

УДК 575:611.77

**ВОДОРАСТВОРИМОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ФУЛЛЕРЕНА C₇₀
РЕГУЛИРУЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ САТЕЛЛИТА III
В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА**

**¹Савинова Е.А., ¹Каменева Л.В., ¹Ершова Е.С., ^{1,2}Умрюхин П.Е., ^{1,2}Родионов И.В.,
¹Артюшин А.А., ³Краевая О.А., ^{3,4}Трошин П.А., ¹Вейко Н.Н., ¹Костюк С.В.**

¹*ФГБУН «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»,
Москва, e-mail: pavelum@mail.ru;*

²*ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва;*

³*ФГБУН «Институт проблем химической физики» Российской академии наук, Москва;*

⁴*Силезский технологический университет, Гливице*

Сателлитная ДНК – характерный компонент генома эукариотических клеток, состоящий из тандемно организованных повторов нуклеотидных последовательностей. Сателлитная ДНК не кодирует белки и локализована в конститутивном гетерохроматине хромосом. Сателлитная ДНК характерна для теломерных и центромерных областей хромосом. Транскрипция сателлита III и увеличение числа копий сателлита III в геноме существенно возрастают при репликативном и стресс-индуцированном старении клеток человека, наряду с увеличением уровня окислительного стресса в клетках организма. При этом клетки с большим содержанием сателлита III не отвечают на пролиферативные и иные стимулы, что значительно уменьшает жизнеспособность всей популяции стареющих клеток. В результате проведенных экспериментов в настоящем исследовании было показано, что водорастворимое производное фуллерена C₇₀ снижает уровень транскрипции сателлита III (1q12), а также число клеток с высоким содержанием сателлита III в стареющих культивируемых фибробластах кожи (human skin fibroblasts, HSF) с высоким уровнем активных форм кислорода (АФК). Таким образом, рассматриваемое водорастворимое производное фуллерена C₇₀ может быть рекомендовано к использованию в качестве потенциального агента, способного снижать скорость пролиферативного старения клеточных популяций, характеризующихся высоким уровнем окислительного стресса.

Ключевые слова: сателлит III, транскрипция сателлита III, фуллерены, старение

**THE WATER-SOLUBLE DERIVATIVE OF FULLERENE C₇₀ REGULATES
THE TRANSCRIPTION OF SATELLITE III IN CULTURED HUMAN SKIN FIBROBLASTS**

**¹Savinova E.A., ¹Kameneva L.V., ¹Ershova E.S., ^{1,2}Umryukhin P.E., ^{1,2}Rodionov I.V.,
¹Artyushin A.A., ³Kraevaya O.A., ^{3,4}Troshin P.A., ¹Veyko N.N., ¹Kostyuk S.V.**

¹*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, e-mail: pavelum@mail.ru;*

²*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow;*

³*Institute of Problems of Chemical Physics of RAS, Moscow;*

⁴*Silesian University of Technology, Gliwice*

Satellite DNA is a characteristic component of the genome of eukaryotic cells, consisting of tandem-organized repeats of nucleotide sequences. Satellite DNA does not encode proteins and is localized in the constitutive heterochromatin of chromosomes. Satellite DNA is characteristic of telomeric and centromeric regions of chromosomes. Transcription of satellite III and an increase in the number of copies of satellite III in the genome significantly increase with replicative and stress-induced aging of human cells, along with an increase in the level of oxidative stress in the cells of the body. At the same time, cells with a high content of satellite III do not respond to proliferative and other stimuli, which significantly reduces the viability of the entire population of aging cells. As a result of the experiments conducted in this study, it was shown that the water-soluble derivative of fullerene C₇₀ reduces the transcription level of satellite III (1q12), as well as the number of cells with a high content of satellite III in aging cultured skin fibroblasts (human skin fibroblasts, HSF) with a high level of reactive oxygen species (ROS). Thus, the considered water-soluble derivative of fullerene C₇₀ can be recommended for use as a potential agent capable of reducing the rate of proliferative aging of cell populations characterized by a high level of oxidative stress.

Keywords: satellite III, satellite III transcription, fullerenes, aging

Полиморфные сателлитные тандемные повторы генома человека входят в состав гетерохроматина прицентромерных и центромерных областей хромосом. Фракция сателлитных повторов, которая была обозначена как сателлит III (SatIII), локализо-

вана преимущественно в прицентромерном гетерохроматине нескольких хромосом. В ряде работ была описана транскрипция SatIII в клетках человека [1, 2]. Транскрипция сателлита является компонентом адаптивного ответа клетки на стресс. Однако

транскрипция SatIII и последующая трансформация РНК SatIII в ДНК SatIII, благодаря активности обратной транскриптазы, может приводить к увеличению размера гетерохроматинового блока SatIII [3]. Клетки с очень большим размером блока прицентромерного гетерохроматина не имеют возможности для развития адаптивного ответа и не делятся. Количество таких клеток возрастает при старении и в условиях хронического окислительного стресса [4]. Можно предположить, что снижение уровня активных форм кислорода (АФК) приведет к снижению активности транскрипции SatIII в стареющих клетках. Показано, что фуллерены C_{60} и C_{70} связывают в больших количествах АФК. В работе мы исследовали влияние водорастворимой формы фуллерена C_{70} на транскрипцию субфракции сателлита III в составе прицентромерного гетерохроматина первой и девятой хромосом.

Материалы и методы исследования

Водорастворимое производное фуллерена C_{70} (F) (рисунок, А) было синтезировано и охарактеризовано в Институте проблем химической физики РАН [5]. Четыре клеточные линии фибробластов кожи взрослых людей были отобраны из коллекции МГНЦ. Клетки (15–20 пассаж) культивировали в стандартных условиях в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА Laboratories, Австрия) в CO_2 инкубаторе при 37°C. Фуллерен в нетоксичной концентрации 10 мкМ добавляли к клеткам на 24 ч.

МТТ-тест. Тест проводили по стандартной методике, используя реагент МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) фирмы Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) и прибор «EnSpire plate reader» (EnSpire Equipment, Turku, Finland).

РТ-ПЦР. РНК клеток выделяли с использованием набора «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, ФРГ). РНК обработали ДНКзой I и провели обратную транскрипцию, применив «Reverse Transcriptase Kit» (Силекс, РФ). Амплификацию проводили с использованием набора «SYBRgreen PCR MasterMix» и прибора «StepOne Plus» (Applied Biosystems). Были использованы праймеры фирмы Силекс, РФ. В качестве стандарта применили ген ТВР. Структура праймеров приводится в работе [4].

QН (количественная нерадиоактивная гибридизация). Метод подробно описан в предыдущей работе и использовался без изменений [4]. В качестве ДНК-зонда на SatIII использовали плазмиду bio-pUC1.77, которую метили биотином ме-

тодом ник-трансляции с помощью набора фирмы Силекс, РФ. ДНК из клеток для проведения гибридизации выделяли стандартным методом с использованием экстракции органическими растворителями [4]. Клетки лизировали в присутствии 1% саркозилата натрия и 0,02 М ЭДТА, лизат обрабатывали последовательно РНКзой А и протеиназой К. После экстракции фенолом и фенолхлороформом, ДНК водной фазы осаждали 70% этанолом в присутствии 0,1 М ацетата натрия. Концентрацию ДНК определяли в комплексе с ДНК-связывающимся флуоресцентным красителем PicoGreen (Molecular Probes/Invitrogen, CA, USA).

Определение АФК

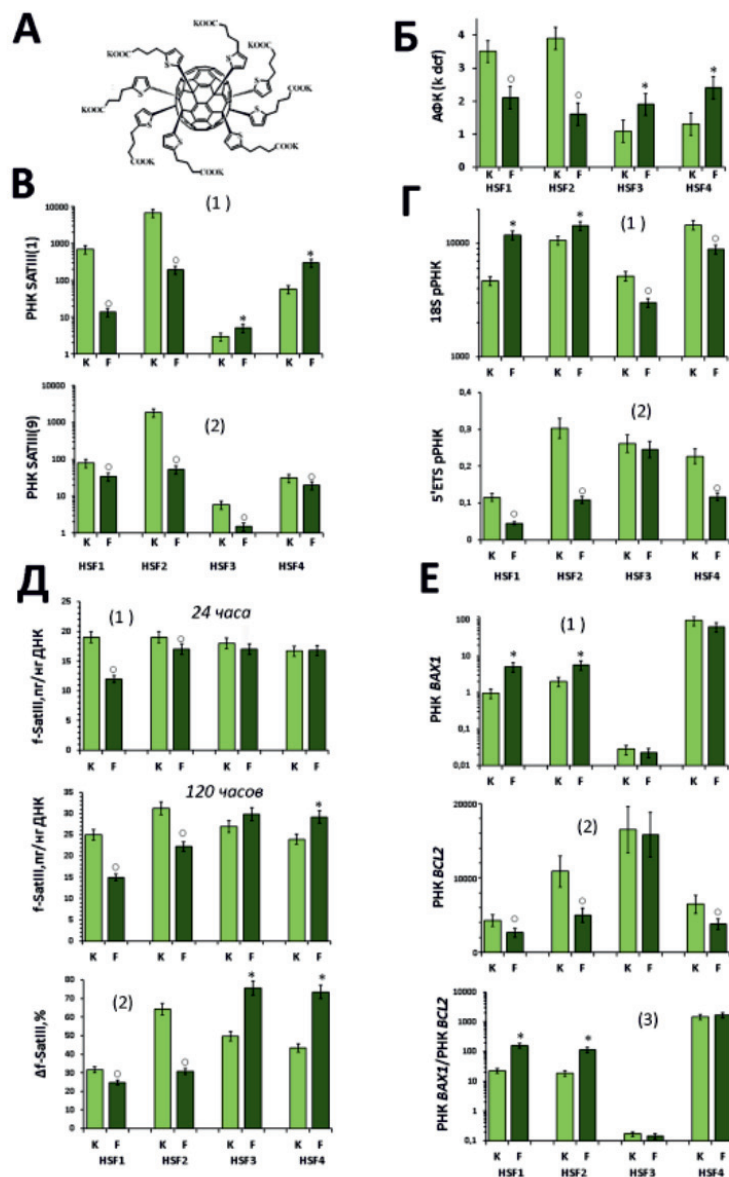
Использовали планшетный ридер (EnSpire Equipment, Finland), $\lambda_{в} = 488$ нм, $\lambda_{эм} = 528$ нм. Клетки обрабатывали 5 мкМ $H_2DCFH-DA$ (Molecular Probes/Invitrogen, CA, USA) и анализировали флуоресценцию в течение 10–40 мин. Константу синтеза DCF (*kdcf*) определяли из зависимости сигнала от времени инкубирования клеток с реагентом.

Статистический анализ

Все эксперименты были повторены не менее трех раз. На графиках приводятся средние значения измеряемых параметров и стандартные ошибки. Сравнение проводили с использованием критерия Манна – Уитни. Различия считали достоверными при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для исследования действия водорастворимого фуллерена C_{70} (рисунок, А) на транскрипцию сателлитных повторов, из клеточной коллекции были отобраны четыре линии фибробластов кожи человека (HSF1-4). Критерием отбора клеточной линии для исследования был общий уровень АФК в клеточных культурах, определенный по реакции образования DCF из реагента $H_2DCFH-DA$ (рисунок, Б). Уровни АФК в клетках HSF1-2 были в два раза выше, чем в клетках HSF3-4. Известно, что репликативное старение сопровождается увеличением уровня транскрипции SatIII и увеличением количества повтора SatIII в клеточной ДНК [4, 6]. Поэтому были выбраны клетки 15–20 пассажа, в которых уже появляются первые признаки старения культуры: снижена скорость пролиферации и повышен уровень АФК по сравнению с клетками ранних пассажей. МТТ-тест показал, что фуллерен в концентрации 10 мкМ не токсичен для всех исследуемых линий клеток.



Характеристики и клеточные эффекты водорастворимого фуллерена C_{70}

А. Структурная формула водорастворимого фуллерена C_{70}

Б. Уровни АФК в клетках. Приводится константа реакции образования DCF при взаимодействии с АФК в клеточной культуре.

В. Содержание РНК SatIII(1q12) (1) и РНК SatIII(9q12) (2) в РНК клеток. Данные нормированы к содержанию РНК гена TBP (внутренний стандарт).

Г. Содержание 18S рРНК (1) и 5'ETS рРНК (2) в РНК клеток.

Д. Содержание в SatIII(1q12) в ДНК клеток после 24 и 120 ч культивирования (1). Относительное увеличение содержания SatIII(1q12) в ДНК клеток при культивировании (2).

Е. Содержание РНК BAX1 (1) и РНК BCL2 (2) в клетках. (3) Отношение BAX1/BCL2, характеризующее апоптоз в популяции клеток

Влияние фуллерена на уровень АФК в клетках

Добавление 10 мкМ фуллерена в среду культивирования HSF1-2 через сутки приводило к снижению содержания АФК в клет-

ках. В клетках линий HSF3-4 фуллерен, напротив, повышал уровень АФК в тех же условиях культивирования (рисунок, Б). Таким образом, мы наблюдали модулирующее действие фуллерена C_{70} на уровень АФК в фибробластах. Увеличение уровня АФК

в клетках HSF3-4 может быть связано с избыточным блокированием АФК в клетках с исходно низким уровнем окислительного стресса. Ранее было показано, что фуллерен C_{60} , блокируя большинство АФК, стимулирует компенсаторное увеличение активности фермента NOX4, который катализирует реакцию синтеза пероксида водорода в клетках. В результате через сутки, вместо ожидаемого падения, наблюдается значительное повышение уровня АФК во всех структурах клетки и особенно в ядре. Таким образом, уровень АФК в клетках в присутствии фуллерена формируется благодаря двум разнонаправленным процессам: связывание АФК фуллереном и активация синтеза АФК в ответ на снижение АФК ниже физиологически необходимого уровня [6, 7].

Влияние фуллерена на содержание РНК SatIII

Высокий уровень АФК в клеточных культурах HSF1-2 коррелирует с более высоким содержанием транскриптов SatIII(1q12) и SatIII(9q12) в клетках по сравнению с клетками HSF3-4. Транскрипция этих участков осуществляется полимеразой II [2]. Большое содержание РНК SatIII подтверждает более высокий уровень стресса в линиях клеток HSF1-2 [4]. Изменения в количестве РНК SatIII(1q12) в клетках, которые культивировали в присутствии 10 мкМ фуллерена, коррелировали с изменениями уровня АФК. В линиях HSF1 и HSF2 количество РНК SatIII(1q12) в присутствии фуллерена значительно снижалось, а в линиях HSF3-4 – возрастало. Количество РНК SatIII(9q12) в присутствии фуллерена снижалось во всех линиях клеток (рисунок, В).

Таким образом, мы обнаружили различное влияние фуллерена на транскрипцию фрагментов сателлита III, локализованных на 1-й и 9-й хромосомах. Ранее мы обнаружили аналогичный эффект при исследовании действия ионизирующего излучения на транскрипцию сателлитных повторов SatIII(1q12) и SatIII(9q12) в культивируемых клетках. Максимумы транскрипции SatIII(1q12) наблюдались при более высоких уровнях окислительного стресса, чем максимумы транскрипции SatIII(9q12).

Влияние фуллерена на содержание рибосомных РНК

Для сравнения мы проанализировали изменения в присутствии 10 мкМ фуллерена в уровне рибосомной РНК (рРНК), которая синтезируется с участием полимеразы I. Количество рРНК в клетках HSF1-2 не отличалось от количества рРНК в клетках HSF3-4.

В присутствии фуллерена происходило снижение количества РНК транскрибируемого спейсера рибосомного повтора во всех линиях клеток, что говорит о блокировке фуллереном транскрипции рибосомного повтора. При этом отмечено увеличение количества 18S рРНК в клетках HSF1-2 и снижение в клетках HSF3-4. Таким образом, данный фуллерен влияет на биогенез рибосом, по-видимому, в зависимости от условий, изменяя скорость деградации рибосомы на фоне блокировки скорости синтеза рибосомной РНК.

Влияние фуллерена на уровень апоптоза

Линия HSF3 отличалась от трех других низким содержанием РНК проапоптотического гена *BAX1* и высоким содержанием РНК антиапоптотического гена *BCL2*, что говорит о низком уровне апоптоза клеток в данной популяции. В клетках HSF1-2 с высоким уровнем АФК фуллерен стимулировал увеличение экспрессии *BAX1* и снижение экспрессии *BCL2* (рисунок, Е). Отношение РНК *BAX1*/РНК *BCL2*, которое отражает уровень апоптоза в клетках [9], для линий HSF1-2 в присутствии фуллерена возрастало. Линии с низким уровнем АФК не изменяли это соотношение при культивировании с фуллереном.

Влияние фуллерена на количество SatIII(1q12) в клеточной ДНК

При длительном культивировании клеток всех линий мы обнаружили ожидаемое увеличение на 30–70% содержания SatIII(1q12) в ДНК, выделенной из клеток через сутки и 5 суток культивирования (рисунок, Д). Добавление фуллерена в среду культивирования клеток HSF1-2 приводило к снижению эффекта увеличения количества SatIII(1q12) в клетках. Однако для клеток HSF3-4 мы наблюдали обратный эффект – количество SatIII(1) в клеточной ДНК возрастало в присутствии фуллерена.

Снижение содержания SatIII(1q12) в ДНК клеток HSF1-2 при культивировании с фуллереном можно объяснить двумя факторами: блокирование транскрипции SatIII(1q12) в субпопуляции клеток (рисунок, В) и усиление процесса апоптоза (рисунок, Е), при котором в первую очередь погибают клетки с большим содержанием повтора SatIII(1q12). В случае линий клеток HSF3-4 увеличение количества транскрипта SatIII(1q12) происходит на фоне неизменных показателей апоптоза и относительно низкого уровня окислительного стресса, что приводит к увеличению в популяции количества клеток с большим блоком гетерохроматина 1q12.

Заключение

Водорастворимый фуллерен C_{70} влияет на процесс транскрипции сателлита III в клетках человека. В зависимости от исходного уровня окислительного стресса в клетках фуллерен может оказывать позитивное воздействие на популяцию стареющих клеток, индуцируя элиминацию клеток с высоким содержанием SatIII(1q12), которые не отвечают на пролиферирующие и иные стимулы и накапливаются в ходе репликативного старения [4]. При низком уровне АФК в популяции фуллерен, напротив, индуцирует накопление клеток с высоким содержанием SatIII(1q12). По-видимому, с целью снижения скорости репликативного старения для каждого типа клеток необходимо подбирать индивидуальные концентрации фуллерена, которые обеспечат баланс между связыванием АФК с фуллереном и индуцированным синтезом АФК клеткой. Фуллерен C_{70} (рисунок, А) может быть рекомендован к использованию в качестве агента, снижающего скорость пролиферативного и стресс-индуцированного старения клеточных популяций с высоким уровнем окислительного стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-15-00437, продолжение (исследования биологических эффектов водорастворимого производного фуллерена), и гранта РФФИ № 19-13-00411 (синтез водорастворимого производного фуллерена).

Список литературы

1. Feliciello I., Pezer Ž., Sermek A., Madarić B.B., Ljubić S., Ugarković Đ. Satellite DNA-Mediated Gene Expression Regulation: Physiological and Evolutionary Implication. *Prog Mol Subcell Biol.* 2021. Vol. 60. P. 145–167.
2. Erukashvily N.I., Ponomartsev N.V. Mammalian satellite DNA: A speaking dumb. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2013. Vol. 90. P. 31–65.
3. Bersani F., Lee E., Kharchenko P.V., Xu A.W., Liu M., Xega K., MacKenzie O.C., Brannigan B.W., Wittner B.S., Jung H., Ramaswamy S., Park P.J., Maheswaran S., Ting D.T., Haber D.A. Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA-derived DNA intermediates in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. P. 15148–15153. DOI: 10.1073/pnas.1518008112.
4. Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Konkova M.S., Veyko R.V., Umriukhin P.E., Martynov A.V., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Copy number variation of human satellite III (1q12) with aging. *Front. Genet.* 2019c. 10:704. DOI: 10.3389/fgene.2019.00704.
5. Ershova E.S., Sergeeva V., Chausheva A.I., Zheglo D.G., Nikitina V., Smirnova T.D., Kameneva L.V., Porokhovnik L.N., Kutsev S.I., Troshin P.A., Voronov I.I., Khakina E.A., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis.* 2016. Vol. 805. P. 46–57.
6. Erukashvily N.I., Donev R., Waisertreiger I.S., Podgornaya O.I. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells. *Cytogenet. Genome. Res.* 2007. Vol. 118. P. 42–54. DOI: 10.1159/000106440.
7. Kraevaya O.A., Peregudov A.S., Godovikov I.A., Schurik E.V., Martynenko V.M., Shestakov A.F., Balzarini J., Schols D., Troshin P.A. Direct arylation of $C_{60}Cl_6$ and $C_{70}Cl_8$ with carboxylic acids: a synthetic avenue to water-soluble fullerene derivatives with promising antiviral activity. *Chem. Commun.* 2020. Vol. 56. P. 1179–1182.
8. Kovel E.S., Kicheeva A.G., Vnukova N.G., Churilov G.N., Stepin E.A., Kudryasheva N.S. Toxicity and Antioxidant Activity of Fullereneol $C_{60}Cl_6$ with Low Number of Oxygen Substituents. *Int J Mol Sci.* 2021. 15; 22(12): 6382.
9. Valgardsdottir R., Chiodi I., Giordano M., Rossi A., Bazzini S., Ghigna C., Riva S., Biamonti G. Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36. P. 423–434. DOI: 10.1093/nar/gkm1056.