

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.088.1

## Влияние госсипола на структуру нуклеосом

Н.В. Малюченко<sup>1,\*</sup>, Д.О. Кошкина<sup>1</sup>, А.Н. Коровина<sup>1</sup>, Н.С. Герасимова<sup>1</sup>,  
М.П. Кирпичников<sup>1</sup>, В.М. Студитский<sup>1,2</sup>, А.В. Феофанов<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;<sup>3</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

\*e-mail: mal\_nat@mail.ru

Госсипол является высокоактивным соединением, обладающим противовирусными, антиоксидантными, противомикробными, противомаларийными и противоопухолевыми свойствами. Известно, что противоопухолевый эффект госсипола связан с генотоксичностью, однако взаимодействие госсипола с хроматином не было изучено. В данной работе методом микроскопии одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии установлено, что при концентрациях 10 мкМ и выше госсипол вызывает значительные структурные изменения в конформации нуклеосомной ДНК на уровне гистонов. Эти изменения затрагивают не менее 35 п.н. нуклеосомной ДНК, увеличивают расстояние между соседними супервитками нуклеосомной ДНК в этой области до 9 нм или более и вызваны разворачиванием нуклеосомной ДНК. Наличие участков линкерной ДНК несколько увеличивает устойчивость нуклеосом к действию госсипола по сравнению с кор-нуклеосомами. При концентрации 30 мкМ и выше госсипол полностью разрушает структуру нуклеосом, вызывая диссоциацию гистонов от ДНК. Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемая *in vivo* генотоксичность госсипола может быть связана с прямым воздействием госсипола на хроматин, приводящим к нарушению структуры нуклеосом.

**Ключевые слова:** госсипол, нуклеосома, хроматин, флуоресценция, Фёрстеровский резонансный перенос энергии

Госсипол является природным соединением – вторичным метаболитом, синтезируемым растениями рода *Gossypium* (хлопчатник) в качестве защиты от патогенных микроорганизмов и травоядных животных [1]. Он представляет собой динатриевый альдегид с полифенольными гидроксильными группами и может существовать в виде (+)- и (-)-энантиомеров из-за вращения вокруг бинафтильной связи [2]. Являясь биологически активным соединением, госсипол обладает противовирусными, интерферон-индуцирующими, антиоксидантными, противомикробными, противомаларийными и противоопухолевыми свойствами [3]. В настоящее время ведутся более 28 клинических испытаний госсипола в качестве отдельного препарата и в комбинации с другими лекарствами.

В микромолярных концентрациях госсипол способен активировать как внутренние, так и внешние пути апоптоза в раковых клетках различного фенотипа [4]. По механизму действия госсипол относится к ВНЗ-миметикам (домен Bcl-2 homology domain 3), блокирующим взаимодействие между белками Bcl-2/Bcl-xL и Bcl-1 или Bax и вызывающим тем самым апоптоз и аутофа-

гию [5, 6]. Обнаружено, что в микромолярных концентрациях госсипол ингибирует репликацию ДНК, вызывая остановку клеточного цикла в S-фазе [7]. Установлено, что одной из ядерных мишеней госсипола является белок PARP-1, участвующий в репарации и репликации ДНК [8]. Еще одним видом активности госсипола является генотоксичность [9, 10], которая может быть вызвана его непосредственным воздействием на хроматин. В то же время вопрос о том, может ли госсипол напрямую влиять на структуру хроматина, остается открытым.

Нуклеосомы являются функциональной и структурной единицей хроматина и могут быть получены *in vitro* путем прямой сборки из гистонов и ДНК. Они широко применяются в молекулярно-биологических исследованиях [11–16] и позволяют, в том числе, изучать влияние различных лекарственных соединений на хроматин. При этом микроскопия одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопия) обеспечивает возможность исследования структурных изменений в нуклеосомах при взаимодействиях с белко-

выми факторами и другими биологически активными соединениями [17, 18].

В данной работе представлены результаты изучения воздействия госсипола на структуру хроматина с использованием метода spFRET-микроскопии и флуоресцентно-меченых нуклеосом, имеющих различную структуру в области линкерной ДНК.

### Материалы и методы

В работе использовали госсипол фирмы Sigma (США) в виде рацемической смеси ( $\pm$ )-энантиомеров.

Флуоресцентно-меченые ДНК-матрицы длиной 147, 167 и 187 п.н. получали методом полимеразной цепной реакции на основе нуклеосом-позиционирующей последовательности 603 [19] с использованием синтетических олигонуклеотидов-праймеров, меченных флуорофорами Cy3 и Cy5 (Lumiprobe, Россия):

Р-прямой с линкером – 5'-AAGCGACACCG GCACTGGGCCCGGTTTCGCG

C[Cy3-dT]CCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGT CTCTCGGGCGT-3';

Р-обратный с линкером – 5'-AACCATGATG GGCCTGGGTACCCAGGGACTTGAAGT AA TAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATG CACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3';

М-прямой с линкером – 5'-CAAGCGACACC GGCCTGGGCCCGGTTTCGCGCTCCCGC CTCCGTGTGTTGTCG[Cy5-dT]CTCTC-3';

М-обратный с линкером – 5'-GAACCATGAT GGGCACTGGGTACCCAGGGACTTGAAGTAAATAAGGACGGAGGGCC[Cy3-dT]CTTTC-3';

Р-прямой без линкера – 5'-CCCGGTTTCGCGC[Cy3-dT]CCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGG-3';

Р-обратный без линкера – 5'-ACCCAGGGA CTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3';

М-прямой без линкера – 5'-CCCGGTTTCGCGCTCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCG[Cy5-dT]CTCTCGG-3';

М-обратный без линкера – 5'-ACCCAGGGA CTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCC[Cy3-dT]CTTCAACATCGAT-3'.

ДНК-матрицы длиной 147 и 187 п.н. получали, используя соответственно праймеры без линкера и праймеры с линкером. ДНК-матрицу длиной 167 п.н. получали с помощью прямого праймера с линкером и обратного без линкера. Качество полученных ДНК-матриц контролировали электрофоретическим разделением в агарозном геле. ДНК выделяли из геля и очищали, используя набор реактивов Cleanup Standard (Евроген, Россия). ДНК-матрицы содержали метки в положениях 13, 91 п.н. или 35, 113 п.н. от на-

чала нуклеосом-позиционирующей последовательности 603.

Для сборки нуклеосом использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [20]. Нуклеосомы собирали на ДНК-матрицах с помощью ступенчатого диализа против раствора NaCl в уменьшающейся концентрации при 4°C по соответствующему протоколу [21]. Далее мононуклеосомы очищали от избытка донорного хроматина и неспецифических продуктов реакции с помощью препаративного электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле.

Измерения методом spFRET микроскопии выполняли с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия), используя систему детекции на основе лавинных фотодиодов и 40× водно-иммерсионный объектив C-planAprochromat (NA=1,2), как описано ранее [20]. Нуклеосомы (~1 нМ) инкубировали с госсиполом (10–30 мкМ) в течение 20 мин в пробирках с низкой адгезией в буфере TB150 (20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 150 мМ KCl, 1 мМ β-меркаптоэтанол) и для измерений переносили в силиконовые лунки на покровном стекле. Измеренные интенсивности флуоресценции меток Cy3 и Cy5 в составе одиночных нуклеосом использовали для расчета коэффициента близости E<sub>PR</sub>, как описано ранее [20]. E<sub>PR</sub> рассчитывали по формуле:

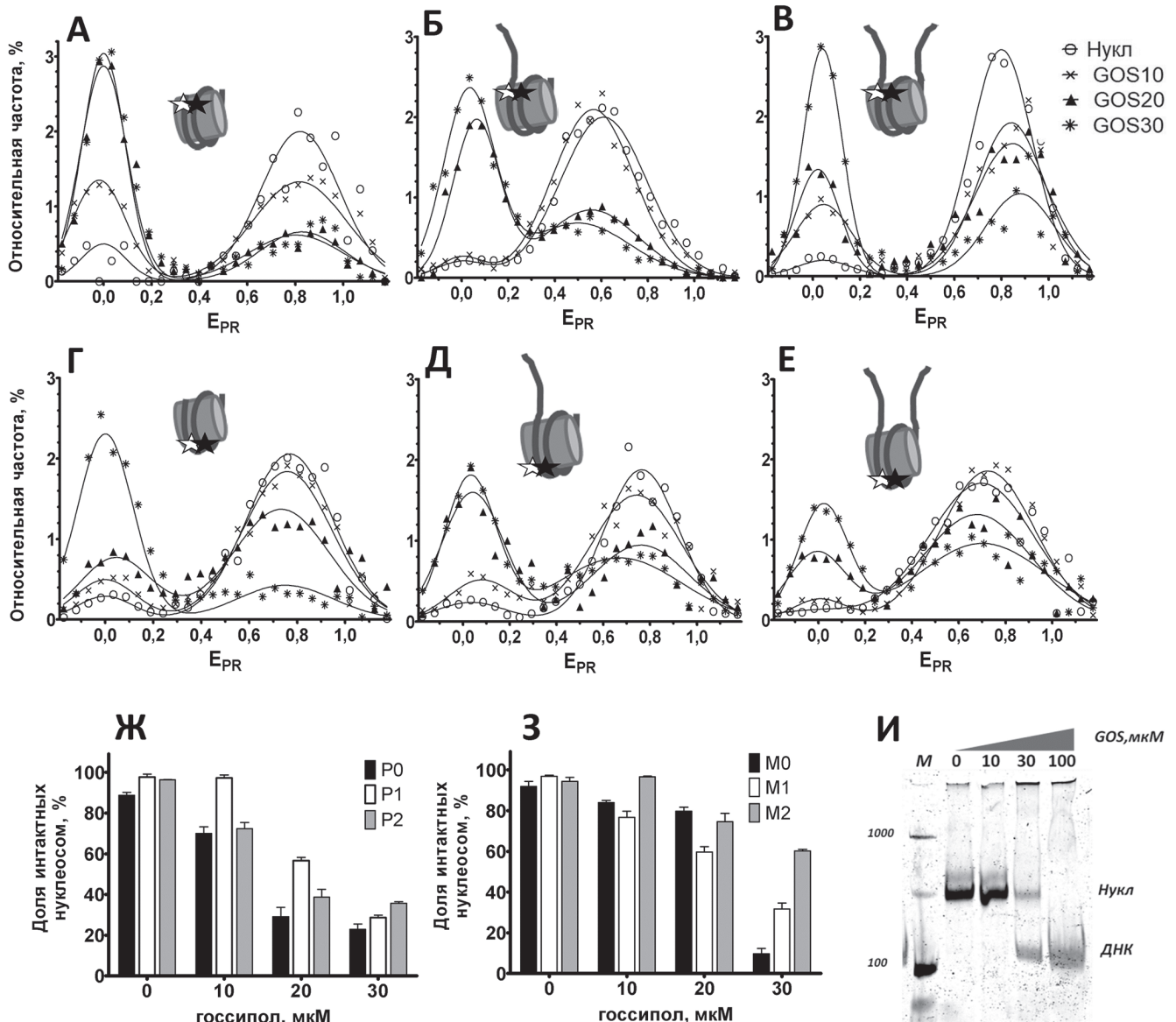
$$E_{PR} = (I_a - 0,19I_d)/(I_a + 0,81I_d),$$

где I<sub>d</sub> и I<sub>a</sub> – интенсивности соответственно флуоресценции донора (Cy3) и акцептора (Cy5), а 0,19 и 0,81 – коэффициенты, позволяющие учесть поправку на перекрытие спектров флуоресценции меток в области 635–800 нм. Коэффициент близости E<sub>PR</sub> – это аналог эффективности FRET без учета поправок на квантовые выходы флуорофоров и отличия в чувствительности прибора в областях испускания флуоресценции Cy3 и Cy5. Выборку значений E<sub>PR</sub> для всех проанализированных нуклеосом (2000–4000 частиц) представляли в виде частотного распределения нуклеосом по величине E<sub>PR</sub> (E<sub>PR</sub>-профиль). E<sub>PR</sub>-профили описывали в виде линейной суперпозиции двух нормальных (гауссовых) распределений (коэффициент детерминации R<sup>2</sup> > 0,86), соответствовавших двум отличающимся по структуре субпопуляциям нуклеосом. Долю субпопуляции нуклеосом с интактной структурой рассчитывали как отношение площади под гауссовым пиком с большими значениями E<sub>PR</sub> к общей площади под E<sub>PR</sub>-профилем, усредняли по повторным измерениям и представляли на гистограмме как среднее ± ошибка среднего. Возможность диссоциации нуклеосом при взаимодействии с госсиполом оценивали с помощью «нативного» электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле.

### Результаты и их обсуждение

Для изучения взаимодействий госсипола с нуклеосомами использовали три типа нуклеосом: без линкерных участков ДНК, а также с одним или двумя участками линкерной ДНК длиной по 20 п.н. каждый, как схематично изображено на рисунке. Донор-акцепторная пара меток находилась на соседних свертках нуклеосомной ДНК вблизи входа ДНК в нуклеосому (мечение по 13 и 91 п.н.; нуклеосомы P0, P1, P2, где цифра обозначает число участков линкерной ДНК) или в от-

даленной от входа области (мечение по 35 и 112 п.н.; нуклеосомы M0, M1, M2, где цифра – число линкерных участков). Два варианта расположения меток обеспечили возможность анализа структурных изменений в различных участках ДНК кор-нуклеосом. Величину  $E_{PR}$  измеряли от одиночных нуклеосом, свободно диффундирующих через фокус лазерного луча [20]. Изменение структуры нуклеосом выявляли, сравнивая  $E_{PR}$ -профили до и после инкубации нуклеосом с госсиполом (рисунок).



**Рисунок.** Госсипол влияет на структуру нуклеосом.

(А–Е) Анализ влияния госсипола на структуру нуклеосом с помощью spFRET-микроскопии. Представлены  $E_{PR}$ -профили нуклеосом P0 (А), P1 (Б), P2 (В), M0 (Г), M1 (Д) и M2 (Е) в отсутствие госсипола и в присутствии госсипола в концентрации 10 (GOS10), 20 (GOS20) или 30 (GOS30)  $\mu\text{M}$ . На вставках схематично показаны положения меток Су3 и Су5 (звездочки) на соседних свертках нуклеосомной ДНК.

(Ж, З) Гистограммы, показывающие долю (%) субпопуляции нуклеосом с высокими значениями  $E_{PR}$  при различных концентрациях госсипола для нуклеосом P0, P1 и P2 (Ж), а также M0, M1 и M2 (З).

(И) Электрофореграмма (4%-ный полиакриламидный гель, нативные условия электрофореза, детекция по флуоресценции Су5 в составе ДНК-матрицы) нуклеосом, содержащих один участок линкерной ДНК в отсутствие госсипола и в присутствии госсипола в концентрации 10, 30 или 100  $\mu\text{M}$ . Справа отмечено положение нуклеосом (Нукл) и свободной ДНК-матрицы (ДНК). М – маркерные фрагменты ДНК, указана длина в п.н.

$E_{PR}$ -профили всех типов исследуемых нуклеосом характеризуются интенсивным пиком в области больших значений  $E_{PR}$  и минорным пиком в области малых  $E_{PR}$  (рисунок, А–Е). Такой тип  $E_{PR}$ -профиля соответствует доминированию в растворе субпопуляции нуклеосом с плотной укладкой витков нуклеосомной ДНК на октамере гистонов в области расположения меток, характерной для интактных нуклеосом [12]. Минорный пик отвечает за присутствие в растворе нуклеосом, у которых нарушена укладка ДНК, и свободной ДНК, образующейся при диссоциации нуклеосом. Инкубация нуклеосом с госсиполом приводит к изменению  $E_{PR}$ -профилей, что указывает на изменение структуры нуклеосомы в этом комплексе. Изменения в  $E_{PR}$ -профилях заключаются в снижении интенсивности пика в области больших значений  $E_{PR}$  и увеличении интенсивности пика в области малых  $E_{PR}$  (рисунок, А–Е). Эти изменения обнаруживаются при концентрации госсипола 10 мкМ и усиливаются при ее увеличении. Из анализа  $E_{PR}$ -профилей P0, P1 и P2 следует, что при 10 мкМ госсипола структурные изменения происходят в области входа ДНК в коровую область в ~30% нуклеосом P0 и P2, то есть независимо от присутствия или отсутствия двух участков линкерной ДНК (рисунок, Ж). Эти изменения слабее затрагивают более удаленные от входа участки нуклеосомной ДНК, о чем свидетельствует увеличение доли нуклеосом M0 с нарушенной в области расположения меток структурой всего на 7% и отсутствие структурных перестроек в области меток в нуклеосомах M2 (рисунок, Г, Е, З). В случае нуклеосом M1 с одним участком линкерной ДНК структурные изменения наблюдались у 20% нуклеосом. Оценка зависимости эффективности FRET от расстояния между метками позволяет заключить, что снижение величины  $E_{PR}$  практически до нуля свидетельствует об увеличении расстояния между соседними супервитками ДНК до 9 нм или более в областях 13-й и 91-й, а также 35-й и 112-й п.н. [12].

При 20 мкМ госсипола доля нуклеосом со структурными изменениями, затрагивающими не менее 13 п.н. нуклеосомной ДНК, возрастает до 59, 42 и 55% соответственно у нуклеосом P0, P1 и P2. При этом увеличивается немного и доля нуклеосом с изменениями, затрагивающими не менее 35 п.н. нуклеосомной ДНК. При 30 мкМ госсипо-

ла значительно возрастает доля нуклеосом с изменениями, вовлекающими не менее 35 п.н., но нуклеосомы с двумя линкерными участками (P2, M2) демонстрируют повышенную устойчивость к действию госсипола.

Исследования методом электрофореза в полиакриламидном геле показали, что структурные изменения, обнаруживаемые методом spFRET-микроскопии, при 10 мкМ госсипола не приводят к диссоциации нуклеосом, а при 30 мкМ около 60% нуклеосом диссоциирует с образованием свободной ДНК (рисунок, И). Госсипол в концентрации 100 мкМ полностью разрушает нуклеосомы, вызывая диссоциацию гистонов от ДНК (рисунок, И).

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что при низких концентрациях (10 мкМ) госсипол, связываясь с нуклеосомами, вызывает структурные изменения, приводящие, наиболее вероятно, к откручиванию нуклеосомной ДНК от белкового кора без потери гистонов. Механизм воздействия госсипола на нуклеосомы требует более детального изучения, так как возможное взаимодействие госсипола с гистонами не исследовалось, а о комплексах госсипола с ДНК известно только то, что они образуются [22, 23]. Возможно, связывание госсипола с нуклеосомной ДНК приводит к нарушению взаимодействий между ДНК и коровыми гистонами, что при концентрациях госсипола 30–100 мкМ вызывает концентрационно-зависимую диссоциацию нуклеосом, сопровождающуюся полным освобождением ДНК от коровых гистонов. Полученные данные позволяют предположить, что наблюдаемая *in vivo* генотоксичность госсипола может быть опосредована прямым воздействием госсипола на хроматин, приводящим к нарушению его структуры.

Отметим, что экспериментальная система на основе флуоресцентно-меченых нуклеосом и метода spFRET-микроскопии является удобным инструментом для изучения воздействия различных биологически активных соединений на структуру хроматина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-54-33045). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tian X., Fang X., Huang J., Wang Q.J., Mao Y.B., Chen X.Y. A gossypol biosynthetic intermediate disturbs plant defence response // *Philos. Trans R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2019. Vol. 374. N 1767: 20180319.
2. Jia L., Coward L.C., Kerstner-Wood C.D., Cork R.L., Gorman G.S., Noker P.E., Kitad S., Pellicchia M., Reed J.C. Comparison of pharmacokinetic and metabolic profiling among gossypol, apogossypol and apogossypol-

hexaacetate // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008. Vol. 61. N 1. P. 63–73.

3. Benvenuto M., Mattera R., Masuelli L., Taffera G., Andracchio O., Tresoldi I., Lido P., Giganti M. G., Godos J., Modesti A., Bei R. (+/-)-Gossypol induces apoptosis and autophagy in head and neck carcinoma cell lines and inhibits the growth of transplanted salivary gland cancer cells in BALB/c mice // *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2017. Vol. 68. N 3. P. 298–312.

4. Lin J., Wu Y., Yang D., Zhao Y. Induction of apoptosis and antitumor effects of a small molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xl, gossypol acetate, in multiple myeloma in vitro and in vivo // *Oncol. Rep.* 2013. Vol. 30. N 2. P. 731–738.
5. Meng Y., Tang W., Dai Y., Wu X.M., Liu Ji Q., Ji M., Pienta K., Lawrence T., Xu L. Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa // *Mol. Cancer Ther.* 2008. Vol. 7. N 7. P. 2192–2021.
6. Lian J., Karnak D., Xu L. The Bcl-2-Beclin 1 interaction in (-)-gossypol-induced autophagy versus apoptosis in prostate cancer cells // *Autophagy.* 2010. Vol. 6. N 8. P. 1201–1203.
7. Wang Y., Rao P.N. Effect of gossypol on DNA synthesis and cell cycle progression of mammalian cells in vitro // *Cancer Res.* 1984. Vol. 44. N 1. P. 35–38.
8. Na Z., Peng B., Ng S., Pan S., Lee J. S., Shen H.M., Yao S.Q. A small-molecule protein-protein interaction inhibitor of PARP1 that targets its BRCT domain // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. Vol. 54. N 8. P. 2515–2519.
9. Rao M.V., Narechania M. B. The genotoxic effects of anti-cancer drug gossypol on human lymphocytes and its mitigation by melatonin // *Drug Chem. Toxicol.* 2016. Vol. 39. N 4. P. 357–361.
10. Luz V.B., Gadelha I.C.N., Cordeiro L.A.V., Melo M.M., Soto-Blanco B. In vitro study of gossypol's ovarian toxicity to rodents and goats // *Toxicol.* 2018. Vol. 145. P. 56–60.
11. Belotserkovskaya R., Bondarenko V.A., Orphanides G., Studitsky V.M., Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration // *Science.* 2003. Vol. 301. N. 5636. P. 1090–1093.
12. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
13. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J., Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N 3. P. 1619–1627.
14. Nilov D., Maluchenko N., Kurgina T., Pushkarev S., Lys A., Kutuzov M., Gerasimova N., Feofanov, A.V., Svedas V., Lavrik O., Studitsky V.M. Molecular mechanisms of PARP-1 inhibitor 7-methylguanidine // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. N 6: E2159.
15. McCullough L.L., Connell Z., Xin H., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Valieva M.E., Formosa T. Functional roles of the DNA-binding HMGB domain in the histone chaperone FACT in nucleosome reorganization // *J. Biol. Chem.* 2018. Vol. 293. N. 16. P. 6121–6133.
16. Sultanov D.C., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Maluchenko N.V., Kotova E.Y., Langelier M.F., Pascal J.M., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genet.* 2017. Vol. 4. N. 1. P. 21–31.
17. Chang H.W., Valieva M.E., Safina A., Chereji R.V., Wang J., Kulaeva O. I., Morozov A. V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Gurova K.V., Studitsky V.M. Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins // *Sci. Adv.* 2018. Vol. 4. N 11: eaav 2131.
18. Maluchenko N.V., Sultanov D.S., Kotova E.Y., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Histone tails promote PARP1-dependent structural rearrangements in nucleosomes // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. Vol. 489. N 1. P. 377–379.
19. Morozov A.V., Fortney K., Gaykalov, D.A., Studitsky V.M., Widom J., Siggia E.D. Using DNA mechanics to predict *in vitro* nucleosome positions and formation energies // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. N 14. P. 4707–4722.
20. 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., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1288. P. 395–412.
21. Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Preparation and analysis of positioned mononucleosomes // *Chromatin protocols. Methods in molecular biology.* Vol. 1288 / Ed.S. Chellappan. N.Y.: Humana Press, 2015. P. 15–26.
22. Zaidi R., Hadi S.M. Interaction of gossypol with DNA // *Toxicol. In Vitro.* 1992. Vol. 6. N 1. P. 71–76.
23. Zaidi R., Hadi S.M. Complexes involving gossypol, DNA and Cu(II) // *Biochem. Int.* 1992. Vol. 28. N 6. P. 1135–1143.

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 12.06.2020 г.

Принята в печать 23.06.2020 г.

## RESEARCH ARTICLE

# Effect of gossypol on nucleosome structure

N.V. Malyuchenko<sup>1,\*</sup>, D.O. Koshkina<sup>1</sup>, A.N. Korovina<sup>1</sup>, N.S. Gerasimova<sup>1</sup>, M.P. Kirpichnikov<sup>1</sup>, V.M. Studitsky<sup>1,2</sup>, A.V. Feofanov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Bioengineering Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;

<sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia

\*e-mail: mal\_nat@mail.ru

Gossypol is a highly active compound with antiviral, antioxidant, antimicrobial, antimalarial and antitumor properties. It is known that the antitumor effect of gossypol is associated with genotoxicity, but interaction of gossypol with chromatin was not investigated. In this work,

using microscopy of single particles based on the Förster resonance energy transfer it was found that at 10 M or higher concentration, gossypol causes significant structural changes in the conformation of nucleosomal DNA on the histone octamer. These changes affect at least 35 bp of nucleosomal DNA, increase the distance between neighboring gyres of nucleosomal DNA in this region to 9 nm or more, and appear to be associated with uncoiling of nucleosomal DNA. The presence of linker DNA somewhat increases the resistance of nucleosomes to the gossypol action, as compared with core nucleosomes. At a concentration of 30  $\mu$ M or higher, gossypol completely disrupts the structure of nucleosomes, causing dissociation of core histones from DNA. The obtained data indicate that gossypol genotoxicity observed *in vivo* could be associated with a direct effect of gossypol on chromatin, leading to destabilization of the nucleosome structure.

**Keywords:** *gossypol, nucleosome, chromatin, fluorescence, Förster resonance energy transfer*

#### **Сведения об авторах**

*Малюченко Наталия Валериевна* – канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: *mal\_nat@mail.ru*

*Кошкина Дарья Олеговна* – магистр 1 года обучения кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: *koshdar@ro.ru*

*Коровина Анна Николаевна* – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; *anna.korovina@gmail.com*

*Герасимова Надежда Сергеевна* – канд. биол. наук, ассистент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: *shordome@gmail.com*

*Кирпичников Михаил Петрович* – акад. РАН, проф., докт. биол. наук, декан и зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: *kirpichnikov@inbox.ru*

*Студитский Василий Михайлович* – докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и отдела эпигенетики рака ракового центра Фокс Чейз, Филадельфия, США. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: *vasily.studitsky@fccc.edu*

*Феофанов Алексей Валерьевич* – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: *avfeofanov@yandex.ru*