

# **Исследование с применением системы редактирования генома CRISPR/Cas9 биологического действия ГЦ-богатых последовательностей внеклеточной ДНК на процесс регуляции транскрипционной активности ДНК-сенсоров TLR9 и AIM2 в клетках линии MCF7**

**Малиновская Е.М.<sup>1</sup>, Кожина Е.А.<sup>1</sup>, Ершова Е.С.<sup>1</sup>, Конькова М.С.<sup>1</sup>, Вейко В.П.<sup>1,2</sup>, Бобровский П.А.<sup>3</sup>, Лазарев В.Н.<sup>3</sup>, Шмарина Г.В.<sup>1</sup>, Каменева Л.В.<sup>1</sup>, Вейко Н.Н.<sup>1</sup>, Костюк С.В.<sup>1</sup>**

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

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

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

Ряд заболеваний, в том числе онкологических, сопровождается повышенным уровнем накопления ГЦ-обогащенных последовательностей в общем пуле свободной внеклеточной ДНК (вкДНК). Во многом этот факт объясняется повышенной устойчивостью этих фрагментов ДНК к действию нуклеаз крови. Они могут активировать ДНК-сенсоры нуклеиновых кислот – TLR9 и AIM2, которые играют существенную роль в функционировании раковых клеток. Цель исследования: изучение биологического ответа клеток линии MCF7 на действие ГЦ-богатых последовательностей вкДНК и выявление с помощью нокаута генов AIM2 и TLR9 функциональной роли ДНК-связывающих рецепторов в развитии клеточного адаптивного ответа. Экспериментально установлено, что клетки культуры MCF7 с «выключенными» рецепторами TLR9 и AIM2 отвечают на стимуляцию фрагментами ГЦ-богатых последовательностей вкДНК снижением транскрипционной активности генов сигнальных каскадов TLR9/MYD88/NF-κB-сигнального пути и связанных с ним STAT 3/6-сигнальных путей, повышающих выживаемость раковых клеток. Это показывает необходимость дальнейших исследований роли других генов в раковых клетках для детализации механизмов отмеченных в данной работе эффектов по выживаемости раковых клеток.

**Ключевые слова:** ГЦ-вкДНК, клеточная линия MCF7, генные регуляторные сети, нокаут генов TLR9 и AIM2, CRISPR/Cas9 технология.

**Для цитирования:** Малиновская Е.М., Кожина Е.А., Ершова Е.С., Конькова М.С., Вейко В.П., Бобровский П.А., Лазарев В.Н., Шмарина Г.В., Каменева Л.В., Вейко Н.Н., Костюк С.В. Исследование с применением системы редактирования генома CRISPR/Cas9 биологического действия ГЦ-богатых последовательностей внеклеточной ДНК на процесс регуляции транскрипционной активности ДНК-сенсоров TLR9 и AIM2 в клетках линии MCF7. *Медицинская генетика* 2021; 20(8): 48-59.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2021.08.48-59

**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:** 30.07.2021.

## **Genome editing technology CRISPR/Cas9 in the study of the biological effect of GC-rich cell-free DNA sequences (cfDNA) on the regulation of the transcriptional activity of TLR9 receptor-DNA sensor genes and AIM2 on the MCF7 line cells**

**Malinovskaya E.M.<sup>1</sup>, Kozhina E.A.<sup>1</sup>, Ershova E.S.<sup>1</sup>, Konkova M.S.<sup>1</sup>, Veiko V.P.<sup>1,2</sup>, Bobrovsky P.A.<sup>3</sup>, Lazarev V.N.<sup>3</sup>, Shmarina G.V.<sup>1</sup>, Kameneva L.V.<sup>1</sup>, Veiko N.N.<sup>1</sup>, Kostyuk S.V.<sup>1</sup>**

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

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

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

A number of diseases, including cancer, are associated with accumulation of GC-enriched sequences in the general cell-free DNA (cfDNA) pool. This fact is primarily explained by these DNA fragments increased resistance to the blood nucleases which can activate DNA sensors – TLR9 and AIM2 that have a different effect on the cancer cells functioning. The aim of the present study was to study the MCF 7 cells biological response to GC-rich cfDNA sequences and using AIM2 and TLR9 knockout to identify the functional role of DNA-binding receptors in the development of cellular adaptive response. It was experimentally established that MCF7 culture cells with TLR9 and AIM2 receptors “turned off” respond to stimulation by GC-DNA fragments by reducing the transcriptional activity of the genes of the TLR9/MYD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway and associated STAT 3/6 signaling pathways that increase the survival of cancer cells. This shows the need for further studies of the role of other genes, including on the example of cell lines with TLR9 and AIM2 knockout, in terms of detailing the mechanisms of the effects noted in this work on cancer cell survival.

**Keywords:** GC-cfDNA, cell line MCF7, gene regulatory networks, gene knockout, CRISPR/Cas9 technology.

**For citation:** Malinovskaya E.M., Kozhina E.A., Ershova E.S., Konkova M.S., Veiko V.P., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N., Shmarina G.V., Kameneva L.V., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Genome editing technology CRISPR/Cas9 in the study of the biological effect of GC-rich cell-free DNA sequences (cfDNA) on the regulation of the transcriptional activity of TLR9 receptor-DNA sensor genes and AIM2 on the MCF7 line cells. *Meditinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(8): 48–59. (In Russ.).

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2021.08.48-59

**Corresponding author:** Elena M. Malinovskaya; **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).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 30.07.2021.

## Введение

За последнее десятилетие достижения в области молекулярной биологии и методов геномики произвели революцию в диагностике и терапии онкологических заболеваний. Для исследования молекулярных основ данной патологии представляет большой интерес изучение биологической активности внеклеточной ДНК (вкДНК), поскольку она высвобождается в окружающие жидкости из клеток организма при разрушении опухолевых клеток и может быть проанализирована малоинвазивно [1]. В последние годы все большее внимание уделяется использованию циркулирующей вкДНК в качестве биомаркера при жидкостной биопсии рака [2]. В литературе отмечается, что в плазме крови онкологических больных часто обнаруживается повышенный уровень вкДНК [3]. Недавнее исследование показало, что измерение уровня вкДНК может иметь прогностическое значение: пациенты с метастатическим колоректальным раком с более высоким уровнем вкДНК имели значительно более короткую продолжительность жизни, чем пациенты с низким уровнем вкДНК в плазме крови [4].

В настоящее время показано, что вкДНК значительно обогащена фрагментами, содержащими повышенный ГЦ-состав (гуанин-цитозин). Так, содержание ГЦ-повторов во вкДНК составляет примерно 54% [5], а в ядерной ДНК – 42% [6]. Это соотношение может меняться при патологии и внешних повреждающих воздействиях, когда вкДНК дополнительно обогащается ГЦ-богатыми последовательностями [7]. Данные повторы могут быть представлены двумя высоко

повторяющимися последовательностями генома – митохондриальной ДНК [8, 9] и рибосомным повтором (рДНК – рРНК-кодирующая последовательность ДНК) [10]. Многократное увеличение количества копий рДНК в составе вкДНК наблюдается при хронической патологии, сопровождающейся повышенным уровнем гибели клеток [10–12], а также при хронических внешних повреждающих воздействиях [13,14]. В предыдущем исследовании было показано, что в крови больных раком молочной железы накапливаются фрагменты GC-богатой транскрибируемой области рибосомного повтора (рДНК), устойчивые к действию нуклеаз крови [15].

На биологическую активность вкДНК оказывают влияние изменения нуклеотидного состава вкДНК и накопление фрагментов рДНК в пуле вкДНК. Ранее нами было показано, что воздействие окисленной геномной ДНК человека повышает как нестабильность генома, так и выживаемость раковых клеток MCF7 [16]. В то же время неокисленная геномная ДНК человека не обладала такими свойствами. Можно ожидать, что окисленные фрагменты ГЦ-вкДНК проявляют активность в отношении раковых клеток, поскольку ГЦ-ДНК содержит большое количество наиболее легко окисляемых мотивов Gp ( $n > 2$ ) [17].

ДНК-сенсоры – это иммунные рецепторы, которые обнаруживают эндогенную или экзогенную вкДНК. Они имеют решающее значение для запуска иммунного ответа против вирусной и внутриклеточной бактериальной инфекции, а также участвуют

в развитии воспалительных и опухолевых заболеваний [18]. Последние исследования доказали, что такие ДНК-сенсоры, как AIM2 и TLR9, принимают участие не только в процессе защиты от патогенов, но и играют немаловажную роль при прогрессировании злокачественных новообразований [19–22].

TLR9 (toll-like receptor 9) — трансмембранный ДНК-рецептор, распознающий не только бактериальную ДНК [23], но и ДНК млекопитающих, содержащую неметилированные цитозин-гуанозиновые (CpG) динуклеотиды [24]. Была показана достоверная взаимосвязь между высокой экспрессией TLR9 и плохой выживаемостью у пациентов с раком предстательной железы [25], раком пищевода [26], глиомой [27]. Кроме того, в ряде исследований обнаружена взаимосвязь между вкДНК, уровнем экспрессии TLR9 и аутоиммунными заболеваниями, которые могут провоцировать воспалительные процессы [28]. Молекулярно-генетическими методами показано, что TLR9 стимулирует выживание раковых клеток путем активации сигнального пути TLR9-MyD88-NF-κB, снижая уровень апоптоза [7]. Кроме этого, сообщалось, что вкДНК может стимулировать пролиферацию клеток рака молочной железы активацией пути TLR9/NF-κB/cyclinD1 [29].

AIM2 (absent in melanoma 2) — цитозольный иммунный рецептор, распознающий двухцепочечную ДНК, инициируя сборку большого мультипротеинового олигомерного комплекса, называемого инфламасомой [30]. Экспрессия AIM2 в опухолевых клетках подавляет пролиферацию клеток, а также повышает чувствительность к проводимой терапии [31].

В настоящее время остается до конца неизученным, каким образом в раковой клетке взаимодействуют два сигнальных пути, активируемые двумя ДНК-сенсорами, которые могут опознавать одни и те же фрагменты ДНК в цитоплазме. Стимуляция рецепторов TLR9 и AIM2 фрагментами ДНК приводит к активации NF-κB-сигнального пути и связанных с ним STAT 3/6-сигнальных путей через TLR9/MyD88/NF-κB-сигнальный путь и через образование инфламасом [29, 30]. Детальное изучение роли этих рецепторов в прогрессировании злокачественной опухоли позволит получить новые фундаментальные знания о механизме возникновения толерантности у клеток злокачественных опухолей к применяемым в практической онкологии терапевтическим агентам. Задачей данной работы являлось исследование изменения транскрипционной активности генов ДНК-сенсоров и связанных с ними ключевых сигнальных путей в раковых клетках MCF7 *in vitro* при воздействии фрагментов вкДНК на фо-

не нокаутирования по гену *TLR9* (*TLR9*<sup>-/-</sup> и по гену *AIM2* (*AIM2*<sup>-/-</sup>).

## Методы

### Клеточная линия

ER/PR-позитивные клетки MCF7 были приобретены в компании ATCC, Manassas, USA (Cat: HTB-22). При помощи технологии CRISPR/Cas9 (см. ниже) были получены 4 клона клеток, нокаутированных по гену *TLR9* (*TLR9*<sup>-/-</sup>), и 2 клона клеток, нокаутированных по гену *AIM2* (*AIM2*<sup>-/-</sup>).

Интактные и нокаутированные клетки культивировали в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой, 2 мм L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина. Клетки MCF7 выращивали в увлажненной атмосфере при 37°C. В атмосфере содержалась CO<sub>2</sub> (5%). Перед обработкой плазмидной ДНК клетки инкубировали в течение 24 ч в слайд-флаконах.

### Модельная ГЦ-ДНК

ГЦ-ДНК добавляли в клеточную культуральную среду. Конечная концентрация плазмиды составила 50 нг/мл. В качестве модельной ГЦ-ДНК использовали плазмидную ДНК (10 197 п.н.), содержащую последовательности рДНК (5836 п.н., 73% ГЦ-пар), клонированные в сайт EcoRI вектора pBR322 (p-рДНК). Плазида pBR322 является коммерческим продуктом (Sigma-Aldrich).

### Нокаутирование культуры клеток MCF7 по гену AIM2 (Gene ID: 9447)

Для проведения нокаута был осуществлен подбор структур sgRNA к соответствующим 20-нуклеотидным участкам гена *AIM2*, который проводили с помощью сервиса CRISPR DESIGN (<http://crispr.mit.edu/>).

Олигонуклеотиды, использованные в работе при инактивации (нокауте) гена *AIM2*:

```
aim2_f1 CACCGAGTACTGGGGGTTAGAAACG
aim2_r1 AAACCGTTTCTAACCCCCAGTACTC
aim2_f2 CACCGTTCAGCATCTAACACACGTG
aim2_r2 AAACCACGTGTGTGTAGATGCTGAAC
aim2_f3 CACCGTTGACCTAAGTGACAACACT
aim2_r3 AAACAGTGTGTGCTACTTAGGTCAAC
```

Олигонуклеотидные дуплексы (aim2\_f1/aim2\_r1, aim2\_f2/aim2\_r2 и aim2\_f3/aim2\_r3) клонировали в составе вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458), любезно предоставленного Feng Zhang (Addgene # 48138) и обработанного эндонуклеазой рестрикции BbsI. Структуру рекомбинантного участка проверяли путем секвенирования. В результате были получены плазмиды

pX458\_Aim2\_1, pX458\_Aim2\_2 и pX458\_Aim2\_3, кодирующие sgRNA с комплементарными последовательностями к разным участкам экзонов гена *AIM2*. Для проведения трансфекции клеток плазмиды были выделены препаративно набором Plasmid DNA Purification Kit (Qiagen, США). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм. Таким образом, были сконструированы три CRISPR/Cas9 вектора, кодирующие sgRNA с комплементарными последовательностями на разные участки экзонов гена *AIM2*.

Оценку эффективности функционирования полученных плазмид проводили на модельных клетках НЕК-293, которые трансфицировали с использованием набора реагентов Lipofectamine3000 (ThermoScientific, США), а наличие изменений в целевых областях геномной ДНК подтверждали набором GeneArt™ Genomic Cleavage Detection Kit (ThermoScientific, США). В результате исследования для дальнейшей работы, как наиболее эффективный, был отобран вектор pX458\_Aim2\_1. Этим вектором и были трансфицированы клетки MCF7. Отбор клонов клеток линии MCF7 проводили с использованием флуоресценто-активированного клеточного сортера (FACS), с последующим анализом целевого участка генома отобранных клеток. Для этого амплифицировали участок ДНК, содержащий адрес распознавания sgRNA Aim2\_1, и определяли первичную последовательность полученных ПЦР-фрагментов на генетическом анализаторе ABIPrism3730xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). В результате анализа были отобраны клон B1,

содержащий две делеции в области целевого двухцепочечного разрыва, и клон F1, содержащий две различные мутации в двух цепях ДНК. Таким образом, на этом этапе работы было получено два клона клеток линии MCF7 с гомозиготно нокаутированным геном *AIM2*: amb\_1 и amf\_1.

#### Нокаут культуры клеток MCF7 по гену *TLR9* (Gene ID: 54106)

Нокаут гена *TLR9* проводили по схеме, аналогичной вышеописанному нокауту для гена *AIM2*, но с использованием праймеров, структуры которых приведены ниже.

Олигонуклеотиды, использованные в работе при инактивации (нокауте) гена *TLR9*:

```
tlrg1f CACCGCGTGGTCTCATCGAGTGAG
tlrg2f CACCGCCGACAGGTCCACGTAGCGC
tlrg3f CACCGCCGCAAGACGCTGTTTGTGC
tlrg4f CACCGACTGGGTGTACAACGAGCTT
tlrg1r AAACCTCACTCGATGAGACCACGCC
tlrg2r AAACGCGCTACGTGGACCTGTTCGGC
tlrg3r AAACGCACAAACAGCGTCTTGCGGC
tlrg4r AAACAAGCTCGTTGTACACCCAGTC
```

Олигонуклеотидные дуплексы: tlrg1f/tlrg1r, tlrg2f/tlrg2r, tlrg3f/tlrg3r, tlrg4f/tlrg4r клонировали в составе вектора pX458dg. Плазмида pX458dg сконструирована в лаборатории генной инженерии (ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России), содержит два участка для клонирования олигонуклеотидных дуплексов (рис. 1) и является модифицированной версией плазмиды pX458, любезно предоставленной Feng

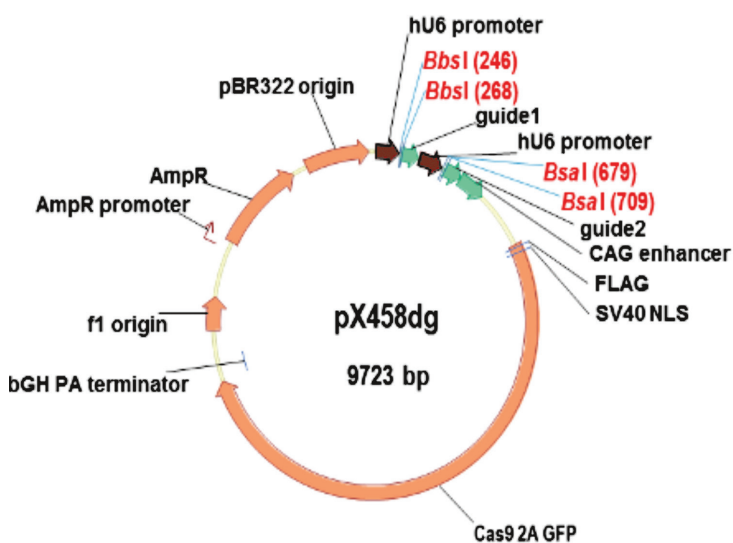


Рис. 1. Схема вектора pX458dg. BbsI и BsaI – сайты распознавания эндонуклеазами рестрикции для клонирования олигонуклеотидных дуплексов.



Zhang (Addgene # 48138). На первом этапе плазмидную ДНК обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BbsI (Thermo, США) и клонировали олигонуклеотидные дуплексы tlr1f/tlr1r и tlr3f/tlr3r. Полученные плазмиды называли pX458dg\_TLR\_1 и pX458dg\_TLR\_3. Далее, плазмиды обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BsaI (Thermo, США) и клонировали олигонуклеотидные дуплексы tlr2f/tlr2r и tlr4f/tlr4r.

Структуры рекомбинантных участков плазмидной ДНК подтверждали секвенированием. Полученные векторы называли pX458dg\_TLR\_1\_2 и pX458dg\_TLR\_3\_4. Плазмиды были выделены и очищены набором Plasmid DNA PurificationKit (Qiagen, США) для проведения трансфекции клеток. Таким образом, были сконструированы два CRISPR/Cas9 вектора, содержащие по две sgRNA, с комплементарными последовательностями на разные участки экзонов гена *TLR9*. Клетки MCF7 трансфицировали с использованием набора реагентов Lipofectamine3000 (Thermoscientific, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Для анализа клонов, после сортировки с помощью FACS, клетки нарабатывали и с использованием ПЦП получали фрагмент геномной ДНК, содержащий участок распознавания sgRNA TLR\_1\_2, TLR\_3\_4. Структуру PCR-фрагментов анализировали на приборе ABIPrism3730xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). В результате анализа были отобраны четыре клон: G2, содержащий инсерцию в области двухцепочечного разрыва гена *TLR9*, клоны H2, 1 и 3, несущие две различные целевые мутации на двух цепях ДНК. Таким образом, было получено четыре клон клеток линии MCF7 с гомозиготным нокаутированным геном *TLR9*: *MCF-7/ΔTLR9* (3); *MCF-7/ΔTLR9* (G2); *MCF-7/ΔTLR9* (1); *MCF-7/ΔTLR9* (H2).

#### Проточная цитометрия

Уровень экспрессии белков определяли методом проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр CyFlow PARTEC, Германия). Клетки промывали в растворе Версена и обрабатывали 0,25% трипсином при контроле в световом микроскопе. Клетки переносили в пробирки Эппендорфа, промывали культуральной средой, затем центрифугировали и суспендировали в PBS. Для количественного определения фоновой флуоресценции были проанализированы контрольные клетки.

Окрашивание клеток различными антителами проводили следующим образом. Клетки фиксировали в 2% параформальдегиде (Сигма) при 37°C в течение 10 мин, промывали три раза с 0,5% BSA-PBS и перемеабиллизировали с 0,1% Тритон х-100 (Сигма) в PBS в течение 15 мин или в 70% этаноле при 4°C. По-

сле этого клетки были промыты три раза 0,5% BSA-PBS и окрашены 1 мкг/мл соответствующих антител (Abcam) в течение 3 ч при 4°C. Затем снова промывали 0,5% BSA-PBS и окрашивали 1 мкг/мл вторичными FITC- или PE-конъюгированными антителами (Abcam) в течение 1 ч при 4°C, снова промывали трижды с 0,5% BSA-PBS.

#### Количественный анализ экспрессии генов

Уровень экспрессии генов в клетках оценивали методом ПЦП в реальном времени с использованием прибора StepOnePlus («Applied Biosystems», США) и с Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Общую мРНК выделяли с помощью наборов Rneasy Mini (Qiagen, Германия), обрабатывали ДНКазой I и проводили обратную транскрипцию с помощью набора обратной транскриптазы (Sileks, Россия). Техническая ошибка составила ~2%.

Список праймеров (Синтол, Россия) приведен в **таблице**. В качестве референсного гена использовали ген *TBP*.

#### Статистика

Эксперименты повторяли не менее трех раз. Статистическую обработку проводили с использованием программ Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph. Для анализа значимости наблюдаемых различий мы использовали непараметрический критерий Манна–Уитни U.

### Результаты

*Влияние ГЦ-ДНК на транскрипционную активность генов и уровень экспрессии белков сенсоров нуклеиновых кислот в нокаутированных и интактной культурах раковых клеток MCF7*

#### 1. Интактная культура

Стимуляция интактных (не нокаутированных клеточных культур) фрагментами ГЦ-ДНК приводила к 4–8-кратному повышению транскрипционной активности генов сенсоров нуклеиновых кислот, включая *RIG1* (все  $p < 0,001$ ) (**рис. 2А**). Результаты, полученные при исследовании уровня экспрессии белков ДНК-сенсоров, в основном соответствовали данным о транскрипционной активности соответствующих генов (**рис. 2Б**).

#### 2. Нокаутированные культуры AIM2<sup>-/-</sup>

В клетках, нокаутированных по AIM2 (AIM2<sup>-/-</sup>), количество РНК-транскриптов *TLR9* было приблизительно в 9 раз выше, чем в интактных культурах клеток линии

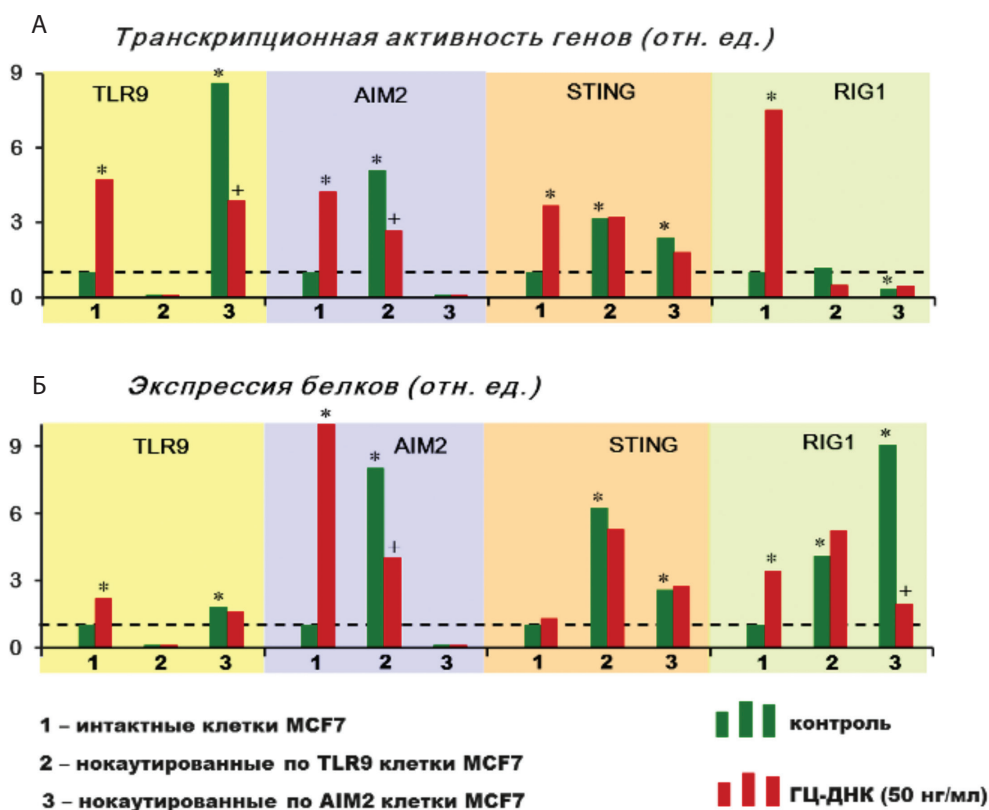
MCF7 ( $p < 0,001$ ). Уровень экспрессии гена *STING* в AIM2<sup>-/-</sup> клетках повышался в 2,4 раза ( $p < 0,01$ ). В то же время уровень экспрессии гена внутриклеточного РНК-сенсора *RIG1* в AIM2<sup>-/-</sup> клетках был приблизительно в 3 раза ниже, чем в интактных культурах MCF7 ( $p = 0,023$ ).

В присутствии фрагментов ГЦ-ДНК транскрипционная активность гена *TLR9* снижалась в 1,9 раза ( $p < 0,001$ ). При этом уровни транскрипционной активности генов *STING* и *RIG1* не претерпевали статистически значимых изменений.

Таблица

## Олигонуклеотиды, использованные в работе (Синтол, Россия)

Ген	Прямой праймер F (5'-3')	Обратный праймер R (3'-5')
<i>AIM2</i>	CAGAAATGATGTCGCAAAGCAA	TCAGTACCATAACTGGCAAACAG
<i>TLR9</i>	CCCACCTGTCACTCAAGTACA	GTGGCTGAAGGTATCGGGATG
<i>STING</i>	CCAGAGCACACTCTCCGGTA	CGCATTTGGGAGGGAGTAGTA
<i>RIG1</i>	GAGATTTTCCGCCTTGGCTAT	CCGTTTCACCTCTGCACTGTT
<i>NFkB</i>	CAGATGGCCCATACCTTCAAAT	CGGAAACGAAATCCTCTCTGTT
<i>MyD88</i>	GGCTGCTCTCAACATGCGA	TGTCCGCACGTTCAAGAACA
<i>STAT3</i>	GGGTGGAGAAGGACATCAGCGGTAA	GCCGACAATACTTTCCGAATGC
<i>STAT6</i>	GTCCGCCACTTGCCAATG	TGGATCTCCCCTACTCGGTG



**Рис. 2.** Транскрипционная активность генов (А) и уровень экспрессии белков (Б) сенсоров нуклеиновых кислот в нокаутированных культурах раковых клеток MCF7.

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактными не нокутированными клетками MCF7; + –  $p < 0,05$  по сравнению с культурами, не стимулированными ГЦ-ДНК.

По сравнению с интактными клетками MCF7, уровень синтеза белка TLR9 в AIM2<sup>-/-</sup> культурах был повышен в 1,8 раза ( $p=0,028$ ), уровень синтеза белка STING — в 3 раза ( $p<0,001$ ). Нокаутированные культуры, по сравнению с интактной, характеризовались высоким уровнем синтеза белка RIG1. Уровень этого белка был повышен в 9 раз ( $p<0,0001$ ).

Стимуляция фрагментами ГЦ-ДНК не оказывала существенного влияния на содержание белка TLR9 в AIM2<sup>-/-</sup> клетках, экспрессия белка STING также не изменялась, но содержание белка RIG1 падало в 4,6 раза ( $p=0,0011$ ).

### 3. Нокаутированные культуры TLR9<sup>-/-</sup>

В клетках, нокаутированных по TLR9 (TLR9<sup>-/-</sup>), транскрипционная активность гена AIM2 в 5 раз превосходила соответствующий параметр в интактных культурах ( $p<0,001$ ). Уровень экспрессии гена STING в TLR9<sup>-/-</sup> клетках повышался в 3,2 раза ( $p<0,01$ ). Транскрипционная активность гена RIG1 в TLR9<sup>-/-</sup> культурах не отличалась от таковой в интактных клетках.

В присутствии фрагментов ГЦ-ДНК транскрипционная активность гена AIM2 в нокаутированной культуре снижалась в 2,2 раза ( $p<0,001$ ). При этом уровни транскрипционной активности генов STING и RIG1 не претерпевали статистически значимых изменений.

По сравнению с интактными клетками MCF7, уровень синтеза белка AIM2 в TLR9<sup>-/-</sup> клетках был повышен в 8 раз ( $p=0,003$ ), уровень синтеза белка STING — в 6 раз ( $p<0,001$ ). В то же время по сравнению с интактными клетками в TLR9<sup>-/-</sup> культурах уровень белка RIG1 был повышен в 4 раза ( $p=0,003$ ).

Уровень синтеза белка AIM2 в TLR9<sup>-/-</sup> клетках при добавлении к среде культивирования фрагментов ГЦ-ДНК снижался в 2 раза ( $p=0,023$ ). Присутствие в среде культивирования фрагментов ГЦ-ДНК не оказывало статистически значимых эффектов на уровень синтеза белков STING и RIG1 в TLR9<sup>-/-</sup> клетках.

*Влияние ГЦ-ДНК на транскрипционную активность генов и уровень синтеза белков нуклеарных факторов NFkB, STAT3 и STAT6, а также гена адаптерного белка MyD88 в нокаутированных и интактной культурах раковых клеток MCF7*

#### 1. Интактная культура

Стимуляция ненокаутированных клеточных культур фрагментами ГЦ-ДНК приводила к повышению транскрипционной активности генов NFkB и MyD88, а также STAT3 и STAT6, соответственно, в 13,0 и 8,2 раза, а также в 5,2 и 2,8 раза (оба  $p<0,0001$ ) (рис. 3А).

Увеличение транскрипционной активности генов NFkB и STAT3 коррелировало с изменением уровня соответствующих белков (рис. 3Б). После добавления ГЦ-ДНК в ненокаутированные культуры MCF7 содержание белков NFkB и STAT3 в клетках повышалось, соответственно, в 2,0 и 2,2 раза (оба  $p<0,05$ ).

### 2. Нокаутированные культуры AIM2<sup>-/-</sup>

В культурах клеток MCF7, подвергшихся нокауту по гену AIM2, по сравнению с интактными (ненокаутированными) клетками было отмечено существенное повышение транскрипционной активности гена нуклеарного фактора NFkB, а также гена адаптерного белка MyD88 (рис. 3А). Так, уровень транскрипционной активности гена NFkB в AIM2<sup>-/-</sup> клетках был в 3,8 раза выше, чем в интактных культурах MCF7 ( $p<0,001$ ). Транскрипционная активность гена MyD88 в AIM2<sup>-/-</sup> культуре была повышена в 3,2 раза ( $p<0,001$ ). Транскрипционная активность генов нуклеарных факторов STAT3 и STAT6 в AIM2<sup>-/-</sup> клетках статистически не отличалась от таковой в интактной культуре.

В AIM2<sup>-/-</sup> клетках, стимулированных ГЦ-ДНК, транскрипционная активность гена MyD88 умеренно возрастала (в 1,2 раза), а уровень транскрипционной активности гена NFkB не претерпевал существенных изменений. В присутствии фрагментов ГЦ-ДНК транскрипционная активность гена STAT6 в AIM2<sup>-/-</sup> культурах снижалась в 1,7 раза по сравнению с ненокаутированными клетками, в то время как уровень экспрессии гена STAT3 не претерпевал существенных изменений.

В AIM2<sup>-/-</sup> клетках количество белка NFkB было немного ниже, чем в интактных культурах, при этом статистически значимых различий обнаружено не было (см. рис. 3Б). Количество белка STAT3 было немного выше, чем в интактной культуре, при этом статистически значимых различий также не было обнаружено.

Содержание белка NFkB в нокаутированной культуре, подвергшейся воздействию фрагментов ГЦ-ДНК, не претерпевало существенных изменений и было статистически значимо ниже количества NFkB в не нокаутированных клетках MCF7, стимулированных ГЦ-ДНК ( $p<0,05$ ). Содержание белка STAT3 в клетках AIM2<sup>-/-</sup>, подвергшихся воздействию фрагментов ГЦ-ДНК, также не претерпевало существенных изменений.

### 3. Нокаутированные культуры TLR9<sup>-/-</sup>

В культурах клеток MCF7, подвергшихся нокауту по гену TLR9, по сравнению с интактными (ненокаутированными) клетками было отмечено существенное повышение транскрипционной активности гена нуклеарного фактора NFkB, а также гена адаптерного белка MyD88 (рис. 3А). Так, уровень транскрипци-

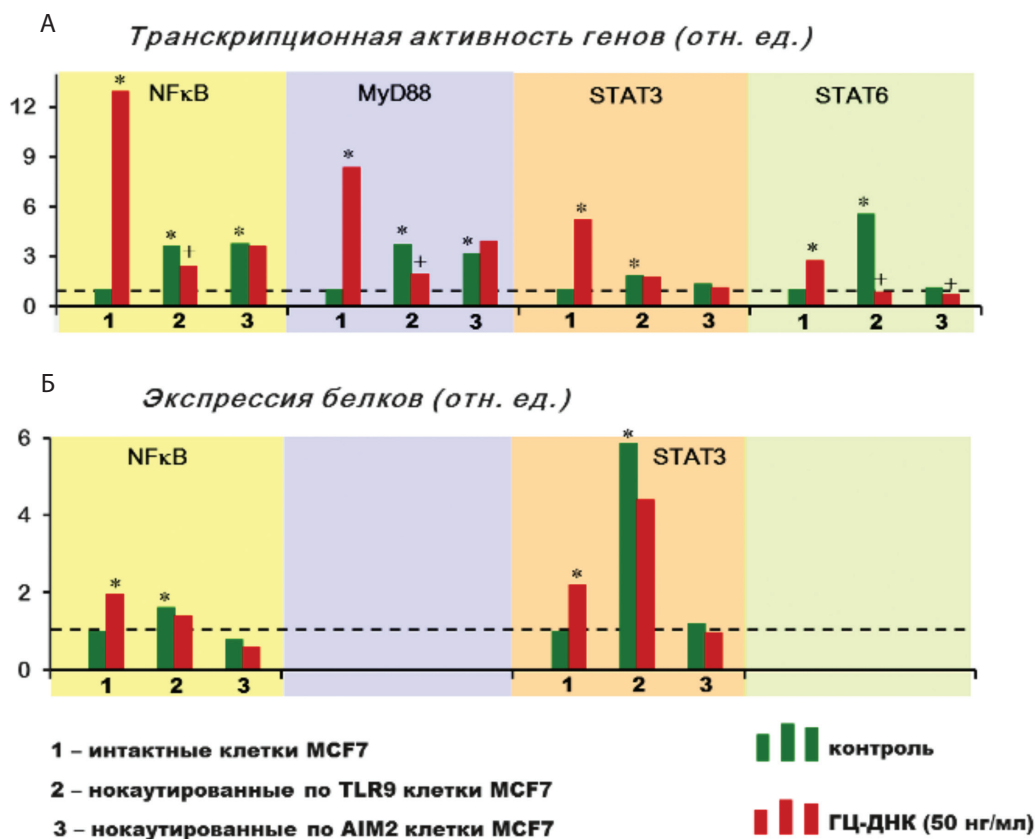
онной активности гена *NfκB* в TLR9<sup>-/-</sup> клетках был, соответственно, в 3,6 раза выше, чем в интактных культурах MCF7, а транскрипционная активность гена *MyD88* была повышена в 3,7 раза (оба  $p < 0,001$ ). Транскрипционная активность генов нуклеарных факторов *STAT3* и *STAT6* в TLR9<sup>-/-</sup> клетках была статистически значимо выше не только соответствующих параметров в интактных (ненокаутированных) культурах, но и в AIM2<sup>-/-</sup> клетках (оба  $p < 0,05$ ).

В присутствии фрагментов ГЦ-ДНК в TLR9<sup>-/-</sup> клетках уровень транскрипционной активности генов *NfκB* и *MyD88* снижался, соответственно, в 1,5 и 2,0 раза (оба  $p < 0,01$ ), транскрипционная активность гена *STAT6* в TLR9<sup>-/-</sup> культуре снижалась в 6,4 раза по сравнению с не нокаутированными клетками, в то время как уровень экспрессии гена *STAT3* не претерпевал существенных изменений.

В TLR9<sup>-/-</sup> клетках уровень синтеза белка NFκB соответствовал повышенной транскрипционной актив-

ности соответствующего гена (рис. 3Б). Сходным образом, уровень синтеза белка STAT3 в TLR9<sup>-/-</sup> клетках был приблизительно в 5 раз выше не только уровня синтеза этого белка в ненокаутированных культурах, но и в AIM2<sup>-/-</sup> клетках (оба  $p < 0,001$ ).

Содержание белка NFκB в TLR9<sup>-/-</sup> клетках, подвергшихся воздействию фрагментов ГЦ-ДНК, не претерпевало существенных изменений и было статистически значимо ниже количества NFκB в ненокаутированных клетках MCF7, стимулированных ГЦ-ДНК (оба  $p < 0,05$ ). Аналогично, содержание белка STAT3 в нокаутированных культурах, подвергшихся воздействию фрагментов ГЦ-ДНК, не претерпевало существенных изменений. Но, как видно на рисунке 3Б, содержание белка STAT3 в нестимулированных и стимулированных TLR9<sup>-/-</sup> культурах было статистически значимо выше, чем уровень данного белка не только в ненокаутированных культурах MCF7, но и в AIM2<sup>-/-</sup> клетках.



**Рис. 3.** Исследование транскрипционной активности генов нуклеарных факторов *NfκB*, *STAT3* и *STAT6*, а так же гена адаптерного белка *MyD88* в нокаутированных культурах раковых клеток MCF7.

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактными ненокаутированными клетками MCF7; + –  $p < 0,05$  по сравнению с культурами, не стимулированными ГЦ-ДНК.



## Обсуждение

### *Повышение транскрипционной активности генов ДНК-сенсоров в нокаутированных культурах клеток MCF7*

Ранее нами было проведено исследование, в котором сообщалось, что фрагменты ГЦ-ДНК подавляют экспрессию AIM2 [15]. Было показано, что с увеличением экспрессии *TLR9* заметно подавляется экспрессия гена внутрицитоплазматического рецептора *AIM2*. В этой же работе для изучения взаимосвязи уровней экспрессии этих двух генов ДНК-сенсоров мы использовали siRNA [15]. Было обнаружено, что при использовании siPHK, подавляющей экспрессию *TLR9*, значительно увеличивались как транскрипционная активность гена *AIM2*, так и уровень накопления его белка. При этом нам не удалось выявить выраженный обратный эффект: использование siPHK, подавляющей экспрессию *AIM2*, не приводило к какому-либо существенному изменению экспрессии гена *TLR9*, но содержание белка TLR9 несколько увеличилось. В настоящей работе с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 показано, что в клетках *TLR9*<sup>-/-</sup> существенно увеличивались как транскрипционная активность гена *AIM2*, так и уровень накопления соответствующего белка. В клетках *AIM2*<sup>-/-</sup> мы наблюдали ту же картину: увеличивалась как транскрипционная активность гена *TLR9*, так и уровень накопления соответствующего белка. Это позволяет подтвердить сделанный нами ранее вывод о взаимосвязи экспрессии генов-рецепторов ДНК *TLR9* и *AIM2*, а также отметить более высокую информативную эффективность технологии системы редактирования генома CRISPR/Cas9 по сравнению с методикой РНК-интерференции экспрессии генов с использованием siPHK.

Стимуляция ГЦ-ДНК в интактных клетках повышает экспрессию всех генов сенсоров нуклеиновых кислот. В то же время в нокаутированных клетках при добавлении ГЦ-ДНК, напротив, наблюдается уменьшение транскрипционной активности гена *TLR9* в клетках *AIM2*<sup>-/-</sup>, и, соответственно, транскрипционной активности гена *AIM2* в клетках *TLR9*<sup>-/-</sup> по сравнению с нестимулированными нокаутированными культурами. Эта же закономерность наблюдается и в уровнях накопления соответствующих белков.

STING (stimulator of interferon genes) работает как в качестве прямого цитозольного ДНК-сенсора, так и в качестве адаптивного белка в интерфероне типа I, сигнализирующего через различные молекулярные механизмы [32]. STING определен как центральная молекула сигналинга врожденного иммунного ответа к цитозольным нуклеиновым кислотам. STING опосредует выработку интерферона I типа в ответ на внутрикле-

точную ДНК и различные внутриклеточные патогены [33]. С момента своего открытия 12 лет назад STING-сигнальный путь привлек пристальное внимание ведущих клеточных биологов, биохимиков и структурных биологов благодаря своим уникальным механизмам активации и важному значению в канцерогенезе, процессах старения и аутоиммунитете [34]. STING-сигнальный путь является важным врожденным иммунным сигнальным каскадом, ответственным за восприятие аберрантной цитозольной двухцепочечной ДНК, которая является признаком рака и вирусной инфекции. В культурах, нокаутированных как по гену *AIM2*, так и по гену *TLR9*, значительно повышались как транскрипционная активность этого гена, так и уровень экспрессии белка по сравнению с интактной культурой. При этом добавление ГЦ-ДНК существенно не меняло эти два показателя.

RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) – рецептор цитозольного распознавания, который инициирует врожденный противовирусный иммунитет путем обнаружения экзогенных вирусных РНК [35]. Хотя транскрипционная активность гена *RIG1* в клетках *AIM2*<sup>-/-</sup> была существенно ниже, а в клетках *TLR9*<sup>-/-</sup> практически не отличалась от таковой в интактных, но уровень синтеза белка в обеих нокаутированных культурах был существенно выше, чем в интактной. Стимуляция нокаутированных культур ГЦ-ДНК практически не изменяла ни транскрипционную активность этого гена, ни уровень экспрессии белка. Лишь в клетках *AIM2*<sup>-/-</sup> уровень накопления белка RIG1 при этом существенно падал.

Таким образом, обнаруженное нами существенное повышение транскрипционной активности генов ДНК-сенсоров в культурах клеток MCF7, подвергшихся нокаутированию по генам *TLR9* и *AIM2*, по сравнению с интактными (не нокаутированными) клетками несет, скорее всего, компенсаторный характер.

### *Исследование транскрипционной активности генов нуклеарных факторов NFkB, STAT3 и STAT6, а так же гена адаптерного белка MyD88*

Транскрипционные факторы семейства NF-kB и STAT3 контролируют многочисленные физиологические процессы, включая развитие, дифференцировку, иммунитет, метаболизм, развитие и прогрессирование многих видов рака.

Активация и взаимодействие STAT3 и NF-kB играют ключевую роль во взаимоотношениях между злокачественной клеткой и ее микроокружением, особенно с воспалительными/иммунными клетками, которые инфильтрируют опухоли [36]. В ответ на NF-kB в иммунных клетках опухолевого микроокружения экспрессируются цитокины, что приводит к актива-

ции STAT3 как в злокачественных, так и в иммунных клетках [37].

В предыдущем исследовании было показано, что ГЦ-ДНК стимулирует TLR9/MYD88/NF- $\kappa$ B сигнальный путь [15]. В настоящей работе мы еще раз подтвердили это стимуляцией ненокаутированных клеточных культур фрагментами ГЦ-ДНК, что приводило к существенному повышению транскрипционной активности генов *NFkB* и *MyD88*, а также *STAT3* и *STAT6*, а также к увеличению уровня экспрессии белков NFkB и STAT3.

В клетках по сравнению с интактными клетками было выявлено существенное повышение активности генов *NFkB* и *MyD88*, тогда как активность генов нуклеарных факторов *STAT3* и *STAT6* статистически не отличалось от таковой в интактной культуре. При этом содержание белка NFkB и STAT3 в AIM2<sup>-/-</sup> культурах статистически не изменялось. При стимуляции AIM2<sup>-/-</sup> клеток ГЦ-ДНК возрастала активность гена *MyD88*, транскрипционная активность гена *STAT6* снижалась, а активность других исследуемых генов не претерпевала существенных изменений. При стимуляции ГЦ-ДНК содержание белков NFkB и STAT3 в AIM2<sup>-/-</sup> клетках так же статистически не изменялось.

При этом в TLR9<sup>-/-</sup> клетках так же отмечалось существенное повышение транскрипционной активности гена нуклеарного фактора *NFkB*, а также гена адаптерного белка *MyD88* и генов нуклеарных факторов *STAT3* и *STAT6* по сравнению с интактной культурой. При стимуляции культур ГЦ-ДНК уровень транскрипционной активности всех этих генов, кроме *STAT3*, значительно снижался. Уровни экспрессии белков NFkB и STAT3 в нокаутированных культурах соответствовали повышенной транскрипционной активности соответствующих генов, но при воздействии ГЦ-ДНК они существенно не изменялись. В присутствии фрагментов ГЦ-ДНК в TLR9<sup>-/-</sup> клетках уровень транскрипционной активности генов *NFkB* и *MyD88* снижался, соответственно, в 1,5 и 2,0 раза (оба  $p < 0,01$ ), транскрипционная активность гена *STAT6* в TLR9<sup>-/-</sup> культуре снижалась в 6,4 раза по сравнению с не нокаутированными клетками, в то время как уровень экспрессии гена STAT3 не претерпевал существенных изменений.

Таким образом, нокаутированные культуры TLR9<sup>-/-</sup> в отличие от интактных клеток реагируют на стимуляцию ГЦ-ДНК уменьшением транскрипционной активности генов нуклеарных факторов *NFkB*, *STAT6*, а также гена адаптерного белка *MyD88*.

### Заключение

Ранее нами была выдвинута гипотеза о роли ГЦ-богатых фрагментов вДНК в развитии толерантности

раковых клеток к проводимой терапии [15]. При помощи технологии системы редактирования генома CRISPR/Cas9 были получены культуры клеток MCF7, нокаутированные по генам рецепторов *TLR9* (*TLR9*<sup>-/-</sup>) и *AIM2* (*AIM2*<sup>-/-</sup>), которые не экспрессировали нокаутные гены, но характеризовались высокой перекрестной транскрипционной активностью генов адаптеров нуклеиновых кислот, генов нуклеарных факторов и гена адаптерного белка. Мы показали, что в отличие от интактных (ненокаутированных) клеточных культур, культуры MCF7 с «выключенными» рецепторами TLR9 и AIM2 отвечают на стимуляцию фрагментами ГЦ-ДНК снижением активности ряда сигнальных каскадов, повышающих выживаемость раковых клеток. Данный факт показывает необходимость дальнейших исследований роли других генов, в том числе и на примере линий клеток с нокаутами по TLR9 и AIM2, в плане детализации механизмов отмеченных в данной работе эффектов по выживаемости раковых клеток.

### Литература

1. Stewart C.M., Kothari P.D., Mouliere F. et al. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627.
2. Niu Z., Tang W., Liu T. et al. Cell-free DNA derived from cancer cells facilitates tumor malignancy through Toll-like receptor 9 signaling-triggered interleukin-8 secretion in colorectal cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018 Oct 1;50(10):1007-1017.
3. Jahr S., Hentze H., Englisch S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1659-65.
4. Spindler K.G., Boysen A.K., Pallisgård N. et al. Cell-free DNA in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist.* 2017 Sep;22(9):1049-1055.
5. Suzuki N., Kamataki A., Yamaki J., Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008 Jan;387(1-2):55-8.
6. Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
7. Kozhina E.A., Ershova E.S., Okorokova N.A. et al. 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 Nov 3;2019:7853492.
8. Alvarado-Vásquez N. Circulating cell-free mitochondrial DNA as the probable inducer of early endothelial dysfunction in the prediabetic patient. *Exp Gerontol.* 2015 Sep;69:70-8.
9. Tuboly E., McIlroy D., Briggs G. et al. Clinical implications and pathological associations of circulating mitochondrial DNA. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017 Jan 1;22:1011-1022.
10. Вейко Н.Н., Булычева Н.В., Рогинко О.А., Вейко Р.В., Ершова Е.С., Коздoba 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; 54(1): 78-93.
11. Veiko N.N., Shubaeva N.O., Ivanova S.M. et al. Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bull Exp Biol Med.* 2006 Sep;142(3):313-6.

12. Вейко, Н. Н., Конорова, И. Л., Неверова, М. Е., Фиделина, О. В., Мкртумова, Н. А., Ершова, Е. С., Постнов, А. Ю., Конькова, М. С. Влияние CpG - богатых фрагментов ДНК на формирование гипертензии у спонтанно-гипертензивных крыс (SHR). *Биомедицинская химия* 2010; 56(6): 686-699.
13. Korzeneva I.B., Kostuyk S.V., Ershova E.S. et al. Human circulating ribosomal DNA content significantly increases while circulating satellite III (1q12) content decreases under chronic occupational exposure to low-dose gamma- neutron and tritium beta-radiation. *Mutat Res.* 2016 Sep - Oct;791-792:49-60.
14. Честков И.В., Вейко Н.Н., Ершова Е.С., Сергеева В.А., Вейко Р.В., Ижевская В.Л., Костюк С.В. 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. *Медицинская генетика.* 2016; 15(1):43-50.
15. Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Okorokova N.A. et al. Ribosomal DNA as DAMP signal for MCF7 cancer cells. *Front Oncol.* 2019 May 30;9:445.
16. 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 Oct 17;8(10):e77469.
17. Kostyuk S., Smirnova T., Kameneva L. et al. 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.
18. He L., Liu Y., Lai W. et al. DNA sensors, crucial receptors to resist pathogens, are deregulated in colorectal cancer and associated with initiation and progression of the disease. *J Cancer* 2020; 11(4):893-905.
19. Li T.T., Ogino S., Qian Z.R. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. *World J Gastroenterol.* 2014;20:17699-708.
20. Sipos .F, Furi I., Constantinovits M., Tulassay Z., Muzes G. Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:12713-21.
21. Man S.M., Zhu Q., Zhu L. et al. Critical role for the DNA sensor AIM2 in stem cell proliferation and cancer. *Cell.* 2015;162:45-58.
22. Chen J., Wang Z., Yu S. AIM2 regulates viability and apoptosis in human colorectal cancer cells via the PI3K/Akt pathway. *Onco Targets Ther.* 2017;10:811-7.
23. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000 Dec 7;408(6813):740-5.
24. Yasuda K., Richez C., Uccellini M.B. et al. Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic cell activation induced by DNA-containing immune complexes. *J Immunol.* 2009 Sep 1;183(5):3109-17.
25. Väisänen M.R., Jukkola-Vuorinen A., Vuopala K.S., Selander K.S., Vaarala M.H. Expression of Toll-like receptor-9 is associated with poor progression-free survival in prostate cancer. *Oncol Lett.* 2013 May;5(5):1659-1663.
26. Zhang Y., Wang Q., Ma A., Li Y., Li R., Wang Y. Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. *Oncol Rep.* 2014 May;31(5):2298-304.
27. Herrmann A., Cherryholmes G., Schroeder A. et al. TLR9 is critical for glioma stem cell maintenance and targeting. *Cancer Res.* 2014 Sep 15;74(18):5218-28.
28. Barrat F.J., Meeker T., Gregorio J. et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005 Oct 17;202(8):1131-9.
29. Wang W., Kong P., Ma G. et al. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget.* 2017 Jun 27;8(26):43180-43191.
30. Sharma B.R., Karki R., Kanneganti T.D. Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. *Eur J Immunol.* 2019 Nov;49(11):1998-2011.
31. Chen P.A., Shrivastava G., Balcom E.F. et al. Absent in melanoma 2 regulates tumor cell proliferation in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2019 Sep;144(2):265-273.
32. Burdette D.L., Russell V.E. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol.* 2013 Jan;14(1):19-26.
33. Barber G.N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol.* 2011 Feb;23(1):10-20.
34. Ergun S.L., Li L. Structural insights into STING signaling. *Trends Cell Biol.* 2020 May;30(5):399-407.
35. Xu X.X., Wan H., Nie L. et al. RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor. *Protein Cell.* 2018 Mar;9(3):246-253.
36. Grivennikov S.I., Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- $\kappa$ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Feb;21(1):11-9.
37. Cui J., Chen Y., Wang H.Y., Wang R.F. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(11):3270-85.

## References

1. Stewart C.M., Kothari P.D., Mouliere F. et al. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627.
2. Niu Z., Tang W., Liu T. et al. Cell-free DNA derived from cancer cells facilitates tumor malignancy through Toll-like receptor 9 signaling-triggered interleukin-8 secretion in colorectal cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018 Oct 1;50(10):1007-1017.
3. Jahr S., Hentze H., Englisch S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1659-65.
4. Spindler K.G., Boysen A.K., Pallisgård N. et al. Cell-free DNA in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist.* 2017 Sep;22(9):1049-1055.
5. Suzuki N., Kamataki A., Yamaki J., Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008 Jan;387(1-2):55-8.
6. Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
7. Kozhina E.A., Ershova E.S., Okorokova N.A. et al. 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 Nov 3;2019:7853492.
8. Alvarado-Vásquez N. Circulating cell-free mitochondrial DNA as the probable inducer of early endothelial dysfunction in the prediabetic patient. *Exp Gerontol.* 2015 Sep;69:70-8.
9. Tuboly E., McIlroy D., Briggs G. et al. Clinical implications and pathological associations of circulating mitochondrial DNA. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017 Jan 1;22:1011-1022.
10. Veiko N.N., Bulycheva N.V., Roginko O.A. et al. Fragmenty transkribiruyemoy oblasti ribosomnogo povtora v sostave vnekletочноy DNK - marker gibeli kletok organizma [Ribosomal repeat in the cell free DNA as a marker for cell death]. *Biomeditsinskaya khimiya [Biomed Khim.]* 2008 Jan-Feb;54(1):78-93. (in Russ.)
11. Veiko N.N., Shubaeva N.O., Ivanova S.M. et al. Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bull Exp Biol Med.* 2006 Sep;142(3):313-6.



12. Veiko N.N., Konorova I.L., Neverova M.E. et al. Vliyaniye CpG - bogatykh fragmentov DNK na formirovaniye gipertenzii u spontanno-gipertenzivnykh kryis (SHR) [Delayed appearance of hypertension in spontaneously hypertensive rat (SHR) injected with CpG-rich DNA early in ontogenesis]. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomed Khim.] 2010 Nov-Dec;56(6):686-99. (In Russ.)
13. Korzeneva I.B., Kostuyk S.V., Ershova E.S. et al. Human circulating ribosomal DNA content significantly increases while circulating satellite III (1q12) content decreases under chronic occupational exposure to low-dose gamma- neutron and tritium beta-radiation. *Mutat Res.* 2016 Sep - Oct;791-792:49-60.
14. Chestkov I.V., Veiko N.N., Ershova E.S. et al. Metod analiza chisla kopiy GC-bogatykh povtoryayushchikhsya posledovatel'nostey genoma v sostave povrezhdennoy DNK. Opredeleniye uvelichennoy soderzhaniya ribosomnykh genov v tsirkuliruyushchey vnekletochnoy DNK lits s dlitel'nyim stazhem kureniya tabaka [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]. *Meditsinskaya genetika* [Medical genetics]. 2016;15:43-50. (In Russ.)
15. Malinovskaya E.M., Ershova E.S., Okorokova N.A. et al. Ribosomal DNA as DAMP signal for MCF7 cancer cells. *Front Oncol.* 2019 May 30;9:445.
16. Kostuyk 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 Oct 17;8(10):e77469.
17. Kostuyk S., Smirnova T., Kameneva L. et al. 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.
18. He L., Liu Y., Lai W. et al. DNA sensors, crucial receptors to resist pathogens, are deregulated in colorectal cancer and associated with initiation and progression of the disease. *J Cancer* 2020; 11(4):893-905.
19. Li T.T., Ogino S., Qian Z.R. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. *World J Gastroenterol.* 2014;20:17699-708.
20. Sipos F., Furi I., Constantinovits M., Tulassay Z., Muzes G. Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:12713-21.
21. Man S.M., Zhu Q., Zhu L. et al. Critical role for the DNA sensor AIM2 in stem cell proliferation and cancer. *Cell.* 2015;162:45-58.
22. Chen J., Wang Z., Yu S. AIM2 regulates viability and apoptosis in human colorectal cancer cells via the PI3K/Akt pathway. *Onco Targets Ther.* 2017;10:811-7.
23. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000 Dec 7;408(6813):740-5.
24. Yasuda K., Richez C., Uccellini M.B. et al. Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic cell activation induced by DNA-containing immune complexes. *J Immunol.* 2009 Sep 1;183(5):3109-17.
25. Väisänen M.R., Jukkola-Vuorinen A., Vuopala K.S., Selander K.S., Vaarala M.H. Expression of Toll-like receptor-9 is associated with poor progression-free survival in prostate cancer. *Oncol Lett.* 2013 May;5(5):1659-1663.
26. Zhang Y., Wang Q., Ma A., Li Y., Li R., Wang Y. Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. *Oncol Rep.* 2014 May; 31(5):2298-304.
27. Herrmann A., Cherryholmes G., Schroeder A. et al. TLR9 is critical for glioma stem cell maintenance and targeting. *Cancer Res.* 2014 Sep 15;74(18):5218-28.
28. Barrat F.J., Meeker T., Gregorio J. et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005 Oct 17;202(8):1131-9.
29. Wang W., Kong P., Ma G. et al. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget.* 2017 Jun 27;8(26):43180-43191.
30. Sharma B.R., Karki R., Kanneganti T.D. Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. *Eur J Immunol.* 2019 Nov;49(11):1998-2011.
31. Chen P.A., Shrivastava G., Balcom E.F. et al. Absent in melanoma 2 regulates tumor cell proliferation in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2019 Sep;144(2):265-273.
32. Burdette D.L., Russell V.E. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol.* 2013 Jan;14(1):19-26.
33. Barber G.N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIM2 and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol.* 2011 Feb;23(1):10-20.
34. Ergun S.L., Li L. Structural insights into STING signaling. *Trends Cell Biol.* 2020 May;30(5):399-407.
35. Xu X.X., Wan H., Nie L. et al. RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor. *Protein Cell.* 2018 Mar;9(3):246-253.
36. Grivennikov S.I., Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- $\kappa$ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Feb;21(1):11-9.
37. Cui J., Chen Y., Wang H.Y., Wang R.F. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(11):3270-85.