



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«МИРЭА – Российский технологический университет»
РТУ МИРЭА

Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова
Кафедра биотехнологии и промышленной фармации

РАБОТА ДОПУЩЕНА К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой БТиПФ

Кедик Станислав Анатольевич

«15» июня 2020 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

по направлению подготовки магистров 19.04.01 Биотехнология

Молекулярная и клеточная биотехнология

На тему: Деплеция линкерных гистонов H1 из хроматина
под влиянием растительных ДНК-тропных полифенолов

Обучающийся

Чернова Ирина Алексеевна

Шифр

18X0840

Группа

ХБМО-01-18

Руководитель работы
от ИТХТ им. М.В.
Ломоносова

к.х.н., доц.

Чудинов М.В.

Руководитель работы
от ФГБУ «НМИЦ
онкологии им. Н.Н.
Блохина» Минздрава
России

Д.м.н., заведующая отделом
химического канцерогенеза

Якубовская М.Г.

Москва 2020 г.

Электронная версия передана в институт

М.В. Чудинов



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«МИРЭА – Российский технологический университет»

РТУ МИРЭА

Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова
Кафедра биотехнологии и промышленной фармации

СОГЛАСОВАНО

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой _____

Директор института _____

Кедик Станислав Анатольевич

Маслов Михаил Александрович

«10» февраля 2020 г.

«11» февраля 2020 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы магистра
(магистерской диссертации)

Обучающийся Чернова Ирина Алексеевна

Шифр 18X0840

Направление 19.04.01 Биотехнология
подготовки

Группа ХБМО-01-18

1. Тема выпускной квалификационной работы

«Деплеция линкерных гистонов H1 из хроматина под влиянием растительных ДНК-тропных полифенолов»

2. Цель и задачи выпускной квалификационной работы

Цель работы: изучить влияние природных ДНК-тропных малых молекул на локализацию линкерного гистона H1 в клеточной линии HeLa.

Задачи работы:

1. Определить диапазон нетоксичных концентраций EGCG, Kaempferol, Apigenin и Thymoquinone на клеточной линии HeLa методом МТТ-теста;

2. Оценить влияние исследуемых соединений на локализацию двух вариантов линкерного гистона H1: H1.2 и H1.4 путем оценки количества белка в хроматин-связанной и нуклеоплазматической фракциях методом вестерн-блоттинга;

2.1. Рассмотреть дозозависимый эффект исследуемых соединений в двух нетоксичных концентрациях;

2.2. Рассмотреть времязависимый эффект данных соединений с использованными продолжительностями экспозиции: 1, 6 и 24 часов;

3. Оценить влияние исследуемых соединений на линкерный гистон H1 (вариант H1.5) в различных фазах клеточного цикла методом флуоресцентной микроскопии клеток;

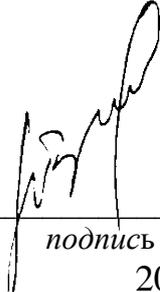
3. Этапы выпускной квалификационной работы:

№ этапа	Содержание этапа выпускной квалификационной работы	Результат выполнения этапа ВКР	Срок выполнения
1	Сбор и изучение литературы по теме	Список литературы	10.02.2020 - 20.02.2020
2	Написание литературного обзора	Литературный обзор	21.02.2020 - 30.03.2020
3	Выполнение основной части исследования	Материалы основной части	01.04.2020 - 24.05.2020
4	Написание диплома и подготовка к защите	Текст диплома и демонстрационные материалы	25.05.2020 - 05.06.2020

4. Перечень разрабатываемых документов и графических материалов

Презентация в формате Microsoft Office PowerPoint 2010

5. Руководитель выпускной квалификационной работы

Функциональные обязанности	Должность в Университете	Фамилия Имя Отчество	Подпись
Руководитель ВКР	к.х.н., доцент	Чудинов Михаил Васильевич	
Задание выдал Руководитель ВКР:		Задание принял к исполнению	
«10» _____ февраля _____ 2020 г.	подпись	Обучающийся:	подпись
«10» _____ февраля _____ 2020 г.		«10» _____ февраля _____ 2020 г.	

Аннотация

Магистерская диссертация имеет объем 60 страниц, содержит 15 рисунков и 5 таблиц. В работе приведены ссылки на 58 источников литературы.

Ключевые слова: ДНК-тропные растительные метаболиты, цитотоксичность, интеркаляция ДНК, дестабилизация хроматина, варианты линкерных гистонов.

В данной работе была определена цитотоксичность растительных ДНК-тропных полифенольных соединений и показана их способность индуцировать деплецию вариантов линкерного гистона H1 из хроматин-связанной фракции клеток линии HeLa. Интенсивность эффекта каждого из анализируемых полифенолов зависела от концентрации соединения в среде культивирования клеток и продолжительности их обработки. Было показано, что наибольшую эффективность проявил кемпферол, так как, во-первых, он вызывает значительное вытеснение линкерного гистона и, во-вторых, проявляет своё действие быстрее остальных соединений. Также было продемонстрировано, что экспозиция клеток к растительным полифенолам при используемых концентрациях и продолжительности обработки клеток не вызывает остановку клеточного цикла ни в одной из фаз.

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	5
1. Обзор литературы	9
1.1. Растительные полифенолы	9
1.2. Организация хроматина.....	19
2. Результаты работы и их обсуждение	30
3. Экспериментальная часть	47
4. Заключение	52
5. Список литературы	54
6. Апробация результатов исследования	60

Список сокращений

ADS (alternative DNA structure) – альтернативная структура ДНК

AMPK – аденозинмонофосфатактивированная протеинкиназа

CK2 – казеинкиназа 2

EGCG – эпигаллакатехина галлат

ERK (extracellular signal-regulated kinase) – внеклеточная регулируемая сигналами киназа

EtBr – бромистый этидий

FACT (FAcilitates Chromatin Transcription) – шаперон, облегчающий транскрипцию хроматина

FSC (forward scatter) detector – детектор прямого светорассеяния

HeLa – клеточная линия, названная по имени пациентки Henrietta Lacks

HFD (histone fold domain) – гистоновая складка

HMG (high-mobility group) – домен группы высокой подвижности

JNK – c-Jun N-терминальная киназа

LEF (limphoid enhancing factor) – усиливающий лимфоидный фактор

MAPK (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа

mTOR (mammalian target of rapamycin) – мишень рапамицина млекопитающих

NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – транскрипционный ядерный фактор

PBS – натрий-фосфатный буфер

PBST – натрий фосфатный буфер с добавлением Tween-20

SDS – додецилсульфат натрия

Shh – сигнальный путь Sonic Hedgehog

SSC (side scatter) detector – детектор бокового светорассеяния

TCF – T-cell factor

Введение

В регионах с различными условиями и образом жизни наблюдается различный спектр злокачественных опухолей, что даёт основания считать образ жизни одним из существенных факторов, влияющих на появление и развитие онкологических заболеваний. Это подтверждается и данными об изменении профиля онкологической заболеваемости у мигрантов [1]. В частности, общий характер питания коррелирует с различными группами онкологических заболеваний, однако в эпидемиологических исследованиях оценка влияния отдельных компонентов питания весьма затруднительна [2]. В связи с этим представляется конструктивным экспериментальное изучение механизмов действия ксенобиотиков – соединений, поступающих в клетки организма из окружающей среды, которые обладают антиканцерогенными свойствами. Такими соединениями, в частности, являются фитонутриенты – вторичные метаболиты растений.

Фитонутриенты играют большую роль в жизнедеятельности растений, и их основной функцией является защита растений от агрессивного воздействия внешнего мира, такого как ультрафиолетовое излучение, фотосинтетический стресс, температурные колебания окружающей среды и т.д. Биологическая активность и польза этих веществ была обнаружена людьми ещё с древних времён, и, как следствие, начала развиваться народная медицина, основанная на лечении травами и использовании различных диет. Фитотерапия была известна уже древним шумерам около 5000 лет назад: были найдены их таблички со списками сотен лекарственных растений, таких как мирра и опиум. А в Древней Греции, например, люди заметили лечебные свойства листьев ивы, в которых содержится ацетилсалициловая кислота, и делали из них настойки в качестве жаропонижающего лекарства. В Средние Века травничество было очень распространено у монахов, которые в свободное время занимались систематизацией накопленных человечеством знаний и выращиванием лекарственных трав в монастырях. Таким образом, монастыри были центром

медицинских знаний, а их сады – источником лекарств от простых заболеваний [3]. И лишь в конце 19-го – начале 20-го века учёные впервые смогли выделить активные вещества из экстрактов растений (салициловую кислоту, морфин и т.д.), установить их химический состав и доказать их лечебные свойства. Например, салициловая кислота была открыта и извлечена из сухих листьев таволги в 1897 году Артуром Айхенгрином и Феликсом Хоффманом и была модифицирована в ацетилсалициловую кислоту, которая всем больше известна как аспирин. Проведя клинические испытания, в том числе и на себе, Айхенгрин доказал анальгетическое и жаропонижающее свойство аспирина [4]. С этих пор метаболитам растений стало уделяться больше внимания.

По данным исследований, фитонутриенты могут непосредственно взаимодействовать с различными биомолекулами клетки, в том числе с ДНК и белками, важным элементом взаимодействия которых является регуляция функционирования генома. Это взаимодействие позволяет влиять на структуру хроматина, непосредственно путем изменения физико-химических характеристик ДНК, а также опосредованно через эпигенетическую регуляцию и влияние на белки-шапероны, что в конечном итоге изменяет экспрессию различных генов, а значит и в целом процессы жизнедеятельности клеток. В то же время для большой группы фитонутриентов – растительных полифенолов, были выявлены антиканцерогенные свойства в экспериментах на животных с химически индуцированными опухолями легкого, кишечника, молочной железы и других. Для большинства из них были отмечены значительные уменьшения скорости роста и размера опухолей, также отмечено активное ингибирование прогрессии опухолей и снижение частоты их образования. До настоящего времени ДНК-опосредованные механизмы действия растительных полифенолов на эукариотические клетки остаются невыясненными, в связи с чем исследование воздействия ряда данных соединений на структуру хроматина актуально для экспериментальной онкологии как в плане понимания закономерностей регуляции структуры хроматина, так и для совершенствования подходов к профилактике рака [5].

В данной работе в качестве объекта исследования выбраны такие растительные полифенолы как эпигаллакатехина галлат, кемпферол, апигенин и тимохинон, для которых накоплены убедительные данные об антиканцерогенном действии.

Одним из возможных ДНК-опосредованных механизмов действия полифенолов может быть их влияние на процессы компактизации ДНК, которые во многом определяются функционированием линкерных гистонов. Эти белки обеспечивают стабилизацию нуклеосом и участвуют в регуляции транскрипции, обеспечивая определенные изменения в профиле экспрессии генов. В частности, нок-даун вариантов линкерных гистонов H1.2 и H1.4, сопровождаемый снижением их содержания в хроматиновой фракции приводит к повышению экспрессии некодирующих РНК, что вызывает активацию интерферонового сигналинга 1 типа, препятствующего процессам канцерогенеза. Процесс компактизации ДНК важен для реализации клеточного деления, т.к. его нарушение может приводить к остановке клеточного цикла в S-фазе.

В связи с вышесказанным, целью представленной работы является исследование влияния ряда ДНК-тропных растительных полифенолов на локализацию линкерного гистона H1 в клетках линии HeLa и на распределение популяции этих клеток по фазам клеточного цикла.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Определить максимально нетоксичную концентрацию каждого из исследуемых соединений в отношении клеток линии HeLa методом МТТ-теста;
2. Изучить влияние соединений на локализацию двух вариантов линкерного гистона H1: H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной и нуклеоплазматической фракциях клеток HeLa методом Вестерн-блоттинга:
 - оценить дозозависимость эффекта при использовании максимально нетоксичной концентрации и ингибирующей метаболическую активность клеток на 20% для всех анализируемых соединений;

- определить зависимость эффекта от продолжительности экспозиции клеток к полифенолам.

3. Оценить влияние анализируемых соединений на прохождение клетками HeLa клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии.

1. Обзор литературы

1.1. Растительные полифенолы

Фитонутриенты не являются необходимыми питательными веществами, однако они обладают такими важными свойствами, как антиоксидантная активность, антимикробное действие, модуляция ферментов детоксикации, стимуляция иммунной системы, снижение агрегации тромбоцитов и модуляция метаболизма гормонов, а также способностью тормозить процесс канцерогенеза и вызывать гибель опухолевых клеток или снижать скорость их пролиферативной активности [6]; [7]. Установление их химического состава позволяет предполагать возможность взаимодействия с различными внутриклеточными мишенями, а так же потенциальные механизмы действия веществ на клеточном и молекулярном уровнях организма.

1.1.1. Классификация

Фитонутриенты, проявляющие значимую биологическую активность и представляющие интерес, разделяют на 3 основные группы по структурному признаку [8]:

- изопреноиды (терпены) – соединения, являющиеся производными изопрена $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ и представляющие подкласс непредельных углеводов общей формулы $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$;
- фенольные соединения – в эту группу входят соединения с одним или несколькими фенольными кольцами, хиноны и полимерные фенольные соединения; существует около 8000 различных классов растительных полифенолов;
- азотсодержащие соединения – эту группу составляют алкалоиды – соединения, в основном включающие атом азота в гетероцикл, реже азот располагается в боковой цепи, и полиамины.

Более подробная классификация приведена в таблице 1.

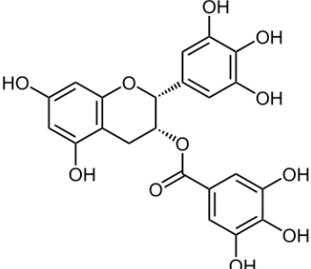
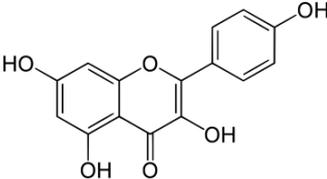
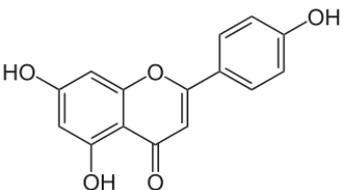
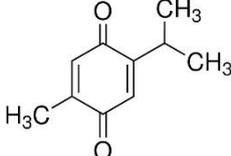
Таблица 1. Химическая классификация фитонутриентов [5]

Группы/подгруппы вторичных метаболитов растений		Общий структурный признак			
Фитонутриенты	Терпены	Гемитерпены	$(C_5 \text{ ед})$		
		Монотерпеноиды	$(C_5H_8)_2$		
		Сесквитерпены	$C_{15}H_{24} - C_{15}H_{32}$		
		Дитерпены	$(C_{10}H_{16})_2$		
		Тритерпены	$(C_{10}H_{16})_3$		
		Политерпены	$(C_5H_8)_n$		
	Азот-содержащие	Алкалоиды	С азотистыми гетероциклами		
			Протоалкалоиды (азот в боковой цепи)		
			Пептидные (циклопептидные) алкалоиды		
		Полиамины	В молекуле содержится 2 или более группы – NH_2		
	Фенольные	С 1 бензольным кольцом	C_6	Фенолгликозиды	
			C_6-C_1	Фенолальдегиды, фенолкарбоновые кислоты	
			C_6-C_2	Фенолспирты Фенилуксусные кислоты	
			C_6-C_3	Фенилпропаноиды	
			$(C_6-C_3)_2$	Лигнаны	
			$C_6-C_1-C_6$	Бензофеноны, добензо- γ -пироны	
		С 2 бензольными кольцами	$C_6-C_2-C_6$	Стильбены	
			$C_6-C_3-C_6$	Флаваноиды	Катехины
					Лейкоантоцианидины
					Флаваноны
Дигидрохалконы					
Халконы					
Антоцианы и антоцианиды					
Флаванолы					
Флавоны					
Изофлаваноиды					
	Ауроны				

		Хиноны	$C_6H_4O_2$	Бензохиноны
			$C_{10}H_6O_2$	Нафтахиноны
			$C_{14}H_8O_2$	Антрахиноны
		Полимерные бензольные соединения	$(C_6-C_1)_n$	Гидролизуемые танины
$(C_6-C_2)_n$				
$(C_6-C_3)_n$	Лингнины			
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Конденсированные танины			

Соединения, которые рассмотрены в данной работе, относятся к растительным полифенолам:

Таблица 2. Рассматриваемые ДНК-тропные соединения

Эпигаллокатехина галлат		Катехин
Кемпеперол		Флаванол
Апигенин		Флавонон
Тимохинон		Хинон

1.1.2. Влияние растительных полифенолов на регуляцию жизнедеятельности эукариотических клеток

Как упоминалось ранее, растительные полифенолы способны взаимодействовать с биомолекулами клетки, в том числе с ДНК. Являясь ДНК-

тропными соединениями, они могут интеркалировать в бороздки дуплекса, тем самым нарушая его пространственную структуру, гибкость. Влияние на гистоны и взаимодействующие с ДНК ферменты может приводить к таким последствиям на клеточном уровне, как индукция апоптоза, снижение пролиферации клеток и т.д. Далее каждый случай будет рассмотрен более детально для изучаемых нами соединений.

Взаимодействие растительных полифенолов с ДНК

Большинство вторичных метаболитов растений являются структурно плоскими молекулами с одним или несколькими ароматическими кольцами, что позволяет им интеркалировать в ДНК, то есть встраиваться между парами оснований дуплекса. Тип связывания исследуемых соединений с двухцепочечной молекулой ДНК был определён при помощи физико-химических методов анализа.

Например, в качестве модельного объекта была взята ДНК тимуса телёнка, которую окрасили флуоресцентным красителем EtBr, являющимся известным интеркалятором. При добавлении в систему исследуемых соединений эпигаллакатехина галлата или апигенина и анализе спектроскопическими методами было замечено, что интенсивность флуоресценции комплекса ДНК-EtBr значительно уменьшалась, и это стало подтверждением способности EGCG и апигенина интеркалировать в ДНК [9];[10]. Также с помощью методов кругового дихроизма, масс-спектрометрии и изменения температуры плавления было доказано разматывание спирали ДНК с конформационными изменениями и значительное связывание EGCG с G-квадруплексами [11]. Похожие эффекты также характерны и для тимохинона: он стабилизирует G-квадруплексы, тем самым ингибируя теломеразу, гиперэкспрессию гена этого белка в опухолевых клетках [12]. Для кемпферола при помощи ИК-спектроскопии было показано интеркалирующее связывание с ДНК и дестабилизация комплекса при высоких концентрациях [13].

Влияние растительных полифенолов на топоизомеразы и гистоны

Характерной способностью многих растительных полифенолов стало ингибирование таких важных для репликации и транскрипции белков, как топоизомеразы 1 и 2 типов (TOP1, TOP2). Топоизомеразы – это ферменты, которые изменяют степень сверхспиральности и тип сверхспирали ДНК путём разрыва одной или двух цепей ДНК с последующим воссоединением концов разрезанных цепей. Методом молекулярного моделирования (молекулярный докинг) был проведён анализ предполагаемых эффектов воздействия растительных полифенолов на топоизомеразы. Далее методом иммуноферментного анализа на клетках лейкоза человека HL-60 для некоторых соединений, в том числе для структурно близких апигенина и кемпферола, было показано, что данные соединения могут ингибировать повторное лигирование ДНК, образуя тройной комплекс с ДНК и TOP1 [14]. TOP2 может ингибироваться апигенином и тимохиноном, причем апигенин также связывает комплекс ДНК-TOP2, а тимохинон увеличивает ферментативное расщепление цепей ДНК в несколько раз [15], [16].

На данный момент взаимодействие растительных полифенолов с гистонами изучено очень мало, бóльшая часть исследований посвящена эпигенетической регуляции гистонов. Однако отдельные попытки исследований в этом направлении предпринимались. Таким образом, были поставлены эксперименты с сангвинарином, в которых методами кругового дихроизма и флуоресцентной спектроскопии было показано, что данное соединение имеет значительное сродство к гистону H1 с образованием устойчивого комплекса [17].

Влияние растительных полифенолов на эпигенетическую регуляцию

При эпигенетической регуляции активность экспрессии генов контролируется посредством модификации самой ДНК, гистоновых и не гистоновых белков без изменения основной кодирующей последовательности. Опухолевые процессы очень часто сопровождаются инактивацией значимых генов-супрессоров посредством гиперметилирования (p21, RECK, TSG) и посредством гипометилирования – активацией ряда онкогенов (raf, c-мус,

HDAC), факторов роста и мобильных повторяющихся элементов. Эпигенетической регуляции экспрессии различных генов, вызванной воздействием растительных полифенолов посвящено большое количество работ.

Так, например, соединение EGCG на клеточных линиях MCF-7 и HL-60 частично восстанавливает функцию генов-супрессоров RECK, который отвечает за подавление метастазирования в организме, и TSG, который регулирует клеточный цикл. Также EGCG понижает экспрессию гена hTERT, фермента, индуцирующего синтез дополнительных нуклеотидов теломер, что даёт клетке бесконечно избегать апоптоз [5].

На различных клеточных линиях EGCG, апигенин и тимохинон показали себя ингибиторами группы ДНК-метилтрансфераз (в основном, DNMT1) – ферментов, катализирующих перенос метильной группы к ДНК, что позволяет контролировать экспрессию генов. Кемпферол вызывает наиболее выраженную деградацию DNMT3B путём повышенного убиквитинирования [18]; [19]; [20].

Также при обработке некоторых клеточных линий (HeLa, HCT116, LNCaP, AsPC-1 и др.) данными соединениями был отмечен эффект снижения экспрессии HDAC – группы гистоновых деацетилаз, ферментов, снимающих с N-лизиновых концов гистонов ацетильные группы. Удаление ацетильной группы происходит с коровых гистонов, что приводит к сокращению расстояния между нуклеосомой и фиксированной на ней ДНК и, как следствие, к подавлению транскрипционных процессов. Но в некоторых случаях при обработке веществами может происходить и гиперацетилирование гистонов. Так, например, апигенин вызывает ацетилирование гистона H3 в промоторе p21, что вызывает остановку клеточного цикла в фазе G2 / M и апоптоз [21]; [22]; [23]; [19].

Влияние растительных полифенолов на сигнальные пути клетки

Клеточный сигналинг является эффективным способом регуляции процессов функционирования и жизнеобеспечения клеток в многоклеточном организме. Нарушение механизмов данного процесса ведёт к опухолевой трансформации клеток. В ряде исследований было выявлено влияние растительных полифенолов на сигнальные «каскады», что является одним из

потенциальных аспектов изучения возможностей их использования в противоопухолевой терапии и профилактике рака.

1.1.3. Сигнальный путь MAPK

MAP-киназы – это ферменты, которые преобразуют внеклеточные сигналы (от цитокинов, факторов роста) во внутриклеточные ответы, осуществляя таким образом контроль над фундаментальными клеточными процессами: пролиферацией, дифференцировкой, гибелью клеток и т.д. Важными подгруппами MAPK являются активируемая митогенными сигналами ERK1/2 и активируемые стрессом протеинкиназы JNK и p38. MAP-киназы являются серин/треонин-специфичными, однако они активируются комбинированным фосфорилированием остатков серина/треонина и тирозина. Активность данных ферментов ограничена рядом белковых фосфатаз, удаляющих фосфатные группы определённых серин/треониновых остатков киназ, необходимых для поддержания активной конформации [24]. Обычно гиперактивация MAPK-сигналинга приводит к неконтролируемой пролиферации клеток.

Так для EGCG, кемпферола, апигенина и тимохинона было показано, что они в основном ингибируют каскад, связанный с киназами ERK1/2. EGCG, например, способствует понижению фосфорилирования ERK [25]. В то же время, данное соединение также способно активировать сразу 2 вида MAPK-путей: JNK и p38 [26]. Тимохинон тоже усиливает сигналинг с киназами JNK и p38 путём их фосфорилирования. Для других растительных полифенолов воздействие на каскады JNK и p38 мало изучено [27]; [5].

1.1.4. Сигнальный путь Wnt

Сигнальный путь Wnt важен для нормального морфогенеза. Гликопротеины Wnt отвечают за многие аспекты эмбрионального развития и пролиферацию клеток, также контролируют обновление клеток уже зрелых тканей за счёт регуляции стволовых клеток. Одной из наиболее распространённых причин канцерогенеза являются мутации белков β -катенина и APC. В большинстве случаев опухолеобразования отмечена повышенная активность данного сигнального пути [28].

При действии EGCG, кемпферола, апигенина и тимохинона на опухолевые клетки наблюдалось подавление каскада Wnt. Например, при обработке культуры клеток HCT15 апигенин ингибировал активацию передачи сигналов β -катенин/TCF/LEF. Это блокировало проникновение β -катенина в ядро и, следовательно, экспрессию нижестоящих генов-мишеней Wnt [29]; [5].

1.1.5. Сигнальный путь NF- κ B

Фактор транскрипции NF- κ B отвечает за контроль экспрессии генов аутоиммунного и воспалительного ответа, апоптоза, клеточного цикла. NF- κ B представляет собой белковый гетеродимер, который обычно неактивен в покоящихся клетках и находится в цитоплазме в комплексе со специфическими ингибиторами – I κ B. Когда в клетку поступает активирующий сигнал (в виде различных факторов роста, микробных патогенов, цитокинов, внешних факторов) происходит фосфорилирование I κ B специфическими киназами (IKK), а затем убиквитинирование и полная деградация гетеродимерного комплекса в протеасомах, после чего свободный и активный NF- κ B поступает в ядро. В большинстве опухолевых клеток NF- κ B постоянно активирован и находится в ядре, из-за чего клетка приобретает повышенную пролиферативную активность, защиту от апоптоза и способность к метастазированию [30].

Для EGCG, кемпферола, апигенина и тимохинона было показано, что они могут ингибировать данный сигнальный путь посредством подавления фосфорилирования и деградации фермента I κ B α , также некоторые из данных соединений препятствуют транслокации NF- κ B в ядро клетки [31]; [5].

1.1.6. Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR необходим для регуляции клеточного цикла, апоптоза, метаболизма, дифференцировки клеток и т.д. Главными ферментами каскада являются фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ и mTOR. Киназа mTOR существует в клетке как субъединица сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2. Нарушение mTORC1 почти не имеет эффекта на клетки, а нарушение mTORC2 приводит к эндоцитозу и к остановке

клеточного цикла на G2/M фазе. Нарушение же обоих белков приводит к остановке клеточного цикла в фазе G0. Комплекс mTORC2 фосфорилирует серин/треонин протеинкиназу Akt, что приводит к её активации. Киназа PI3K также фосфорилирует и активирует Akt, локализуя её в плазматической мембране. Активированная Akt может оказывать влияние на апоптоз, фосфорилируя (и тем самым инактивируя) один из важнейших апоптотических белков – Bcl-2. Akt также способен запустить сигнальный путь NF-κB при помощи регуляции фермента IKK. При многих онкологических заболеваниях сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR является сверхактивным, что приводит к подавлению апоптоза и способствует повышенной пролиферации [32].

Снижение активности PI3K/Akt/mTOR, регистрируемое как уменьшение содержания в клетках фосфорилированной формы белка Akt, способны вызывать рассматриваемые ДНК-тропные соединения: апигенин, кемпферол, EGCG, тимохинон. Эти соединения подавляют PI3K за счет связывания с АТФ-связывающим доменом белка, конкурируя с молекулами АТФ за взаимодействие с данным сайтом. Апигенин и ресвератрол снижают активность mTOR-каскада путем повышения экспрессии негативного регулятора – протеинкиназы АМРК [33]; [5].

1.1.7. Сигнальный путь Shh/Gli

Сигнальный путь Hedgehog играет большую роль в нормальном эмбриогенезе, контролирует пролиферацию и дифференцировку клеток, участвует в регенерации тканей. У млекопитающих известно три гомолога полипептида Hedgehog: Desert (Dhh), Indian (Ihh) и Sonic (Shh). Обычно Hh-сигналинг инициируется, когда лиганды Shh, Dhh или Ihh связываются с трансмембранным рецептором Patched (PTCH), который подавляет активность трансмембранного белка Smoothed (Smo). При связывании Hh с Ptch ингибирующий блок Smo удаляется, и Smo инициирует группу факторов транскрипции Gli, которые активируют таргетные гены посредством прямого взаимодействия с определёнными зонами в области промотора. Инактивация

Нн сигнального пути вызывает дефекты развития, а гиперактивация наоборот способствует метастазированию и канцерогенезу [34].

Для растительных полифенолов, в том числе для апигенина, кемпферола, EGCG, было показано, что обработка клеток данными соединениями приводит к уменьшению уровня экспрессии компонентов каскада Hedgehog/Gli. Например, апигенин подавлял экспрессию белка Gli1. Для кемпферола также была показана способность ингибировать Gli, что снижало уровень антиапоптозной экспрессии Bcl-2 [35]; [36]; [5].

1.1.8. Сигнальный путь Notch

Сигнальный путь Notch критически важен для пролиферации, дифференцировки клеток, имеет огромное влияние на развитие и функционирование многих органов. У млекопитающих на настоящий момент известно четыре рецептора Notch: Notch-1-4. Несмотря на то, что структуры этих белков отличаются, во всех белках семейства Notch присутствуют высоко консервативные домены. Белок можно разделить на внеклеточный домен Notch (NECD) и внутриклеточный домен Notch (NICD), которые соединяются между собой трансмембранным доменом (TM). Канонические Notch-лиганды делятся на два семейства: Delta (Delta-like 1, Delta-like 3 и Delta-like 4) и Serrate (Jagged-1 и Jagged-2). И лиганды, и рецепторы Notch являются трансмембранными белками, поэтому их основная локализация расположена в клеточной мембране. При активированном пути рецептор NICD транспортируется в ядро, где он действует как фактор транскрипции для прямой регуляции генов-мишеней, в том числе таких протоонкогенов, как C-MYC, SURVIVIN. Интересный факт, что функция передачи сигналов Notch в онкогенезе может быть онкогенной или, наоборот, антипролиферативной, и эта функция может зависеть от типа тканей клеток [37].

Влияние растительных полифенолов на данный сигнальный путь мало изучено. Однако для EGCG было показано, что при обработке клеток EGCG снижался уровень транскрипции Notch и его нижестоящих целевых белков Neu1

и Hes1, что приводило к ингибированию передачи сигналов Notch. Кроме того, введение EGCG снижало активность промотора Notch. Было также отмечено подавление экспрессии целевых для Notch генов, включая Notch1, Hey1 и Hes1 [38]; [5].

Таблица 3. Влияние растительных полифенолов на активность сигнальных путей [5]

Сигнальный путь	EGCG	Каempferol	Apigenin	Thymoquinone
MARK/ERK	↓	↓	↓	↓
MARK/p38	↑	–	–	↑
МАРК/JNK	↑	–	–	↑
Wnt	↓	↓	↓	↓
PI3K/Akt/mTOR	↓	↓	↓↑	↓
NF-κB	↓	↓	↓	↓
Notch	↓	–	–	–
Shh/Gli	↓	↓	↓	–

1.2. Организация хроматина

1.2.1. Гистоны. Строение нуклеосомы

Структурная организация хроматина, включающего в себя ДНК и специальные ядерные белки – гистоны, является основополагающим фактором для регуляции экспрессии генов. Главной функцией хроматина является упаковка ДНК, за счёт своей ассоциации с гистонами, однако это происходит таким образом, чтобы сама ДНК была потенциально доступна для транскрипции и, соответственно, является динамической системой. В частности, свой вклад в активацию и репрессию транскрипции вносят обратимые ковалентные модификации гистонов: например, метилирование, фосфорилирование или ацетилирование концевых аминокислотных [39].

При компактизации генома нити ДНК и гистоны организовываются в повторяющиеся единицы – нуклеосомы. Коровая часть нуклеосомы состоит из гистонов H2A, H2B, H3 и H4, которые попарно «узнают» друг друга. Спиральные домены взаимодействуют между собой, образуя структуры, названные рукопожатием, в результате чего возникают гетеродимеры - H2A-H2B и H3-H4. H3-H4 в свою очередь образует тетрамер (H3-H4)₂. Тетрамер (H3-H4)₂ и два димера H2A-H2B составляют гистоновый октамер, сердцевину нуклеосомы. Таким образом, октамер имеет характерную вторичную структуру: трёхспиральный домен с центральным V-образным (H3-H4)₂ тетрамером фланкируется двумя димерами H2A-H2B, и подобная пространственная структура называется HFD. Так, коровые гистоны содержат центральный структурированный трёхспиральный HFD-домен и неструктурированные N- и C-хвосты [40]; [41].

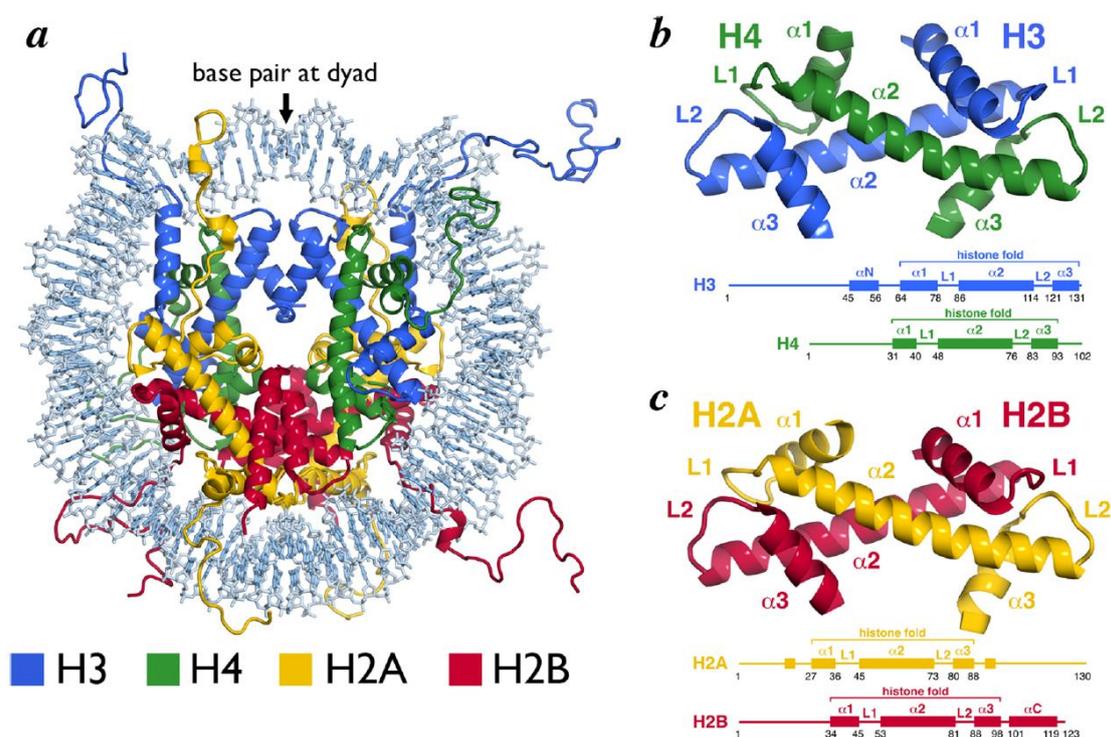


Рисунок 1. Структура коровой части нуклеосомы и гистоновых гетеродимерных складок: (a) структура ядра нуклеосомы; (b) H3 / H4-гистоновый гетеродимер, (c) H2A / H2B-гистоновый гетеродимер [40]

В состав коровых гистонов входит большое количество положительно заряженных аминокислот, таких как лизин и аргинин. Цепь ДНК имеет

отрицательный заряд, и это способствует прочному связыванию между гистонами и боковой поверхностью ДНК при сворачивании. В каждой нуклеосоме между ДНК и гистонами образуется 142 водородные связи. Почти половина этих связей возникает между основной цепью аминокислот гистонов и фосфодиэфирными группами сахарофосфатного остова ДНК. Помимо водородных связей ДНК с белками, нуклеосомы скрепляют многочисленные гидрофобные взаимодействия и солевые мостики. Благодаря этим многочисленным связям практически любые последовательности ДНК могут связываться с нуклеосомой [40].

1.2.2. Линкерный гистон H1, его вариативность и зависимость от клеточного цикла

1.2.2.1. Строение гистона H1

Участок ДНК, выходящий за пределы кор-частицы нуклеосомы, длиной 146 пар нуклеотидов называется линкерной ДНК. В этой области с внешней стороны между ядрами нуклеосомы в области тетрамера (H3-H4)₂ присоединяется линкерный гистон H1, который таким образом фиксирует нуклеосому на нити ДНК и способствует уплотнению хроматиновых конструкций.



Рисунок 2. Схематическая модель положения глобулярного домена гистона H1 внутри нуклеосомы. В этой модели глобулярный домен взаимодействует с одним сайтом связывания возле нуклеосомной диады и со вторым сайтом связывания с линкерной ДНК, смежной с ядром нуклеосомы. Серая, хромосомная ДНК; оранжевый, гистоновый октамер; красный, глобулярный домен H1.

Гистон H1 млекопитающих содержит около 215 аминокислот, при этом состав других гистонов колеблется от 100 до 135 аминокислот. Гистоны H1 имеют трёхдоменную структуру, как и коровые гистоны, однако их состав H1 существенно отличается от четырёх коровых гистонов: в нём гораздо больше остатков лизина, причём все положительно заряженные аминокислотные остатки находятся на С-конце гистона H1.

Короткий N-концевой домен длиной около 45 аминокислот имеет упорядоченную структуру, в которой можно выделить две части. На N-конце преобладают остатки аланина и пролина, а также более гидрофобные аминокислоты (валин, лейцин, метионин и т.д.), которые не формируют стабильных комплексов с ДНК. Вторая часть содержит один остаток аргинина и пять остатков лизина [43].

Центральная часть белка включает около 75 аминокислот, является высоко консервативной среди всех подтипов H1 и имеет глобулярную конформацию типа «спираль с крылом» (англ. «winged helix»). Данный мотив называется «спираль–поворот–спираль». Он складывается из двух α -спиралей, которые соединены небольшой цепью аминокислот. Такая структура позволяет взаимодействовать с ДНК: одна из спиралей связывается с большой бороздкой дуплекса при помощи водородных связей, другая стабилизирует взаимодействие белка и ДНК. Отсчёт α -спиралей ведётся от ближайшей к N-концу и обозначается как H1, H2 и H3 или $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ [44].

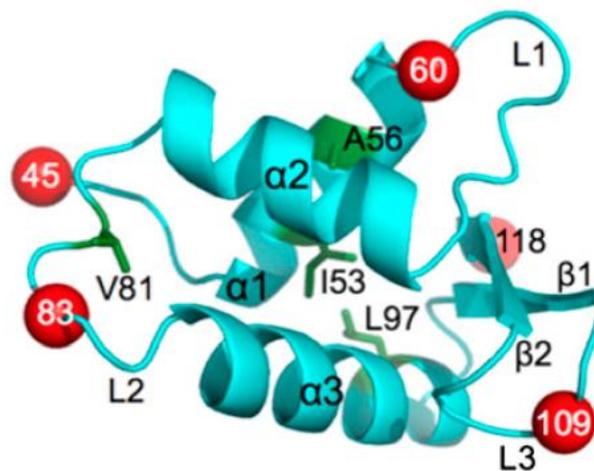


Рисунок 3. Структурная модель глобулярного домена, смоделированная с использованием В-цепи структуры глобулярного домена gH5 в качестве матрицы [45]

С-концевой домен удлинён, имеет длину около 100 аминокислот и высоко обогащен лизином, серином и пролином. Эта часть белка неструктурирована в водном растворе, но приобретает специфическую вторичную структуру при связывании с ДНК. С-концевой домен участвует в стабилизации наложения гистона H1 на линкерную ДНК и конденсации хроматиновых волокон [46].

1.2.2.2. Вариативность гистона H1

Семейство линкерных гистонов H1 является наиболее многочисленным классом гистоновых белков. На сегодняшний день в геноме млекопитающих обнаружены гены, кодирующие одиннадцать различных подтипов H1. Гистоны H1 участвуют в образовании структур хроматина более высокого порядка и обеспечивают доступность регуляторных белков, факторов ремоделирования хроматина и ферментов модификации гистонов к их сайтам-мишеням.

В процессинге большинства гистонов была замечена одна особенность. В эукариотических клетках полиаденилируются практически все мРНК, однако гистоны оказались исключением. Так как в гистоновых генах отсутствуют интроны, их мРНК не являются полиаденилированными, и они заканчиваются характерной петлей гистон-мРНК, которая участвует в S-фазной регуляции этих генов. Из-за того, что гистоны входят в состав нуклеосом, они тесно связаны с ДНК, и при синтезе новых цепей уровень синтеза хроматиновых составляющих

также растёт. Полиаденилирование, возможно, сильно влияет на время жизни мРНК гистонов, поэтому эта функция была удалена у них, т.к. поли(А)-хвост с течением трансляции разрушается, что приводит к полной деградации мРНК [47]. Линкерные гистоны можно распределить по разным критериям: по локализации их генов, по времени экспрессии, по месту локализации самих белков, по прочности их связывания с хроматином и т.д. Все одиннадцать гистонов принято делить на группу основных вариантов H1 (подтипы H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 и H1.5) и одиночные гистоны (H1.0, H1x, H1t, H1T2, H1LS1).

Таблица 4. Варианты гистонов H1 человека

Варианты H1 (синонимы)	Гены H1 (синонимы)	Расположение	Локализация на хромосоме	Сродство с хроматином
<i>Основной тип гистонов. Зависят от репликации</i>				
H1.1 (H1a)	HIST1H1A (H1F1)	Соматические клетки	6p21.3-22	Слабо
H1.2 (H1c)	HIST1H1C (H1F2)		6p21.3-22	Слабо
H1.3 (H1d)	HIST1H1D (H1F3)		6p21.3-22	Средне
H1.4 (H1e)	HIST1H1E (H1F4)		6p21.3-22	Сильно
H1.5 (H1b)	HIST1H1B (H1F5)		6p21.3-22	Сильно
H1.t	HIST1H1T (H1FT)	Клетки семенников	6p21.3-22	–
<i>Одиночные гистоны. Независимые от репликации</i>				
H1.T2	H1FNT (HANP1)	Клетки	12q13.11	–
H1LS1 (H1ls1)	H1LS1	семенников	17q21.33	–
H1.oo (H1foo)	H1FOO	Клетки ооцитов	3q21.3	–
H1.x (H1X, H1.X)	H1FX	Соматические	3q21.3	Сильно
H1.0 (H1°)	H1F0	клетки	22q13.1	Сильно

Варианты основного типа кодируются генами, расположенными в главном кластере гистонов в клетках человека на коротком плече хромосомы 6 и экспрессируются в основном в соматических клетках. Одиночные гистоны специфичны для различных тканей, и их кодирующие гены разбросаны по всему

геному. Гистоны H1.0 и H1x отличаются от остальных тем, что их мРНК полиаденилированы. Сами H1.0 и H1x встречаются в соматических клетках. Остальные гистоны находятся в половых клетках и их предшественниках: варианты H1t, H1T2, H1LS1 – в клетках семеников, и H1oo – в ооцитах [48].

Гистоны также различаются по прочности связывания с хроматином. Варианты H1 имеют различное сродство к хроматину и разные способности стимулировать конденсацию хроматина, это обосновано в основном различным строением С-концевого домена гистонов. Таким образом их можно поделить на сильноконденсирующие (H1.0, H1.4, H1.5 и H1.x), среднеконденсирующие (H1.3) и слабоконденсирующие (H1.1 и H1.2) [49].

Направленный нокадаун генов различных вариантов линкерного гистона, первоначально выполненный для того, чтобы выявить специфичные для вариантов функции, показал, что поломка одного или двух генов подтипа H1 количественно компенсируется повышенной экспрессией других вариантов. Это объясняет избыточность видов гистонов H1. В то же время нокаут трех вариантов и уменьшение H1-фрагмента пополам привели к фенотипическому эффекту. Последовательно инактивируя гены для трех мышинных вариантов H1 (H1c, H1d и H1e), было показано, что линкерные гистоны необходимы для развития млекопитающих. Эмбрионы без трех вариантов H1 умирают к середине беременности с широким спектром дефектов [50]. Из этого можно сделать вывод, что некоторые из генов гистонов основного типа базово экспрессируются во всех клетках, другие ограничиваются определенными типами клеток или индуцируются на определенных стадиях дифференцировки [51].

1.2.2.3. Зависимость экспрессии гистона H1 от клеточного цикла

Имеется определённая зависимость экспрессии гистона H1 от фаз клеточного цикла. Клеточный цикл, в свою очередь, делится на следующие фазы:

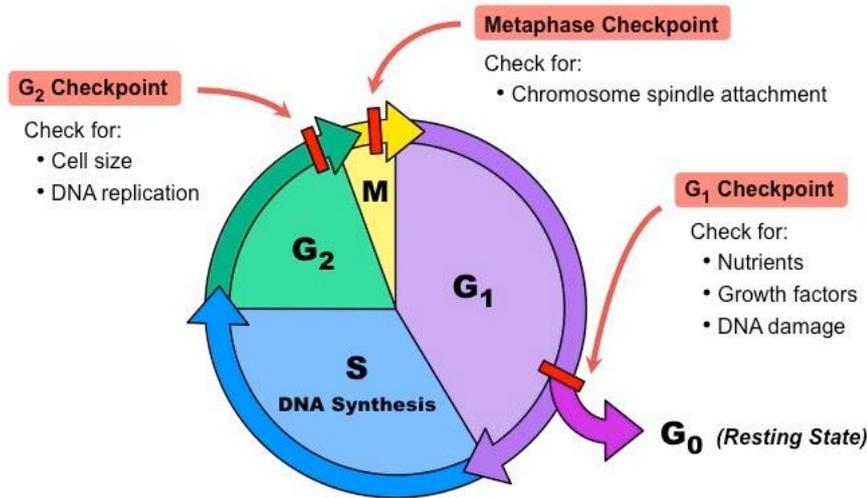


Рисунок 4. Фазы клеточного цикла и контрольные точки, вызывающие остановку клеточного цикла

- 1) G₁ фаза – фаза роста клетки. В этой фазе идёт подготовка к делению: клетка начинает накапливать все белки, необходимые для её деления, и увеличивается в размерах. Также это очень важный этап цикла клетки, так как здесь принимается решение, вступить в S-фазу и продолжать рост или уйти в G₀-фазу, фазу покоя. Продолжительность фазы составляет от 10 до 12 часов;
- 2) S фаза – фаза репликации ДНК. После репликации клетка проверяет любые возможные абберации и повреждения генома и исправляет их, если они есть. Продолжительность фазы составляет 8 часов;
- 3) G₂ фаза – фаза подготовки к митозу. Идёт синтез микротрубочек, деление митохондрий, увеличение энергетических запасов. Продолжительность фазы составляет приблизительно 4 часа;
- 4) M фаза – фаза деления клетки. Процесс деления делится на чёткие этапы (профаза, метафаза, анафаза, телофаза), которые строго регулируются. Продолжительность фазы очень короткая: от 30 до 60 минут.

В клеточном цикле обычно наблюдаются 3 контрольные точки, определяющие процесс нормального деления клетки. В контрольной точке фазы G₁, когда наблюдается повреждение ДНК, клетка автоматически переходит в

состояние G0 (состояние покоя), тем самым препятствуя дальнейшему процессу деления клетки. В контрольной точке фазы G2 контролируется увеличение размера клетки и репликация ДНК. Когда любой из этих процессов еще не завершен или ошибочен, вызывается остановка клеточного цикла. На контрольной точке сборки веретена деления контролируется, прикреплены ли хромосомы к веретену [52].

Так, активация генов пяти вариантов основного типа (от H1.1 до H1.5) в основном увеличивается во время S-фазы и, следовательно, зависят от репликации. Причём гены H1.2, H1.4 и H1.5 экспрессируются с самого начала S-фазы, а H1.0 и H1.3 – во второй её половине. Для подтипа H1.2 была также описана не только зависимость от репликации, но и независимая от репликации экспрессия, которая приводит к образованию полиаденилированной мРНК. Варианты основного типа демонстрируют сходную динамику в отношении уровней их мРНК, и только H1.2 и H1.4 были экспрессированы во всех клетках на высоком уровне, что указывает на их основополагающую функцию [51]; [53].

Ген H1t интересен тем, что также находится внутри кластера на хромосоме 6 и имеет 3'-концевую структуру в виде шпильки, но белок по большей части встречается в хроматине сперматоцитов. Это подразумевает, что ген H1t экспрессируется в мейотических клетках, то есть не имеет прямой зависимости от репликации ДНК. Однако H1t также был обнаружен в экстрактах клеток селезенки, и конкретно эта экспрессия вполне может зависеть от S-фазы [54].

Пять других вариантов экспрессируются в течение всего клеточного цикла. Экспрессия гена замещающего гистона H1.0 не зависит от репликации ДНК. Следовательно, высокий уровень экспрессии может быть обнаружен в высоко дифференцированных неделящихся клетках. В то время как уровень белка H1x остается практически неизменными как в G1, так и во время прогрессирования S-фазы. Также было замечено, что на уровень мРНК H1x не влияет остановка клеточного цикла, как это наблюдалось для уровня белка H1x. Однако H1x накапливается в ядрышках в G1 и распространяется во всем ядре в S-фазе [53].

Таким образом, экспрессию гистонов H1 от фаз клеточного цикла можно поделить на две большие группы: она либо зависит от репликации и потому значительно повышается во время S-фазы, либо не зависит от репликации.

В целом, можно выделить 4 возможных механизма влияния растительных полифенолов на организацию комплекса ДНК-хроматин:

- 1) Изменение параметров дуплекса ДНК;
- 2) Снижение гибкости дуплекса;
- 3) Конкуренное ингибирование соединением взаимодействия белка с ДНК;
- 4) Стабилизация альтернативной структуры ДНК;

Взаимодействие данных соединений с ДНК и взаимодействующими с ней белками приводит либо к тому, что ослабляется связь между ДНК и белками, из-за чего открывается доступ к некоторым областям на самой ДНК, а, значит, и возможность влиять на экспрессию генов, либо меняется структурная конформация хромосомного дуплекса, в том числе крепкое связывание с неканоничными структурами ДНК, что может наоборот блокировать доступ к целевым генам и их транскрибированию.

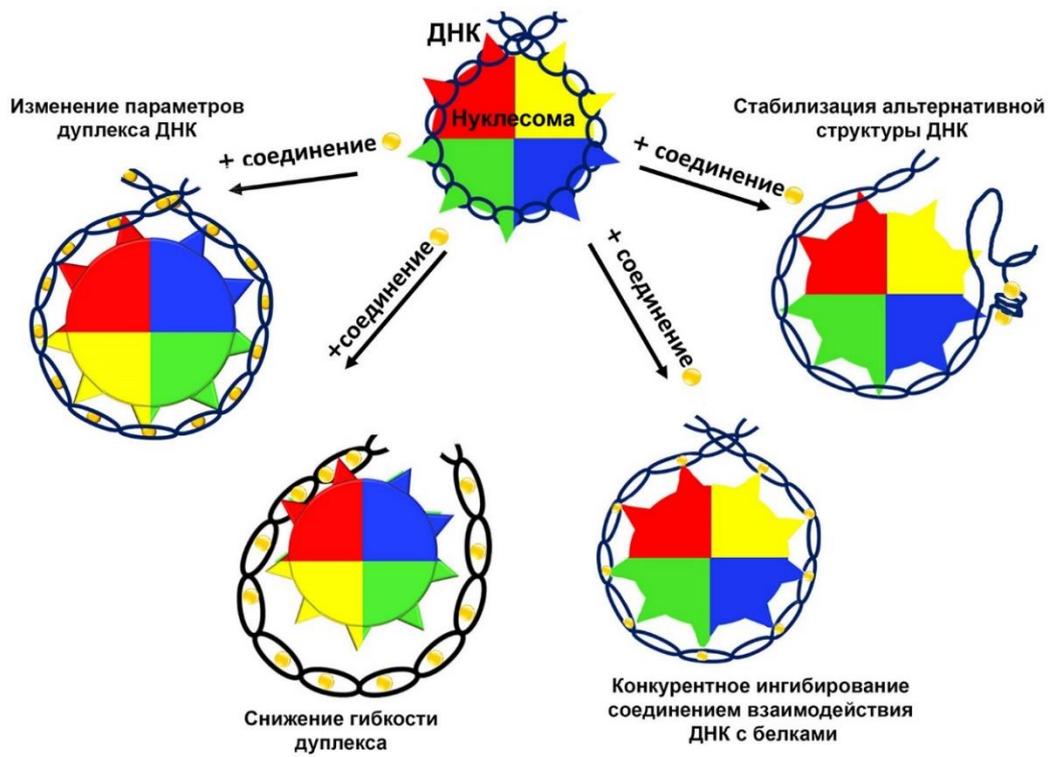


Рисунок 5. Возможные механизмы влияния растительных полифенолов на процесс компактизации ДНК [5]

2. Результаты работы и их обсуждение

Кураксины как положительный контроль при изучении эффектов растительных полифенолов

Основным достижением современной химиотерапии опухолей за последние два десятилетия считается развитие таргетной терапии. Однако при использовании таргетных препаратов существует ряд проблем, в частности, быстрое развитие резистентности. Это происходит в результате прогрессии опухоли – селективного отбора клонов опухолевых клеток с новыми мутациями, обеспечивающими активацию коллатеральных путей передачи про-пролиферативного сигнала. Кроме того, таргетные препараты могут быть эффективными лишь для тех пациентов, в опухолях которых имеются определенные мутации. В остальных случаях, а также и при развитии резистентности к таргетным препаратам, для терапии онкозаболеваний используются генотоксичные цитостатики, действие которых вызывает повреждение ДНК и приводит к нарушению практически всех жизненно важных процессов в клетке. При этом более чувствительны к действию генотоксичных цитостатиков активно пролиферирующие клетки. Это объясняет причину серьёзных осложнений, сопровождающих терапию цитостатиками: анемию, тромбоцитопению, язвенные колиты, облысение и др.

Кроме того, при действии цитостатиков также может развиваться резистентность к химиотерапии за счёт отбора в ходе опухолевой прогрессии клонов клеток с развитой системой множественной лекарственной устойчивости, функционирование которой направлено на выброс чужеродных соединений из клетки. Таким образом, поиск новых противоопухолевых агентов продолжает оставаться актуальной задачей современной молекулярной онкологии.

Не так давно была открыта группа небольших молекул, получившая название «кураксины» (рис.6), для которых был продемонстрирован противоопухолевый эффект в отношении широкого спектра опухолей и линий

опухолевых клеток, а также способность повышать эффективность других препаратов при комбинированной химиотерапии. Особенностью действия препаратов этой группы является их мультитаргетность – они взаимодействуют в клетке сразу с несколькими биомолекулами. При этом они влияют на структуру хроматина, изменяя профиль экспрессии генов. В частности, наблюдается активация p53 (классический опухолевый супрессор), сигнального пути интерферонов I и II типов, ингибирование сигнальных путей NF-κB, Wnt, c-Myc и др. В то же время, эти препараты не повреждают структуру ДНК путём образования ковалентных связей, что значительно снижает их генотоксичность. Также была отмечена их пониженная токсичность по отношению к нормальным клеткам, то есть большая избирательность действия в отношении опухолевых клеток [55].

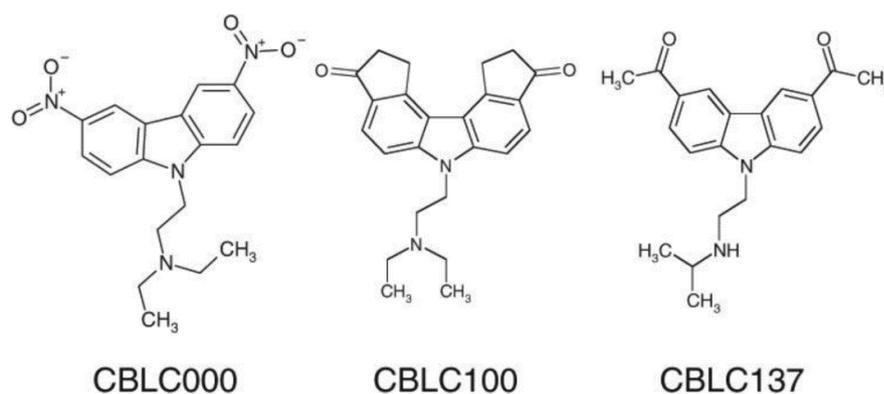


Рисунок 6. Кураксины

Основным механизмом действия кураксинов является нековалентное взаимодействие с ДНК путем интеркаляции карбазольного ядра и расположения заместителей по малой бороздке биополимера. При взаимодействии кураксина с ДНК не происходит повреждение биополимера, но возможны следующие эффекты: изменение гибкости дуплекса, снижение отрицательного заряда молекулы, переход от стандартной В-формы структуры к альтернативным формам. Нуклеосомы, основная структурная единица хроматина эукариот, стабилизируются электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными гистонами и отрицательно заряженным фосфатным остовом ДНК, и, соответственно, взаимодействие кураксинов с ДНК приводит к их

дестабилизации. В результате происходит вытеснение из хроматина линкерного гистона H1, раскрытие нуклеосом, появление зон отрицательной свехспирализации и нарушение дуплексной структуры ДНК. Данные изменения индуцируют ответ гистонового шаперона FACT. Шапероны – это особые белки, обеспечивающие правильное образование гистоновых олигомеров до образования связей с ДНК и защищающие ядро нуклеосомы от распада при ослаблении его контакта с ДНК, например, во время транскрипции [56]. Сайты перехода одноцепочечных участков ДНК в дуплексные распознаются шапероном FACT, изменение внутриядерной локализации которого сопровождается изменением экспрессии ряда генов, в частности, активацией p53 [57].

Описанные механизмы действия кураксинов являются не единственными, но в целом они рассматриваются в качестве основных, достаточно изучены и хорошо продемонстрированы. Эта информация представляет научную основу нашего исследования. Учитывая сильное влияние кураксинов на структуру хроматина, в наших экспериментах мы использовали одно из соединений этой группы (CBL0137) в качестве положительного контроля. CBL0137 был добавлен в среду культивирования клеток до концентрации 25 μ M, и продолжительность обработки клеток составляла 1 час.

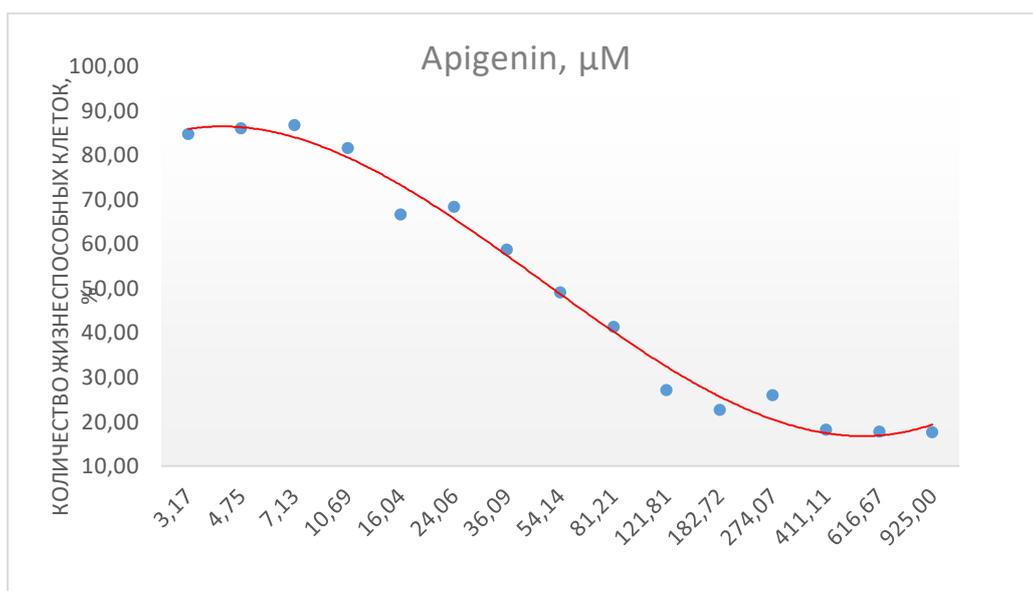
Изучение эффектов растительных ДНК-тропных полифенолов

Известно, что природные малые ДНК-тропные молекулы проявляют антиканцерогенное действие, которое было показано на различных моделях канцерогенеза *in vitro* и *in vivo*. Для этих соединений была продемонстрирована способность взаимодействовать с хроматином без образования ковалентных связей – посредством интеркаляции между парами оснований ДНК и путем расположения в малой бороздке биополимера. Это позволило нам предположить, что данные соединения, подобно кураксинам, влияя на пространственные и физико-химические параметры ДНК, могут вызывать

дестабилизацию нуклеосом, в том числе путем вытеснения линкерного гистона H1, и индуцировать изменения экспрессии генов различных сигнальных путей.

Цитотоксический эффект исследуемых соединений

Первым этапом работы было определение цитотоксичности веществ с помощью МТТ-теста. В его основе лежит реакция жёлтой соли тетразолия - реагента МТТ (3-[4,5-диметилтиазолил-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид), который восстанавливается митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до формазана, образующего нерастворимые фиолетовые гранулы. Кристаллы формазана растворяют в ДМСО и при помощи спектроскопии детектируют интенсивность окрашивания раствора, что позволяет определить количество метаболически активных клеток.



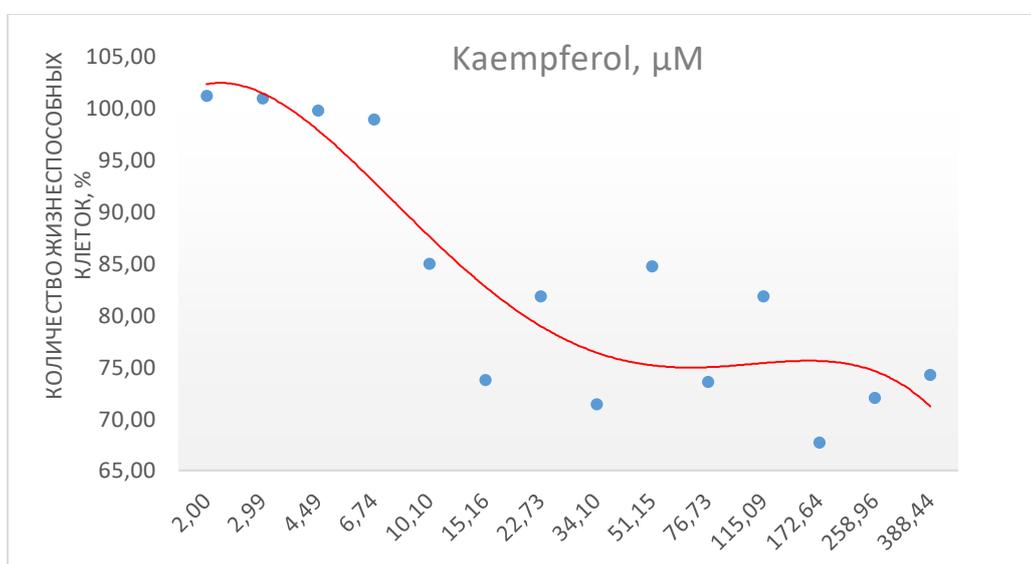
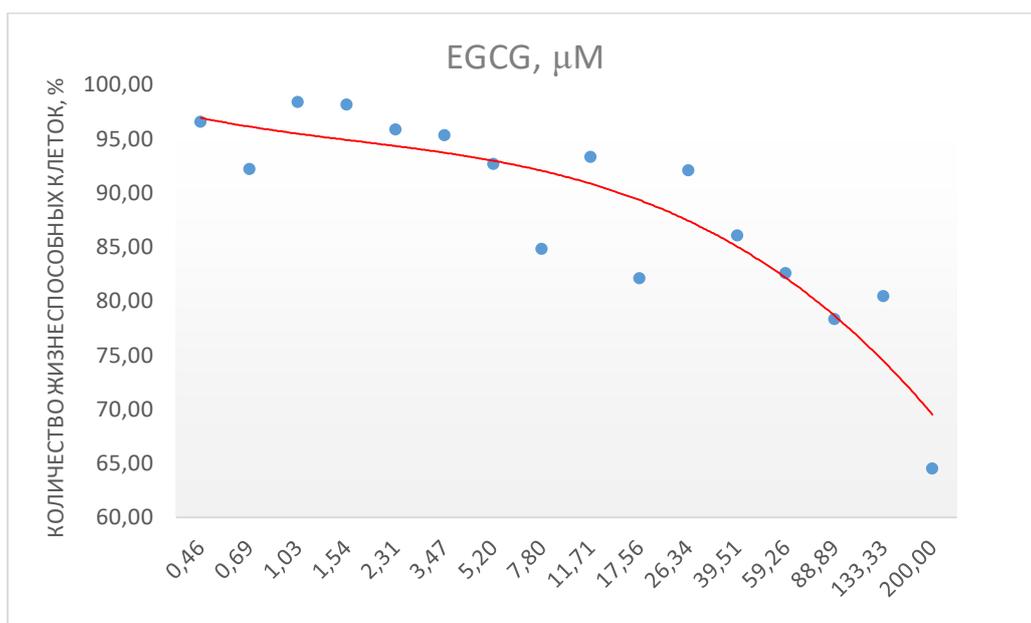


Рисунок 7. Цитотоксический эффект рассматриваемых полифенолов.

Клетки инкубировали в течение 24 часов в присутствии полифенолов от максимально растворимой концентрации вещества (апигенин 925 μM , EGCG 200 μM , кемпферол 874 μM) с последующим последовательным разведением в 1,5 раза. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи МТТ-теста и представляли в процентах.

Полученные результаты демонстрируют прямо пропорциональную зависимость между концентрациями веществ и процентом выживших клеток. Можно отметить заметное снижение выживаемости клеток с повышением концентрации соединений. Нашей первоочередной задачей стояло выявить наибольшие нетоксичные концентрации исследуемых соединений, так как

тематика работы предполагает изучение не противоопухолевой терапии, «убийственной» для клеток, а использование соединений для профилактики рака, а также изучение механизмов их действия, опосредующих антиканцерогенный эффект, в том числе активацию апоптоза. Для определения дозозависимого эффекта на локализацию линкерного гистона H1 необходимо было изучить эффекты соединений при их воздействии в нескольких концентрациях. Мы использовали те концентрации, при которых за время инкубации с соединениями в течение 24 часов выживало 100 и 80% клеток соответственно. Для тимохинона ранее в нашей лаборатории уже была определена цитотоксичность. Для рассмотрения времязависимого эффекта мы использовали максимально нетоксичные концентрации соединений. Результаты определения максимально нетоксичной концентрации и IC20 приведены в таблице 5.

Таблица 5. Максимально нетоксичная концентрация и IC20 исследуемых полифенолов

Вещество	Концентрация, μM	% выживаемости клеток
EGCG	62	100
	133	80
Каempferol	6,5	100
	10	80
Apigenin	5,5	100
	11	80
Thymoquinone	3	100
	18	80

Влияние исследуемых соединений на локализацию вариантов гистона H1

Для изучения влияния исследуемых полифенолов на внутриядерную локализацию вариантов линкерного гистона H1.2 и H1.4 мы обрабатывали клетки ДНК-тропными соединениями и использовали метод Вестерн-блоттинга для двух ядерных фракций (нуклеоплазматической и хроматин-связанной) для фиксации изменения количества белка во фракциях. Так как исследуемые

вещества затрагивают лишь линкерный гистон и не оказывают заметного влияния на коровые гистоны, показатели интенсивности полос гистонов H1 можно нормировать по интенсивности полос корового гистона H3, так как его количество остаётся постоянным. На рисунке представлены результаты Вестерн-блоттинга: блотт (рис. 8А), результаты денситометрического анализа (рис. 8Б).

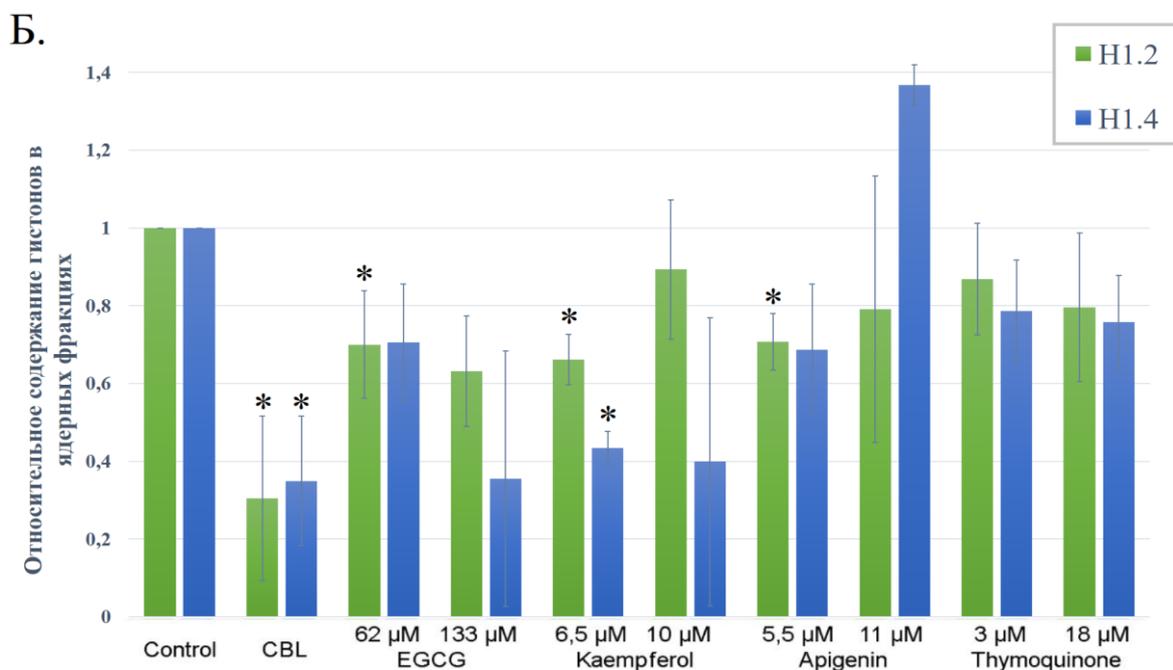
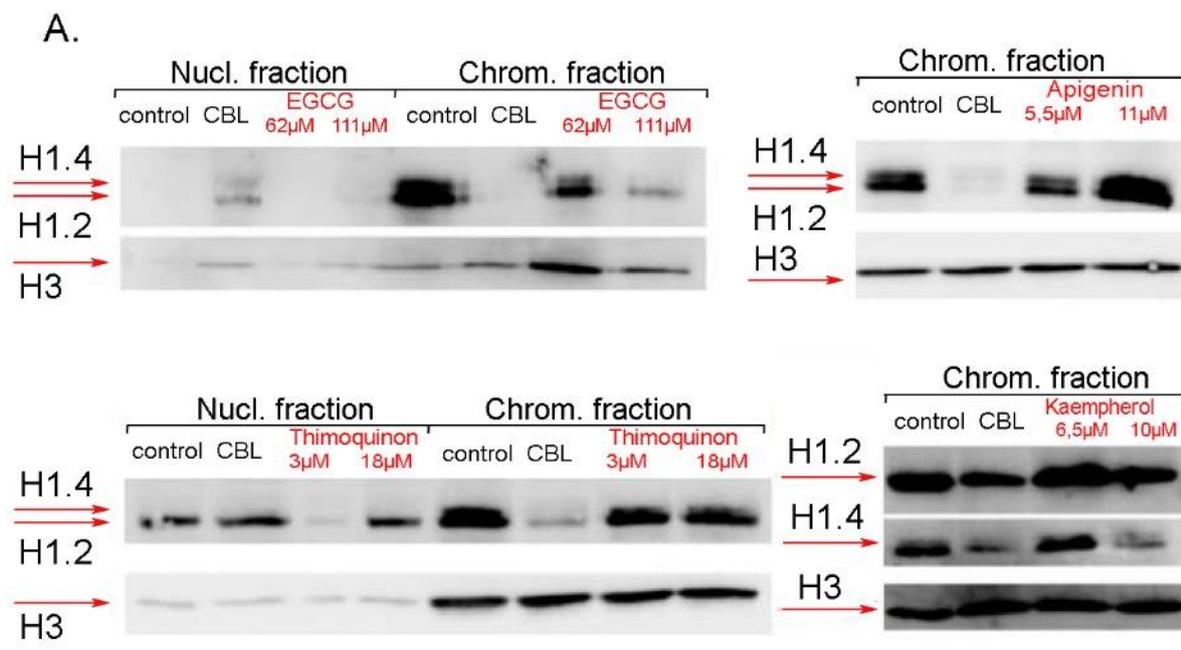


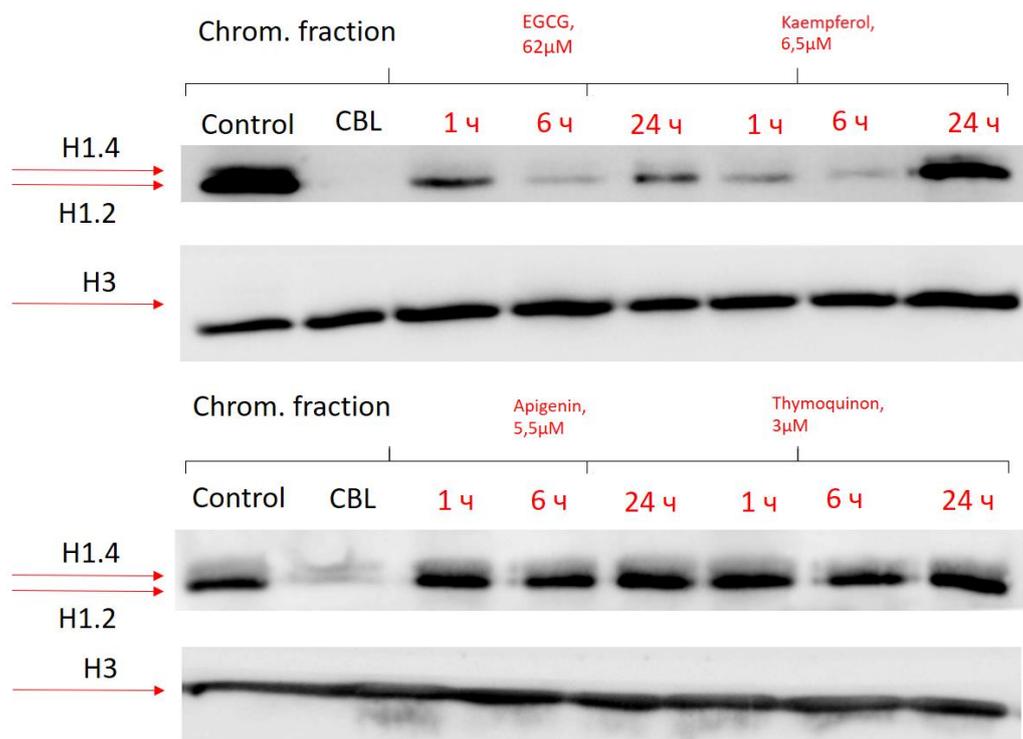
Рисунок 8. Дозозависимый эффект. А. Вестерн-блот. Б. Анализ количества белков H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции при обработке клеток HeLa (24 часа) полифенолами в нетоксических концентрациях методом Вестерн-блоттинг.

* - статистически значимое отличие от контроля (p < 0,05)

Клетки HeLa инкубировали 24 часа в присутствии полифенолов: с EGCG (62 μM и 133 μM), с кемпферолом (6,5 μM и 10 μM), с апигенином (5,5 μM и 11 μM) и с тимохиноном (3 μM и 18 μM) и с CBL (25 μM) в качестве положительного контроля в течение 1 часа. В качестве отрицательного контроля были взяты клетки без обработки каким-либо соединением. Количественный анализ проводили с использованием денситометрии и обработки изображений в компьютерной программе Image Quant для Windows.

Было показано, что для клеток, обработанных в максимально нетоксичной концентрации и IC20 кемпферолом, эпигаллокатехином галлата и апигенином, была достигнута статистическая значимость различий количества линкерных гистонов H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции по сравнению с отрицательным контролем. Экспериментов с обработкой культуры клеток тимохиноном было проведено недостаточное количество, что не позволило достичь статистической значимости различий, при этом наблюдалась тенденция к снижению содержания линкерных гистонов H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции. Из полученных результатов тем не менее можно сделать вывод, что для EGCG в максимально нетоксичной концентрации содержание линкерного гистона H1 во фракции уменьшилось на 30%, для кемпферола – на 35%, для апигенина – на 30%, для тимохинона – на 20%. На рисунке представлены результаты Вестерн-блоттинга: блот (рис. 9А), результаты денситометрического анализа (рис. 9Б).

A.



Б.

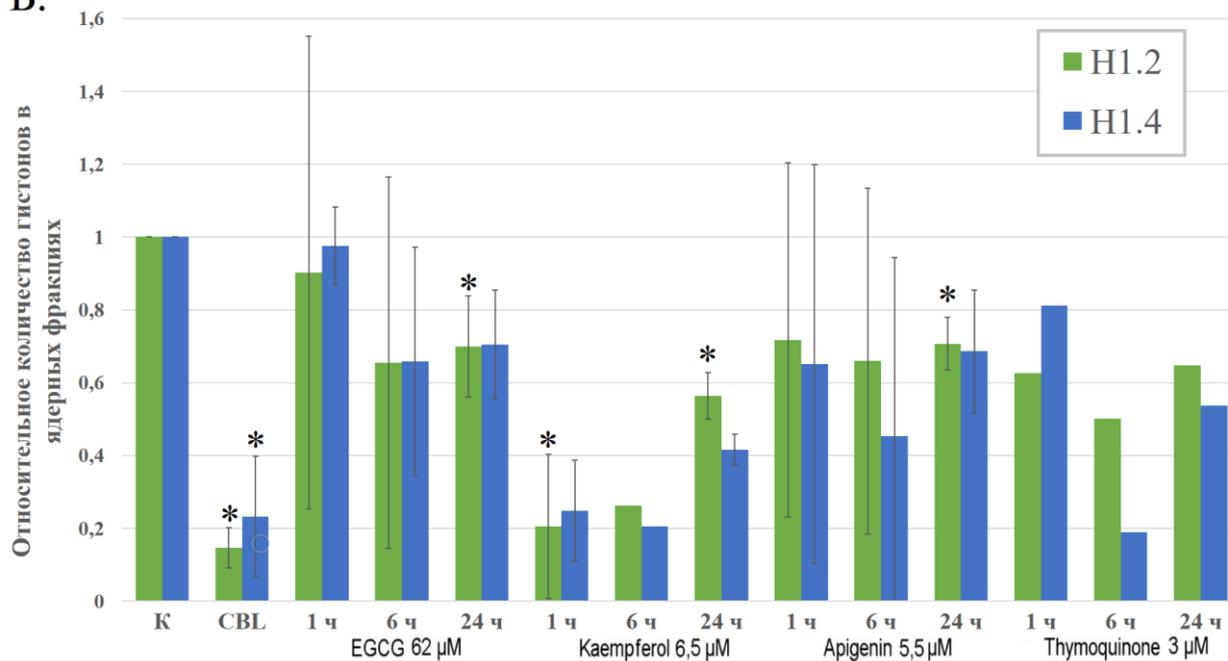


Рисунок 9. Вреязависимый эффект. А. Вестерн-блот. Б. Анализ зависимости количества белков H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции при продолжительности экспозиции 1, 6 и 24 часов при обработке клеток HeLa рассматриваемых полифенолов в нетоксических концентрациях методом Вестерн-блоттинг

* - статистически значимое отличие от контроля ($p < 0,05$)

При изучении зависимости эффектов полифенолов от продолжительности экспозиции клетки HeLa обрабатывали кемпферолом, эпигаллокатехином галлата и апигенином, взятых в максимально нетоксичной концентрации и IC20. Культивирование клеток проводили 1 час, 6 часов и 24 часа в присутствии соединений: EGCG (62 μM), кемпферола (6,5 μM), апигенина (5,5 μM) и тимохинона (3 μM), CBL (25 μM) в качестве положительного контроля в течение 1 часа. В качестве отрицательного контроля были использованы клетки, культивируемые в течение 24 часов без обработки каким-либо соединением. Количественный анализ проводили с использованием денситометрии и обработки изображений в компьютерной программе Image Quant для Windows.

Для EGCG, апигенина и частично – кемпферола была достигнута статистическая значимость различий количества линкерных гистонов H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции. Сделать вывод о статистической значимости эффектов для тимохинона и кемпферола из-за недостаточного количества экспериментов нам не удалось, необходимо провести ряд дополнительных экспериментов. Однако из полученных результатов можно сделать вывод о том, что кемпферол, тимохинон и апигенин начинают оказывать значительное влияние на перераспределение вариантов гистона H1 уже спустя 1 час: содержание линкерных гистонов в хроматин-связанной фракции уменьшилось на 65% для кемпферола, на 40% - для тимохинона и 30% - для апигенина. В то время как значительное уменьшение количества гистона, на 35%, при обработке EGCG произошло через 6 часов.

Проточная цитофлуориметрия

Клеточная линия HeLa является хорошей моделью для изучения регуляции клеточного цикла, так как относительно легко синхронизируется многими методами. Синхронизация прохождения клетками цикла деления происходит за счет остановки клеточного цикла в определённой фазе при воздействии того или

иногo агента. Для синхронизации клеток HeLa в S-фазе был использован ингибитор синтеза ДНК тимидин. Высокая концентрация тимидина нарушает метаболизм данного дезоксинуклеотида, присутствующего в клетке, тем самым препятствуя репликации ДНК. Поскольку обработка тимидином задерживает цикл клетки на протяжении всей S-фазы, процедура двойного тимидинового блока обычно используется для установления более точной ранней блокады S-фазы [58]. После синхронизации в S фазе всех культивируемых клеток, через заданные промежутки времени, которые соответствовали прохождению определённых фаз клеточного цикла (через 14-16 часов после снятия тимидинового блока все клетки находятся в S фазе, через 6 часов после этого – в G2/M фазе, а еще через 12 часов – в G1 фазе), клетки были обработаны исследуемыми соединениями.

В заключительном этапе была проведена синхронизация клеток, успешность которой была подтверждена при помощи проточной цитофлуорометрии. Сбор данных осуществляли в программе CellQuest, результаты были проанализированы в программе WinList. На рисунке 10 приведён пример зависимости распределения клеток популяции от интенсивности их флуоресценции для необработанной клеточной культуры без остановки клеточного цикла.

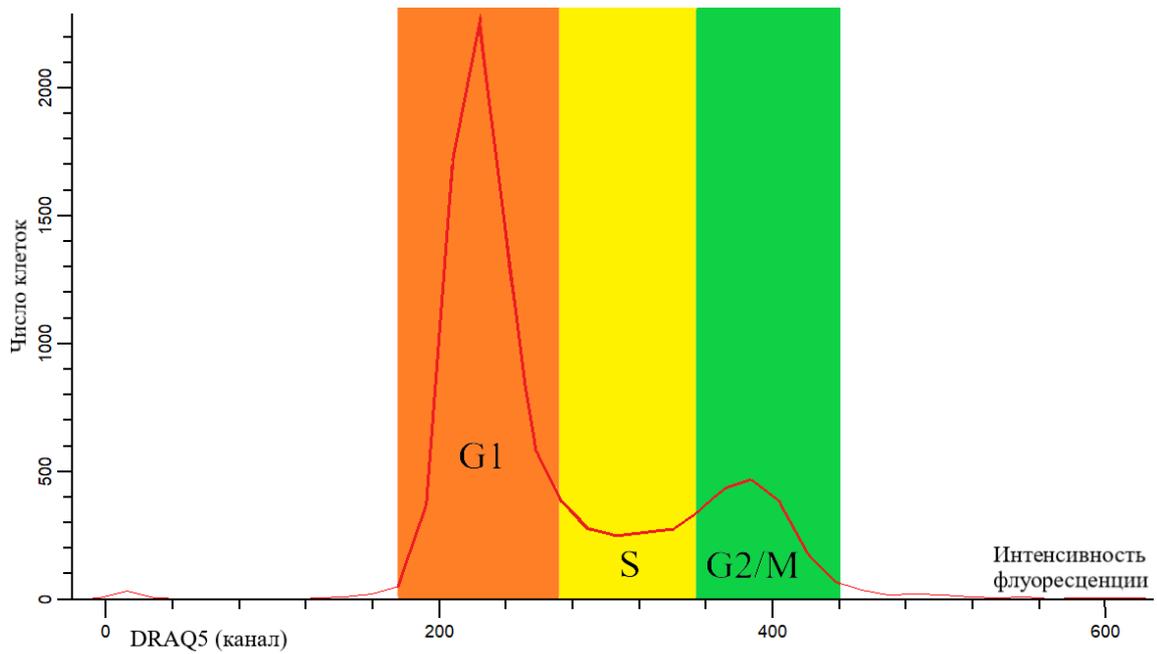
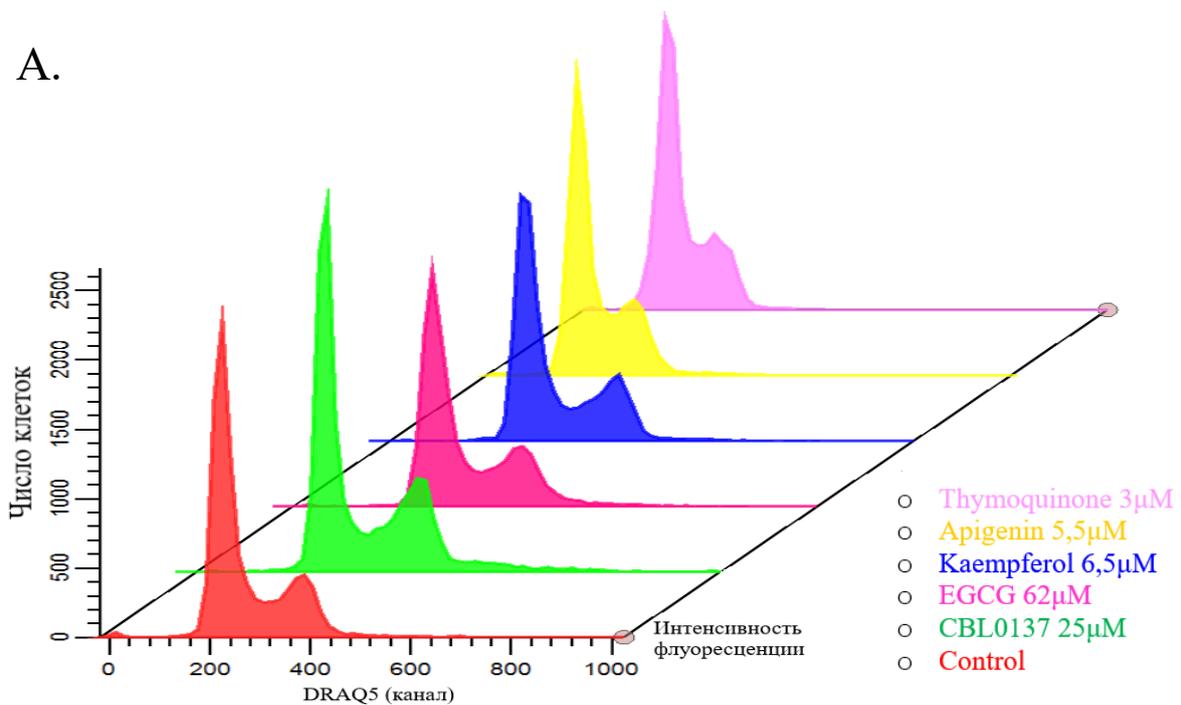


Рисунок 10. Пример распределения количества клеток по фазам в контроле.

Для определения фазы клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии измеряется количество ДНК в клетке. По оси абсцисс отображается интенсивность флуоресценции, по оси ординат – количество клеток. Процентное распределение клеток для каждой фазы клеточного цикла показывается в виде гистограммы процентного распределения количества клеток в каждой фазе.

A.



Б.

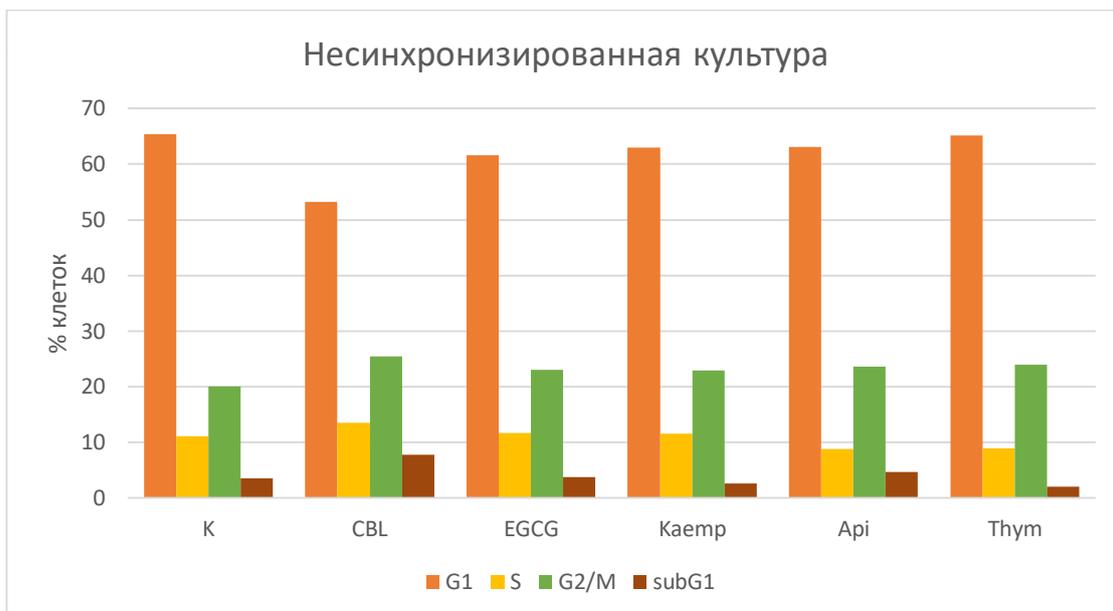


Рисунок 11. Несинхронизированные культуры. А. Гистограмма интенсивности флуоресценции. Б. Гистограмма процентного распределения клеток по фазам клеточного цикла.

На рисунке 11 представлено распределение клеток популяции HeLa T1 по фазам клеточного цикла при добавлении в среду культивирования CBL0137 и исследуемых полифенолов. Полученные результаты демонстрируют, что соотношение количества клеток в различных фазах клеточного цикла (G1:S:G2/M) приблизительно одинаково и составляет 60:10:25. Клетки subG1, которые обычно относят к погибшим, составляли около 5%. Наблюдалась некоторая тенденция к увеличению доли клеток, находящихся в фазе G2/M (для CBL - 6%, для полифенолов – 3- 4%), однако статистически значимых различий от популяции необработанных клеток достигнуто не было. Эти данные не позволили нам выявить какое-либо влияние CBL0137 и полифенолов в качестве блокаторов клеточного цикла.

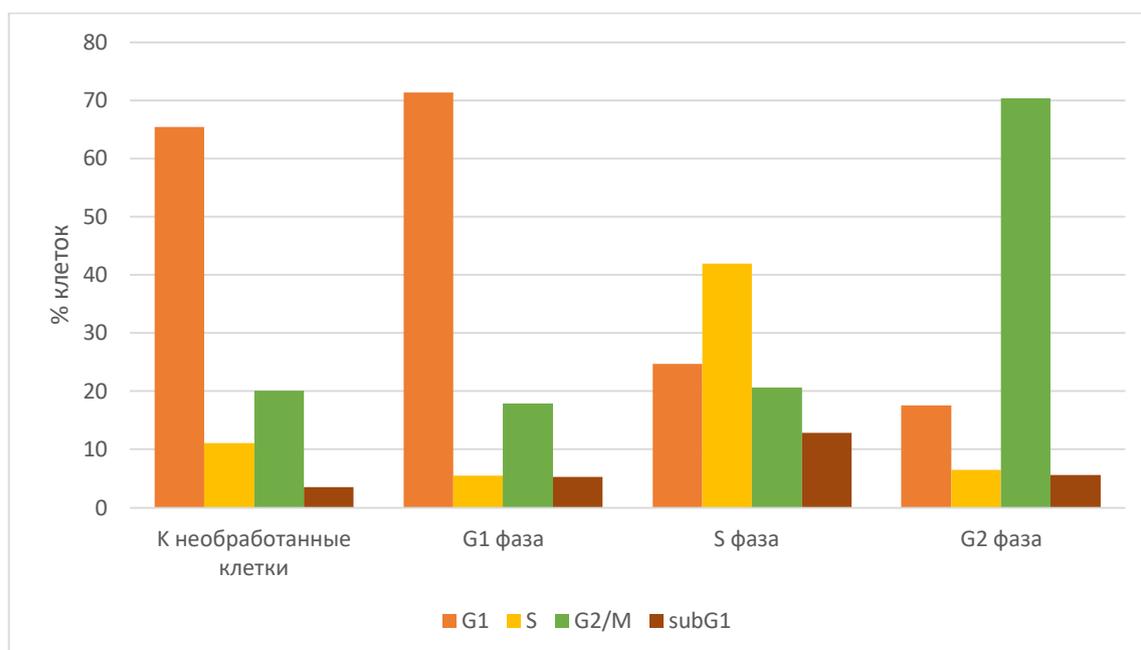


Рисунок 12. Гистограмма процентного распределения по фазам клеток несинхронизированной популяции клеток и для синхронизированных популяций.

На рисунке 12 представлена гистограмма распределения клеток популяции HeLa по фазам клеточного цикла несинхронизированной популяции клеток и синхронизированных популяций, находящихся в разных фазах клеточного цикла через определённые интервалы времени после снятия тимидинового блока. Поскольку известна продолжительность каждой из фаз клеточного цикла в клетках HeLa, снятие тимидинового блока и последующее культивирование клеток в течение определенного интервала времени позволяет получить синхронизованную популяцию клеток, находящихся в той или иной фазе клеточного цикла. Чётко выраженный пик количества клеток, находящихся в каждой определённой фазе, свидетельствует об успешности проведенной синхронизации. Далее был проведен анализ влияния полифенолов на синхронизированные популяции клеток, преимущественно находящиеся в какой-либо фазе клеточного цикла.

После обработки полифенолами синхронизированной популяции клеток, находящихся на стадии G1, произошли небольшие изменения распределения клеток по фазам клеточного цикла: в G1 фазе количество клеток увеличилось на

10%, в то время как в остальных фазах их число уменьшилось: в S фазе на 3% и в G2/M на 10% (рис. 13).

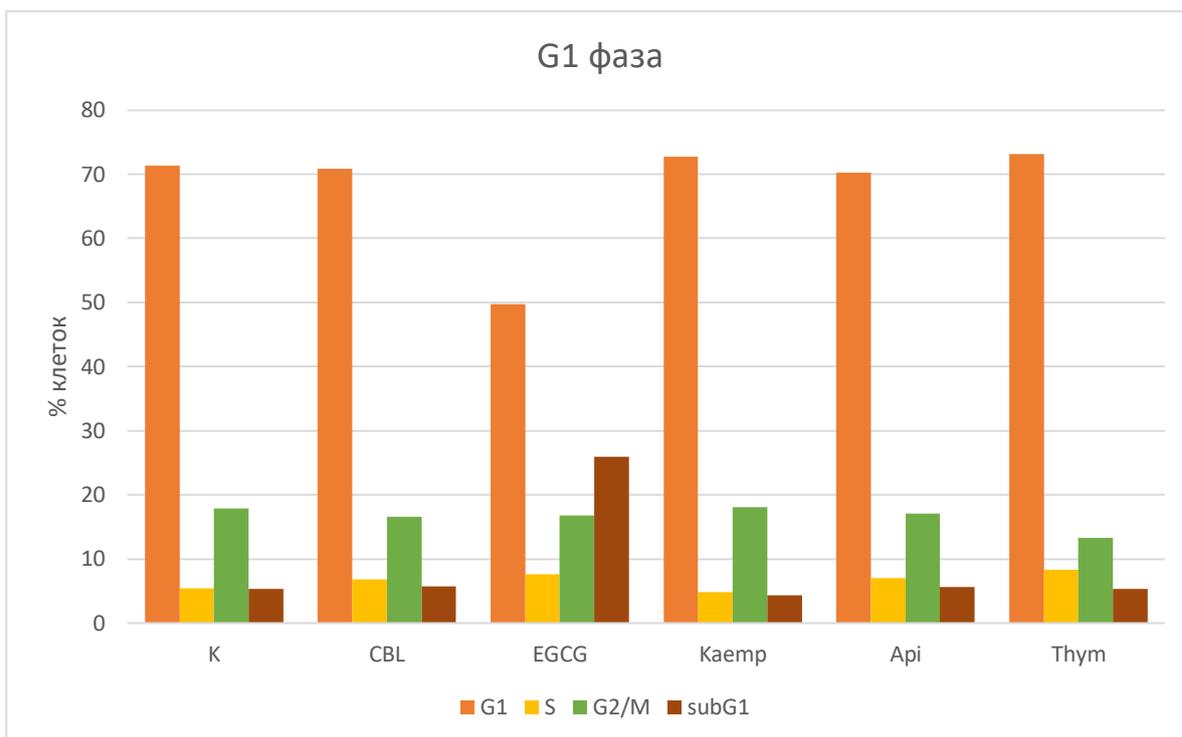


Рисунок 13. Гистограмма процентного распределения синхронизированной популяции клеток, находящихся на стадии G1

Также следует отметить, что при обработке клеток EGCG, наблюдалось сильное увеличение доли погибших клеток (subG1, с 5% до 25%).

Доля клеток в фазе S в несинхронизированной популяции составляет обычно около 10%. После обработки CBL синхронизированной популяции клеток, находящихся в фазе S, наблюдалось увеличение доли погибших клеток на 13%, в то время как изменение количества клеток в других фазах клеточного цикла уменьшилось на 2-8% (рис. 14).

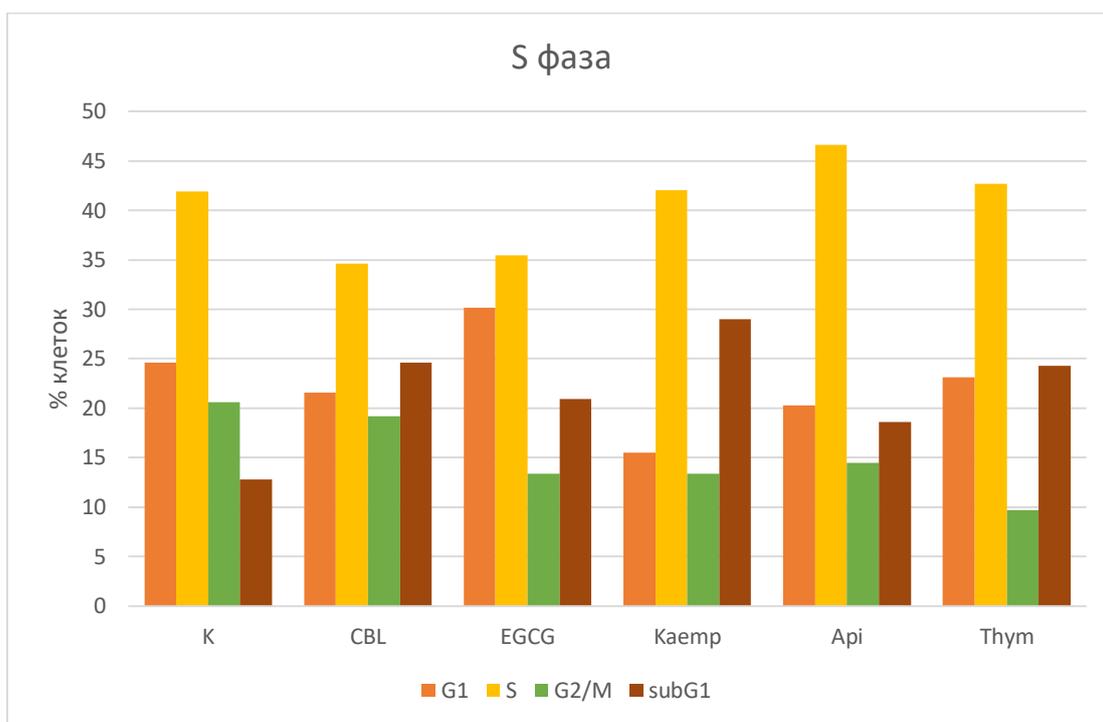


Рисунок 14. Гистограмма процентного распределения синхронизированной популяции клеток, находящихся на стадии S

После обработки растительных полифенолами синхронизированной популяции клеток, находящихся в фазе S, наблюдались следующие изменения:

- 1) для всех полифенолов доля клеток, находящихся в фазе G2/M, уменьшилась (от 7% до 12%);
- 2) доля погибших клеток увеличилась (от 7% до 16%);
- 3) изменение доли клеток, находящихся в фазе S, не наблюдалось при действии кемпферола и тимохинона, при обработке EGCG и апигенина наблюдалось уменьшение на 7% и увеличение на 6% соответственно;
- 4) изменение доли клеток, находящихся в фазе G1, не наблюдалось при действии тимохинона и апигенина, при обработке EGCG и кемпферола наблюдалось увеличение на 7% и уменьшение на 10% соответственно.

Доля клеток в фазе G2/M в несинхронизированной популяции составляет обычно около 25%. После обработки CBL синхронизированной популяции клеток, находящихся в фазе G2/M, наблюдалось увеличение доли клеток в G2/M

фазе на 47%, в то время как изменение количества клеток в других фазах клеточного цикла уменьшилось: в G1 фазе – на 47%, в S фазе – на 4% (рис. 15).

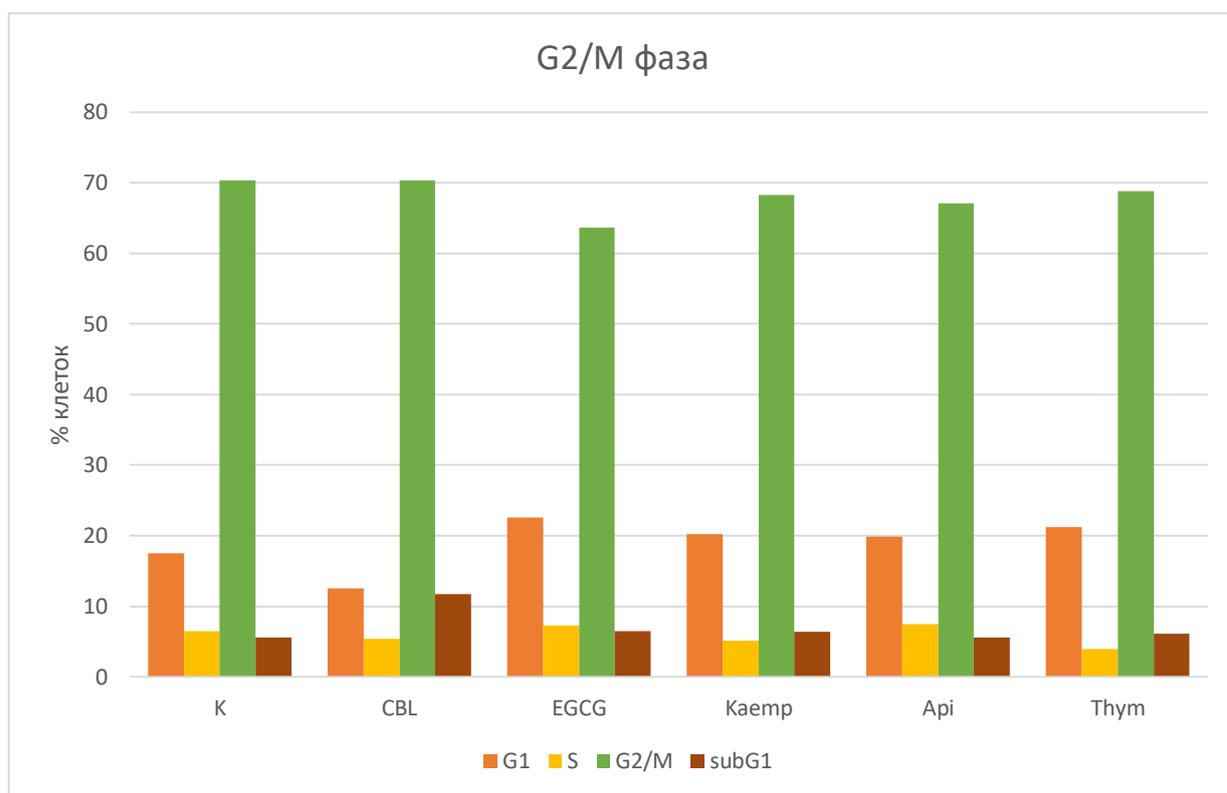


Рисунок 15. Гистограмма распределения синхронизированной популяции клеток, находящихся на стадии G2/M

После обработки растительными полифенолами синхронизированной популяции клеток, находящихся на стадии G2/M, произошли следующие изменения:

- 1) для доли клеток, находящихся в фазе G2/M, для всех полифенолов наблюдалось увеличение: при обработке EGCG – на 40%, при действии остальных фитонутриентов – на 43%;
- 2) доля погибших клеток увеличилась (от 6% до 12%);
- 3) для всех полифенолов доля клеток, находящихся в фазе S, уменьшилась (от 4% до 8%);
- 4) для доли клеток, находящихся в фазе G1, наблюдалось уменьшение на 40-45%.

3. Экспериментальная часть

Используемые реагенты

Раствор Версена-EDTA, раствор Трипсина, фосфатный буфер (PBS), сыворотка крови эмбриональная телячья, культуральная среда DMEM, пенициллин/стрептомицин, L-глутамин, DMSO с содержанием воды не более 0,03% («ПанЭко», Россия), реагент Брэдфорда, Buffer A (10mM HEPES, pH 7.9; 1.5mM MgCl₂; 10mM KCl), коктейль ингибиторов протеаз в таблетках (Roshe), High Salt Buffer NaCl-1, High Salt Buffer NaCl-2, 40%-полиакриламид, бис-полиакриламид («ПанЭко», Россия), Tris-HCl, SDS, Twin 20 («Sigma», США), PBST (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween), персульфат аммония (APS), TEMED, глицерин («Serva», Германия), маркер молекулярного веса Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder («Thermo Fisher Scientific», США), Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3, 20% v/v methanol), молоко сухое обезжиренное (AppliChem, Германия), первичные антитела: PARP (46D11) («Cell Signaling Technology», США), H3 (ab1791), H1.2 (ab17677), H1.4 (ab103522), H1.5 (ab24175), вторичные кроличьи антитела к H1 и PARP (ab97051), Loading buffer, ECL набор для хемилюминисцентной детекции белков («Bio-Rad», США), мембрана PVDF Transfer Membrane («Thermo Scientific»), β-меркаптоэтанол, тимидин 100 мМ, 4% параформальдегид, доксициклин

Чистота всех реагентов – ЧДА и выше.

Используемое оборудование

Бокс с установкой очистки и обеззараживания воздуха БОВ-001-АМС (Россия), MCO-17AIC CO₂ инкубатор («SANYO», Япония), Центрифуга Hettich Mikro 200 («Hettich», Германия), микроскоп Nikon Eclipse TS100 («Япония»), весы аналитические PioneerOHAUS (Китай), UV-Vis микропланшетный спектрофотометр Multiskan Sky («Thermo Scientific», США), лабораторная система визуализации ImageQuant LAS-4000 Fluorescent Image Analyzer («General Electric», США), проточный цитофлуориметр FACS Calibur («Becton

Dickinson», США)

Культивирование клеток

При выполнении данного исследования мы работали с клеточной линией HeLa и клеточной линией HeLa, экспрессирующей меченый mCherry гистон H1.5, созданной стабильной трансфекцией линии HeLa вектором pSB/IR-TRE3G-H1-mCherry. Клетки HeLa поддерживали в монослое в стандартной среде DMEM с добавлением 10% FBS, L-глутамина (0,25 ед), пенициллина (5 ед/мл) и стрептамицина (5 мкг/мл) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В среду DMEM для клеточной линии HeLa H1-mCherry добавляли доксициклин (0,5 мкл/мл) помимо стандартных компонентов.

Анализ цитотоксичности соединений с помощью МТТ-теста

Для проведения МТТ-теста клетки HeLa высевали в 96-луночные планшеты и культивировали сутки при 37°C и при 5%-ном содержании CO₂. Далее клетки не обрабатывали (контроль) или обрабатывали веществами интереса по схеме: от максимально растворимой концентрации веществ (EGCG 200 μМ, кемпферол 874 μМ, апигенин 925 μМ) с последующим последовательным разведением в 1,5 раза. После культивирования клеток в течение 24 часов добавляли 10 мкл раствора МТТ (10 мг/мл) и оставляли на 2-4 ч в CO₂-инкубаторе. Затем удаляли среду, кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO. С помощью универсального планшетного ридера EL_x800 определяли оптическую плотность раствора в каждой лунке при 540 нм. Для определения процента выживших клеток значения абсорбции, полученные для обработанных соединениями клеток, нормировали по значениям клеток контроля.

Анализ дозо- и времязависимых эффектов соединений

Для определения дозозависимого эффекта использовали две концентрации анализируемых соединений – максимально нетоксичную концентрацию и IC₂₀.

Клетки HeLa высевали в чашки Петри диаметром 100 мм и культивировали сутки при 37°C и при 5%-ном содержании CO₂. Далее клетки не обрабатывали (контроль) или обрабатывали CBL (25 μM), EGCG (62 μM и 133 μM), кемпферолом (6,5 μM и 10 μM), апигенином (5,5 μM и 11 μM) и тимохиноном (3 μM и 18 μM), по прошествии 24 часов снимали.

С целью анализа времязависимого эффекта использовали три времени экспозиции клетки HeLa высевали в чашки Петри диаметром 100 мм и культивировали сутки при 37°C и при 5%-ном содержании CO₂. Далее клетки не обрабатывали (контроль) или обрабатывали CBL (25 μM), EGCG (62 μM), кемпферолом (6,5 μM), апигенином (5,5 μM) и тимохиноном (3 μM), по прошествии 1 часа, 6 часов и 24 часов снимали.

Выделение нуклеоплазматической и хроматин-связанной фракции

Использован модифицированный группой A. Jordan протокол Kalashnikova et al. *Nucleic Acids Research*, 2013 [59].

Клетки, рассаженные на 100 мм чашках Петри, снимали стандартным способом при помощи растворов Версена и Трипсина, центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре, отбирали среду. Каждый полученный осадок ресуспендировали в PBS. Далее центрифугировали 10 минут при 600g 4°C. Осадки ресуспендировали в 400 мкл Буфера А с добавленным непосредственно перед экспериментом коктейля ингибиторов протеаз в таблетках (Roshe) и инкубировали на льду в течении 30 минут, после чего центрифугировали при тех же условиях. Осадки ресуспендировали в 200 мкл Буфера А и гомогенизировали 40-60 ударами пестика, после чего лизированные клетки центрифугировали при тех же условиях. Супернатант отбирали как цитоплазматическую фракцию. Осадки растворяли в High-Salt Buffer-1 (20mM HEPES, pH 7.9; 25% v/v glycerol; 0.42M NaCl; 1.5mM MgCl₂; 0.2mM EDTA) с добавленным коктейлем ингибиторов протеаз и инкубировали в течении 90 минут при 4°C. А затем центрифугировали 30 минут при 16000 g 4°C. Супернатант отбирали как нуклеоплазматическую фракцию, а осадок

растворяли в 200 мкл High-Salt Buffer-2 (20mM HEPES, pH 7.9; 25% v/v glycerol; 0.75M NaCl; 1.5mM MgCl₂; 0.2mM EDTA) с добавленным коктейлем ингибиторов протеаз. Образцы грели при 95°C в течение 5 минут, а затем центрифугировали на максимальной скорости в течение 15 минут. Супернатант отбирали как хроматин-связанную фракцию.

Количественный анализ белков с помощью Вестерн-блоттинга

Количественный анализ белков проводили при помощи реагента Брэдфорд (BioRad) в 96-луночном планшете на микропланшетном спектрофотометре Multiskan Sky. После подсчета и нормирования на контроль, пробы для нанесения на гель подготавливались смешиванием в рассчитанных пропорциях белка, воды и 16 мкл 5×Loading buffer (3,75 мл 1M Tris 7,5 pH, 3мл 20%-SDS, 1,35мл BPB Бромфеноловый синий, 2,4 мл β-меркаптоэтанол, 4,5 мл глицерол) и последующей инкубацией при 95°C в течение 5 минут, общий объем пробы составлял 80 мкл.

Белки разделяли при помощи вертикального электрофореза при 45мА с использованием полиакриламидных гелей в Tris-глициновом буфере с 1% SDS в Running буфере (25mM Tris, 190mM глицин, 0,1%SDS). Перенос на мембрану PVDF Transfer Membrane («Thermo Scientific») осуществляли мокрым способом при 100В в Transfer буфере (25mM Tris, 190mM глицин, 20% метанол). Для предотвращения неспецифической сорбции мембраны инкубировали в течение 1 ч с 5%-ным раствором обезжиренного молока в PBST. После промывали (2 раза по 5 мин) буфером PBST каждую мембрану и затем при постоянном покачивании инкубировали с первичными антителами к PARP, H3, H1.2, H1.4, H1.5 в течение 1,5-2 часов при комнатной температуре, а затем мембраны 2 раза промывали в PBST по 5 мин. Далее проводили инкубацию со вторичными антителами в таких же условиях и снова промывали PBST (2 раза по 5 минут). Обсчет результатов был выполнен с помощью программы ImageJ.

Проточная цитофлуориметрия

Изучение зависимости влияния исследуемых соединений от фазы цикла

проводили посредством фиксации клеток в определённых фазах клеточного цикла. Для проведения данного эксперимента использовали модифицированный протокол синхронизации клеток Т.Н. Ma and R. Poon *Methods in Molecular Biology*, 2011 [58]. Клетки HeLa H1-mCherry высевали в 6-луночные планшеты и культивировали сутки при 37°C и при 5%-ном содержании CO₂. Затем обновляли культуральную среду и обрабатывали клетки тимидином (2 мМ) и инкубировались 15 часов. После этого клетки промывали 1 мл PBS и оставляли инкубироваться в течение 9 часов. Затем клетки снова промывали 1 мл PBS и добавляли культуральную среду с тимидином (2 мМ). По прошествии 15 часов клетки промывали 1 мл PBS и в зависимости от фазы цикла в разное время (после снятия тимидинового блока все культуры клеток находились в S фазе, через 6 часов после первой контрольной точки – в G2/M фазе, через 12 часов – в G1 фазе) клетки не обрабатывали (контроль) или обрабатывали CBL (25 μМ) и нетоксичными концентрациями EGCG (62 μМ), кемпферолом (6,5 μМ), апигенином (5,5 μМ и 11 μМ) и тимохиноном (3 μМ и 18 μМ), по прошествии 1 часа промывали PBS, фиксировали 1 мл 4%- параформальдегида в течении 10 минут и снова промывали 1мл PBS. После этого клетки снимали по стандартной схеме при помощи растворов Версена и трипсина, центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин при комнатной температуре, отбирали среду и ресуспендировали в 1мл 75% этилового спирта. Образцы исследовали на проточном цитофлуометре FACS Calibur, полученные данные проанализированы с использованием программного обеспечения для анализа CellQuest.

4. Заключение

Представленное исследование было направлено на изучение ДНК-опосредованных эффектов растительных полифенолов, а именно, на анализ влияния малых природных ДНК-тропных молекул на локализацию линкерного гистона H1 и на распределение популяции культивируемых клеток HeLa по фазам клеточного цикла. С помощью МТТ-теста были определены максимально нетоксичные концентрации растительных полифенолов, которые далее были использованы при изучении ДНК-опосредованных эффектов этих соединений. Ряд полученных в исследовании результатов свидетельствуют о правильности выдвинутой нами гипотезы о возможном влиянии растительных полифенолов на структуру хроматина путем вытеснения из хроматиновой фракции линкерных гистонов. Учитывая роль линкерных гистонов в процессе компактизации ДНК, важном для прохождения клеточного цикла, мы оценили влияние анализируемых полифенолов на распределение популяции культивируемых клеток HeLa по фазам клеточного цикла, однако значимых эффектов полифенолов в качестве блокаторов клеточного цикла не наблюдалось. Все полученные данные хорошо согласуются с опубликованными результатами исследований механизмов действия нового антиканцерогенного и противоопухолевого препарата кураксин CBL0137, который, так же как и растительные полифенолы, относится к малым ДНК-тропным молекулам.

Таким образом, все задачи, необходимые для достижения цели исследования выполнены полностью.

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Обработка клеток HeLa растительными полифенолами кемпферол и EGCG при использовании максимально нетоксичных концентраций вызывает статистически значимое снижение количества линкерных гистонов H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции.
2. Тенденция к снижению количества линкерных гистонов H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции клеток HeLa наблюдается при их обработке

тимохиноном и апигенином, использованных в максимально нетоксичной концентрации (для подтверждения статистической значимости наблюдаемых эффектов необходимо проведение дополнительной серии экспериментов).

3. Различия в интенсивности снижения содержания линкерных гистонов H1.2 и H1.4 в хроматинсвязанной фракции клеток HeLa наблюдаются при действии всех анализируемых растительных полифенолов.

4. Для каждого из анализируемых растительных полифенолов динамика развития эффекта на содержание линкерных гистонов H1.2 и H1.4 в хроматин-связанной фракции клеток HeLa имеет особые временные зависимости; быстрее всего проявление эффекта происходит при действии кемпферола, для которого уже через 1 час обработки наблюдается снижение содержания линкерных гистонов в хроматин-связанной фракции на 65%.

5. Ни одно из анализируемых соединений не проявляет способности к блокированию прохождения клетками HeLa клеточного цикла, что было продемонстрировано как на несинхронизированной клеточной популяции, так и на популяциях клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла.

5. Список литературы

1. McDonald J.T., Farnworth M., Liu Z. Cancer and the healthy immigrant effect: a statistical analysis of cancer diagnosis using a linked Census-cancer registry administrative database // *BMC Public Health*. 2017. Vol. 17, № 1. P. 296.
2. Wiseman M.J. Nutrition and cancer: prevention and survival // *Br. J. Nutr.* 2019. Vol. 122, № 5. P. 481–487.
3. Godswill C. Medicinal Plants: The Medical, Food, and Nutritional Biochemistry and Uses. 2019. Vol. 5, № 11. P. 22.
4. Desborough M.J.R., Keeling D.M. The aspirin story - from willow to wonder drug // *Br. J. Haematol.* 2017. Vol. 177, № 5. P. 674–683.
5. Kirsanov K.I. et al. Influence of DNA-binding compounds with cancer preventive activity on the mechanisms of gene expression regulation // *Adv. Mol. Oncol.* 2019. Vol. 5, № 4. P. 41–63.
6. Shiny T. et al. Phytochemical and hypoglycaemic activity investigation of *Costus pictus* plants from Kerala and Tamilnadu. *Int.J. Pharm. Sci. Invent.* 2013. Vol. 2 №5, 11–18.
7. Yang C.S. et al. Cancer prevention by tea and tea polyphenols // *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2008. Vol. 17 Suppl 1. P. 245–248.
8. Ditu L.-M. et al. Introduction in Nutraceutical and Medicinal Foods // *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*. Elsevier, 2018. P. 1–12.
9. Ghosh K.S. et al. Studies on the interaction of copper complexes of (–)-epicatechin gallate and (–)-epigallocatechin gallate with calf thymus DNA // *J. Inorg. Biochem.* 2008. Vol. 102, № 9. P. 1711–1718.
10. Kanwal R. et al. Dietary Flavones as Dual Inhibitors of DNA Methyltransferases and Histone Methyltransferases // *PLOS ONE* / ed. Dahiya R. 2016. Vol. 11, № 9. P. e0162956.
11. Mikutis G. et al. Phenolic promiscuity in the cell nucleus – epigallocatechingallate (EGCG) and theaflavin-3,3'-digallate from green and black tea bind to model cell

- nuclear structures including histone proteins, double stranded DNA and telomeric quadruplex DNA // *Food Funct.* 2013. Vol. 4, № 2. P. 328–337.
12. Salem A.A. et al. Interaction of human telomeric G-quadruplex DNA with thymoquinone: A possible mechanism for thymoquinone anticancer effect // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 2015. Vol. 1850, № 2. P. 329–342.
 13. Kanakis C.D. et al. DNA Interaction with Naturally Occurring Antioxidant Flavonoids Quercetin, Kaempferol, and Delphinidin // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2005. Vol. 22, № 6. P. 719–724.
 14. Boege F. et al. Selected Novel Flavones Inhibit the DNA Binding or the DNA Religation Step of Eukaryotic Topoisomerase I // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 4. P. 2262–2270.
 15. Elliott J., Scarpello J.H.B., Morgan N.G. Effects of tyrosine kinase inhibitors on cell death induced by sodium fluoride and pertussis toxin in the pancreatic β -cell line, RINm5F // *Br. J. Pharmacol.* 2001. Vol. 132, № 1. P. 119–126.
 16. Ashley R.E., Osheroff N. Natural Products as Topoisomerase II Poisons: Effects of Thymoquinone on DNA Cleavage Mediated by Human Topoisomerase II α // *Chem. Res. Toxicol.* 2014. Vol. 27, № 5. P. 787–793.
 17. Selvi B R. et al. Sanguinarine Interacts with Chromatin, Modulates Epigenetic Modifications, and Transcription in the Context of Chromatin // *Chem. Biol.* 2009. Vol. 16, № 2. P. 203–216.
 18. Pang J. et al. Thymoquinone exerts potent growth-suppressive activity on leukemia through DNA hypermethylation reversal in leukemia cells // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 21. P. 34453–34467.
 19. Paredes-Gonzalez X. et al. Apigenin reactivates Nrf2 anti-oxidative stress signaling in mouse skin epidermal JB6 P + cells through epigenetics modifications // *AAPS J.* 2014. Vol. 16, № 4. P. 727–735.
 20. Nandakumar V., Vaid M., Katiyar S.K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells // *Carcinogenesis.* 2011. Vol. 32, № 4. P. 537–544.

21. Khan M.A. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells // *Oncol. Rep.* 2015. Vol. 33, № 4. P. 1976–1984.
22. Berger A. et al. Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases // *J. Nutr. Biochem.* 2013. Vol. 24, № 6. P. 977–985.
23. Attoub S. et al. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth *in vivo* // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2013. Vol. 27, № 5. P. 557–569.
24. Flores K. et al. The Nuclear Translocation of Mitogen-Activated Protein Kinases: Molecular Mechanisms and Use as Novel Therapeutic Target // *Neuroendocrinology.* 2019. Vol. 108, № 2. P. 121–131.
25. Shankar S., Marsh L., Srivastava R.K. EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHL1/FOXO3a and neuropilin // *Mol. Cell. Biochem.* 2013. Vol. 372, № 1–2. P. 83–94.
26. Koh Y.W. et al. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits HGF-induced progression in oral cavity cancer through suppression of HGF/c-Met // *J. Nutr. Biochem.* 2011. Vol. 22, № 11. P. 1074–1083.
27. Chen M.-C. et al. Inhibition of NF- κ B and metastasis in irinotecan (CPT-11)-resistant LoVo colon cancer cells by thymoquinone via JNK and p38: TQ Inhibits NF- κ B and Metastasis in CPT-11-R Cells Via JNK and p38 // *Environ. Toxicol.* 2017. Vol. 32, № 2. P. 669–678.
28. Weinberg R.A. *The biology of cancer.* N-Y. Garland Science, 2014, 2nd Ed, P. 960.
29. Xu M. et al. Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway // *Oncol. Lett.* 2016. Vol. 11, № 5. P. 3075–3080.
30. Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease // *J. Pathol.* 2008. Vol. 214, № 2. P. 149–160.

31. Lee S.-H. et al. Inhibitory effects of flavonoids on TNF- α -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells // *BMB Rep.* 2009. Vol. 42, № 5. P. 265–270.
32. Sarbassov D.D. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex // *Science.* 2005. Vol. 307, № 5712. P. 1098–1101.
33. Tong X., Pelling J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Axis by Apigenin for Cancer Prevention // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2013. Vol. 13, № 7. P. 971–978.
34. Li Y. et al. Targeting the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2012. Vol. 16, № 1. P. 49–66.
35. Tang A.-Q. et al. Apigenin inhibits the self-renewal capacity of human ovarian cancer SKOV3-derived sphere-forming cells // *Mol. Med. Rep.* 2015. Vol. 11, № 3. P. 2221–2226.
36. Hosoya T. et al. Naturally Occurring Small-Molecule Inhibitors of Hedgehog/GLI-Mediated Transcription // *ChemBioChem.* 2008. Vol. 9, № 7. P. 1082–1092.
37. Wang Z. et al. Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer.* 2010. Vol. 1806, № 2. P. 258–267.
38. Lee S.H. et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates head and neck cancer stem cell traits through suppression of Notch pathway // *Eur. J. Cancer.* 2013. Vol. 49, № 15. P. 3210–3218.
39. Brown D.T. Histone H1 and the dynamic regulation of chromatin function // *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 2003. Vol. 81, № 3. P. 221–227.
40. McGinty R.K., Tan S. Nucleosome Structure and Function // *Chem. Rev.* 2015. Vol. 115, № 6. P. 2255–2273.
41. Alva V. et al. On the origin of the histone fold // *BMC Struct. Biol.* 2007. Vol. 7, № 1. P. 17.
42. Kuzmichev A. et al. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3 // *Mol. Cell.* 2004. Vol. 14, № 2. P. 183–193.

43. Wintjens R., Rooman M. Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes // *J. Mol. Biol.* 1996. Vol. 262, № 2. P. 294–313.
44. Zhou B.-R. et al. Structural insights into the histone H1-nucleosome complex // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110, № 48. P. 19390–19395.
45. Lu X. et al. Chromatin Condensing Functions of the Linker Histone C-Terminal Domain Are Mediated by Specific Amino Acid Composition and Intrinsic Protein Disorder [†] // *Biochemistry.* 2009. Vol. 48, № 1. P. 164–172.
46. Marzluff W.F. et al. The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes // *Genomics.* 2002. Vol. 80, № 5. P. 487–498.
47. Lyubitelev A.V. et al. Structures And Functions Of Linker Histones // *Biochemistry.* 2016. Vol. 81, № 3. P. 329 – 338.
48. Clausell J. et al. Histone H1 Subtypes Differentially Modulate Chromatin Condensation without Preventing ATP-Dependent Remodeling by SWI/SNF or NURF // *PLoS ONE* / ed. Aramayo R. 2009. Vol. 4, № 10. P. e0007243.
59. Fan Y. et al. H1 Linker Histones Are Essential for Mouse Development and Affect Nucleosome Spacing In Vivo // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 23, № 13. P. 4559–4572.
50. Happel N., Doenecke D. Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function // *Gene.* 2009. Vol. 431, № 1–2. P. 1–12.
51. Cooper G.M. (2000) "Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle". *The cell: a molecular approach* (2nd ed.). Washington, D.C: ASM Press. ISBN 978-0-87893-106-4
52. Happel N. et al. H1 subtype expression during cell proliferation and growth arrest // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8, № 14. P. 2226–2232.
53. Wisniewski J.R. et al. Mass Spectrometric Mapping of Linker Histone H1 Variants Reveals Multiple Acetylations, Methylations, and Phosphorylation as Well as Differences between Cell Culture and Tissue // *Molecular And Cellular Proteomics.* 2007. Vol. 6, № 1. P. 72–87.

54. Leonova K. et al. TRAIN (Transcription of Repeats Activates INterferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells // eLife. 2018. Vol. 7. P. 26.
55. Safina A. et al. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells // Nucleic Acids Res. 2017. Vol. 45, No. 4 1925–1945.
56. Jin M.-Z. et al. Curaxin CBL0137 Exerts Anticancer Activity via Diverse Mechanisms // Front. Oncol. 2018. Vol. 8. P. 598.
57. Ma H.T., Poon R.Y.C. Synchronization of HeLa Cells // Cell Cycle Synchronization / ed. Banfalvi G. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. Vol. 761. P. 151–161.
58. Izquierdo-Bouldstridge A. et al. Histone H1 depletion triggers an interferon response in cancer cells via activation of heterochromatic repeats // Nucleic Acids Res. 2017. Vol. 45, № 20. P. 11622–11642.

6. Апробация результатов исследования

Результаты работы были опубликованы:

- 1) Власова О.А., Чернова И.А., Сафина А., Лесовая Е.А., Гурова К.В., Джордан А., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г. Влияние антиканцерогенных ДНК-тропных природных малых молекул на локализацию линкерного гистона H1 // Успехи молекулярной онкологии. 2019. Том 6, № 4 (приложение), стр. 76-77.
- 2) Власова О.А., Чернова И.А., Сафина А., Лесовая Е.А., Белицкий Г.А., Гурова К.В., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г. Влияние ДНК-тропных природных малых молекул на локализацию гистонового шаперона FACT // ACTA NATURAE. 2019. Том 1, спецвыпуск, стр. 67.
- 3) Vlasova O., Chernova I., Safina A., Lesovaya E., Belitsky G., Gurova K., Kirsanov K., Yakubovskaya M. FACT localization in cell nuclei under influence of minor groove binding ligands and natural DNA-binding polyphenols // 1st EMBO Workshop Histone Chaperones: Structure, Function and Role in Development and Disease (Crete, Greece, 06 – 10 October, 2019). P. 1.