

ВЛИЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ НА СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HELA

О.А. Власова¹, И.А. Антонова¹, А.А. Борунова¹, Т.Н. Заботина¹, К.И. Кирсанов^{1,2},
М.Г. Якубовская¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, *Olya_vlasov@mail.ru*

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Актуальность. В ряде исследований было показано, что средиземноморская диета может замедлить развитие различных форм злокачественных новообразований. Предполагается, что этот эффект, по крайней мере частично, обусловлен высокими концентрациями вторичных растительных метаболитов из группы полифенолов. Эти соединения характеризуются наличием одного или нескольких ароматических колец с разными гидроксильными группами, которые определяют их химические свойства и биологические эффекты. При воздействии полифенолами были обнаружены опосредованные изменения в специфических сигнальных путях, которые предотвращают рост опухоли или канцерогенез. Данные соединения обладают антиоксидантной активностью, что объясняет их способность предотвращать и противодействовать повреждениям ДНК. Во многих исследованиях в экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрировано антипролиферативное, проап-

оптоическое, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие данных соединений. Плейотропность эффектов полифенолов крайне затрудняет интерпретацию интегрального результата их действия. Малые молекулы растительного происхождения способны связываться с большим количеством белковых молекулярных мишеней, включая клеточные рецепторы, ферменты гидрофобного метаболизма ксенобиотиков, компоненты ряда сигнальных путей, факторы транскрипции, ферменты метаболизма ДНК и системы эпигенетической регуляции. Однако одним из общих свойств многих полифенолов является их сродство к ДНК. Все ДНК-опосредованные эффекты данных соединений могут влиять на трехмерную организацию процессов упаковки хроматина и ДНК и за счет этого влияния изменять доступ к местам посадки на ДНК для белков-шаперонов, эпигенетических ферментов и других регуляторных белков. Влияние полифенолов на структуру хроматина никогда не анализировалось.

Цель. Основной целью нашего исследования был анализ влияния полифенолов на стабильность хроматина, локализацию нуклеосомных гистонов и гистонов-шаперонов FACT в ядрах клеток, локализацию линкерных гистонов в ядрах и их относительное содержание в хроматин-связанной фракции и общем пуле белков.

Материалы и методы. Для изучения вытеснения природными ДНК-связывающими соединениями линкерного гистона H1 из хроматина мы использовали вестерн-блоттинг и ПЦР в реальном времени на клеточной линии HeLa и флуоресцентную визуализацию живых клеток на клеточной линии HeLa-H1.5-mCherry. В нашем эксперименте клетки HeLa обрабатывали ДНК-связывающими соединениями, а затем исследовали истощение белковых вариантов линкерных гистонов H1.2 и H1.4 из связанной с хроматином фракции. Для контроля мы оценивали белки линкерных гистонов H1.2 и h1.4 в клеточных лизатах, не разделенных на фракции, а также мРНК линкерных гистонов методом ПЦР в реальном времени при обработке интересующими соединениями. В качестве положительного контроля был взят кураксин CBL137, который, как известно, вызывает значительные изменения локализации линкерного гистона.

Результаты и обсуждение. Мы показали, что полифенолы не оказывают дестабилизирующего действия на структуру нуклеосом. Ни один из изученных нами соединений не повлиял на характер расщепления ДНК при обработке хроматина микрококковой нуклеазой. Полифенолы не влияли на локализацию корового гистона H2B нуклеосомы, меченного флуоресцентной меткой, а относительное содержание гистонового шаперона FACT во фракции хроматина, измеренное с помощью вестерн-блоттинга, не менялось после обработки клеток HeLa исследуемыми соединениями. При анализе продуктов расщепления ДНК обработки хроматина микрококковой нуклеазой в положительном контроле, где ядра клеток HeLa обрабатывались CBL0137 в течение одного часа, мы наблюдали полное исчезновение любых фрагментов ДНК, что соответствует ранее опубликованным данным [1]. Более того, обработка клеток HeLa CBL0137 вызывала значительную редислокацию H2B в ядрах и значительное увеличение относительного содержания FACT во фракции хроматина, что соответствует ранее опубликованным данным о влиянии CBL0137 на хроматин [2].

Используя клетки HeLa с H1.5, меченным mCherry, мы продемонстрировали значительную редислокацию H1.5 в ядрышки для 11 полифенолов из 15 проанализированных, в частности, для берберина, дельфинидина, физетина, генистеина, сангвинарина, ресвератрола, куркумина, нарингенина, кверцетина, тимохинона и EGCG сразу после 1-часовой обработки. Затем мы проанализировали относительное содержание H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции методом вестерн-блоттинга. Эти варианты линкерных гистонов были выбраны для нашего дальнейшего анализа, поскольку они являются преобладающими вариантами в большинстве соматических клеток, и ранее Izquierdo-Bouldstridge et al. показали, что нокдаун этих вариантов гистонов вызывает значительные последствия для транскриптома, включая активацию экспрессии эндогенного ретровируса, сопровождаемую запуском передачи сигналов интерферона [3]. Статистически значимое истощение гистона H1.2 в хроматин-связанной фракции клеток HeLa наблюдалось при обработке шестью полифенолами в максимально нетоксичных концентрациях: берберин, дельфинидин, физетин, генистеин, кверцетин, ресвератрол и еще три полифенолами, в частности куркумин, нарингенин и сангвинарин, которые вызывали истощение H1.2 в хроматин-связанной фракции при концентрации IC20. Статистически значимое истощение гистона H1.4 в хроматин-связанной фракции клеток HeLa наблюдалось при обработке 8 полифенолами в максимально нетоксичных концентрациях: берберин, дельфинидин, физетин, генистеин, кемпферол, кверцетин, ресвератрол и сангвинарин. Еще три полифенола, в частности куркумин, EGCG и нарингенин, вызывали истощение H1.4 в хроматин связанной фракции белков в концентрациях IC20. Наиболее сильное истощение обоих вариантов линкерных гистонов из фракции хроматина наблю-

далось при обработке клеток HeLa физетином, ресвератролом, куркумином, дельфинидином и кверцетином. Относительный уровень белка вариантов линкерных гистонов H1.2 и H1.4 во фракции хроматина снизился на 70% и более. Примечательно, что в клетках HeLa, обработанных полифенолами в наших экспериментах, относительное содержание H1.4 и H1.2 в пуле клеточных белков не изменялось при обработке исследуемыми соединениями в концентрациях IC20, за исключением ресвератрола, который вызывал снижение H1.2 в общем пуле белков и нарингенина, который также вызывал снижение H1.4 в общем пуле белков клетки. Таким образом, при обработке нарингенином и ресвератролом происходит не только прямое истощение линкерных гистонов хроматина, но и влияют другие эффекты на созревание/деградацию линкерных белков в клетках. В целом, мы идентифицировали 8 соединений (кемпферол, EGCG, дельфинидин, куркумин, генистеин и берберин, сангвинарин, физетин), вызывающих статистически значимое вытеснение линкерных гистонов H1.2 и H1.4 из хроматина на фоне незначительного изменения или отсутствия изменения общего количества этих белков в клетках. Можно предположить, что вытеснение линкерных гистонов из хроматина полифенолами связано либо со значительной конкуренцией между данными соединениями и линкерными гистонами за сайты связывания ДНК, либо влияет на скорость обмена линкерных гистонов с ДНК. Этого можно достичь за счет увеличения посттранскрипционных модификаций линкерных гистонов, таких как фосфорилирование, ацетилирование, формилирование, пропионилирование и кротонилирование, что приводит к уменьшению положительного заряда линкерных гистонов, что влияет на упаковку ДНК и изменяет состояния хроматина на менее компактное. Четыре исследуемых соединения, в частности апигенин, кумарин, гинсенозид Rb1 и тимохинон, не вызвали статистически значимых количественных изменений ни в общем пуле белков, ни в хроматин-связанной белковой фракции, что может свидетельствовать об их низкой способности влиять на взаимодействие ДНК с линкерными гистонами. Мы не обнаружили статистически значимого влияния полифенолов на экспрессию генов линкерных гистонов всех соматических вариантов, а это означает, что снижение относительного содержания H1.2 и H1.4, вызванное соответственно IC20 ресвератролом и нарингенином, не связано с регуляцией экспрессии генов линкерных гистонов.

Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что некоторые полифенолы могут реализовывать свой эффект через истощение линкерных гистонов в хроматине и что куркумин, ресвератрол, EGCG, берберин, нарингенин и кверцетин одновременно вызывают истощение трех вариантов линкерных гистонов H1.2, H1.4. и H1.5, демонстрирующий некоторое перекрытие эффектов. Примечательно, что влияние исследуемых соединений на локализацию H1.5 в ядрах клеток наблюдалось при 1-часовой обработке, что указывает на наиболее вероятный механизм конкурентного ингибирования.

Выводы. Анализ влияния вторичных метаболитов растений на структуру хроматина никогда не исследовался, несмотря на возможность изменения пространственных характеристик мест связывания гистонов, эпигенетических ферментов, транскрипционных факторов и других ДНК-опосредованных белков. Нами было показано, что 8 соединений (кемпферол, EGCG, дельфинидин, куркумин, генистеин и берберин, сангвинарин, физетин) вызывают статистически значимое вытеснение линкерных гистонов H1.2 и H1.4 из хроматина, что важно для глубокого понимания молекулярного механизма противоопухолевой и антиканцерогенной активности данных соединений и может помочь в дальнейшей разработке препаратов для профилактики появления злокачественных новообразований.

Работа была поддержана грантом РФФ 23-25-00276.

Список использованных источников

1. Safina A., Cheney P., Pal M., Brodsky L., Ivanov A., Kirsanov K., Lesovaya E., Naberezhnov D., Neshor E., Koman I., et al. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:1925–1945. Doi: 10.1093/nar/gkw1366.
2. Volokh O.I., Sivkina A.L., Moiseenko A.V., Popinako A.V., Karlova M.G., Valieva M.E., Kotova E.Y., Kirpichnikov M.P., Formosa T., Studitsky V.M., et al. Mechanism of curaxin-dependent nucleosome unfolding by FACT. *Front. Mol. Biosci.* 2022;9:1048117. doi: 10.3389/fmolb.2022.1048117.
3. Izquierdo-Bouldstridge A, Bustillos A, Bonet-Costa C, Aribau-Miralbes P, Garcia-Gomis D, Dabad M, et al. Histone H1 depletion triggers an interferon response in cancer cells via activation of heterochromatic repeats. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:11622–42. doi: 10.1093/nar/gkx746.