

ВЛИЯНИЕ ГЕНИСТЕИНА НА СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМ И ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ С PARP1

© 2024 г. Т.В. Андреева*, А.В. Ефременко**, А.В. Феофанов*, **, А.В. Любителев*, А.Н. Коровина*, В.М. Студитский*, ***, Н.В. Малюченко*, #

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

**Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997, Россия

***Онкологический центр Фокса Чейза, Филадельфия, США

#E-mail: mal_nat@mail.ru

Поступила в редакцию 22.12.2023 г.

После доработки 22.12.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2024 г.

Полифенол растительного происхождения – генистеин – обладает высокой биологической активностью, что стимулирует изучение его применимости для профилактики и лечения опухолевых, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. С учетом способности генистеина связываться с ДНК в настоящей работе исследовано взаимодействие генистеина с нуклеосомами и комплексами нуклеосом с поли-(АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (PARP1). Установлено, что в широком диапазоне концентраций генистеин не влияет на структуру нуклеосомной ДНК, но при высокой концентрации вызывает изменение структуры линкерной ДНК, сближая спирали ДНК между собой. В хроматосомах генистеин не вызывает диссоциации линкерного гистона и изменений конформации в области линкерной ДНК. При высокой концентрации генистеин затрудняет образование комплексов нуклеосом с PARP1.

Ключевые слова: генистеин, хроматин, клетки A549, нуклеосома, PARP1, H1.0, H1.5, spFRET.

DOI: 10.31857/S0006302924030024, EDN: OGHMOC

Генистеин (рис. 1а) является вторичным метаболитом растений из группы изофлавонов [1]. Генистеин содержится во многих употребляемых в пищу продуктах растительного происхождения, наиболее им богаты соевые культуры [2]. Исследования показали, что генистеин проявляет высокую биологическую активность (рис. 1б), оказывая противовоспалительное [3–5], антиоксидантное [6–8], антиангиогенное и антипролиферативное [9–11] действие. Подобная активность генистеина благоприятна для профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма и развитием хронических воспалительных процессов. Продемонстрирована потенциальная эффективность генистеина в качестве противоопухолевого агента на клетках рака легких [12], молочной железы [13], предстательной железы [14], печени [15], репродуктивных женских органов [11], почек [16], мо-

чевого пузыря [17] и ЖКТ [18]. В основе противоопухолевого действия генистеина лежит способность модулировать множественные сигнальные пути в клетке, приводящие к онкотрансформации [17, 19, 20], регулировать клеточный цикл, ингибировать матриксные металлопротеиназы [21], индуцировать апоптоз [12, 22], блокировать и обращать эпителиально-мезенхимальный переход [15, 18], препятствовать про-опухолевым изменениям эпигенетического ландшафта клетки [23]. Исследования показали потенциальное терапевтическое действие генистеина при сердечно-сосудистых заболеваниях [24]. Молекулярная структура генистеина сходна со стероидным гормоном позвоночных эстрадиолом, что определяет гормоноподобную активность генистеина [5].

Для эффективного использования генистеина в медицине необходимо улучшить его биодоступность [25, 26] и доказать безопасность его применения [27]. Одним из важных показателей токсикологической безопасности лекарств является оценка их ДНК-тропного потенциала. Показано, что генистеин способен взаимодействовать с

Сокращения: Hoechst 33342 – флуоресцентный краситель бисбензимидазол, ДМСО – диметилсульфоксид, EGCG – галлат эпигаллокатехина.

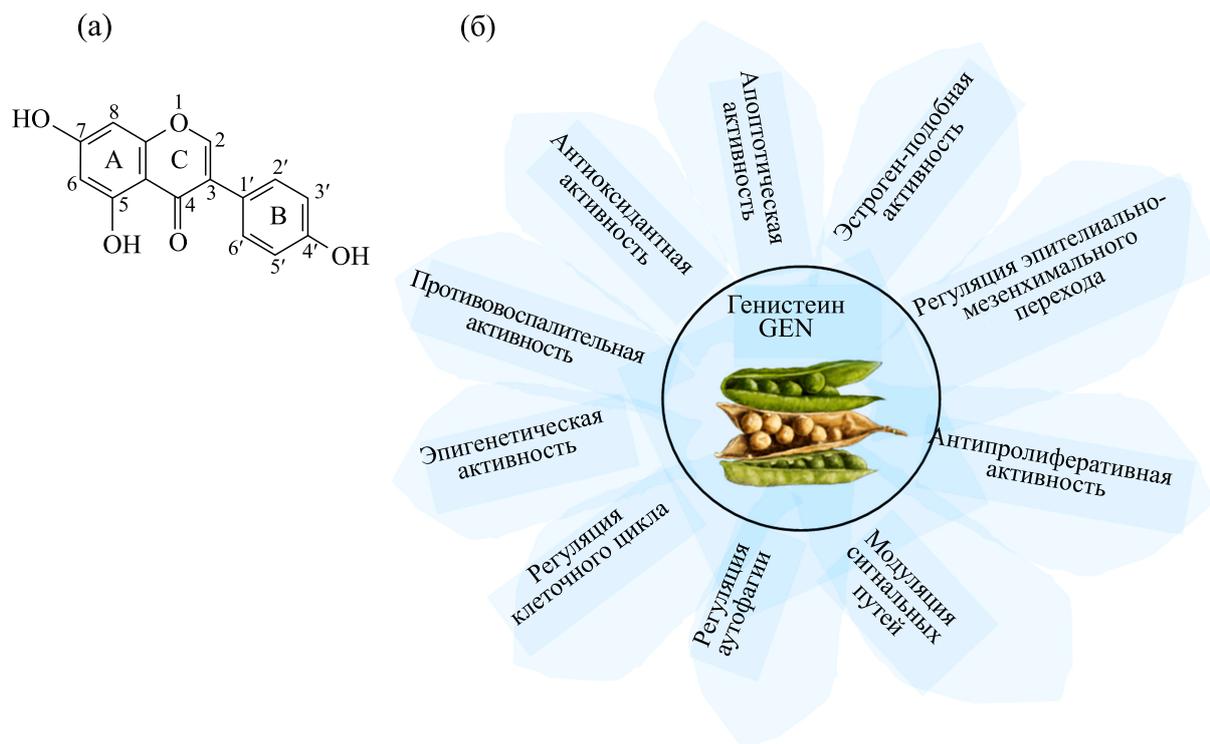


Рис. 1. Структура (а) и виды биологической активности (б) генистеина.

ДНК [28, 29]. Из экспериментов по конкурентному связыванию с ДНК флуоресцирующих интеркаляторов и генистеина следует, что генистеин эффективно взаимодействует с ДНК при концентрациях около 100 мкМ [28], а измеренная константа диссоциации комплекса ДНК-генистеин равна 50 мкМ [29]. Поскольку ДНК упакована в ядре клетки на нуклеосомах и хроматосомах и функционирует в составе хроматина, важно оценить воздействие генистеина на данные морфофункциональные единицы хроматина.

С целью изучения влияния генистеина на структуру хроматина исследована способность генистеина проникать в ядро клеток, а также проведена оценка взаимодействия генистеина с нуклеосомами и хроматосомами, изучено влияние генистеина на взаимодействие и активацию ядерного фермента системы распознавания повреждений и репарации ДНК поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1). Было установлено, что генистеин не влияет на структуру нуклеосом в коровой области, но при этом в высокой концентрации способен сближать линкерные участки ДНК между собой. При высокой концентрации генистеин затрудняет образование комплексов нуклеосом с PARP1, но не вызывает диссоциации линкерного гистона H1.0.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки аденокарциномы человека A549 выращивали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone defined (GE Healthcare LifeSciences, США) и 2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия). Пересевы клеток проводили 2 раза в неделю. Клетки высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (плотность посева – $2 \cdot 10^4$ клеток/луночка) и выращивали сутки при 37°C и 5% CO_2 . Клетки инкубировали с 2 мкМ проникающего в клетки флуоресцентного красителя бисбензимида (Hoechst 33342) в течение 2 ч, добавляли генистеин в диапазоне концентраций 25.0–0.8 мкМ с двойным шагом разведения и инкубировали еще в течение 4 ч. Генистеин из стокового раствора (62.9 мМ в диметилсульфоксиде (ДМСО)) добавляли к клеткам через промежуточное разбавление в ДМСО до 2.5–0.08 мМ. Конечная концентрация ДМСО в лунках с клетками составляла 1%. В качестве контроля использовали клетки, проинкубированные только с 2 мкМ Hoechst 33342 и 1% ДМСО, а также клетки, проинкубированные только с генистеином (25.0–0.8 мкМ), чтобы учесть возможную собственную флуоресценцию полифенола. Изображения клеток в проходящем белом свете и флуоресцентные изображения регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа ZOE Fluorescent Cel-

Imager (Bio-Rad, Singapore). Флуоресценцию Hoechst 33342 возбуждали в диапазоне длин волн 335–375 нм, регистрировали в диапазоне 415–451 нм. Флуоресцентные изображения клеток анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institute of Health, США) с использованием плагина “Analyze particles”. Размер выборки 400–600 клеток. Эксперименты выполнены в трех независимых повторах.

Флуоресцентно-меченые ДНК-матрицы длиной 187 п.н. получали методом ПЦР с использованием плазмиды pTZ57R, содержащей нуклеосом-позиционирующую последовательность 603 [30]. Для амплификации использовали синтетические олигонуклеотиды, меченные флуорофорами Cy3 и Cy5 (ООО «Люмипроб РУС», Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров для синтеза матриц ДНК, меченных Cy3 и Cy5 по тиминам в положениях 13 и 91 п.н., 35 и 112 п.н. или 57 и 135 п.н. от начала последовательности 603, были опубликованы ранее [31, 32]. Для получения матрицы ДНК длиной 227 п.н., меченной в линкерных участках ДНК на расстоянии 10 п.н. от начала и конца нуклеосом-позиционирующей последовательности, использовали праймеры, опубликованные в работе [32]. Сборку нуклеосом с использованием октамера гистонов человека проводили методом ступенчатого диализа с понижающейся ионной силой по методике, опубликованной ранее [33]. Рекомбинантные гистоны человека H2A, H2B, H3 и H4, линкерные гистоны H1.0 лягушки и H1.5 человека, а также PARP1 человека получали, как описано ранее [34].

Исследование нуклеосом и их комплексов с генистеином проводили методом микроскопии одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (микроскопии spFRET) с использованием подхода, описанного в статье [32]. Концентрированный раствор генистеина (Sigma, США) готовили в 25% растворе ДМСО. Нуклеосомы (1–2 нМ) инкубировали с генистеином в различных концентрациях (48–400 мкМ, концентрация ДМСО не более 1%) в течение 20 мин в пробирках с низкой адгезией в буфере TB150 (20 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 5 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl, 1 мМ β-меркаптоэтанола) при комнатной температуре. Ранее методом spFRET-микроскопии было показано, что ДМСО в концентрации менее 2% не оказывает влияние на структуру нуклеосом [34].

В экспериментах с хроматосомами нуклеосомы (1–2 нМ) инкубировали с гистонами H1.0 (15 нМ) или H1.5 (7.6 нМ) в буфере TB150 в течение 15 мин при комнатной температуре, делили раствор на две части и одну из них инкубировали с генистеином (100 мкМ) в течение 20 мин. В экспериментах с PARP1 нуклеосомы (1–2 нМ) инку-

бировали с генистеином в различных концентрациях (100, 200, 400 мкМ) в буфере TB150 при комнатной температуре в течение 20 мин, вносили PARP1 (20 или 40 нМ) и инкубировали еще 30 мин при комнатной температуре. Для оценки влияния генистеина на каталитическую активность PARP1 пробы готовили следующим образом: нуклеосомы (1–2 нМ) инкубировали с полифенолом в различных концентрациях (100, 200, 400 мкМ) в буфере TB150 при комнатной температуре в течение 20 мин, вносили PARP1 (40 нМ) вместе с β-никотинамидадениндинуклеотидом (NAD⁺, 20 мкМ, Sigma, США) и инкубировали еще 45 мин при комнатной температуре.

Образцы переносили в лунки силиконовой кюветы (Ibidi, Германия), прикрепленной к покровному стеклу (Assistent, Германия), и проводили измерения на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM710 с модулем Confoc3 для корреляционной спектроскопии (Zeiss, Германия). Концентрация нуклеосом в растворе (1–2 нМ) была подобрана так, чтобы в фокусе лазера находилось не более одной свободно диффундирующей нуклеосомы. Во время диффузии нуклеосом (<6 мс) через фокус лазера флуоресценцию возбуждали при длине волны 514.5 нм, а регистрировали с помощью лавинных фотодиодов в диапазонах длин волн 530–635 нм (флуоресценция Cy3) и 635–800 нм (флуоресценция Cy5). Измеренные интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5 использовали для расчета коэффициента близости E , как описано ранее [35]. Коэффициент E — это величина эффективности FRET без коррекции на квантовые выходы флуоресцентных меток и на чувствительность системы детекции в разных диапазонах длин волн. Выборки значений E измеренных частиц (не менее 3000 частиц) представляли в виде частотных распределений, или E -профилей. Измерения выполняли не менее, чем в трех независимых экспериментах, а рассчитанные E -профили усредняли и аппроксимировали линейной суперпозицией нескольких гауссовых распределений, описывающих отличающиеся по структуре субпопуляции нуклеосом.

Оценку влияния генистеина на связывание и активность PARP1 проводили методами анализа электрофоретической подвижности нуклеосом и их комплексов в геле при неденатурирующих условиях и с помощью вестерн-блоттинга. Образцы для исследований готовили так же, как и для spFRET-микроскопии. Электрофорез в 5% полиакриламидном геле проводили при 100 В в буфере 0.2×TBE, содержащем 3.6 мМ Трис (рН 7.5), 3.6 мМ борной кислоты и 0.08 мМ ЭДТА, в течение 1.0–1.2 ч при 4°C. Гель до внесения проб подвергали префорезу. Флуоресцентный анализ гелей проводили с помощью лазерного сканера Typhoon RGB (Amersham, США) при

длине волны возбуждения 532 нм по флуоресценции метки Су3.

Пробы для вестерн-блоттинга нагревали до 95°C в течение 5–10 мин с добавлением буфера для нанесения (5× буфер: 312 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 10% додецилсульфата натрия, 25% β-меркаптоэтанола, 0.05% бромфенолового синего). Пробы наносили на градиентный гель (4–12%, Mini-protean gelsTGX, Bio-Rad, США) и проводили электрофорез в трис-глициновом буфере (25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицина и 0.1% додецилсульфата натрия, рН 8.6) при 130 В в течение 1 ч при комнатной температуре. Перенос белка на подложку из нитроцеллюлозной мембраны (Bio-Rad) осуществляли в буфере для переноса (50 мМ MOPS, 50 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 3.5 мМ додецилсульфата натрия) с 20% этанолом при 4°C (350 мА, 2 ч). Далее мембрану инкубировали в течение часа в растворе PBS-T (2,7 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 37 мМ NaCl, 0,5% Твин 20), дополненном 5% обезжиренным молоком, и промывали дважды раствором PBS-T по 5 мин. Затем мембрану инкубировали с мышинными моноклональными антителами против полиАДФ-рибозы (10Н, ab14459, Abcam, США) в течение 1 ч в растворе PBS-T, содержащем 5% молока, промывали, инкубировали 1 ч со вторичными анти-мышинными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad, Hercules, США), и снова промывали. Иммунодетекцию проводили с использованием системы Chemidoc (Bio-Rad, США) и хемилюминесцентного субстрата SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, США) в течение 3 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Взаимодействие генистеина с ДНК изучали *in vitro* [28, 29], однако его способность проникать в клетки и накапливаться в клеточном ядре мало изучена. Ранее нами был предложен новый подход к изучению проникновения ДНК-тропных нефлуоресцирующих и слабо флуоресцирующих соединений в ядра клеток, основанный на исследовании влияния данных соединений на флуоресценцию красителя Hoechst 33342, появляющуюся при образовании им комплексов с ДНК в живых клетках [34]. Инкубация с генистеином клеток A549, ДНК в которых предварительно была окрашена красителем Hoechst 33342, выявила концентрационно-зависимое усиление флуоресценции Hoechst 33342 в ядрах (рис. 2). Этот результат позволяет заключить, что генистеин, добавленный к клеткам в суб- и микромолярных концентрациях, способен эффективно проникать через интактную плазматическую мембрану и накапливаться в клеточном ядре, обеспечивая

тем самым возможность взаимодействия с хроматином.

Поскольку значительная часть ДНК существует в ядре в виде нуклеосом, было изучено влияние генистеина на структуру нуклеосом и комплексов нуклеосом с ядерными белками. С этой целью были получены несколько видов нуклеосом, отличающихся положением пары флуоресцентных меток (донора и акцептора): в коровой области вблизи границ нуклеосомы (нуклеосомы 2LN_P и 2LN_D с метками соответственно в положениях +13/+91 и +57/+135 п.н.), в коровой области, отдаленной от границы нуклеосомы (нуклеосомы 2LN_M с метками в положениях +35/+112 п.н.) (рис. 3а), и в линкерных участках ДНК (нуклеосомы 2LN_O с метками на расстоянии 10 п.н. от границы нуклеосомы) (рис. 4а). Различные положения меток позволяют изучать структурные изменения, вызываемые полифенолами в различных областях нуклеосомы по изменениям в профилях распределения частиц по величине E [34].

Методом *sp*FRET-микроскопии была изучена концентрационная зависимость влияния генистеина на структуру нуклеосом. E -профили всех вариантов нуклеосом, меченных в коровой области, характеризуются пиком в области высоких значений E (рис. 3б–г), характерным для нуклеосом с нативной укладкой супервитков нуклеосомной ДНК на октамере гистон. Инкубация нуклеосом с генистеином в концентрации 48–400 мкМ не приводит к существенному изменению E -профилей: на рис. 3б–г представлены E -профили, измеренные при максимальной исследованной концентрации генистеина — 400 мкМ. Это свидетельствует об отсутствии изменений в структуре нуклеосомной ДНК, вызванных взаимодействием с генистеином.

В то же время генистеин влияет на конформацию линкерных участков ДНК при концентрациях выше 100 мкМ (рис. 4). В согласии с ранее опубликованными данными [36] для нуклеосом характерны по меньшей мере две конформации линкеров, отличающиеся расстоянием между спиралями ДНК (рис. 4в), которым в E -профилях соответствуют два пика в области низких и средних значений E (рис. 4б). Генистеин вызывает изменение структуры линкерной ДНК, сближая спирали ДНК между собой, и переводит большую часть нуклеосом в конформационное состояние, при котором величина E значительно возрастает (рис. 4б). По данным электрофореза образование комплексов нуклеосом с генистеином и структурные изменения в области линкерной ДНК практически не влияют на подвижность нуклеосом в геле (рис. 4в).

Как показано ранее, увеличение величины E , вызванное сближением спиралей линкерной ДНК, характерно для образования хроматосом с

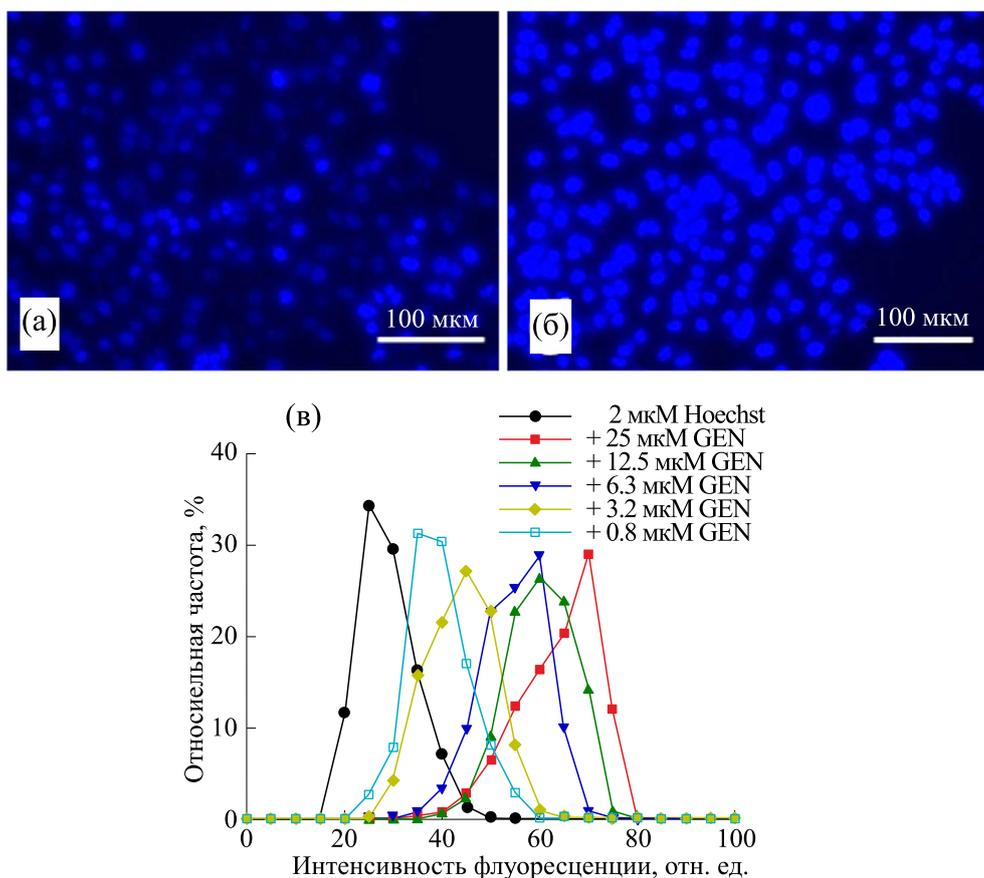


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции Hoechst 33342 в ядрах клеток A549 после инкубации клеток с различными концентрациями генистеина (GEN). (а) и (б) – Флуоресцентные изображения клеток, проинкубированных с 2 мкМ Hoechst 33342 в отсутствие и в присутствии 25 мкМ генистеина соответственно. Масштаб – 100 мкм. (в) – Частотные распределения клеток по интенсивности флуоресценции Hoechst 33342. Клетки инкубировали с 2 мкМ Hoechst 33342 в отсутствие генистеина или в присутствии его различных концентраций. Согласно контрольным экспериментам, собственная флуоресценция генистеина вклада в измеряемую интенсивность флуоресценции Hoechst 33342 не дает.

участием линкерного гистона [34, 36]. Известно, что в результате связывания линкерного гистона в области диадной оси нуклеосом происходит конденсация полинуклеосом в структуры более высокого порядка, а линкерные участки нуклеосом становятся недоступны для коммуникации с другими регуляторными элементами хроматина [37, 38]. Нами исследовано влияние генистеина на структуру хроматосом, образованных гистонами H1.0 и H1.5 (рис. 46). По данным spFRET-микроскопии, гистоны H1.0 и H1.5 формируют хроматосомы, отличающиеся по конформации линкерной ДНК, на что указывают отличия по величине *E*-пиков хроматосом в *E*-профилях (рис. 46). Судя по величине *E*, гистон H1.5 сближает спирали линкерной ДНК в области расположения меток так же, как и генистеин, и превосходит по этому параметру гистон H1.0. Генистеин в концентрации 100 мкМ не влияет на *E*-профили обоих типов хроматосом (рис. 46). Из этого следу-

ет, что генистеин не вызывает диссоциации линкерного гистона H1.0 и изменений конформации в области линкерной ДНК в H1.0-хроматосом. Воздействие генистеина, по-видимому, имеет аналогичный характер и в случае H1.5-хроматосом, но из-за совпадения *E*-профилей данных хроматосом и комплексов нуклеосом с генистеином сделать однозначный вывод сложно.

Взаимодействие генистеина с ДНК в хроматине, по-видимому, лежит в основе обнаруженного ранее ингибирования этим полифенолом ДНК топоизомеразы II [39]. Аналогично можно ожидать, что генистеин способен оказывать влияние на функциональную активность и других ДНК-зависимых ферментов. Для проверки этой гипотезы исследовано влияние генистеина на комплексы нуклеосом с ферментом PARP1 – сенсором разрывов ДНК, инициирующим сборку комплекса репарации повреждений ДНК.

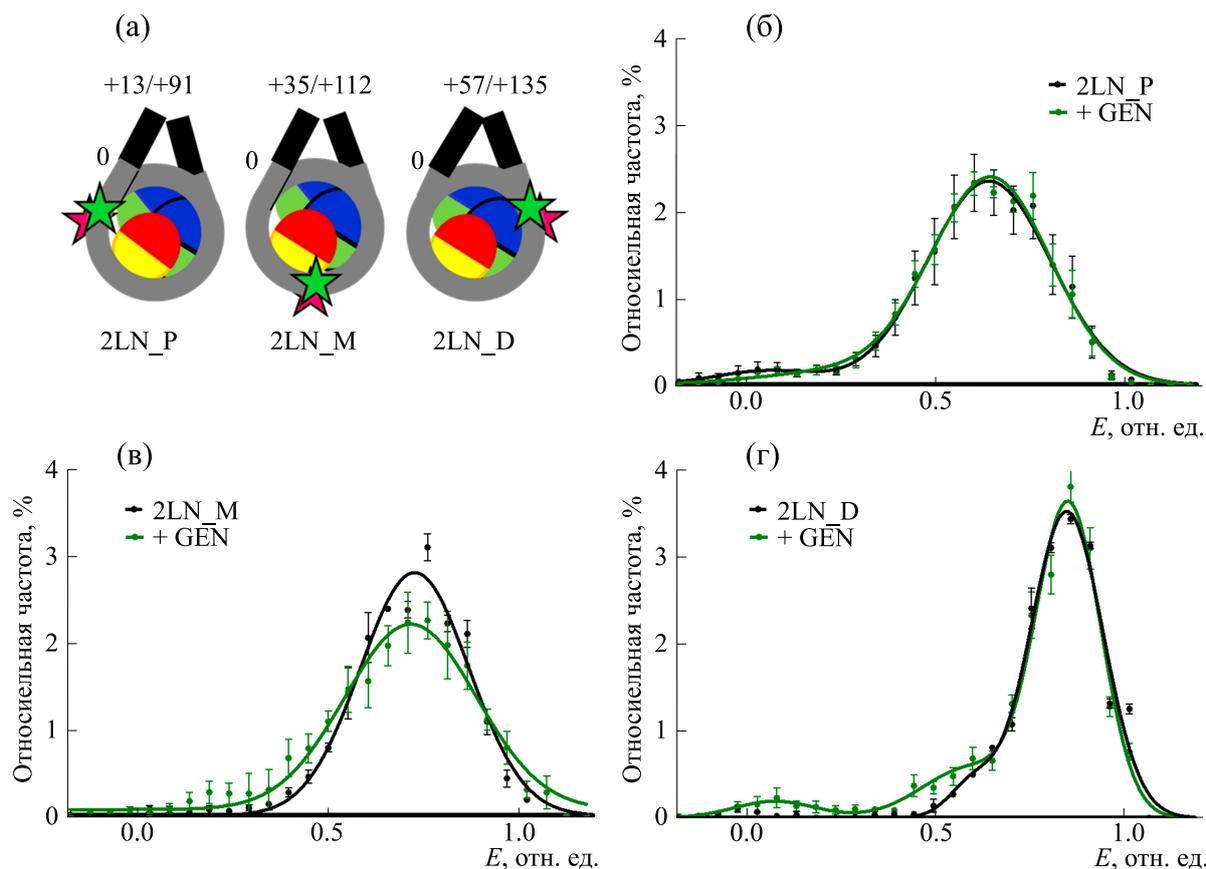


Рис. 3. Влияние генистеина (GEN) на структуру коровой области нуклеосом. (а) – Схемы нуклеосом 2LN_P, 2LN_M и 2LN_D, отличающихся положением флуоресцентных меток (звездочки) в коровой области. (б)–(г) – E -профили нуклеосом 2LN_P, 2LN_M и 2LN_D соответственно до и после инкубации с 400 мкМ генистеина.

Ранее было показано, что при образовании комплексов PARP1 реорганизует структуру нуклеосомы, увеличивая расстояние между соседними супервитками ДНК на октамере гистонов, что детектируется как концентрационно-зависимое появление субпопуляции нуклеосом, которой в E -профиле соответствует пик с максимумом в области значений $E \sim 0.35\text{--}0.45$ [40]. В согласии с этим результатом в настоящей работе PARP1 вызывал сходные изменения в E -профилях нуклеосом, связывая при концентрации 20 нМ часть нуклеосом (рис. 5 а), а при 40 нМ – все нуклеосомы (рис. 5 б). Концентрационно-зависимое образование комплексов нуклеосом с PARP1 подтверждают и данные электрофореза в нативных условиях (рис. 5 в). Электрофореграмма свидетельствует, что PARP1 образует несколько типов комплексов с нуклеосомой (рис. 5 в), которые, согласно результатам работы [40], отличаются числом связанных молекул PARP1.

Методом spFRET-микроскопии установлено, что генистеин при концентрации 100 и 200 мкМ не оказывает существенного влияния на образо-

вание и структуру комплексов нуклеосом с 20 нМ PARP1, а при концентрации генистеина 400 мкМ он вызывает заметные изменения в E -профиле комплексов (рис. 5а). Изменения в E -профиле включают в себя уменьшение интенсивности пика в области значений E 0.35–0.60 и появление нового пика с максимумом $E = 0.8$. Аналогичные изменения в E -профиле наблюдали при концентрациях генистеина и PARP1, соответственно 400 мкМ и 40 нМ (рис. 5б). С учетом опубликованных ранее данных [40] и данных электрофореза (рис. 5в) эти изменения можно интерпретировать как снижение в присутствии высокой концентрации генистеина доли комплексов нуклеосом, связанных с несколькими молекулами PARP1. На это указывают уменьшение пика с максимумом в области $E \sim 0.45$ (рис. 5а,б) и характерные изменения в электрофореграмме (рис. 5в). Одновременно в растворе увеличивается доля свободных нуклеосом, на что указывает данные электрофореза при 40 нМ PARP1 в присутствии 200 или 400 мкМ генистеина (рис. 5в), при частичном сохранении образования комплексов нуклеосом с одной молекулой PARP1 (рис. 5а–в),

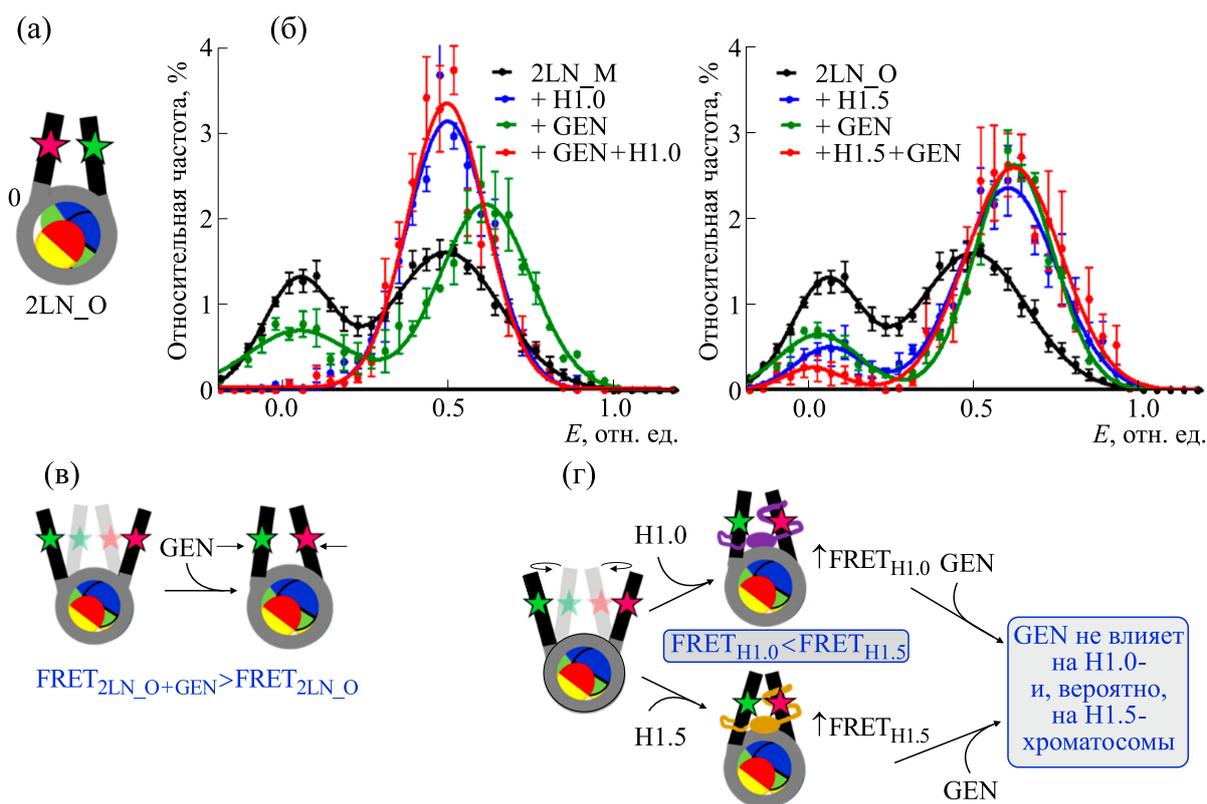


Рис. 4. Влияние генистеина (GEN) на структуру нуклеосом и хроматосом в области линкерной ДНК. (а) – Схема нуклеосом 2LN_O, меченных в области линкерной ДНК. Положения флуоресцентных меток показаны звездочками. (б) – *E*-профили нуклеосом, H1.0-хроматосом (слева) и H1.5-хроматосом (справа) до и после инкубации с генистеином (100 мкМ). (в) – Схема, поясняющая влияние генистеина на структуру нуклеосом в области линкерной ДНК. (г) – Схема, поясняющая структурные изменения в области линкерной ДНК при образовании H1.0- и H1.5-хроматосом и отсутствие влияния генистеина на эти хроматосомы.

для которых в *E*-профилях характерен пик с максимумом $E \sim 0.8$ [40]. Таким образом, генистеин при высокой концентрации затрудняет образование комплексов нуклеосом с PARP1.

Образование комплексов с нуклеосомной ДНК активирует PARP1 и в присутствии NAD^+ ведет к поли-АДФ-рибозилированию гистонов и самого PARP1 [40]. Увеличение числа и длины цепочек поли-АДФ-рибозы, прикрепленных к ферменту, способствует диссоциации PARP1 и восстановлению исходной структуры нуклеосом, собранных на донорном хроматине из эритроцитов кур [40]. Аналогично в случае нуклеосом, собранных на октамере рекомбинантных гистонов человека, NAD^+ -зависимое авто-поли-АДФ-рибозилирование PARP1 приводит к увеличению доли свободных нуклеосом (рис. 5в) и появлению в *E*-профиле пика с максимумом в области 0.70–0.75, который свидетельствует о восстановлении исходной структуры у части нуклеосом после диссоциации PARP1 (рис. 5б). При этом в области низких значений *E* наблюдается пик, кото-

рый указывает на то, что часть нуклеосом в процессе поли-АДФ-рибозилирования подвергается структурным перестройкам, приводящим к значительному увеличению расстояния между супервитками нуклеосомной ДНК в области расположения меток, возможно, откручиванию нуклеосомной ДНК от октамера гистонов. Эти структурные изменения обнаружены для нуклеосом, собранных на рекомбинантных гистонах человека (рис. 5б), и не наблюдались для нуклеосом, собранных на донорном хроматине из эритроцитов кур [40]. Возможно, отсутствие пострепликационных модификаций в рекомбинантных гистонах способствовало более эффективному поли-АДФ-рибозилированию по некоторым сайтам гистонов, что в итоге вызвало реорганизацию структуры ограниченной субпопуляции нуклеосом.

В случае внесения NAD^+ в раствор с комплексами «генистеин–нуклеосома–PARP1» *E*-профиль меняется незначительно, а эффективность образования длинных поли-АДФ-рибозных цепей, как показывают данные вестерн-блоттинга,

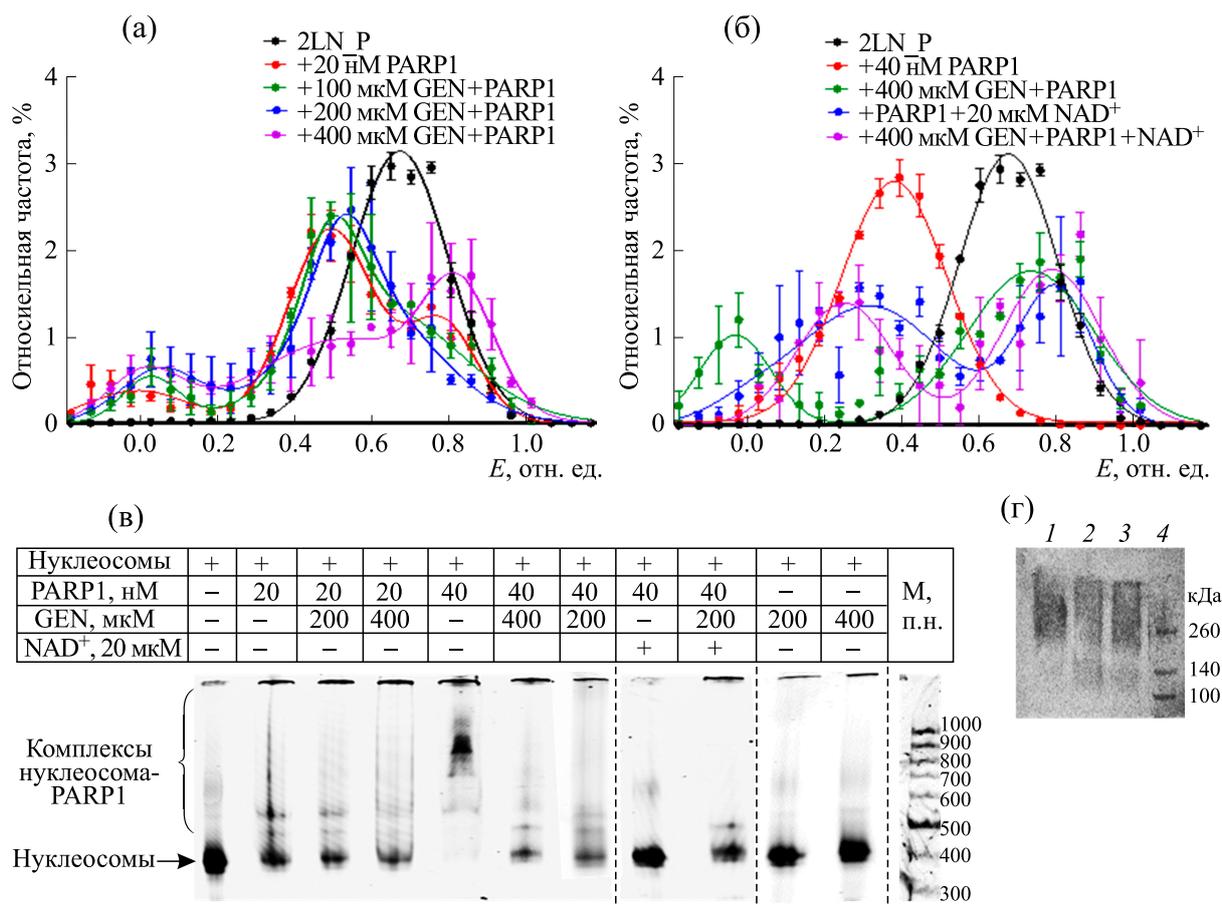


Рис. 5. Изучение влияния генистеина (GEN) на образование и структуру комплексов «PARP1–нуклеосома» и на способность PARP1 к поли-АДФ-рибозилированию. (а) – *E*-профили нуклеосом и комплексов нуклеосом с PARP1 (20 нМ) до и после инкубации с генистеином (100, 200 и 400 мкМ). (б) – *E*-профили нуклеосом и комплексов нуклеосом с PARP1 (40 нМ) до и после инкубации с 400 мкМ генистеина и/или 20 мкМ NAD⁺. (в) – Анализ электрофоретической подвижности комплексов нуклеосом с PARP1 до и после инкубации с генистеином и/или 20 мкМ NAD⁺. (г) – Вестерн-блот с использованием антител 10Н на поли-АДФ-рибозу для комплексов нуклеосома-PARP1 в присутствии NAD⁺ до и после инкубации с генистеином: дорожка 1 – нуклеосомы + PARP1 + NAD⁺, дорожка 2 – нуклеосомы + 400 мкМ генистеина + PARP1 + NAD⁺, дорожка 3 – нуклеосомы + 200 мкМ генистеина + PARP1 + NAD⁺, дорожка 4 – белковые маркеры.

снижается по сравнению с комплексами «нуклеосома–PARP1» в отсутствие генистеина (рис. 5г). Отметим, что образование полимеров поли-АДФ-рибозы изучали с помощью моноклональных антител 10Н, которые связываются с полимерами длиной более 10 остатков АДФ-рибозы [41]. Одна из возможных причин снижения эффективности поли-АДФ-рибозилирования в присутствии генистеина – частичное ингибирование образования комплексов PARP1 с нуклеосомами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Генистеин является представителем большой группы биологически активных полифенолов, способных взаимодействовать с ДНК. Проводимые нами исследования [34, 42–44] показывают,

что полифенолы могут значительно отличаться по воздействию на хроматин. Так, полифенолы кверцетин и галлат эпигаллокатехина (EGCG) при микромолярных концентрациях вызывают обратимое откручивание нуклеосомной ДНК от октамера гистонов, не вызывая при этом диссоциацию нуклеосом. Основным типом взаимодействия кверцетина и EGCG с ДНК является их интеркаляция между парами оснований [45–48].

По воздействию на структуру нуклеосом генистеин похож на полифенол ресвератрол, который также не влияет на структуру коровой области нуклеосом, но сближает спирали линкерной ДНК [42]. Известно, что ресвератрол связывается в узкой бороздке ДНК [49–51]. Генистеин отличается по воздействию на хроматосомы от EGCG, который вызывает значительные изменения в

структуре хроматосом в линкерной области ДНК при микромолярных концентрациях, но также не приводит к диссоциации линкерных гистонов [34].

Полученные данные позволяют предположить, что тип взаимодействия полифенола с ДНК может определять характер его воздействия на хроматин. Полифенолы-интеркаляторы, по-видимому, способны реорганизовывать структуру нуклеосом и хроматосом в хроматине, а полифенолы, связывающиеся в узкой бороздке ДНК, на структуру нуклеосом и хроматосом влияют слабо. В то же время оба типа полифенолов вследствие взаимодействия с ДНК могут модулировать функциональную активность ядерных белков, связывающихся с ДНК. Например, EGCG, не мешая связыванию PARP1 с нуклеосомами, подавляет поли-АДФ-рибозилирование соседних белков [52], но не влияет на поли-АДФ-рибозилирование самого PARP1 [34]. Исследованный нами генистеин может ослаблять взаимодействие PARP1 с ДНК, тем самым затрудняя распознавание повреждений ДНК этим ферментом и их последующую репарацию. Возможно, что воздействие генистеина на раковые клетки, при котором наблюдается образование разрывов ДНК, отчасти вызвано этим свойством полифенола и является одной из причин генистеин-индуцированного апоптоза [12, 22].

Полученные данные свидетельствуют, что отличия биологически активных полифенолов по структуре могут разнонаправленно изменять характер их взаимодействия с хроматином и ядерными белками, что предопределяет необходимость детальных исследований даже очень близких по структуре полифенолов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dixon R. A. and Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry*, **60**, 205–211 (2002). DOI: 10.1016/s0031-9422(02)00116-4
- Liggins J., Bluck L. J., Runswick S., Atkinson C., Coward W. A., and Bingham S. A. Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br. J. Nutr.*, **84**, 717–725 (2000).
- Ji G., Yang Q., Hao J., Guo L., Chen X., Hu J., Leng L., and Jiang Z. Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms. *Int. Immunopharmacol.*, **11** (6), 762–768 (2011). DOI: 10.1016/j.intimp.2011.01.036
- Jeong J. W., Lee H. H., Han M. H., Kim G. Y., Kim W. J., and Choi Y. H. Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Chemico-Biological Interactions*. **212**, 30–39 (2014). DOI: 10.1016/j.cbi.2014.01.012
- Mukund V., Mukund D., Sharma V., Mannarapu M., and Alam A. Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **119**, 13–22 (2017). DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.09.004
- Yoon G. A. and Park S. Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats. *Nutr. Res. Pract.*, **8**, 618–624 (2014). DOI: 10.4162/nrp.2014.8.6.618
- Mirahmadi S. M., Shahmohammadi A., Rousta A. M., Azadi M. R., Fahanik-Babaei J., Baluchnejadmojarad T., and Roghani M. Soy isoflavone genistein attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairments in the rat via exerting anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Cytokine*, **104**, 151–159 (2018). DOI: 10.1016/j.cyto.2017.10.008
- Rajaei S., Alihemmati Ph. D. A., and Abedelahi Ph. D. A. Antioxidant effect of genistein on ovarian tissue morphology, oxidant and antioxidant activity in rats with induced polycystic ovary syndrome. *Int. J. Reprod. Biomed.*, **17** (1), 11–22 (2019). DOI: 10.18502/ijrm.v17i1.3816
- Yu X., Zhu J., Mi M., Chen W., Pan Q., and Wei M. Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Med. Oncol.*, **29** (1), 349–357 (2012). DOI: 10.1007/s12032-010-9770-2
- Chen X., Wu Y., Gu J., Liang P., Shen M., Xi J., and Qin J. Anti-invasive effect and pharmacological mechanism of genistein against colorectal cancer. *BioFactors*, **46**, 620–628 (2020). DOI: 10.1002/biof.1627
- Chen T., Wang J., Li M., Wu Q., and Cui S. Genistein Inhibits proliferation and metastasis in human cervical cancer cells through the focal adhesion kinase signaling pathway: a network pharmacology-based in vitro study in hela cells. *Molecules*, **28** (4), 1919 (2023). DOI: 10.3390/molecules28041919
- Xu H., Ma H., Zha L., Li Q., Pan H., and Zhang L. Genistein promotes apoptosis of lung cancer cells through the IMPDH2/AKT1 pathway. *Am. J. Transl. Res.*, **14**, 7040–7051 (2022).

13. Malik P., Singh R., Kumar M., Malik A., and Mukherjee T. K. Understanding the phytoestrogen genistein actions on breast cancer: Insights on estrogen receptor equivalence, pleiotropic essence and emerging paradigms in bioavailability modulation. *Curr. Top. Med. Chem.*, **23** (3), 1395–1413 (2023). DOI: 10.2174/1568026623666230103163023
14. Yu X., Yan J., Li Y., Cheng J., Zheng L., Fu T., and Zhu Y. Inhibition of castration-resistant prostate cancer growth by genistein through suppression of AKR1C3. *Food Nutr. Res.*, **67** (2023). DOI: 10.29219/fnr.v67.9024
15. Yang X., Jiang W., Kong X., Zhou X., Zhu D., and Kong L. Genistein Restricts the epithelial mesenchymal transformation (emt) and stemness of hepatocellular carcinoma via upregulating miR-1275 to inhibit the EIF5A2/PI3K/Akt pathway. *Biology*, **11** (2022).
16. Ji Z., Huo C., and Yang P. Genistein inhibited the proliferation of kidney cancer cells via CDKN2a hypomethylation: role of abnormal apoptosis. *Int. Urol. Nephrol.*, **52** (6), 1049–1055 (2020). DOI: 10.1007/s11255-019-02372-2
17. Park C., Cha H. J., Lee H., Hwang-Bo H., Ji S. Y., Kim M. Y., Hong S. H., Jeong J. W., Han M. H., Choi S. H., Jin C. Y., Kim G. Y., and Choi Y. H. Induction of G2/M cell cycle arrest and apoptosis by genistein in human bladder cancer T24 cells through inhibition of the ROS-dependent PI3k/Akt signal transduction pathway. *Antioxidants*, **8**, 327 (2019). DOI: 10.3390/antiox8090327
18. Kozak J., Forma A., Czezelewski M., Kozyra P., Sitarz E., Radzikowska-Buchner E., Sitarz M., and Baj J. Inhibition or Reversal of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer: Pharmacological Approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (1), 277 (2020). DOI: 10.3390/ijms22010277
19. Zhang H., Liu G., Zeng X., Wu Y., Yang C., Mei L., Wang Z., and Huang L. Fabrication of genistein-loaded biodegradable TPGS-b-PCL nanoparticles for improved therapeutic effects in cervical cancer cells. *Int. J. Nanomedicine*, **10**, 2461–2473 (2015). DOI: 10.2147/IJN.S78988
20. Gao J., Xia R., Chen J., Gao J., Luo X., Ke C., Ren C., Li J., and Mi Y. Inhibition of esophageal-carcinoma cell proliferation by genistein via suppression of JAK1/2-STAT3 and AKT/MDM2/p53 signaling pathways. *Aging (Albany NY)*, **12** (7), 6240–6259 (2020). DOI: 10.18632/aging.103019
21. Xu L. and Bergan R. C. Genistein inhibits matrix metalloproteinase type 2 activation and prostate cancer cell invasion by blocking the transforming growth factor β -mediated activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-27-kDa heat shock protein pathway. *Mol. Pharmacol.*, **70** (3), 869–877 (2006). DOI: 10.1124/mol.106.023861
22. Joshi H., Gupta D. S., Abjani N. K., Kaur G., Mohan C. D., Kaur J., Aggarwal D., Rani I., Ramniwas S., Abdulabbas H. S., Gupta M., and Tuli H. S. Genistein: a promising modulator of apoptosis and survival signaling in cancer. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **396**, 2893–2910 (2023). DOI: 10.1007/s00210-023-02550-1
23. Sundaram M. K., Ansari M. Z., Al Mutery A., Ashraf M., Nasab R., Rai S., Rais N., and Hussain A. Genistein Induces alterations of epigenetic modulatory signatures in human cervical cancer cells. *Anti-cancer agents Med. Chem.*, **18**, 412–421 (2018). DOI: 10.2174/1871520617666170918142114
24. Jafari S., Shoghi M., and Khazdair M. R. Pharmacological Effects of Genistein on Cardiovascular Diseases. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2023**, 8250219 (2023). DOI: 10.1155/2023/8250219
25. Zhang X., Huang Y., Zhu H., Liu Z., Zhang L., Li Z., Niu Y., and Zhang H. Genistein microparticles prepared by antisolvent recrystallization with low-speed homogenization process. *Food Chem.*, **408**, 135250 (2023). DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.135250
26. Rasheed S., Rehman K., Shahid M., Suhail S., and Akash M. S. H. Therapeutic potentials of genistein: New insights and perspectives. *J. Food Biochem.*, **46** (9), e14228 (2022). DOI: 10.1111/jfbc.14228
27. Serebrenik A. A., Verduyn C. W., and Kaytor M. D. Safety, Pharmacokinetics, and Biomarkers of an amorphous solid dispersion of genistein, a radioprotectant, in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.*, **12** (2), 190–201 (2023). DOI: 10.1002/cpdd.1188
28. Usha S., Johnson I. M., and Malathi R. Modulation of DNA intercalation by resveratrol and genistein. *Mol. Cell. Biochem.*, **284**, 57–64 (2006). DOI: 10.1007/s11010-005-9013-6
29. N'Soukpoe-Kossi C. N., Bourassa P., Mandeville J. S., Bekale L., and Tajmir-Riahi H. A. Structural modeling for DNA binding to antioxidants resveratrol, genistein and curcumin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **151**, 69–75 (2015). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.07.007
30. Thastrom A., Lowary P. T., Widlund H. R., Cao H., Kubista M., and Widom J. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J. Mol. Biol.*, **288** (2), 213–229 (1999). DOI: 10.1006/jmbi.1999.2686
31. Malyuchenko N. V., Koshkina D. O., Korovina A. N., Gerasimova N. S., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., and Feofanov A. V. The Effect of Gossypol on the Structure of Nucleosomes. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **75** (3), 142–146 (2020). DOI: 10.3103/S0096392520030050
32. Малюченко Н. В., Андреева Т. В., Гераськина О. В., Герасимова Н. С., Любителев А. В., Феофанов А. В. и Студитский В. М. К вопросу о взаимодействии ресвератрола с нуклеосомами. *Биофизика*. **68** (3), 466–473 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923030067
33. Gaykalova D. A., Kulaeva O. I., Bondarenko V. A., and Studitsky V. M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes. *Methods Mol. Biol.*,

- 523, 109–123 (2009). DOI: 10.1007/978-1-59745-190-1_8
34. Andreeva T. V., Maluchenko N. V., Efremenko A. V., Lyubitelev A. V., Korovina A. N., Afonin D. A., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., and Feofanov A. V. Epigallocatechin Gallate Affects the Structure of Chromatosomes, Nucleosomes and Their Complexes with PARP1. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (18), 14187 (2023). DOI: 10.3390/ijms241814187
 35. Kudryashova K. S., Chertkov O. V., Nikitin D. V., Pestov N. A., Kulaeva O. I., Efremenko A. V., Solonin A. S., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., and Feofanov A. V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET. *Methods Mol. Biol.*, **1288**, 395–412 (2015). DOI: 10.1007/978-1-4939-2474-5_23
 36. Lyubitelev A. V., Kudryashova K. S., Mikhaylova M. S., Malyuchenko N. V., Chertkov O. V., Studitsky V. M., Feofanov A. V., and Kirpichnikov M. P. Change in linker DNA conformation upon histone H1.5 binding to nucleosome: Fluorescent microscopy of single complexes. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **71**, 108–113 (2016). DOI: 10.3103/S0096392516020061
 37. Bednar J., Garcia-Saez I., Boopathi R., Cutter A. R., Papai G., Reymer A., Syed S. H., Lone I. N., Tonchev O., Crucifix C., Menoni H., Papin C., Skoufias D. A., Kurumizaka H., Lavery R., Hamiche A., Hayes J. J., Schultz P., Angelov D., Petosa C., and Dimitrov S. Structure and dynamics of a 197 bp nucleosome in complex with linker histone H1. *Mol. Cell*, **66** (5), 729 (2017). DOI: 10.1016/j.molcel.2017.05.018
 38. Hao F., Kale S., Dimitrov S., and Hayes J. J. Unraveling linker histone interactions in nucleosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **71**, 87–93 (2021). DOI: 10.1016/j.sbi.2021.06.001.
 39. Markovits J., Linassier C., Fosse P., Couprie J., Pierre J., Jacquemin-Sablon A., Saucier J. M., Le Pecq J. B., and Larsen A. K. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.*, **49** (18), 5111–5117 (1989).
 40. Maluchenko N. V., Nilov D. K., Pushkarev S. V., Kotova E. Y., Gerasimova N. S., Kirpichnikov M. P., Langelier M. F., Pascal J. M., Akhtar M. S., Feofanov A. V., and Studitsky V. M. Mechanisms of Nucleosome Reorganization by PARP1. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (22), 12127 (2021). DOI: 10.3390/ijms222212127
 41. Kawamitsu H., Hoshino H., Okada H., Miwa M., Momoi H., and Sugimura T. Monoclonal antibodies to poly(adenosine diphosphate ribose) recognize different structures. *Biochemistry*, **23** (16), 3771–3777 (1984). DOI: 10.1021/bi00311a032
 42. Maluchenko N. V., Andreeva T. V., Geraskina O. V., Gerasimova N. S., Lyubitelev A. V., Feofanov A. V., and Studitsky V. M. On the interaction of resveratrol with nucleosomes. *Biophysics*, **68**, 369–375 (2023). DOI: 10.1134/S0006350923030144
 43. Maluchenko N. V., Feofanov A. V., and Studitsky V. M. PARP-1-associated pathological processes: inhibition by natural polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (21), 11441 (2021). DOI: 10.3390/ijms222111441
 44. Andreeva T., Lyubitelev A., Bondarenko E., Studitsky V., and Feofanov A. Quercetin affects nucleosome structure. *Microscopy and Microanalysis*, **27** (S1), 1740–1741 (2021). DOI: 10.1017/S143192762100636X
 45. Ji C., Yin X., Duan H., and Liang L. Molecular complexes of calf thymus DNA with various bioactive compounds: Formation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, **168**, 775–783 (2021). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.135
 46. Galindo-Murillo R., and Cheatham T. E. 3rd. Computational DNA binding studies of (–)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Biomol. Structure & Dynamics*, **36** (13), 3311–3323 (2018). DOI: 10.1080/07391102.2017.1389306
 47. Zheng X., Chen A., Hoshi T., Anzai J., and Li G. Electrochemical studies of (–)-epigallocatechin gallate and its interaction with DNA. *Anal. Bioanal. Chem.*, **386** (6), 1913–1919 (2006). DOI: 10.1007/s00216-006-0752-3
 48. Ghosh K. S., Sahoo B. K., Jana D., and Dasgupta S. Studies on the interaction of copper complexes of (–)-epicatechin gallate and (–)-epigallocatechin gallate with calf thymus DNA. *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1711–1718 (2008).
 49. Kumar S., Kumar P., and Nair M. S. Exploring the binding of resveratrol to a promoter DNA sequence d(CCAATTGG)₂ through multispectroscopic, nuclear magnetic resonance and molecular dynamics studies. *Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **252**, 119488 (2021). DOI: 10.1016/j.saa.2021.119488
 50. Ji C., Yin X., Duan H., and Liang L. Molecular complexes of calf thymus DNA with various bioactive compounds: Formation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, **168**, 775–783 (2021). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.135
 51. Nair M. S., D'Mello S., Pant R., and Poluri K. M. Binding of resveratrol to the minor groove of DNA sequences with AATT and TTAA segments induces differential stability. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **170**, 217–224 (2017).
 52. Alqahtani S., Welton K., Gius J. P., Elmegerhi S., and Kato T. A. The Effect of green and black tea polyphenols on BRCA2 deficient chinese hamster cells by synthetic lethality through PARP inhibition. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1274 (2019). DOI: 10.3390/ijms20061274

Influence of Genistein on the Structure of Nucleosomes and Formation of Complexes With PARP1

T.V. Andreeva*, **A.V. Efremenko****, **A.V. Feofanov*, ****, **A.V. Lyubitelev***, **A.N. Korovina***,
V.M. Studitsky*, ***, **N.V. Malyuchenko***

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

***Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

****Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Cottman Ave. 333, Philadelphia, PA 19111, USA*

The plant-derived polyphenol genistein has high biological activity, which stimulates the study of its applicability for the prevention and treatment of cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases. Given the ability of genistein to bind DNA, the present work examined the interaction of genistein with chromatosomes, nucleosomes, and nucleosome complexes with poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1). It has been established that over a wide range of concentrations, genistein does not affect the structure of nucleosomal DNA, but at high concentrations it causes a change in the structure of linker DNA, bringing DNA helices closer together. In chromatosomes, genistein does not cause dissociation of linker histone and changes in conformation in the region of linker DNA. At high concentrations, genistein hinders the formation of nucleosome complexes with PARP1.