

Исследование роли ГЦ-богатых последовательностей в составе внеклеточной ДНК в активации ДНК-сенсоров раковых клеток на примере линии MCF7

Малиновская Е.М.¹, Кожина Е.А.¹, Ершова Е.С.¹, Конькова М.С.¹, Вейко В.П.^{1,2}, Бобровский П.А.³, Лазарев В.Н.³, Каменева Л.В.¹, Вейко Н.Н.¹, Костюк С.В.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, Россия, г. Москва, ул.Москворечье, д.1.

2 — ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук»
119071, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2

3 — ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России
119435, Россия, г. Москва, ул.Малая Пироговская, д.1 а.

Основные вопросы исследования: (1) Взаимодействие рецепторов TLR9 и AIM2 в клеточной линии MCF7 в ответ на действие ГЦ-богатых фрагментов в составе внеклеточной ДНК (ГЦ-вкДНК); (2) Изучение роли рецепторов TLR9 и AIM2 в опосредовании биологического действия ГЦ-вкДНК на клетки MCF7.

Ключевые слова: ГЦ-вкДНК, клеточная линия MCF7, генные регуляторные сети.

Для цитирования: Малиновская Е.М., Кожина Е.А., Ершова Е.С., Конькова М.С., Вейко В.П., Бобровский П.А., Лазарев В.Н., Каменева Л.В., Вейко Н.Н., Костюк С.В. Исследование роли ГЦ-богатых последовательностей в составе внеклеточной ДНК в активации ДНК-сенсоров раковых клеток на примере линии MCF7. *Медицинская генетика* 2020; 19(6): 93-95.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.06.93-95

Автор для корреспонденции: Малиновская Елена Михайловна; **e-mail:** m.elena.0402@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта № 0517-2018-0003 программы Президиума РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

The role of GC-rich sequences in cell-free DNA in the activation of DNA sensors using the cancer line MCF7 as an example

Malinovskaya E.M.¹, Kozhina E.A.¹, Ershova E.S.¹, Konkova M.S.¹, Veiko V.P.^{1,2}, Bobrovsky P.A.³, Lazarev V.N.³, Kameneva L.V.¹, Veiko N.N.¹, Kostyuk S.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechye st., 1, Moscow, 115522, Russia

2 — Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences
Leninsky pr-t, 33, bld. 2, Moscow, 119071, Russia

3 — Federal Research and Clinical Center of physical-chemical medicine of Federal Medical Biological Agency
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia

The major research questions: (1) Interaction of TLR9 and AIM2 receptors in MCF7 in response to the action of GC-rich fragments in cell-free DNA (GC-cfDNA); (2) Studying the role of TLR9 and AIM2 receptors in mediating the biological effect of GC-cfDNA on MCF7 cells.

Keywords: GC-cfDNA, cell line MCF7, gene regulatory networks.

For citation: Malinovskaya E.M., Kozhina E.A., Ershova E.S., Konkova M.S., Veiko V.P., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N., Kameneva L.V., Veiko N.N., Kostyuk S.V. The role of GC-rich sequences in cell-free DNA in the activation of DNA sensors using the cancer line MCF7 as an example. *Medical genetics*. 2020; 19(6): 93-95 (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.06.93-95

Corresponding author: Malinovskaya E.M.; **e-mail:** m.elena.0402@gmail.com

Funding. The work was supported by funding under Project No. 0517-2018-0003 under the Basic Research for Biomedical Technologies program of the Russian Academy of Science Presidium (1.42).

Conflicts of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020

Биологическая активность фрагментов внеклеточной ДНК (вкДНК) связана с изменением ее состава по сравнению с ядерной ДНК [1]. Изменение ГЦ-состава и окисление оснований в составе вкДНК могут приводить к активации вкДНК экспрессии генов сигнальных путей, важных для функционирования и выживания клеток. При онкологических заболеваниях наблюдается повышенное содержание ГЦ-вкДНК по сравнению с нормой. ДНК-сенсоры TLR9 и AIM2 распознают фрагменты вкДНК, которые проникают в клетки. ГЦ-вкДНК обладают биологической активностью в отношении раковых клеток MCF7, выступая в роли DAMPs (damage-associated molecular patterns, молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением), в концентрации 10–300 нг/мл вызывают адаптивный ответ, повышают жизнеспособность раковых клеток и их толерантность к внешним повреждающим воздействиям [2,3]. При этом TLR9 способствует выживаемости раковых клеток путем активации сигнального пути TLR9-MyD88-NF- κ B, тогда как AIM2 индуцирует клеточный апоптоз [4,5].

Цель работы: выяснение роли ДНК-сенсоров TLR9 и AIM2 в опосредовании биологического действия ГЦ-богатых последовательностей вкДНК на раковые клетки MCF7.

Материалы и методы

В экспериментах *in vitro* была использована культура клеток MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека) из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ». Нокаут генов рецепторов TLR9 и AIM2 осуществлялся с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Было получено четыре клон клеток MCF7 с нокаутированным геном *TLR9* и два клон клеток MCF7 с нокаутированным геном *AIM2*. Для индукции адаптивной реакции в культуры интактных и нокаутированных клеток MCF7 добавляли модельные генетические конструкции, содержащие вставки ГЦ-обогащенной ДНК (ГЦ-ДНК), в частности, фрагменты транскрибируемой области рибосомного повтора – ТОРДНК (ETS и 18S). Клетки культивировали в присутствии ГЦ-ДНК (50 нг/мл) в течение трех часов. По окончании инкубации в интактных и нокаутированных клетках MCF7 методом ПЦР в реальном времени с использованием прибора StepOnePlus («Applied Biosystems», США) определяли уровень транскрипционной активности генов сенсоров нуклеиновых кислот (*TLR9*, *AIM2*, *STING*, *RIG1*), генов, регулирующих процессы клеточной гибели (*BCL2*, *BAX*), генов транскрипционных факторов (*NF κ B*, *STAT3*), генов маркеров оксидативного стресса и гипоксии (*NOX4*, *HIF1A*).

Параллельно методом проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр CyFlow PARTEC, Германия) оценивали экспрессию соответствующих белков. Эксперименты повторяли не менее трех раз. Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph.

Результаты

В культурах MCF7 с нокаутированным геном *TLR9* (*TLR9*^{-/-}) по сравнению с интактной культурой отсутствовала транскрипционная активность гена *TLR9*, но повышалась экспрессия генов сенсоров нуклеиновых кислот (*AIM2*, *STING*, *RIG1*) в 1,5–6 раз ($p < 0,05$). В культурах MCF7 с нокаутированным геном *AIM2* (*AIM2*^{-/-}) отсутствовала транскрипционная активность гена *AIM2* по сравнению с интактной, но повышалась экспрессия генов сенсоров нуклеиновых кислот в 2–9 раз ($p < 0,01$). В присутствии фрагментов ГЦ-ДНК транскрипционная активность генов *TLR9* и *AIM2* в культурах *TLR9*^{-/-} и *AIM2*^{-/-} снижалась в 1,9 (в клетках *AIM2*^{-/-}) и 2,2 (в клетках *TLR9*^{-/-}) раза ($p < 0,05$). Аналогичные результаты были получены при исследовании экспрессии соответствующих белков. В присутствии фрагментов ГЦ-ДНК транскрипционная активность гена *BCL2* в нокаутированных культурах MCF7 снижалась в 2,8 (в клетках *AIM2*^{-/-}) и 2,1 (в клетках *TLR9*^{-/-}) раза ($p < 0,01$). Уровень транскрипции гена *BAX* не претерпевал изменений в клетках *TLR9*^{-/-} и снижался в 3,7 раза в клетках *AIM2*^{-/-}.

Культивирование нокаутированных клеток MCF7 в присутствии фрагментов ГЦ-ДНК не вызывало статистически значимых изменений уровня экспрессии белков *BCL2* и *BAX*, однако соотношение *BCL2*/*BAX* было в 1,4–2,8 раза ниже соответствующего показателя в нестимулированных культурах ($p < 0,05$). Стимуляция фрагментами ГЦ-ДНК вызывала снижение транскрипционной активности генов маркеров оксидативного стресса и гипоксии *NOX4* и *HIF1A* в 1,6–3,3 раза в клетках *TLR9*^{-/-} ($p < 0,05$) и не оказывала существенного влияния на транскрипционную активность этих генов в клетках *AIM2*^{-/-}. Культивирование всех нокаутированных клеток MCF7 в присутствии фрагментов ГЦ-ДНК приводило к снижению уровня экспрессии генов транскрипционных факторов *NF κ B* и *STAT3* – в 1,5–6,0 раз ($p < 0,05$). В отличие от нокаутированных клеток *TLR9*^{-/-} и *AIM2*^{-/-}, интактные (не нокаутированные) клеточные культуры отвечали на стимуляцию фрагментами ГЦ-ДНК повышением транскрипционной активности всех исследованных генов.

Заключение

Подтверждено взаимодействие между ДНК-сенсорами TLR9 и AIM2 в раковых клетках MCF7. ГЦ-богатые фрагменты в составе вкДНК участвуют в развитии толерантности раковых клеток к проводимой терапии. Данный подход к исследованию ГЦ-ДНК в активации ДНК-сенсоров раковых клеток позволяет выявить наиболее значимую мишень для разработки методов прицельного воздействия с целью снижения адаптивного ответа в раковых клетках.

Литература/References

1. 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; (2015): 782123.
2. Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Okorokova N.A., Veiko V.P., Konkova M.S., Kozhina E.A., Savinova E.A., Porokhovnik L.N., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Ribosomal DNA as DAMPs signal for MCF7 cancer cells. *Front Oncol* 2019; (9): 445.
3. Anunobi R., Boone B.A., Cheh N., Tang D., Kang R., Loux T., Lotze M.T., Zeh H.J. Extracellular DNA promotes colorectal tumor cell survival after cytotoxic chemotherapy *J Surg Res* 2018; (226): 181–191.
4. Kozhina E.A., Ershova E.S., Okorokova N.A., Veiko V.P., Malinovskaya E.M., Sergeeva V.A., Konkova M.S., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Extracellular DNA containing (dG)n motifs penetrates into MCF7 breast cancer cells, induces the adaptive response, and can be expressed. *Oxid Med Cell Longev* 2019; (2019): 7853492.
5. Chen P.A., Shrivastava G., Balcom E.F., McKenzie B.A., Fernandes J., Branton W.G., Wheatley B.M., Petruk K., van Landeghem F.K.H., Power C. Absent in melanoma 2 regulates tumor cell proliferation in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2019; 144(2): 265–273.