

Влияния окисленной внеклеточной ДНК на повреждение ДНК и активацию транскрипции генов, регулирующих репарацию ДНК и апоптоз в клетках линии астроцитомы человека

Назаретян А. Ш.^{1,3}, Малиновская Е.М.¹, Филев А.Д.^{1,2}, Ершова Е.С.^{1,2}, Вейко Н.Н.¹,
Писарев В.М.², Халанский А.С.⁴, Каменева Л.В.¹, Табаков В.Ю.¹, Конькова М.С.¹, Костюк С.В.^{1,2}

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

2 — НИИ общей реаниматологии имени В.А.Неговского ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»
107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

3 — ФГАОУ ВО «Российский Национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

4 — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»
117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

В работе исследовали влияние окисленной внеклеточной ДНК (овкДНК) на повреждение геномной ДНК и активацию транскрипции генов, регулирующих репарацию ДНК и процессы апоптоза в клетках астроцитомы человека линии 1321NI. Фрагменты овкДНК добавляли в среду культивирования клеток в концентрации 50–100 нг/мл на 0,5–24 часа. Уровни окислительных повреждений и двуниевых разрывов ДНК ядер, экспрессии белков BCL2, BAX определяли с помощью антител к 8-окси-7,8-дигидрогуанозину (8oxodG), фосфорилированной форме гистона H2AX (γ H2AX), белкам BCL2 и BAX, соответственно, используя метод проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии генов *BCL2*, *BAX*, *BRCA1*, *BRCA2*, *TBP* (контроль) оценивали методом ПЦР в реальном времени. Воздействие на клетки 1321NI 50–100 нг/мл овкДНК в течение 30–60 мин приводило к 2–4-кратному повышению уровня 8-oxodG ($p < 0,01$, уровень двуниевых разрывов увеличивался в 3–3,5 раза ($p < 0,01$), а экспрессия генов репарации повреждений *BRCA1* и *BRCA2* возрастала в 3–5 раз ($p < 0,001$). Позже, через 5–24 часа после воздействия на клетки овкДНК, в 3,5–5 раз увеличивалось отношение экспрессии генов *BCL2/BAX* по сравнению с нестимулированными культурами ($p < 0,001$). Таким образом, в клетках астроцитомы овкДНК индуцирует и перестройку генома, и адаптивные реакции транскриптома, с последующей активацией анти-апоптотического процесса в клетках. Предполагается, что тем самым овкДНК может способствовать накоплению резистентных к лечению мутантных клонов в резидуальной опухоли, провоцируя рецидивы.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, астроцитома, апоптоз, окислительный стресс.

Для цитирования: Назаретян А. Ш., Малиновская Е.М., Филев А.Д., Ершова Е.С., Вейко Н.Н., Писарев В.М., Халанский А.С., Каменева Л.В., Табаков В.Ю., Конькова М.С., Костюк С.В. Влияния окисленной внеклеточной ДНК на повреждение ДНК и активацию транскрипции генов, регулирующих репарацию ДНК и апоптоз в клетках линии астроцитомы человека. *Медицинская генетика* 2020; 19(6): 96–99

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.06.96-99

Автор для корреспонденции: Назаретян Ашот Шаликович; **e-mail:** ashotn58@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России и гранта РФФИ 17-29-06017 офи_м.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

Oxidized extracellular DNA affects DNA damage and transcription of genes regulating DNA repair and apoptosis in human astrocytoma cells

Nazaretyan A.S.^{1,3}, Malinovskaya E.M.¹, Filev A.D.^{1,2}, Ershova E.S.^{1,2}, Veiko N.N.¹, Pisarev V.M.², Khalansky A.S.⁴, Kameneva L.V.¹, Tabakov V.Y.¹, Konkova M.S.¹, Kostyuk S.V.^{1,2}

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

2 — V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of the Federal Research and Clinical Center of Intensive
Care Medicine and Rehabilitology
Petrovka st., 25, bld. 2, Moscow 107031, Russia

3 — N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow 117997, Russia.
Ostrovityanova st. 1, Moscow 117997, Russia

4 — Research Institute of Human Morphology, Moscow 117418, Russia.
Tsyurupy st., 3, Moscow, 117418, Russia

The effects of oxidized extracellular DNA (oecDNA) on genomic DNA damage and activation of transcription of genes regulating DNA repair and apoptosis in human astrocytoma 1321NI cells were studied. OecDNA fragments, 50-100 ng/ml, were added to 1321NI cells for 0.5-24 hours. The levels of oxidative damage and double stranded DNA breaks, BCL and BAX protein expression were determined using antibodies to 8-hydroxy-7,8-dihydroguanosine (8-ohdG), phosphorylated histone γ H2AX, BCL2 and BAX proteins and flow cytofluorimetry. The levels of gene expression of *BCL2*, *BAC*, *BRCA1*, *BRCA2*, *TBP* (control) were evaluated by real-time PCR. The exposure of 1321NI cells to oecDNA resulted in a 2-4-fold increased levels of 8-ohdG ($p < 0.01$) and 3-3.5-fold increases in double-strand breaks ($p < 0.01$), whereas the expression of damage repair genes *BRCA1* and *BRCA2* was enhanced by 3-5 times ($p < 0.001$). In 5-24 hours after exposure to oecDNA cells, the ratio of *BCL2/BAX* gene expression increased by 3.5-5 times vs. unexposed cell cultures ($p < 0.001$). Therefore, in astrocytoma cells, oecDNA induces both genome rearrangement and adaptive transcriptome reactions followed by activation of an anti-apoptotic path in malignant cells. It is suggested that oecDNA contributes to the accumulation in a residual tumor of mutant clones resistant to treatment thus provoking relapse.

Keywords: cell-free DNA, astrocytoma, apoptosis, oxidative stress.

For citation: Nazaretyan A.S., Malinovskaya E.M., Filev A.D., Ershova E.S., Veiko N.N., Pisarev V.M., Khalansky A.S., Kameneva L.V., Tabakov V.Y., Konkova M.S., Kostyuk S.V. Oxidized extracellular DNA affects DNA damage and transcription of genes regulating DNA repair and apoptosis in human astrocytoma cells. *Medical genetics*. 2020; 19(6): 96-99 (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.06.96-99

Corresponding author: Nazaretyan Ashot Shalikovich; **e-mail:** ashotn58@yandex.ru

Funding. The research supported by the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and RFBR grant 17-29-06017 OFI M.

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

Accepted: 20.05.2020

Глиобластома относится к наиболее частым и злокачественным опухолям мозга. Неблагоприятный прогноз глиобластом обусловлен ускоренной пролиферацией злокачественных клеток и агрессивными рецидивами вследствие сохранения при лечении стволовоподобных клеток, резистентных к радио- и химиотерапии. Молекулярные механизмы, обеспечивающие резистентность опухоли к лечению, недостаточно изучены. Ранее в наших исследованиях было показано, что фрагменты внеклеточной ДНК (вкДНК) и окисленной вкДНК (овкДНК) могут проникать в раковые клетки и активировать сигнальные каскады адаптивного ответа [1, 2]. Мы предположили, что противоопухолевая терапия, вызывающая окислительный стресс и гибель клеток как самой опухоли, так и окружающих тканей, приводит к высвобождению в межклеточное пространство овкДНК. Могут ли фрагменты овкДНК инициировать в клетках глиобласто-

мы адаптивный ответ, способный обеспечить или поддержать развитие толерантности опухолевых клеток к проводимой терапии, остается неизвестным.

Целью данной работы было исследование влияния овкДНК на повреждение ДНК и активацию транскрипции генов, регулирующих репарацию ДНК и апоптоз в клетках астроцитомы человека линии 1321NI. В задачи исследования входило определить способность овкДНК вызывать в клетках 1321NI: (1) окислительные повреждения и двунитевые разрывы ДНК, и (2) изменения уровней экспрессии генов *BRCA1* и *BRCA2*, про- и антиапоптотических генов и белков BCL2, BAX.

Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки радиорезистентной линии астроцитомы человека 1321NI.

В экспериментах использовали модельные образцы овкДНК, полученные комбинированной обработкой образца геномной ДНК 300мМ H_2O_2 и ультрафиолетом при длине волны $\lambda = 312$ нм [2]. Методом масс-спектрометрии показали, что в образцах присутствовало 1200 молекул 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8oxodG) на миллион нуклеозидов. Фрагменты овкДНК добавляли в среду культивирования клеток в концентрации 50–100 нг/мл на 0,5–24 часа. Уровни окислительных повреждений и двунитевых разрывов ДНК ядер, экспрессии белков *BCL2*, *BAX* определяли с помощью антител к 8oxodG, фосфорилированной форме гистона H2AX (γ H2AX), белкам *BCL2* и *BAX* (Abcam), используя метод проточной цитофлуориметрии (Partec CyFlow, Германия). РНК выделяли наборами Yellow-Solve (Клонотек, Россия) с последующей экстракцией фенолом и хлороформом и осаждением хлороформом и изоамиловым спиртом (49:1). Концентрацию РНК определяли с помощью красителя Quant-iT RiboGreen RNA reagent (MoBioTec, Германия), используя планшетный ридер (EnSpire equipment, Финляндия). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью реактивов фирмы «Силекс» (Россия) согласно стандартной методике [3]. Уровень экспрессии генов *BCL2*, *BAX*, *BRCA1*, *BRCA2*, *TBP* оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием соответствующих праймеров: *BCL2* TTTGGAAATCCGACCACTAA, AAAGAAATGCAAGTGAATGA; *TBP* GCCCGAAACGCCGAATAT, CGTGGTTTCGTG-GCTCTCT; *BAX* CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG, CCAGCCCATGATGGTTCTGAT; *BRCA2* CCTCTGCCCTTATCATCACTTT, CCAGATGATGTCTTCTCCATCC; *BRCA1* GGC-TATCCTCTCAGAGTGACATTTTA; CTTTATCAGGT-TATGTTGCATGGT (Евроген, Россия) и интеркалирующего красителя SybrGreen (Евроген, Россия) на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Полученные результаты воспроизводили не менее 3 раз в независимых экспериментах. Значимость наблюдаемых различий анализировали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни при $p < 0,01$.

Результаты

Одним из наиболее распространенных продуктов окисления клеточной ДНК является 8-oxodG, который широко используется в качестве маркера окислительных повреждений ДНК [3]. В образцах овкДНК, полученных от онкологических больных, содержание 8-oxodG может достигать 1000–3000 8-oxodG на миллион нуклеотидов [2, 3]. В нашем исследовании воздействие на клетки 1321NI 50–100 нг/мл овкДНК

в течение 30 мин приводило к 2–4-кратному повышению уровня 8-oxodG ($p < 0,01$). Анализ содержания фосфорилированной формы гистона H2AX, по которому оценивали уровень двунитевых разрывов ДНК в ядрах клеток 1321NI, показал, что уже через 0,5–1 часа после воздействия на клетки овкДНК уровень двунитевых разрывов увеличивался в 3–3,5 раза ($p < 0,01$). При этом в клетках в течение 1–3 часов после добавления в среду культивирования 50–100 нг/мл овкДНК в 3–5 раз возрастала экспрессия генов *BRCA1* и *BRCA2* ($p < 0,001$), ответственных за восстановление разрывов ДНК после воздействия на клетки овкДНК. Уже через 3–5 часов после воздействия овкДНК, уровни окислительных повреждений и двунитевых разрывов ДНК в клетках астроцитомы возвращались к уровням показателей в интактных клетках, культивируемых без овкДНК. Образование двунитевых разрывов ДНК часто приводит к усилению апоптоза в клеточной популяции, однако в ходе экспериментов мы обнаружили активацию антиапоптотических генов в клетках астроцитомы: через 5–24 часа после воздействия на клетки овкДНК в 2–3 раза увеличивались уровни экспрессии и гена *BCL2*, и белка *BCL2* ($p < 0,01$ в обоих случаях), а уровни экспрессии гена *BAX* и белка *BAX* опускались ниже контрольных значений. Соотношение *BCL2*/*BAX* было в 3,5–5 раз выше соответствующего показателя в нестимулированных культурах ($p < 0,001$).

Обсуждение

Ранее полученные результаты свидетельствуют о том, что фрагменты окисленной ДНК легко проникают через клеточную мембрану [2]. Данные, полученные в ходе представляемого исследования, подтверждают высокую биологическую активность овкДНК, способной уже через 30 минут вызывать окисление остатков дезоксигуанозина в составе ядерной ДНК и индуцировать двунитевые разрывы ДНК. Интересно, что практически сразу после столь выраженного и быстрого генотоксического эффекта наблюдали адаптивную реакцию генома: усиление транскрипции генов репарации (*BRCA1*, *BRCA2*), а впоследствии – увеличение экспрессии гена и антиапоптотического белка *BCL2*, сопровождающееся снижением экспрессии проапоптотического гена *BAX* и белка *BAX*. При химиотерапии или радиотерапии опухолей, когда в кровотоке высвобождается много фрагментов ДНК, модифицированных в результате окисления нуклеотидов в ходе опухолевого роста и воздействия факторов лечения, столь выраженная реакция на них злокачественных клеток может носить характер адаптивного ответа всех или некоторых клеточных популяций с повышенным по-

тенциалом к выживанию в проапоптотических условиях. Особое значение такие адаптивные реакции выживания в условиях воздействия овкДНК, накапливающихся в окружении погибающих клеток, могут приобрести для т.н.так называемых стволовых (или стволовоподобных — stem-like) клеток рака — ключевых драйверов онкогенеза, метастазирования и рецидивирования опухолевого роста после лечения [4]. Вследствие выраженной генетической гетерогенности опухоли, клоны злокачественных клеток (в том числе стволовоподобные клетки с высоким клонообразующим потенциалом), могут нести мутации, способствующие инвазивному росту, миграции, избеганию воздействия клеток иммунной системы [5]. Возможно, что овкДНК, способствуя антиапоптотическим процессам, могут поддерживать генетическую гетерогенность опухоли, сохраняя мутантные клоны и предоставляя им селективные преимущества в ходе лечения, тем самым способствуя и более быстрому накоплению мутантных клонов, резистентных к лечению.

Таким образом, в клетках астроцитомы 1321NI человека овкДНК вызывает реакции генома, проявляющиеся в (а) индукции двунитевых разрывов и накоплении окисленного дезоксирибозина в геномной ДНК,

(б) инициации адаптивных реакций транскриптома, приводящих к усилению транскрипции генов репарации *BRCA1*, *BRCA2* и анти-апоптотического гена *BCL2* в клетках, снижению экспрессии анти-апоптотического гена и белка BAX. Предполагается, что высвобождающаяся в ходе лечения из клеток овкДНК может служить специфическим фактором сохранения генетической гетерогенности опухоли и ускорения формирования резистентности к лечению.

Литература/ References

1. Malinovskaya E.M. Ershova E.S., Okorokova N.A. et al. Ribosomal DNA as DAMPs signal for MCF7 cancer cells. *Front Oncol.* 2019. 30; 9:445. doi 10.3389/fonc.2019.00445
2. Kostyuk S.V., Konkova M.S., Ershova E.S. et al. An exposure to the oxidized DNA enhances both instability of genome and survival in cancer cells. *PLoS One.* 2013 17;8(10). doi. 10.1371/journal.pone.0077469
3. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V. et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2013. 2013:649747. doi:10.1155/2013/649747
4. Clarke M.F. Clinical and Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells. *N Engl J Med.* 2019;380(23):2237–2245. doi:10.1056/NEJMr1804280
5. Burrell R.A., Swanton C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Mol Oncol.* 2014;8(6):1095–1111. doi:10.1016/j.molonc.2014.06.005