

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ МЫШЕЙ И МЫШЕЙ С МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМОЙ V16 НА ИЗМЕНЕНИЕ ОНКОГЕННЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

© 2023 А.А. Филатова^{1,2}, Л.А. Алексеева¹, И.А. Савин¹, А.В. Сенькова¹,
М.А. Зенкова¹, Н.Л. Миронова^{1*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: miroнова@niboch.nsc.ru

² Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук,
630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 31.01.2023

После доработки 13.03.2023

Принята к публикации 13.03.2023

В настоящее время значительное повышение уровней внеклеточной ДНК (внДНК) в крови пациентов является общепризнанным маркером развития онкологических заболеваний. Несмотря на то что такая опухоль-ассоциированная внДНК хорошо изучена, ее биологические функции остаются невыясненными. В данной работе мы исследовали влияние внДНК, выделенной из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой V16-F10, на поведение клеток меланомы V16-F10 *in vitro*. Было обнаружено, что состав внДНК мышей с меланомой значительно отличается от внДНК сыворотки крови здоровых мышей и по представленности онкогенов и мобильных генетических элементов (МГЭ) схож с геномной ДНК клеток V16. Показано, что внДНК из сыворотки крови мышей с меланомой проникала в клетки V16, вследствие чего в клетках увеличивалась представленность фрагментов онкогенов и МГЭ, и вызывала увеличение экспрессии мРНК *Dnase I13*, кодирующего секретируемую ДНКазу, в 5 раз при отсутствии изменения экспрессии мРНК онкогенов *Jun*, *Fos*, *Ras* и *Myc*. ВнДНК здоровых мышей вызывала активацию экспрессии мРНК *EndoG*, кодирующего внутриклеточную регуляторную ДНКазу, и повышение в 4 раза экспрессии мРНК онкогенов *Fos* и *Ras*, являющихся триггерами большого числа сигнальных каскадов от ингибирования апоптоза до усиления пролиферации опухолевых клеток. Таким образом, очевидно, что циркулирующая внДНК способна проникать в клетки и, несмотря на то что не было обнаружено изменений на уровне жизнеспособности и миграционной активности опухолевых клеток, внДНК даже при однократном воздействии способна вызывать на клеточном уровне изменения, усиливающие онкогенность клеток-реципиентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циркулирующие внеклеточные ДНК, меланома V16.

DOI: 10.31857/S0320972523070114, **EDN:** FYAWBZ

ВВЕДЕНИЕ

Развитие онкологических заболеваний у пациентов часто сопровождается повышением уровня циркулирующих внеклеточных ДНК (внДНК) в крови [1]. Существует три основных источника внДНК: опухолевые клетки, как находящиеся в первичном опухолевом узле, так и циркулирующие в кровотоке при запущенных стадиях заболевания; клетки опухолевого

окружения, гибнущие при развитии заболевания; и клетки иммунной системы, преимущественно макрофаги и нейтрофилы [2]. Состав циркулирующих внДНК зависит от типа онкологического заболевания и его стадии, поэтому многие исследователи используют анализ профиля внДНК для диагностики и мониторинга опухолевого процесса. Для некоторых типов рака, где состав внДНК в основном отражает особенности ДНК и хроматина опухолевой

Принятые сокращения: внДНК – внеклеточные ДНК; МГЭ – мобильные генетические элементы; h-внДНК – внДНК здоровых мышей; V16-ДНК – суммарная ДНК клеток V16; V16_{см}-внДНК – внДНК из кондиционной среды клеток V16; V16_s-внДНК – внДНК мышей с метастатической меланомой V16; NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки.

* Адресат для корреспонденции.

клетки, в пуле внДНК анализируют геномный и эпигеномный профили, что позволяет оценить опухолевую нагрузку и скорректировать лечение [3]. Анализ соотношения мутантных фрагментов онкогенов, ретротранспозонов и мобильных генетических элементов (МГЭ), изменения метилирования внДНК с успехом применяют в клинических и преклинических исследованиях [4–6].

Несмотря на то что предпринимаются активные попытки исследовать состав внДНК, выполнено не так много исследований, посвященных функциональной роли внДНК. Относительно хорошо изученными являются так называемые нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET), которые образуются из нейтрофилов при выбрасывании собственного геномного материала и содержимого гранул с формированием обширной сети, в том числе и в опухолевом окружении [7]. Образование NET в опухолевом окружении провоцирует рост опухоли и ее инвазию [8]. Для некоторых типов опухолевых клеток показано наличие рецептора CCDC25, селективно узнающего именно ДНК-составляющую NET по остаткам 8-ОН-дезоксигуанозина (8-ОНdG) и активирующего миграцию опухолевых клеток по пути ILK-PARVB [9].

Некоторые исследователи предполагают, что циркулирующая внДНК может участвовать в горизонтальном переносе, проникая в здоровые клетки организма и вызывая в них изменения, приводящие к формированию опухолевого микроокружения, преметастатической ниши и метастазов [10]. В области изучения эффектов опухолеспецифической внДНК на развитие патологических процессов выполнено лишь несколько пионерских работ [11–13]. Была обнаружена способность опухолеспецифической внДНК, полученной от пациентов с колоректальным раком, проникать в фибробласты мыши [11]. Была показана способность внДНК и хроматина из сыворотки крови пациентов с различными типами рака при проникновении в клетку попадать в ядро и интегрироваться в геном клетки-реципиента [13]. В недавней работе Souza et al. [14] показано, что внДНК из крови больных раком предстательной железы поглощалась клетками неопухолевых линий предстательной железы (RWPE-1 и PNT-2), что приводило к изменению экспрессии ряда генов и мРНК, связанных с онкогенезом, и усилению миграционных свойств клеток. В наших недавних работах было обнаружено, что снижение концентрации опухолеспецифической внДНК под действием ДНКазы I в сыворотке крови мышей-опухоленосителей

с различными метастатическими формами опухолей коррелировало с уменьшением первичного опухолевого узла и снижением количества метастазов, что говорит о функциональной значимости внДНК в опухолевой прогрессии [15–17]. Стоит отметить, что внДНК является компонентом опухолевого окружения, постоянно присутствующим в высокой концентрации и потенциально влияющим как на сами опухолевые клетки, так и на клетки опухолевого микроокружения. Однако до сих пор нет работ, описывающих влияние внДНК на сами опухолевые клетки, несмотря на то что накоплены данные о возможности взаимодействия внДНК с их рецепторами [9]. Таким образом, изучение влияния внДНК на опухолевые клетки является актуальной задачей и может быть важным для раскрытия фундаментальных процессов онкогенеза.

Целью данной работы является изучение биологических эффектов, которые оказывает внДНК, выделенная из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой B16, на клетки B16 *in vitro*. Показано, что внДНК способна проникать в клетки-реципиенты и вызывать в них активацию экспрессии внутриклеточных и секреторных ДНКаз, а также онкогенов *Fos* и *Ras*, являющихся триггерами множества сигнальных каскадов от блокировки апоптоза до усиления пролиферации. Несмотря на то что внДНК не влияла на жизнеспособность и миграционную активность клеток-реципиентов, вызванная внДНК активация экспрессии ДНКаз и онкогенов может вносить существенный вклад в процесс усиления онкогенных свойств опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опухолевые клетки. Клетки меланомы B16-F10 (далее, клетки B16) были приобретены в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки B16 инкубировали в среде DMEM («ThermoFisher Scientific», США) с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («ThermoFisher Scientific»), 1%-ным раствором антибиотика-антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина; «ThermoFisher Scientific») в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С (стандартные условия) и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

Мыши. В работе использовали 10–14-недельных мышей-самцов линии C57Bl/6 (далее C57Bl) развода вивария ИХБФМ СО РАН

(Новосибирск, Россия). К началу эксперимента масса животного (mean \pm SD) составляла $20,0 \pm 1,5$ г. Животных содержали по 10 особей в клетке в хорошо освещенном помещении. Мыши имели свободный доступ к еде и воде.

Опухолевая модель. Для формирования метастатической модели меланомы B16 суспензию клеток меланомы B16 ($0,5 \times 10^6$ клеток на мл) в 0,2 мл физиологического раствора (0,9%-ный водный раствор хлорида натрия) внутривенно вводили мышам. На 21-е сутки после введения опухолевых клеток прижизненно собирали кровь из ретро-орбитального синуса, мышей подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. Легкие собирали и фиксировали в 10%-ном формалине (pH 7,0; «БиоВитрум», Россия) для последующего патоморфологического исследования. Число поверхностных метастазов в легких подсчитывали с помощью бинокуляра.

Получение кондиционной среды. Клетки B16 инкубировали в бессывороточной среде DMEM в стандартных условиях в течение 24 ч. Среду собирали и использовали для выделения внДНК.

Получение сыворотки крови. Образцы крови здоровых мышей (0,2 мл) брали из ретро-орбитального синуса. Сыворотку из образцов крови здоровых мышей и мышей с метастатической меланомой B16 получали методом формирования тромба путем инкубации при 37 °С в течение 30 мин с последующей инкубацией при 4 °С в течение ночи. Тромб извлекали и сыворотку центрифугировали (1500 g, 4 °С, 20 мин). Образцы сывороток хранили при -70 °С.

Выделение внДНК. ВнДНК из кондиционной среды (B16_{CM}-внДНК), сыворотки крови здоровых мышей (h-внДНК) и мышей с метастатической меланомой B16 (B16_S-внДНК) выделяли экстракцией фенолом/хлороформом (1/1; v/v) с последующим концентрированием методом обратимой сорбции на силикатном сорбенте с помощью QI Aquick Gel Extraction kit («Qiagen», США) [17]. Чистоту выделенной ДНК оценивали с помощью NanoDrop® ND-1000 («ThermoFisher Scientific»), концентрацию измеряли с помощью Qubit™ fluorimeter («Invitrogen», США) и Quant-iT™ dsDNA HS Assa kit («ThermoFisher Scientific»).

Выделение суммарной ДНК из клеток B16 (B16-ДНК). С клеток B16 собирали среду, клетки открепляли 0,25%-ным раствором трипсина в ЭДТА, промывали PBS, осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Клеточный осадок обрабатывали 0,25%-ным раствором трипсина в ЭДТА и центрифугиро-

вали при 350 g в течение 20 мин при 4 °С, после чего супернатант удаляли. Клетки лизировали в 600 мкл раствора, содержащего 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM ЭДТА; 200 mM NaCl; 0,2% SDS и 10 нг/мл протеиназы К в течение 4 ч при 65 °С при постоянном перемешивании. Далее ДНК выделяли смесью фенол/хлороформ (1/1; v/v), как описано выше, и осаждали 96%-ным этанолом в присутствии 0,3 M ацетата натрия при -20 °С в течение 18 ч. ДНК отделяли центрифугированием, осадок промывали 80%-ным этанолом, высушивали, растворяли в воде и хранили при -20 °С. Концентрацию ДНК определяли с помощью Qubit™ fluorimeter и Quant-iT™ dsDNA HS Assa kit.

Исследование влияния внДНК на клетки меланомы B16. Клетки B16 высаживали в бессывороточной среде DMEM в 24-луночный планшет в плотности $0,5 \times 10^6$ клеток на лунку, чтобы через 12 ч клеточная культура достигла состояния 95%-ного конфлюэнтного монослоя. Через 24 ч среду заменяли на свежую бессывороточную среду DMEM, добавляли h-внДНК или B16_S-внДНК до концентрации 100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Клетки собирали, из одной части клеточного осадка выделяли суммарную ДНК экстракцией фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом, как описано выше. Из второй части клеточного осадка выделяли РНК с помощью Trizol («ThermoFisher Scientific»), согласно стандартному протоколу. Качество и концентрацию выделенной РНК оценивали с помощью NanoDrop® ND-1000, качество и концентрацию ДНК оценивали с помощью Qubit™ fluorimeter и Quant-iT™ dsDNA HS Assa kit.

Определение количества последовательностей (представленности) МГЭ и онкогенов во внДНК с помощью qPCR. Количество последовательностей МГЭ и онкогенов в составе B16-ДНК, B16_{CM}-внДНК, h-внДНК и B16_S-внДНК определяли с помощью qPCR. Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0,1–0,5 нг ДНК, SYBR-Green-containing Bio Master CorHS-qPCR («Биолаб-микс», Россия) и по 0,6 мкМ прямого и обратного специфических праймеров к МГЭ (*B1_mus2*, *L1td1*) и онкогенам (*Braf*, *Hmga2*, *Myc*, *Fos*, *Jun*, *Ras*, *P53*) (табл. 1). Условия реакции: 95 °С – 6 мин; 95 °С – 15 с, 60 °С – 20 с, 70 °С – 60 с, 50 циклов. В качестве референса использовался *Gapdh*.

Определение уровня экспрессии МГЭ, ДНКаз и онкогенов с помощью RT-qPCR. Для приготовления кДНК использовали реакционную смесь объемом 40 мкл, содержащую 2 мкг

Таблица 1. Последовательность праймеров, использованных в работе

Наименование	Последовательности праймеров 5'→3'	
	прямой праймер	обратный праймер
Праймеры для qPCR		
<i>B1_mus2</i>	GAGACAGGCGGATTTCTGAGT	TGTAGCCCTGGCTGTCCT
<i>L1td1</i>	GCCAGGTATCTGTGCATCTT	ACTCTAGCTCTCTCCTGAGTTT
<i>Braf</i>	GCTCACAGACTAGGCGTAAAT	GGAGAGACAAGTGCTGTAGAAG
<i>Hmga2</i>	CCTTCACAGTCCCAGGTTTAG	AAGAGAGCTTGTGGGCTTATC
<i>Myc</i>	CGACTACGACTCCGTACAGC	CCAGATATCCTCACTGGGCG
<i>Fos</i>	GAGAATCCGAAGGGAAGGAATA	GTAGGTGAAGACGAAGGAAGAC
<i>Jun</i>	GTTGAGCTCAGGCTGGATAAG	CTGTGCGAACTGGTATGAGTATAG
<i>Ras</i>	GCTCTGTGTCCATCTACTCATC	AGCCATCAAAGTCTCCTTATCC
<i>P53</i>	CAGTCTACTTCCC GCCATAAA	CAGCAGAGACCTGACAAC TATC
<i>Gapdh</i>	AATGGTGAAGGTCGGTGTG	ACAAGCTTCCCATTCTCGG
Праймеры для RT-qPCR		
<i>L1td1 Orf1</i>	GAACCAAGACCACTCACCATCA	CCCTGGACTGGGCGAAGT
<i>L1td1 Orf2</i>	GCGGTTCCCTCAGAAAATTGG	TGCCCAGGAGAGGTATTGCT
<i>Dnase1l3</i>	TATCCACACCTCACTCCTATCC	CAACAGAGTCAAGGGCCATAA
<i>Dffa</i>	TGCCTTGAAGTGGGACATAAA	GCTGAGGGTGTCTACCAATAAC
<i>Dffb</i>	CAGGAATAAGTCGGGCTATCTG	CGGTGCGCTTCTTCTCTATTA
<i>Endog</i>	GCTCCTTCACTCTGTGCTAAC	CCACGTGGTTCTTCCCAATAA
<i>Fos</i>	GAGAATCCGAAGGGAAGGAATA	GTAGGTGAAGACGAAGGAAGAC
<i>Jun</i>	GTTGAGCTCAGGCTGGATAAG	CTGTGCGAACTGGTATGAGTATAG
<i>Myc</i>	CGACTACGACTCCGTACAGC	CCAGATATCCTCACTGGGCG
<i>Ras</i>	CAAGATGGATTGCACGCAGG	GCAGCCGATTGTCTGTTGTG
β-актин	AGCCATGTACGTAGCCATCCA	TCTCCGGAGTCCATCACAATG

суммарной клеточной РНК, 5 × ОТ-буфер mix («Биолабмикс»), 100 ед. обратной транскриптазы MMuLV-RH («Биолабмикс») и 0,05 мкМ праймера dT15. Реакцию обратной транскрипции проводили в следующем режиме: 42 °С – 1 ч, 70 °С – 10 мин.

Реакционная смесь для qPCR объемом 25 мкл содержала 0,1–0,5 нг кДНК, БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («Биолабмикс») и по 0,6 мкМ прямого и обратного специфических

праймеров к МГЭ (*L1td1 Orf1*, *L1td1 Orf2*), ДНКазам (*Dnase1l3*, *Dffa*, *Dffb*, *Endog*) и онкогенам (*Fos*, *Jun*, *Myc*, *Ras*) (табл. 1). Условия реакции: 95 °С – 6 мин; 95 °С – 15 с, 60 °С – 20 с, 70 °С – 60 с, 45 циклов. В качестве референса использовался β-актин.

Исследование влияния вДНК на жизнеспособность, миграционную активность и апоптоз клеток В16. МТТ-тест. Клетки высаживали в 96-луночный планшет по $1,5 \times 10^4$ клеток на

лунку в бессывороточной среде DMEM. Через 24 ч среду заменяли на свежую бессывороточную среду DMEM, добавляли h-внДНК или V16_s-внДНК до концентраций 5–100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Далее к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали в течение 3 ч и анализировали, как описано ранее [18].

Scratch-тест. Клетки в бессывороточной среде DMEM высаживали в 6-луночный планшет в плотности $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку, чтобы через 12 ч клеточная культура достигла состояния 90%-ного конфлюэнтного монослоя. В клеточном монослое наносили царапины шириной 0,5 мм носиком пипетки на 200 мкл, трижды промывали PBS, добавляли бессывороточную среду DMEM, h-внДНК или V16_s-внДНК до концентрации 100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Границы царапины маркировали и фотографировали зоны повреждения в течение суток с помощью микроскопа Zeiss Primo Vert («Zeiss», Германия). Скорость миграции клеток оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ [17].

Апоптоз. Клетки V16 высаживали в бессывороточной среде DMEM в 24-луночный планшет в плотности $0,5 \times 10^6$ клеток на лунку. Через 12 ч среду заменяли на свежую бессывороточную среду DMEM, добавляли h-внДНК и V16_s-внДНК до концентрации 100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Анализ апоптоза проводили с использованием набора Annexin V-FITC («Abcam», Великобритания) в соответствии с протоколом производителя на проточном цитометре NovoCyte («ACEA Biosciences», США).

В качестве контроля для МТТ-теста, Scratch-теста и определения уровня апоптоза использовали клетки V16, инкубированные в бессывороточной среде DMEM в течение 24 ч.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали *t*-тест критерия Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки (Tukey). Значение $p \leq 0,05$ отражало статистически достоверные отличия. Для статистического анализа использовали программу STATISTICA 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение и характеристика образцов внДНК из сыворотки крови. Мышам линии C57Bl внутривенно вводили клетки меланомы V16

(10^5 клеток/мышь), через 21 день проводили забор крови, выводили мышей из эксперимента и определяли количество поверхностных метастазов в легких. ВнДНК выделяли из сыворотки крови, как описано в разделе «Материалы и методы». Схема получения образцов внДНК показана на рис. 1, а. При внутривенном введении меланомы V16 развивается в виде множественных метастатических опухолевых узлов, в первую очередь в легочной ткани животных (рис. 1, б). На 21-е сутки развития опухоли количество поверхностных метастазов в среднем составило 50, однако при этом наблюдался разброс в количестве метастазов на особь от 25 до 150 (рис. 1, в).

Развитие опухолевого процесса (метастазы в легких) у мышей сопровождалось значительным повышением концентрации циркулирующих внДНК в сыворотке крови мышей-опухоленосителей (рис. 1, г). Так, медианное значение концентрации внДНК в сыворотке крови мышей-опухоленосителей составило 1000 нг/мл, а разброс значений варьировал от 100 до 2500 нг/мл (рис. 1, г). Медианное значение концентрации внДНК сыворотки крови у здоровых мышей было 35 нг/мл, а разброс значений варьировал от 0 до 150 нг/мл (рис. 1, г).

Для дальнейших экспериментов использовали сыворотки крови от мышей-опухоленосителей с количеством поверхностных метастазов в легких не менее 25 и концентрацией внДНК в сыворотке крови не менее 250 нг/мл, а также сыворотки крови здоровых мышей с концентрацией внДНК не менее 50 нг/мл. После выделения внДНК объединяли по группам. Таким образом, были получены объединенные препараты внДНК животных-опухоленосителей (V16_s-внДНК) и здоровых животных (h-внДНК). Также для сравнения состава фрагментов была выделена внДНК из кондиционной среды клеток V16 (V16_{CM}-внДНК) и суммарная ДНК клеток V16 (V16-ДНК).

Препараты внДНК были охарактеризованы по уровню представленности фрагментов онкогенов и МГЭ методом qPCR. В табл. 2 приведены данные по представленности фрагментов МГЭ и онкогенов в V16_{CM}-внДНК, h-внДНК и V16_s-внДНК. Уровень представленности фрагментов МГЭ и онкогенов в V16-ДНК был использован в качестве референса сравнения.

Видно, что последовательности МГЭ и онкогенов слабо представлены в h-внДНК по сравнению с их уровнями представленности в V16-ДНК. Составы V16_s-внДНК и V16_{CM}-внДНК были похожи по уровню представленности выбранных фрагментов: последовательности

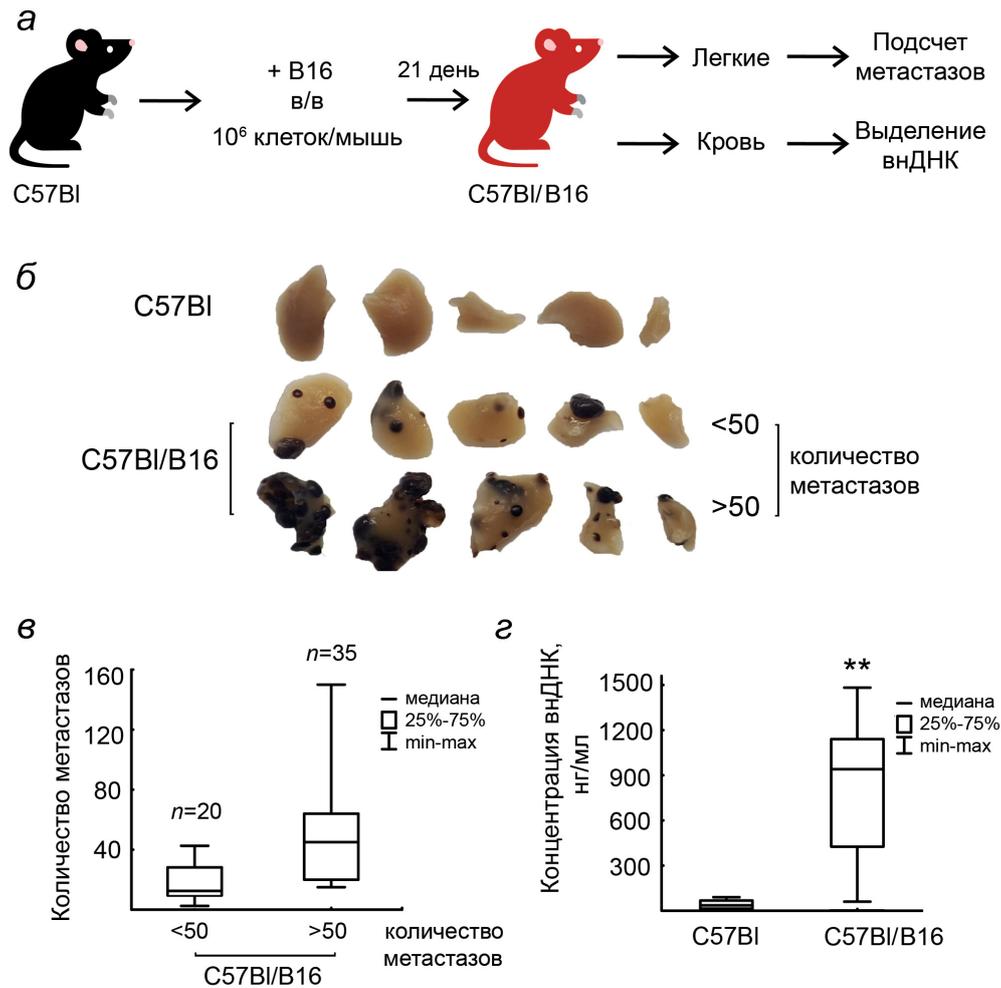


Рис. 1. Характеризация метастатической модели меланомы. *а* – Дизайн эксперимента. *б* – Легкие здоровых мышей и мышей-опухоленосителей с количеством поверхностных метастазов <50 и >50. *в* – Разброс среди мышей-опухоленосителей с количеством метастазов <50 ($n = 20$) и >50 ($n = 35$). *г* – Концентрация вДНК в сыворотке крови здоровых мышей и мышей-опухоленосителей с количеством метастазов >50 ($n = 35$). Данные проанализированы с использованием однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки и представлены в виде медианы, ** $p < 0,001$

Таблица 2. Представленность фрагментов МГЭ и онкогенов в вДНК сыворотки крови здоровых мышей, мышей с меланомой, геномной ДНК В16 и кондиционной среде клеток В16

Гены	h-вДНК	В16s-вДНК	В16см-вДНК	В16-ДНК
<i>B1_mus1</i>	–	++	++	++
<i>B1_mus2</i>	–	++	++	++
<i>L1td1 Orf2</i>	–	++	++	++
<i>Braf</i>	–	–	–	–
<i>Hmga2</i>	–	–	–	–
<i>Jun</i>	–	–	–	–
<i>Myc</i>	–	++	++	+
<i>Ras</i>	–	+	++	+
<i>P53</i>	–	–	–	–

Примечание. Уровень представленности фрагментов онкогенов и МГЭ был определен с помощью qPCR. «–» – относительное содержание последовательностей менее 0,3 отн. ед.; «+» – 0,3–0,7 отн. ед.; «++» – более 0,7 отн. ед.; отн. ед. – относительные единицы, количество копий гена, нормированное на количество копий *Gapdh*.

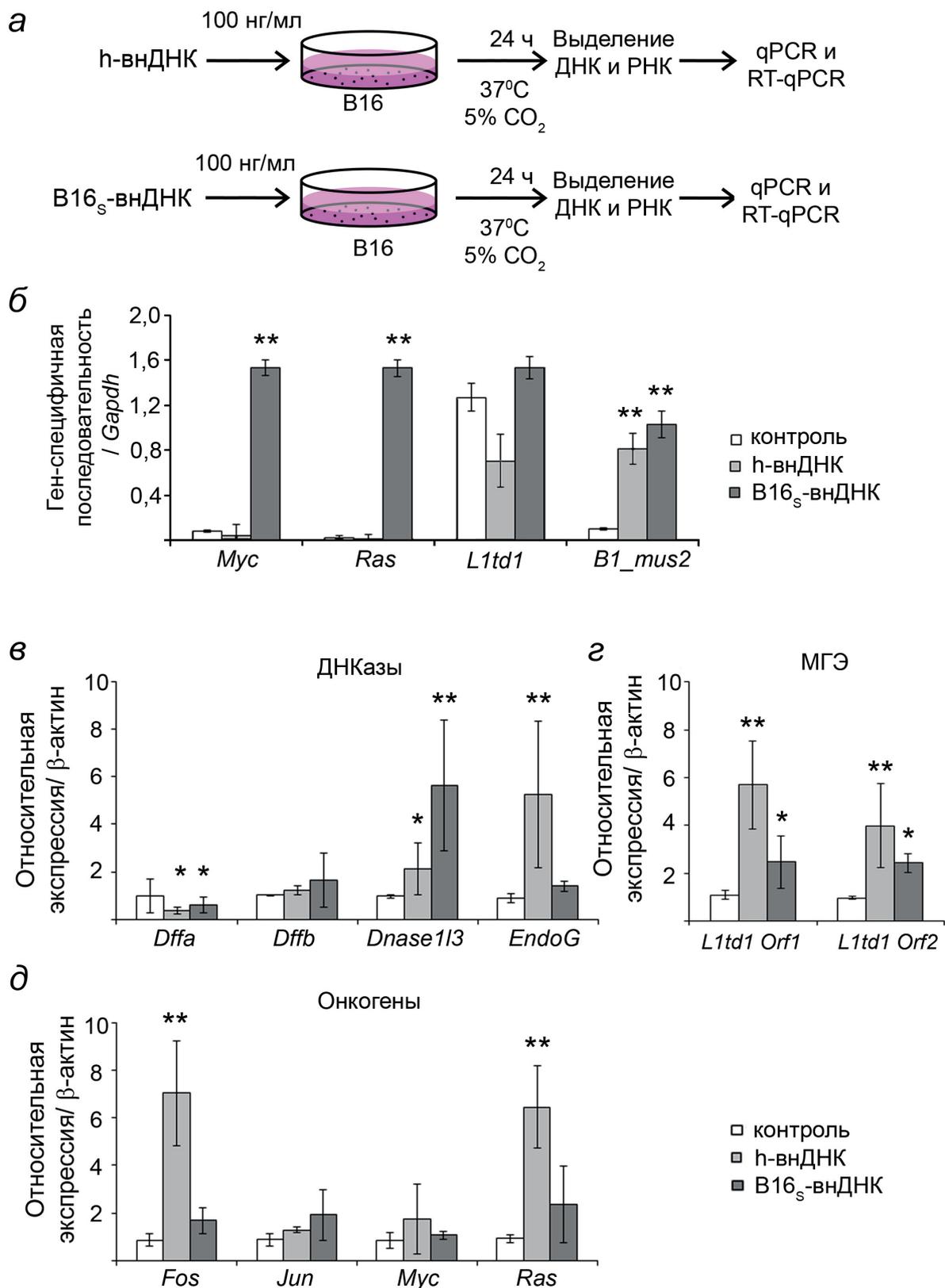


Рис. 2. Влияние B16_s-внДНК на свойства клеток меланомы B16. *а* – Схема эксперимента. *б* – Изменение представленности фрагментов *Myc*, *Ras*, *L1td1* и *B1_mus2* в клетках B16 после инкубации с B16_s-внДНК. Данные qPCR. В качестве референсного гена использовали *Gapdh*. *в–д* – Влияние B16_s-внДНК на уровни экспрессии ДНКаз (*в*), МГЭ (*г*) и онкогенов (*д*) в клетках B16. Данные RT-qPCR. В качестве референсного гена использовали β-актин. Контроль – интактные клетки. Данные анализировали с использованием критерия Стьюдента (*t*-тест) и представляли как среднее ± SEM; * *p* < 0,05; ** *p* < 0,001

генов *Hmga2*, *Braf*, *P53* и *Jun* детектировались слабо, последовательности *B1_mus1*, *B1_mus2*, *L1td1* *Orf2* и *Myc* были представлены на достаточно высоком уровне – более 0,7 относительных единиц (отн. ед.) (табл. 2). Отличия были обнаружены только для гена *Ras*, представленность фрагментов которого в кондиционной среде была выше как по сравнению с В16-ДНК, так и с В16_s-внДНК.

Изучение влияния В16_s-внДНК на свойства клеток меланомы В16. Для изучения влияния В16_s-внДНК на свойства клеток В16 к клеткам в бессывороточной среде DMEM добавляли h-внДНК или В16_s-внДНК до концентрации 100 нг/мл и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. По окончании инкубации клетки собирали, выделяли суммарную ДНК и определяли представленность фрагментов онкогенов (*Myc*, *Ras*) и МГЭ (*B1_mus2*, *L1td1*) методом qPCR (рис. 2, а).

Из приведенных данных (рис. 2, б) видно, что В16_s-внДНК приводит к многократному увеличению представленности фрагментов обоих онкогенов и *B1_mus2*. h-внДНК вызывала в клетках меланомы В16 достоверное увеличение представленности только фрагментов *B1_mus2* и не оказывала влияния на представленность онкогенов и фрагментов *L1td1* (рис. 2, б). Ни h-внДНК, ни В16_s-внДНК не вызывали в клетках В16 достоверного изменения представленности фрагментов *L1td1*. Таким образом, можно заключить, что внДНК способна проникать в клетки меланомы В16.

Помимо представленности фрагментов онкогенов и МГЭ для оценки изменений в клетках-реципиентах после их инкубации с В16_s-внДНК, оценивали изменение уровней мРНК ряда ключевых ДНКаз (*Dffa*, *Dffb*, *Dnase1L3*, *EndoG*), являющихся маркерами первичного ответа клетки на присутствие экзогенной ДНК, онкогенов (*Ras*, *Myc*, *Fos*, *Jun*), которые являются триггерами внутриклеточных процессов и основными показателями клеточного метаболизма, и LINE-элемента *L1td1* (*Orf1*, *Orf2*), указывающего на активацию/подавление ретротранспозиции (рис. 2, в).

Оказалось, что h-внДНК в 2 раза повышает уровень мРНК *Dnase1L3*, кодирующего внутриклеточную секреторную ДНКазу, и вызывает 5-кратное повышение уровня мРНК *EndoG*, кодирующего ДНКазу, участвующую преимущественно в негативной регуляции апоптоза и ограничивающую экспрессию другой секреторной ДНКазы – ДНКазы I (рис. 2, в). При этом уровень экспрессии мРНК *Dffb*, кодирующей апоптотическую ДНКазу, не менялся. Действие В16_s-внДНК на клетки мелано-

мы В16 значительно отличается от действия h-внДНК: для В16_s-внДНК наблюдается значительное увеличение уровня экспрессии *Dnase1L3* по сравнению с интактными клетками (контролем) и незначительное статистически недостоверное увеличение экспрессии мРНК *Dffb* и *EndoG* (рис. 2, в). Интересно, что внДНК обоих типов привели к достоверному снижению уровня экспрессии мРНК *Dffa*.

И В16_s-внДНК и h-внДНК приводили к увеличению экспрессии мРНК *L1td1* (*Orf1* и *Orf2*), однако более выраженный эффект был отмечен для h-внДНК (рис. 2, г). Следует отметить, что h-внДНК вызывала более значимое изменение экспрессии генов в клетках меланомы В16, чем В16_s-внДНК: h-внДНК вызывала 4-кратное повышение уровня мРНК онкогенов *Fos* и *Ras* по сравнению с контролем (рис. 2, д), тогда как В16_s-внДНК вызывала слабое статистически недостоверное повышение экспрессии всех четырех исследованных онкогенов (рис. 2, д).

Одной из задач данного исследования было изучить, как внДНК опухолевого происхождения влияет на жизнеспособность и миграционную активность опухолевых клеток, и способна ли внДНК после попадания в опухолевые клетки запускать в них апоптоз *in vitro*. Для определения уровня апоптоза клетки меланомы В16 инкубировали в присутствии В16_s-внДНК в концентрации 100 нг/мл в течение 24 ч, а затем окрашивали аннексином V-FITC/PI и анализировали с помощью проточной цитометрии (рис. 3, а). Жизнеспособность клеток В16 определяли с помощью МТТ-теста после их инкубации в присутствии h-внДНК или В16_s-внДНК в концентрации 10–100 нг/мл в течение 24 ч (рис. 3, б). Влияние внДНК на миграцию клеток В16 исследовали методом «scratch»-теста: клетки В16 инкубировали в присутствии h-внДНК или В16_s-внДНК в концентрации 100 нг/мл и тестировали скорость зарастания ими царапины, формируемой в монослое (рис. 3, в и г).

Оказалось, что ни h-внДНК, ни В16_s-внДНК не влияют на уровень апоптоза, жизнеспособность и миграционные свойства клеток В16 (рис. 3). Таким образом, аутологичная внДНК не меняла макросвойства клеток меланомы ни в плане усиления проопухолевой активности (пролиферация, миграция), ни в плане антиопухолевой активности (апоптоз).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящий момент накоплено большое количество данных о составе циркулирующих

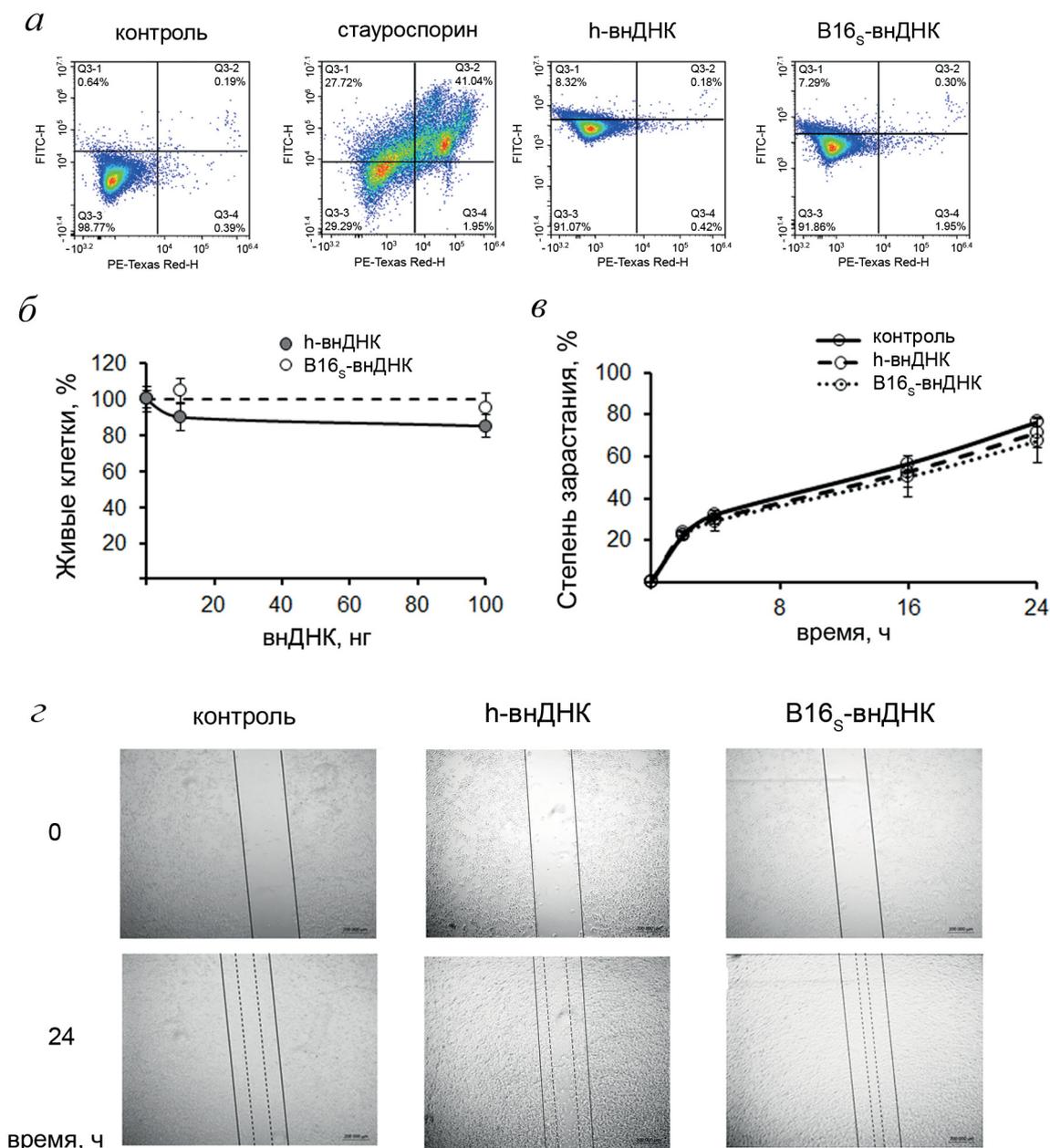


Рис. 3. Влияние V16_s-внДНК на апоптоз, жизнеспособность и миграционную активность клеток меланомы V16. *а* – Влияние внДНК на способность запускать апоптоз клеток V16. Результаты проточной цитометрии. Q3-1 – аннексин V-FITC⁻/PI⁺, некроз; Q3-2 – аннексин V-FITC⁺/PI⁺, поздний апоптоз; Q3-3 – аннексин V-FITC⁻/PI⁻, живые клетки; Q3-4 – аннексин V-FITC⁺/PI⁻, ранний апоптоз. Положительный контроль позднего апоптоза – клетки V16, обработанные стауроспорином (0,1 мкг/1 млн клеток). *б* – Влияние внДНК на жизнеспособность клеток V16. Данные МТТ-теста. Данные представлены как среднее ± SEM. *в* – Степень зарастания царапины клетками V16 через 24 ч инкубации с внДНК. Данные Scratch-теста. Сплошная линия – границы царапины в момент времени 0; пунктирные линии – граница клеточного фронта через 24 ч. Контроль – интактные клетки V16 без обработки

внДНК в крови высших организмов при различных патологиях, но биологические функции внДНК до сих пор активно изучаются. В клинической практике предпринимаются попытки использовать характеристики внДНК для ранней диагностики онкологических заболеваний [2]. Углубленное исследование характеристик внДНК позволило поставить вопрос

о возможной роли внДНК в канцерогенезе, что подтверждается некоторыми экспериментальными данными [11, 13, 14, 19]. В нескольких работах было сделано предположение, что внДНК опухолевого происхождения, в состав которой в том числе входят и фрагменты онкогенов, может вести себя подобно онковирусам, что открывает альтернативный путь

метастазирования [11, 13, 14]. Открытие ДНК-содержащих микровезикул и полученные доказательства горизонтального переноса ДНК для многих клеточных линий и организмов позволили укрепить эту гипотезу [19]. Несмотря на то что накоплены некоторые данные о функциональном воздействии внДНК опухолевого происхождения на здоровые клетки, отсутствуют данные о влиянии такой внДНК на сами опухолевые клетки.

Целью данной работы было исследование влияния циркулирующих $V16_s$ -внДНК на опухолевые клетки для понимания механизмов, опосредующих участие циркулирующих опухолеспецифических внДНК в процессах онкотрансформации. В нашей работе в качестве внДНК опухолевого происхождения была использована $V16_s$ -внДНК из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой $V16$, для которой характерно образование большого числа метастазов в легких и высокая концентрация внДНК в сыворотке крови. Принимая во внимание, что клетки опухоли также испытывают давление от внДНК, генерированных здоровыми клетками, особенно на ранних стадиях развития опухоли, h -внДНК также была использована в экспериментах.

Нами было обнаружено, что состав $V16_s$ -внДНК значительно отличается от состава h -внДНК и по представленности последовательностей онкогенов и МГЭ схож как с суммарной $V16$ -ДНК, так и с $V16_{CM}$ -внДНК. Эти результаты подтверждают, что внДНК при метастатической меланоме имеет преимущественно опухолевое происхождение и отражает состав геномной ДНК клеток $V16$, что позволяет рассматривать данную внДНК как опухолеспецифичную. Это согласуется с тем, что геном опухолевых клеток отличается от генома нормальных клеток, и во многих случаях измененный профиль внДНК отражает превалирование в этом пуле ДНК из опухолевых клеток над ДНК из нормальных клеток [20].

Интересно, что ни $V16_s$ -внДНК, ни h -внДНК не оказывали никаких эффектов как с точки зрения усиления проопухолевой активности, так и противоопухолевой активности. В работе Mitra et al. [13] было показано, что внДНК из крови пациентов с опухолями способна проникать в ядра клеток и адгезироваться хроматином, что приводило к двуцепочечным разрывам в ДНК и, как следствие, запуску ранних стадий апоптоза в клетках-реципиентах. Тем не менее следует отметить, что в работе Mitra et al. [13] использовали внДНК человека, а в качестве клеток-реципиентов – фибробласты NIH3T3 мыши, поэтому индукция

апоптоза может объясняться видовым конфликтом [21, 22]. И в данном исследовании, и в работе Mitra et al. [13] использовались одни и те же концентрации внДНК (100 нг/мл). Тем не менее наши данные показали, что концентрации внДНК в крови животных-опухоленосителей могут достигать 1500 нг/мл, и поэтому в условиях организма постоянно пополняющийся пул опухолеспецифической внДНК в высоких концентрациях может вызывать более выраженные апоптотические сигналы, сопровождающиеся усилением или ослаблением инвазивных свойств опухолевых клеток.

Тем не менее, несмотря на отсутствие эффектов внДНК на жизнеспособность, апоптоз и миграцию клеток меланомы $V16$, было обнаружено, что как $V16_s$ -внДНК, так h -внДНК вызывают изменение уровней мРНК ряда ключевых генов: ДНКаз, как генов первичного ответа на присутствие экзогенной ДНК; онкогенов, которые являются триггерами внутриклеточных каскадов, в том числе и каскадов, опосредующих онкотрансформацию [23]; и ретротранспозона *L1td1*.

Было показано, что ни один тип внДНК не вызывал повышения уровня экспрессии мРНК *Dffb*, кодирующего проапоптотическую ДНКазу, что может быть признаком отсутствия токсических эффектов внДНК. Тем не менее оба типа внДНК вызывали снижение уровня экспрессии мРНК ДНКазы *Dffa*, которая является специфическим ингибитором ДНКазы *Dffb*. В норме оба белка находятся в форме неактивного гетеродимера, и при возникновении внешней угрозы в виде чужеродной ДНК либо при увеличении общей концентрации внутриклеточной ДНК происходит диссоциация гетеродимера с высвобождением активной субъединицы *Dffb* [24]. Для подавления избыточного функционирования *Dffb* требуется новая порция *Dffa*, однако снижение экспрессии мРНК *Dffa*, кодирующего белок-ингибитор, говорит о повышенной готовности клетки к расщеплению ДНК [25].

$V16_s$ -внДНК вызывала очень умеренное повышение уровня мРНК гена, кодирующего EndoG, нуклеазу широкого спектра действия, негативного регулятора апоптоза и участника процессов репарации [26]. В норме EndoG локализуется в митохондриях и только при разрушении митохондрий при апоптозе попадает в ядро, где может приводить к разрушению хроматина, активации других ДНКаз и усилению апоптотического каскада [27]. Полученные нами данные указывают на то, что повышение уровня мРНК *EndoG* может коррелировать с ограничением запуска апоптоза.

Следует отметить, что под действием h-внДНК уровень мРНК *EndoG* возрастал в значительно большей степени, чем под действием V16_s-внДНК.

V16_s-внДНК вызывала значительное повышение уровня мРНК *Dnase113*, кодирующего секретлируемую ДНКазу. *Dnase113* способна расщеплять ДНК в ДНК-белковых комплексах и является мощным инструментом защиты клеток от чужеродной ДНК либо собственной ДНК при увеличении ее концентрации вследствие обменных процессов в организме [28, 29]. Таким образом, инкубация клеток в присутствии внДНК приводит к включению механизмов защиты клетки от избыточной ДНК.

При анализе влияния V16_s-внДНК на уровни онкогенов в клетках V16 было обнаружено лишь слабое повышение уровня мРНК онкогенов *Fos*, *Jun* (кодирует регуляторы транскрипции) и *Ras* (кодирует белок-мессенджер, участвующий во многих сигнальных каскадах). При этом h-внДНК приводила к значительному (в 4 раза) повышению уровня мРНК онкогенов *Fos* и *Ras* относительно контроля, а повышения экспрессии *Jun* не наблюдалось [30].

Белки *Jun* и *Fos* склонны к димеризации, и в норме существуют либо димеры *Jun–Jun* и *Fos–Fos*, обладающие относительно низкой способностью связываться с ДНК [31], либо смешанные димеры *Jun–Fos*, более стабильные и обладающие более сильной ДНК-связывающей активностью по сравнению с гомодимерами [31]. Наблюдаемое повышение уровня мРНК *Fos* свидетельствует об активации клеточных каскадов, что может приводить к стимуляции пролиферации и инвазии опухолевых клеток. Наблюдаемое увеличение уровня мРНК *Ras* (ген малой GTPазы, являющейся промежуточным звеном в цепи передачи сигналов во многих клеточных каскадах) также является признаком активации клеточных каскадов, приводящей к усилению онкотрансформации [32].

Интересным результатом является обнаруженная способность h-внДНК вызывать на уровне мРНК активацию в опухолевых клетках сигнальных путей, усиливающих онкотрансформацию в значительно большей степени, чем V16_s-внДНК. Опухолеспецифическая циркулирующая внДНК отличается от условно нормальной циркулирующей внДНК измененным статусом метилирования и может активировать сигнальные пути через внутриклеточные TLR9-рецепторы, узнающие, как правило, неметилированные CpG-мотивы [33]. Кроме того, GC-состав опухолеспецифической внДНК от-

личается от условно нормальной циркулирующей внДНК, как правило, в сторону увеличения представленности GC-богатых последовательностей, что также может приводить к изменению TLR9-сигналинга [34]. Опухолеспецифическая внДНК может характеризоваться повышенной представленностью 8-oxodG, что влияет на ее узнавание рецепторами, и, соответственно, на запускаемые ею сигнальные пути в клетке [35]. Таким образом, уровень активации внутриклеточных сигналов в опухолевых клетках под действием опухолеспецифической ДНК, которая является для клеток V16 аутологичной, и условно нормальной ДНК различается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что как внДНК из сыворотки крови здоровых мышей, так и внДНК из сыворотки крови мышей с метастатической меланомой V16 при воздействии на клетки V16 вызывает выраженный ответ: увеличение экспрессии внутриклеточных и секретлируемых ДНКаз, которые не только защищают клетку от избыточной концентрации ДНК, но являются регуляторами процессов апоптоза. ВнДНК здоровых мышей вызывала увеличение уровня мРНК онкогенов *Fos* и *Ras*, являющихся триггерами большого числа сигнальных каскадов от блокировки апоптоза до усиления пролиферации опухолевых клеток. Активация процессов транскрипции и внутриклеточного сигналинга в опухолевых клетках под действием внДНК обоих типов, продемонстрированная *in vitro*, может усилить чувствительность опухолевых клеток к другим стимулам (гистонам, низкомолекулярным медиаторам, факторам роста и т.д.), которые циркулируют в кровотоке вместе с внДНК *in vivo* [36]. В итоге общая мобилизация клеточных процессов может способствовать пролиферации опухолевых клеток, формированию опухолевого микроокружения, росту опухолевого узла, усилению миграции и в конечном итоге усилению онкогенеза, формированию преметастатической ниши и метастазированию.

Вклад авторов. М.Н.Л., З.М.А. — идея и руководство исследованием; Ф.А.А., А.Л.А., С.А.В., С.И.А. — проведение исследований; А.Л.А., М.Н.Л. — обсуждение результатов экспериментов с согласованием со всеми авторами; Ф.А.А., А.Л.А., М.Н.Л. — написание рукописи; З.М.А. — редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00289).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры с животными проводились в соответствии

с рекомендациями по правильному использованию и уходу за лабораторными животными (Директива ЕСС 2010/63/ЕС). Все эксперименты на животных были одобрены и выполнены по рекомендациям биоэтического комитета ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, Россия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oellerich, M., Schütz, E., Beck, J., Kanzow, P., Plowman, P. N., Weiss, G. J., and Walson, P. D. (2017) Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **54**, 205-218, doi: 10.1080/10408363.2017.1299683.
- Balla, A., Bhak, J., and Biró, O. (2022) The application of circulating tumor cell and cell-free DNA liquid biopsies in ovarian cancer, *Mol. Cell Probes*, **66**, 101871, doi: 10.1016/j.mcp.2022.101871.
- Otandault, A., Anker, P., Al Amir Dache, Z., Guillaumon, V., Meddeb, R., Pastor, B., Pisareva, E., Sanchez, C., Tanos, R., Tusch, G., Schwarzenbach, H., and Thierry, A. R. (2019) Recent advances in circulating nucleic acids in oncology, *Ann. Oncol.*, **30**, 374-384, doi: 10.1093/annonc/mdz031.
- Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Raoul, J. L., Guimbaud, R., Pezet, D., Artru, P., Assenat, E., Borg, C., MATHONNET, M., De La Fouchardière, C., Bouché, O., Gavoille, C., Fiess, C., Auzemery, B., Meddeb, R., Lopez-Crapez, E., Sanchez, C., Pastor, B., and Ychou, M. (2017) Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment, *Ann. Oncol.*, **28**, 2149-2159, doi: 10.1093/annonc/mdx330.
- Bachet, J. B., Bouché, O., Taieb, J., Dubreuil, O., Garcia, M. L., Meurisse, A., Normand, C., Gornet, J. M., Artru, P., Louafi, S., Bonnetain, F., Thiriot-Bidault, A., Baumgaertner, I., Coriat, R., Tougeron, D., Lecomte, T., Mary, F., Aparicio, T., Marthey, L., Taly, V., Blons, H., Vernerey, D., and Laurent-Puig, P. (2018) RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study, *Ann. Oncol.*, **29**, 1211-1219, doi: 10.1093/annonc/mdy061.
- Keller, L., Guibert, N., Casanova, A., Brayer, S., Farella, M., Delaunay, M., Gilhodes, J., Martin, E., Balagué, G., Favre, G., Pradines, A., and Meyer, N. (2019) Early circulating tumour DNA variations predict tumour response in melanoma patients treated with immunotherapy, *Acta Derm. Venereol.*, **99**, 206-210, doi: 10.2340/00015555-3080.
- Poli, V., and Zanoni, I. (2022) Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease, *Trends Microbiol.*, **31**, 280-293, doi: 10.1016/j.tim.2022.10.002.
- Sounbuli, K., Mironova, N., and Alekseeva, L. (2022) Diverse neutrophil functions in cancer and promising neutrophil-based cancer therapies, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 15827, doi: 10.3390/ijms232415827.
- Yang, L., Liu, Q., Zhang, X., Liu, X., Zhou, B., Chen, J., Huang, D., Li, J., Li, H., Chen, F., Liu, J., Xing, Y., Chen, X., Su, S., and Song, E. (2020) DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25, *Nature*, **583**, 133-138, doi: 10.1038/s41586-020-2394-6.
- García-Olmo, D. C., and García-Olmo, D. (2013) Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genomastasis, *Crit. Rev. Oncog.*, **18**, 153-161, doi: 10.1615/critrevoncog.v18.i1-2.90.
- García-Olmo, D., García-Olmo, D. C., Domínguez-Berzosa, C., Guadalajara, H., Vega, L., and García-Arranz, M. (2012) Oncogenic transformation induced by cell-free nucleic acids circulating in plasma (genomastasis) remains after the surgical resection of the primary tumor: a pilot study, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **12 Suppl 1**, S61-S68, doi: 10.1517/14712598.2012.685151.
- Olmedillas-López, S., García-Olmo, D. C., García-Arranz, M., Peiró-Pastor, R., Aguado, B., and García-Olmo, D. (2018) Liquid biopsy by NGS: differential presence of exons (DPE) in cell-free DNA reveals different patterns in metastatic and nonmetastatic colorectal cancer, *Cancer Med.*, **7**, 1706-1716, doi: 10.1002/cam4.1399.
- Mittra, I., Khare, N. K., Raghuram, G. V., Chaubal, R., Khambatti, F., Gupta, D., Gaikwad, A., Prasannan, P., Singh, A., Iyer, A., Singh, A., Upadhyay, P., Nair, N. K., Mishra, P. K., and Dutt, A. (2015) Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes, *J. Biosci.*, **40**, 91-111, doi: 10.1007/s12038-015-9508-6.
- Souza, A. G., Bastos, V. A. F., Fujimura, P. T., Ferreira, I. C. C., Leal, L. F., da Silva, L. S., Laus, A. C., Reis, R. M., Martins, M. M., Santos, P. S., Corrêa, N. C. R., Marangoni, K., Thomé, C. H., Colli, L. M., Goulart, L. R., and Goulart, V. A. (2020) Cell-free DNA promotes malignant transformation in

- non-tumor cells, *Sci. Rep.*, **10**, 21674, doi: 10.1038/s41598-020-78766-5.
15. Alekseeva, L. A., Mironova, N. L., Brenner, E. V., Kurilshikov, A. M., Patutina, O. A., and Zenkova, M. A. (2017) Alteration of the exDNA profile in blood serum of LLC-bearing mice under the decrease of tumour invasion potential by bovine pancreatic DNase I treatment, *PLoS One*, **12**, e0171988, doi: 10.1371/journal.pone.0171988.
 16. Alekseeva, L. A., Sen'kova, A. V., Zenkova, M. A., and Mironova, N. L. (2020) Targeting circulating SINEs and LINEs with DNase I provides metastases inhibition in experimental tumor models, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **20**, 50-61, doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.035.
 17. Alekseeva, L., Sen'kova, A., Savin, I., Zenkova, M., and Mironova, N. (2021) Human recombinant DNase I (Pulmozyme®) inhibits lung metastases in murine metastatic b16 melanoma model that correlates with restoration of the DNase activity and the decrease SINE/LINE and c-Myc fragments in blood cell-free DNA, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12074, doi: 10.3390/ijms222112074.
 18. Park, J. G., Kramer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. (1987) Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay, *Cancer Res.*, **47**, 5875-5879.
 19. Lee, T. H., Chennakrishnaiah, S., Audemard, E., Montermini, L., Meehan, B., and Rak, J. (2014) Oncogenic *ras*-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **451**, 295-301, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.109.
 20. Baca, S. C., Prandi, D., Lawrence, M. S., Mosquera, J. M., Romanel, A., Drier, Y., Park, K., Kitabayashi, N., MacDonald, T. Y., Ghandi, M., Van Allen, E., Kryukov, G. V., Sboner, A., Theurillat, J. P., Soong, T. D., Nickerson, E., Auclair, D., Tewari, A., Beltran, H., Onofrio, R. C., Boysen, G., Guiducci, C., Barbieri, C. E., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Saksena, G., Voet, D., Ramos, A. H., Winckler, W., Cipicchio, M., Ardlie, K., Kantoff, P. W., Berger, M. F., Gabriel, S. B., Golub, T. R., Meyerson, M., Lander, E. S., Elemento, O., Getz, G., Demichelis, F., Rubin, M. A., and Garraway, L. A. (2013) Punctuated evolution of prostate cancer genomes, *Cell*, **153**, 666-677, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.021.
 21. Chen, R., Du, J., Zhu, H., and Ling, Q. (2021) The role of cGAS-STING signalling in liver diseases, *JHEP Rep.*, **3**, 100324, doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100324.
 22. Brezgin, S., Kostyusheva, A., Ponomareva, N., Volia, V., Goptar, I., Nikiforova, A., Shilovskiy, I., Smirnov, V., Kostyushev, D., and Chulanov, V. (2020) Clearing of foreign episomal DNA from human cells by CRISPRa-mediated activation of cytidine deaminases, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6865, doi: 10.3390/ijms21186865.
 23. Cotterman, R., Jin, V. X., Krig, S. R., Lemen, J. M., Wey, A., Farnham, P. J., and Knoepfler, P. S. (2008) N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor, *Cancer Res.*, **68**, 9654-9662, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1961.
 24. Judson, H., van Roy, N., Strain, L., Vandesompele, J., Van Gele, M., Speleman, F., and Bonthron, D. T. (2000) Structure and mutation analysis of the gene encoding DNA fragmentation factor 40 (caspase-activated nuclease), a candidate neuroblastoma tumour suppressor gene, *Hum Genet.*, **106**, 406-413, doi: 10.1007/s004390000257.
 25. Larsen, B. D., and Sorensen, C. S. (2017) The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond, *FEBS J.*, **284**, 1160-1170, doi: 10.1111/febs.13970.
 26. Alekseeva, L., and Mironova, N. (2021) Role of cell-free DNA and deoxyribonucleases in tumor progression, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12246, doi: 10.3390/ijms222212246.
 27. Fahmi, T., Wang, X., Zhdanov, D. D., Islam, I., Apostolov, E. O., Savenka, A. V., and Basnakian, A. G. (2020) DNase I induces other endonucleases in kidney tubular epithelial cells by its DNA-degrading activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8665, doi: 10.3390/ijms21228665.
 28. McCord, J. J., Engavale, M., Masoumzadeh, E., Villarreal, J., Mapp, B., Latham, M. P., Keyel, P. A., and Sutton, R. B. (2022) Structural features of Dnase1L3 responsible for serum antigen clearance, *Commun. Biol.*, **5**, 825, doi: 10.1038/s42003-022-03755-5.
 29. Wang, G., Lam, W. K. J., Ling, L., Ma, M. L., Ramakrishnan, S., Chan, D. C. T., Lee, W. S., Cheng, S. H., Chan, R. W. Y., Yu, S. C. Y., Tse, I. O. L., Wong, W. T., Jiang, P., Chiu, R. W. K., Allen Chan, K. C., and Lo, Y. M. D. (2022) Fragment ends of circulating microbial DNA as signatures for pathogen detection in sepsis, *Clin. Chem.*, **69**, 189-201, doi: 10.1093/clinchem/hvac197.
 30. Udou, T., Hachisuga, T., Tsujioka, H., and Kawabayashi, T. (2004) The role of c-jun protein in proliferation and apoptosis of the endometrium throughout the menstrual cycle, *Gynecol. Obstet. Invest.*, **57**, 121-126, doi: 10.1159/000075701.
 31. Leech, J. T., Brennan, A., Don, N. A., Mason, J. M., and Kad, N. M. (2022) *In vitro* single molecule and bulk phase studies reveal the AP-1 transcription factor cFos binds to DNA without its partner cJun, *J. Biol. Chem.*, **298**, 102229, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102229.
 32. Li, C., Kuai, L., Cui, R., and Miao, X. (2022) Melanogenesis and the targeted therapy of melanoma, *Bio-molecules*, **12**, 1874, doi: 10.3390/biom12121874.

33. Roers, A., Hiller, B., and Hornung, V. (2016) Recognition of endogenous nucleic acids by the innate immune system, *Immunity*, **44**, 739-754, doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.002.
34. Kostjuk, S., Loseva, P., Chvartatskaya, O., Ershova, E., Smirnova, T., Malinovskaya, E., Roginko, O., Kuzmin, V., Izhevskaya, V., Baranova, A., Ginter, E., and Veiko, N. (2012) Extracellular GC-rich DNA activates TLR9- and NF- κ B-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (haMSCs), *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **12 Suppl 1**, S99-S111, doi: 10.1517/14712598.2012.690028.
35. Kawai, K., Li, Y. S., Song, M. F., and Kasai, H. (2010) DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 260-265, doi: 10.1016/j.bmcl.2009.10.124.
36. Duvvuri, B., and Lood, C. (2019) Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases, *Front. Immunol.*, **10**, 502, doi: 10.3389/fimmu.2019.00502.

IMPACT OF CELL-FREE DNA FROM BLOOD SERUM OF MICE WITH METASTATIC MELANOMA ON THE ENHANCEMENT OF ONCOGENIC PROPERTIES OF MELANOMA CELLS

A. A. Filatova^{1,2}, L. A. Alekseeva¹, I. A. Savin¹, A. V. Sen'kova¹,
M. A. Zenkova¹, and N. L. Mironova^{1*}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: mironova@niboch.nsc.ru*

² *Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Currently, a significant increase in the levels of circulating cell-free DNA (cfDNA) in the blood of patients is a generally recognized marker of the development of oncological diseases. Although tumor-associated cfDNA has been well studied, its biological functions remain unclear. In this work, we investigated the effect of cfDNA isolated from the blood serum of mice with B16-F10 metastatic melanoma on the properties of B16-F10 melanoma cells *in vitro*. It was found that the profile of cfDNA isolated from blood serum of mice with melanoma differs significantly from the cfDNA isolated from blood serum of healthy mice, and is similar concerning the abundance of oncogenes and mobile genetic elements (MGE) to the genomic DNA of B16 cells. It was shown that cfDNA of mice with melanoma penetrated into B16 cells, resulting to the increase in the abundance of oncogenes and MGE fragments, and caused the 5-fold increased mRNA level of the secreted DNase *Dnase113* and a slight increase of the mRNA level of the *Jun*, *Fos*, *Ras*, and *Myc* oncogenes. cfDNA of healthy mice caused increasing of mRNA level of the intracellular regulatory DNase *EndoG* and a 4-fold increase of mRNA level of *Fos* and *Ras* oncogenes, which are well-known triggers of a large number of signal cascades, from apoptosis inhibition to increased tumor cell proliferation. Thus, it is obvious that the circulating cfDNA of tumor origin is able to penetrate into cells and, despite the fact that no changes were found in the level of viability and migration activity of tumor cells, cfDNA, even with a single exposure, can cause changes at the cellular level that increase the oncogenicity of recipient cells.

Keywords: circulating cell-free DNA, melanoma B16