

Влияние новых водорастворимых производных фуллерена C60, имеющих одинаковые заместители и одну замену CL→ME на экспрессию генов и активность транскрипционных факторов NRF2 и NFκB

Савинова Е.А.¹, Ершова Е.С.¹, Родионов И.В.¹, Вейко Н.Н.¹, Краевая О.А.^{2,3}, Трошин П.А.^{2,3}, Костюк С.В.¹

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

2 — Сколковский институт науки и технологий
121205, г. Москва, Большой бульвар д.30, стр.1

3 — Институт проблем химической физики РАН
141432, г. Черноголовка, проспект акад. Семенова, 1

С применением новых наносоединений, в частности, производных фуллерена C60, возрастает вероятность контакта с ними человека. Показано, что водорастворимые производные фуллерена могут влиять на транскрипционную активность генов в эмбриональных фибробластах легких человека (ФЛЭЧ). Активация транскрипционного фактора NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) индуцирует процессы, направленные на выживание клеток, а также развитие про-воспалительного ответа. Экспрессия генов, обеспечивающих защиту от стресса на клеточном уровне, запускается фактором транскрипции, NRF2 (nuclear factor [erythroid-derived 2]-like factor 2). Взаимодействие между NFκB и NRF2 в основном носит характер антагонизма. Поиск новых соединений, избирательно активирующих транскрипционный фактор NFκB и NRF2, остаётся актуальной задачей современной медицины.

Ключевые слова: наносоединения, фуллерены, транскрипционные факторы.

Для цитирования: Савинова Е.А., Ершова Е.С., Родионов И.В., Вейко Н.Н., Краевая О.А., Трошин П.А., Костюк С.В. Влияние новых водорастворимых производных фуллерена C60, имеющих одинаковые заместители и одну замену CL→ME на экспрессию генов и активность транскрипционных факторов NRF2 и NFκB. *Медицинская генетика* 2020; 19(11): 58-60.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.11.58-60

Автор для корреспонденции: Савинова Екатерина Алексеевна; **e-mail:** savinova.ekaterina96@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России ФГБНУ «МГНЦ», работа по исследованию антиокислительных свойств фуллеренов поддержана грантом РНФ № 18-15-00437.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020.

The effect of new water-soluble derivatives of C60 fullerene having identical substituents and one substitution CL→ME on gene expression and the activity of transcription factors NRF2 and NFκB

Savinova E.A.¹, Ershova E.S.¹, Rodionov I.V.¹, Veiko N.N.¹, Kraevaya O.A.^{2,3}, Troshin P.A.^{2,3}, Kostyuk S.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechye str. 1, Moscow, 115522, Russia

2 — Skolkovo Institute of Science and Technology
Bolshoy Boulevard 30, bld. 1, Moscow, 121205, Russia

3 — Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IPCP RAS),
Academician Semenov avenue 1, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

With the use of new nanocompounds, in particular, derivatives of fullerene C60, the likelihood of human contact with them increases. It has been shown that water-soluble derivatives of fullerene can affect the transcriptional activity of genes in human embryonic fibroblasts of the lungs (PLEC). Activation of the transcription factor NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) induces processes aimed at cell survival, as well as the development of a pro-inflammatory response. The expression of genes that provide protection against stress at the cellular level is triggered by a transcription factor, NRF2 (nuclear factor [erythroid-derived 2]-like factor 2). The interaction between NFκB and NRF2 is mainly antagonistic. The search for new compounds that selectively activate the transcription factor NFκB and NRF2 remains an urgent task of modern medicine.

Keywords: nanoconnections, fullerenes, transcription factors.

For citation: Savinova E.A., Ershova E.S., Rodionov I.V., Veiko N.N., Kraevaya O.A., Troshin P.A., Kostyuk S.V. The effect of new water-soluble derivatives of C₆₀ fullerene having identical substituents and one substitution Cl→Me on gene expression and the activity of transcription factors NRF2 and NFκB. *Medical genetics*. 2020; 19(11): 58-60. (In Rus).

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.11.58-60

Corresponding author: Savinova Ekaterina Alekseevna; **e-mail:** savinova.ekaterina96@yandex.ru

Funding. The work was carried out as part of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia Federal State Budgetary Institution «RCMG», the work on the study of the antioxidant properties of fullerenes was supported by the Russian Science Foundation grant No. 18-15-00437.

Conflicts of Interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020.

С применением новых наносоединений, в частности, производных фуллера C₆₀, возрастает вероятность контакта с ними человека. Показано, что водорастворимые производные фуллера могут влиять на транскрипционную активность генов в эмбриональных фибробластах легких человека (ФЛЭЧ) [1,2]. Активация транскрипционного фактора NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), индуцирует процессы, направленные на выживание клеток, а также развитие провоспалительного ответа [2]. Экспрессия генов, обеспечивающих защиту от стресса на клеточном уровне, запускается фактором транскрипции, NRF2 (nuclear factor [erythroid-derived 2]-like factor 2) [1]. Взаимодействие между NFκB и NRF2, в основном, носит характер антагонизма. Поиск новых соединений, избирательно активирующих транскрипционный фактор NFκB и NRF2, остаётся актуальной задачей современной медицины.

Целью данной работы было исследование влияния водорастворимых производных фуллера C₆₀, с одинаковыми заместителями и одной заменой Cl→Me на экспрессию генов и активность транскрипционных факторов NRF2 и NFκB.

Материалы и методы

Водорастворимые производные фуллера C₆₀Ar5Cl и C₆₀Ar5Me были получены и охарактеризованы ранее [3]. Суммарную РНК выделяли набором RNeasy (Qiagen, Германия). Реакцию обратной транскрипции проводили набором (Силекс, Россия). Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems); техническая ошибка составляла примерно 2%. Использовали праймеры (Синтол, Россия): NRF2 (TCCAGTCAGAAACCAGTGGAT; GAATGTCTGCGCCAAAAGCTG); NFκB1 (CAGATGGCCSATACTTCAAT; CGGAAACGAAATCCTCTCTGTT); TBP (референсный ген) (GCCCGAAACGCCGAATAT, CCGTGGTTCT

GTGGCTCTCT). Уровень экспрессии белков NFκB, NRF2, pNRF2 определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе CyFlow Space (Partec, Германия) с использованием специфических антител, меченых FITC (US Biological, США). Локализация транскрипционных факторов оценивалась с использованием микроскопа AxioScope A1 (Carl Zeiss); процентное соотношение локализованных в ядре и цитоплазме транскрипционных факторов подтвердили с использованием системы для проведения клеточного имиджинга и последующей обработки данных CyTell (GE Healthcare).

Результаты

При действии соединения C₆₀Ar5Cl в концентрации 0,3–30 мкг/мл уровень экспрессии гена *NRF2* повышен почти в 2 раза в течение 3 часов, через 24 часа после добавления C₆₀Ar5Cl в концентрации 0,3–30 мкг/мл уровень экспрессии гена *NRF2* возвращается к контрольным значениям. Уровень экспрессии белка NRF2 возрастает на 40–60%. Методом флуоресцентной микроскопии показано, что NRF2 в присутствии соединения C₆₀Ar5Cl локализуется, преимущественно, в ядре клеток, что свидетельствует об активности NRF2.

Исследовали уровень фосфорилированной формы NRF2 (pNRF2) в клетках. Через 1–24 часа культивирования клеток с фуллереном C₆₀Ar5Cl уровень pNRF2 повышается относительно контрольных интактных клеток, что подтверждает возрастание активности фактора NRF2 в клетках при действии C₆₀Ar5Cl. С использованием системы для проведения клеточного имиджинга CyTell показали, что через 1–24 часа после добавления соединения C₆₀Ar5Cl процент ядер, содержащих NRF2 возрастает в 4–5 раз относительно контрольных клеток. При действии соединения C₆₀Ar5Me в концентрации 0,3–30 мкг/мл мы не обнаружили в течение 24 часов повышения уровня экспрессии NRF2 ни на уровне гена, ни на уровне белка.

При действии соединения C₆₀Ar5Cl в концентрации 3–30 мкг/мл мы не обнаружили изменений в уров-

не экспрессии гена *NFKB1* и белка NFκB в клетках в течение 24 часов, не происходит перемещения NFκB в ядро ФЛЭЧ, что свидетельствует об отсутствии активности NFκB в присутствии соединения C60Ar5Cl. Соединение C60Ar5Me в концентрации 0,3–30 мкг/мл вызывает повышение уровня экспрессии белка NFκB через 3 часа после добавления к клеткам, но через 24 часа уровень экспрессии транскрипционного фактора NFκB снижается до контрольных значений. Показали, что через 3–24 часа после добавления соединения C60Ar5Me в концентрации 3–30 мкг/мл в среду культивирования ФЛЭЧ NFκB локализуется преимущественно в ядре клеток, процент ядер, содержащих NFκB, возрастает в 6–8 раз относительно контроля, что свидетельствует об активности NFκB в ФЛЭЧ в присутствии C60Ar5Me.

Таким образом, исследованные соединения C60Ar5Cl и C60Ar5Me оказывают противоположное воздействие на экспрессию и активность транскрипционных факторов NRF2 и NFκB в ФЛЭЧ, что приводит к активации разных сигнальных каскадов в клетках. Водорастворимое производное фуллерена C60Ar5Cl может рассматриваться в качестве потенциального антиоксиданта, поскольку C60Ar5Cl активирует антиокислительные процессы в ФЛЭЧ, усиливая повышение экспрессии транскрипционного фактора NRF2 и его

перемещение в ядро клеток. Водорастворимое производное фуллерена C60Ar5Me не усиливает экспрессию транскрипционного фактора NRF2 ни на уровне белка, ни на уровне гена в течение 3–24 часов, однако, активирует провоспалительный фактор NFκB и его перемещение в ядро клеток, что свидетельствует о активности NFκB. Активация провоспалительного ответа фуллереном C60Ar5Me может обуславливать противовирусную активность исследуемого соединения [3].

Литература/ References

1. Sergeeva V., Kraevaya O., Ershova E., Kameneva L., Malinovskaya E., Dolgikh O., Konkova M., Voronov I., Zhilenkov A., Veiko N., Troshin P., Kutsev S., Kostyuk S. *Antioxidant Properties of Fullerene Derivatives Depend on Their Chemical Structure: A Study of Two Fullerene Derivatives on HELFs*. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:4398695.
2. Ershova E.S., Sergeeva V.A., Tabakov V.J., Kameneva L.A., Porokhovnik L.N., Voronov I.I., Khakina E.A., Troshin P.A., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. *Functionalized Fullerene Increases NF-κB Activity and Blocks Genotoxic Effect of Oxidative Stress in Serum Starving Human Embryo Lung Diploid Fibroblasts*. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:9895245.
3. Kraevaya O.A., Peregudov A.S., Troyanov S.I., Godovikov I., Fedorova N.E., Klimova R.R., Sergeeva V.A., Kameneva L.V., Ershova E.S., Martynenko V.M., Claes S., Kushch A.A., Kostyuk S.V., Schols D., Shestakov A.F., Troshin P.A. *Diversion of the Arbuzov reaction: alkylation of C-Cl instead of phosphonic ester formation on the fullerene cage*. Org Biomol Chem. 2019; 17(30):7155–7160.