока человека

Для выделения нуклеиновых кислот (НК) использовали молоко, предоставленное донорами в различные периоды лактации. Для выявления свободных (не связанных с белками молока) олигонуклеотидов (ОН) проводили прямое фосфорилирование нуклеиновых кислот в препаратах молочной плазмы (клетки молока удаляли центрифугированием) в присутствии полинуклеотидкиназы

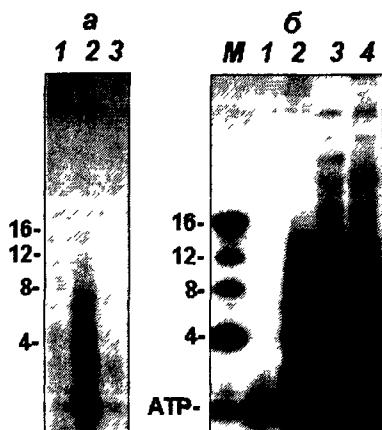


Рис. 1. Электрофоретический анализ $[^{32}\text{P}]$ -меченых нуклеиновых кислот (НК) плазмы молока человека. **а.** 1 - плазма молока + $[^{32}\text{P}]$ -АТР; 2 - плазма молока + $[^{32}\text{P}]$ -АТР + ПНК Т4; 3 - $[^{32}\text{P}]$ -АТР + ПНК Т4. Слева от панели указаны положения в геле олигодезоксирибонуклеотидов длиной 4, 8, 12, 16 нт. **б.** 1 - $[^{32}\text{P}]$ АТР + ПНК Т4; 2 - НК плазмы молока + РНКазы А; 3 - НК плазмы молока + ДНКазы I, 4 - НК плазмы молока (контроль). М - набор $[^{32}\text{P}]$ -меченых олигодезоксирибонуклеотидов известной длины. Радиоавтографы 20%-ных ПААГ.

фага Т4 (ПНК Т4) и $[^{32}\text{P}]$ -АТР. В результате проведенных экспериментов в молоке человека обнаружили набор коротких олигонуклеотидов, которые, вероятно, находятся в свободном состоянии, так как доступны для прямого кинирования ПНК Т4. (рис. 1, а).

Для выявления полного набора нуклеиновых кислот плазмы молока использовали два подхода.

Первый подход включал протеолиз белков молока протеиназой К и отделение нуклеиновых кислот от продуктов протеолиза ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-сорбенте. Данный метод позволил выделить из молока человека олигонуклеотиды длиной до 60 нуклеотидов (нт) (рис. 1, б, дорожка 4).

Второй подход включал экстракцию и осаждение белков молока с помощью системы органических растворителей (хлороформ : изоамиловый спирт). Экстракцию проводили в присутствии детергентов и высокой концентрации соли. С помощью

этого подхода из плазмы молока были выделены как короткие олигонуклеотиды (менее 15 нт) (рис. 2, а), так и набор полимерных (более 100 нт) нуклеиновых кислот (рис. 2, б).

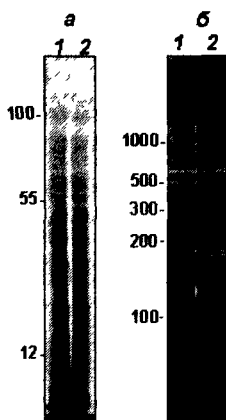


Рис. 2. Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот (НК) плазмы молока человека в денатурирующем ПААГ.

а. 1, 2 - препараты [^{32}P]-меченых НК из образцов плазмы молока двух различных доноров. Радиоавтограф 12%-ного ПААГ. **б.** 1, 2 - НК, выделенные из плазмы молока двух доноров 7%-ный ПААГ. Окрашивание бромистым этидием. Слева от панелей указаны положения в геле ДНК-олигомеров известной длины.

Необходимо отметить, что молоко - это внеклеточная жидкость организма млекопитающих, которая образуется лишь в периоды лактации. В связи с этим представлялось интересным сравнить наборы нуклеиновых кислот различных внеклеточных жидкостей млекопитающих - спинномозговой жидкости, сыворотки и плазмы крови.

2. Олигонуклеотиды сыворотки крови

Методом фенол-хлороформной экстракции мы выделили из сыворотки крови олигонуклеотиды длиной до 20-ти нуклеотидов (рис. 3, дорожка 1).

Оказалось, что олигонуклеотиды присутствуют как в альбуминовой, так и в глобулиновой фракциях сыворотки (рис. 3, дорожки 2, 3). При этом нуклеиновые кислоты альбуминовой фракции (рис. 3, дорожка 2) представлены более протяженными олигонуклеотидами, чем нуклеиновые кислоты, ассоциированные с белками глобулиновой фракции (рис. 3, дорожка 3).

При выделении олигонуклеотидов из сыворотки крови мы использовали стадию диализа, при которой происходит существенное обеднение диализуемого препарата по низкомолекулярным соединениям, в том числе по коротким

олигонуклеотидам, не связанным с белками. При этом концентрация

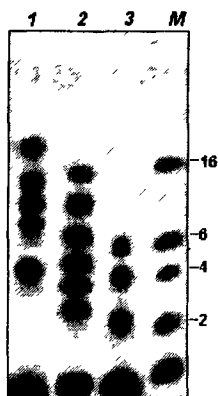


Рис. 3. Электрофоретический анализ [^{32}P]-меченых олигонуклеотидов сыворотки крови человека. 1 - олигонуклеотиды сыворотки крови; 2 - олигонуклеотиды альбуминовой фракции сыворотки; 3 - олигонуклеотиды глобулиновой фракции сыворотки. М - набор [^{32}P]-меченых олигодезоксирибонуклеотидов известной длины (длины указаны справа от панели). Радиоавтограф 20%-ного ПААГ.

олигонуклеотидов, прочно связанных с белками, изменяется несущественно.

Полученные данные позволяют предположить, что с белками сыворотки крови человека достаточно прочные комплексы образуют короткие олигонуклеотиды сыворотки (рис. 3, дорожки 2, 3). Эти данные дополнительно подтверждаются тем, что коммерческий препарат человеческого сывороточного альбумина содержит набор олигонуклеотидов близких по длине олигонуклеотидам альбуминовой фракции сыворотки крови (данные не представлены).

Сравнение наборов нуклеиновых кислот плазмы крови и плазмы молока человека, выделенных с помощью системы органических растворителей (хлороформ :

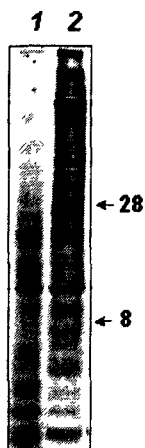


Рис. 4. Электрофоретическое разделение [^{32}P]-меченых нуклеиновых кислот (НК) плазмы крови и плазмы молока человека. 1 - НК плазмы крови; 2 - НК плазмы молока. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ. Справа от панели указаны положения в геле олигодезоксирибонуклеотидов длиной 8 и 28 нт.

изоамиловый спирт), показало, что в молоке относительное содержание фрагментов НК, протяженность которых превышает 28 нт, выше чем в крови (рис. 4).

3. Олигонуклеотиды спинномозговой жидкости

Спинномозговую жидкость (СМЖ) брали путем поясничной пункции у людей, перенесших спинномозговые и черепномозговые травмы (Окружной военный госпиталь №333, г. Новосибирск). Клетки СМЖ удаляли центрифугированием. Образцы СМЖ обрабатывали протеиназой К, и нуклеиновые кислоты отделяли от продуктов протеолиза ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-сорбенте. Полученный из СМЖ нуклеотидный материал метили ^{32}P с помощью ПНК Т4 и $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и разделяли электрофорезом в ПААГ. В результате нам удалось выделить из СМЖ фрагменты нуклеиновых кислот длиной до 45 нт (рис. 5) При этом оказалось, что спектры олигонуклеотидов, выделенных из СМЖ людей, перенесших спинномозговые и черепномозговые травмы, сходны между собой (рис. 5, дорожки 2, 3) и в то же время отличаются от набора олигонуклеотидов, выделенных из плазмы молока человека (рис. 5, дорожка 4).

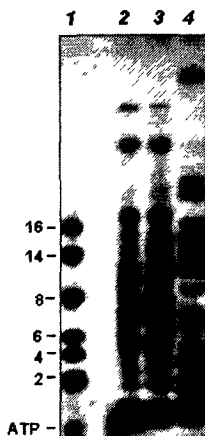


Рис. 5. Электрофоретическое разделение ^{32}P -меченых олигонуклеотидов из СМЖ людей, перенесших черепномозговые и спинномозговые травмы. 1 - набор ^{32}P -меченых олигонуклеотидов известной длины (длины указаны слева от панели); 2 - олигонуклеотиды, выделенные из СМЖ людей, перенесших черепномозговые травмы; 3 - олигонуклеотиды, выделенные из СМЖ людей, перенесших спинномозговые травмы; 4 - олигонуклеотиды плазмы молока человека. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ.

Таким образом, нам удалось показать, что все исследованные внеклеточные жидкости (молоко, СМЖ, плазма крови) содержат нуклеиновые кислоты. Наборы нуклеиновых кислот разных внеклеточных жидкостей значительно отличаются. Это свидетельствует о разных механизмах попадания фрагментов НК во внеклеточные

жидкости или о существенных различиях в глубине и специфичности постсекреторной деградации этих нуклеиновых кислот.

Дальнейшие исследования структуры и функций внеклеточных нуклеиновых кислот проводили на примере нуклеиновых кислот плазмы молока. Молоко является гораздо более доступным биологическим материалом, чем СМЖ, и менее изученным, чем сыворотка и плазма крови.

4. Определение состава нуклеиновых кислот человеческого молока

Для определения природы углеводных остатков нуклеиновых кислот человеческого молока мы использовали несколько различных подходов:

а) Разделение нуклеиновых кислот молока хроматографией на гидроксиапатите (ГАП). Известно, что различные формы нуклеиновых кислот удастся эффективно разделить сорбционной хроматографией на ГАПе. Как видно из данных рис. 6, времена элюции основного пула нуклеиновых кислот молочной плазмы с сорбента соответствуют временам выхода коротких фрагментов РНК. Оценка оптической плотности элюента при временах элюции ДНК позволяет говорить о том, что содержание ДНК в препаратах нуклеиновых кислот молока не превышает 0.5%. Эти данные указывают на то, что основной пул нуклеотидного материала молока представлен олигорибонуклеотидами.

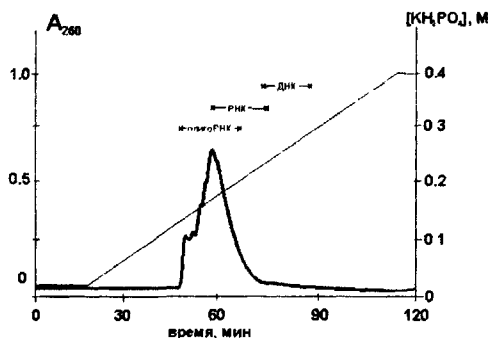


Рис. 6. Разделение нуклеиновых кислот плазмы молока человека сорбционной хроматографией на ГАПе. Стрелками указаны времена выхода контрольных препаратов ДНК спермы лосося (ДНК), высокополимерных РНК дрожжей (РНК) и полимерных продуктов гидролиза РНК дрожжей РНКазой А (олиго РНК).

б) Гидролиз фосфодиэфирных связей олигонуклеотидов молока ферментами и основаниями. Для установления структуры сахарофосфатного остова (D-рибоза/2-дезоксид-рибоза) препараты нуклеиновых кислот плазмы молока человека подвергали обработке гидролизующими ферментами (ДНКазой I, РНКазой А) и щелочному гидролизу. Результаты представлены на рис. 7. Видно, что суммарный

набор олигонуклеотидов молока практически не меняется под действием ДНКазы I (рис. 7, дорожка 2). В присутствии РНКазы А происходит частичный гидролиз олигонуклеотидов (рис. 7, дорожка 3), а под действием щелочи - деградация НК до нуклеозидмонофосфатов и коротких олигонуклеотидов (рис. 7, дорожка 4). Таким образом, анализ устойчивости фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот человеческого молока к действию гидролитических ферментов и оснований также

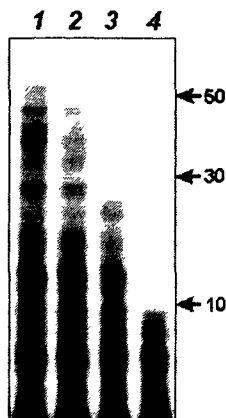


Рис. 7. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза фосфодиэфирных связей [^{32}P]-меченых нуклеиновых кислот (НК) плазмы молока человека ДНКазой I (2), РНКазой А (3) и 60 мМ КОН при 90°C (4). 1 - набор [^{32}P]-меченых НК плазмы молока (контроль). Радиоавтограф 20%-ного денатурирующего ПААГ. Справа от панели указаны положения в геле ДНК-олигомеров известной длины.

показал, что суммарный пул олигонуклеотидов молока представлен в основном рибонуклеиновыми кислотами.

5. Количественная оценка содержания РНК в плазме человеческого молока

Концентрация суммарных РНК в использованных в данном исследовании препаратах плазмы молока человека изменялась от 16 до 58 мкг/мл. Концентрация РНК варьировала от донора к донору и у индивидуального донора в течение периода лактации.

На примере набора препаратов молока донора, период лактации которого нам удалось проследить, начиная со 2-ой недели, видно, что кривая зависимости концентрации РНК от времени лактации имеют куполообразный вид с максимумом на 5-ой неделе (приблизительно в середине лактации) (рис. 8). С увеличением времени лактации концентрация РНК в молоке снижается. Сравнение полученных результатов с данными литературы позволяет утверждать, что концентрация РНК в молоке человека значительно выше, чем в плазме крови.

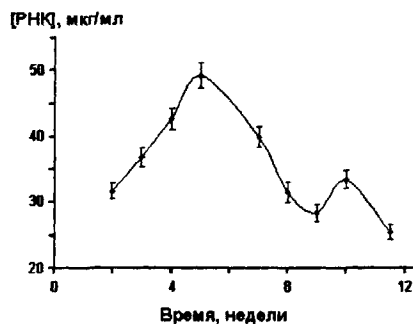


Рис. 8. Изменение концентрации РНК в препаратах плазмы молока одного донора с течением лактации.

Сравнительный анализ РНК из различных препаратов плазмы человеческого молока показал, что в молоке разных доноров присутствуют сходные наборы олигорибонуклеотидов (рис. 9, дорожки D3, D4, D5). С другой стороны, можно наблюдать изменение содержания разных форм РНК в молоке одного донора в течение лактации (рис. 9, дорожки D1/15, D1/24, D1/28). Эти данные позволяют предположить, что в молоко секретируется консервативный набор форм РНК, который в дальнейшем подвергается деградации нуклеазами на различную глубину.

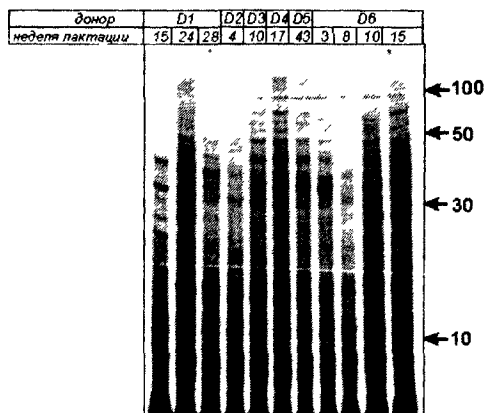


Рис. 9. Электрофоретическое разделение $[5'-^{32}\text{P}]$ -меченых нуклеиновых кислот из препаратов плазмы молока шести доноров (D1-D6). Радиоавтограф 20%-ного денатурирующего ПААГ. Справа от панели указаны положения в геле ДНК-олигомеров известной длины (10, 30, 50 и 100 нт).

Вместе с тем необходимо отметить сохранность протяженных олигорибонуклеотидов в плазме молока в окружении внеклеточных нуклеаз. Повышенная устойчивость РНК во внеклеточном пространстве может быть объяснена образованием комплексов с белками, защищающими РНК от гидролиза

секреторными РНКазами, а также наличием у олигорибонуклеотидов молока развитой вторичной структуры.

6. Анализ РНК человеческого молока двумерным электрофорезом в ПААГ

Использование двумерного электрофореза (ЭФ) для анализа олигорибонуклеотидов из набора нуклеиновых кислот молока позволяет не только выявить наличие вторичной структуры в этих олигонуклеотидах, но и разделить протяженные олигомеры, обладающие близкой подвижностью при одномерном электрофорезе.

Разделение РНК молока двумерным электрофорезом (в нативных условиях в одном направлении, и, затем, в денатурирующих условиях - в другом) показало, что электрофоретическая подвижность $[5'-^{32}\text{P}]$ -меченых олигорибонуклеотидов молока существенно меняется после их обработки 7 М мочевиной.

Из рис. 10 видно, что при ЭФ в денатурирующих условиях часть олигонуклеотидов (например ON7) мигрирует с большей подвижностью, чем в нативных условиях. Это указывает на наличие в олигорибонуклеотидах молока двуцепочечных структур, которые разрушаются в присутствии 7 М мочевины. Подвижность других олигонуклеотидов (например ON6, рис. 10) практически не изменяется при денатурации. В совокупности эти данные указывают на то, что протяженные олигорибонуклеотиды молока обладают развитой вторичной структурой.

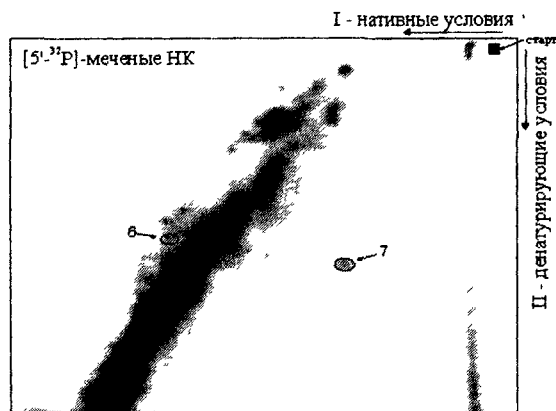


Рис. 10. Разделение $[5'-^{32}\text{P}]$ -меченых нуклеиновых кислот плазмы человеческого молока двумерным электрофорезом. I - ЭФ в 10%-ном нативном ПААГ в первом направлении, II - ЭФ в 25%-ном денатурирующем ПААГ во втором направлении Радиоавтограф геля. Цифрами 6, 7 обозначены дискретные области, соответствующие олигорибонуклеотидам ON6 и ON7.

7. Выделение индивидуальных олигорибонуклеотидов плазмы человеческого молока и установление их первичной структуры

При определении нуклеотидной последовательности некоторых 5'-меченых олигорибонуклеотидов молока человека с помощью ограниченного гидролиза РНКазами T1, U2, PhyM, B.c. и A мы установили, что олигонуклеотиды молока представлены гетероолигорибонуклеотидами. Последовательность олигонуклеотида ON6 (см. рис. 10) 5' - AGAGGUGAAAUUUC - 3' (рис. 11) соответствует фрагменту 955 - 968 18S рибосомной РНК человека. Что касается олигонуклеотида ON7 (см. рис. 10), то, учитывая высокую степень гомологии его нуклеотидной последовательности 5' - ACUCYCGACYCYN - 3' (где N - неустановленные нуклеотидные остатки и Y - неустановленные остатки пиримидинового типа) (данные не представлены) с

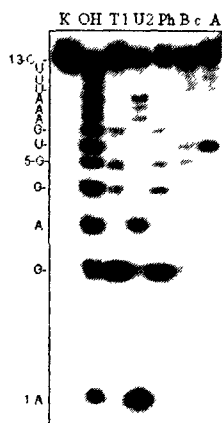


Рис. 11. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза $[5'-^{32}\text{P}]$ -меченого олигорибонуклеотида ON6 (рис.10) набором РНКаз: T1 (дорожка T1), U2 (U2), Phy M (Ph), B c (B.c.) и A (A). OH - статистический гидролиз ON6 60 mM KOH K - исходный ON6. Радиоавтограф 25%-ного денатурирующего ПААГ.

последовательностью фрагмента 492 - 505 18S рибосомной РНК человека, можно предположить, что предшественником ON7 также являлась 18S рРНК.

Поскольку в пуле РНК молока фосфорилированию ПНК подвергался достаточно обширный набор олигонуклеотидов, выделение индивидуальных 5'-меченых форм РНК с чистотой, необходимой для определения их первичной структуры, являлось трудной задачей.

Полагая, что РНК молока подвергались постсекреторному процессингу РНКазой А, можно заключить, что большая часть набора олигорибонуклеотидов представлена 3'-фосфорилированными фрагментами, которые не являются субстратами РНК-лигазы фага Т4. Поэтому для получения ограниченного набора

меченых РНК из общего пула РНК молока (т.е. для выявления олигорибонуклеотидов со свободной 3'-ОН группой) мы использовали метод 3'-концевого мечения РНК с помощью РНК лигазы T4.

РНК молока содержит более узкий набор субстратов РНК-лигазы, чем полинуклеотидкиназы, и продукты 3'-концевого мечения РНК эффективно разделяются двумерным электрофорезом в ПААГ и образуют дискретные области, соответствующие индивидуальным олигорибонуклеотидам (рис. 12).

Последовательности индивидуальных форм РНК - олигорибонуклеотидов ON1 - ON5 (рис. 12) также определяли с помощью ограниченного гидролиза набором РНКаз.

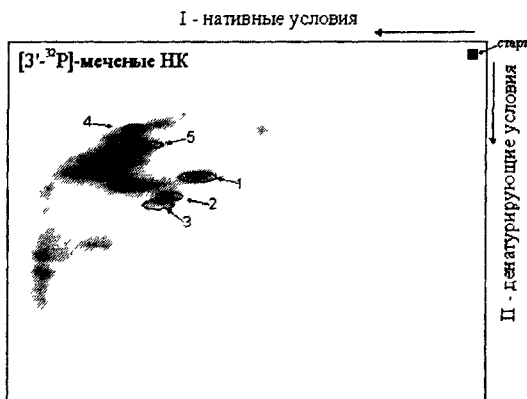


Рис. 12. Разделение $[3^{32}\text{P}]$ -меченых нуклеиновых кислот плазмы человеческого молока двумерным электрофорезом. I - ЭФ в 10%-ном нативном ПААГ в первом направлении, II - ЭФ в 25%-ном денатурирующем ПААГ во втором направлении. Цифрами 1 - 5 обозначены дискретные области, соответствующие олигорибонуклеотидам ON1 - ON5.

7.1. Первичная структура олигорибонуклеотидов ON1 - ON3

На рис. 13 представлены результаты ограниченного гидролиза олигорибонуклеотида ON1 (рис. 12) набором специфических РНКаз. Аналогичные результаты для олигорибонуклеотидов ON2 и ON3 (рис. 12) не приведены. Нуклеотидные последовательности ON1 - ON3 где N - неидентифицированные нуклеозидные остатки, представлены ниже:

ON1 - 5' - NNUCCCCGGGGCUACGCCUGUCUGAGCGUCGCUU - 3' ,

ON2 - 5' - NNGGGGCUACGCCUGUCUGAGCGUCGCUU - 3' ,

ON3 - 5' - NGGGGCUACGCCUGUCUGAGCGUCGCUU - 3' .

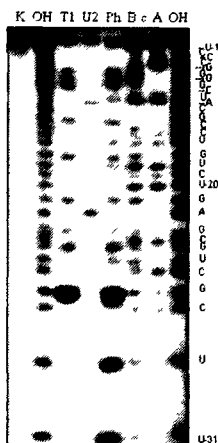


Рис. 13. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза $[3',^{32}\text{P}]$ -меченого олигорибонуклеотида ON1 (рис.12) набором РНКаз: T1 (дорожка T1), U2 (U2), Ph M (Ph), Bc (B.c.) и A (A).

OH - статистический гидролиз ON1 60 мМ КОН. K - исходный олигорибонуклеотид ON1. Радиоавтограф 25%-ного денатурирующего ПААГ.

Видно, что эти олигонуклеотиды могут являться продуктами гидролиза одного РНК-предшественника. Последовательность ON1 соответствует последовательности фрагмента 129 - 159 3'-концевой области 5.8S рибосомной РНК человека. Эта область 5.8S рРНК не содержит модифицированных оснований, которые могли бы затруднить сопоставление определенной нами нуклеотидной последовательности ON1 с последовательностью рРНК. Поэтому можно утверждать, что олигорибонуклеотиды ON1 - ON3 (рис. 12) являются продуктами расщепления 5.8S рибосомной РНК человека.

Известно, что 5.8S рРНК животных образует прочную двуцепочечную структуру с 5'-концевым доменом 28S рРНК (остатки 2 - 20). Нуклеотидные остатки фрагмента 126 - 129 5.8S рРНК представлены олигопиримидиновой последовательностью, не участвующей в образовании комплементарных пар. Именно в этой области произошло расщепление 5.8S рРНК с образованием наблюдаемых в молоке олигорибонуклеотидов ON1 - ON3. Определенная стабильность этих олигонуклеотидов в окружении нуклеаз молока указывает на возможное наличие в человеческом молоке протяженных продуктов деградации 28S рРНК, по крайней мере, фрагмента 2 - 20, комплементарного ON1 - ON3.

7.2. Первичная структура олигорибонуклеотида ON4

Установленная нами нуклеотидная последовательность 3'-концевой части олигорибонуклеотида ON4 5'-CGGUUCGAAACCGGGCGGAAACA-3' совпадает с 3'-

концевой областью валиновых тРНК человека, а именно, областью акцепторного стебля и псевдоуридиновой петли (рис. 14).

Известно, что зрелая форма тРНК^{Вал} содержит остаток псевдоуридина в положении, соответствующем U4 в ON4 и остаток 1-метиладенина в положении,

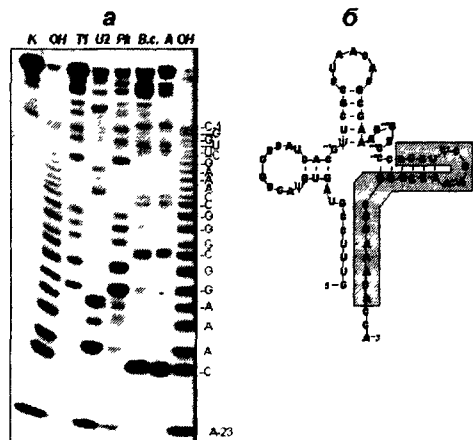


Рис. 14. а. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза $[3'-^{32}\text{P}]$ -меченого олигорибонуклеотида ON4 (рис.12) набором РНКаз: T1 (дорожка TT), U2 (U2), Phу M (Ph), В.с. (В.с.) и А (А) OH - статистический гидролиз ON4 60 мМ КОН. К - исходный ON4. Радиоавтограф 25%-ного денатурирующего ПААГ.
б. Вторичная структура валиновой тРНК человека. Выделенная область соответствует олигорибонуклеотиду ON4 человеческого молока.

идентифицированном нами как А8 в ON4. Картины расщепления фосфодиэфирных связей, образованных 3'-гидрооксильными группами нуклеотидов U4 и А8 (рис. 14, а) не позволяют однозначно сделать вывод о присутствии в этих положениях канонических А и U, либо модифицированных ^{1m}А и ψ. Вместе с тем известно, что ^{1m}А и ψ, так же как и другие минорные компоненты РНК, присутствуют в гидролизатах суммарных нуклеиновых кислот молока, поэтому оправданным является предположение о том, что олигонуклеотид ON4 является продуктом гидролиза полностью процессированной тРНК^{Вал}.

Известно также, что полностью процессированные тРНК имеют ССА-акцепторную последовательность на 3'-конце. В 3'-концевой части олигонуклеотида ON4 эта последовательность отсутствует.

Так как ON4 является субстратом РНК-лигазы фага T4, то, соответственно, этот олигонуклеотид имеет свободную 3'-ОН группу. Наличие свободного 3'-гидроксила у этого олигорибонуклеотида исключает возможность его образования из тРНК^{Вал} благодаря действию одной только РНКазы А. Такой олигонуклеотид мог образоваться в результате секреции в молоко не полностью процессированной

валиновой тРНК, либо при деградации зрелой тРНК^{Вал} во внеклеточном пространстве 3'-экзонуклеазой.

Как и в случае олигонуклеотидов ON1 - ON3, стабильность ON4 в окружении нуклеаз молока может быть обусловлена образованием дуплекса с другим олигонуклеотидом молока. Наиболее вероятным партнером ON4 является 5'-концевая часть акцепторного стебля тРНК^{Вал}, либо более протяженный фрагмент этой тРНК (рис. 14).

7.3. Первичная структура олигорибонуклеотида ON5

5'-концевая область 5'-UUCGAUUCGGCUCGANGGACC-3' в составе олигонуклеотида ON5 совпадает с 3'-концевой последовательностью тирозиновой тРНК человека (псевдоуридиновая петля, акцепторный стебель, включая СС-фрагмент ССА-акцептора) (рис. 15). Последовательность 5'-CUUAG-3' отсутствует в составе зрелой тРНК и не встречается в про-тРНК^{Тир}.

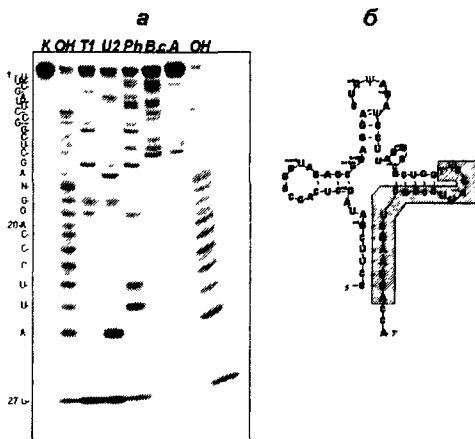


Рис. 15. а. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза [$3',^{32}\text{P}$]-меченого олигорибонуклеотида ON5 (рис.12) набором РНКаз: T1 (дорожка *TI*), U2 (*U2*), Phy M (*Ph*), Bc (*B.c.*) и A (*A*) *OH* - статистический гидролиз ON5 60 mM KOH. *K* - исходный ON5. Радиоавтограф 25%-ного денатурирующего ПААГ. **б.** Вторичная структура тирозиновой тРНК человека. Выделенная область соответствует олигонуклеотиду ON5 человеческого молока.

Образование олигорибонуклеотида ON5, возможно, является результатом использования исчерпывающих условий 3'-концевого мечения РНК. Можно предположить, что ON5 является продуктом лигирования 3'-концевой части тРНК^{Тир} (без (CC)А-акцепторной последовательности) с другим олигонуклеотидом 5'-(CC)CUUAG-3' из суммарного пула РНК человеческого молока. При этом остатки

C21 и C22 могли быть как 3'-концевыми в составе РНК-акцептора, так и 5'-концевыми в составе донора фосфата в реакции лигирования.

Последовательность 3'-концевой части ON5 5'-(C)CCUUAG-3' достаточно коротка, для того чтобы можно было достоверно установить природу ее РНК-предшественника. Среди основных клеточных РНК такая последовательность встречается в составе 18S рРНК (5'-CCCUUAG-3' 1501 - 1507), и, кроме того, в составе самой тРНК^{Тир} (40 - 45).

Таким образом, мы установили, что последовательности олигорибонуклеотидов плазмы молока человека соответствуют последовательностям основных РНК эукариотических клеток - 5.8S и 18S рРНК, тРНК^{Вал} и тРНК^{Тир}. При этом повышенная устойчивость РНК к действию РНКазы А *in vitro* и в молоке, по-видимому, детерминирована вторичной структурой РНК - формированием шпилек и дуплексов с другими олигонуклеотидами молока. Так, для 3'-концевых фрагментов 5.8S рРНК наиболее вероятным партнером в образовании двуцепочечной структуры является 5'-концевая часть 28S рРНК, а для 3'-фрагментов тРНК - 5'-концевые области тех же тРНК (рис. 14, рис. 15).

Отсутствие ССА-акцепторных последовательностей и наличие свободного 3'-гидроксила у фрагментов тРНК свидетельствуют об участии в постсекреторном процессинге клеточных РНК-предшественников не только РНКазы А, но и фермента с 3'-экзонуклеазной/фосфоэстеразной активностью. Ферменты с такой активностью присутствуют в плазме крови и на внешней мембране форменных элементов крови, на мембранах клеток эндотелия сосудов, а также на мембране эпителиоцитов.

8. Функции внеклеточных нуклеиновых кислот

Какова функция коротких фрагментов цитоплазматических РНК во внеклеточном пространстве?

К настоящему моменту РНК, рибонуклеозиды и рибонуклеотиды молока рассматриваются, в основном, как источники "частично незаменимых" метаболитов, необходимых для постнатального развития млекопитающих.

В настоящей работе мы попытались проанализировать влияние внеклеточных РНК молока человека на некоторые физиологические процессы, происходящие в молоке и в культуре клеток молочной железы.

8.1. Влияние внеклеточных нуклеиновых кислот человеческого молока на фосфорилирование белков молока

Мы обнаружили, что в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ в плазме человеческого молока происходит фосфорилирование белков с молекулярными массами 76, 38, 30 и 18 кДа (рис. 16, дорожка 1). Белок с молекулярной массой 30 кДа соответствует β -казеину. При исследовании влияния выделенных из молока человека олигонуклеотидов на фосфорилирование белков молока оказалось, что добавление к молоку олигонуклеотидов (рис. 16, дорожка 2) или гепарина (рис. 16, дорожка 3) приводило к ингибированию фосфорилирования белка р38 и существенному уменьшению включения ^{32}P в р18. Присутствие олигонуклеотидов и гепарина не влияло на фосфорилирование белка р76, хотя при этом наблюдалось некоторое снижение фосфорилирования β -казеина (рис. 16, дорожки 2, 3).

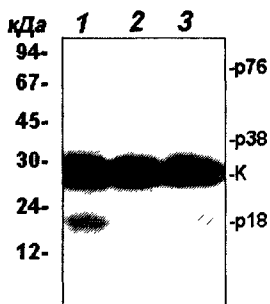


Рис. 16. Электрофоретическое разделение ^{32}P -меченых белков плазмы молока человека. 1 - белки плазмы молока; 2 - белки плазмы молока в присутствии олигонуклеотидов; 3 - белки плазмы молока в присутствии гепарина. Радиоавтограф 10%-ного ПААГ. Слева от панели указаны положения в геле белков с известными молекулярными массами. Справа от панели указаны положения в геле меченых белков.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что внеклеточные олигонуклеотиды молока могут влиять на физиологические процессы в молочной железе, участвуя в фосфорилировании/дефосфорилировании биологически активных белков и пептидов.

8.2. Влияние внеклеточных РНК молока на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7

При изучении влияния РНК на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в условиях оптимальных для культивирования этих клеток мы установили, что как РНК человеческого молока, так и используемая в качестве контроля суммарная РНК пекарских дрожжей, не оказывают существенного влияния на пролиферацию и жизнеспособность клеток.

Вместе с тем оказалось, что РНК обладает цитопротективным действием на MCF-7 в условиях холодового шока (инкубации 12 ч при 5°C). Из данных рис. 17 видно, что график зависимости МТТ индекса клеток MCF-7, подвергнутых холодовому шоку в присутствии экзогенной РНК, от концентрации РНК в среде

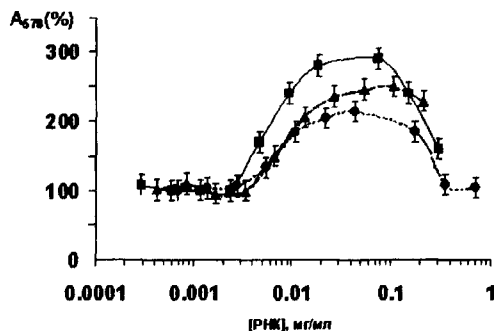


Рис. 17. График зависимости жизнеспособности клеток MCF-7 (МТТ - индекс) после холодового шока от концентрации в культуральной среде: □ - суммарной РНК дрожжей; π - продуктов гидролиза суммарной РНК дрожжей РНКазой А; ● - суммарной РНК плазмы молока человека.

имеет куполообразный вид с максимумом в диапазоне 25 – 100 мкг/мл. При этом РНК человеческого молока увеличивает жизнеспособность клеток в 2 раза, а суммарный пул РНК пекарских дрожжей - в 3 раза.

Протективные свойства РНК проявляются при низкой плотности клеток, в

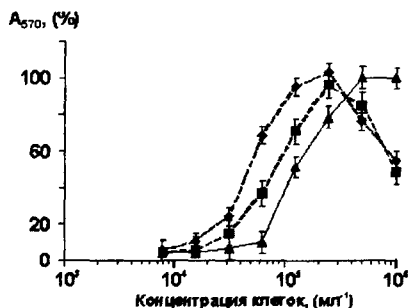


Рис. 18. График зависимости жизнеспособности клеток MCF-7 (МТТ - индекс) от начальной концентрации клеток в условиях холодового шока. Клетки предынкубированы в присутствии 100 мкг/мл (12 ч, 37°C): ◆ - суммарной РНК дрожжей; □ - суммарной РНК плазмы молока человека; π - без добавления РНК. (За 100 % принята оптическая плотность (A_{570}) МТТ-формаза, образовавшегося при инкубации с 10^6 клеток)

отсутствие контактного торможения. В то время как при высокой плотности MCF-7 (80% монослоя) РНК не обладает цитопротективным эффектом, а напротив подавляет жизнеспособность MCF-7 (рис. 18).

При разделении препаратов РНК молока и дрожжей на ГАПе и дальнейшем исследовании цитопротективных свойств различных хроматографических фракций в условиях холодового шока, оказалось, что только фракции с высоким содержанием фрагментов РНК длиной не менее 30 нуклеотидов обладали цитопротективными свойствами при холодовом шоке.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что присутствие экстраклеточных нуклеиновых кислот во внеклеточных жидкостях организма человека не является случайным. Обнаруженные нами физиологические эффекты внеклеточных РНК, конечно же, не исчерпывают всего многообразия их функций, но, тем не менее, эти эффекты достаточно четко указывают на возможную регуляторную роль протяженных фрагментов основных клеточных РНК на уровне клетки и организма.

4. Выводы

1. Выделен набор нуклеиновых кислот из плазмы молока человека. Сравнение наборов нуклеиновых кислот плазмы молока, плазмы крови и спинномозговой жидкости показало, что размеры внеклеточных нуклеиновых кислот для разных физиологических жидкостей значительно различаются.
2. Установлено, что внеклеточные нуклеиновые кислоты плазмы человеческого молока представлены в основном фрагментами РНК и некоторые из этих фрагментов имеют развитую вторичную структуру. Концентрация РНК в препаратах молочной плазмы варьирует в интервале от 16 до 58 мкг/мл и является индивидуальной характеристикой донора.
3. Определены нуклеотидные последовательности ряда олигорибонуклеотидов плазмы человеческого молока, и показано, что эти олигорибонуклеотиды являются фрагментами 5.8S и 18S рибосомных РНК, тРНК^{Вал} и тРНК^{Тир}.
4. Установлено, что олигорибонуклеотиды человеческого молока участвуют в процессах фосфорилирования/дефосфорилирования белков молока.
5. Показано, что препараты суммарной РНК человеческого молока оказывают цитопротективное действие на клетки MCF-7 в условиях холодового шока, которое

проявляется при низкой плотности клеток в отсутствие контактного торможения. Цитопротективными свойствами обладают фрагменты РНК длиной не менее 30 нуклеотидов.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Кит Ю.Я., Кулигина Е.В., Романникова И.В., Семенов Д.В., Рихтер В.А., Власов В.В. В препаратах человеческого α -лактальбумина, индуцирующих апоптоз трансформированных клеток, присутствуют рибоолигонуклеотиды // Доклады Академии Наук. 1998. Т. 360. № 3. С. 406-408.
2. Кулигина Е.В., Андреева А.Ю., Могельницкий А.С., Кит Ю.Я., Якубов Л.А., Рихтер В.А., Власов В.В. Олигонуклеотиды и олигонуклеотидсвязывающие белки спинномозговой жидкости человека // Доклады Академии Наук. 1999. Т. 364. № 6. С. 832-834.
3. Кит Ю.Я., Кулигина Е.В., Онищенко А.М., Юрченко Л.В., Романникова И.В., Рихтер В.А., Власов В.В. Эндогенные олигонуклеотиды молока человека и их возможная биологическая активность // Биохимия. 1999. Т. 64. вып. 8. С. 59-64.
4. Kuligina E., Semenov D., Shevyrina O., Richter V. Ribonucleic acids of human milk // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004. V.23. P. 837-842.
5. Semenov D.V., Kuligina E.V., Shevyrina O.N., Richter V.A., Vlassov V.V. Extracellular ribonucleic acids of human milk // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004. V. 1022. P. 190-194.



Р18202

РНБ Русский фонд

2006-4
14831