

УДК 575.113: 576.316:577.21
© Коллектив авторов, 2020

Е.М. Малиновская¹, Е.А. Кожина¹, Е.С. Ершова¹,
М.С. Конькова¹, В.П. Вейко^{1,2}, П.А. Бобровский³, В.Н. Лазарев³,
Л.В. Каменева¹, В.М. Писарев⁴, Н.Н. Вейко¹, С.В. Костюк^{1,4}

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПО ГЕНАМ TLR9 И AIM2 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ MCF7 НА ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И ГИПОКСИИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ГЦ-ОБОГАЩЕННЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», г. Москва

²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук», г. Москва

³ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, г. Москва

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

Цель исследования. Определить влияние GC-богатых фрагментов ДНК (GC-ДНК) на экспрессию маркерных генов гипоксии и окислительного стресса в клетках рака молочной железы MCF7, нокаутированных по генам TLR9 и AIM2, кодирующих внутриклеточные сенсорные молекулы ДНК.

Материал и методы. Исследование проведено на интактных клетках MCF7, четырех клонах клеток MCF7, нокаутированных по гену TLR9 (TLR9^{-/-}), и двух клонах клеток MCF7, нокаутированных по гену AIM2 (AIM2^{-/-}). Уровень экспрессии белков определяли методом проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии генов определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Результаты. Нокаутные культуры MCF7, в отличие от интактных, отвечают на стимуляцию фрагментов GC-ДНК снижением окислительного стресса и транскрипционной активности генов маркеров гипоксии, что приводит к увеличению выживаемости раковых клеток.

Выводы. Доказана ключевая роль сенсоров ДНК TLR9 и AIM2 как триггеров, способствующих выживанию адаптивных реакций злокачественных клеток на GC-обогатенные фрагменты ДНК опухолевого ландшафта.

Ключевые слова: GC-вкДНК, клеточная линия MCF7, геновые регуляторные сети.

E.M. Malinovskaya, E.A. Kozhina, E.S. Ershova,
M.S. Kon'kova, V.P. Veiko, P.A. Bobrovsky, V.N. Lazarev,
L.V. Kameneva, V.M. Pisarev, N.N. Veiko, S.V. Kostyuk

EFFECT OF TLR9/AIM2 GENE KNOCKOUT IN MCF7 TUMOR CELLS ON ALTERATIONS OF OXIDATIVE STRESS AND HYPOXIA MARKER GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO GC-ENRICHED DNA FRAGMENTS

The purpose of this study was to determine the influence of GC-DNA on the expression of hypoxia and oxidative stress marker genes in breast cancer MCF7 cells knocked out for the TLR9 and AIM2 encoding intracellular DNA sensor molecules.

Material and methods. The study was conducted on intact MCF7 cells, four clones of MCF7 cells knocked out by the TLR9 gene (TLR9^{-/-}), and two clones of MCF7 cells knocked out by the AIM2 gene (AIM2^{-/-}). The protein expression was determined by flow cytometry. The gene expression in cells was studied by real-time PCR.

Results. The results of the study showed that knockout MCF7 cultures, in contrast to intact ones, respond to GC-DNA fragments stimulation by reducing the oxidative stress and hypoxia marker genes transcriptional activity both resulted in increased survival of cancer cells.

Conclusions. The key role of TLR9 and AIM2 DNA sensors as triggers of adaptive survival-promoting responses of malignant cells to the GC-DNA fragments originated from the tumor landscape has been proved.

Key words: GC-DNA, cell line MCF7, gene regulatory networks.

Циркулирующая внеклеточная ДНК (вкДНК) является потенциальным диагностическим и прогностическим биомаркером при многих видах рака. Фрагменты циркулирующей вкДНК высвобождаются как из тканей здоровых людей, так и из опухолевых клеток онкологических больных [1]. В недавних исследованиях отмечалось, что вкДНК может стимулировать пролиферацию некоторых раковых клеток [2].

Ранее нами были получены данные, что во вкДНК, выделенной из крови больных раком молочной железы, накапливаются фрагменты GC-богатой транскрибируемой области рибосомного повтора (рДНК), устойчивые к действию нуклеаз крови [3]. Кроме того, многократное увеличение количества копий рДНК в составе вкДНК наблюдается при процессах, сопровождающихся повышенным уровнем гибели клеток, таких как хронические патологи-

ческие состояния [4], хронические внешние повреждающие воздействия [5,6].

ВкДНК, высвобождающаяся из стрессовых, некротических или поврежденных клеток, является эндогенным сигналом повреждения, активирующим клетки врожденной иммунной системы [3,7]. Многие ДНК-сенсоры служат рецепторами распознавания таких сигналов. Прежде всего, к ДНК-сенсорам относят трансмембранный рецептор TLR9 (toll-like receptor 9), а также цитозольный рецептор AIM2 (absent in melanoma 2).

Активация TLR9 повышает выживаемость раковых клеток путем активации сигнального пути TLR9-MyD88-NF- κ B, вызывающего блокаду апоптоза и усиление аутофагии [7,8]. В то же время экспрессия AIM2 в опухолевых клетках выполняет противоположную роль, подавляя пролиферацию клеток, а также повышая чувствительность к проводимой противоопухолевой терапии [9].

Данное исследование методически основано на экспериментальном нокауте обоих типов ДНК-сенсоров с целью их «выключения» из процессов регуляции транскрипционной активности генов.

Целью работы было выяснение адаптивных реакций транскриптома злокачественных клеток на эффекты ГЦ-богатых фрагментов ДНК (ГС-ДНК). В качестве маркерных адаптивных реакций генной активности определяли транскрипцию генов оксидативного стресса и гипоксии, экспрессия которых может способствовать повышенной выживаемости раковых клеток при фармако- и радиотерапии опухолей.

Материал и методы

В экспериментах *in vitro* использованы культивируемые клетки MCF7 (аденокарциномы 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 клона клеток MCF7, нокаутированных по гену TLR9 (TLR9^{-/-}), и два клона клеток MCF7, нокаутированных по гену AIM2 (AIM2^{-/-}).

Интактные и нокаутированные клетки культивировали в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой, 2 мл L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина. Клетки MCF7 выращивали в увлажненной атмосфере при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

В качестве источника ГС-ДНК использовали плазмидную ДНК (10197 п.н.), содер-

жащую последовательности рДНК (5836 п.н., 73% ГЦ-пар), клонированные в сайт EcoRI вектора pBR322 (Sigma-Aldrich, США). Перед обработкой плазмидной ДНК клетки выращивали в течение 24 ч в слайд-флаконах. ГС-ДНК добавляли в клеточную культуральную среду в конечной концентрации 50 нг/мл. Клетки культивировали в присутствии ГС-ДНК в течение трех часов. Эксперименты повторяли не менее трех раз.

Уровень экспрессии белков определяли методом проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр CyFlow PARTEC, Германия).

Уровень экспрессии генов в клетках оценивали методом ПЦР в реальном времени с помощью прибора StepOnePlus (Applied Biosystems, США), используя набор SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, США). Общую мРНК выделяли с помощью наборов Rneasy Mini (Qiagen, Германия), затем обрабатывали ДНКазой I и проводили обратную транскрипцию с помощью набора обратной транскриптазы (Силекс, Россия). Техническая ошибка составляла не более 2%.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph. Для сравнения полученных данных использовали U-критерий Манна–Уитни. Данный параметр позволяет выявить различия между малыми выборками. Чем меньше значение критерия, тем вероятнее, что различия между значениями параметра в выборках достоверны.

Результаты

Интактная культура клеток

Стимуляция интактных (ненокаутированных) клеточных культур фрагментами ГС-ДНК повышала транскрипционную активность генов NOX4 (в 2,6 раз), HMOX1 (в 2,9 раз) и HIF1A (в 3,2 раза) $p < 0,01$ во всех случаях (см. рисунок 1А). Как видно из рисунка, повышению транскрипционной активности генов NOX4 и HIF1A соответствовало повышение уровня соответствующих белков. Так, после добавления ГС-ДНК в ненокаутированные культуры MCF7 содержание белков NOX4 и HIF1A в клетках повышалось, соответственно, в 3,0 и в 2,2 раза ($p < 0,05$ в обоих случаях) (см. рисунок 1Б).

Уровень транскрипционной активности гена *NRF2*, кодирующего одноименный белок, который является ключевым регулятором антиоксидантного ответа, не зависел от стимуляции фрагментами ГС-ДНК и был низок как в интактной культуре MCF7, так и в нокаутированных клетках.

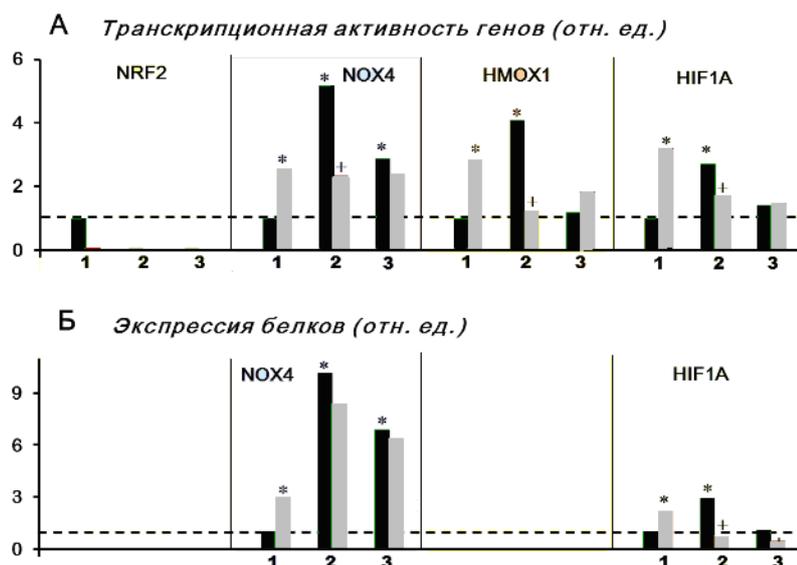


Рис. Транскрипционная активность генов, маркеров оксидативного стресса и гипоксии, в нокаутированных культурах клеток MCF7. Примечание. Данные представлены в условных единицах; 1 – интактные клетки MCF7; 2 – TLR9^{-/-} клетки MCF7 (нокаут по TLR9); 3 – AIM2^{-/-} клетки MCF7 (нокаут по AIM2); черные столбцы – необработанные клетки, серые столбцы – клетки через 3 часа после добавления GC-ДНК (50 нг/мл); *p < 0,05 по сравнению с интактными клетками MCF7; +p < 0,05 по сравнению с культурами, не обработанными GC-ДНК.

Клетки TLR9^{-/-}

В культуре клеток MCF7, подвергшихся нокаутированию по гену TLR9, по сравнению с интактными (ненокаутированными) клетками было отмечено существенное повышение транскрипционной активности генов NOX4 и HIF1A (см. рисунок 1А). Так, уровень транскрипционной активности гена NOX4 в TLR9^{-/-} клетках был в 5,2 раза выше, чем в интактных культурах MCF7 (p < 0,001). Транскрипционная активность гена HIF1A в TLR9^{-/-} культурах была повышена в 2,7 раза (p < 0,05). Транскрипционная активность гена HMOX1 в TLR9^{-/-} клетках была значительно выше соответствующих параметров в интактных (ненокаутированных) (p < 0,05).

В TLR9^{-/-}-клетках в присутствии фрагментов GC-ДНК уровни транскрипционной активности генов NOX4, HMOX1 и HIF1A существенно снижались – в 2,2, в 3,3 и в 1,6 раза соответственно (все p < 0,01).

Уровень экспрессии белка NOX4 соответствовал повышенной транскрипционной активности соответствующего гена в TLR9^{-/-} клетках (рис. 1Б). Содержание белка NOX4 в TLR9^{-/-} культурах было в 10,2 раза выше, чем в интактных MCF7 (p < 0,001). В TLR9^{-/-} клетках уровень экспрессии белка HIF1A был повышен в 2,9 раза (p = 0,045).

При стимуляции GC-ДНК уровень экспрессии белка HIF1A в этих клетках снижался в 4,1 раза, а уровень экспрессии белка NOX4 не претерпевал существенных изменений.

Клетки AIM2^{-/-}

В клетках AIM2^{-/-} по сравнению с интактными (ненокаутированными) клетками было отмечено существенное повышение

транскрипционной активности генов NOX4 и HIF1A (см. рисунок 1А). Так, уровень транскрипционной активности гена NOX4 был в 2,9 раза выше, чем в интактных культурах MCF7 (p < 0,001). Транскрипционная активность гена HIF1A в AIM2^{-/-} культурах была повышена в 1,4 раза (p < 0,05). Транскрипционная активность гена HMOX1 практически не отличалась от таковой в интактных культурах.

В AIM2^{-/-}-клетках, стимулированных GC-ДНК, транскрипционная активность генов NOX4 и HIF1A существенно не изменялась, а транскрипционная активность гена HMOX1 характеризовалась тенденцией к некоторому возрастанию (в 1,5 раза, p = 0,065).

Уровень экспрессии белка NOX4 соответствовал повышенной транскрипционной активности соответствующего гена в AIM2^{-/-} клетках (рис. 1Б). Содержание белка NOX4 в AIM2^{-/-} культурах было в 6,7 раза выше, чем в интактных MCF7 (p < 0,001). В то же время содержание белка HIF1A не отличалось от такового в интактных MCF7.

При стимуляции GC-ДНК уровень экспрессии белка HIF1A в нокаутированных клетках снижался в 2,4 раза, а уровень экспрессии белка NOX4 не претерпевал существенных изменений.

Обсуждение

Окислительный стресс тесно связан с возникновением и развитием различных заболеваний, таких как рак, сахарный диабет, сердечно-сосудистые и инфекционные заболевания. В нашем исследовании мы изучали изменения экспрессии генов, маркеров оксидативного стресса (NRF2 и NOX4), и гипоксии

(HMOX1 и HIF1A) в клетках рака молочной железы MCF7, интактных и нокаутированных по генам ДНК-сенсоров TLR9 или AIM2 под воздействием GC-ДНК.

Известно, что недостаточность кислорода в тканях, развивающаяся при гипоксических патологических состояниях (сепсис, ишемия жизненно важных органов, рак) может приводить к молекулярным и даже генетическим изменениям в клетках [10]. В злокачественных клетках гипоксия может способствовать прогрессированию опухоли и возникновению резистентности к химио- и радиотерапии [11]. HIF-1 – ген-маркер гипоксии, активирует транскрипцию генов, которые участвуют в канцерогенезе, контролируя ангиогенез, выживание клеток (включая наиболее злокачественные – стволоподобные клетки рака), метаболизм глюкозы, инвазию и метастазирование [12]. При многих типах рака, например, при глиобластоме, наблюдается гиперэкспрессия HIF-1 [12]. Чрезмерная экспрессия при таких типах рака, как глиобластома, характерна и для гена HMOX1 [13]. Еще один ген, экспрессия которого изменялась в нашем исследовании под влиянием GC-ДНК – NOX4, вносит вклад в геномную нестабильность при раке у человека на основе его способности конститутивно генерировать H₂O₂ [14].

В нашем исследовании при добавлении GC-ДНК к интактным клеткам наблюдалось значительное увеличение экспрессии всех трех генов, при этом содержание белков NOX4 и HIF1A коррелировало с высоким уровнем транскрипции соответствующих генов. Во всех культурах MCF7 с нокаутом генов TLR9 или AIM2 экспрессия этих генов значительно повышалась в 1,2–5 раз по сравнению с интактными клетками (во всех случаях $p < 0,05$). Однако стимуляция фрагментами GC-ДНК в нокаутных клетках TLR9^{-/-} вызывала снижение транскрипционной активности этих генов в 1,6–3,3 раза ($p < 0,05$ во всех случаях) и не оказывала существенного влияния на транскрипционную активность этих генов в клетках AIM2^{-/-}.

NRF2 является главным регулятором окислительно-восстановительного гомеостаза

и обеспечивает клеточную защиту от окислителей и электрофилов, индуцируя экспрессию широкого спектра цитопротекторных генов фазы II [15]. Однако ряд данных свидетельствует о том, что NRF2 может способствовать развитию химио- и радиорезистентности опухолей, а его высокая экспрессия коррелирует с плохим прогнозом для пациентов при раке [15]. В нашей работе уровень транскрипционной активности данного гена не зависел от стимуляции фрагментами GC-ДНК и был низок как в интактной культуре клеток, так и в нокаутированных по любому из обоих генов.

Заключение

Таким образом, исследование показало, что нокаутированные по генам TLR9 и AIM2 культуры MCF7, в отличие от интактных клеток, отвечают на стимуляцию фрагментами GC-ДНК снижением транскрипционной активности маркерных генов оксидативного стресса и гипоксии, повышенная экспрессия которых усиливает выживаемость раковых клеток. Данные результаты вносят существенный вклад в понимание взаимосвязи такого фактора опухолевого ландшафта, как GC-ДНК и сигнальных каскадов, контролируемых генами антиоксидантного ответа и гипоксии в опухолевых клетках. Полученные данные служат обоснованием для разработки средств стратегии целенаправленного воздействия на механизмы развития резистентности раковых клеток к проводимой терапии, используя в качестве молекулярных мишеней сенсорные молекулы TLR9 и AIM2.

Финансовая поддержка. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 17-29-06017 офи_м (создание генетических конструкций для исследования воздействий на интактные и нокаутированные злокачественные клетки) и проекта № 0517-2018-0003 программы Президиума РАН.

Благодарности

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

Сведения об авторах статьи:

Малиновская Елена Михайловна – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова. Адрес: 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1. E-mail: m.elena.0402@gmail.com.

Кожина Екатерина Алексеевна – м.н.с. лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова». Адрес: 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1. E-mail: e_kozhina@mail.ru.

Ершова Елизавета Сергеевна – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова». Адрес: 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1. E-mail: es-ershova@gambler.ru.

Конькова Марина Сергеевна – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова». Адрес: 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1. E-mail: mkonkova@gmail.com.

Вейко Владимир Петрович – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова»; главный научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук». Адрес: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2. E-mail: vladveiko@yahoo.com.

Бобровский Павел Александрович – м.н.с. лаборатории геномной инженерии ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России. Адрес: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1а. E-mail: pbobrovskiy@gmail.com.
Лазарев Василий Николаевич – д.б.н., заведующий лабораторией геномной инженерии ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России. Адрес: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1а. E-mail: lazar0@mail.ru.
Каменева Лариса Владимировна – научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова». Адрес: 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1. E-mail: larisa.kameneva@yandex.ru.
Писарев Владимир Митрофанович – д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов критических состояний НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФГБНУ ФНКЦ РР Минобрнауки России. Адрес: 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2. E-mail: vprisarev@gmail.com.
Вейко Наталья Николаевна – д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова». Адрес: 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1. E-mail: satelit32006@yandex.ru.
Костюк Светлана Викторовна – д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной биологии ФГБНУ МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова». Адрес: 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1. E-mail: svet-vk@yandex.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications / A.L. Volckmar [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2018. – Vol.5 7, № 3. – P. 123-139.
2. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines / W. Wang [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 26. – P. 43180-43191.
3. Ribosomal DNA as DAMPs signal for MCF7 cancer cells / E.M. Malinovskaya [et al.] // *Front Oncol*. – 2019. – Vol. 9. – P. 445.
4. Delayed appearance of hypertension in spontaneously hypertensive rat (SHR) injected with CpG-rich DNA early in ontogenesis / N.N. Veiko [et al.] // *Biomed Khim*. – 2010. – Vol. 56, № 6. – P. 686-699.
5. 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 / I.B. Korzeneva [et al.] // *Mutat Res*. – 2016. – Vol. 791-792. – P. 49-60.
6. 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 / I.V. Chestkov [et al.] // *Meditsinskaya genetika*. – 2016. – Vol. 15. – P. 43-50.
7. Extracellular DNA promotes colorectal tumor cell survival after cytotoxic chemotherapy / R. Anunobi [et al.] // *J Surg Res*. – 2018. – Vol. 226. – P. 181-191.
8. 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.
9. Absent in melanoma 2 regulates tumor cell proliferation in glioblastoma multiforme / P.A. Chen [et al.] // *J Neurooncol*. – 2019. – Vol. 144, № 2. – P. 265-273.
10. Continuous hypoxia and glucose metabolism, the effects on genes expression in MCF7 breast cancer cell line / A.Q. Al Bawab [et al.] // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. – 2020. [Epub ahead of print]
11. Vaupel, P. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome / P. Vaupel, M. Arnulf // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2007. – Vol. 26. – P. 225-239.
12. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy / G.L. Semenza // *Nat Rev Cancer*. – 2003. – Vol. 3, № 10. – P. 721-322003.
13. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide regulate growth and progression in glioblastoma cells / C. Castruccio Castracani [et al.] // *Mol Neurobiol*. – 2020. – Vol. 57, № 5. – P. 2436-2446.
14. Decoding NADPH oxidase 4 expression in human tumors / J.L. Meitzler [et al.] // *Redox Biol*. – 2017. – Vol. 13. – P. 182-195.
15. Molecular mechanisms and systemic targeting of NRF2 dysregulation in cancer / J.S. Kang [et al.] // *Biochem Pharmacol*. – 2020. – Vol. 177. – P. 114002.

REFERENCES

1. A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications / A.L. Volckmar [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2018. – Vol.5 7, № 3. – P. 123-139.
2. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines / W. Wang [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 26. – P. 43180-43191.
3. Ribosomal DNA as DAMPs signal for MCF7 cancer cells / E.M. Malinovskaya [et al.] // *Front Oncol*. – 2019. – Vol. 9. – P. 445.
4. Delayed appearance of hypertension in spontaneously hypertensive rat (SHR) injected with CpG-rich DNA early in ontogenesis / N.N. Veiko [et al.] // *Biomed Khim*. – 2010. – Vol. 56, № 6. – P. 686-699.
5. 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 / I.B. Korzeneva [et al.] // *Mutat Res*. – 2016. – Vol. 791-792. – P. 49-60.
6. 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 / I.V. Chestkov [et al.] // *Meditsinskaya genetika*. – 2016. – Vol. 15. – P. 43-50.
7. Extracellular DNA promotes colorectal tumor cell survival after cytotoxic chemotherapy / R. Anunobi [et al.] // *J Surg Res*. – 2018. – Vol. 226. – P. 181-191.
8. 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.
9. Absent in melanoma 2 regulates tumor cell proliferation in glioblastoma multiforme / P.A. Chen [et al.] // *J Neurooncol*. – 2019. – Vol. 144, № 2. – P. 265-273.
10. Continuous hypoxia and glucose metabolism, the effects on genes expression in MCF7 breast cancer cell line / A.Q. Al Bawab [et al.] // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. – 2020. [Epub ahead of print]
11. Vaupel, P. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome / P. Vaupel, M. Arnulf // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2007. – Vol. 26. – P. 225-239.
12. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy / G.L. Semenza // *Nat Rev Cancer*. – 2003. – Vol. 3, № 10. – P. 721-322003.
13. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide regulate growth and progression in glioblastoma cells / C. Castruccio Castracani [et al.] // *Mol Neurobiol*. – 2020. – Vol. 57, № 5. – P. 2436-2446.
14. Decoding NADPH oxidase 4 expression in human tumors / J.L. Meitzler [et al.] // *Redox Biol*. – 2017. – Vol. 13. – P. 182-195.
15. Molecular mechanisms and systemic targeting of NRF2 dysregulation in cancer / J.S. Kang [et al.] // *Biochem Pharmacol*. – 2020. – Vol. 177. – P. 114002.