

**НОКАУТИРОВАННЫЕ ПО TLR9 И AIM2 КЛЕТКИ MCF7 КАК  
МОДЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ,  
ИНИЦИИРУЕМЫХ ГЦ-ОБОГАЩЕННЫМИ ФРАГМЕНТАМИ ДНК**

© **Е.М. Малиновская<sup>1</sup>, Е.А. Кожина<sup>1</sup>, Е.С. Ершова<sup>1</sup>, М.С. Конькова<sup>1</sup>,  
В.П. Вейко<sup>1,2</sup>, П.А. Бобровский<sup>3</sup>, В.Н. Лазарев<sup>3</sup>, Л.В. Каменева<sup>1</sup>,  
В.М. Писарев<sup>4</sup>, Н.Н. Вейко<sup>1</sup>, С.В. Костюк<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>*Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова,  
г. Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук,  
г. Москва, Россия*

<sup>3</sup>*Физико-химической медицины ФМБА, России, г. Москва, Россия*

<sup>4</sup>*Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В.А.  
Неговского ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр  
реаниматологии и реабилитологии», г. Москва, Россия*

*Открытие технологии генного редактирования CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated 9) послужило настоящей революцией в области генной инженерии. Технология открыла новые подходы к изучению сигнальных молекул микроокружения опухоли, запускающих цитопротективные системы в клетках, участвующие в химио- и радиорезистентности. В настоящей работе исследовали изменение транскрипционной активности генов репарации BRCA1 и BRCA2 в интактных и нокаутированных по TLR9 или AIM2 клетках линии MCF7 под воздействием ГЦ-богатых фрагментов ДНК. Обнаружено, что в культурах раковых клеток MCF7 с «молчащими» рецепторами ГЦ-богатой внеклеточной ДНК (ГЦ-ДНК) – в*

*условиях нокаута по TLR9 AIM2 - добавление ГЦ-ДНК существенно снижало уровень экспрессии генов репарации ДНК – BRCA1 и BRCA2.*

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

## **TLR9 AND AIM2 KNOCKED OUT MCF7 CELLS AS A MODEL FOR STUDYING SIGNALING PATHWAYS INITIATED BY GC-RICH DNA FRAGMENTS**

**© E.M. Malinovskaya<sup>1</sup>, E.A. Kozhina<sup>1</sup>, E.S. Ershova<sup>1</sup>, M.S. Konkova<sup>1</sup>, V.P. Veiko<sup>1,2</sup>, P.A. Bobrovsky<sup>3</sup>, V.N. Lazarev<sup>3</sup>, L.V. Kameneva<sup>1</sup>, V.M. Pisarev<sup>4</sup>, N.N. Veiko<sup>1</sup>, S.V. Kostyuk<sup>1,4</sup>.**

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Institution Federal Research and Clinical Center of physical-chemical medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>4</sup> V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow, Russia

***Summery.** The discovery of CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated 9) gene editing technology has revolutionized the field of genetic engineering. The technology has opened up new approaches to the study of signaling molecules in the tumor microenvironment that trigger cytoprotective systems in cells involved in chemo- and radioresistance. In this work, we investigated the change in the transcriptional activity of the BRCA1 and BRCA2 repair genes in intact and TLR9 or AIM2 knockout MCF7 cells under the influence of GC-rich DNA fragments. It was found that in cultures of MCF7 cancer cells with “silent”*

*receptors of GC-rich extracellular DNA (GC-DNA) - under TLR9 AIM2 knockout conditions - the addition of GC-DNA significantly reduced the expression level of DNA repair genes - BRCA1 and BRCA2.*

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

Внеклеточной циркулирующей ДНК (вкДНК) называют свободно циркулирующие фрагменты ДНК погибших клеток. При некоторых заболеваниях, в том числе, онкологических, в общем пуле вкДНК благодаря устойчивости к действию нуклеаз крови накапливаются ГЦ-обогащенные фрагменты. В крови больных раком молочной железы накапливаются фрагменты гуанидин-цитидин-богатой транскрибируемой области рибосомного повтора (ГЦ-ДНК), устойчивые к действию нуклеаз крови [1]. Несмотря на интенсивные исследования ГЦ-ДНК при онкологических заболеваниях [2], спектр биологической активности ГЦ-ДНК в отношении раковых клеток остается до конца не выясненным.

Ранее нами было показано, что ГЦ-ДНК выступает в отношении клеток MCF7 в роли DAMPs (damage-associated molecular patterns), вызывая в концентрации 10-300 нг/мл адаптивный ответ раковых клеток - повышение их жизнеспособности и толерантности к внешним повреждающим воздействиям [1, 3]. ДНК-сенсоры TLR9 и AIM2 в клетках MCF7 выполняют противоположные функции, способствуя выживанию клеток (активация TLR9-MyD88-NF- $\kappa$ B-сигнального пути), либо их гибели путем индукции апоптоза, соответственно [3].

Благодаря использованию экспериментального подхода - нокаута этих двух типов ДНК-сенсоров, в работе была обнаружена связь воздействия ГЦ-богатых фрагментов ДНК и экспрессии генов репарации *BRCA I* и *BRCA II*, которая менялась в зависимости от «выключения» генов TLR9 и AIM2.

## Материалы и методы

В экспериментах *in vitro* была использована культура клеток MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека) из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ». С помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 был осуществлен нокаут генов рецепторов TLR9 и AIM2 в клетках линии MCF7 и получено четыре клон клеток MCF7, нокаутированных по гену *TLR9* (*TLR9*<sup>-/-</sup>), и два клон клеток MCF7, нокаутированных по гену *AIM2* (*AIM2*<sup>-/-</sup>). Интактные и нокаутированные клетки культивировали в присутствии ГЦ-ДНК (50 нг/мл) в течение трех часов. По окончании инкубации из клеток выделяли РНК и методом ПЦР в реальном времени определяли уровень транскрипционной активности генов *BRCA1* и *BRCA2* с использованием прибора StepOnePlus («Applied Biosystems», США). Эксперименты повторяли не менее трех раз. Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph.

## Результаты

В *TLR9*<sup>-/-</sup> клетках уровень экспрессии генов *BRCA1* и *BRCA2* была, в 2,7 и 5,1 раза выше, чем в интактных культурах MCF7, соответственно, ( $p < 0,01$ ). В *AIM2*<sup>-/-</sup> клетках уровень экспрессии гена *BRCA2* был повышен в 5,8 раза, а уровень экспрессии гена *BRCA1*, напротив, был в 2,5 раза ниже, чем в интактных культурах MCF7 (оба  $p < 0,01$ ).

Стимуляция не нокаутированных клеточных культур фрагментами ГЦ-ДНК приводила к повышению транскрипционной активности генов репарации *BRCA1* и *BRCA2*, соответственно, в 1,6 и 12,2 раза (все  $p < 0,05$ ).

Как видно на рисунке, в *TLR9*<sup>-/-</sup> клетках в присутствии фрагментов ГЦ-ДНК уровни транскрипционной активности генов *BRCA1* и *BRCA2* снижались, соответственно, в 3,0, в 10,3 (оба  $p < 0,001$ ).

В *AIM2*<sup>-/-</sup> клетках, стимулированных ГЦ-ДНК, транскрипционная активность гена *BRCA1* возрастала в 2 раза ( $p = 0,014$ ). В то же время

уровень экспрессии гена *BRCA2* в этих клетках снижался, соответственно, в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ).

Данные представлены в условных единицах; (1) – интактные клетки MCF7; (2) – *TLR9*<sup>-/-</sup> клетки MCF7; (3) – *AIM2*<sup>-/-</sup> клетки MCF7; черные столбцы - необработанные клетки, серые столбцы – клетки через 3 часа после добавления ГЦ-ДНК (50 нг/мл); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактными клетками MCF7; + –  $p < 0,05$  по сравнению с культурами, не обработанными ГЦ-ДНК.

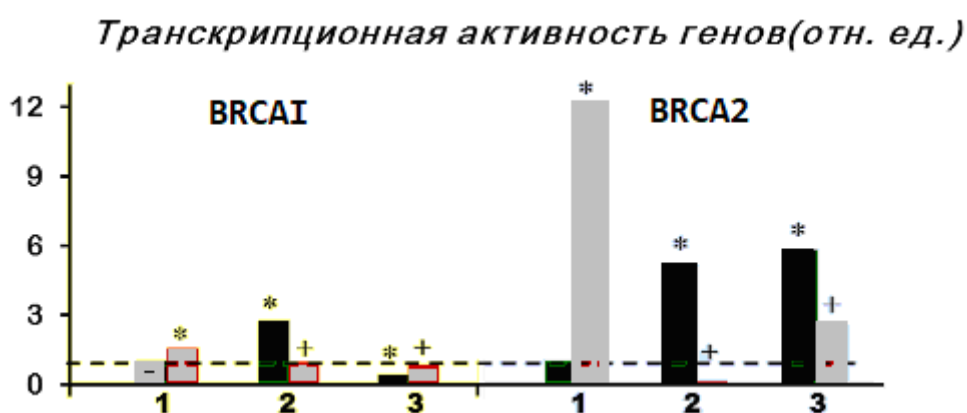


Рисунок 1. Транскрипционная активность генов маркеров репарации BRCA1 и BRCA2 в нокаутированных культурах клеток MCF7.

### Обсуждение

*BRCA1* и *BRCA2* являются наиболее известными генами, экспрессия которых существенна для поддержания стабильности генома клеток рака молочной железы и рака яичников. Они играют решающую роль в репарации ДНК и регуляции транскрипции, принимая участие в восстановлении двуцепочечных разрывов ДНК [4]. Главным образом, они участвуют в поддержании целостности генома в ответ на повреждение ДНК с помощью различных механизмов [5]. В недавнем исследовании показано, что уровни экспрессии мРНК *BRCA1* и *BRCA2* повышены в тканях рака молочной железы и рака яичников по сравнению с контролем [6].

Повышение транскрипционной активности генов репарации *BRCA1* и *BRCA2* при стимуляции не нокаутированных клеточных культур фрагментами ГЦ-ДНК доказывает наше предположение о том, что ГЦ-богатые фрагменты в составе вкДНК участвуют в развитии резистентности раковых клеток к проводимой терапии. При этом в нокаутированных культурах в присутствии фрагментов ГЦ-ДНК уровень транскрипционной активности данных генов был существенно ниже уровня экспрессии этих генов в не нокаутированных клетках MCF7, стимулированных ГЦ-ДНК (оба  $p < 0,001$ ).

**Заключение.** В отличие от интактных клеточных культур, культуры MCF7 с «выключенными» рецепторами TLR9 и AIM2 отвечают на стимуляцию фрагментами ГЦ-ДНК снижением экспрессии генов, повышающих выживаемость раковых клеток.

#### **Благодарности**

Авторы выражают благодарность В.Н. Лазареву и П.А. Бобровскому (ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России) за предоставленные нокаутированные культуры клеток MCF7.

**Финансовая поддержка. Работа выполнена в рамках проекта № 0517-2018-0003 программы Президиума РАН (культуры нокаутированных клеток) и РФФИ 17-29-06017 офи\_м (создание генетических конструкций для исследований интактных и нокаутированных клеток MCF7).**

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Ribosomal DNA as DAMPs signal for MCF7 cancer cells / E.M. Malinovskaya [et al.] // Front Oncol. – 2019. – Vol. 9. – P. 445.
2. Role of circulating cell-free DNA in cancers / R. Aarthy [et al.] // Mol. Diagn. Ther. – 2015. – V. 19, № 6. – P. 339-350.

3. Extracellular DNA containing (dG)n motifs penetrates into MCF7 breast cancer cells, induces the adaptive response, and can be expressed / E.A. Kozhina [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 7853492.

4. BRCA1 and BRCA2 gene expression: diurnal variability and influence of shift work / M. Bracci [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11, № 8. – P. 1146.

5. BRCA1 and BRCA2 expression patterns and prognostic significance in digestive system cancers / G.-H. Wang [et al.] // *Hum Pathol.* – 2018. – Vol. 71. – P. 135-144

6. Expression and mutations of BRCA in breast cancer and ovarian cancer: Evidence from bioinformatics analyses / Z. Wang [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2018. – Vol. 42, № 6. – P. 3542-3550.

#### REFERENCES

1. Ribosomal DNA as DAMPs signal for MCF7 cancer cells / E.M. Malinovskaya [et al.] // *Front Oncol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 445.

2. Role of circulating cell-free DNA in cancers / R. Aarthy [et al.] // *Mol. Diagn. Ther.* – 2015. – V. 19, № 6. – P. 339-350.

3. Extracellular DNA containing (dG)n motifs penetrates into MCF7 breast cancer cells, induces the adaptive response, and can be expressed / E.A. Kozhina [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 7853492.

4. BRCA1 and BRCA2 gene expression: diurnal variability and influence of shift work / M. Bracci [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11, № 8. – P. 1146.

5. BRCA1 and BRCA2 expression patterns and prognostic significance in digestive system cancers / G.-H. Wang [et al.] // *Hum Pathol.* – 2018. – Vol. 71. – P. 135-144

6. Expression and mutations of BRCA in breast cancer and ovarian cancer: Evidence from bioinformatics analyses / Z. Wang [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2018. – Vol. 42, № 6. – P. 3542-3550.