

На правах рукописи



Сергеев Александр Вячеславович

**Влияние противоопухолевых препаратов,
связывающихся с ДНК, на функционирование ДНК-
метилтрансферазы Dnmt3a**

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., проф., Громова Е.С

Москва 2021

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный руководитель -

Громова Елизавета Сергеевна
Доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты -

Хомутов Алексей Радиевич, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Варижук Анна Михайловна, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории искусственного антителогенеза, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Олсуфьева Евгения Николаевна, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе»

Защита диссертации состоится «12» октября 2021 г. в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/376891824/>

Автореферат разослан «__» 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.х.н., доцент



И.Г. Смирнова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Разработка новых химиотерапевтических средств является важным направлением исследований в терапии онкологических заболеваний. Поиск потенциальных противоопухолевых препаратов привел к открытию молекул, которые более селективны в отношении злокачественных опухолей и менее токсичны для нормальных тканей. Влияние этих соединений на различные клеточные процессы и на работу ключевых ферментов, необходимых для нормального функционирования клеток, представляет большой интерес. Открытие новых аспектов механизма действия противоопухолевых соединений значительно расширит потенциал их терапевтического применения, а также поспособствует внедрению новых соединений. Так как ДНК является одной из основных мишеней противоопухолевых препаратов, изучение их влияния на работу ДНК-узнающих факторов и ДНК-оперирующих ферментов представляется особо интересным. Применение в клинической практике химиотерапевтических препаратов, тем или иным образом взаимодействующих с ДНК, может оказывать влияние на метилирование ДНК, осуществляемое ДНК-метилтрансферазами (МТазами). Эта эпигенетическая модификация играет ключевую роль в протекании множества клеточных процессов, таких, как регуляция экспрессии генов, защита генома от мобильных генетических элементов, дифференциация клеток и других. В клетках млекопитающих метилирование осуществляется, как правило, в CpG-участках ДНК по 5 положению остатка цитозина. Расположенные определенным образом метилированные участки CpG формируют профиль метилирования ДНК. Установление профиля метилирования осуществляется *de novo* МТазой Dnmt3a и Dnmt3b и поддерживается в каждом раунде репликации МТазой Dnmt1. Нарушение профиля метилирования ДНК приводит к серьезным последствиям, включая аутоиммунные заболевания, неврологические расстройства, диабет, а также возникновение и развитие опухолей. Во многих раковых опухолях наблюдается гиперметилирование CpG-участков в промоторных областях генов-супрессоров опухолей и генов, отвечающих за репарацию ДНК, что приводит к инактивации этих генов, а также общее гипометилирование ДНК, приводящее к нестабильности генома.

Применение в клинической практике химиотерапевтических препаратов, тем или иным образом взаимодействующих с ДНК, может оказывать влияние на работу МТазы Dnmt3a, чувствительной к таким нарушениям структуры ДНК. В связи с этим, наше внимание привлекли традиционные и новые противоопухолевые препараты, взаимодействующие с ДНК по различным механизмам: путем встраивания в полинуклеотидные цепи, путем интеркалирования в двойную спираль или локализации в ее бороздках. Это 6-тиогуанин (^SG), малобороздочные ДНК-лиганды семейства ауреоловой кислоты оливомицин А и оливамид, а также ДНК-интеркаляторы доксорубин и недавно синтезированный кураксин СBL0137. Известно, что они оказывают влияние на структуру хроматина, пространственную организацию генома, ДНК-оперирующие ферменты и факторы транскрипции, однако их действие на метилирование ДНК, в частности, на работу МТазы Dnmt3a, не изучено.

Степень разработанности темы

Ранее немногочисленные исследования показали, что различные ДНК-интеркаляторы и соединения, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, могут ингибировать метилирование ДНК и в некоторых случаях реактивировать эпигенетически замалчиваемые гены в опухолевых клетках. Так, димерные бисбензимидазолы связываются с малой бороздкой ДНК и ингибируют реакцию метилирования, осуществляемую МТазой Dnmt3a, а интеркалирующий противоопухолевый

препарат доксорубин способен ингибировать реакцию метилирования ДНК, катализируемую МТазой Dnmt1.

Цели и задачи исследования

Целью работы стало изучение влияния противоопухолевых препаратов на работу МТазы Dnmt3a, а также определение молекулярного механизма такого влияния. Для достижения выбранной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделение каталитического домена МТазы Dnmt3a (Dnmt3a-CD), активного в отсутствие N-концевого регуляторного домена.
2. Изучение комплексообразования 30-звенных ДНК-дуплексов с малобороздочными ДНК-лигандами оливомицином А и оливамидом в разных условиях. Изучение влияния данных соединений на образование и устойчивость комплекса ДНК с Dnmt3a-CD, а также на эффективность метилирования ДНК.
3. Исследование связывания Dnmt3a-CD с ДНК-дуплексами в присутствии ДНК-интеркалятора кураксина CBL0137, а также влияния CBL0137 и доксорубина на метилирование этих ДНК-дуплексов Dnmt3a-CD.
4. Исследование влияния остатка 6-тиогуанина (^SG), встроенного в CpG-участок или в примыкающую нуклеотидную последовательность в ДНК-дуплексах на эффективность их метилирования МТазой Dnmt3a-CD.
5. Определение молекулярного механизма возможного влияния каждого из рассмотренных препаратов на функционирование Dnmt3a-CD.

Объект исследования

Каталитический домен ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a, противоопухолевые препараты: оливомицин А, оливамид, кураксин CBL0137, доксорубин, 6-тиогуанин.

Предмет исследования

Влияние выбранных противоопухолевых препаратов на функционирование Dnmt3a-CD.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые детально исследовано влияние традиционных и новых противоопухолевых препаратов, обладающих способностью связываться с ДНК или встраиваться в двойную спираль, на функционирование МТазы Dnmt3a-CD *in vitro*.

1. Исследованы различные этапы реакции метилирования МТазой Dnmt3a-CD ДНК-дуплексов, моделирующих возможные варианты внедрения в ДНК противоопухолевого препарата ^SG вместо остатка гуанина.
2. Впервые остаток ^SG использован в качестве спектроскопической метки для исследования локальных структурных изменений в ДНК в комплексе с эукариотическими МТазами методом кругового дихроизма.
3. Показано влияние малобороздочных антибиотиков оливомицина А и его нового, более активного и менее токсичного производного оливамида на эффективность метилирования ДНК, свидетельствующее о возможном эпигенетическом вкладе в механизм их противоопухолевого действия. Установлен молекулярный механизм наблюдаемых эффектов.
4. Продемонстрировано ингибирование Dnmt3a-зависимого метилирования ДНК недавно охарактеризованным ДНК-интеркалирующим препаратом кураксином CBL0137, и предложен механизм этого явления. Ингибирующий эффект CBL0137 был более выраженным в сравнении с традиционным ДНК-интеркалятором доксорубицином.

5. Впервые показана возможность исследования взаимодействия низкомолекулярных ДНК-интеркаляторов с FAM-мечеными ДНК-дуплексами методом поляризации флуоресценции.
6. Выдвинута гипотеза, что кураксин СВL0137 и оливаמיד способны реактивировать гены, экспрессия которых эпигенетически подавлена в раковых клетках. Первым экспериментальным подтверждением этой гипотезы стало увеличение уровня мРНК генов-супрессоров опухолей в клетках рака молочной железы MCF-7 под действием данных препаратов.

Теоретическая значимость исследования

Информация, полученная в опытах *in vitro*, может представлять интерес как новый механизм активности противоопухолевых агентов, связывающихся с ДНК. Таким образом, Dnmt3a можно рассматривать как одну из мишеней действия данных противоопухолевых препаратов. Можно предположить, что уровень экспрессии Dnmt3a в раковых клетках будет оказывать влияние на эффективность лечения данными препаратами.

Практическая значимость исследования

Информация о влиянии рассматриваемых нами препаратов на метилирование, катализируемое МТазой Dnmt3a-CD, расширит понимание механизма их действия, откроет пути к персонализированной таргетированной терапии рака, комбинированному использованию эпигенетической и традиционной терапии рака, поможет искать новые пути преодоления устойчивости к традиционным лекарствам.

Методология диссертационного исследования

Для выполнения работы использовались современные физико-химические методы исследования. Выделение белковых препаратов Dnmt3a-CD и M.SssI, экспрессированных в клетках *E.coli*, проводили с помощью металл-аффинной хроматографии. Чистоту выделенных препаратов оценивали с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), а концентрацию – методом Бредфорда. Связывание оливомицина А и оливамида с ДНК изучали по флуоресценции антибиотиков. Комплексообразование СВL0137 с ДНК, а также всех противоопухолевых препаратов с ДНК и Dnmt3a-CD изучалось по поляризации флуоресценции ДНК-дуплексов, меченных флуоресцеином. Кинетика метилирования ДНК-дуплексов, поврежденных остатками ³G, исследовалась по включению меченной тритием метильной группы (³H-CH₂-) в ДНК. Эффективность метилирования ДНК в присутствии оливомицина А, оливамида, кураксина СВL0137 и доксорубина изучалась по защите метилированной ДНК от расщепления эндонуклеазой рестрикции H_{in}6I. Локальные структурные перестройки в ДНК-дуплексе в комплексах Dnmt3a-CD с ДНК исследовались методом кругового дихроизма. Образование ковалентных интермедиатов реакции метилирования изучалось с использованием ДНК-дуплексов, содержащих остаток пиримидин-2(1H)-он в позиции цитозина-мишени.

Основные положения, выносимые на защиту

- Локализация ³G в CpG-сайте драматически сказывается на метилировании поврежденной ДНК МТазой Dnmt3a-CD: наблюдается увеличение или уменьшение скорости реакции, в зависимости от положения остатка ³G относительно цитозина-мишени. Обнаружено, что наличие ³G даже вне CpG-сайта на расстоянии до 9 п.н., приводит к ухудшению метилирования ³G-ДНК-дуплексов.
- Антибиотики оливомицин А и его аналог оливаמיד, связывающиеся с малой бороздкой ДНК в GC-богатых участках, приводят к существенному ингибированию метилирования

ДНК МТазой Dnmt3a-CD, не затрагивая стадию комплексообразования фермента с ДНК, но затрудняя образование ковалентного интермедиата реакции метилирования.

- Новый противоопухолевый препарат кураксин CBL0137 эффективно ингибирует реакцию метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD за счет интеркаляции между парами оснований, нарушения структуры двойной спирали вблизи CpG-сайта и дестабилизации фермент-субстратного комплекса. Ингибирующий эффект CBL0137 был более выраженным в сравнении с традиционным ДНК-интеркалятором доксорубицином.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании и с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на следующих научных мероприятиях и конференциях: Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», «Ломоносов-2018» и «Ломоносов-2019», Конференция Федерации европейских биохимических обществ FEBS EMBO 2014 (Париж, Франция, 29 августа - 4 сентября 2014), Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications (Московская область, Россия, 21-26 июня 2015), The Seventh NEB Meeting on DNA Restriction and Modification (Гданьск, Польша, 24-29 августа 2015 г.), Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" (Москва, Россия, 18-22 сентября 2017), First Russia-Japan MSU-TokyoTech Joint Conference for Young Scientists "Proteins, Nucleic Acids and Nucleoproteins" (Москва, Россия, 11-12 декабря 2017), The 43rd FEBS Congress Prague (Прага, Чехия, 7-12 июля 2018).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 4 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора

В работе обсуждены и обобщены результаты, полученные лично автором или в соавторстве. При этом автору принадлежит решающая роль на всех этапах работы: от планирования, разработки и обоснования путей решения, реализации, проверки предложенных в работе экспериментальных подходов и непосредственного участия в проведении ключевых экспериментов до обсуждения и оформления полученных результатов.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 100 страницах, содержит 38 рисунков, 9 таблиц и 3 схемы. Работа построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: списка сокращений, введения, 2 глав, описания материалов и методов исследования и списка литературы (130 источников).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ДНК-метилтрансфераза Dnmt3a

Объектом наших исследований явился каталитический домен эукариотической ДНК-метилтрансферазы (МТазы) Dnmt3a (Dnmt3a-CD). Dnmt3a принадлежит к семейству МТаз Dnmt3,

устанавливающих профиль метилирования ДНК *de novo* на ранних стадиях эмбриогенеза. Кроме того, совместно с Dnmt1, МТазы семейства Dnmt3 участвуют в поддерживающем метилировании некоторых участков ДНК, в частности, повторяющихся последовательностей, богатых CpG-участками. Мутации в Dnmt3a, а также нарушения её экспрессии приводят к нестабильности генома и сопутствуют образованию и прогрессированию различных типов опухолей. Геномы опухолевых клеток обычно демонстрируют глобальное гипометилирование ДНК с локальным гиперметилированием определенных областей. Dnmt3a переносит метильную группу с кофактора S-аденозил-L-метионина (AdoMet) на атом углерода C5 остатка цитозина в участках CpG, AdoMet в ходе реакции превращается в S-аденозил-L-гомоцистеин (AdoHcy). Предполагается, что Dnmt3a имеет такой же каталитический механизм, что и прокариотическая МТаза M.HhaI. Стадии реакции метилирования можно представить, как 1) комплексообразование МТазы с ДНК и AdoMet, 2) выведение цитозина-мишени из двойной спирали в каталитическую полость фермента для его сближения с AdoMet, 3) образование ковалентного интермедиата МТазы с ДНК и перенос CH₃-группы с кофактора на ДНК, 4) диссоциация фермент-субстратного комплекса и высвобождение продуктов реакции (**текст диссертации, рис. 13**).



Рис. 1. Структура ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a.

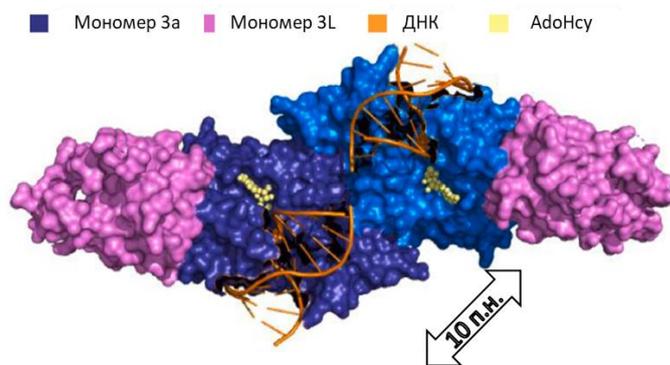


Рис. 2. Структура комплекса ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a-CD/Dnmt3L/ДНК.

Для выделения рекомбинантных белков Dnmt3a-CD использовались плазмиды pET28a и, соответственно. Фермент содержал кластер His₆ на N-конце. Экспрессию белков производили в штаммах *E. coli* Rosetta 2 (DE3). Белковый препарат получили с высокой степенью очистки (>95%, рис. 3). Из 1 литра культуры удалось выделить 1,2 мг белка.

Dnmt3a состоит из C-концевого домена, обладающего активностью в изолированной форме, и N-концевого регуляторного домена, отвечающего за взаимодействие фермента с гистонами и локализацию фермента в ядре (рис. 1). Фермент активен в форме тетрамерного комплекса с регуляторным фактором Dnmt3L, состоящего из двух молекул Dnmt3L (по краям тетрамера) и двух центральных молекул Dnmt3a, формирующих участки связывания ДНК (рис. 2). В отсутствие Dnmt3L активный тетрамер формируется четырьмя молекулами Dnmt3a. По разным данным, активные центры тетрамера способны метилировать два участка CpG, разделенные 8-14 п.н. в противоположных цепях ДНК.

Выделение и очистка Dnmt3a-CD

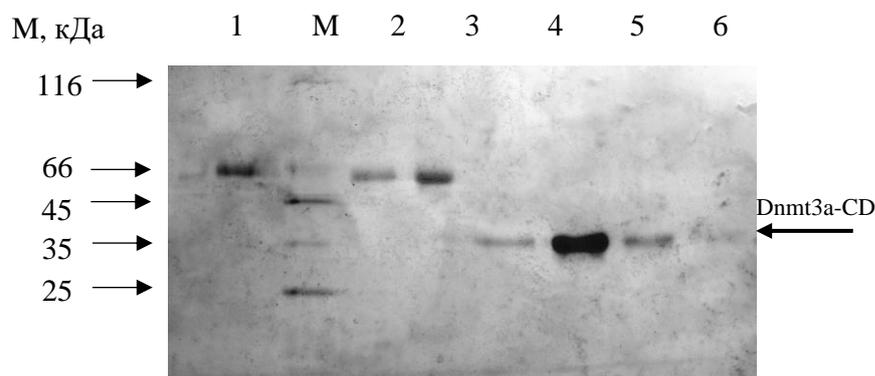


Рис. 3. Анализ чистоты выделенного препарата Dnmt3a-CD методом электрофореза в 12,5% ПААГ по Лэмбли. 1-3 – маркеры БСА (66 кДа), М – белковые маркеры молекулярного веса, 4-7 – фракции Dnmt3a-CD 400, 600 и 600 мкл после элюции раствором 250 мМ имидазола.

Разработка метода определения степени метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD с использованием эндонуклеаз рестрикции

Для количественного измерения кинетики метилирования ДНК в данной работе использовался традиционный метод, основанный на включении AdoMet, содержащего меченную триетием метильную группу (^3H AdoMet), в участок CpG. После проведения реакции метилирования ^3H -ДНК отделяли от неиспользованного ^3H AdoMet и измеряли радиоактивность ДНК. Недостатком этого метода низкая доступность ^3H AdoMet. В связи с этим, было решено изучить другие возможности определения степени метилирования ДНК. Наше внимание привлекли недавно открытые “метилзависимые” эндонуклеазы (МЗ-ЭР) – ферменты, в отличие от традиционных эндонуклеаз (ЭР), расщепляющие метилированные участки в ДНК. Для разработки метода были выбраны традиционная ЭР Hin6I ($G\downarrow\text{CGC}$) и МЗ-ЭР KfoI ($G\downarrow\text{C}(5\text{mC})\text{GGC}$) и PcsI ($((5\text{mC})\text{GNNNNN}\downarrow\text{NN}(5\text{mC})\text{G})$). Суть метода заключалась в последовательных реакциях метилирования FAM-меченных ДНК-дуплексов, содержащих CpG-сайты в участках узнавания эндонуклеазы, (табл. 1, **If-IVf**) и её расщепления исследуемой эндонуклеазой. Продукты расщепления затем анализировались в ПААГ, после чего из соотношения интенсивностей флуоресценции расщепленной и нерасщепленной ДНК рассчитывалась степень метилирования.

Таблица 1. ДНК-дуплексы, использованные в работе. ^a

Номер	Обозначение	Дуплекс
I	CG/GC	5' -CTGAATACTACTT CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC CG GAGAGATTGGACTA
If	fCG/GCf	5' FAM -CTGAATACTACTT CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC CG GAGAGATTGGACTA - FAM
IIIf	fCG/GM _k	5' FAM -CTGAATACTACTT CGCG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAC CGM CGGAGATTGGACTA
IIIIf	fCG/GC _k	5' FAM -CTGAATACTACTT CGCG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAC CGCG CGGAGATTGGACTA
IVf	fCG-MG/ GM-GC	5' FAM -TGCTGAATA CGCTGTATAMG TCTAACCTG 3' -ACGACTTAT GM GACATAT GC AGATTGGAC
Vf	fCG-MG/ GM-GM	5' FAM -TGCTGAATA CGCTGTATAMG TCTAACCTG 3' -ACGACTTAT GM GACATAT GM AGATTGGAC
VI	CG/GM	5' -CTGAATACTACTT CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GM GAGAGATTGGACTA
VIIf	CG/GMf	5' -CTGAATACTACTT CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GM GAGAGATTGGACTA - FAM
VII	C ^S G/GM	5' -CTGAATACTACTT C^SG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC CG MGAGAGATTGGACTA
VIII	C ^S G/GMf	5' -CTGAATACTACTT C^SG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC CG MGAGAGATTGGACTA - FAM

^aМ – 5-метилцитозин; FAM – 6-карбоксийфлуоресцеин, ^SG – 6-тиогуанин, Z – пиримидин-2-он. Метилируемые остатки цитозина выделены подчеркиванием. CG-сайты указаны полужирным шрифтом. Участки узнавания эндонуклеаз рестрикции (Hin6I, KfoI или PcsI) выделены курсивом.

Номер	Обозначение	Дуплекс
VIII	CG/ ^s GM	5' -CTGAATACTACTTG CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC ^s GM GAGAGATTGGACTA
VIII _f	fCG/ ^s GM	5' FAM -CTGAATACTACTTG CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC ^s GM GAGAGATTGGACTA
IX	^s GCG/GM	5' -CTGAATACTACTT ^s GCG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAA CGM GAGAGATTGGACTA
IX _f	^s GCG/GM _f	5' -CTGAATACTACTT ^s GCG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAA CGM GAGAGATTGGACTA- FAM
X	CG-CG/ GM-GM	5' -TGCTGAATA CG CTACTGATG CG CTAACCTG 3' -ACGACTTAT GM GATGACTAC GM GATTGGAC
X _f	CG-CG/ GM-GM _f	5' -TGCTGAATA CG CTACTGATG CG CTAACCTG 3' -ACGACTTAT GM GATGACTAC GM GATTGGAC- FAM
XI	CG-C ^s G/ GM-GM	5' -TGCTGAATA CG CTACTGATG C^sG CTAACCTG 3' -ACGACTTAT GM GATGACTAC G MGATTGGAC
XI _f	CG-C ^s G/ GM-GM _f	5' -TGCTGAATA CG CTACTGATG C^sG CTAACCTG 3' -ACGACTTAT GM GATGACTAC G MGATTGGAC- FAM
XII	C ^s G-C ^s G/ GM-GM	5' -TGCTGAATA C^sG CTACTGATG C^sG CTAACCTG 3' -ACGACTTAT G MGATGACTAC G MGATTGGAC
XII _f	C ^s G-C ^s G/ GM-GM _f	5' -TGCTGAATA C^sG CTACTGATG C^sG CTAACCTG 3' -ACGACTTAT G MGATGACTAC G MGATTGGAC- FAM
XIII	CG/ GM ^s G	5' -CTGAATACTACTTG CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GM^sG AGAGATTGGACTA
XIV	CG/ GMN ₂ ^s G	5' -CTGAATACTACTTG CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GMGA^sG AGATTGGACTA
XV	CG/ GMN ₃ ^s G	5' -CTGAATACTACTTG CG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GMGAGA^sG ATTGGACTA
XVI	CG/ GMN ₄ ^s G	5' -CTGAATACTACTTG CG CTCTCTAA CCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GMGAGAGATT^sG ACTA
XVII	CG/ GMN ₅ ^s G	5' -CTGAATACTACTTG CG CTCTCTAAC CTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GMGAGAGATTG^sG ACTA
XVIII	^s GG/GM	5' -CTGAATACTACTT ^s G GCTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GM GAGAGATTGGACTA
XIX	C ^s G-CG/ GM-GM	5' -TGCTGAATG C^sG CTACTGAT GM GCTAACCTG 3' -ACGACTTAC G MGATGACTAC GM GATTGGAC
XX	^s GCG-CG/ GM-GM	5' -TGCTGAAT ^s GCG CTACTGAT GM GCTAACCTG 3' -ACGACTTAC CGM GATGACTAC GM GATTGGAC
XXI	CG-CG/ ^s GM-GM	5' -TGCTGAATG CG CTACTGAT GM GCTAACCTG 3' -ACGACTTAC ^s GM GATGACTAC GM GATTGGAC
XXIII _f	fCG/GC _f	5' - FAM -GAGCCAAG CG CACTCTGA 3' -CTCGGTT CG GTGAGACT- FAM
XXIII _f	CGZ/GC _f	5' -GAGCCAAG CGZ ACTCTGA 3' -CTCGGTT CG GTGAGACT- FAM
XXIV _f	fCG/GZ	5' FAM -GAGCCAAG CG CACTCTGA 3' -CTCGGTT CGZ GTGAGACT
XXV _f	fCG/ GC _{Arf}	5' FAM -CTGAATAATTAAT CG CTAAATTAATCTGAT 3' -GACTTATTAATTA CG GATTAATTAGACTA- FAM

Эффективность метилирования дуплексов fCG/GM^K и fCG/GC^K МТазой Dnmt3a-CD была низкой (табл. 2 и **основной текст диссертации (рис. 19-21)**), возможно, потому что сайт CpG фланкировали неоптимальные нуклеотидные последовательности. Дуплекс fCG-MG/GM-GM был также непригоден для анализа эффективности метилирования ДНК в связи со способностью PcsI гидролизовать такой дуплекс без предварительного метилирования МТазой Dnmt3a-CD. Единственным дуплексом, подходящим для анализа степени метилирования с помощью МЗ-ЭР, стал fCG-MG/GM-GC. Однако, и в этом случае степень расщепления ДНК-дуплекса после метилирования была невысокой (68%). В связи с этим, в данной работе степень метилирования ДНК определяли с использованием традиционной ЭР Hin6I. В оптимизированном нами методе использовался ДНК-дуплекс **If**, содержащий FAM-метки в обеих цепях, а также была исключена стадия замены буфера перед реакцией расщепления ДНК для увеличения экспрессности метода.

Таблица 2. Определение эффективности метилирования ДНК-дуплексов МТазой Dnmt3a-CD с использованием эндонуклеаз рестрикции Hin6I, KroI и PcsI.

ДНК-дуплекс	Эндонуклеаза рестрикции	Степень расщепления ДНК-дуплексов (w), % ^a		Степень метилирования ДНК-дуплексов МТазой Dnmt3a-CD, %
		w_0	w_{Dnmt3a}	
1. fCG/GCf	Hin6I	88 ± 6	10 ± 7	89
2. fCG/GM ^K	KroI	27 ± 9	21 ± 4	- ^b
3. fCG/GC ^K	KroI	0	14 ± 1	24
4. fCG-MG/GM-GC	PcsI	4 ± 2	68 ± 10	100
5. fCG-MG/GM-GM	PcsI	71 ± 18	74 ± 15	- ^b

^a w_0 и w_{Dnmt3a} – степени расщепления ДНК-дуплексов до и после их метилирования МТазой Dnmt3a-CD, соответственно. Указаны стандартные отклонения.

^b Не рассчитано для ДНК-дуплексов fCG/GM^K и fCG-MG/GM-GM (см. текст диссертации).

Влияние противоопухолевых препаратов на метилирование ДНК

6-тиогуанин (^SG)

Тиопурины, такие как 6-тиогуанин (^SG), 6-меркаптопурин и азатиоприн, являются эффективными противоопухолевыми препаратами, успешно применяющимися в клинической практике. Влияние встраивания ^SG в ДНК на функционирование Dnmt3a не изучено. Ранее мы показали, что ряд повреждений остатков гуанина в сайтах CpG влияют на работу Dnmt3a. Так как Dnmt3a при связывании с ДНК образует большое число специфических и неспецифических контактов в участке узнавания и рядом с ним, включение ^SG вместо G в сайты CpG или в соседние последовательности может нарушать метилирование этого сайта МТазой Dnmt3a. Чтобы проверить эту гипотезу, мы оценили влияние ^SG в CpG на метилирование 30-звенных ^SG-содержащих ДНК-дуплексов (^SG-ДНК) с одним или двумя CpG-сайтами. Чтобы оценить влияние ^SG на метилирование конкретной цепи ДНК, мы использовали полуметилированные ДНК-дуплексы, содержащие 5-метилцитозин (M) вместо одного или двух остатков цитозина (табл. 1, VI-XXI и схема 1).

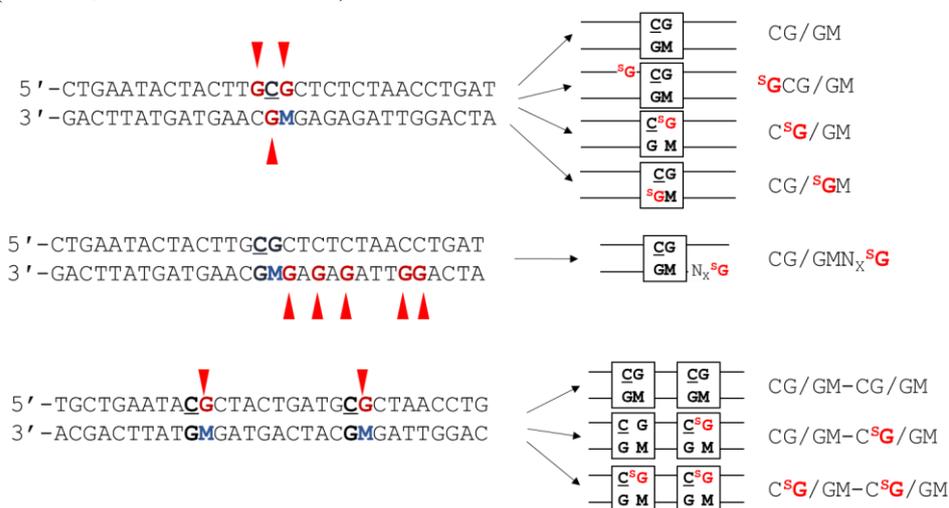


Схема 1. ^SG-ДНК с одним или двумя CpG-сайтами. ^SG – 6-тиогуанин, M – 5-метилцитозин. Места введения ^SG в исходный ДНК-дуплекс отмечены стрелками.

Температура плавления ^SG-ДНК CG-C^SG/GM-GM и C^SG-C^SG/GM-GM уменьшалась на 14 и 15°C по сравнению с немодифицированным дуплексом CG/GM-CG/GM (57±1, 55±1 и 71±1°C, соответственно). Эти результаты показывают, что замена кислорода на серу в 6 положении гуанина нарушает взаимодействие оснований в паре C-G.

³G-ДНК с одним CpG-сайтом.

Выбор односайтовых ³G-ДНК был нацелен на моделирование различных ситуаций, возникающих при повреждении ДНК ³G вблизи сайта CpG или непосредственно в сайте. ³G располагался с 3'-стороны от цитозина-мишени (C³G/GM), напротив него (CG/³GM) или с 5'-стороны от CpG-сайта (³GCG/GM) (табл. 1, VI-IX; схема 1). Степень метилирования измеряли по переносу меченной тритием метильной группы (³H-CH₃) AdoMet в 5-ое положение цитозина. Замена 3'-гуанина рядом с цитозином-мишенью, на ³G (C³G/GM) привела к двухкратному снижению значений начальной скорости реакции метилирования (V₀) относительно дуплекса CG/GM (рис. 4а, табл. 3). Введение ³G, расположенного напротив целевого цитозина (CG/³GM) или с 5'-стороны от CpG-сайта (³GCG/GM) увеличивало V₀ в 1,4 раза.

Таблица 3. Начальные скорости реакции метилирования и параметры комплексообразования ³G-ДНК и МТазы Dnmt3а-CD.

ДНК-дуплекс	V ₀ ± SD ^б , нМ/мин	V _{отн} ^в	K _d ± SD (нМ)	Коэффициент Хилла (n)	
VI	CG/GM	2,2 ± 0,2	1	59 ± 19	1,9
VII	C ³ G/GM	1,2 ± 0,1	0,5	77 ± 14	1,5
VIII	CG/ ³ GM	3,0 ± 0,4	1,4	80 ± 12	1,8
IX	³ GCG/GM	2,8 ± 0,3	1,3	75 ± 3	1,8
X	CG-CG/GM-GM	6 ± 2	1	40 ± 20	1,7
XI	CG-C ³ G/GM-GM	1,9 ± 0,3	0,3	67 ± 19	1,6
XII	C ³ G-C ³ G/GM-GM	2,5 ± 0,3	0,4	106 ± 30	1,5

^б Абсолютные начальные скорости приведены с указанием стандартных отклонений минимум 3 независимых повторов. ^в Относительные скорости метилирования V_{отн} получены делением V₀ каждого ³G-содержащего дуплекса на V₀ соответствующего базового дуплекса. ^г Константы диссоциации комплексов Dnmt3а-CD с FAM-мечеными ³G-ДНК в присутствии AdoHcy.

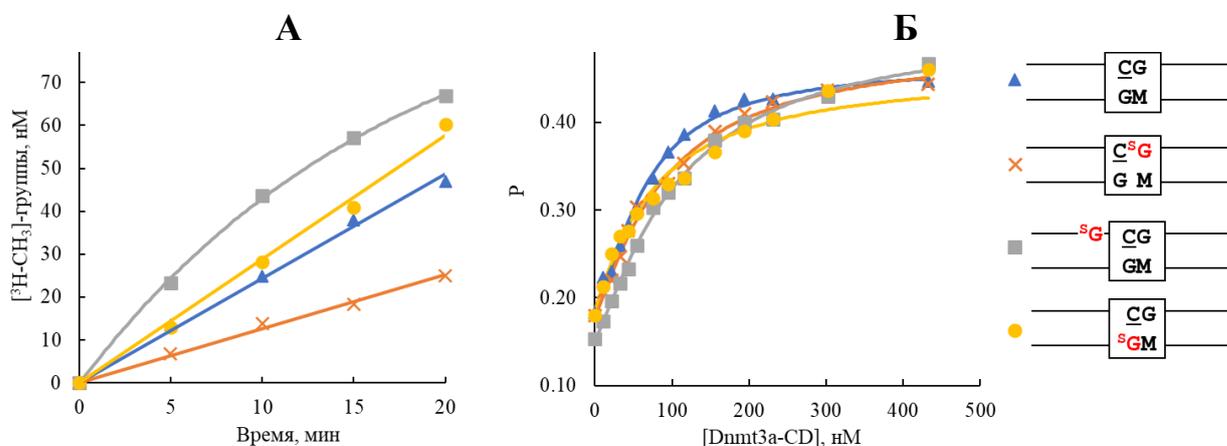


Рис. 4. Свойства односайтовых ³G-ДНК как субстратов Dnmt3а-CD. (а) Пример кинетики метилирования CG/GM и ³G-ДНК МТазой Dnmt3а-CD. (б) Кривые связывания ³G-ДНК с Dnmt3а-CD, полученные методом поляризации флуоресценции при титровании 10 нМ FAM-меченных ДНК дуплексов и ³G-ДНК (табл. 1, VI-IXf) МТазой Dnmt3а-CD. Смеси содержали 0-450 нМ Dnmt3а-CD, 0,1 мМ AdoHcy. P – поляризация флуоресценции. Мы предположили, что изменения в метилировании ³G-ДНК могут объясняться затруднением связывания Dnmt3а-CD с ³G-ДНК. Для проверки этой гипотезы мы провели измерения комплексообразования Dnmt3а-CD с FAM-мечеными ³G-ДНК (табл. 1, VI-IXf) методом поляризации флуоресценции (рис. 4б) в присутствии AdoHcy. Значения констант диссоциации (K_d) находились в диапазоне 60–80 нМ для CG/GMf и ³G-ДНК (табл. 3). Следовательно, включение ³G не влияло на комплексообразование Dnmt3а-CD с 30-звенными дуплексами.

Снижение V_0 в случае $C^S G/GM$ может объясняться тем, что замена кислорода в 6 положении гуанина на серу препятствует контакту аргинина R836 Dnmt3a-CD с гуанином, важному для образования каталитически компетентного комплекса Dnmt3a-CD/ДНК (текст диссертации, схема 2). Увеличение V_0 в случае $CG/S^S GM$ и $S^S GCG/GM$, скорее всего, связано с дестабилизацией пары $C^S \cdot S^S G$, что может способствовать выведению цитозина-мишени из двойной спирали ДНК.

Учитывая возможность встраивания $S^S G$ в различные положения вблизи CpG-сайта, мы сконструировали ряд односайтовых ДНК-дуплексов, содержащих $S^S G$ вне CpG-сайта на различном расстоянии от него (табл. 1, XIII-XVII). Значения V_0 метилирования таких дуплексов составили 10–50% от V_0 немодифицированного дуплекса CG/GM . Ухудшение метилирования таких дуплексов может быть вызвано дестабилизацией ДНК-дуплекса и нарушением важных ДНК-белковых взаимодействий, необходимых для образования активного комплекса $S^S G$ -ДНК с тетрамером Dnmt3a, а также высокой чувствительностью Dnmt3a к нуклеотидным последовательностям, примыкающим к CpG-сайту (Jurkowska et al, 2011).

$S^S G$ -ДНК с двумя CpG-сайтами.

Учитывая возможность метилирования тетрамером Dnmt3a двух CpG-сайтов, разделенных 8-14 п.н., был поставлен вопрос, как встраивание $S^S G$ в соседние CpG-сайты, разделенные 9 п.н., влияет на метилирование этих сайтов МТазой Dnmt3a. Введение $S^S G$ в один ($CG-C^S G/GM-GM$) или оба ($C^S G-C^S G/GM-GM$) сайта вызывает 3,2- и 2,4-кратное снижение значений $V_{отн}$, соответственно (рис. 5, табл. 3, X-XII). Эти эффекты были аналогичны тем, которые наблюдались для односайтового дуплекса $C^S G/GM$. Значения K_d составляли 67 и 106 нМ для FAM-меченных дуплексов $CG-C^S G/GM-GMf$ и $C^S G-C^S G/GM-GMf$, соответственно (рис. 5 и табл. 3). Следовательно, как и в случае односайтовых $S^S G$ -ДНК, включение $S^S G$ в двухсайтовые субстраты ухудшало метилирование ДНК, но не влияло на стабильность фермент-субстратных комплексов. Это также может быть связано с нарушением контакта Dnmt3a-CD с атомом гуанина O6. В рамках нашей модельной системы, для дуплексов с данной конфигурацией остатков m5C увеличение числа замен G на $S^S G$ не приводило к дальнейшему уменьшению V_0 реакции метилирования.

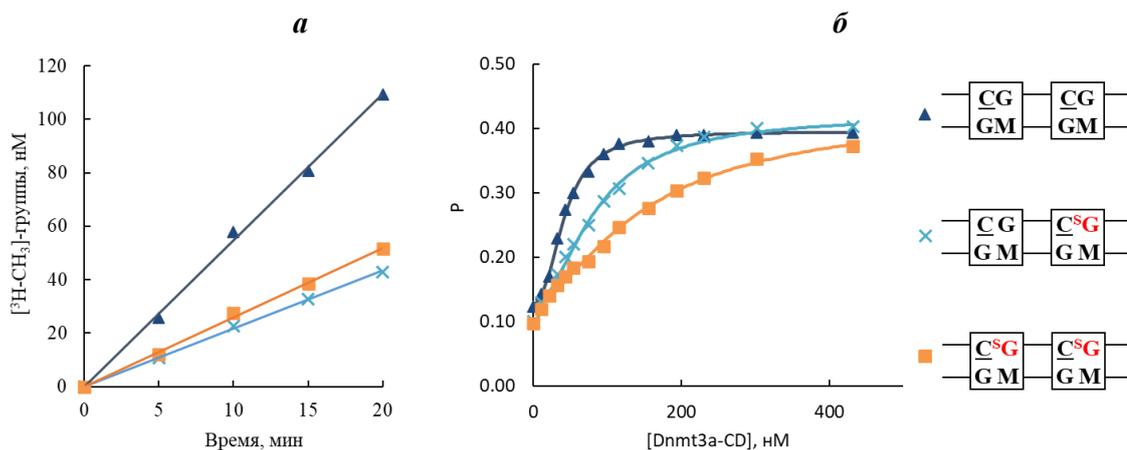


Рис. 5. Свойства двухсайтовых $S^S G$ -ДНК как субстратов Dnmt3a-CD. (а) Пример кинетики метилирования мкМ $CG-CG/GM-GM$ и $S^S G$ -ДНК (табл. 1, X-XII) МТазой Dnmt3a-CD. (б) Комплексообразование $S^S G$ -ДНК с Dnmt3a-CD. P – поляризация флуоресценции.

Конформационные переходы в комплексах МТаз с $S^S G$ -ДНК

Одной из ключевых стадий реакции метилирования являются конформационные изменения в ДНК-субстрате, а именно выведение цитозина-мишени из состава двойной спирали. Поэтому

следующей задачей стало исследование возможности влияния остатка ^SG на конформационные изменения в комплексах ^SG -ДНК с Dnmt3a-CD. Наличие у остатка ^SG поглощения в длинноволновой области (340 нм) позволяет детектировать методом КД конформационные переходы в ДНК близи остатка ^SG , в области, где остальные основания и белки оптически прозрачны (рис. 6А). Для опытов с Dnmt3a-CD использовались ^SG -ДНК-дуплексы, содержавшие остатки ^SG с 3'- или 5'- стороны от цитозина-мишени, а также напротив него (табл. 1, XIX-XXI).

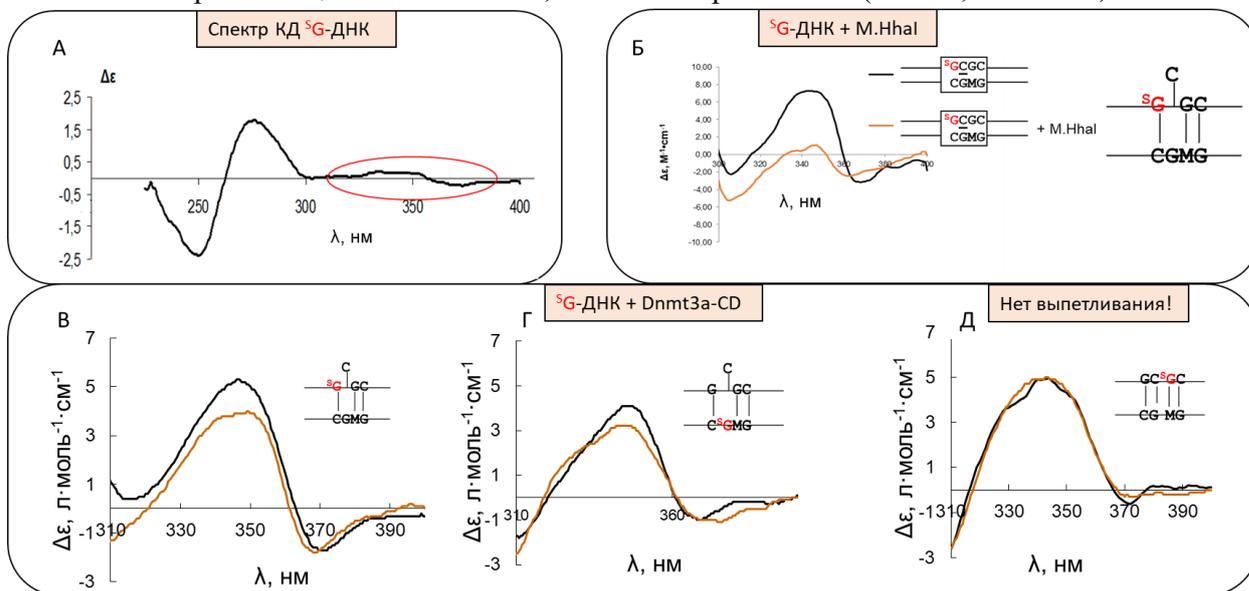


Рис. 6. Спектры КД 30-звенных ДНК-дуплексов и их комплексов с Dnmt3a-CD (дуплексы $\text{C}^S\text{G-CG/GM-GM}$, $^S\text{GCG-CG/GM-GM}$ и $\text{CG-CG}^S\text{GM-GM}$). Сплошной линией показан спектр ^SG -ДНК-дуплекса, пунктиром – спектр комплекса ^SG -ДНК-Dnmt3a-CD. Показаны схемы выведения цитозина-мишени из двойной спирали ДНК.

Спектр КД ^SG -содержащего ДНК-дуплекса $\text{C}^S\text{G-C}^S\text{G/GM-GM}$ имел положительный максимум в области 340 нм и отрицательный – около 370 нм (рис. 6Б, черная линия). При ранее доказанном выпетливании цитозина-мишени из двойной спирали ДНК прокариотической МТазой M.HhaI, наблюдалось исчезновение КД при 340 нм (рис. 6Б, оранжевая линия). Аналогичный, но менее выраженный эффект мы наблюдали и для ^SG -ДНК (рис. 6В,Г), за исключением дуплекса $\text{C}^S\text{G/GM}$, у которого ^SG располагался в CpG-сайте, и который метилировался хуже остальных (рис. 6Д). Следовательно, затруднение метилирования такого дуплекса может быть объяснено торможением ферментативной реакции на стадии выпетливания цитозина из двойной спирали.

Полученные данные указывают на возможность влияния ^SG , встроенного в область CpG-сайта, так и в примыкающие к нему нуклеотидные последовательности, на работу Dnmt3a, а следовательно, и на биологические процессы, зависящие от уровня и профиля метилирования ДНК. Учитывая, что (1) встраивание ^SG в нуклеотидную последовательность, примыкающую к CpG-сайту, приводило исключительно к уменьшению эффективности метилирования в той или иной степени, а также (2) значительное число возможностей такого расположения ^SG относительно CpG-сайтов в ДНК, можно сделать вывод о том, что в среднем, при случайном встраивании в ДНК, ^SG должен ухудшать эффективность метилирования. Этот вывод хорошо согласуется с данными о снижении уровня метилирования в клетках, обработанных ^SG .

Препараты, связывающиеся с ДНК

Многие эффективные противоопухолевые препараты способны связываться с ДНК по различным механизмам. Нами было выдвинуто предположение о возможном влиянии этих

веществ на функционирование Dnmt3a. Мы выбрали некоторые из этих соединений, опираясь на информацию о способе их связывания с ДНК, и изучили их влияние на метилирование ДНК, а также механизм таких эффектов.

Оливомицин А и оливаמיד

Цитотоксическое действие противоопухолевых антибиотиков группы ауреоловой кислоты (АК) основано прежде всего на их способности связываться с малой бороздкой ДНК и ингибировать Sp1-зависимую транскрипцию. Следующими объектами данного исследования стали антибиотики группы АК оливомицин А и его полусинтетический аналог оливаמיד. Мы изучили влияние этих препаратов на метилирование ДНК, а также на отдельные стадии этой реакции. В качестве ДНК-субстратов использовали немодифицированные и FAM-меченные дуплексы (табл. 1, **I** и **If**), в которых четыре последовательные GC-пары составляют сайт связывания оливомицина, а сайт CpG может метилироваться МТазой Dnmt3a-CD.

Влияние оливомицина А и оливамида на метилирование ДНК.

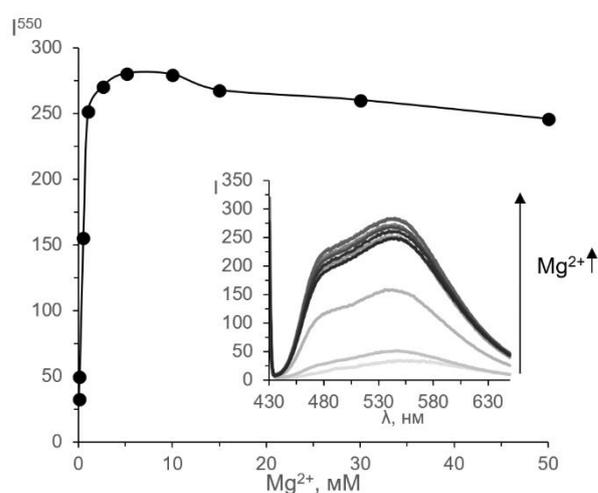


Рис. 7. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса оливомицина А с CG/GC при 550 нм (I^{550}) от концентрации Mg^{2+} . На вставке - спектры флуоресценции комплекса оливомицина А с CG/GC при 0-50 мМ Mg^{2+} (300 нМ CG/GC, 5 мкМ оливомицина А).

Поскольку для связывания оливомицина А с ДНК требуется присутствие ионов Mg^{2+} , была определена оптимальная концентрация Mg^{2+} , при которой возможно комплексобразование оливомицина А с ДНК, а Dnmt3a-CD сохраняет активность. Мы использовали тот факт, что интенсивность флуоресценции оливомицина А увеличивается при его связывании с ДНК. Спектры флуоресценции оливомицина А регистрировали в присутствии CG/GC при различных концентрациях Mg^{2+} (рис. 7).

При увеличении концентрации Mg^{2+} от 0 до 5 мМ интенсивность флуоресценции оливомицина А при 550 нм увеличивалась и достигала плато при 2,5 мМ, что свидетельствует о том, что при этой концентрации Mg^{2+} все участки связывания на ДНК были заняты антибиотиком. Во всех дальнейших экспериментах кон-

центрация Mg^{2+} составляла 3 мМ.

Влияние оливомицина А и оливамида на метилирование ДНК мы изучили по защите метилированной ДНК от расщепления эндонуклеазой Hin6I. Для формирования комплекса ДНК с оливомицином А или оливаמידом FAM-меченный дуплекс fCG/GCf (табл. 1, **If**) инкубировался в течение 1 ч с соответствующим антибиотиком в присутствии Mg^{2+} с последующим метилированием дуплексов МТазой Dnmt3a. Дуплекс fCG/GCf расщеплялся эндонуклеазой Hin6I в течение 1 ч при 37 °С (без замены буфера) с образованием 14-звенного флуоресцентного продукта.

Присутствие 3 мМ Mg^{2+} не влияло на активность Dnmt3a-CD (рис. 8а, дор. 3). Степень метилирования ДНК снижалась при добавлении оливомицина А в реакционную смесь (рис. 8а, дорожки 4-13). Значение IC_{50} , составило 6 ± 1 мкМ. Метилирование ДНК в присутствии оливамида изучали аналогично (рис. 8б). Оливаמיד ингибировал метилирование ДНК с IC_{50} $7,1 \pm 0,7$ мкМ.

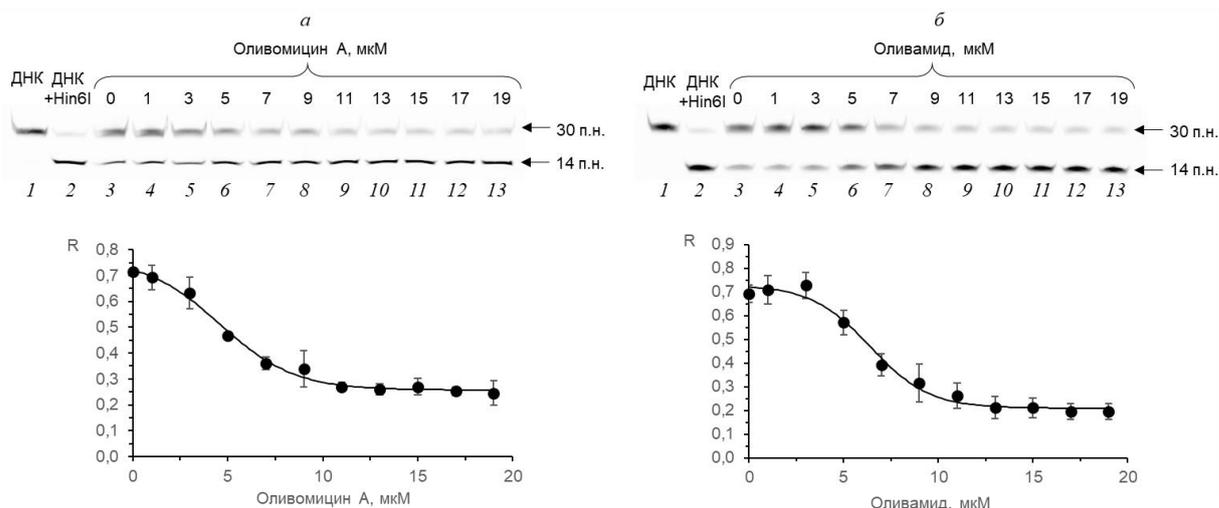


Рис. 8. Влияние оливомицина А (а) и оливамида (б) на метилирование ДНК. Верхняя панель: расщепление fCG/GCf эндонуклеазой Hin6I после метилирования МТазой Dnmt3a-CD в присутствии 0-19 мкМ оливомицина А или оливамида (дорожки 3-13) в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Дуплекс fCG/GCf (дорожка 1) и продукты его гидролиза Hin6I (дорожка 2) показаны в качестве контролей. Нижняя панель: зависимость степени метилирования ДНК (R) от концентрации оливомицина А и оливамида. Условия: 300 нМ fCG/GCf, 3 мМ Mg²⁺, 25 мкМ AdoMet.

Степень метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD в присутствии >10 мкМ оливомицина А и оливамида составляла ~ 20% от максимально возможной. Таким образом, локализация различных объемных лигандов в малой бороздке ДНК существенно сказывается на работе Dnmt3a-CD, приводя к ингибированию реакции метилирования.

Комплексообразование ДНК с Dnmt3a-CD в присутствии оливомицина А и оливамида.

Чтобы определить, на какую именно стадию реакции метилирования влияют исследуемые антибиотики, мы изучили влияние оливомицина А на образование фермент-субстратного комплекса. Влияние оливомицина А и оливамида на связывание Dnmt3a-CD с ДНК-субстратом оценивали по поляризации флуоресценции FAM-меченого дуплекса fCG/GCf в присутствии AdoHcy (рис. 9).

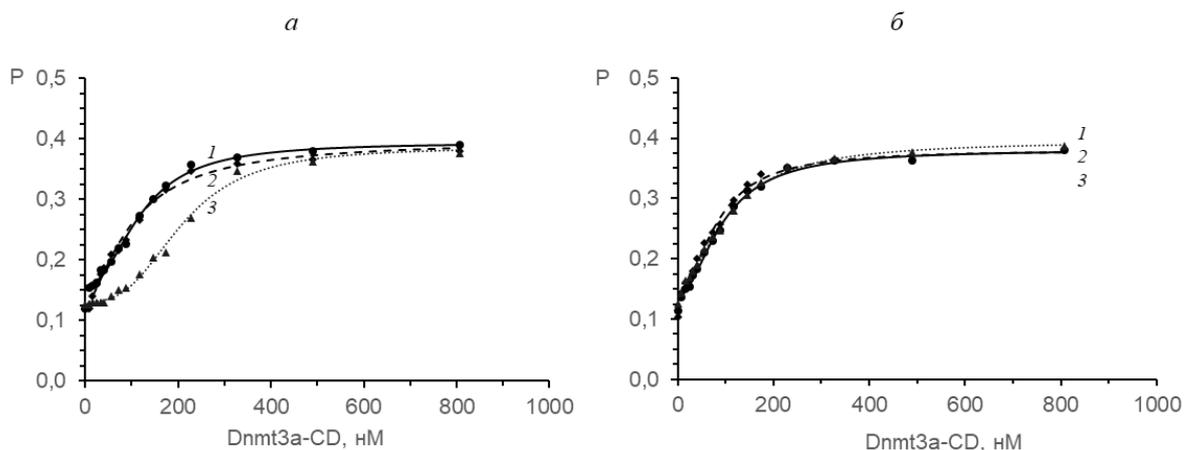


Рис. 9. Кривые связывание FAM-меченных дуплексов fCG/GCf с Dnmt3a-CD в присутствии 0-15 мкМ оливомицина А (а) или оливамида (б), полученные методом поляризации флуоресценции: 1) 0 мкМ; 2) 5 мкМ; 3) 15 мкМ оливомицина А или оливамида. Условия: 10 нМ fCG/GCf, 3 мМ Mg²⁺, 100 мкМ AdoHcy.

Таблица 4. Влияние оливомицина А и оливамида на связывание fCG/GCf с Dnmt3a-CD.

Соединение	K _d , нМ			Коэффициент Хилла (n)		
	Концентрация антибиотика, мкМ					
	0	5	15	0	5	15
Оливомицин А	110 ± 13	101 ± 8	180 ± 39	1,8 ± 0,4	1,6 ± 0,2	2,7 ± 0,3
Оливамид	95 ± 3	88 ± 8	115 ± 17	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2

Значения K_d и n представлены с указанием стандартных отклонений трех независимых экспериментов.

K_d комплексов Dnmt3a-CD с ДНК существенно не изменялись при добавлении 5 и 15 мкМ оливомицина А или оливамида (табл. 4), то есть ни оливомицин А, ни оливамид заметно не нарушали связывание фермента с ДНК-дуплексом.

Образование ковалентных интермедиатов ДНК-(Dnmt3a-CD) в присутствии оливомицина А.

Далее мы изучили влияние оливомицина А на другую ключевую стадию реакции метилирования - образование ковалентного интермедиата, происходящее при нуклеофильной атаке цитозина-мишени по положению С6 высококонсервативным цистеиновым остатком активного центра Dnmt3a-CD. Промежуточное соединение нестабильно и быстро разлагается с высвобождением ДНК-дуплекса, содержащего остаток 5-метилцитозина. Ранее было показано, что FAM-меченные ДНК-дуплексы, содержащие пиримидин-2-он (Z) вместо цитозина-мишени (Z-ДНК), образуют значительно более стабильные ковалентные интермедиаты с МТазами Dnmt3a. Мы использовали 18-звенные ДНК-дуплексы (табл. 1, **XXIII**-**XXVf**), меченные FAM на 5'-концах и содержащие остаток Z, либо расположенный вблизи сайта CpG (CGZ/GCf), либо заменяющий один из цитозинов-мишеней (fCG/GZ). Дуплексы инкубировали с Dnmt3a-CD в течение 1 ч при 4°C, а затем реакционные смеси анализировали в 12% ПААГ с 0,1% SDS (рис. 10).

Прокариотическую МТазу M.HhaI использовали в качестве положительного контроля для об-

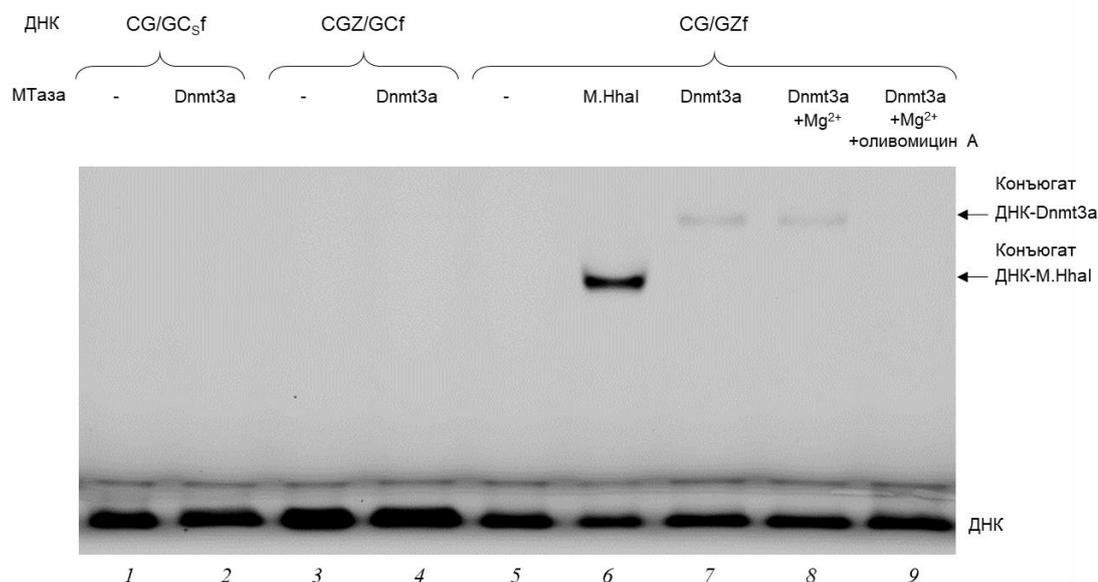


Рис. 10. Влияние оливомицина А на образование ковалентных интермедиатов (конъюгатов) Dnmt3a-CD с Z-ДНК. Реакционные смеси содержали 300 нМ ДНК-дуплекса fCG/GC_{sf} (дор. 1, 2), CGZ/GCf (дор. 3, 4) или fCG/GZ (дор. 5, 9), 6 мкМ Dnmt3a-CD (дор. 2, 4, 7, 8, 9) или M.HhaI (дор. 6), 100 мкМ AdoHcy (дор. 19), 3 мМ Mg²⁺ (дор. 8, 9) и 10 мкМ оливомицин А (дор. 9). 12% ПААГ с 0,1% SDS.

разования ковалентного промежуточного соединения (рис. 10, дор. 6). Дуплексы, не содержавшие Z (fCG/GC_{sf}) или содержавшие Z вблизи сайта CpG (CGZ/GCf), не образовывали стабильных ковалентных промежуточных соединений (рис. 10, дор. 2 и 4). fCG/GZ образовывал ковалентное промежуточное соединение с Dnmt3a CD, в том числе в присутствии 3 мМ Mg²⁺, необходимого для связывания оливомицина А с ДНК (рис. 10, дор. 8). При добавлении оливомицина

А в реакционную смесь перед добавлением Dnmt3a-CD, образования интермедиата не наблюдалось (рис. 10, дор. 7 и 9). Следовательно, оливомицин А предотвращал образование ковалентного интермедиата в реакционной смеси.

О возможности комплексообразования оливомицина А с Dnmt3a-CD.

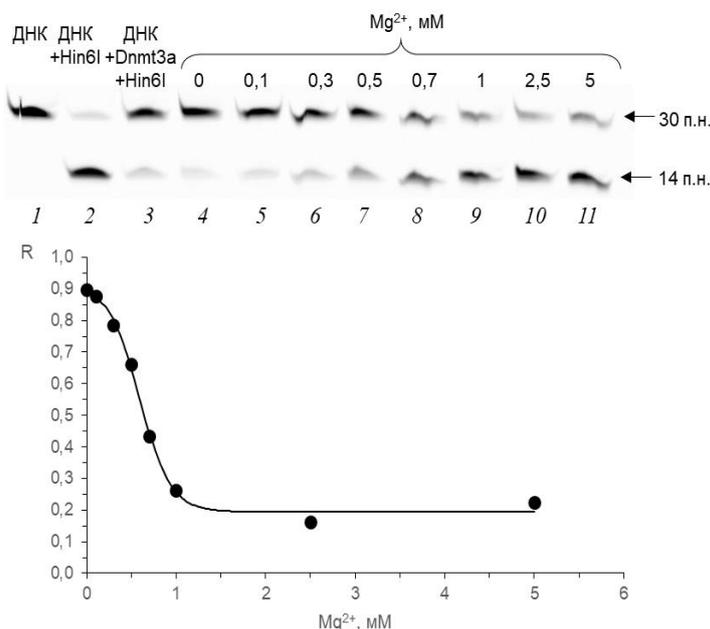


Рис. 11. Влияние Mg^{2+} на функционирование Dnmt3a-CD в присутствии оливомицина А. Верхняя панель: расщепление 300 нм ДНК-дуплекса fCG/GCf эндонуклеазой Hin6I после метилирования ДНК с помощью Dnmt3a-CD в присутствии 10 мкМ оливомицина А и 0-5 мМ Mg^{2+} . 20% ПААГ с 7М мочевиной. Нижняя панель: зависимость эффективности метилирования от концентрации Mg^{2+} .

димы для образования димеров оливомицина А, которые затем могут связываться с GC-парами в ДНК, в отсутствие возможности образования димеров ингибирование метилирования отсутствовало. Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что влияние оливомицина А на метилирование ДНК нельзя объяснить связыванием антибиотика с Dnmt3a-CD.

Полученные данные о комплексообразовании Dnmt3a-CD с fCG/GCf позволяют заключить, что оливомицин А и оливаמיד не препятствуют образованию фермент-субстратного комплекса. Анализ Z-содержащих дуплексов показал, что в присутствии оливомицина А образования ковалентного интермедиата Dnmt3a-CD с ДНК не происходило. Учитывая важность контактов Dnmt3a с малой бороздкой ДНК, невозможность образования конъюгата с Z-содержащей ДНК в присутствии оливомицина А можно объяснить нарушением контактов между каталитической петлей Dnmt3a и группами атомов гетероциклических оснований, экспонированных в малую бороздку. Это, в свою очередь, может привести к ингибированию других стадий метилирования. Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможном эпигенетическом вкладе в механизм противоопухолевого действия антибиотиков группы АК, включающем ингибирование Dnmt3a.

Кураксин СВL0137 и доксорубицин

Недавно охарактеризованный СВL0137 является представителем нового класса эффективных противоопухолевых соединений на основе карбазола. Нами было выдвинуто

предположение о возможном влиянии CBL0137 на функционирование Dnmt3a-CD. CBL0137 связывается с ДНК путем интеркалирования между парами оснований, при этом N-содержащая боковая цепь кураксина располагается в малой бороздке ДНК. Известные аспекты механизма его противоопухолевого действия включают нарушение структуры хроматина и пространственной организации генома. Мы также изучили ДНК-интеркалятор доксорубицин - один из наиболее типичных противоопухолевых препаратов, используемых в клинической практике.

CBL0137 связывается преимущественно с АТ-богатыми последовательностями (Safina et al, 2017). Мы использовали немодифицированные и FAM-меченные ДНК-дуплексы (табл. 1, **I** и **If**) и еще один дуплекс с повышенным содержанием А·Т-пар - fCG/GC_{ATf} (**XXVf**). ДНК-дуплексы fCG/GCf и fCG/GC_{ATf} содержали 17 и 22 А·Т-пары, соответственно. Во-первых, было изучено комплексообразование CBL0137 с обоими ДНК-дуплексами в отсутствие Dnmt3a-CD с помощью метода поляризации флуоресценции (рис. 12). Значение поляризации флуоресценции (P) исследуемых дуплексов увеличивалось при титровании их CBL0137. Константы диссоциации (K_d) комплексов CBL0137-ДНК составляли 20 ± 5 мкМ с дуплексом fCG/GCf и 34 ± 2 мкМ с дуплексом fCG/GC_{ATf}, соответственно, что свидетельствует о незначительной разнице в прочности этих комплексов.

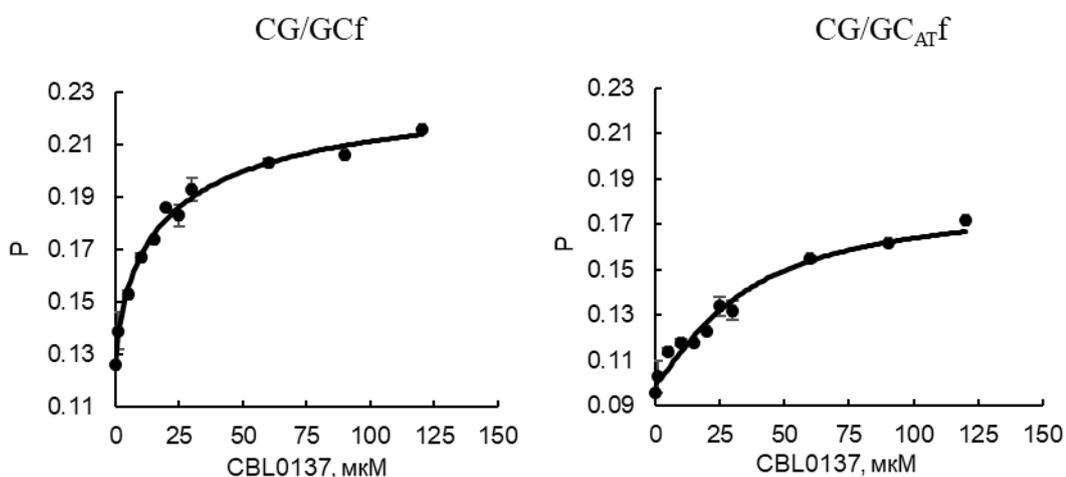


Рис. 12. Связывание CBL0137 с ДНК, исследованное методом поляризации флуоресценции (P). Титрование 10 нМ ДНК-дуплекса fCG/GCf или fCG/GC_{ATf} кураксином CBL0137 0–120 мкМ.

CBL0137 в области концентраций более 40 мкМ ингибировал активность эндонуклеазы Hn1b1 (текст диссертации, рис. 34). В связи с этим, в протокол эксперимента по метилированию ДНК-дуплексов в присутствии CBL0137 была внесена стадия выделения ДНК из реакционной смеси с заменой буфера.

Далее было показано, что CBL0137 и доксорубицин ингибируют метилирование обоих дуплексов МТазой Dnmt3a-CD в микромолярных концентрациях (рис. 13 и табл. 5). Активность Dnmt3a-CD на дуплексах fCG/GCf и fCG/GC_{ATf} была снижена до 85% и 70% соответственно, что указывает на немного более сильное ингибирующее действие CBL0137 на дуплекс fCG/GCf по сравнению с А·Т-богатым дуплексом fCG/GC_{ATf}. Доксорубицин оказался более слабым ингибитором метилирования ДНК, чем CBL0137 (рис. 13В, табл. 5), о чем свидетельствует более низкое значение ΔR (51%).

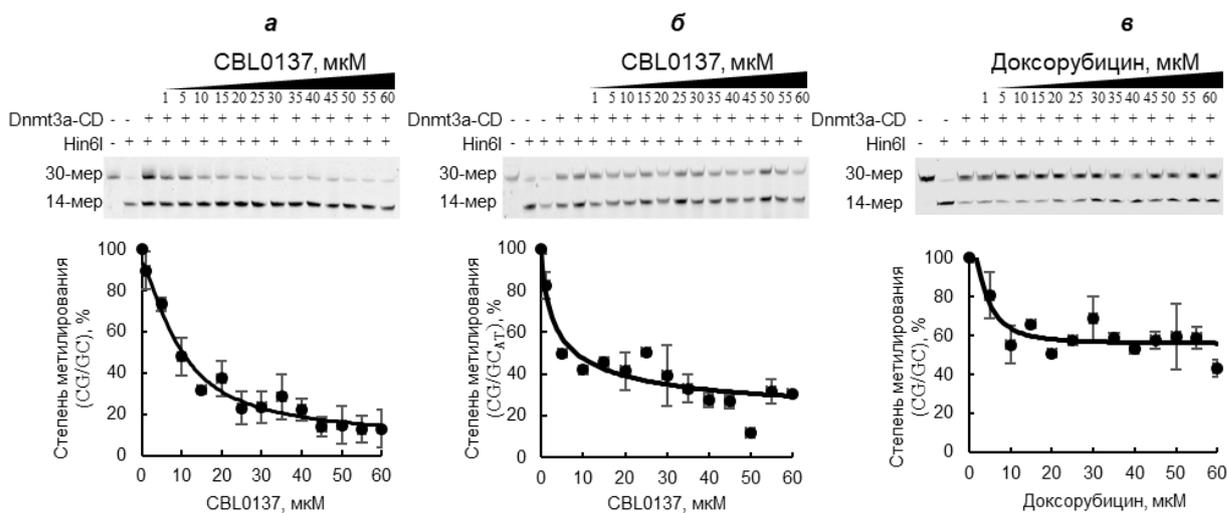


Рис. 13. Влияние CBL0137 и доксорубина на метилирование ДНК. Верхняя панель: расщепление ДНК-дуплексов (0,3 мкМ) эндонуклеазой *Hin6I* после их метилирования 2 мкМ *Dnmt3a-CD* в присутствии 25 мкМ *AdoMet* и CBL0137 (*a*: дуплекс fCG/GCf; *б*: дуплекс fCG/GCATf) или доксорубина (*в*, дуплекс fCG/GCf). 20% ПААГ с 7М мочевиной. Нижняя панель: зависимость эффективности метилирования от концентрации препарата.

Таблица 5. Ингибирование метилирования ДНК-дуплексов fCG/GCf и fCG/GCATf МТазой *Dnmt3a-CD* в присутствии CBL0137 или доксорубина.

Соединение	ДНК-дуплекс	IC ₅₀ , мкМ ^а	ΔR, % ^б
CBL0137	fCG/GCf	9 ± 2	85
	fCG/GCATf	3 ± 1	70
Доксорубин	fCG/GCf	5 ± 2	51

^а IC₅₀ ± SEM; ^б уменьшение степени метилирования ДНК при наивысшей исследованной концентрации препарата (60 μM).

Далее было изучено влияние CBL0137 на связывание *Dnmt3a-CD* с дуплексами fCG/GCf и fCG/GCATf с помощью метода поляризации флуоресценции (рис. 14). FAM-меченные дуплексы fCG/GCf и fCG/GCATf инкубировали с различными концентрациями CBL0137 (0, 5, 15 или 30 мкМ) в течение 30 мин, а затем титровали МТазой *Dnmt3a-CD* в присутствии *AdoHcy*.

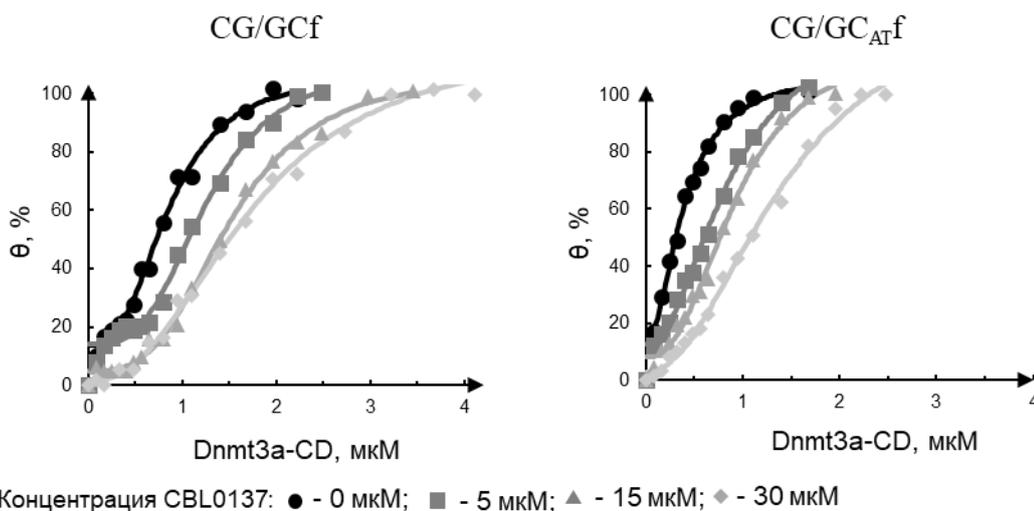


Рис. 14. Связывание FAM-меченных ДНК-дуплексов fCG/GCf и fCG/GCATf (10 нМ) с возрастающими количествами *Dnmt3a-CD* в присутствии CBL0137, изученное методом поляризации флуоресценции. θ - доля связанной ДНК, рассчитанная как $(P - P_0)/(P_{\max} - P_0)$, где P_0 и P_{\max} - значения поляризации флуоресценции для свободной и полностью связанной ДНК, соответственно.

Микромолярные значения K_d указывают на образование ДНК-белковых комплексов с обоими дуплексами. В отсутствие CBL0137 K_d комплекса составлял $0,9 \pm 0,1$ мкМ с дуплексом fCG/GCf и $0,4 \pm 0,1$ с дуплексом fCG/GC_{ATf}, что указывает на несколько более сильное связывание белка с дуплексом fCG/GC_{ATf}. При добавлении CBL0137 в реакционные смеси наблюдалось увеличение (до 4 раз) значений K_d ДНК-белковых комплексов, что указывало на снижение прочности комплексов с увеличением содержания CBL0137 в ДНК (рис. 14, табл. 6). В целом, наблюдаемое снижение эффективности метилирования обоих ДНК-дуплексов в присутствии CBL0137, возможно, является результатом дестабилизации ДНК-белковых комплексов.

Таблица 6. Связывание Dnmt3a-CD с ДНК-дуплексами в присутствии CBL0137 (0-30 мкМ).

CBL0137, мкМ	fCG/GCf		fCG/GC _{ATf}	
	K_d , мкМ	n	K_d , мкМ	n
0	$0,9 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,5$
5	$1,3 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,5$
15	$1,5 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,4$
30	$1,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$

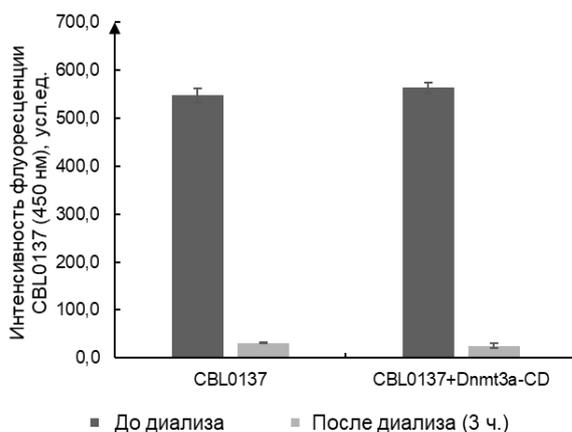


Рис. 15. Изучение связывания CBL0137 с Dnmt3a-CD методом диализа по собственной флуоресценции CBL0137. Планки погрешностей - SD 2-х повторяющихся экспериментов.

Возможность связывания CBL0137 с Dnmt3a-CD была исследована с использованием метода диализа (рис. 15). Смесь, содержащую 5 мкМ CBL0137 и Dnmt3a-CD, диализовали против буфера А (текст диссертации) в течение 3 ч. Затем концентрацию CBL0137 внутри диализной кассеты оценивали по флуоресценции кураксина (λ_{EX} 340 нм, λ_{EM} 450 нм). Флуоресценция CBL0137 уменьшилась примерно в 20 раз после диализа, аналогично контрольной смеси без Dnmt3a-CD, что позволяет предположить, что большая часть кураксина высвобождается из кассеты. Следовательно, связывания CBL0137 с Dnmt3a-CD не наблюдалось, и влияние CBL0137 на метилирование ДНК нельзя объяснить связыванием CBL0137 с Dnmt3a-CD.

Наши результаты показывают, что ингибирующий эффект CBL0137 вызван его способностью интеркалировать в ДНК. Модель комплекса CBL0137 с ДНК показывает, что интеркаляция карбазольного фрагмента существенно увеличивает расстояние между парами оснований, что приводит к раскручиванию ДНК. Мы предполагаем, что такие искажения могут приводить к ингибированию Dnmt3a в присутствии CBL0137. Кроме того, возможен вклад в ингибирующий эффект CBL0137 от присутствия N-содержащей боковой цепи кураксина в малой бороздке ДНК. Ингибирующее действие CBL0137 в случае ДНК-дуплекса fCG/GCf было таким же, как у малобороздочного антибиотика оливомицина А, и выше, чем у ДНК-интеркалятора доксорубицина.

Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что интеркалирующие в ДНК противоопухолевые препараты CBL0137 и доксорубицин могут влиять на эффективность метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD. Учитывая, что многие раковые клетки демонстрируют aberrантные профили метилирования ДНК и/или экспрессируют мутированные формы Dnmt3a, полученные результаты позволяют рассматривать Dnmt3a как одну из возможных клеточных мишеней для

интеркалирующих в ДНК противораковых препаратов. Учитывая, что кураксины изменяют пространственную организацию генома и нарушают взаимодействия промоторов с энхансерами, наши результаты могут дать представление об эпигенетических механизмах, лежащих в основе противоопухолевого эффекта CBL0137 и родственных соединений.

Реактивация генов-супрессоров опухолей с помощью CBL0137 и оливамида в клетках MCF7. Наличие ингибирующего эффекта CBL0137 и антибиотиков ряда АК в отношении Dnmt3a-CD *in vitro* позволило сделать предположение о влиянии этих препаратов на клеточные процессы, зависящие от степени метилирования ДНК, а именно на экспрессию эпигенетически “молчащих” генов. В качестве объектов изучения были выбраны гены-супрессоры опухолей, которые описаны в литературе как транскрипционно молчащие в клетках рака молочной железы MCF-7 благодаря гиперметилированию промоторных областей: *RUNX3* (runt-related transcription factor 3), *APC* (adenomatous polyposis coli), *RARB* (retinoic acid receptor, beta) и *PTEN* (phosphatase and tensin homolog). Клетки MCF-7 инкубировались с CBL0137 или оливамидом в течение 72 часов. Уровень мРНК определялся методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. В качестве контроля были использованы клетки, не подвергавшиеся воздействию противоопухолевых препаратов. Относительные уровни мРНК после инкубации клеток MCF7 с 0,1–0,5 мкМ CBL0137 и 0,1–0,4 мкМ оливамида представлены на рис. 16.

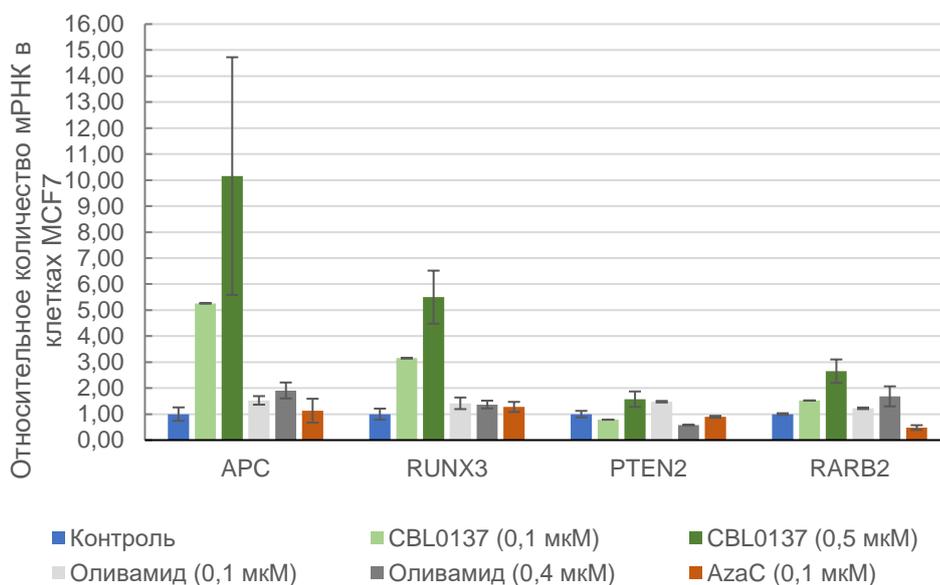


Рис. 16. Изменение уровня мРНК генов-супрессоров опухолей *APC*, *RUNX3*, *PTEN* и *RARB* в клетках MCF7 под действием различных концентраций CBL0137 и оливамида.

Для сравнения в одну из смесей для культивирования клеток добавили известный ингибитор метилирования ДНК 5-азациитидин (AzaC). Экспрессия всех исследованных генов увеличивалась при инкубации клеток с CBL0137 и оливамидом (табл. 7).

Таблица 7. Влияние CBL0137 и оливамида на уровень мРНК генов-супрессоров опухолей.

	Контроль	CBL0137		Оливамид		AzaC (0,1 мкМ)
		0,1 мкМ	0,5 мкМ	0,1 мкМ	0,4 мкМ	
APC	1,0±0,3	5,08	10±5	1,5±0,2	1,9±0,3	1,2±0,5
RUNX3	1,0±0,2	3,08	5±1	1,4±0,2	1,3±0,2	1,3±0,2
PTEN	1,0±0,1	0,78	1,6±0,3	1,47±0,03	0,57	0,89±0,04
RARB	1,00±0,03	1,52	2,7±0,5	1,22±0,03	1,7±0,4	0,49±0,09

Для исследованных генов, за исключением *RUNX3*, экспрессия увеличивалась больше, чем после инкубации клеток с AzaC. CBL0137 реактивировал выбранные гены сильнее, чем оливамид, а также приводил к значительно большему увеличению уровня мРНК *APC* и *RUNX3* в

сравнении с мРНК PTEN и RARB в обеих исследованных концентрациях. Уровень мРНК выбранных генов в клетках, обработанных оливамидом, увеличивался менее выражено. Учитывая эти данные, можно предположить, что CBL0137 и оливамид способны реактивировать данные гены-супрессоры опухолей в клетках MCF-7.

Заключение

Мы выбрали несколько противоопухолевых препаратов, руководствуясь только информацией об их связывании с ДНК. Наше исследование выявило, что все изученные нуклеозидные препараты в той или иной мере ингибируют МТазу Dnmt3a-CD с микромолярными значениями IC₅₀ за счет связывания с ДНК-дуплексами и не образуют комплексов с МТазой. Кроме того, аналог гуанина ^SG, как и традиционные нуклеозидные ингибиторы МТаз, также оказывал влияние на метилирование ДНК, причем эффект зависел от положения остатка ^SG в CpG-сайте или рядом с ним.

Полученные результаты позволяют предположить, что широкий круг ДНК-связывающих препаратов может проявлять ингибирующий эффект в отношении *de novo* МТазы Dnmt3a, что открывает возможность для лечения этими препаратами злокачественных заболеваний, сопряженных с нарушением активности Dnmt3a. Значительное число синтетических производных и аналогов препаратов, рассмотренных в данной работе, обеспечивает многообещающую основу для дальнейшей оптимизации этой новой группы ингибиторов Dnmt3a с потенциальной возможностью увеличения активности и снижения токсичности по сравнению с известными ингибиторами МТазы. Это особенно актуально в отношении таких типов опухолей, как, например, острый миелоидный лейкоз, сопровождающийся крайне высокой частотой мутаций Dnmt3a. Молекулярный механизм ингибирования Dnmt3a был различным для разных типов ДНК-связывающих препаратов. Как ДНК-интеркаляторы, так и малобороздочные ДНК-лиганды уменьшали активность Dnmt3a-CD, но самым сильным ингибитором МТазы стал кураксин CBL0137 – соединение, сочетающее оба механизма связывания с ДНК. Этот факт задает новое направление как для поиска эффективных ингибиторов МТаз, так и для характеристики уже известных препаратов с точки зрения их влияния на метилирование ДНК.

ВЫВОДЫ

1. Встраивание ^SG в CpG-сайт ведёт к увеличению или уменьшению скорости метилирования ДНК-дуплексов МТазой Dnmt3a-CD, в зависимости от взаимного расположения остатка ^SG и цитозина-мишени. Это может быть связано с облегчением или затруднением протекания ключевой стадии реакции метилирования - выведения цитозина-мишени из двойной спирали ДНК. Связывание Dnmt3a-CD с ^SG-ДНК не нарушалось.
2. Обнаружено, что наличие ^SG вне CpG-сайта на расстоянии до 9 п.н., приводит к ухудшению метилирования ДНК-дуплексов, что может быть связано с нарушением контактов тетрамера Dnmt3a с ДНК.
3. Показано, что малобороздочные ДНК-лиганды оливомицин А и оливамид способны ингибировать Dnmt3a со значениями IC₅₀, составившими 6 ± 1 мкМ и $7,1 \pm 0,7$ мкМ соответственно, не затрудняя образование специфического фермент-субстратного комплекса. Ингибирующий эффект этих соединений может быть связан с нарушением движения каталитической петли фермента через малую бороздку ДНК – стадии реакции метилирования, предшествующей образованию ковалентной связи фермента с ДНК.
4. Новый противоопухолевый препарат кураксин CBL0137 эффективно ингибирует реакцию метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD за счет интеркаляции между парами оснований, нарушения структуры двойной спирали вблизи CpG-сайта и дестабилизации фермент-

субстратного комплекса. Ингибирующий эффект CBL0137 был более выраженным в сравнении с традиционным ДНК-интеркалятором доксорубицином.

5. Показано, что кураксин CBL0137 и оливаמיד способны увеличивать уровень мРНК генов, экспрессия которых эпигенетически подавлена в клетках рака молочной железы MCF-7.
6. На основании результатов работы можно сделать вывод о возможном эпигенетическом вкладе в механизм противоопухолевого действия исследованных препаратов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные результаты диссертационной работы представлены в 4 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus.

1. Kirsanova O. V., **Sergeev A. V.**, Yasko I.S., Gromova E.S. The impact of 6-thioguanine incorporation into DNA on the function of DNA methyltransferase Dnmt3a // *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids*. Taylor and Francis Inc., 2017. Vol. 36, № 6. P. 392–405. Импакт-фактор: 1,598 (2019, Scopus).
2. **Сергеев А.В.**, Кирсанова О.В., Лойко А.Г., Номероцкая Е.И., Громова Е.С. Определение степени метилирования ДНК метилтрансферазой Dnmt3a с использованием метилзависимых эндонуклеаз рестрикции // *Молекулярная биология*. 2018. Vol. 52, № 2. P. 318–325. Импакт-фактор: 0,598 (2019, Scopus).
3. **Сергеев А.В.**, Тевяшова А.Н., Воробьев А.П., Громова Е.С. Влияние противоопухолевого антибиотика оливомицина А и нового полусинтетического производного, оливамида, на функционирование ДНК-метилтрансферазы мыши Dnmt3a // *Биохимия*. 2019. Vol. 84, № 2. P. 229–239. Импакт-фактор: 2,028 (2019, Scopus).
4. **Sergeev A.**, Vorobyov A., Yakubovskaya M., Kirsanova O., Gromova E.S. Novel anticancer drug curaxin CBL0137 impairs DNA methylation by eukaryotic DNA methyltransferase Dnmt3a // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 30, № 16. P. 127296. Импакт-фактор: 2,644 (2019, Scopus).

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. Gromova, E. S., Kirsanova, O. V., **Sergeev, A. V.**, Arutyunyan, A. M.. Murine DNA methyltransferase Dnmt3a: Interaction with damaged DNA substrates. *Book of abstracts of International conference BIOCATALYSIS-2015: fundamentals & applications*. 2015, Moscow region, Russia, 44–46.
2. Gromova, E. S., Kirsanova, O. V., **Sergeev, A. V.**, Minero, A. S., Lukashovich, O. V., Cherepanova, N. A., Kolbanovskiy, A., and Geacintov, N. E.. Impact of guanine damage on DNA methylation by Dnmt3a. *Materials of The Seventh NEB Meeting on DNA Restriction and Modification, August 24-29, 2015, Gdańsk, Poland*. 2015, 40–41. Gdańsk, Poland.
3. **Sergeev, A.**, Tevyashova, A., and Gromova, E.. Epigenetic aspect of function of a promising anticancer drug olivomycin a. In *Abstracts of the 43rd FEBS Congress (Prague, Czech Republic, 7-12 July 2018)*, *FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1)*. 2018, P.01–012–Wed.
4. **Сергеев, А. В.** Структурные изменения в комплексах ДНК-метилтрансферазы мыши Dnmt3a с ДНК, содержащими модифицированные основания. *Материалы Международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2015, Секция Химия*. 2015. МАКС Пресс Москва.
5. **Сергеев, А. В.** Влияние противоопухолевого препарата оливомицина А на метилирование ДНК. *Материалы IX научной конференции молодых ученых Инновации в химии: достижения и перспективы*. 2018. 1, 996. Перо Москва.
6. **Сергеев, А. В.**, Кирсанова, О. В., Громова, Е. С. Метилзависимые эндонуклеазы как инструмент определения активности эукариотической ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a. *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2017. 9 (спецвыпуск-2017):139–140.