

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Сергеев Александр Вячеславович

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

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н., проф. Громова Е.С

Москва 2021

Содержание

Содержание	2
Список сокращений.....	3
Введение	4
Глава 1. Противоопухолевые препараты, взаимодействующие с ДНК (Обзор литературы).....	11
Нуклеозидные препараты	12
Зебуларин.....	13
6-тиогуанин.....	14
Ненуклеозидные ДНК-связывающие препараты	18
Препараты, связывающиеся с бороздками ДНК	18
Препараты, интеркалирующие в ДНК	27
Глава 2. Влияние противоопухолевых препаратов, взаимодействующих с ДНК, на функционирование ДНК-метилтрансфераз (Результаты и обсуждение).....	40
ДНК-метилтрансфераза Dnmt3a.....	40
Выделение и очистка Dnmt3a-CD.....	43
Разработка метода определения степени метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD с использованием эндонуклеаз рестрикции	44
Влияние противоопухолевых препаратов на метилирование ДНК.....	51
6-тиогуанин (3G).....	51
Оливомицин А и оливамид.....	64
Кураксин CBL0137 и доксорубицин	72
Реактивация генов-супрессоров опухолей с помощью CBL0137 и оливамида в клетках MCF7	79
Заключение	80
Глава 3. Экспериментальная часть.	83
Реактивы и материалы	83
Приборы и методы.....	84
Методики.....	86
Выделение белковых препаратов.....	86
Формирование ДНК-дуплексов.....	87
Определение концентраций активных молекул Dnmt3a-CD с помощью метода поляризации флуоресценции	87
Метилирование ДНК с использованием [3H -CH $_3$]AdoMet.....	87
Метилирование ДНК с использованием эндонуклеаз рестрикции	88
Определение K_d комплексов Dnmt3a-CD с ДНК в присутствии AdoHcy методом поляризации флуоресценции	88
Регистрация спектров кругового дихроизма	89
Связывание оливомицина А с ДНК в присутствии Mg^{2+}	89
Изучение образования ковалентных интермедиатов Dnmt3a с ДНК, содержащими Z.	
90	
Список литературы.....	92

Список сокращений

AdoHcy – S-аденозил-L-гомоцистеин	$V_{\text{отн}}$ – относительная начальная скорость
AdoMet – S-аденозил-L-метионин	Z – пимимидин-2-он
Dnmt3a-CD – каталитический домен Dnmt3a	АК – ауреоловая кислота
FAM, f – 6-карбоксифлуоресцеин	БСА – бычий сывороточный альбумин
IC50 - концентрация полумаксимального ингибирования	ВРВ – бромфеноловый синий
K_d – константа диссоциации	ДСН – додецилсульфат натрия
M, m ⁵ C – 5-метилцитозин	ед. акт. – единица активности
M.NhaI – ДНК-метилтрансфераза NhaI	КД – круговой дихроизм
M.SssI – ДНК-метилтрансфераза SssI	МТаза – C5-ДНК-метилтрансфераза
P – поляризация флуоресценции	п.н. – нуклеотидная пара
^s G – 6-тиогуанин	ПААГ – полиакриламидный гель
^s G-ДНК – 6-тиогуанин-содержащие ДНК-дууплексы	РСА – рентгеноструктурный анализ
Трис – трис-(гидроксиметил)-аминометан	ХС – ксиленианол
V_0 – начальная скорость	ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия

Введение

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* МТазами 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 доксорубицин и недавно синтезированный кураксин CBL0137. 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 доксорубицин 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, оливаמיד, 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-меченными ДНК-дуплексами методом поляризации флуоресценции.

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 CBL0137 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 ($^3\text{H}-\text{CH}_2-$) в ДНК. Эффективность метилирования ДНК в присутствии оливомицина А, оливамида, кураксина CBL0137 и доксорубина изучалась по защите метилированной ДНК от расщепления эндонуклеазой рестрикции HincII. 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 оливамид, 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

Работа представлена на следующих научных 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

1. Kirsanova, O. V., **Sergeev, A. V.**, Yasko, I. S., Gromova, E. S. (2017). The impact of 6-thioguanine incorporation into DNA on the function of DNA methyltransferase Dnmt3a. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 36(6), 392-405. Импакт-фактор: 1,598 (2019, Scopus).
2. **Сергеев, А. В.**, Кирсанова, О. В., Лойко, А. Г., Номероцкая, Е. И., Громова, Е. С. (2018). Определение степени метилирования ДНК метилтрансферазой Dnmt3a с использованием метилзависимых эндонуклеаз рестрикции. *Молекулярная биология*, 52(2), 318-325. Импакт-фактор: 0,598 (2019, Scopus).
3. **Сергеев, А. В.**, Тевяшова, А. Н., Воробьев, А. П., Громова, Е. С. (2019). Влияние противоопухолевого антибиотика оливомицина А и нового полусинтетического производного, оливамида, на функционирование ДНК-метилтрансферазы мыши Dnmt3a. *Биохимия*, 84(2), 229-239. Импакт-фактор: 2,028 (2019, Scopus).
4. **A.V. Sergeev**, A.P. Vorobyov, M.G. Yakubovskaya, O.V. Kirsanova, E.S. Gromova. (2020). Novel anticancer drug curaxin CBL0137 impairs DNA methylation by eukaryotic DNA methyltransferase Dnmt3a. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(16), 127296. Импакт-фактор: 2,644 (2019, 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 4 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).

Глава 1. Противоопухолевые препараты, взаимодействующие с ДНК (Обзор литературы)

Взаимодействие малых молекул с двуцепочечной ДНК является предметом большого числа исследований в течение более 40 лет. Существует три основных типа взаимодействия малых молекул с двуцепочечной ДНК: интеркаляция между гетероциклическими основаниями, связывание с большой или малой бороздкой и ковалентное связывание. Интеркаляцией называют внедрение малой молекулы в ДНК между парами оснований, приводящее к искажению параметров двойной спирали. Представители первых двух групп не повреждают ДНК при связывании, и возможный цитотоксический эффект таких соединений проявляется через влияние на работу ДНК-оперирующих ферментов, таких как топоизомеразы и РНК-полимеразы, и на сродство ДНК-связывающих белков к своему участку узнавания. Одно и то же соединение может проявлять несколько типов взаимодействия одновременно. Например, продукты метаболизма известного канцерогена бензо[*a*]пирена способны образовывать стабильные ковалентные аддукты с ДНК через нуклеофильную атаку N2- или N6-экзоциклических аминогрупп dG или dA. При этом, в зависимости от конформации аддукта, основной полициклический фрагмент бензо[*a*]пирена может располагаться в малой бороздке ДНК, интеркалировать между основаниями двойной спирали, либо интеркалировать в ДНК с вытеснением спаренного основания из двойной спирали [1]. Другим примером является 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI), связывающийся с малой бороздкой ДНК в АТ-богатых участках, но также способный связываться с ДНК посредством интеркаляции в случае poly[d(GC)]₂ [2].

ДНК-топоизомеразы I и II (Торо I и II) являются наиболее изученными ДНК-оперирующими ферментами с точки зрения влияния на их работу ДНК-связывающих малых молекул. Топоизомеразы представляют собой ферменты, участвующие в многочисленных клеточных процессах, включая репликацию и транскрипцию. Эти ферменты влияют на уровень сверхспирализации ДНК путем внесения одно- (Торо I) и двуцепочечных (Торо II) разрывов с последующим восстановлением (лигированием) расщепленной ДНК. Многие противоопухолевые препараты, такие как камптотecin (ингибитор Торо I) и даунорубин (ингибитор Торо II), проявляют свою цитотоксическую активность, усиливая способность ферментов создавать разрывы в ДНК и/или

предотвращая лигирование расщепленной ДНК. В результате, в ответ на накопление стабилизированных комплексов топоизомераз с ДНК происходит запуск апоптоза [2]. Некоторые малобороздочные лиганды также способны ингибировать активность топоизомераз, например, Hoechst 33258 обладает ингибирующей активностью в отношении Торо I, сравнимой с камптотецином.

Соединения, способные интеркалировать в двойную спираль ДНК, получили широкое распространение в химиотерапии рака. Опухолевые клетки особенно уязвимы к повреждениям, вызванным ДНК-связывающими лигандами, вследствие высокой скорости их пролиферации по сравнению с незлокачественными клетками, а также нарушенной системы репарации [3,4]. ДНК-интеркаляторы, как правило, имеют общий структурный мотив - плоскую полиароматическую систему, способную внедряться между парами оснований ДНК.

В обзоре литературы рассмотрены противоопухолевые препараты, взаимодействующие с ДНК по различным механизмам, таким как встраивание в последовательность ДНК, связывание с её бороздками и интеркалирование между парами оснований. Описаны механизмы их противоопухолевого действия, особенности комплексообразования с ДНК, а также их влияние на различные клеточные процессы и ДНК-оперирующие ферменты.

Нуклеозидные препараты

Как обсуждалось выше, в случае злокачественных новообразований наблюдается гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста, что приводит к их инактивации. Традиционные нуклеозидные ингибиторы МТаз: 5-азациитидин (видаза) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин), а также 2'-дезоксиде-5-азациитидилил-(3'-5')-2'-дезоксигуанозин (гвадеситабин) очень давно широко используются как эффективные химиотерапевтические средства при злокачественных заболеваниях крови (в частности, они одобрены при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) и миелодиспластическом синдроме (МДС) [5–8]. Эти соединения включаются в ДНК в процессе ее синтеза, что приводит к замене цитозина-мишени на 5-азацитозин и блокированию МТазы за счет её необратимого связывания с ДНК. Эти деметилирующие агенты вызывают реэкспрессию молчащих генов (активируются гены-супрессоры опухолей). Применение классической гипометилирующей терапии кажется проблематичным в случае пациентов с мутациями в DNMT3A, при наличии которых, как показано выше, в большинстве случаев также снижается

метилирующая активность этого фермента. Однако по некоторым данным применение деметилирующих препаратов было успешным и даже способствовало быстрой ремиссии у пациентов с МДС [9].

Зебуларин

Зебуларин - нуклеозидный аналог цитидина, содержащий 2(1H)-пиримидиновое кольцо (рис. 1), являющийся эффективным ингибитором метилирования ДНК. Изначально зебуларин был разработан как ингибитор цитидиндезаминазы, поскольку в нем отсутствует аминогруппа в 4 положении [10]. Было показано, что зебуларин вызывает деметилирование и реактивацию подавленного гиперметилизованного гена p16 в раковых клетках мочевого пузыря человека [11]. Кроме того, зебуларин индуцировал значительное деметилирование генов-супрессоров опухолей Ras-ассоциированного домена семейства 1A и человеческого гомолога 1 MutL в клетках A2780/CP. Также наблюдалась реэкспрессия генов RASSF1A, ARHI и BLU [12]. Низкая токсичность и высокая стабильность зебуларина обуславливают потенциал его использования в качестве препарата для эпигенетической терапии рака. Другой особенностью данного препарата является его селективность: зебуларин встраивался в ДНК нескольких типов злокачественных клеток с большей скоростью, чем в ДНК фибробластов [13].

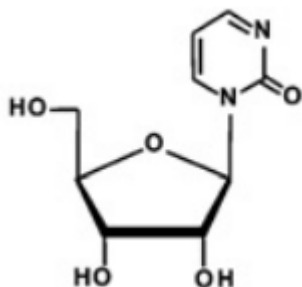


Рис.1. Структура зебуларина

Непрерывная обработка клеток T24 зебуларинем индуцировала и поддерживала экспрессию гена p16 и поддерживала деметилирование его 5'-концевой области в течение более 40 дней, предотвращая реметилирование. Кроме того, непрерывное лечение зебуларинем эффективно и глобально деметилировало различные гиперметилированные области, особенно области с низким содержанием участков CpG. Препарат вызвал полное исчезновение МТазы DNMT1 и частичное истощение DNMT3a и DNMT3b3 [14].

Механизм ингибирования метилирования зебуларин-содержащей ДНК был изучен в работе Aranda и др. [15]. На первом этапе реакции метилирования происходит обратимая нуклеофильная атака остатка цистеина из активного центра МТазы по положению С6 цитозина с образованием ковалентного аддукта. На втором этапе происходит перенос метильной группы с кофактора S-аденозил-L-метионина в положение С5 цитозина. Однако, в случае зебуларина энергия активации реакции переноса метильной группы оказывается слишком высокой, что приводит к невозможности образования метилированного цитозина в физиологических условиях. Введение зебуларина не приводило к серьезным искажениям структуры комплекса МТазы с ДНК [16]. В отличие от 5-фторцитозина, промежуточный ковалентный комплекс между ферментом и зебуларин-содержащей ДНК обратим [17].

6-тиогуанин

Механизм действия 5G

6-тиогуанин является эффективным противоопухолевым препаратом и, как и другие тиопурины, используется в лечении рака и других заболеваний [18–21]. При попадании в клетку 6-тиогуанин (5G) метаболизируется до 2'-дезоксид-6-тиогуанозин-5'-трифосфата, который является хорошим субстратом ДНК-полимеразы и встраивается в ДНК напротив остатка цитидина при репликации [20,21]. 6-тиогуанин (5G) доказал свою эффективность в лечении некоторых типов лейкемии, в частности, хронического миелоидного лейкоза [22]. Цитотоксический эффект 5G опосредован несколькими механизмами. Остаток 5G , встроенный в ДНК, может подвергаться окислению [20] и метилированию экзоциклического атома серы [19,23], что приводит к ошибкам во время репликации, активации системы репарации, остановке клеточного цикла и гибели клеток. Также 5G оказывает значительное влияние на активность ДНК-полимераз, лигаз, РНКазы H, топоизомеразы II и эндонуклеаз рестрикции [24–26]. РНКазы H удаляет РНК-праймеры с фрагментов Оказаки во время синтеза запаздывающей цепи [25,27]. Активность человеческих [28], бактериальных [25,29] и ретровирусных [30,31] РНКаз H в отношении ДНК-РНК гетеродуплексов, содержащих тиогуанин в ДНК-цепи, а цитозин - в комплементарной РНК-цепи, существенно подавляется. Раскрытие пары 5G -С на продолжительное время может локально изменить ширину малой бороздки, что влияет на узнавание данного участка РНКазой H [27]. Кроме того, нарушенная динамика спаривания 5G -С может стерически затруднить связывание РНКазы H с дуплексом. 5G также вызывает одноцепочечные разрывы в ДНК, ДНК-белковые сшивки и хроматидный обмен [21].

В работе [32] авторы изучили влияние остатка 5G в участке CpG на эффективность метилирования ДНК-субстратов человеческой метилтрансферазой DNMT1 и прокариотической HpaII. В качестве субстратов использовались 15-звенные полуметилированные ДНК-дууплексы, содержащие остатки 5G в различных положениях по отношению к участку CpG. Присутствие 5G в сайте CpG существенно подавляло метилирование этого сайта обеими МТазами. С другой стороны, включение 5G рядом с CpG с 3'-стороны практически не повлияло на метилирование этого субстрата МТазой DNMT1, но существенно ухудшило работу HpaII. Наконец, замещение остатка G на 5G в участке CpG улучшило эффективность метилирования цитозина в комплементарной цепи. Авторы также исследовали уровень метилирования ДНК в клетках Jurkat, подвергшихся обработке 6-тиогуанином в течение 24 часов. Количество остатков m^5C снизилось с $3,92 \pm 0,04\%$ в необработанных клетках до $3,42 \pm 0,04\%$ и $3,39 \pm 0,18\%$ в клетках, обработанных 1 и 3 мкМ 6-тиогуанина, соответственно. Аналогичная обработка 5 мкМ 5-аза-2'-дезоксцитидином, хорошо известным ингибитором метилирования, снизила уровень метилирования до $1,96 \pm 0,15\%$. Авторы предполагают, что, если остаток 5G находится в участке узнавания фермента, он нарушает связывание ДНК-субстрата МТазой, что влечет за собой ухудшение метилирования этого субстрата. В случае, когда остаток 5G находится напротив цитозина-мишени, ослабление водородных связей в паре $^5G \cdot C$ может облегчить выведение цитозина из двойной спирали ДНК в ходе реакции метилирования, что и выражается в увеличении эффективности метилирования. Обработка клеток 5G способствовала снижению общего уровня метилирования в клетке, а также реактивации эпигенетически инактивированных генов [32].

Окисление 5G

Остатки 6-тиогуанина гораздо более восприимчивы к окислению, чем любые из природных оснований в ДНК. Тиопурины обладают спектральными свойствами, отличающими их от природных азотистых оснований. Максимумы поглощения аденина и гуанина находятся в области 260 нм. Замена шестого атома кислорода на серу вызывает длинноволновый сдвиг в спектре поглощения, и 6-тиогуанин имеет максимум поглощения при 340 нм. В растворе тиогуанин быстро разрушается под действием УФ-облучения в области 300-400 нм. В этих условиях тиогуанин может выступать в качестве фотосенсибилизатора [33]. Свободный 5G поглощает фотон УФ-света и переходит в триплетное состояние. Это очень нестабильное соединение может взаимодействовать с

молекулярным кислородом с образованием тиопуриновых радикалов и супероксида. Супероксид может образовывать крайне реакционноспособные гидроксильные радикалы по реакции Фентона. В других реакциях энергия УФ-света, поглощенная тиогуанином, передается молекулярному кислороду с образованием синглетного кислорода. Как известно, и гидроксильные радикалы, и синглетный кислород вносят повреждения в ДНК, причем последний считается основным источником повреждений ДНК в клетках, подвергшихся УФ-облучению. Таким образом, 5G является источником активных форм кислорода в клетках, подвергшихся воздействию малых доз ультрафиолета.

6-тиогуанин сам по себе очень подвержен окислению и быстро превращается в гуанин-сульфонат (G^{SO_3}) [34]. Даже незначительные дозы УФ-облучения преобразовывают 5G в G^{SO_3} в составе ДНК. Фотохимическая активация клеточного 5G имеет значительные биологические последствия: даже очень небольшие количества встроенного в ДНК 5G при коротком облучении УФ-светом приводят к накоплению мутаций и клеточной смерти [35]. G^{SO_3} оказывает сильное воздействие на стабильность ДНК. Остатки G^{SO_3} не способны образовывать стабильные пары с любыми основаниями, и дестабилизирует двойную спираль даже сильнее, чем пурин-пуриновые и пиримидин-пиримидиновые неканонические пары. G^{SO_3} является непреодолимым препятствием для фрагмента Кленова в реакции элонгации праймеров, однако человеческая ДНК-полимераза η способна обойти G^{SO_3} . Предполагается, что рекрутирование ДНК-полимераз семейства Υ , способных осуществлять репликацию поврежденных участков ДНК, способствует мутагенной активности окисленных форм тиогуанина. В связи со способностью G^{SO_3} блокировать ДНК-полимеразы, лечение 6-тиогуанином вкупе с УФ-облучением вызывает сильное ингибирование репликации в клетках человека.

Влияние 5G на структуру ДНК

Структурный эффект от включения 5G в ДНК был исследован в работе [36]. С помощью методов ЯМР и молекулярной динамики было установлено, что $^5G \cdot C$ является нормальной Уотсон-Криковской парой, не нарушающей В-форму ДНК. Однако, она гораздо менее стабильна, чем $G \cdot C$, даже при 35 °C. Из-за большего радиуса и меньшей электроотрицательности атома серы по сравнению с атомом кислорода, длины водородных связей в такой паре увеличиваются по сравнению с $G \cdot C$, за исключением связи GN2-CO2, укорачивающейся с 3,01 Å до 2,76 Å. Кроме того, пара наклоняется на 7° в сторону большой

бороздки ДНК (рис. 2). Несмотря на меньшую стабильность этой пары оснований, она практически не дестабилизирует соседние пары.

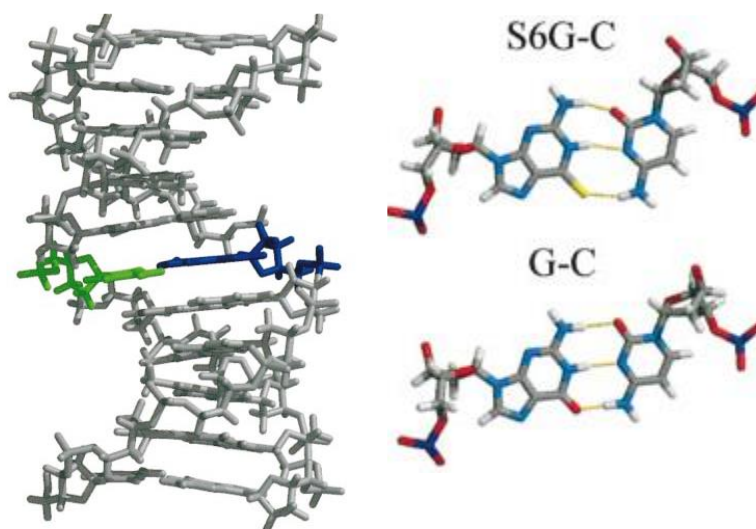


Рис. 2. Модель структуры пары $^S\text{G}\cdot\text{C}$.

Что интересно, пара $^S\text{G}\cdot\text{C}$ оказалась даже менее стабильной, чем $^S\text{G}\cdot\text{T}$ -мисматч, образующий пару wobble-типа.

В другой работе [37] авторы исследовали изменение температуры плавления 25-звенных ДНК-шпилек и 8-звенных ДНК-РНК дуплексов при замещении остатка гуанина на 6-тиогуанин. В случае ДНК-шпильки температура плавления упала на 30°C (с 76 до 46°C), а в случае гибридного дуплекса – на 18°C (с 60 до 42°C), что свидетельствует о дестабилизации двойной спирали ДНК парой $^S\text{G}\cdot\text{C}$. После этого авторы исследовали $T_{\text{пл}}$ 8-звенных ДНК-дуплексов, содержащих пару $^S\text{G}\cdot\text{мер}$, где мер – аналог цитозина с отсутствующей аминогруппой. Выяснилось, что даже несмотря на то, что в такой паре уменьшены стерические затруднения по сравнению с парой $^S\text{G}\cdot\text{C}$, $T_{\text{пл}}$ для нее уменьшилась еще сильнее, составив 32°C по сравнению с 41°C у дуплекса с $^S\text{G}\cdot\text{C}$ и 52°C у немодифицированного дуплекса. Авторы делают вывод, что даже несмотря на стерические затруднения, водородная связь между тиокетогруппой ^SG и аминогруппой C сохраняется и уменьшает дестабилизирующий эффект атома серы.

ДНК-дуплекс является очень динамичной структурой. Локальные нарушения структуры и разрыв водородных связей происходят в миллисекундной шкале времени [38]. Скорость обмена имино-протонов при этом зависит от времени жизни пары оснований: в “открытом”

состоянии эта скорость зависит от химического окружения обменивающегося протона (сера в ^SG и кислород в G). В работе [39] авторы сравнили скорости обмена имино-протонов в парах $\text{G}\cdot\text{C}$ и $^S\text{G}\cdot\text{C}$ и определили времена жизни этих пар в ДНК-дуплексе. Оказалось, что время жизни пары $^S\text{G}\cdot\text{C}$ (8 мс) в 80 раз меньше времени жизни пары $\text{G}\cdot\text{C}$ (671 мс). Это значит, что пара $^S\text{G}\cdot\text{C}$ проводит гораздо больше времени в “раскрытом” состоянии, чем пара $\text{G}\cdot\text{C}$, делая протон Н1 более доступным для обмена с растворителем. В то же время, влияние ^SG на динамику спаривания оснований оказалось очень локализованным: времена жизни соседних пар оснований практически не изменились.

Ненуклеозидные ДНК-связывающие препараты

Ненуклеозидные препараты представляют собой органические соединения различных классов, связывающиеся с ДНК по различным механизмам. Это небольшие молекулы, взаимодействующие с ДНК путем связывания с бороздками, посредством интеркаляции, образования сшивок или других повреждений цепи ДНК. ДНК-связывающие препараты также могут быть направлены на стабилизацию неканонических структур ДНК, таких как G-квадруплексы.

Препараты, связывающиеся с бороздками ДНК

Трабектедин

Трабектедин (Yondelis®, рис. 3) является природным полициклическим противоопухолевым препаратом, изначально выделенным из асцидий (*Ecteinascidia turbinata*) [40]. В клинической практике трабектедин используется для лечения прогрессирующей саркомы мягких тканей при неэффективности антрациклинов и ифосфамида [41].

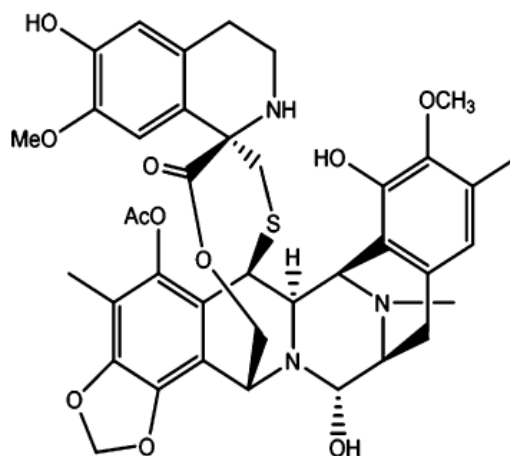


Рис. 3. Структура трабектедина.

Трабектедин ковалентно связывается с экзоциклической аминогруппой гуанина в малой бороздке ДНК в тринуклеотидных сайтах пиримидин-G-G и пурин-G-C (рис. 4). При связывании трабектедина с ДНК наблюдалось значительное расширение малой бороздки, а также частичное раскручивание двойной спирали ДНК [42]. Связавшись с ДНК, трабектедин воздействует на функционирование ДНК-оперирующих ферментов, осуществляющих транскрипцию и репарацию ДНК [41]. Одним из основных механизмов цитотоксичности трабектедина является влияние на транскрипцию генов, осуществляемую РНК-полимеразой II [43]. Трабектедин избирательно ингибирует транскрипцию гена множественной лекарственной устойчивости, при этом не затрагивая экспрессию генов “домашнего хозяйства”.

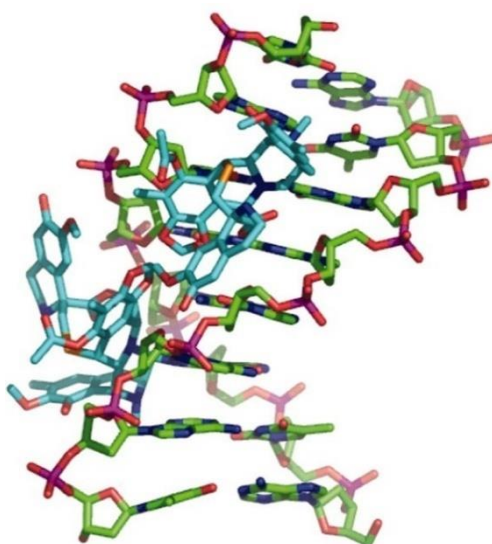


Рис 4. Модель комплекса трабектедина с ДНК [44].

Germano и др. показали, что трабектедин вызывает быстрый апоптоз исключительно в мононуклеарных фагоцитах [45]. На моделях опухолей мышей было показано, что трабектедин избирательно снижает концентрацию моноцитов и макрофагов в крови, селезенке и опухоли, что сопровождается подавлением ангиогенеза. Авторы заключили, что цитотоксичность трабектедина в отношении мононуклеарных фагоцитов - ключевой компонент его противоопухолевой активности. Трабектедин вызывал каспаза-8-зависимый апоптоз в моноцитах, однако точный механизм, с помощью которого препарат инициирует расщепление каспазы-8, еще предстоит выяснить. Исследователи из института фармакологических исследований им. Марио Негри также показали, что трабектедин

воздействует на миеломоноциты с высокой степенью специфичности и выделили центральную роль транскрипционного фактора MAFB в механизме цитотоксичности трабектедина [42].

В другой работе был исследован механизм действия трабектедина в миксоидных липосарcomaх [46]. CHOP является транскрипционным фактором, принимающим участие во многих процессах, включая реакцию на вредные раздражители. Активность химерных белков CHOP связана с развитием миксоидных/круглоклеточных липосарком. Авторы показали, что трабектедин индуцирует вытеснение химерного онкобелка FUS-CHOP с промоторов генов-мишеней *in vivo* в человеческих липосарcomaх.

Значительную противоопухолевую активность трабектедина в отношении клеток менингиомы наблюдали Preusser и др. [47]. Трабектедин вызывал остановку клеточного цикла, подавление экспрессии циклинов и индукцию апоптоза. Ингибирование экспрессии циклина могло быть следствием остановки клеточного цикла, вызванной повреждением ДНК трабектедином. Кроме того, авторы подчеркивают, что трабектедин препятствует связыванию определенных факторов транскрипции с ДНК и проявляет свою противоопухолевую активность, по крайней мере частично, путем блокирования активированной (но не конститутивной) транскрипции генов.

Противоопухолевые антибиотики группы ауреоловой кислоты

Антибиотики группы ауреоловой кислоты (АК), такие как оливомидин, митрамицин, хромомицины и дурамицин, являются трициклическими поликетидами с противоопухолевой активностью и продуцируются различными видами стрептомицетов. [48]. Антибиотики группы АК содержат две олигосахаридные цепи, связанные с ароматическим поликетидным ядром. Показаниями к применению митрамицина в клинике является болезнь Педжета и карцинома яичек [49], хромомицин ограниченно используется в Японии для лечения рака желудка [50], а оливомидин А применяется для лечения опухолей яичка, ретикулосарком и некоторых других видов опухолей [51]. Однако серьезные побочные эффекты лечения ограничивают применение этих антибиотиков в клинике.

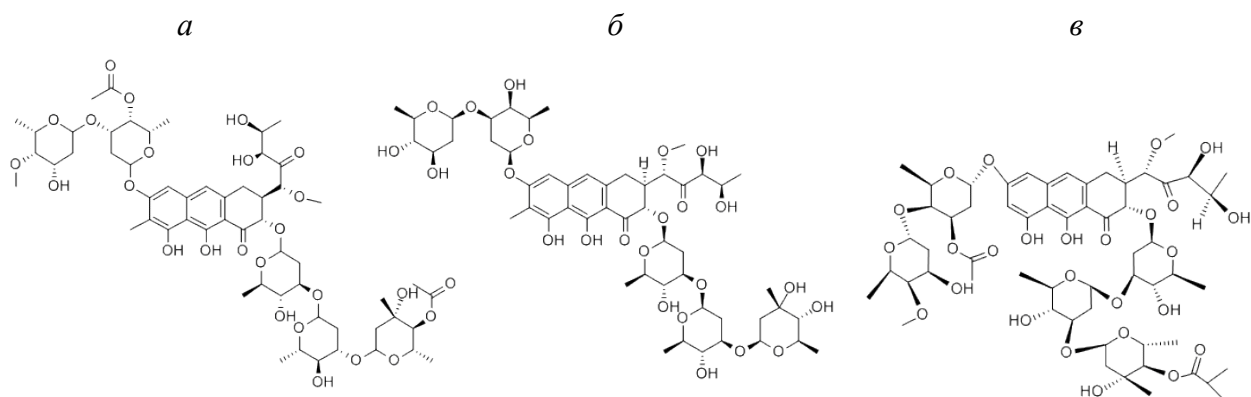


Рис.5. Структуры основных представителей семейства противоопухолевых антибиотиков группы ауреоловой кислоты. *а* – хромомицин А₃, *б* – митрамицин А, *в* – оливомицин А.

Поскольку оливомицин А (рис. 5) обладает наилучшим химиотерапевтическим индексом среди антибиотиков группы АК, он наиболее интересен с точки зрения получения на его основе полусинтетических производных, обладающих сниженной токсичностью и улучшенными фармакологическими характеристиками [52,53]. Среди серий аналогов оливомицина А, полученных в ФГБНУ «НИИНА», было отобрано соединение, N,N-диметиламиноэтилаид 1'-дез-(2,3-дигидрокси-*n*-бутироил)-1'-карбокси-оливомицина А (оливамида) (рис. 6), проявившее наиболее высокую активность на различных линиях опухолевых клеток и обладающее, по предварительным данным, сниженной токсичностью, в сравнении с оливомицином А [53]. Обработка человеческих опухолевых клеточных линий НСТ116 и К562 этим соединением приводила к ингибированию роста опухолей, кроме того, антипролиферативный эффект данного антибиотика был продемонстрирован на моделях мышей, содержащих транспланты Т-клеточной лимфомы Р-388 и меланомы В16 [53].

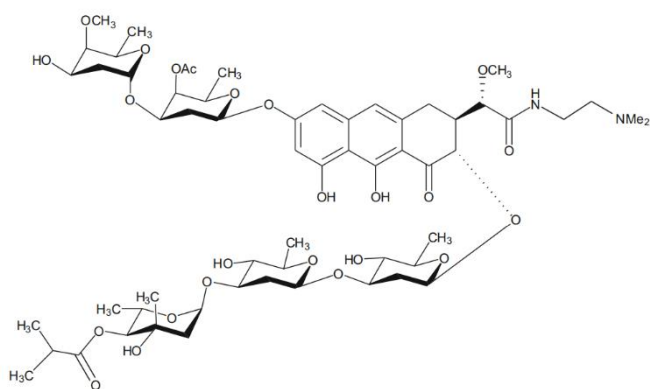


Рис. 6. Структура оливамида

Известно, что, как и другие антибиотики группы АК, оливомицин А способен связываться с малой бороздкой ДНК в G·C-богатых участках. Связывание с ДНК осуществляется в виде Mg^{2+} -координированных комплексов. Механизм цитотоксичности оливомицина А в отношении опухолевых клеток связывают, прежде всего, с нарушением процессов транскрипции и репликации [54,55]. Связываясь с G·C-богатыми последовательностями в промоторных участках различных генов, антибиотики группы АК блокируют связывание транскрипционных факторов, таких как Sp1 и c-Мус, со своими участками узнавания, что приводит к ингибированию экспрессии этих генов [56,57].

Взаимодействие антибиотиков группы АК с ДНК

Современная модель связывания антибиотиков группы АК с G·C-богатыми участками ДНК предполагает, что две молекулы антибиотика, координированные катионом Mg^{2+} , связываются в малой бороздке ДНК-дуплекса. Кристаллическая структура комплекса хромомицина А₃ с ДНК-дуплексом 5'-TTGGCCAA/3'-AACCGGTT, показывает, что координированный металлом димер хромомицина вызывает локальное конформационное изменение дуплекса со стороны малой бороздки [58]. Две молекулы хромомицина образуют димер, опосредованный ионом Mg^{2+} , в ориентации «голова к хвосту» с псевдо-осью симметрии 2-го порядка. Ион металла в комплексе имеет октаэдрическую координацию и связывается с двумя атомами кислорода каждой молекулы хромомицина и двумя молекулами воды, выступающими в качестве пятого и шестого лигандов.

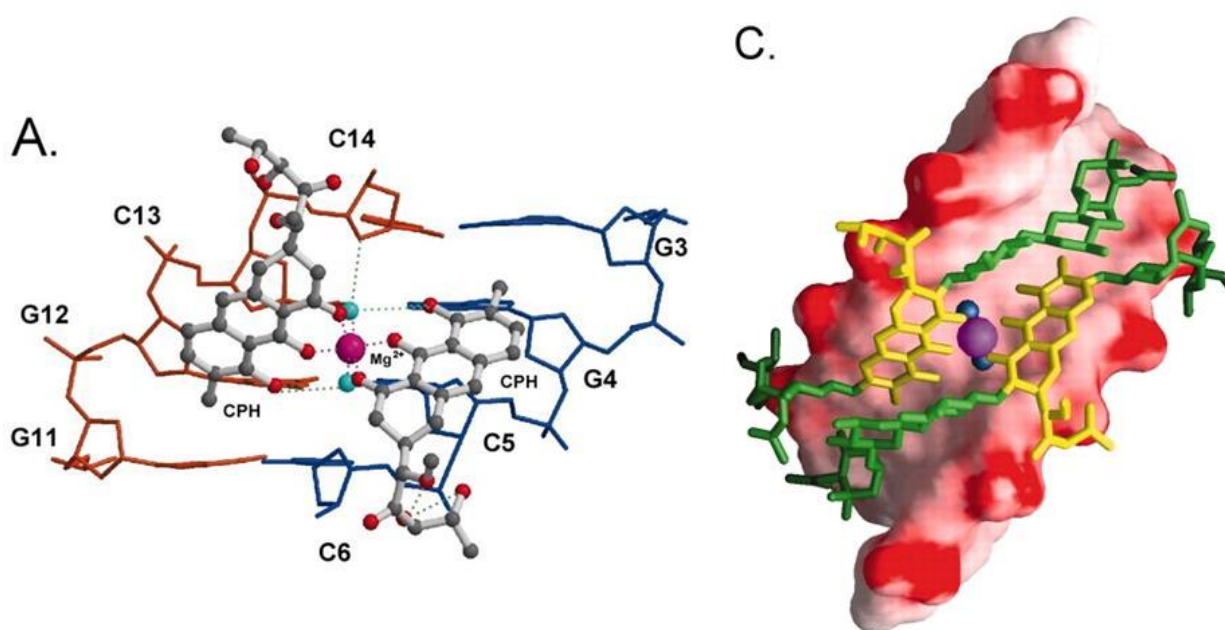


Рис. 7. Структура комплекса хромомицина А₃ с ДНК.

ДНК в комплексе сохраняет правозакрученную двойную спираль с центральным сегментом в 4 п.н., принимающим В-подобный характер с выраженным изломом. Центральный сегмент GGCC, окружающий сайт связывания димера хромомицина, показывает значительные изменения параметров двойной спирали: малая бороздка ДНК значительно расширяется, и появляется изгиб двойной спирали, составляющий от 30° до 36°. Шесть водородных связей между молекулами хромомицина и NH₂-группами остатков гуанина в ДНК обеспечивают специфичность к последовательности GGCC.

В другой работе исследовалась специфичность связывания митрамицина (ауреоловой кислоты) с фрагментами ДНК, содержащими G·C-богатый участок ((AT)₁₀X(AT)₁₀ (X = CCCG, CCGC или CGGC) и A₁₄GGCCT₁₅) с помощью метода футпринтинга [59]. Антибиотик занимал участок длиной в 6 пар нуклеотидов в малой бороздке ДНК, но его положение варьировалось в зависимости от исследуемой последовательности. Результаты свидетельствовали о большей специфичности митрамицина к динуклеотиду GpC по сравнению с CpG. Различные исследования особенностей комплексообразования антибиотиков группы АК с фрагментами ДНК показали, что константы диссоциации комплексов, как правило, лежат в интервале 3-100 мкМ, в зависимости от исследуемого антибиотика и последовательности участка связывания на ДНК [60–62].

Несмотря на то, что современная модель связывания антибиотиков группы АК с ДНК предполагает, что координация двухвалентного катиона Mg²⁺ с димерами антибиотика необходима для образования комплекса, в недавней работе авторы показали, что оливамид способен образовывать прочные комплексы с ДНК и в отсутствие ионов двухвалентных металлов в растворе [63]. Оливомицин А, производным которого является оливамид, напротив, не способен к комплексообразованию с ДНК в отсутствие ионов Mg²⁺. Методом кругового дихроизма было подтверждено, что модель связывания оливамида с ДНК в отсутствие и в присутствии ионов Mg²⁺ одинакова. Сродство оливамида к ДНК в растворе, не содержащем Mg²⁺, было сходным со сродством оливамида и оливомицина А к ДНК в присутствии ионов Mg²⁺ при низкой ионной силе. Возможность такого связывания может объясняться вкладом электростатического взаимодействия положительно заряженной NH₂-группы оливамида с ДНК, что облегчает комплексообразование антибиотика с участком узнавания в отсутствие Mg²⁺.

Помимо ионов Mg^{2+} , антибиотики группы АК способны образовывать активные комплексы также и с ионами Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} и Mn^{2+} . Исследования методом кругового дихроизма показали, что комплекс $[(\text{Митрамицин})_2Mn^{2+}]$ имеет правозакрученную конформацию, сходную по структуре с Mg^{2+} и Zn^{2+} -содержащими комплексами [64]. Такая конформация позволяет комплексу связываться с малой бороздкой ДНК. Используя оптическую и флуоресцентную спектроскопию, авторы показали, что комплекс $[(\text{Митрамицин})_2Mn^{2+}]$ связывается с двуцепочечной ДНК с кажущейся константой диссоциации 32 мкМ и размером сайта связывания 0,2 (антибиотик/п.н.). С хроматином куриной печени он связывается со значением кажущейся константы диссоциации 298 мкМ. Увеличение K_d , по-видимому, объясняется присутствием гистоновых белков в хроматине, затрудняющих доступ комплекса антибиотика к хромосомной ДНК.

Токсичность антибиотиков группы АК

Применение антибиотиков группы АК в противоопухолевой терапии ограничено их высокой токсичностью. Основными токсическими эффектами митрамицина и хромомицина А₃ являются гепатотоксичность, гипокальциемия и геморрагический синдром, а для оливомицина характерна сердечная и почечная токсичность. Дозы LD₅₀ для мышей составили 1,85, 2,14 и 13,75 мг/кг для хромомицина А₃, митрамицина и оливомицина, соответственно [65]. Терапевтический индекс (отношение LD₅₀ к дозе, ингибирующей рост опухоли на 50%, GI₅₀) гораздо выше в случае оливомицина (2,96), чем в случае хромомицина А₃ (0,99) [65]. В связи с этим, оливомицин представляет большой интерес с точки зрения создания модифицированных производных с улучшенным терапевтическим индексом, то есть с уменьшенной общей токсичностью *in vivo* с сохранением высокой цитотоксичности в отношении опухолевых клеток. Одним из наиболее перспективных производных оливомицина А является оливаמיד, продемонстрировавший высокую противоопухолевую активность в двух моделях агрессивных опухолей, таких как лимфома Р388 и меланома В16 [53]. Увеличение продолжительности жизни мышей (до 52%) и ингибирование роста опухоли (до 85%) происходило на фоне отсутствия признаков общей токсичности, таких как смерть, потеря волос и веса или изменения в поведении мышей.

Механизм противоопухолевого действия антибиотиков группы АК

Цитотоксичность хромомицина А₃, митрамицина, оливомицина и других антибиотиков семейства АК в отношении клеток млекопитающих объясняется их

чрезвычайно сильным ингибирующим действием на ДНК-зависимые ферментативные процессы, включая репликацию и транскрипцию. Связываясь с малой бороздкой ДНК в G·C-богатых областях, эти соединения ингибируют транскрипцию как *in vivo*, так и *in vitro*, нарушая ДНК-белковые взаимодействия. Несколько факторов транскрипции, распознающих G·C-богатые участки в промоторах, были идентифицированы как потенциальные мишени для антибиотиков группы АК. Одна из таких мишеней – белок Sp1 (specificity protein 1). Белки Sp1–Sp4 регулируют экспрессию множества генов в нормальных тканях и опухолях. Они участвуют в широком круге процессов, связанных с жизнедеятельностью клеток, включая рост, дифференцировку, апоптоз и канцерогенез. Белки Sp связывают GC- и GT-боксы в промоторах генов с помощью трех мотивов типа “цинковый палец”, присутствующих в их C-концевых доменах. Существует все больше доказательств того, что некоторые белки Sp играют критическую роль в росте и метастазировании многих типов опухолей путем регуляции экспрессии генов клеточного цикла и фактора роста эндотелия сосудов [66]. Избыточная экспрессия белков Sp является негативным прогностическим фактором во многих видах рака. В одной из работ [67] авторы наблюдали гиперэкспрессию Sp1 в клетках рака яичников. Митрамицин и его производные оказались сильными ингибиторами экспрессии Sp1-зависимых генов, играющих важную роль при раке яичников. Набор включал гены, вовлеченные в пролиферацию клеток (hTERT, CCNE1), апоптоз (BIRC5, XIAP), инвазию (CLDN4, KLF8) и ангиогенез (VEGF). Экспрессия c-SRC, VEGF, c-Myc, hTERT, CLDN4 и KLF8 снижалась на 80%, экспрессия CCNE1 и XIAP была снижена на ~60%, а BIRC5 на 25–30%. Эффект *in vivo* был еще более выражен. У мышей, содержащих трансплантированные опухоли и получавших производные митрамицина, уровень экспрессии всех протестированных генов был значительно снижен. Для большинства генов (hTERT, CLDN4, KLF8, CCNE1, XIAP, BIRC5, c-SRC, c-Myc) ингибирование было сравнимым или даже большим, чем в экспериментах *in vitro*, вероятно, из-за кумулятивного эффекта после длительного лечения.

Другой потенциальной мишенью антибиотиков группы АК является топоизомераза II. Было показано [68], что хромомицин А₃, как и ряд других малобороздочных лигандов, способен ингибировать расщепление ДНК-дуплексов топоизомеразой II *in vitro*. ДНК-дуплексы содержали один основной сайт расщепления и расположенные рядом сайты связывания малобороздочных лигандов. Авторы заключают, что длина участка ДНК, закрытого малобороздочным лигандом, в сайте узнавания фермента является основным

фактором, ответственным за сильный ингибирующий эффект в отношении топоизомеразы II.

В другой работе [69] была продемонстрирована возможность использования митрамицина в качестве сенситизатора устойчивых к терапии стволовых раковых клеток (CSC). CSC с трудом поддаются лучевой и химиотерапии и способны к самообновлению и регенерации всей массы опухолевой ткани, состоящей, в основном, из не-стволовых опухолевых клеток. Устойчивость CSC к химиотерапевтическим препаратам вызывает потребность в лекарствах, специфичных к CSC, которые будут применяться в сочетании с химиотерапией. Авторы показали, что митрамицин А, известный ингибитор белка Sp1, сенситизирует CSC рака молочной железы, нарушая экспрессию транспортеров лекарственных средств, ABCG2 и ABCC1, факторов выживания Bcl-2 и X-связанного ингибитора апоптоза, и транскрипционных факторов Oct4 и Nanog, которые по своей природе активированы в CSC, по сравнению с основной популяцией опухолевых клеток. Сверхэкспрессия Sp1 в этих CSC активирует (1) гены, стимулирующие устойчивость к генотоксической терапии, и (2) регуляторы стволовости ("stemness"), необходимые для поддержания потенциала самообновления этих клеток. Митрамицин А подавляет транскрипцию этих генов хеморезистентности и самообновления посредством ингибирования связывания Sp1 с их промоторами. В таких условиях химиотерапевтический агент доксорубицин оказался способным вызывать апоптоз в CSC посредством генерации активных форм кислорода, приводящих к повреждению ДНК. Обработка клеток митрамицином А не только снижала апоптотический порог доксорубицина в отношении CSC, но также снижала токсичность доксорубицина и защищала нормальные клетки от вызванного генотоксическим препаратом окислительного стресса.

Митрамицин способен сенситизировать опухолевые клетки не только к другим химиотерапевтическим препаратам, но и к лучевой терапии, как показано в другой недавней работе [70]. Мыши, несущие ксенотрансплантаты A549 (рак легких человека), были распределены на 4 группы: 1) контрольная группа; 2) мыши, получавшие митрамицин; 3) мыши, получившие дозу лучевого воздействия; и 4) мыши, получившие митрамицин и прошедшие лучевое воздействие. Митрамицин и лучевое воздействие задерживали рост ксенотрансплантата на 0,6 и 5,6 дня, соответственно. У мышей, прошедших комбинированную терапию митрамицином и лучевым воздействием, рост ксенотрансплантата был задержан на 9,2 дня. Таким образом, задержка роста опухоли при

комбинированном лечении была больше, чем сумма задержек роста при раздельной химио- и лучевой терапии.

Хотя основным механизмом противоопухолевого действия митрамицина и других антибиотиков группы АК считается ингибирование Sp1-зависимой транскрипции, в ряде недавних работ была продемонстрирована способность митрамицина активировать транскрипционный фактор p53, являющийся супрессором опухоли [71,72]. После обработки клеток митрамицином уровень экспрессии p53 значительно возрастал, что в итоге приводило к G0/G1-аресту и апоптозу в исследуемых клетках. При этом, нокдаун p53 значительно ослаблял цитотоксичность митрамицина в клетках карциномы эндометрия, что подтверждает важность вклада активации p53 в механизм противоопухолевого действия митрамицина.

Препараты, интеркалирующие в ДНК

Интеркаляторы — это молекулы, выстраивающиеся между парами оснований в ДНК без образования ковалентных связей. Как правило, интеркалирующие препараты представляют собой гидрофобные гетероциклические кольцевые молекулы, напоминающие структуру пары оснований. Интеркаляция таких препаратов в ДНК искажает геометрию двойной спирали, тем самым препятствуя репликации, транскрипции и репарации ДНК.

Антрациклины

Противораковая активность антрациклиновых антибиотиков, изначально выделенных из бактерий *Streptomyces peucetius*, была обнаружена более пятидесяти лет назад. Плоский полициклический фрагмент антрациклина способен интеркалировать в двойную спираль ДНК между парами оснований. Цитотоксичность антрациклиновых антибиотиков проявляется по нескольким механизмам. Основным механизмом цитотоксичности данных соединений в отношении опухолевых клеток считается их способность ингибировать топоизомеразу II. Кроме того, антрациклины препятствуют расплетению цепей ДНК, осуществляемому хеликазами [73]. Еще одним возможным аспектом противоопухолевого действия антрациклинов является повреждение клеточных мембран и других белков, вызванное последовательными процессами восстановления и окисления антибиотика [74]. Высокая кардиотоксичность антрациклиновых антибиотиков вызвана, по-видимому, генерацией большого количества свободных радикалов и активных форм кислорода в окислительно-восстановительных реакциях, которым подвержены

данные соединения. Кроме того, выпадение волос является одним из наиболее распространенных побочных эффектов химиотерапии с использованием антрациклинов.

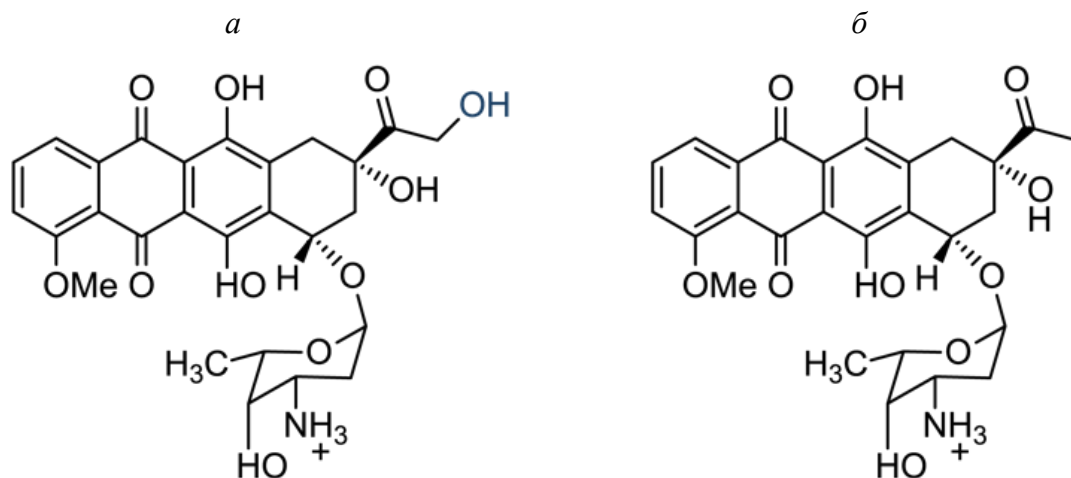


Рис. 8 Структуры доксорубина (а) и даунорубина (б)

Примерами используемых в химиотерапии антрациклиновых антибиотиков являются доксорубин и даунорубин (рис. 8). Доксорубин (адриамицин), является одним из наиболее широко используемых в химиотерапии противоопухолевых препаратов. Доксорубин применяется при лечении широкого спектра солидных опухолей (например, молочной железы, мочевого пузыря, эндометрия, щитовидной железы, легких, яичника, желудка и сарком кости) и при лечении лимфом, а также острых лимфобластных и миелобластных лейкозов [75]. Связывание даунорубина и доксорубина с синтетическими ДНК-дуплексами и хроматином различного состава хорошо изучено. Механизм их противоопухолевого действия связан, в первую очередь, с интеркаляцией антибиотика в ДНК, приводящей к деформации двойной спирали ДНК и стабилизации лабильного в нормальных условиях комплекса ДНК с топоизомеразой II. В результате происходит накопление двуцепочечных разрывов в ДНК [76]. Вторым важным аспектом механизма этих препаратов является генерация свободных радикалов и повреждение клеточной мембраны по механизму, описанному выше.

Также показано, что доксорубин способен ингибировать реакцию метилирования ДНК, катализируемую МТазой Dnmt1, являющейся основным ферментом, ответственным за поддержание метилирования геномной ДНК [77]. При определенной концентрации доксорубин также способен подавлять экспрессию Dnmt1 в клетках. Большая часть

клеток HCT116 погибала при их обработке 1 мкМ доксорубицином. Что интересно, массовой гибели клеток не наблюдалось при увеличении и уменьшении дозы доксорубицина в 10 раз. Запуск апоптоза происходил только в клетках, экспрессирующих Dnmt1. Авторы исключили возможность того, что доксорубицин связывается непосредственно с Dnmt1, и утверждают, что для ингибирования МТазы важно образование комплекса антибиотика с ДНК.

Основными ограничениями в применении антрациклинов в качестве противоопухолевых препаратов являются сильные побочные эффекты, такие как хроническая и острая кардиотоксичность и резистентность раковых клеток к действию препарата [76]. Высокая кардиотоксичность объясняется генерацией свободных радикалов и активных форм кислорода, к которым особенно уязвимы кардиомиоциты. Индуцированное доксорубицином повреждение сердечной мышцы, как правило, необратимо и носит кумулятивный характер.

Производные акридина

К числу наиболее изученных малых молекул, связывающихся с ДНК, относятся производные акридина (рис. 9), взаимодействующие с ДНК посредством интеркаляции. Наличие плоского акридинового хромофора, придающего молекулам плоскую структуру, позволяет им связываться с ДНК путем укладки между парами оснований [78]. Возможность интеркаляции придает производным акридина высокое сродство к ДНК, которая обычно рассматривается как биологическая мишень для акридиновых противораковых препаратов.

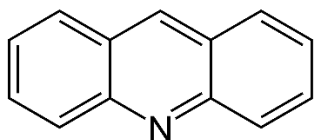


Рис. 9. Структура акридина

Противоопухолевое действие производных акридина связано с их воздействием на различные клеточные мишени, в т. ч. на ДНК-оперирующие ферменты. Топоизомераза II является мишенью многих противоопухолевых препаратов, в том числе производных акридина. Клеточной мишенью этих препаратов является промежуточный комплекс топоизомеразы II с ДНК. При связывании данных препаратов с ДНК концентрация промежуточных ДНК-белковых комплексов резко возрастает, что вызывает накопление

одно- и двуцепочечных разрывов в ДНК. Наличие большого количества разрывов ДНК стимулирует метаболические процессы, такие как рекомбинация, мутации и гибель клеток (апоптоз).

Амсакрин (4'-(9'-акридиниламино)метансульфон-м-анизидид) является производным акридина, используемым в клинической практике для лечения острого лимфобластного лейкоза [79]. Амсакрин образует тройной комплекс, в котором плоский фрагмент акридина интеркалирует в ДНК, а боковая цепь взаимодействует с ферментом. Стабилизация комплекса топоизомеразы II с ДНК амсакрином приводит к ингибированию лигирования цепей ДНК и накоплению одно- и двуцепочечных разрывов [80]. Производные акридина также проявляют противоопухолевую активность посредством ингибирования топоизомеразы I [81].

Другой клеточной мишенью препаратов на основе акридина является теломераза – фермент, достраивающий теломерные повторы к 3'-концу цепи ДНК на концах хромосом в эукариотических клетках. Теломераза неактивна в нормальных соматических клетках, но активация теломеразы наблюдается примерно в 90% всех опухолей человека [82]. Богатые гуанином участки теломерной ДНК могут образовывать G-квадруплекс – четырехцепочечную структуру, способную ингибировать теломеразу. По этой причине стабилизация G-квадруплекса низкомолекулярными ДНК-лигандами рассматривается как многообещающее направление противоопухолевой терапии. Было показано, что различные соединения на основе акридина взаимодействуют с G-квадруплексами и являются ингибиторами теломеразы [83,84].

Одним из факторов устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии является Р-гликопротеин, или белок множественной лекарственной устойчивости 1, который активно выводит противоопухолевые препараты из клеток, снижая их активность. Некоторые соединения, в том числе производные акридина, были протестированы как ингибиторы Р-гликопротеина [85].

Еще один класс противоопухолевых препаратов на основе акридина включает комплексы акридин—платина. Такие препараты связываются с ДНК по механизму, который включает интеркаляцию и платинирование азота в азотистых основаниях, вызывая более сильное повреждение ДНК, чем сшивки, наблюдаемые для цисплатина [86]. При немелкоклеточном

раке легкого (НМРЛ) препараты на основе комплексов акридин-платина проявляли до 1000 раз более высокую цитотоксичность, чем цисплатин [87].

Кураксины

Поскольку высокая генетическая изменчивость злокачественных клеток позволяет им приобретать устойчивость к химиотерапевтическим препаратам с одной молекулярной мишенью, многоцелевая терапия дает лучшую надежду на эффективное излечение рака. Некоторые традиционные противоопухолевые препараты, такие как доксорубин, циклофосамид и цисплатин способны воздействовать на несколько мишеней, но их высокая токсичность снижает их клиническую ценность. Нетоксичные функциональные аналоги этих препаратов могут стать прорывом в лечении рака. Однако, эти аналоги не были широко изучены, потому что повреждение ДНК считалось необходимым аспектом их механизма действия [88]. Помимо высокой токсичности известных препаратов, существует и другая проблема, связанная с нехваткой «универсальных» мишеней, которые важны в разных типах опухолей. Функционирование белка-супрессора опухолей p53 и антиапоптотического ядерного фактора κB (NF- κB) нарушено почти во всех типах опухолей, что делает их привлекательными мишенями для терапевтической активации и ингибирования, соответственно. Недавно открытые исследователями из Cleveland Biolabs Inc. (США) кураксины (от англ. cure - «лечение»), производные карбазола, являются примером многообещающих противоопухолевых препаратов, которые одновременно активируют p53 и ингибируют NF- κB , не вызывая заметной генотоксичности.

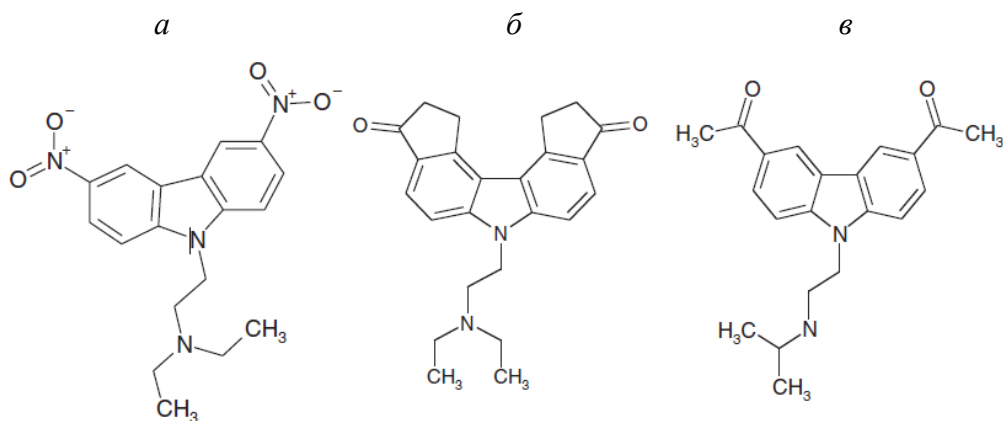


Рис. 10. Структуры кураксинов CBL-000 (а), CBL-100 (б) и CBL-137 (в)

Влияние кураксинов на p53 и NF-κB первоначально изучили на линии клеток почечной карциномы (RCC45), и результаты показали, что кетонзамещенные кураксины (CBL100/137) более эффективны в качестве активаторов p53 и ингибиторов NF-κB, чем нитрозамещенный аналог (CBL000). CBL0137 был выбран для оценки противоопухолевой эффективности *in vivo* из-за его высокой метаболической стабильности и растворимости в воде. Доклинические испытания CBL0137 показали высокую активность *in vitro* и *in vivo* [89]. Значения IC50 для 26 тестируемых клеточных линий находились в диапазоне от 0,13 до 0,80 мкМ, с медианным значением 0,28 мкМ. Наиболее чувствительная клеточная линия, MOLT-4, являлась клеточной линией острого лимфобластного лейкоза.

CBL0137, вводимый мышам перорально в нетоксичной дозе 30 мг/кг в день, подавлял рост ксенотрансплантатов опухоли толстой кишки (DLD-1), почечно-клеточного рака (Caki-1), и меланомы (Mel-7) [90].

Влияние кураксина CBL0137 на раковые стволовые клетки

Интересной особенностью кураксина CBL0137 является его цитотоксичность в отношении раковых стволовых клеток (cancer stem cells, CSC) [91]. Раковые стволовые клетки — это редкие опухолевые клетки, которые могут самообновляться и давать начало множеству типов клеток, составляющих опухоль, и, следовательно, могут образовывать новые опухоли. CSC менее чувствительны к лучевой и химиотерапии и более склонны к метастазированию по сравнению с нестволовыми опухолевыми клетками. Рецидив некоторых видов рака после терапии цитостатическими препаратами, например, гемцитабином, может быть связан с неспособностью этих препаратов уничтожить медленно делящиеся CSC, поскольку их механизм действия требует репликации ДНК. Так как цитотоксический эффект CBL0137 не связан с репликацией ДНК, авторы сравнили влияние CBL0137 и гемцитабина на популяцию CSC. Гемцитабин вызвал увеличение побочной популяции CSC. Напротив, обработка клеток CBL0137 не увеличивала популяцию CSC. Кроме того, CBL0137 предотвращал увеличение популяции CSC, вызванной гемцитабином, что позволяет предположить, что CBL0137 столь же токсичен для CSC, как и для пролиферирующих опухолевых клеток, и, кроме того, способен предотвращать вызванное гемцитабином обогащение CSC. Доля CSC в общем числе раковых клеток при этом уменьшалась. Это позволяет предположить, что CBL0137 может быть даже более токсичным для CSC, чем для основной популяции опухолевых клеток.

Потенциал использования CBL0137 для уничтожения раковых стволовых клеток был также продемонстрирован на стволовых клетках глиобластомы [92]. CBL0137 эффективно проникал через гемато-энцефалический барьер, о чем свидетельствовала его крайне высокая концентрация в нормальных тканях мозга у мышей (383 мкМ через 0,5 ч после внутривенного введения 70 мг/кг CBL0137, уменьшавшаяся до 9 мкМ через 24 часа, что все еще в 30 раз превышает значение IC₅₀ *in vitro*, равную 300 нМ в клетках глиобластомы), а его концентрация в опухолях была выше, чем в нормальных тканях головного мозга. CBL0137 значительно улучшал выживаемость мышей с опухолями. Кроме того, CBL0137 значительно снижал пролиферацию CSC глиобластомы по сравнению с нормальными опухолевыми клетками, а комбинированная обработка клеток CBL0137 и ингибитором EGFR / HER2 лапатинибом полностью останавливала пролиферацию CSC. Для оценки эффективности CBL0137 *in vivo* мышам с внутричерепными имплантатами CSC давали CBL0137 в питьевой воде. CBL0137 значительно улучшал выживаемость испытуемых мышей. Авторы предположили, что CBL0137 сдвигает баланс от симметричного к асимметричному клеточному делению, т. е. подталкивает CSC к дифференцировке.

Взаимодействие кураксинов с ДНК

Химическая структура кураксинов позволила предположить, что они могут быть интеркаляторами ДНК. Моделирование *in silico* показало, что при связывании с ДНК карбазольное ядро кураксина, внедряется между основаниями ДНК [90]. Симметричные боковые цепи молекулы в положениях 3 и 7 карбазола выступают в большую бороздку ДНК, в то время как N-концевая положительно заряженная боковая цепь заполняет малую бороздку и взаимодействует с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК.

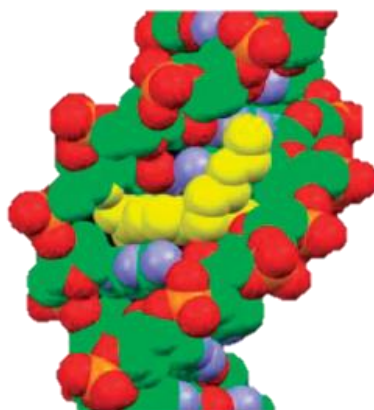


Рис. 11. Компьютерная модель комплекса кураксина CBL0137 с ДНК.

Круговой дихроизм и футпринтинг с ДНКазой I подтвердили интеркаляцию и изменение топологии ДНК в присутствии CBL0137 [93]. Константа диссоциации комплекса CBL0137 с ДНК составляла 40 ± 20 мкМ. Исходя из этого, на одну молекулу лиганда в равновесном состоянии приходится 25–66 п.н.

Влияние кураксинов на активность p53 и NF-κB коррелировало с их сродством к ДНК. Кроме того, кураксины предпочтительно связывались с последовательностями, обогащенными А·Т-парами. Авторы также изучили распределение нескольких флуоресцентных кураксинов в живых клетках. В отличие от неактивных аналогов, активные соединения, по-видимому, связывались с ядерными структурами с наибольшим накоплением в областях, где сосредоточен гетерохроматин с высоким содержанием А·Т-пар.

Наличие двух симметричных боковых цепи, выступающих в большую бороздку ДНК, крайне важно для биологической активности кураксинов, скорее всего, из-за лучшего закрепления молекулы между основаниями [94]. Наконец, относительно маленький и гибкий «хвост» - положительно заряженная боковая цепь, заполняющая малую бороздку, также повышает прочность связывания.

Механизм противоопухолевого действия кураксина CBL0137

Молекулярные механизмы противоопухолевого действия кураксинов являются предметом активных исследований на протяжении почти десяти лет. В одной из первых работ, посвященных изучению механизма CBL0137, Гаспарян и др. [90] показали, что влияние кураксинов на p53 и NF-κB, а также их цитотоксичность в отношении раковых клеток, являются результатом «захвата хроматина» комплексом FACT (FACilitates Chromatin Transcription).

FACT-зависимый механизм

FACT экспрессируется во время раннего эмбриогенеза в недифференцированных клетках-предшественниках и стволовых клетках взрослых тканей, практически не обнаруживается в дифференцированных клетках взрослых тканей и сверхэкспрессируется в некоторых типах опухолей. FACT представляет собой гистоновый шаперон, который участвует в элонгации транскрипции путем разборки и повторной сборки нуклеосом, тем самым обеспечивая возможность прохождения РНК-полимеразы II по хроматину во время

транскрипции. Эта функция жизненно важна для нормальной транскрипции генов и, по-видимому, требует наличия несвязанного FACT. Недостаток FACT в нуклеоплазме приводит к фосфорилированию серина Ser392 p53 киназой 2 и ингибированию NF-κB-зависимой транскрипции, что приводит к смерти раковых клеток. Хотя для скрининга кураксинов использовали способность активировать p53, цитотоксичность кураксинов в данном исследовании не ограничивалась клетками, экспрессирующими дикий тип p53 (p53-WT). Авторы обнаружили, что p53-WT-клетки были лишь немногим более восприимчивы к кураксину, чем клетки без p53 [90]. Большая чувствительность клеток p53-WT, вероятно, обусловлена индукцией апоптоза после обработки кураксином, тогда как гибель клеток с дефицитом p53 происходила без химических признаков апоптоза. Следовательно, p53-зависимый апоптоз не является единственным механизмом уничтожения клеток кураксином. Это означает, что если p53 мутирован или не экспрессируется (что наблюдается в ~50% случаев рака [95]), то один из двух механизмов действия кураксинов перестаёт работать, а противоопухолевая активность сохраняется только благодаря ингибированию NF-κB.

Согласно предложенной модели, способ активации p53 кураксинами отличается от такового у препаратов, повреждающих ДНК, и включает фосфорилирование Ser392 [90]. Фосфорилирование p53 по Ser392 осуществляется киназой 2 (CK2), связанной с комплексом FACT. FACT состоит из двух субъединиц: 1) структурно-специфического узнающего белка 1 (SSRP1) и 2) супрессора Ty16 (SPT16), перемещающего гистоны на ДНК после транскрипции. FACT связывается высокоподвижным доменом HMG из SSRP1 со структурно искаженной ДНК (например, аддуктами цисплатина и димерами тимина) и с неканоническими формами ДНК (например, со структурой Холлидея), и это смещает субстратную специфичность связанного с FACT CK2 от SSRP1 к p53. Авторы делают вывод о том, что кураксин вызывает перераспределение субъединиц FACT в ядре [90]. Кураксины не влияли на общее количество SSRP1 в клетках, но заставляли SSRP1 быстро исчезать из фракции растворимого белка и прочно связываться с хроматином. То же происходило и с SPT16-субъединицей FACT. Авторы называли это явление «захватом хроматина» (*chromatin trapping, c-trapping*). Этот захват хроматина комплексом FACT, вероятно, связан с его сродством к нарушенной структуре хроматина, вызванной интеркаляцией кураксина в ДНК. Индуцированный кураксином «захват хроматина» комплексом FACT также наблюдался *in vivo*: уровни как SSRP1, так и SPT16 были снижены в фракциях растворимого

белка, полученных из опухолей молочной железы трансгенных мышей, обработанных CBL0137, по сравнению с опухолями необработанных мышей. Цитотоксичность кураксина была повышена в клетках, недостаточно экспрессировавших FACT, в то время как избыточная экспрессия FACT, наоборот, компенсировала недостаток FACT, вызванный захватом хроматина, и поддерживала жизнеспособность клеток в присутствии кураксина.

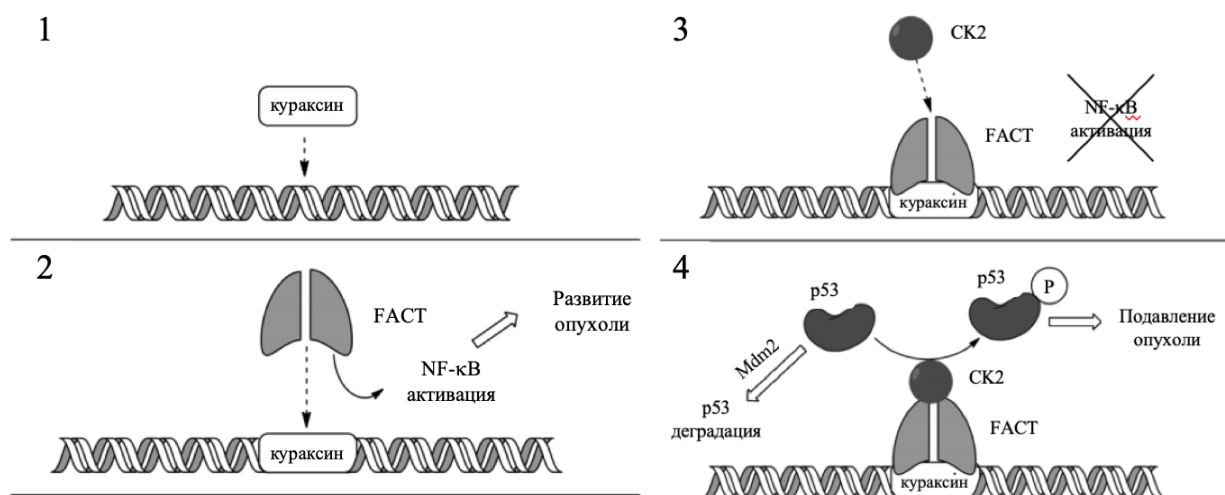


Рис. 12. Схематическое изображение механизма противоопухолевого действия кураксина: 1) интеркалирование в ДНК; 2) взаимодействие белкового комплекса FACT с нуклеосомной ДНК, приводящее к ингибированию NF-κB-опосредованной транскрипции; 3) связывание CK2 с комплексом FACT-хроматин-кураксин; 4) фосфорилирование/активация белка супрессора опухолей p53.

Механизм ингибирования NF-κB, по-видимому, связан с блокированием связывания ферментов транскрипции (в особенности, РНК-полимеразы II, RNAPII) с NF-κB-зависимыми промоторами. Для связывания этих ферментов с ДНК необходимы факторы ремоделирования хроматина, в том числе FACT. Отсутствие FACT на NF-κB-зависимых промоторах в клетках, обработанных кураксином, может привести к затруднению связывания RNAPII и подавлению NF-κB-зависимой транскрипции. В соответствии с этой моделью, обработка клеток кураксином снижала количество RNAPII, связанной с промотором IL-8, и блокировала связывание RNAPII с кодирующей областью гена IL-8.

Нарушение структуры хроматина

Дальнейшие исследования FACT-зависимого механизма действия CBL0137 показали, что связывание кураксина с ДНК может вести к разрушению нуклеосом, накоплению отрицательных сверхвитков и переходу ДНК в левозакрученную Z-форму [93]. В клетках, обработанных ≥ 3 мкМ CBL0137, через 10–20 минут после начала обработки происходило накопление свободных гистонов в растворимой фракции. Потеря гистонов из

хроматина подтверждалась увеличением чувствительности геномной ДНК к расщеплению нуклеазами. Инкубация нуклеосом с увеличивающимися концентрациями CBL0137 приводила к появлению гексасом, свободной ДНК и полному исчезновению полосы, соответствующей нуклеосоме, в геле при высоких концентрациях CBL0137. Обработка клеток CBL0137 в высокой концентрации ($\geq 2,5$ мкМ) также вызывала появление Z-ДНК в ядре. Согласно модели, предложенной авторами, в результате вызванной CBL0137 диссоциации нуклеосом, в ДНК накапливаются отрицательные сверхвитки, облегчающие распаривание оснований и переход ДНК из B-формы в Z-форму. При этом, субъединица FACT SSRP1 связывает ДНК, склонную к переходу в Z-форму, по-видимому, когда она уже перешла в левозакрученную конфигурацию. Таким образом, захват хроматина комплексом FACT происходит в две фазы: первая фаза — это частичное разрушение нуклеосом, сопровождаемое связыванием субъединицы SPT16 с открытыми нуклеосомами или гексасомами. Вторая фаза - полная разборка нуклеосом, сопровождаемая связыванием SSRP1 с альтернативными структурами ДНК, такими, как Z-ДНК.

Подавление экспрессии ферментов нуклеотидного обмена

При исследовании одновременного воздействия CBL0137 и цитостатического препарата гемцитабина на клетки рака поджелудочной железы, авторы обнаружили, что CBL0137 сенситизирует раковые клетки к цитотоксическому действию гемцитабина [91]. Для выяснения роли CBL0137 в повышении активности гемцитабина, было изучено влияние CBL0137 на экспрессию факторов, связанных с устойчивостью и чувствительностью к гемцитабину, одним из которых был фермент нуклеотидного обмена рибонуклеотидредуктаза. CBL0137 предотвращал индуцированную гемцитабином экспрессию субъединиц рибонуклеотидредуктазы. Механизм такого ингибирования неясен, поскольку регуляция экспрессии этих субъединиц изучена недостаточно.

Нарушение пространственной организации генома

Пространственная организация генома играет важнейшую роль в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Хроматин организован в виде топологически ассоциированных доменов (ТАД), в которых последовательности ДНК физически взаимодействуют друг с другом чаще, чем с последовательностями вне ТАД. Сами ТАДы состоят из петель ДНК, связанных с белковыми комплексами когезинами и транскрипционными факторами CTCF. Петли ДНК, связанные когезином и CTCF,

обеспечивают сближение регуляторных элементов генома, таких как промоторы и энхансеры, в пространстве, регулируя, таким образом, транскрипцию генов. В 2019 г. Кантидзе и соавт. изучили влияние кураксина CBL0137 на пространственную организацию генома и взаимодействия энхансеров с промоторами (ЭПВ) [96]. Авторы показали, что CBL0137 гораздо сильнее ингибирует все транскрипцию генов, регулируемых энхансерами (в клетках HT1080) или супер-энхансерами (в клетках MM1.S), по сравнению с генами, транскрипция которых от энхансеров не зависит. CBL0137, таким образом, нарушал дальние ЭПВ. При этом, CBL0137 не влиял на структуру и целостность нуклеосом в концентрациях, при которых наблюдались нарушения ЭПВ, но изменял длину линкерной ДНК. Авторы предположили, что изменение длины линкерной ДНК препятствовало образованию петель хроматина, что и послужило причиной нарушения ЭПВ.

Чтобы выяснить, влияет ли кураксин на дальние ЭПВ в живых клетках, авторы провели анализ конформации хромосом методом Hi-C и получили карты взаимодействия хроматина для клеток HT1080, инкубированных с CBL0137. Согласно полученным данным, CBL0137 нарушал трехмерную организацию генома. Границы ТАДов были частично нарушены, о чем свидетельствовало увеличение количества контактов между ТАДами и уменьшение плотности контактов внутри ТАДов. Причиной наблюдаемых изменений трехмерной организации генома могла послужить вызванная кураксином частичная диссоциация CTCF с его сайтов связывания на ДНК. Кураксины, таким образом, могут рассматриваться как эпигенетические препараты, влияющие на транскрипцию генов посредством изменения пространственной организации генома.

Токсичность кураксинов

Кураксины показали высокую противоопухолевую активность у мышей в дозах, не вызывающих системной токсичности или генотоксичности, о чем свидетельствуют обширные токсикологические исследования и всестороннее гистопатологическое исследование [90]. Введение мышам дозы кураксина в 30 мг/кг не вызывало побочных эффектов. После введения 60 мг/кг кураксина CBL0137 в день в течение 14 дней (что значительно выше максимальной переносимой дозы для этого соединения) наблюдалось некоторое увеличение размера селезенки, и это может быть связано со сверхэкспрессией FcγR в этом органе. Кураксины оказались более токсичными для опухоли, чем для нормальных клеток. Нормальные фибробласты мыши и человека были гораздо менее чувствительны к обработке кураксином *in vitro*, чем их опухолевые линии или клетки

фибросаркомы. Кроме того, опухолевые клетки человека погибали после обработки кураксином *in vitro*, тогда как нормальные клетки (фибробласты человека и immortalized эпителиальные клетки почки) переставали расти и возобновляли рост после прекращения инкубации с кураксином.

Накопление CBL0137 в неопухолевой мозговой ткани мышей не вызывало заметной нейротоксичности [97].

Глава 2. Влияние противоопухолевых препаратов, взаимодействующих с ДНК, на функционирование ДНК-метилтрансфераз (Результаты и обсуждение)

ДНК-метилтрансфераза Dnmt3a

Объектом наших исследований явился каталитический домен эукариотической МТазы Dnmt3a (Dnmt3a-CD). 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). Dnmt3a принадлежит к семейству МТаз Dnmt3, устанавливающих профиль метилирования *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 [98]. Генетические исследования показали, что как Dnmt3a, так и Dnmt3b необходимы для правильного эмбрионального развития: мыши с инактивированным геном Dnmt3b рождались мертвыми, а мыши-нокауты по гену Dnmt3a рождались с многочисленными дефектами развития и погибали вскоре после рождения [99]. Мутации в Dnmt3a, а также нарушения её экспрессии приводят к нестабильности генома и сопутствуют образованию и прогрессированию различных типов опухолей [100]. В отличие от геномов клеток нормальной ткани, геномы опухолевых клеток обычно демонстрируют глобальное гипометилирование ДНК с локальным гиперметилированием определенных областей [101].

В настоящее время предполагается, что Dnmt3a имеет такой же каталитический механизм, что и прокариотическая МТаза M.HhaI. Упрощенно 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 CH_3 -группы с кофактора на ДНК, 4) диссоциация фермент-субстратного комплекса и высвобождение продуктов реакции (рис. 13)

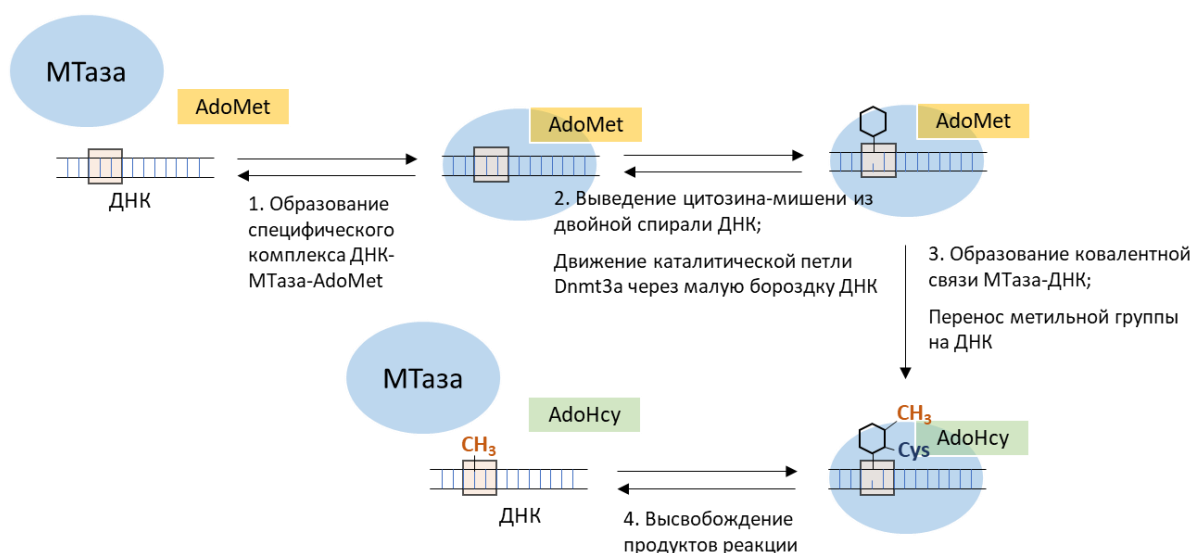


Рис. 13. Схема реакции метилирования ДНК.

Dnmt3a состоит из С-концевого домена, обладающего активностью в изолированной форме [102], и N-концевого регуляторного домена, отвечающего за взаимодействие фермента с гистонами, локализацию фермента в ядре и регулирующего активность фермента (рис. 14) [99].

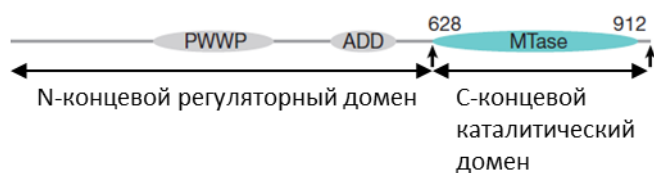


Рис. 14. Строение ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a.

Рентгеноструктурный анализ (РСА) С-концевого домена Dnmt3a в комплексе с регуляторным фактором Dnmt3L показал, что комплекс представляет собой линейный гетеротетрамер, состоящий из двух молекул DnmtL (по краям тетрамера) и двух центральных молекул Dnmt3a, формирующих участок связывания ДНК [103]. В отсутствие Dnmt3L, молекулы Dnmt3a формируют гомодимеры через 3a-3L поверхность (FF-поверхность), которые затем димеризуются по поверхности 3a-3a (RD-поверхность) с образованием каталитически активного тетрамера. Так как связывание ДНК происходит на RD-поверхности, тетрамер Dnmt3a содержит один участок связывания ДНК [104]. FF-поверхность образуется за счет гидрофобных взаимодействий остатков фенилаланина F728 и F768 Dnmt3a с остатками F297 и F337 Dnmt3L, в то время как RD-поверхность образована

контактами R881 с D872. Разрушение как RD, так и FF-поверхностей ведет к полной потере каталитической активности, что свидетельствует об отсутствии активности Dnmt3a в мономерной форме. Согласно данным PCA комплекса каталитического домена Dnmt3a (Dnmt3a-CD) с ДНК-дуплексом в присутствии Dnmt3L, два активных центра тетрамера расположены в большой бороздке ДНК на расстоянии 14 п.н. [103] (рис. 15). По разным данным, активные центры тетрамера способны метилировать два участка CpG, разделенных 8-14 п.н. в противоположных цепях ДНК [103,105].

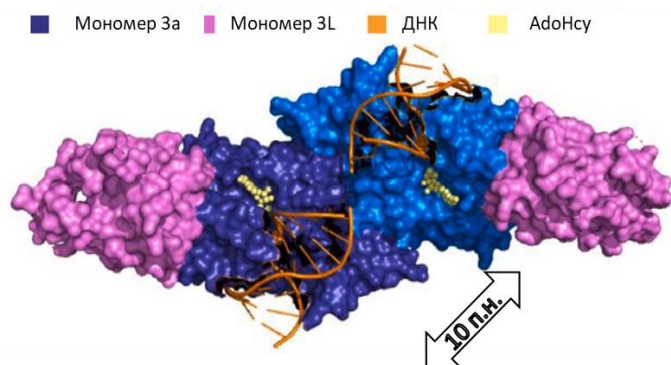


Рис. 15. Структура комплекса Dnmt3a/Dnmt3L/ДНК (PDB 6f57).

Ранее биохимические исследования показали, что участки геномной ДНК, подверженные метилированию Dnmt3a, содержат сайты CpG, расположенные периодически, с периодом в 10 п. н. [104]. Путем исследования метилирования ДНК-шпилек Dnmt3a-CD, содержащих по 9 и 12 участков CpG с последующей оценкой уровня метилирования с помощью бисульфитного секвенирования, обнаружено, что распределение метилированных сайтов CpG носит упорядоченный, а не случайный характер. Распределение метилированных остатков цитозина имеет максимумы на расстоянии 10 п. н., при этом соответствующие максимумы на противоположных цепях сдвинуты к 5'-концам [105].

МТаза Dnmt3a чувствительна к нарушениям структуры ДНК. Это подтверждают полученные ранее в нашей лаборатории данные об ингибировании Dnmt3a малобороздочными ДНК-лигандами - димерными бисбензимидазолами [106,107], а также ухудшение метилирования этим ферментом ДНК субстратов, поврежденных канцерогеном бензо[а]пиреном [1].

Выделение и очистка Dnmt3a-CD

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). Ферменты были выделены с помощью металл-аффинной хроматографии на колонках, содержащих смолу Co²⁺-TALON[®].

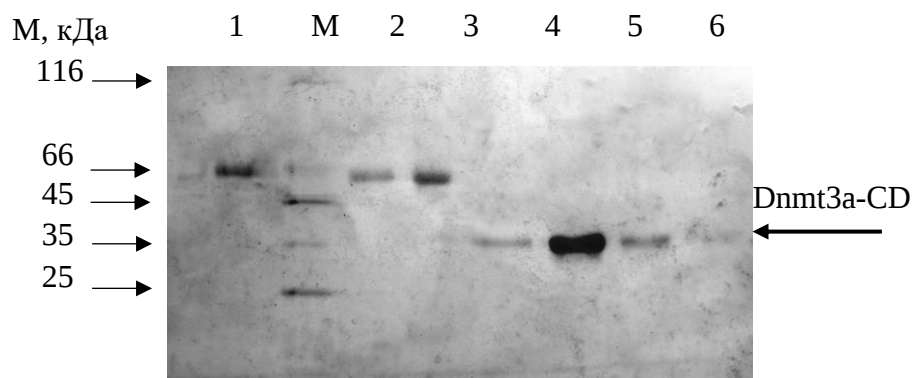


Рис. 16. Анализ чистоты выделенного препарата Dnmt3a-CD методом электрофореза в 12,5% ПААГ по Лэммли. 1-3 – маркеры БСА (66 кДа), М – белковые маркеры молекулярного веса, 4-7 – фракции Dnmt3a-CD 400, 600 и 600 мкл после элюции раствором 250 мМ имидазола.

Белковый препарат получили с высокой степенью очистки (~99%). Из 1 литра культуры удалось выделить 1,2 мг белка.

Кроме того, была выделена прокариотическая МТаза M.SssI, метилирующая участки CpG, для использования в качестве контроля в экспериментах по методу кругового дихроизма. Фермент был гиперэкспрессирован в клетках *E. coli* ER1821 с помощью плазмиды pCAL/pH. Выделение проводили аналогично Dnmt3a-CD.

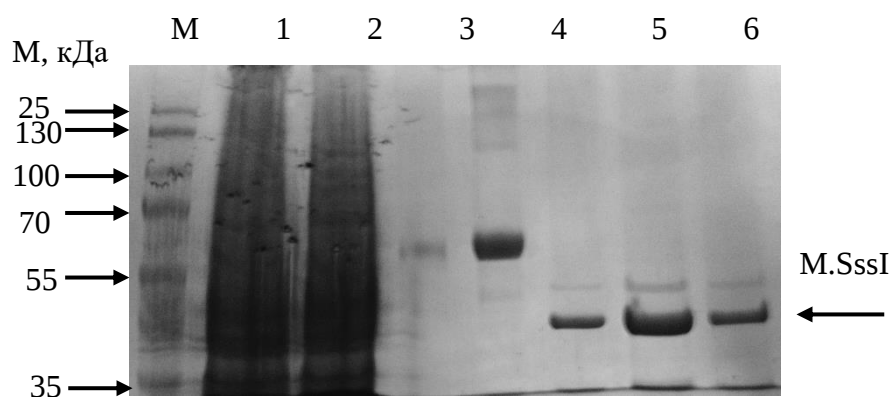


Рис. 17. Анализ чистоты выделенного препарата M.SssI методом электрофореза в 12,5% ПААГ по Лэмбли. М – белковый маркер молекулярного веса; 1 – лизат, 2 – проскок; 3, 4 – маркеры БСА (66 кДа), 5-7 – фракции M.SssI 400, 600 и 300 мкл после элюции раствором 150 mM имидазола

Из 1 литра культуры удалось выделить 1,6 мг M. SssI с высокой степенью очистки (~95%). Оба фермента проявляли склонность к агрегации при диализе, поэтому в случае M.SssI эту проблему решали, используя в качестве диализного буфера двухкратный рабочий буфер для M.SssI (буфер Б), содержащий 0,02% неионогенного ПАВ Triton X-100.

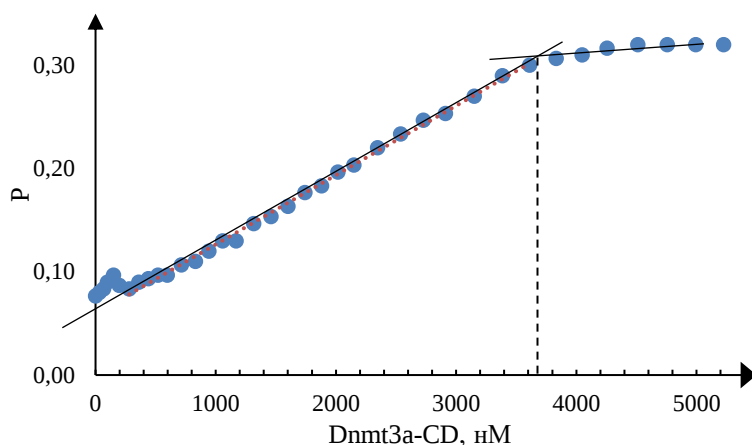


Рис. 18. Титрование 100 нМ ДНК дуплекса fCG/GCf МТазой Dnmt3a-CD в неравновесных условиях для определения концентрации активных молекул фермента методом поляризации флуоресценции. Р – поляризация флуоресценции

Концентрации ферментов, определенные по методу Бредфорда, составили ~25 мкМ и ~23 мкМ для M.SssI и Dnmt3a-CD, соответственно. Для МТазы Dnmt3a-CD мы также определили концентрацию активных молекул с помощью титрования 100 нМ дуплекса fCG/GCf в неравновесных условиях. Начальный и конечный участки полученной кривой аппроксимировались прямыми (рис. 18). Учитывая при расчётах, что Dnmt3a-CD вступает в реакцию в форме тетрамера, полученная концентрация активных молекул (в расчете на мономер) составила ~2 мкМ, что составляет около 10% от общего числа молекул белка.

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

Задача определения активности МТаз часто возникает при решении различных задач, связанных с функционированием МТазы или при исследовании соединений, потенциально способных влиять на её работу. Для количественного измерения кинетики метилирования ДНК в данной работе использовался традиционный метод, основанный на включении AdoMet, содержащего меченную тритием метильную группу ($[^3\text{H}]$ AdoMet), в участок CpG

[108]. 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 исследовать другие возможности определения степени метилирования ДНК. Наше внимание привлекли недавно открытые “метилзависимые” эндонуклеазы (МЗ-ЭР) – ферменты, расщепляющие метилированные участки в ДНК. Для разработки метода были выбраны МЗ-ЭР KfoI ($\text{G}\downarrow\text{C}(\text{5mC})\text{GGC}$) и PcsI ($((\text{5mC})\text{GNNNNN}\downarrow\text{NN}(\text{5mC})\text{G}))$) [109]. Суть данного метода заключалась в последовательных реакциях метилирования FAM-меченной ДНК (табл. 1, **IIf-IVf**) и её расщепления МЗ-ЭР. Продукты расщепления затем анализировались в 20% 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' –CTGAATACTACTTGC CG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAAC CG GAGAGATTGGACTA
IIf	fCG/GCf	5' FAM –CTGAATACTACTTGC CG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAAC CG GAGAGATTGGACTA– FAM
IIIf	fCG/GM _к	5' FAM –CTGAATACTACTGCG CG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGACG GM CGGAGATTGGACTA
IIIf	fCG/GC _к	5' FAM –CTGAATACTACTGCG CG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGACG CG CGGAGATTGGACTA
IVf	fCG-MG/ GM-GC	5' FAM –TGCTGAATA CG CTGTATAM G CTCTAACCTG 3' –ACGACTTAT GM GACATAT GC AGATTGGAC
Vf	fCG-MG/ GM-GM	5' FAM –TGCTGAATA CG CTGTATAM G CTCTAACCTG 3' –ACGACTTAT GM GACATAT GM AGATTGGAC
VI	CG/GM	5' –CTGAATACTACTTGC CG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAAC GM GAGAGATTGGACTA
VIIf	CG/GMf	5' –CTGAATACTACTTGC CG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAAC GM GAGAGATTGGACTA– FAM
VII	C ^s G/GM	5' –CTGAATACTACTTGC ^s G CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAAC G MGAGAGATTGGACTA
VIIIf	C ^s G/GMf	5' –CTGAATACTACTTGC ^s G CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAAC ^s G MGAGAGATTGGACTA– FAM
VIII	CG/ ^s GM	5' –CTGAATACTACTTGC CG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAAC ^s GM GAGAGATTGGACTA
VIIIIf	fCG/ ^s GM	5' FAM –CTGAATACTACTTGC CG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAAC ^s GM GAGAGATTGGACTA
IX	^s GCG/GM	5' –CTGAATACTACTT ^s GCG CTCTCTAACCTGAT 3' –GACTTATGATGAA CGM GAGAGATTGGACTA
IXf	^s GCG/GMf	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
Xf	CG-CG/ GM-GMf	5' –TGCTGAATA CG CTACTGATG CG CTAACCTG 3' –ACGACTTAT GM GATGACTAC GM GATTGGAC– FAM

Номер	Обозначение	Дуплекс
XI	CG-C ^S G/ GM-GM	5' -TGCTGAATA <u>CG</u> CTACTGATGC ^S GCTAACCTG 3' -ACGACTTATGMGATGACTACG MGATTGGAC
XII	CG-C ^S G/ GM-GMf	5' -TGCTGAATA <u>CG</u> CTACTGATGC ^S GCTAACCTG 3' -ACGACTTATGMGATGACTACG MGATTGGAC-FAM
XIII	C ^S G-C ^S G/ GM-GM	5' -TGCTGAATA <u>C^SG</u> CTACTGATGC ^S GCTAACCTG 3' -ACGACTTATG MGATGACTACG MGATTGGAC
XIII	C ^S G-C ^S G/ GM-GMf	5' -TGCTGAATA <u>C^SG</u> CTACTGATGC ^S GCTAACCTG 3' -ACGACTTATG MGATGACTACG MGATTGGAC-FAM
XIII	CG/ GM ^S G	5' -CTGAATACTACTTGCG CTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAACGM ^S GAGAGATTGGACTA
XIV	CG/ GMN ₂ ^S G	5' -CTGAATACTACTTGCGCT CTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAACGMGA ^S GAGAGATTGGACTA
XV	CG/ GMN ₄ ^S G	5' -CTGAATACTACTTGCGCTCT CTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAACGMGAGA ^S GATTGGACTA
XVI	CG/ GMN ₈ ^S G	5' -CTGAATACTACTTGCGCTCTCTAA CCTGAT 3' -GACTTATGATGAACGMGAGAGATT ^S GACTA
XVII	CG/ GMN ₉ ^S G	5' -CTGAATACTACTTGCGCTCTCTAAC CTGAT 3' -GACTTATGATGAACGMGAGAGATTG ^S GACTA
XVIII	^S GG/GM	5' -CTGAATACTACTTG ^S GGCTCTCTAACCTGAT 3' -GACTTATGATGAAC GMGAGAGATTGGACTA
XIX	C ^S G-CG/ GM-GM	5' -TGCTGAATGC ^S GCTACTGATGMGCTAACCTG 3' -ACGACTTACG MGATGACTACGMGATTGGAC
XX	^S GCG-CG/ GM-GM	5' -TGCTGAAT ^S GCGCTACTGATGMGCTAACCTG 3' -ACGACTTA CGMGATGACTACGMGATTGGAC
XXI	CG-CG/ ^S GM-GM	5' -TGCTGAATG CGCTACTGATGMGCTAACCTG 3' -ACGACTTAC ^S GMGATGACTACGMGATTGGAC
XXII	fCG/GC _s f	5' -FAM-GAGCCAAGCGCACTCTGA 3' -CTCGGTTCGCTGAGACT-FAM
XXIII	CGZ/GCf	5' -GAGCCAAGCGZACTCTGA 3' -CTCGGTTCGCTGAGACT-FAM
XXIV	fCG/GZ	5' FAM-GAGCCAAGCGCACTCTGA 3' -CTCGGTTCGZGTGAGACT
XXV	fCG/ GC _{At} f	5' FAM-CTGAATAATTAATGCGCTAATTAATCTGAT 3' -GACTTATTAATTACGCGATTAATTAGACTA-FAM

^aM – 5-метилцитозин; FAM – 6-карбоксифлуоресцеин, ^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.

KroI

Эндонуклеаза KroI способна гидролизовать ДНК в метилированном участке G↓C(5mC)GGC (рис. 19a) [110]. В данной работе был использован 30-звенный полуметилированный (fCG/GM^K) и неметилированный (fCG/GC^K) ДНК-субстраты, каждый из которых содержал FAM-метку в одной из цепей (табл. 1, **II**f-**III**f). Расщепление ДНК эндонуклеазой KroI после реакции метилирования проводили в буфере B. Как видно из табл. 2 и рис. 19б (дор. 2), KroI расщепляла верхнюю цепь дуплекса fCG/GM^K (w₀ = 27%) с образованием 13-звенного FAM-меченного фрагмента ДНК. Полученный результат согласуется с данными о том, что KroI способен гидролизовать ДНК-дуплексы с полуметилированными сайтами узнавания [110]. Добавление к дуплексу fCG/GM^K МТазы

ДНК-дуплекс	Эндонуклеаза рестрикции	Степень расщепления ДНК-дуплексов (w), % ^a			Степень метилирования ДНК-дуплексов МТазой Dnmt3a-CD, %
		w ₀	w _{M.SssI}	w _{Dnmt3a}	
1. fCG/GCf	Hin6I	88 ± 6	0	10 ± 7	89
2. fCG/GM ^K	KroI	27 ± 9	58 ± 3	21 ± 4	– ^b
3. fCG/GC ^K	KroI	0	58 ± 3	14 ± 1	24
4. fCG-MG/GM-GC	PcsI	4 ± 2	68 ± 14	68 ± 10	100
5. fCG-MG/GM-GM	PcsI	71 ± 18	68 ± 14	74 ± 15	– ^b

^aОбозначения w₀, w_{M.SssI} и w_{Dnmt3a} приведены в “Экспериментальной части”. Величины w рассчитаны на основании не менее двух экспериментов. Указаны стандартные отклонения.

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

PcsI

Метилзависимая эндонуклеаза PcsI расщепляет ДНК-дуплексы, которые содержат два полностью метилированных CpG-сайта, разделенные 7 п.н. (Рис. 20а). [112], что приблизительно соответствующее расстоянию между активными центрами в тетрамере Dnmt3a-CD [104]. Эта особенность делает PcsI привлекательной для использования в анализе активности Dnmt3a-CD. Чтобы получить ДНК-дуплекс, являющийся хорошим субстратом для PcsI, мы сконструировали дуплекс fCG-MG/GM-GC, который уже имел два метилированных остатка цитозина и содержащий FAM в верхней цепи (табл. 1). Ориентация двух цитозинов-мишеней в дуплексе fCG-MG/GM-GC является оптимальной для их метилирования с помощью Dnmt3a-CD (рис. 15). Расщепление проводили в буфере Д. Дуплекс fCG-MG/GM-GC практически не расщеплялся PcsI, но 15-мерный продукт его гидролиза был обнаружен в геле после его метилирования с помощью Dnmt3a-CD (рис. 20б, дорожки 2 и 4, соответственно). Этот же продукт наблюдался после метилирования M.SssI в контрольном эксперименте (рис. 20б, 3). Степень метилирования МТазой Dnmt3a-CD дуплекса fCG-MG/GM-GC составила 100% (табл. 2).

a

б

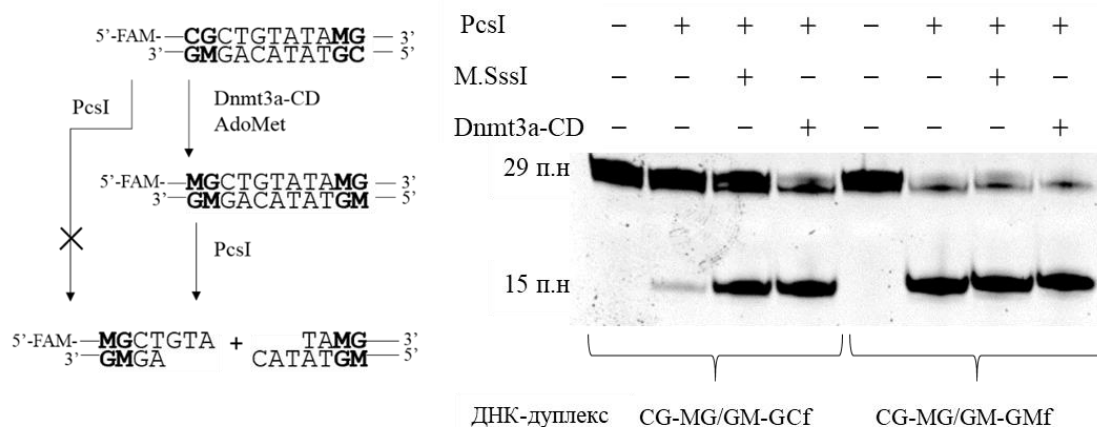


Рис. 20. Расщепление дуплексов fCG-MG/GM-GC и fCG-MG/GM-GM эндонуклеазой PcsI до и после метилирования МТазой Dnmt3a-CD и M.SssI. *а* – Схема расщепления fCG-MG/GM-GC. *б* – Расщепление fCG-MG/GM-GC и fCG-MG/GM-GM в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной.

Мы также изучили ДНК-дуплекс fCG-MG/GM-GM, содержащий три метильные группы в CpG-сайтах и только один цитозин-мишень (табл. 1, рис. 20). Ранее мы наблюдали, что такой субстрат эффективно метилируется МТазой Dnmt3a-CD. Однако PcsI эффективно расщепляла триметилированный дуплекс (рис. 20б, 6) даже в отсутствие его метилирования с помощью Dnmt3a-CD ($w_0 = 71\%$, табл. 2), и электрофоретическая картина не изменилась после метилирования этого дуплекса любой из МТаз (Рис. 20б, 7 и 8). Следовательно, субстрат fCG-MG/GM-GM был непригоден для анализа эффективности метилирования ДНК с помощью Dnmt3a-CD.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что KroI может лишь ограниченно использоваться для оценки эффективности метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD, поскольку гидролиз метилированного субстрата эндонуклеазой KroI является неполным, а также вследствие неоптимального для Dnmt3a-CD контекста CpG-сайта в участке узнавания KroI. При этом, дуплекс fCG-MG/GM-GC может быть рекомендован для изучения активности Dnmt3a с помощью PcsI.

Hin6I

Общим недостатком изученных МЗ-ЭР явилась невысокая степень расщепления ДНК после метилирования Dnmt3a-CD (рис. 19 и 20). В связи с этим, было решено продолжить разработку метода определения степени метилирования с использованием традиционной эндонуклеазы Hin6I, расщепляющей неметилированный участок G↓CGC (рис. 21а). Ранее

аналогичный подход был использован для поиска ингибиторов МТаз M.SssI и Dnmt3a с помощью эндонуклеаз Hin6I [106] и HhaI [1] соответственно. В данной работе был впервые использован 30-звенный ДНК-дуплекс fCG/GCf (табл. 1), содержащий FAM-метки в обеих цепях, в качестве субстрата для реакции метилирования. ДНК-дуплекс fCG/GCf последовательно метилировали МТазой Dnmt3a-CD в буфере А, добавляли в смесь MgCl₂ до 3 мМ и расщепляли с помощью эндонуклеазы Hin6I. В качестве контроля проводили расщепление дуплекса fCG/GCf без предварительного метилирования. Hin6I расщепляла неметилированный дуплекс fCG/GCf с образованием FAM-меченных продуктов, (рис. 21б), тогда как обработка Dnmt3a-CD или M.SssI практически полностью защищала дуплекс fCG/GCf от расщепления. Эффективность метилирования ДНК-дуплекса fCG/GCf МТазой Dnmt3a-CD составила 89% (табл. 2).

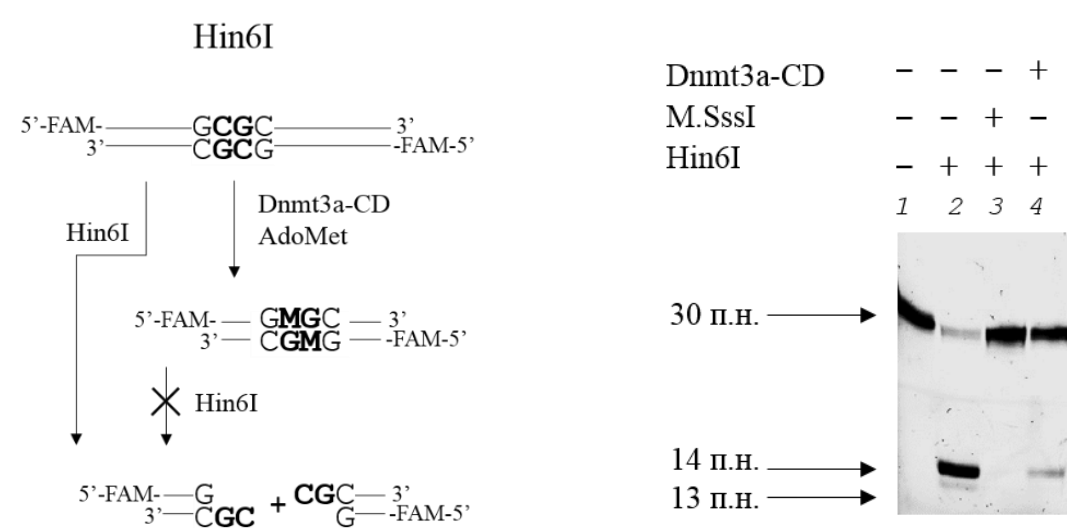


Рис. 21. Расщепление ДНК-дуплекса fCG/GCf эндонуклеазой Hin6I до и после метилирования Dnmt3a-CD и M.SssI. *а* – Схема расщепления fCG/GCf. *б* – Расщепление fCG/GCf в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной.

Сравнение значений степени метилирования (табл. 2), полученных для KfoI и Hin6I, имеющих один CpG-сайт в участке узнавания показывает, что традиционная эндонуклеаза Hin6I является более предпочтительной для определения степени метилирования ДНК МТазой Dnmt3a. В связи с этим, в данной работе степень метилирования ДНК определяли с использованием традиционной Hin6I. В отличие от предыдущих работ, в оптимизированном нами методе использовался ДНК-дуплекс, содержащий FAM-метки в обеих цепях для увеличения интенсивности флуоресценции, а также была исключена

стадия замены буфера перед реакцией расщепления ДНК для увеличения экспрессности метода.

Влияние противоопухолевых препаратов на метилирование ДНК

6-тиогуанин (^SG)

Как отмечено в гл. 1, тиопурины, такие как 6-тиогуанин (^SG), 6-меркаптопурин и азатиоприн, являются эффективными противоопухолевыми препаратами, успешно применяющимися в клинической практике, в частности, при лечении острого лимфобластного лейкоза. Влияние встраивания ^SG в ДНК на функционирование Dnmt3a не изучено. Ранее в нашей лаборатории было показано, что ряд повреждений остатков гуанина в сайтах CpG, таких как 8-оксогуанин [113], O6-метилгуанин [114] и аддукты гуанина с бензо[*a*]пирендиолэпоксидами [1], влияют на работу Dnmt3a. Так как тетрамер Dnmt3a (рис. 15) при связывании с ДНК образует большое число специфических и неспецифических контактов в участке узнавания и рядом с ним [103], включение ^SG вместо гуанина в сайты CpG или соседние нуклеотидные последовательности может нарушать метилирование цитозина, катализируемое Dnmt3a, в этих сайтах. Чтобы проверить эту гипотезу, мы оценили влияние ^SG в CpG на метилирование ДНК МТазой Dnmt3a-CD. Мы сконструировали набор 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 (m5C) вместо одного или двух остатков цитозина (табл. 1, **VI-XXI** и схема 1).

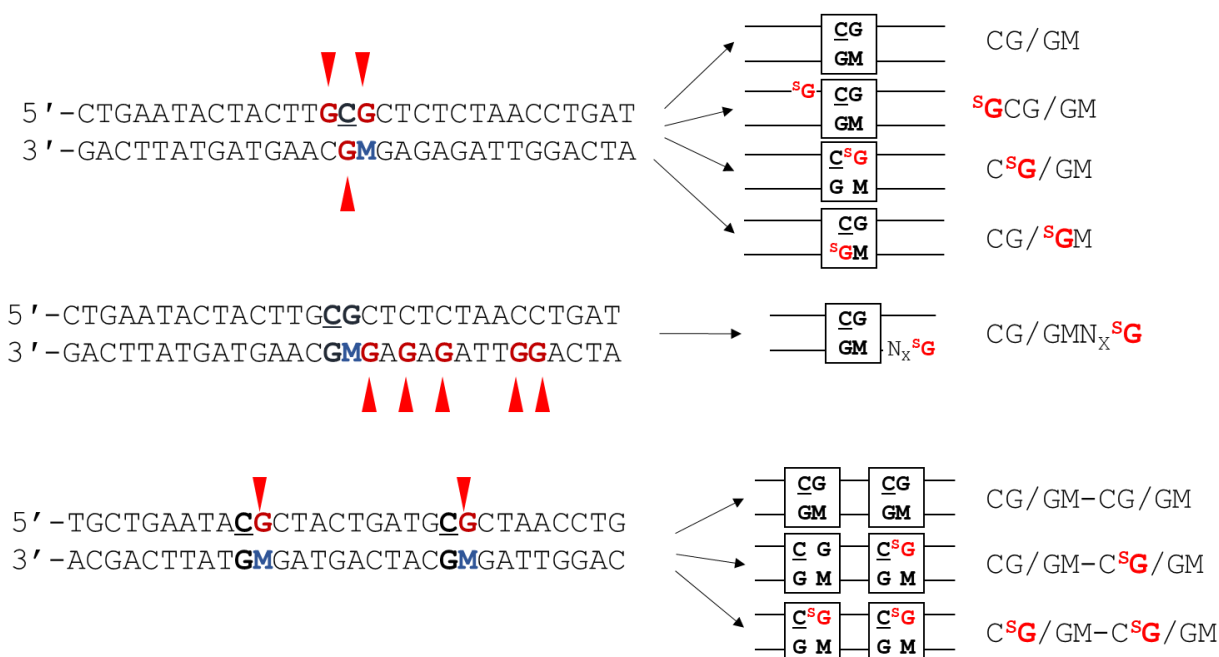


Схема 1. Конструирование ^SG-ДНК с одним или двумя CpG-сайтами. ^SG – 6-тиогуанин, М – 5-метилцитозин. Места введения ^SG в исходный ДНК-дуплекс отмечены стрелками.

Чтобы оценить влияние ^SG на стабильность ^SG-ДНК, **Таблица 3.** Влияние ^SG на было проведено плавление ДНК-дуплексов, стабильность ^SG-ДНК.

содержащих один и два остатка ^SG. Температура плавления ^SG-ДНК уменьшалась на 13,8°C и 15,5°C по сравнению с немодифицированным дуплексом CG/GM-CG/GM (табл. 3). Эти результаты показывают, что замена кислорода на серу в 6 положении гуанина нарушает взаимодействие оснований в паре C-G и согласуется с данными о влиянии ^SG, на динамику пары оснований, а именно, о 80-кратном уменьшении времени жизни пары C-^SG по сравнению с парой C-G [гл. 1]

^SG-ДНК с одним CpG-сайтом.

Выбор односайтовых ^SG-ДНК был нацелен на моделирование различных ситуаций, возникающих при повреждении ДНК тиогуанином вблизи сайта CpG или непосредственно в сайте. ДНК-дуплексы содержали один центрально расположенный CpG-сайт и остаток ^SG, замещающий один из остатков гуанина в CpG-сайте или рядом с ним (табл. 1, **VI-IX**; схема 1). ^SG располагался с 3'-стороны от цитозина-мишени (дуплекс C^SG/GM), напротив него (CG/^SGM) или с 5'-стороны от CpG-сайта (^SGCG/GM) (схема 1). Затем мы изучили их связывание и метилирование МТазой Dnmt3a-CD (рис. 22). Метилирование односайтовых

^3H -ДНК представлено на рис. 22а. Кинетику метилирования ^3H -ДНК изучали при соотношении концентраций активной тетрамерной формы фермента и ДНК-дуплекса 1:18. Степень метилирования измеряли по переносу меченной тритием метильной группы (^3H -CH₃) от молекулы AdoMet в 5-ое положение цитозина-мишени. Временные зависимости данных реакций фиксировались в интервале времени до 20 мин. для всех субстратов.

Замена 3'-гуанина рядом с цитозином-мишенью, на ^3G ($\text{C}^3\text{G}/\text{GM}$) привела к двукратному снижению значений начальной скорости реакции метилирования ($V_{\text{отн}}$) относительно дуплекса CG/GM (табл. 4). Введение ^3G , расположенного напротив целевого цитозина ($\text{CG}/^3\text{GM}$) или с 5'-стороны от CpG-сайта ($^3\text{GCCG}/\text{GM}$) увеличивало $V_{\text{отн}}$ в 1,4 раза. Следовательно, метилирование 30-звенных ^3G -ДНК МТазой Dnmt3a-CD зависело от положения ^3G . Наибольший эффект наблюдался в том случае, когда ^3G замещал гуанин в сайте CpG с 3'-стороны от цитозина-мишени.

Таблица 4. Начальные скорости реакции метилирования и параметры комплексообразования ^3G -ДНК и МТазы Dnmt3a-CD.

	ДНК-дуплекс	$V_0 \pm \text{SD}^b$, нМ/мин	$V_{\text{отн}}^a$	$K_d^c \pm \text{SD}$ (нМ)	Коэффициент Хилла (n)
VI	CG/GM	$2,2 \pm 0,2$	1	59 ± 19	1,9
VII	$\text{C}^3\text{G}/\text{GM}$	$1,2 \pm 0,1$	0,5	77 ± 14	1,5
VIII	$\text{CG}/^3\text{GM}$	$3,0 \pm 0,4$	1,4	80 ± 12	1,8
IX	$^3\text{GCCG}/\text{GM}$	$2,8 \pm 0,3$	1,3	75 ± 3	1,8
X	CG-CG/GM-GM	6 ± 2	1	40 ± 20	1,7
XI	CG- $\text{C}^3\text{G}/\text{GM}$ -GM	1.9 ± 0.3	0,3	67 ± 19	1,6
XII	$\text{C}^3\text{G}-\text{C}^3\text{G}/\text{GM}$ -GM	2.5 ± 0.3	0,4	106 ± 30	1,5

^b Абсолютные начальные скорости приведены с указанием стандартных отклонений минимум 3 независимых повторов. ^a Относительные скорости метилирования $V_{\text{отн}}$ получены делением V_0 каждого ^3G -содержащего дуплекса на V_0 соответствующего базового дуплекса. ^c Константы диссоциации комплексов Dnmt3a-CD с FAM-меченными ^3G -ДНК в присутствии AdoHcy. Значения констант приведены с указанием стандартных отклонений 3-5 независимых повторов.

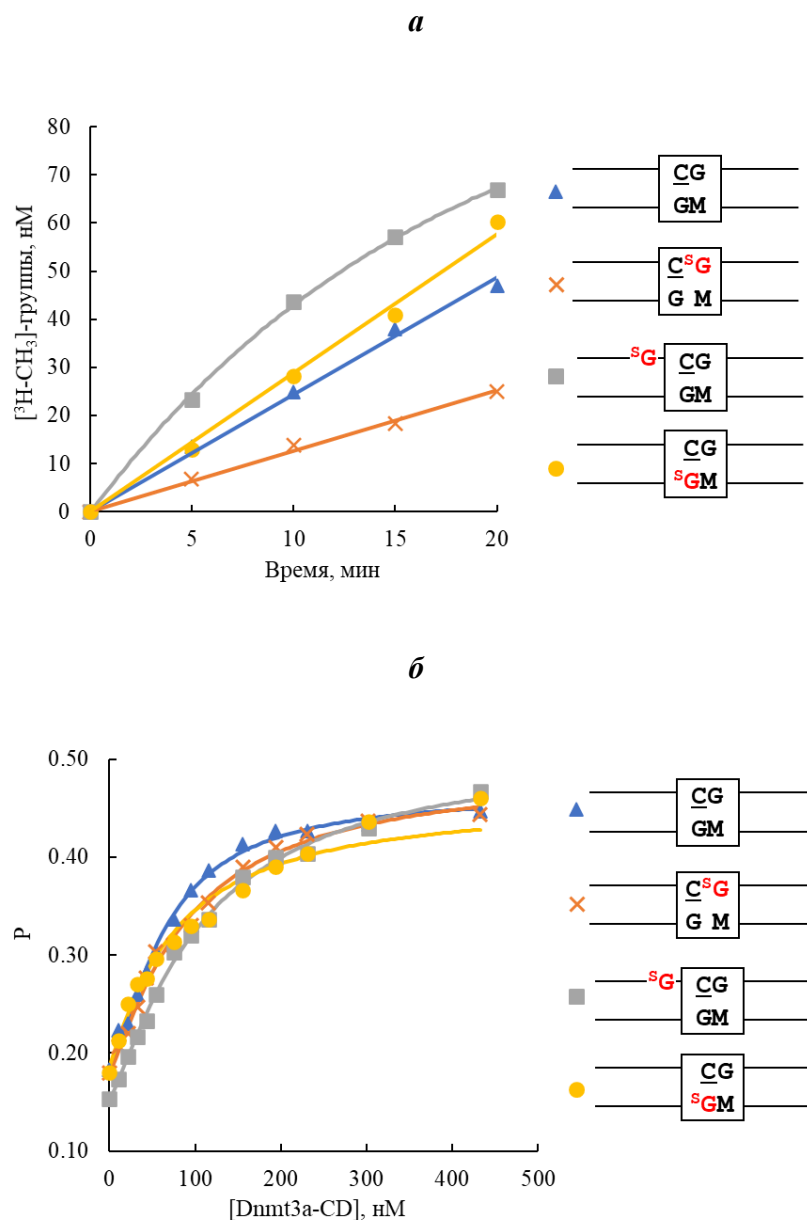


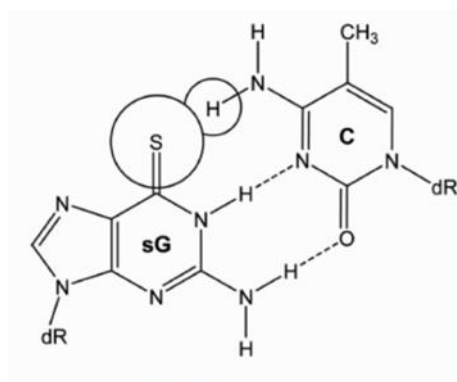
Рис. 22. Свойства односайтовых ^5G -ДНК как субстратов Dnmt3a-CD. (а) Пример кинетики метилирования CG/GM и ^5G -ДНК МТазой Dnmt3a-CD. Реакционные смеси содержали 1,5 мкМ ДНК, 3,3 мкМ Dnmt3a-CD и 2 μM [^3H - CH_3]AdoMet, буфер А. (б) Комплексообразование ^5G -ДНК с Dnmt3a-CD. Кривые связывания получены методом поляризации флуоресценции при титровании 10 нМ FAM-меченных ДНК дуплексов и ^5G -ДНК (табл. 1, **VI**f-**IX**f) МТазой Dnmt3a-CD. Смеси содержали 0-450 нМ Dnmt3a-CD, 0,1 мМ AdoHcy, буфер А. Р – поляризация флуоресценции.

Мы предположили, что изменения в метилировании ^5G -ДНК по сравнению с немодифицированными дуплексами могут объясняться затруднением связывания Dnmt3a-CD с поврежденными ДНК-субстратами. Для проверки этой гипотезы мы провели измерения комплексообразования Dnmt3a-CD с FAM-мечеными ^5G -ДНК (табл. 1, **VI**f-**IX**f) методом поляризации флуоресценции. Комплексообразование изучали в присутствии

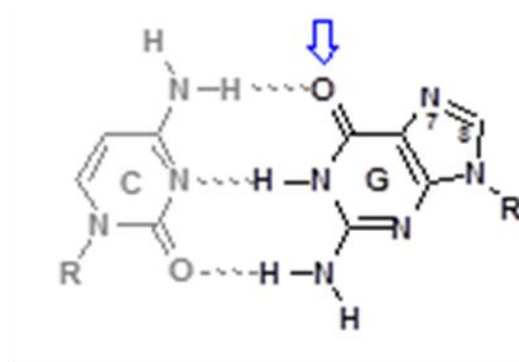
аналога кофактора - S-аденозил-L-гомоцистеина (AdoHcy) – аналога AdoMet, не содержащего метильной группы [115]. Вид кривых связывания ^SG -ДНК с Dnmt3a-CD указывает на существование слабой положительной кооперативности (рис. 226). Коэффициенты Хилла составляли 1,5–1,9 (табл. 4). Значения констант диссоциации (K_d), определенные путем аппроксимации экспериментальных данных уравнением Хилла, находились в диапазоне 60–80 нМ для CG/GMf и ^SG -ДНК ($\text{C}^S\text{G}/\text{GMf}$, $\text{fCG}/^S\text{GM}$ и $^S\text{GCG}/\text{GMf}$); (табл. 4). Следовательно, включение ^SG не влияло на прочность комплексов Dnmt3a-CD с 30-звенными субстратами.

Замена гуанина, расположенного напротив цитозина-мишени в CG/ ^SGM или с 5'-стороны с сайтом CpG ($^S\text{GCG}/\text{GM}$), увеличивала степень метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD. Скорее всего, это связано с дестабилизацией пары $\text{C}\cdot^S\text{G}$ по сравнению с парой $\text{C}\cdot\text{G}$. Это согласуется с данными о структуре 11-13-мерной ^SG -ДНК, из которых следует, что влияние модификации на структуру ДНК будет локализованным на модифицированной паре оснований [36,39]. В частности, ^SG образовывал ослабленные Уотсон-Криковские пары с цитозином и вызывал умеренное раскрытие модифицированной пары оснований в направлении большой бороздки. Дестабилизация пары $\text{C}\cdot^S\text{G}$ может способствовать выпетливанию цитозина-мишени из двойной спирали ДНК. Механизм выпетливания оснований в процессе метилирования был изначально показан для прокариотической C5-МТазы M.NhaI [116]. Высокая степень гомологии между последовательностями C5-МТаз предполагает, что этот механизм является общим для всех ферментов этого класса, включая Dnmt3a-CD [117]. При расположении напротив цитозина-мишени остатки 8-охоG [113], ОбмеG [114] и 2-аминопурина [107] также немного ускоряли метилирование. Наличие поврежденной пары $\text{C}\cdot^S\text{G}$ не нарушало ДНК-белковых контактов, поскольку значительного изменения прочности комплекса ^SG -ДНК с Dnmt3a-CD не наблюдалось (табл. 4).

Таким образом, влияние ^SG на значения $V_{\text{отн}}$, зависело от положения поврежденного остатка гуанина относительно сайта CpG и цитозина-мишени. Наличие остатка ^SG в CpG-сайте с 3'-стороны от цитозина-мишени в $\text{C}^S\text{G}/\text{GM}$ привело к двукратному уменьшению скорости метилирования ДНК относительно базового субстрата CG/GM. Это может объясняться тем, что замена кислорода в 6 положении гуанина на серу препятствует образованию водородной связи аргинина R836 Dnmt3a-CD с гуанином, важной для образования каталитически компетентного комплекса Dnmt3a-CD/ДНК (схема 2, [103]).



^sG-C-пара



G-C-пара

Схема 2. Замена кислорода в 6 положении на серу может нарушить контакт Dnmt3a-CD с 6-оксогруппой гуанина, важной для образования каталитически активного комплекса Dnmt3a-CD с ДНК.

Сера является плохим акцептором протонов по сравнению с кислородом [118]. Важно отметить, что введение ^sG не приводило к изменению прочности комплексов Dnmt3a-CD с ^sG-ДНК (табл. 4). Поскольку известно, что комплексы МТаз с ДНК стабилизируются многочисленными прямыми и непрямыми контактами [103], разрушение только одного такого контакта в результате включения ^sG не должно существенно повлиять на стабильность фермент-субстратного комплекса, что и было нами продемонстрировано.

Учитывая возможность встраивания ^sG в различные положения вблизи CpG-сайта, мы сконструировали ряд односайтовых ДНК-дуплексов, содержащих ^sG 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 (рис.23). Ухудшение метилирования таких дуплексов может быть вызвано дестабилизацией ДНК-дуплекса и нарушением важных ДНК-белковых взаимодействий, необходимых для образования активного комплекса ^sG-ДНК с тетрамером Dnmt3a, а также высокой чувствительностью Dnmt3a к нуклеотидным последовательностям, примыкающим к CpG-сайту [111].

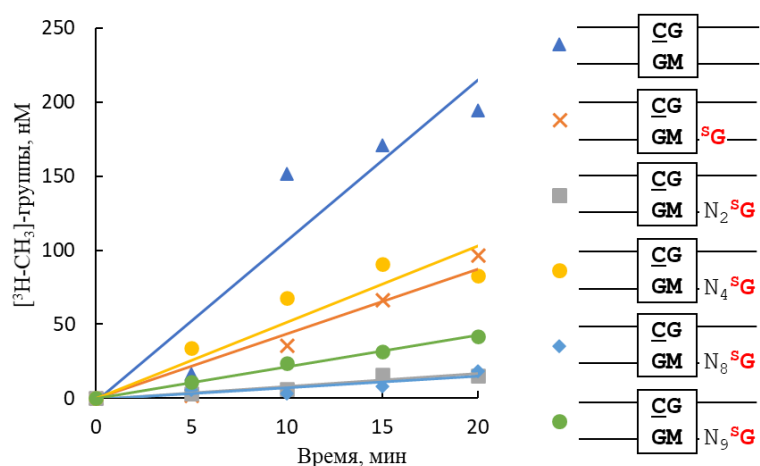


Рис. 23. Пример кинетики метилирования дуплексов (CG/GM) и ⁵G-ДНК, содержащих ⁵G во фланкирующей последовательности (табл. 1, XIII-XVII) МТазой Dnmt3a-CD. Реакционные смеси содержали 1,5 мкМ ДНК, 3,3 мкМ Dnmt3a-CD и 2 μМ [³H-CH₃]AdoMet, буфер А.

Ухудшение метилирования таких дуплексов может быть вызвано дестабилизацией ДНК-дуплекса и нарушением важных ДНК-белковых взаимодействий, необходимых для образования активного комплекса ⁵G-ДНК с ферментом.

⁵G-ДНК с двумя CpG-сайтами.

Учитывая наличие двух активных центров в тетрамере Dnmt3a-CD и возможность метилирования одним тетрамером двух CpG-сайтов, разделенных 8-14 п.н. [[104], глава 2], был поставлен вопрос, как встраивание ⁵G в соседние CpG-сайты, разделенные 9 п.н., влияет на метилирование этих сайтов МТазой Dnmt3a.

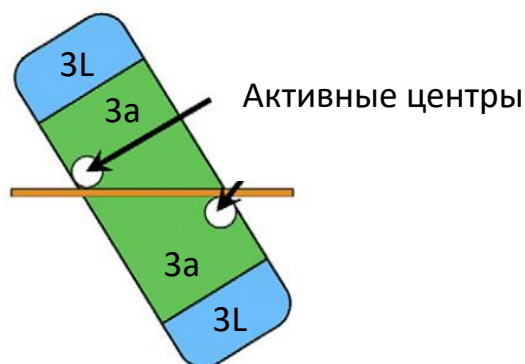
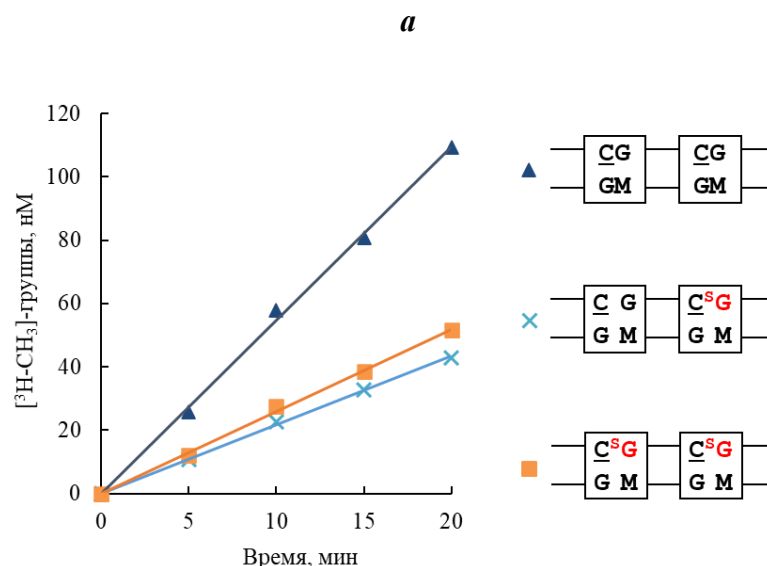


Схема 3. Расположение активных центров тетрамера Dnmt3a/Dnmt3L на ДНК [99].

Остаток ⁵G включили в верхнюю цепь двухсайтового ДНК-дуплекса CG-CG/GM-GM в один (CG-C⁵G/GM-GM) или оба (C⁵G-C⁵G/GM-GM) CpG-сайта с 3'-стороны от цитозина-

мишени (табл. 1, X-XII). Замена этого конкретного остатка G на S G была критической в случае односайтовых субстратов. Кинетические кривые метилирования этих субстратов приведены на рис. 24. Введение S G в один (CG- C^S G/GM-GM) или оба (C^S G- C^S G/GM-GM) сайта вызывало 3,2- и 2,4-кратное снижение значений $V_{отн}$, соответственно (табл. 4, CG-GM-GM, CG- C^S G/GM-GM и C^S G- C^S G/GM-GM). Эти эффекты были аналогичны тем, которые наблюдались для односайтового субстрата 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. 24 и табл. 4). Следовательно, как и в случае односайтовых S G-ДНК, включение 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 Об.



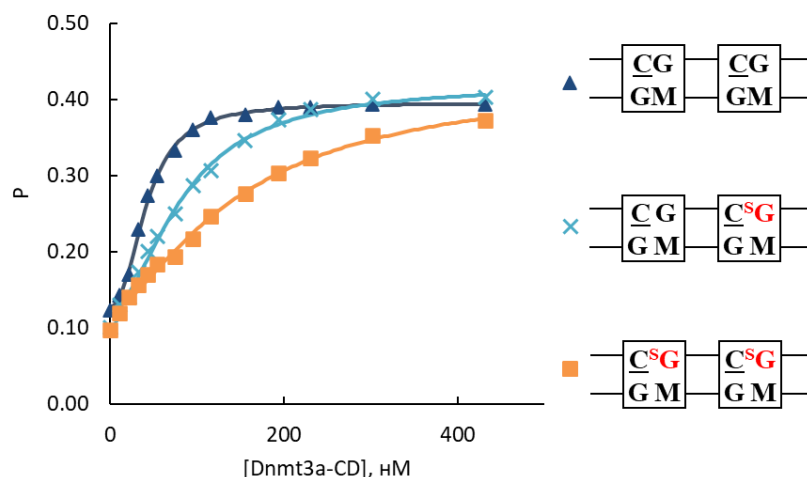


Рис. 24. Свойства двухсайтовых ^5G -ДНК как субстратов Dnmt3a-CD. (а) Пример кинетики метилирования CG-CG/GM-GM и ^5G -ДНК (табл. 1, **X-XII**) МТазой Dnmt3a-CD. Реакционные смеси содержали 1,5 мкМ ДНК, 3,3 мкМ Dnmt3a-CD и 2 μM [$^3\text{H-CH}_3$]AdoMet, буфер А. (б) Комплексообразование ^5G -ДНК с Dnmt3a-CD. Кривые связывания получены методом поляризации флуоресценции при титровании 10 нМ FAM-меченных ДНК-дуплексов и ^5G -ДНК (табл. 1, **Xf-XIff**) МТазой Dnmt3a-CD. Смеси содержали 0-450 нМ Dnmt3a-CD, 0,1 мМ AdoHcy, буфер А. Р – поляризация флуоресценции.

Примечательно, что в нашей модельной системе увеличение количества ^5G в ДНК-дуплексах (один остаток в CG-C ^5G /GM-GM и два в C ^5G -C ^5G /GM-GM) не привело к дальнейшему ухудшению эффективности метилирования. Таким образом, впервые показано, что нарушение включения гуанина в один из двух соседних сайтов CpG влияет на метилирование ДНК, катализируемое Dnmt3a-CD.

Изучение конформационных переходов в комплексах МТаз с ^5G -ДНК методом кругового дихроизма

Из полученных данных по метилированию ^5G -ДНК МТазой Dnmt3a-CD очевидно, что остатки 6-тиогуанина, встроенные в ДНК, влияют на реакцию метилирования. Помимо связывания ДНК МТазой, одной из ключевых стадий каталитической реакции являются конформационные изменения в ДНК-субстрате, а именно выведение цитозина-мишени из состава двойной спирали (рис. 13). Поэтому следующей задачей стало исследование возможности влияния остатка ^5G на конформационные изменения в комплексах ^5G -ДНК с Dnmt3a-CD. В то время как при исследованиях ДНК методом КД в области 200-300 нм спектры отражают совокупный эффект от всех оснований в ДНК, наличие поглощения в более длинноволновой области позволяет детектировать локальные конформационные переходы вблизи гетероциклических оснований-меток, в области, где остальные основания и белки оптически прозрачны. Как указывалось в гл.1, остаток ^5G обладает максимумом

поглощения при 340 нм. Это создаёт потенциальную возможность использования ^SG в качестве метки для изучения локальных конформационных переходов в комплексах ДНК с Dnmt3a-CD методом КД.

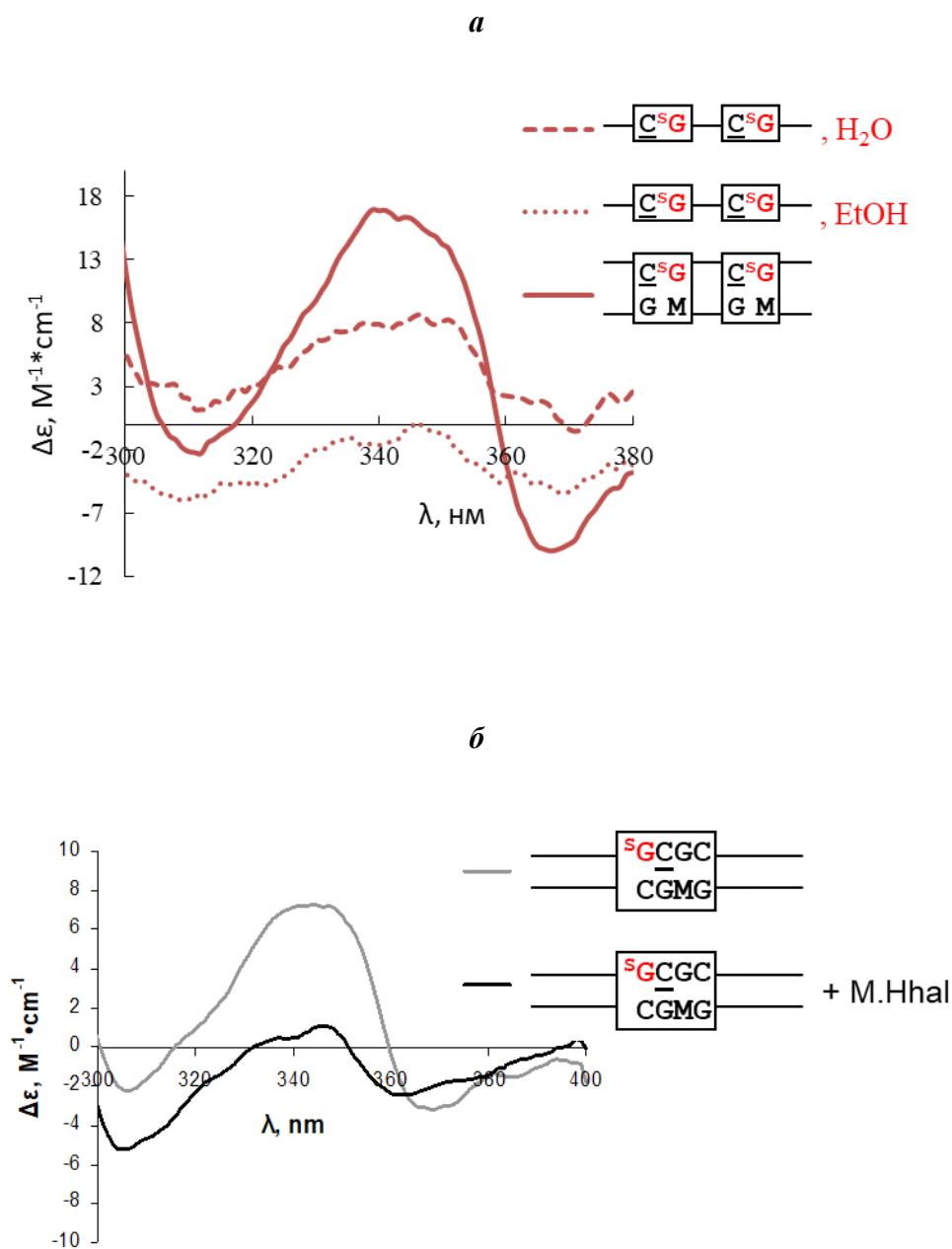


Рис. 25. Спектры КД ^SG -ДНК в различных условиях. (а) Спектры КД 30-звенного двухсайтового ДНК-дуплекса и олигонуклеотида с ^SG , расположенным в обоих участках CpG. Сплошной линией показан спектр ^SG -ДНК-дуплекса $\text{C}^S\text{G}-\text{C}^S\text{G}/\text{GM}-\text{GM}$ в воде, штрихом – спектр олигонуклеотида $\text{C}^S\text{G}-\text{C}^S\text{G}$ в воде, пунктиром – спектр олигонуклеотида $\text{C}^S\text{G}-\text{C}^S\text{G}$ в спирте. (б) Спектр КД $^S\text{GCGC}/\text{GM}$. Серой линией показан спектр ^SG -ДНК-дуплекса, черной – спектр комплекса ^SG -ДНК с M.HhaI. Концентрации фермента и ^SG -ДНК составили 10 мкМ. Буфер Б.

Первым этапом работы стала разработка условий исследования комплексов МТаз с ^SG -ДНК. Спектр КД для ^SG -содержащего ДНК-дуплекса $\text{C}^S\text{G}-\text{C}^S\text{G}/\text{GM}-\text{GM}$ имел положительный максимум в области 340 нм и отрицательный – около 370 нм (рис. 25 сплошная кривая). Такой вид спектра является характерным для ^SG -содержащих ДНК (рис. 26) [119]. В случае одноцепочечного ^SG -олигонуклеотида $\text{C}^S\text{G}-\text{C}^S\text{G}$ в спирте наблюдалось отсутствие пика при 340 нм, что свидетельствует о разрушении межплоскостных взаимодействий гетероциклических оснований (рис. 25а). Этот же олигонуклеотид в воде давал гораздо менее выраженный максимум КД при 340 нм по сравнению с дуплексом $\text{C}^S\text{G}-\text{C}^S\text{G}/\text{GM}-\text{GM}$ в тех же условиях.

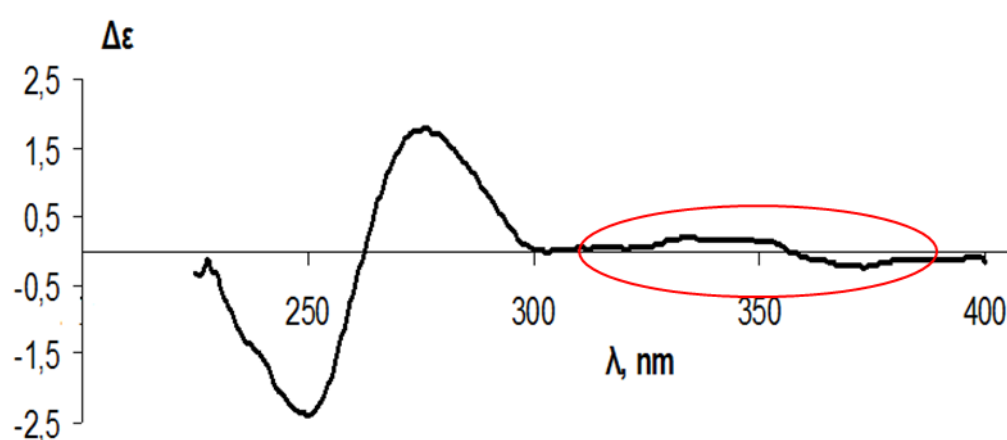


Рис 26. Спектр КД ^SG -ДНК. Отмечена область спектра, где поглощает остаток ^SG . По данным [119].

Уменьшение КД при 340 нм наблюдалась и для комплекса $^S\text{GCG}/\text{GM}$ с прокариотической МТазой *M.NhaI*, (рис. 25б), для которой доказано выпетливание цитозина–мишени при метилировании [116]. При введении ^SG с 5'-стороны от цитозина-мишени предполагаемое выведение цитозина-мишени из двойной спирали ДНК сопровождается нарушением локальной структуры ДНК рядом с остатком ^SG и приводит к уменьшению пика при 340 нм. Таким образом, на примере 30-звенных CpG -содержащего ^SG -ДНК мы показали, что при изменениях локальной структуры ДНК вблизи остатка ^SG , таких как разрушение стекинг-взаимодействий, образование одноцепочечных участков и выведение оснований из двойной спирали ДНК, можно ожидать изменения спектра КД в области 300-400 нм.

Для опытов по КД комплексов ^SG -ДНК с Dnmt3a-CD использовались двухсайтовые ДНК-дуплексы, которые содержали остатки ^SG с 3'- или 5'- стороны от цитозина-мишени, а также напротив него (табл. 1, XIX-XXI). В случае комплекса Dnmt3a-CD с $\text{C}^S\text{G}-\text{CG}/\text{GM}-$

GM изменения спектра КД исходного дуплекса при добавлении фермента практически не наблюдалось (рис. 27). Мы ожидали увидеть уменьшение пика при 340 нм на спектрах КД при добавлении фермента, так как должны нарушаться стекинг-взаимодействия остатка ^SG при ожидаемом выведении метилируемого цитозина из двойной спирали ДНК в ходе реакции (схема 4). Однако существенных изменений вида спектра в области 300-400 нм не наблюдалось. Предположительно, отсутствие эффекта связано с ухудшением выпетливания цитозина-мишени при наличии остатка ^SG в участке CpG, что косвенно подтверждается результатами по ухудшению метилирования этой ^SG -ДНК по сравнению с немодифицированным субстратом.

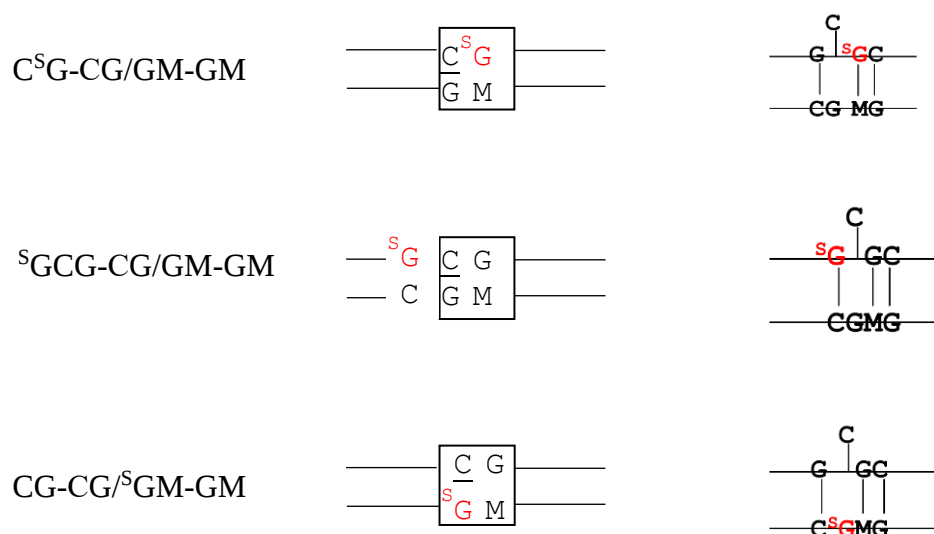


Схема 4. Выведение цитозина-мишени из двойной спирали в комплексах ^SG -ДНК с Dnmt3a-CD.

Уменьшение амплитуды пика при 340 нм наблюдалось для комплексов $^S\text{GCG-CG/GM-GM}$ и $\text{CG-CG}/^S\text{GM-GM}$ с Dnmt3a-CD (рис. 27, б и в). Введение ^SG в эти позиции может в небольшой степени улучшать эффективность метилирования (разд. “ ^SG -ДНК с одним CpG-сайтом”). Уменьшение пика свидетельствует о частичном нарушении стекинг-взаимодействий остатка ^SG с соседними основаниями при выведении цитозина-мишени из двойной спирали МТазой Dnmt3a-CD.

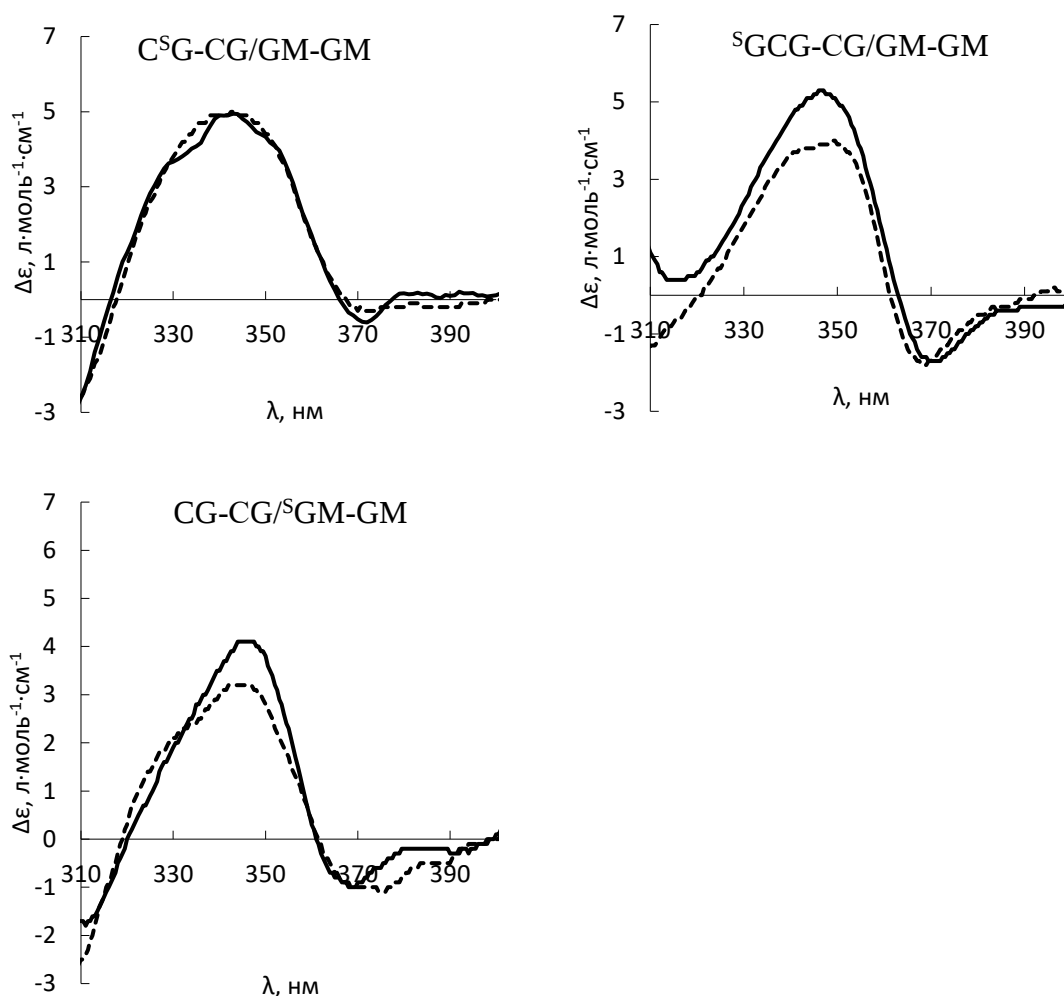


Рис. 27. Спектры КД 30-звенных ДНК-дуплексов и их комплексов с Dnmt3a-CD (дуплексы C^5G -CG/GM-GM, 5GCG -CG/GM-GM и CG-CG/ 5GM -GM). Сплошной линией показан спектр 5G -ДНК-дуплекса, пунктиром – спектр комплекса 5G -ДНК-Dnmt3a-CD. Концентрации фермента и субстрата составили 10 мкМ. Измерения проводились в буфере А.

Результаты по КД коррелируют с эффективностью метилирования этих субстратов: лучше всего метилируется субстрат CG/ 5GM , и в то же время для его двухсайтового аналога CG-CG/ 5GM -GM показан самый большой эффект на спектре КД. Дуплекс C^5G /GM метилируется хуже, поэтому и конформационные изменения в фермент-субстратных комплексах с таким расположением 5G должны происходить менее выражено. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что механизм влияния 5G , встроившегося вблизи CpG-сайта, на реакцию метилирования 5G -ДНК связан с изменением способности МТазы выводить цитозин-мишень из двойной спирали 5G -ДНК, наряду с обсужденным выше нарушением ДНК-белковых контактов. В зависимости от расположения 5G относительно CpG-сайта, процесс выведения цитозина-мишени может

как усложняться, так и упрощаться. Соответственно, и метилирование таких 5G -ДНК будет изменяться подобным образом.

* * *

Полученные данные указывают на возможность влияния 5G , встроившегося 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 5G в нуклеотидную последовательность, примыкающую к CpG-сайту, приводило исключительно к уменьшению эффективности метилирования в той или иной степени [разд. “ 5G -ДНК с одним CpG-сайтом”], а также (2) значительное число возможностей такого расположения 5G относительно CpG-сайтов в ДНК, можно сделать вывод о том, что в среднем, при случайном встраивании в ДНК, 5G должен ухудшать эффективность метилирования. Этот вывод хорошо согласуется с данными о снижении уровня метилирования в клетках, обработанных 5G [32].

Препараты, связывающиеся с ДНК

Как следует из гл. 1, ряд эффективных противоопухолевых препаратов способен 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 оливамид

Как отмечалось в гл. 1, цитотоксическое действие антибиотиков группы ауреоловой кислоты (АК) основано прежде всего на их способности связываться с малой бороздкой ДНК и ингибировать Sp1-зависимую транскрипцию [67]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что малобороздочные лиганды способны нарушать работу МТазы Dnmt3a [1,107]. В связи с этим, следующими объектами данного исследования стали противоопухолевые антибиотики группы ауреоловой кислоты (АК) оливомицин А и его полусинтетический аналог оливамид. 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 (гл.1 и [59]), а сайт CpG может метилироваться МТазой Dnmt3a-CD.

Влияние оливомицина А и оливамида на метилирование ДНК.

Для изучения комплексообразования Dnmt3a-CD с ДНК в присутствии оливомицина А и оливамида было необходимо подобрать оптимальные условия для связывания исследуемых антибиотиков с ДНК-дуплексами. Поскольку для связывания оливомицина А с ДНК требуется присутствие ионов Mg^{2+} [54], была определена оптимальная концентрация Mg^{2+} , при которой возможно комплексообразование оливомицина А с ДНК, а Dnmt3a-CD сохраняет активность. Мы использовали тот факт, что интенсивность флуоресценции оливомицина А увеличивается при его связывании с ДНК [53]. Спектры флуоресценции оливомицина А регистрировали в присутствии CG/GC при различных концентрациях Mg^{2+} (рис. 28).

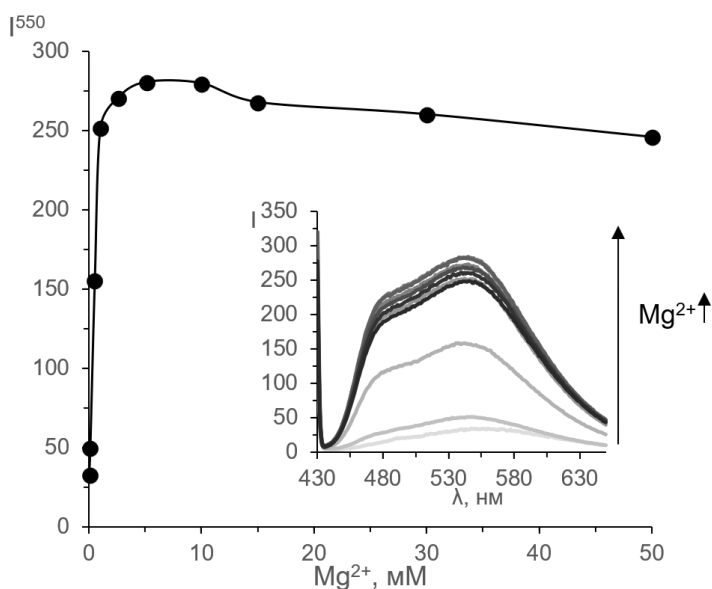


Рис. 28. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса оливомицина А с CG/GC при 550 нм (I^{550}) от концентрации Mg^{2+} . На вставке - спектры флуоресценции комплекса оливомицина А с CG/GC при 0-50 mM Mg^{2+} (300 нМ CG/GC, 5 мкМ оливомицина А, буфер А).

При увеличении концентрации Mg^{2+} от 0 до 5 mM интенсивность флуоресценции оливомицина А при 550 нм увеличивалась и достигала плато при 2,5 mM, что свидетельствует о том, что при этой концентрации Mg^{2+} все участки связывания на ДНК были заняты антибиотиком. Во всех дальнейших экспериментах концентрация Mg^{2+} составляла 3 mM. Недавно было продемонстрировано, что присутствие ионов Mg^{2+} необязательно для связывания оливамида с ДНК, но стабильность комплексов оливамида с

ДНК зависела от ионной силы раствора [63]. В данной работе связывание оливомицина А и оливамида проводили в присутствии ионов Mg^{2+} с целью сохранения одинаковых условий эксперимента для сравнения полученных результатов.

Влияние оливомицина А и оливамида на метилирование ДНК, мы изучили по защите метилированной ДНК от расщепления эндонуклеазами рестрикции. Для формирования комплекса ДНК с оливомицином А или оливамидом FAM-меченный дуплекс fCG/GCf (табл. 1, **If**) инкубировался в течение 1 ч с соответствующим антибиотиком в присутствии 3 мМ Mg^{2+} с последующим проведением метилирования 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. 29а, дорожки 2 и 3). Степень метилирования ДНК снижалась при добавлении оливомицина А в реакционную смесь. Значение IC_{50} , составило 6 ± 1 мкМ (рис. 29а, дорожки 4-13). Метилирование ДНК в присутствии оливамида изучали аналогично (рис. 29б). Оливамид ингибировал метилирование ДНК с IC_{50} $7,1 \pm 0,7$ мкМ.

Добавление оливомицина А к предварительно сформированному комплексу ДНК- (Dnmt3a-CD) также приводило к ингибированию метилирования ДНК (данные не приведены), что указывает на то, что оливомицин А и Dnmt3a-CD не конкурируют за сайты связывания на ДНК.

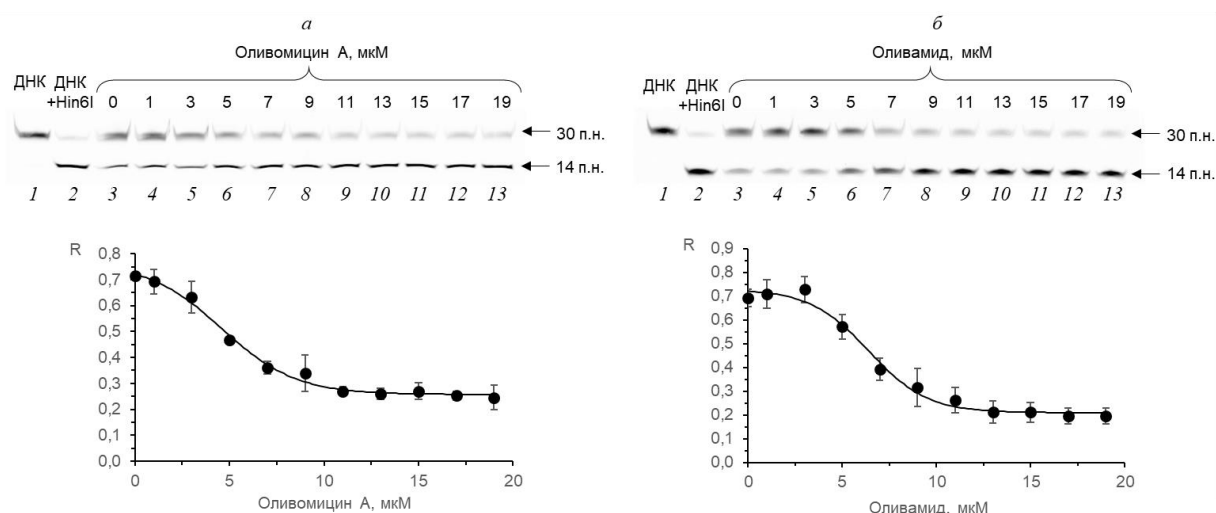


Рис. 29. Влияние оливомицина А (а) и оливамида (б) на метилирование ДНК. Верхняя панель: расщепление fCG/GCf эндонуклеазой Hin6I после метилирования МТазой Dnmt3a-CD в присутствии 0-19 мкМ

оливомицина А или оливамида (дорожки 3-13) в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Дуплекс fCG/GCf (дорожка 1) и продукты его гидролиза HincII (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 мМ AdoMet, буфер А.

Степень метилирования ДНК МТазой Dnmt3a-CD в присутствии высоких концентраций оливомицина А и оливамида составляла ~ 20% от максимально возможной (рис. 29), при этом значения IC₅₀ для этих антибиотиков (6 ± 1 и $7,1 \pm 0,7$ мкМ, соответственно) не показали существенных различий. Это может быть объяснено очень похожими химическими структурами оливомицина А и оливамида (рис. 5 и 6). Кроме того, пространственная структура комплексов обоих антибиотиков с ДНК предполагается сходной со структурой комплекса другого антибиотика группы АК, хромомицина А₃, с ДНК [57].

Сравнивая значения IC₅₀ оливомицина А и оливамида с таковыми для других малобороздочных лигандов, ранее изученных в нашей лаборатории, димерных бисбензимидазолов DB(n), в которых бис-бензимидазольные фрагменты соединены метиленовыми мостиками различной длины (n=3–11), [107], можно заключить, что оливомицин А и оливамид ингибируют Dnmt3a-CD так же эффективно, как DB(11), IC₅₀ которого составляет $5,0 \pm 1,5$ мкМ. 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 (рис 10) влияют исследуемые антибиотики, мы изучили влияние оливомицина А на образование фермент-субстратного комплекса, а также на формирование ковалентного интермедиата ДНК с Dnmt3a-CD. Влияние оливомицина А и оливамида на связывание Dnmt3a-CD с ДНК-субстратом оценивали по поляризации флуоресценции FAM-меченого дуплекса fCG/GCf в присутствии AdoHcy. На рис. 30 показаны типичные кривые связывания в присутствии 0, 5 и 15 мкМ оливомицина А или оливамида. Когда к реакционной смеси, содержащей fCG/GCf и исследуемый антибиотик, добавляли Dnmt3a-CD, поляризация флуоресценции увеличивалась и достигала плато. Полученные кривые связывания аппроксимировали уравнением Хилла и рассчитывали значения K_d и коэффициенты Хилла (n) для комплексов ДНК–(Dnmt3a CD) (табл. 5). Значения K_d существенно не изменились при добавлении 5 и 15 мкМ оливомицина А или оливамида, то есть ни оливомицин А, ни оливамид заметно не

нарушали связывание фермента с ДНК-дуплексом. Полученные коэффициенты Хилла (n) указывали на существование положительной кооперативности связывания, что характерно для комплексов Dnmt3a-CD с ДНК [105,113]

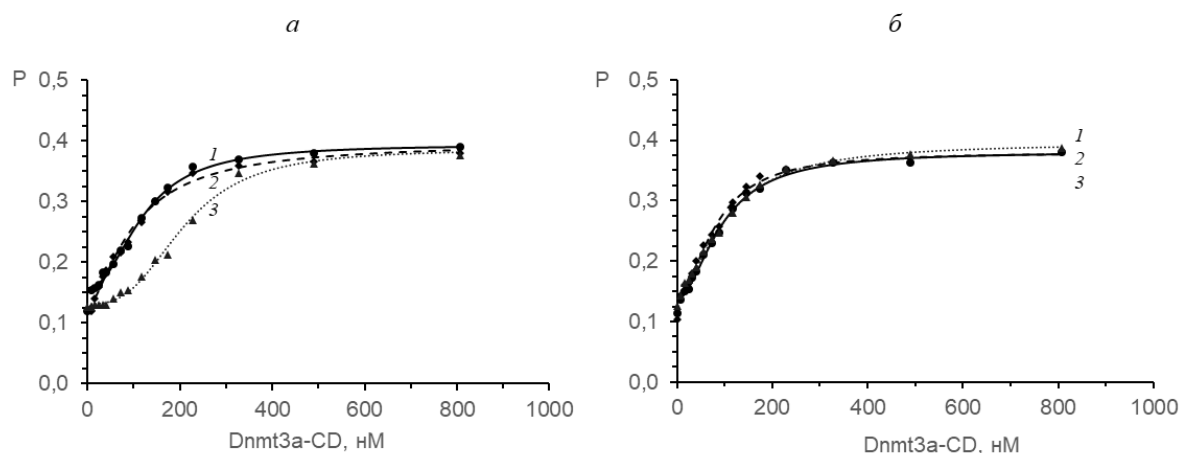


Рис. 30. Кривые связывание FAM-меченных дуплексов fCG/GCf с Dnmt3a-CD в присутствии 0-15 мкМ оливомицина А (а) или оливамида (б), полученные методом поляризации флуоресценции: 1) 0 мкМ; 2) 5 мкМ; 3) 15 мкМ оливомицина А или оливамида. Условия: 10 нМ fCG/GCf, 3 мМ Mg^{2+} , 100 мкМ AdoHcy, буфер А.

Таблица 5. Влияние оливомицина А и оливамида на связывание fCG/GCf с Dnmt3a-CD.

Соединение	K _d , нМ			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 величин стандартных отклонений трех независимых экспериментов.

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 сайта C5-МТазы (рис 10 и [120]). 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, образуют значительно более стабильные ковалентные интермедиаты с МТазы M.SssI и Dnmt3a, которые можно обнаружить по флуоресценции FAM в ПААГ [121]. Недавно с помощью РСА была охарактеризована структура ковалентного интермедиата, образованного 25-звенным ДНК дуплексом, содержащим Z и тетрамером DNMT3A–DNMT3L человека [103]. Мы использовали 18-звенные ДНК-дуплексы (табл.1, **XXIIIf-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. 31).

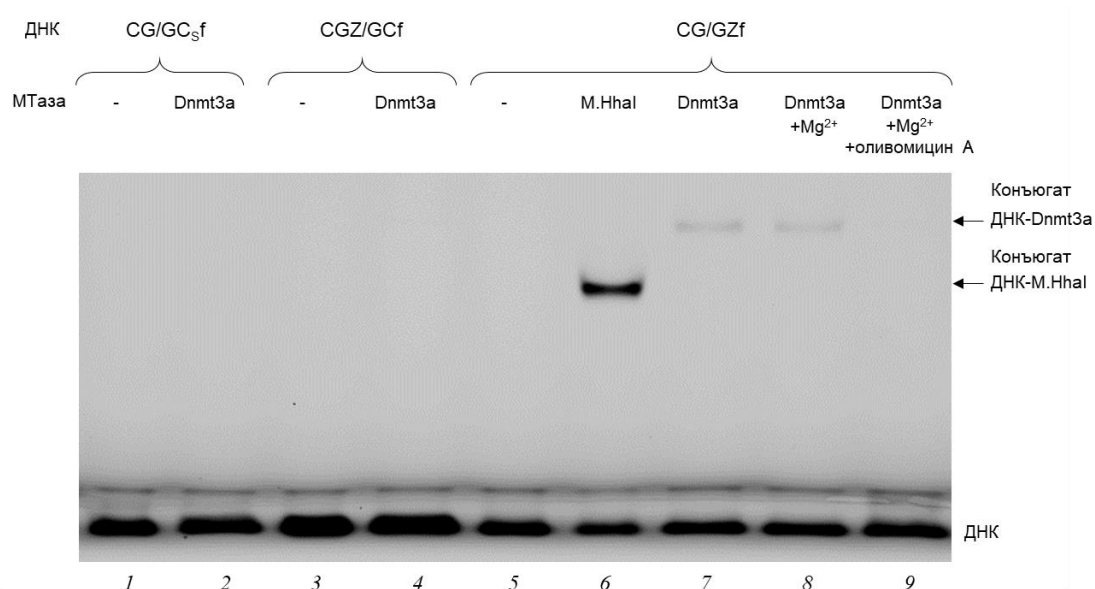


Рис. 31. Влияние оливомицина А на образование ковалентных интермедиатов (конъюгатов) Dnmt3a-CD с ДНК-дуплексами, содержащими или не содержащими остаток Z. Реакционные смеси содержали 300 нМ ДНК-дуплекса fCG/GCsf (дорожки 1, 2), CGZ/GCf (дорожки 3, 4) или fCG/GZ (дорожки 5, 9), 6 мкМ Dnmt3a-CD (дорожки 2, 4, 7), 8, 9 или M.HhaI (дорожка 6), 100 мкМ AdoHcy (дорожки 19), 3 мМ Mg²⁺ (дорожки 8, 9) и 10 мкМ оливомицин А (дорожка 9). Смеси разделяли в 12% ПААГ с 0,1% SDS

Прокариотическую МТазу M.HhaI использовали в качестве положительного контроля для образования ковалентного промежуточного соединения (рис. 31, дорожка 6). Дуплексы, не содержавшие Z (fCG/GCsf) или содержавшие Z вблизи сайта CpG (CGZ/GCf), не образовывали стабильных ковалентных промежуточных соединений (рис. 31, дорожки 2 и

4). fCG/GZ образовывал ковалентное промежуточное соединение с Dnmt3a CD, в том числе в присутствии 3 мМ Mg^{2+} , необходимого для связывания оливомицина А с ДНК (рис. 31, полоса 8). При добавлении оливомицина А в реакционную смесь перед добавлением Dnmt3a-CD, образования интермедиата не наблюдалось (рис. 31, дорожки 7 и 9). Следовательно, оливомицин А предотвращал образование ковалентного интермедиата в реакционной смеси.

О возможности комплексообразования оливомицина А с Dnmt3a-CD.

Можно ли объяснить ингибирование метилирования связыванием антибиотика с Dnmt3a CD, а не с ДНК-дуплексом? Во-первых, как было показано выше, значения K_d в присутствии 0, 5 и 15 мкМ оливомицина А были практически одинаковыми (табл. 5). Если дуплекс ДНК и оливомицин А конкурировали за связывание с активным сайтом фермента, увеличение концентрации антибиотика должно было привести к значительному увеличению значения K_d . Во-вторых, мы изучили эффективность метилирования дуплекса fCG/GCf в присутствии 10 мкМ оливомицина А и 0-5 мМ Mg^{2+} (рис. 32). В отсутствие ионов Mg^{2+} , необходимых для связывания антибиотика с ДНК, ингибирования метилирования ДНК не наблюдалось (рис. 32, дорожка 4), тогда как увеличение концентрации Mg^{2+} в реакционной смеси приводило к резкому снижению эффективности метилирования, которая достигала плато при концентрациях Mg^{2+} более 1 мМ (рис. 32, дорожки 5-11). Поскольку ионы Mg^{2+} необходимы для образования димеров оливомицина А, которые затем могут связываться с GC-парами в ДНК, в отсутствие возможности образования димеров ингибирование метилирования отсутствовало.

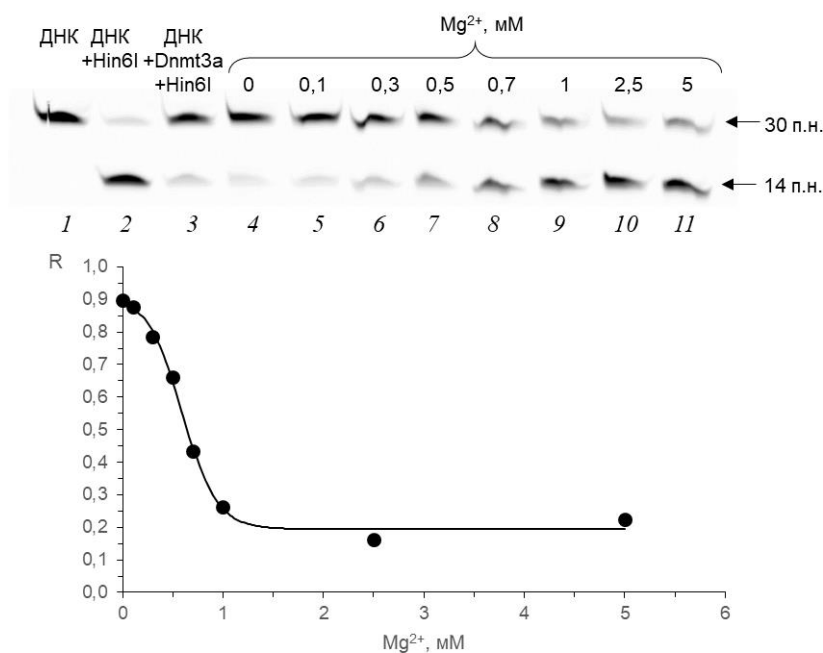


Рис. 32. Влияние Mg^{2+} на функционирование Dnmt3a-CD в присутствии оливомицина А. Расщепление 300 нМ ДНК-дуплекса fCG/GCf эндонуклеазой Hin6I после метилирования ДНК с помощью Dnmt3a-CD в присутствии 10 мкМ оливомицина А, 25 мкМ AdoMet и 0-5 мМ Mg^{2+} , буфер А. Перед расщеплением концентрацию Mg^{2+} доводили до 3 мМ в смесях, содержащих 0-1 мМ Mg^{2+} (дорожки 2-9). Смеси разделяли в 20% ПААГ с 7М мочевиной.

Возможность связывания оливомицина А с Dnmt3a-CD также изучали флуоресцентным титрованием 1 мкМ оливомицина А МТазой Dnmt3a-CD (0-2 мкМ) в присутствии 3 мМ Mg^{2+} в буфере А. В отличие от комплексов оливомицина А с ДНК, мы не наблюдали изменений флуоресценции при 550 нм по сравнению со свободным антибиотиком; интенсивность флуоресценции оливомицина А увеличивалась только при добавлении CG/GC в реакционную смесь (данные не приведены). 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 лишь незначительно влияют на связывание фермента с ДНК. Таким образом, изученные малобороздочные лиганды не препятствуют образованию фермент-субстратного комплекса. Анализ дуплексов с различной локализацией остатков Z показал, что Dnmt3a-CD образует стабильные ковалентные интермедиаты только с ДНК-дуплексом, содержащим остаток Z на месте цитозина-мишени в сайте CpG (fCG/GZ), тогда

как в присутствии оливомицина А образования такого интермедиата не происходило (рис. 31). Учитывая важность контактов Dnmt3a с малой бороздкой ДНК [103] для реакции метилирования, 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, таких как выведение целевого цитозина из двойной спирали ДНК (рис. 13). Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможном эпигенетическом вкладе в механизм противоопухолевого действия антибиотиков группы АК, включающем ингибирование Dnmt3a.

Кураксин CBL0137 и доксорубицин

На основе анализа литературных данных, посвященных интеркалирующим в двойную спираль ДНК препаратам (гл.1), а также ранее полученных в нашей лаборатории данных о влиянии таких соединений на метилирование ДНК [122], нами было выдвинуто предположение о возможном влиянии кураксина CBL0137 на функционирование Dnmt3a-CD. Как отмечено в гл. 1, недавно охарактеризованный CBL0137 является представителем нового класса эффективных противоопухолевых соединений на основе карбазола. 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. Эти факты делают CBL0137 интересным объектом для изучения влияния интеркалирующих соединений на метилирование ДНК МТазой Dnmt3a-CD. Помимо CBL0137, мы также изучили ДНК-интеркалятор доксорубицин - один из наиболее типичных противоопухолевых препаратов, используемых в клинической практике.

Для изучения влияния CBL0137 на функционирование Dnmt3a-CD *in vitro* использовались немодифицированные и FAM-меченные ДНК-дуплексы (табл. 1, **I** и **If**). Согласно данным футпринтинга, CBL0137 связывается преимущественно с АТ-богатыми последовательностями [93]. Поэтому мы сконструировали еще один дуплекс с повышенным содержанием А·Т-пар - fCG/GC_{ATf} (табл. 1, **XXVf**). ДНК-дуплексы fCG/GCf и fCG/GC_{ATf} содержали 17 и 22 А·Т-пары, соответственно.

Чтобы оценить влияние CBL0137 на метилирование ДНК, важно получить больше информации об образовании комплекса CBL0137 с ДНК. Мы изучили этот процесс с помощью метода поляризации флуоресценции (рис. 33). Значение поляризации флуоресценции (P) FAM-меченных дуплексов fCG/GCf и fCG/GC_{AT}f 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_{AT}f, соответственно. Наши результаты указывают на образование несколько более стабильного комплекса CBL0137 с дуплексом fCG/GCf, но разница в значениях K_d не была статистически значимой ($p = 0,07$). Следовательно, CBL0137 имеет низкую специфичность связывания с ДНК.

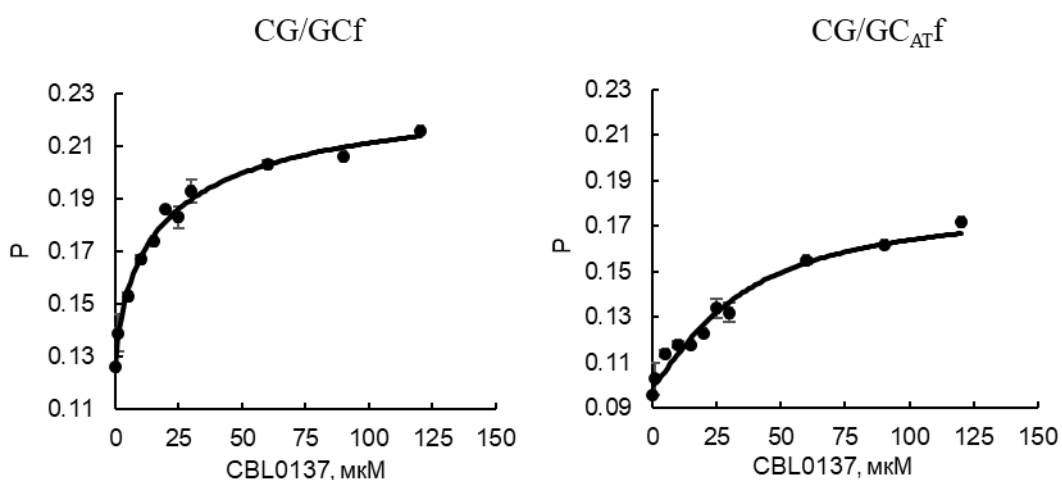


Рис. 33. Связывание CBL0137 с ДНК, исследованное методом поляризации флуоресценции (P). Титрование 10 нМ ДНК-дуплекса fCG/GCf или fCG/GC_{AT}f кураксином CBL0137 0–120 мкМ в буфере А.

Как отмечалось выше, CBL0137 взаимодействует с ДНК путем интеркаляции между парами оснований, что приводит к искажению геометрии двойной спирали, что может повлиять на работу эндонуклеаз рестрикции, таких, как H_{in}6I, используемая нами в методе определения степени метилирования ДНК. Поэтому перед метилированием ДНК-дуплексов в присутствии CBL0137 необходимо было исследовать влияние CBL0137 на расщепление дуплекса fCG/GCf эндонуклеазой H_{in}6I. Кураксин в области концентраций более 40 мкМ ингибировал активность эндонуклеазы H_{in}6I (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 (гл. 3).

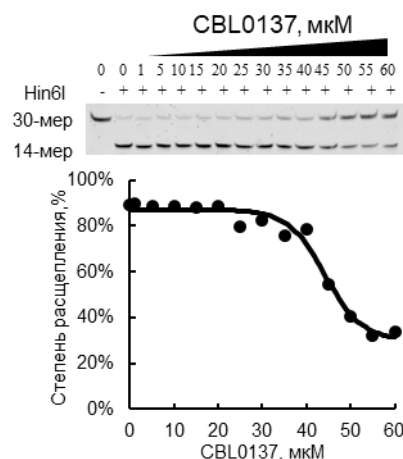


Рис. 34. Расщепление ДНК-дуплекса fCG/GCf эндонуклеазой Hin6I в присутствии CBL0137. Реакционные смеси содержали 0,3 мкМ fCG/GCf, 2 ед. Hin6I, 0-60 мкМ CBL0137 в буфере Б. Смеси разделяли в 20% ПААГ с 7М мочевиной.

Далее было изучено влияние CBL0137 на метилирование ДНК-дуплексов fCG/GCf и fCG/GC_{ATf}. Дуплексы fCG/GCf и fCG/GC_{ATf} инкубировались с 0-60 мкМ CBL0137 при комнатной температуре в течение 30 минут в буфере А и метилировались МТазой Dnmt3a-CD. Чтобы удалить CBL0137 из реакционной смеси, ДНК осаждали с использованием 80% этанола и 67 мМ ацетата натрия. Затем дуплексы ДНК ресуспендировали в буфере Б, расщепляли эндонуклеазой Hin6I и анализировали согласно методу, описанному выше.

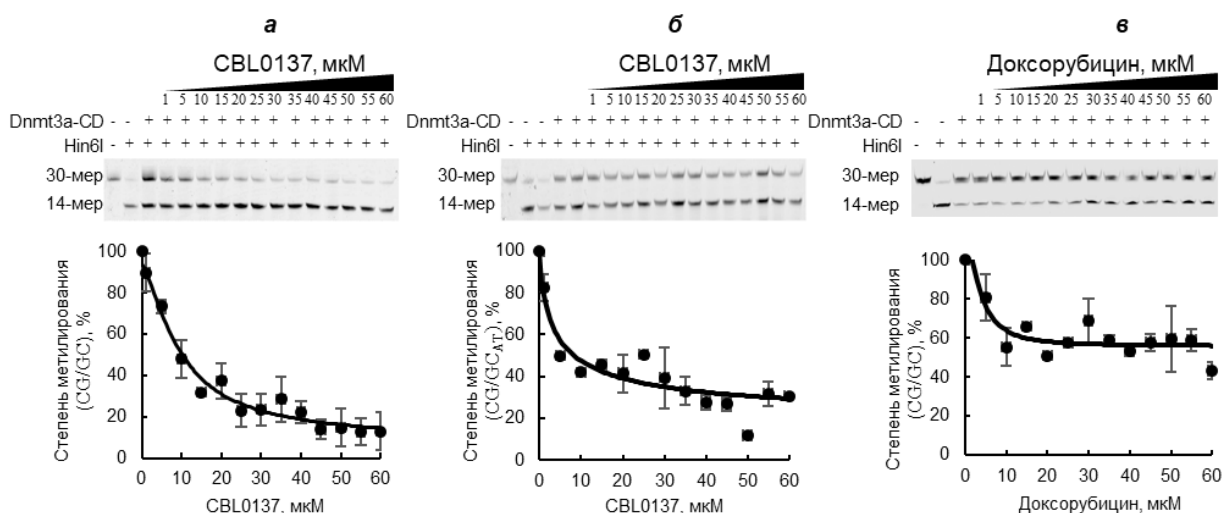


Рис. 35. Влияние CBL0137 и доксорубицина на метилирование ДНК. Верхняя панель: расщепление ДНК-дуплексов (0,3 мкМ) эндонуклеазой Hin6I после их метилирования 2 мкМ Dnmt3a-CD в присутствии 25 мкМ AdoMet и CBL0137 (**а**: дуплекс fCG/GCf; **б**: дуплекс fCG/GC_{ATf}) или доксорубицин (**в**, дуплекс fCG/GCf). Смеси разделяли в 20% ПААГ с 7М мочевиной. Нижняя панель: зависимость эффективности метилирования от концентрации препарата. Планки погрешностей - SEM 2-х экспериментов.

Таблица 6. Ингибирование метилирования ДНК-дуплексов fCG/GCf и fCG/GC_{ATf} МТазой Dnmt3a-CD в присутствии CBL0137 или доксорубина.

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

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

Как можно видеть на рис. 35 и в табл. 6, CBL0137 ингибировал метилирование обоих дуплексов МТазой Dnmt3a-CD в микромолярных концентрациях. 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}. Это согласуется с несколько более низким значением K_d комплекса CBL0137 с fCG/GCf. Доксорубин оказался более слабым ингибитором метилирования ДНК, чем CBL0137 (рис. 35в, табл. 6), о чем свидетельствует более низкое значение ΔR дуплекса fCG/GCf (51%).

Изменения в эффективности метилирования ДНК-дуплексов в присутствии CBL0137 могут быть следствием нарушения комплексообразования ДНК с Dnmt3a-CD. Влияние CBL0137 на связывание Dnmt3a-CD с дуплексами fCG/GCf и fCG/GC_{ATf} оценивали с помощью метода поляризации флуоресценции. FAM-меченные дуплексы fCG/GCf и fCG/GC_{ATf} инкубировали с различными концентрациями CBL0137 (0, 5, 15 или 30 мкМ) при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем титровали МТазой Dnmt3a-CD в присутствии AdoHcy. Значения Р увеличивались с увеличением концентрации Dnmt3a-CD в растворе и выходили на плато (рис. 36).

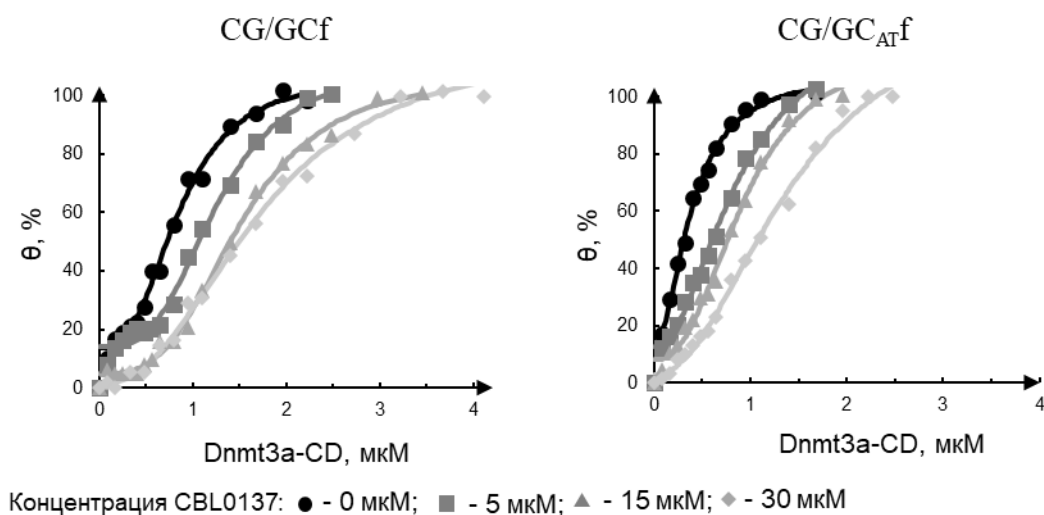


Рис. 36. Связывание FAM-меченных ДНК-дуплексов fCG/GCf и fCG/GC_{ATf} (10 нМ) с возрастающими количествами Dnmt3a-CD в присутствии CBL0137, изученное методом поляризации флуоресценции. θ - доля связанной ДНК, рассчитанная как $(P - P_0) / (P_{\max} - P_0)$, где P_0 и $P_{\max}$ - значения поляризации флуоресценции для свободной и полностью связанной ДНК, соответственно.

Значения K_d и коэффициенты Хилла (n) (табл. 7) были определены путем анализа полученных зависимостей с использованием уравнения Хилла. 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. 36, табл. 7). Все значения n были больше 1, что свидетельствует о положительной кооперативности связывания, характерной для комплексов Dnmt3a с ДНК [113]. В целом, наблюдаемое снижение эффективности метилирования обоих ДНК-дуплексов в присутствии CBL0137, возможно, является результатом дестабилизации ДНК-белковых комплексов.

Таблица 7. Связывание Dnmt3a-CD с ДНК-дуплексами в присутствии CBL0137 (0-30 мкМ).

CBL0137, мкМ	fCG/GCf		fCG/GC _{AT} f	
	K _d , мкМ	n	K _d , мкМ	n
0	0.9 ± 0.1	2.8 ± 0.5	0.4 ± 0.1	2.0 ± 0.5
5	1.3 ± 0.1	3.2 ± 0.6	0.9 ± 0.1	2.1 ± 0.5
15	1.5 ± 0.1	3.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	2.5 ± 0.4
30	1.7 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	2.1 ± 0.2

Возможность связывания CBL0137 с Dnmt3a-CD была исследована с использованием метода диализа (рис. 37). Смесь, содержащую CBL0137 (5 мкМ) и Dnmt3a-CD (5 мкМ), диализовали против буфера А в течение 3 часов. Затем концентрацию CBL0137 внутри диализной кассеты оценивали по флуоресценции кураксина (λ_{EX} 340 нм, λ_{EM} 450 нм). Мы обнаружили, что флуоресценция CBL0137 уменьшилась примерно в 20 раз после диализа, аналогично контрольной смеси без Dnmt3a-CD, что позволяет предположить, что большая часть кураксина высвобождается из диализной кассеты. Следовательно, связывание CBL0137 с Dnmt3a-CD в этом исследовании не наблюдалось. Таким образом, влияние CBL0137 на метилирование ДНК нельзя объяснить связыванием кураксина с Dnmt3a-CD.

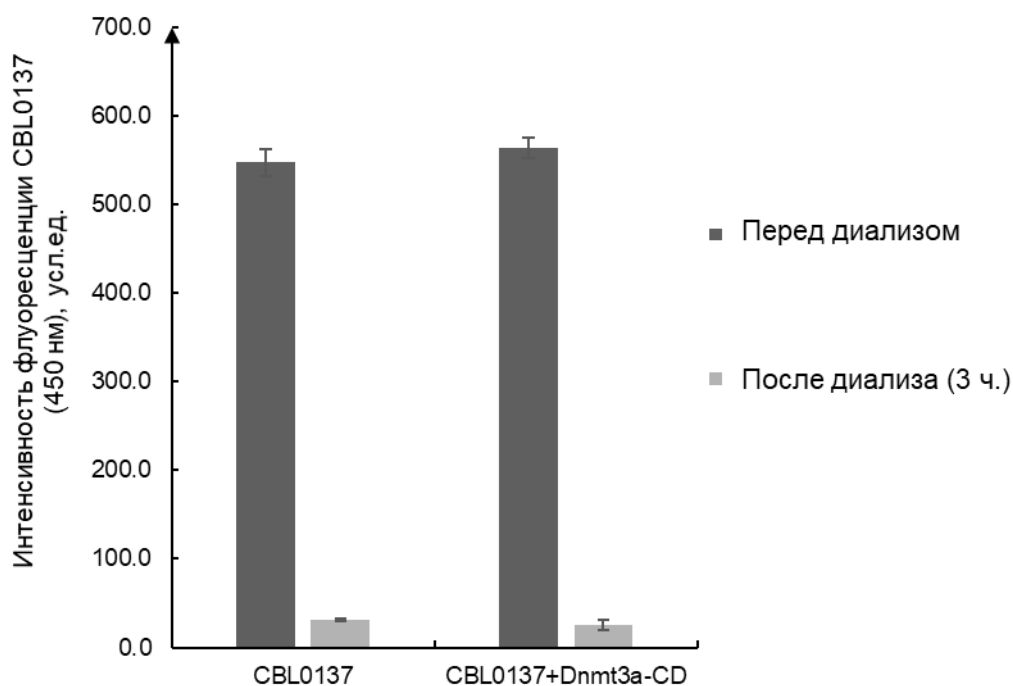


Рис. 37. Изучение связывания CBL0137 с Dnmt3a-CD методом диализа по собственной флуоресценции CBL0137. CBL0137 (5 мкМ, 300 мкл) в буфере А с Dnmt3a-CD (5 мкМ) или в отсутствие фермента

диализовали против 500 мл буфера А в течение 3 ч. Планки погрешностей - SD 2-х повторяющихся экспериментов.

Наши результаты показывают, что ингибирующий эффект CBL0137 вызван его связыванием с ДНК. Наблюдаемое снижение метилирующей активности Dnmt3a-CD можно объяснить способностью кураксина интеркалировать в ДНК [90]. Подобное влияние на метилирование ДНК МТазой Dnmt3a наблюдалось и для интеркалированных цис-бензо[а]пиреновых аддуктов ДНК [1]. Хорошо известно, что интеркаляторы ДНК нарушают структуру и стабильность ДНК, что, в свою очередь, может влиять на работу ДНК-оперирующих белков [123]. Компьютерное моделирование комплекса CBL0137 с ДНК предполагает, что интеркаляция карбазольного фрагмента существенно увеличивает расстояние между парами оснований, что приводит к раскручиванию ДНК [гл.1]. 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. Соединения, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, такие как оливомицин А [гл. 2, оливомицин А] и димерные бис-бензимидазолы [107], обладают сильным ингибирующим эффектом в отношении Dnmt3a. Ингибирующее действие кураксина в случае ДНК-дуплекса fCG/GCf было таким же, как у малобороздочного антибиотика оливомицина А, и выше, чем у ДНК-интеркалятора доксорубицина (табл. 6), что может быть связано с двояким способом связывания CBL0137 с ДНК.

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 [124] и/или экспрессируют мутированные варианты Dnmt3a [125], полученные результаты позволяют рассматривать Dnmt3a как одну из возможных клеточных мишеней для интеркалирующих в ДНК противораковых препаратов. Наши результаты, вместе с недавним исследованием Кантидзе и др. [96], показывающим, что кураксины изменяют пространственную организацию генома и нарушают взаимодействия промоторов с энхансерами, 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 ауреоловой кислоты 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. Как обсуждалось выше, во многих опухолевых клетках наблюдается гиперметилование промоторных участков генов-супрессоров опухолей, приводящее к подавлению их экспрессии. В связи с этим, 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).

Чтобы оценить влияние исследуемых препаратов на экспрессию выбранных генов, клетки MCF-7 инкубировались с CBL0137 (0,1 и 0,5 мкМ) или оливамидом (0,1 и 0,4 мкМ) 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. 38. 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. 8).

Таблица 8. 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

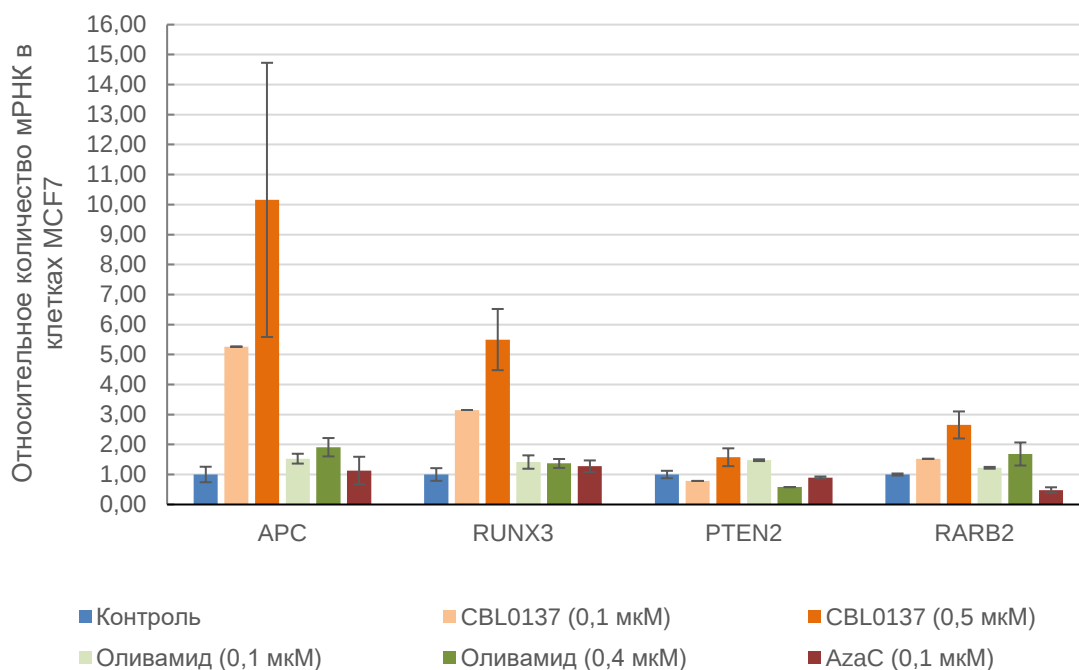


Рис. 38. Изменение уровня мРНК генов-супрессоров опухолей *APC*, *RUNX3*, *PTEN* и *RARB* в клетках MCF7 под действием различных концентраций CBL0137 и оливамида.

Как и в случае ранее изученных малобороздочных ДНК-лигандов DB[n] [126], для всех исследованных генов, за исключением *RUNX3*, экспрессия увеличивалась больше, чем после инкубации клеток с AzaC. CBL0137 реактивировал выбранные гены сильнее, чем оливаמיד, 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 (до 2-х раз). Учитывая эти данные, можно предположить, что CBL0137 и оливаמיד способны реактивировать данные гены-супрессоры опухолей в клетках MCF-7.

Заключение

Таким образом, мы выбрали несколько противоопухолевых препаратов, руководствуясь только информацией об их связывании с ДНК. Наше исследование выявило, что все изученные ненуклеозидные препараты в той или иной мере ингибируют МТазу Dnmt3a-CD с низкими микромолярными значениями IC50 за счет связывания с ДНК-субстратом и не образуют комплексов с МТазой. Кроме того, аналог гуанина ⁵G, как и традиционные нуклеозидные ингибиторы МТаз 5-азацитидин и децитабин, также оказывал влияние на метилирование ДНК, причем эффект зависел от положения остатка ⁵G 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 ^5G в CpG-сайт ведёт к увеличению или уменьшению скорости метилирования ДНК-дуплексов МТазой Dnmt3a-CD, в зависимости от взаимного расположения остатка ^5G 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 ^5G -ДНК-дуплексами не нарушалось.
2. Обнаружено, что наличие ^5G 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 оливаמיד способны ингибировать Dnmt3a со значениями IC_{50} , 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.

Глава 3. Экспериментальная часть.

Реактивы и материалы

Олигодезоксирибонуклеотиды. Олигонуклеотиды, содержащие пиримидин-2-он (Z), были синтезированы С. Н. Михайловым (ИМБ им. В. А. Энгельгардта РАН) (табл. 1). Остальные использованные в работе олигонуклеотиды являются коммерческими препаратами (ЗАО «Евроген», Россия; ООО «Синтол», Россия). Часть олигонуклеотидов содержала флуоресцентный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM,f), ковалентно присоединенный через амиолинкер $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_6-$ к 5'-концевой фосфатной группе (табл. 1, FAM-дууплексы).

Ферменты. Эндонуклеазы *Hin6I*, *KroI* и *PcsI* являются коммерческим препаратом («СибЭнзим», Россия). Препарат *M.HhaI* (200 мкМ) был любезно предоставлен С. Климашаускасом (Вильнюс, Литва). *Dnmt3a-CD* и *M.SssI* выделены в соответствии с методиками, приведенными в разделе «Выделение белковых препаратов». *Dnmt3a-CD* экспрессировали в клетках *E. Coli* BL21 (DE3), («Stratagene», США), несущих плазмиду pET28a с геном, кодирующим *Dnmt3a-CD*, содержащую N-концевой *His*₆-кластер. Для выделения *M.SssI* клетки *E.coli* ER1821 были трансформированы плазмидой pCAL/nH, несущей фрагмент, кодирующий *M.SssI* с кластером *His*₆ на N-конце. Выделение ферментов производили с помощью металл-аффинной хроматографии на Co^{2+} -содержащей смоле Talon® («GE Healthcare», США) по ранее описанной методике [122]. Чистота выделенных белковых препаратов была оценена с помощью электрофореза в 12,5% ПААГ по Леммли [127] и составила >95%. Концентрацию ферментов определяли в расчете на мономер по методу Бредфорда [128]. Белковые препараты хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Реактивы. Бактотриптон, дрожжевой экстракт и бактоагар (Difco, США); растворы 5052 и NPS, глюкоза, Co^{2+} -содержащая смола TALON для металл-аффинной хроматографии (Clontech, США); среда LB (Amresco, США); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Biomed, Польша); трис-(гидроксиметил)-аминометан (Трис), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), 2-меркаптоэтанол, 1,4-дителиотреитол и персульфат аммония (Merck, Германия); глицерин, имидазол, формамид, Triton X-100, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), S-аденозил-L-метионин (Sigma), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Sigma, St. Louis, MO, США); пепстатин А (Serva, Германия); акриламид, N,N'-метилен-бисакриламид, мочеви́на, глицин, додецилсульфат натрия (ДСН), NaCl, KCl, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , (ДиаЭм,

Россия); MgCl_2 (Panreac, Испания) красители — маркеры бромфеноловый синий (BPB) и ксиленцианол (XC) (NEB, Англия); ледяная уксусная кислота (ООО Авогадро); 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислота (HEPES) (Amresco, США), краситель Кумасси G250 (Reactives IBF, France).

Буферные растворы.

- А) 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5), 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 1,4-дителиотреитол, 5% глицерин;
- Б) 10 мМ Трис-HCl (pH 7,9), 50 мМ NaCl, 1 мМ 1,4-дителиотреитол, 0,1% Triton X-100, 5% глицерин;
- В) 33 мМ Трис- CH_3COOH (pH 7.9), 10 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 66 мМ CH_3COOK , 0.1 мг/мл БСА;
- Г) 10 мМ Трис-HCl (pH 7.6), 10 мМ MgCl_2 , 50 мМ NaCl и 1 мМ 1,4-дителиотреитол;
- Д) 10 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 20 мМ NaCl, 3 мМ MgCl_2 и 1 мМ 1,4-дителиотреитол;
- Е) 125 мМ Трис-HCl (pH 6,8);
- Ж) 375 мМ Трис-HCl (pH 8,8);
- З) 62,5 мМ Трис-HCl (pH 6,8), 3% ДСН, 5% 2-меркаптоэтанол, 8 М мочевины, 5% (об/об) глицерин, 0,1% BPB;
- И) 25 мМ Tris- H_3BO_3 , pH 8.3, 0.5 мМ ЭДТА;
- К) 20 мМ KH_2PO_4 -KOH (pH 7,5), 500 мМ NaCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1%-ный Triton X-100;
- Л) 50 мМ NaH_2PO_4 -NaOH (pH 7,8), 300 мМ NaCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1%-ный Triton X-100;
- М) 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ 2-меркаптоэтанол.

Приборы и методы

Оптические измерения водных растворов олигонуклеотидов проводили в кварцевых кюветах (длина опт. пути 1 см) фирмы «Starna Cells» (США) и «Hellma» (Германия). Спектры поглощения в УФ-области записывали на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США) при комнатной температуре. Концентрацию олигонуклеотидов определяли по формуле Бугера-Ламберта-Бера по поглощению при 260 нм. Молярные коэффициенты экстинкции одноцепочечных олигонуклеотидов рассчитывали в программе «OligoAnalyzer Tool» (Integrated DNA Technologies, США).

Измерения поляризации флуоресценции проводили при комнатной температуре на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) при длине волны возбуждающего света 495 нм и испускаемого – 520 нм. Значение поляризации флуоресценции (P) определялось

согласно уравнению: $P = \frac{I_v - GI_h}{I_v + GI_h}$, где I_v и I_h вертикальная и горизонтальная составляющие

испускаемого света соответственно, а G - поправочный коэффициент.

Препаративное микроцентрифугирование проводили на микроцентрифуге «Eppendorf-5414S» (Eppendorf, Германия). Для упаривания микроколичеств водных растворов, а также для удаления следовых количеств этанола и ацетона, использовали прибор «Speed Vac» (США). Микрообъемы растворов дозировали автоматическими дозаторами фирмы Gilson (Франция) и Eppendorf (Германия) с точностью 5%.

pH растворов измеряли на потенциометре UltraBasic фирмы Denver Instrument (США).

Отмывку фильтров DE81 проводили на шейкере «SciEra» при частоте качаний 8.

Электрофорез Dnmt3a-CD и M.SssI проводили в плоском (10x10x0.075 см) ПААГ по Лэммли. Концентрирующий гель: 4% акриламид, 0,104% N,N'-метиленбисакриламид, 0,1% ДСН в буфере Е; разделяющий гель: 12,5% акриламид, 0,33% N,N'-метиленбисакриламид, 0,1% ДСН в буфере Ж. Для полимеризации всех акриламидных гелей к соответствующим растворам добавляли свежеприготовленный 10%-ный раствор персульфата аммония (из расчета 100 мкл на 10 мл ПААГ) и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (из расчета 10 мкл на 10 мл ПААГ). Пробы наносили в 5-10 мкл буфера З. Прокрашивали гель раствором Кумасси G-250 (CH₃COOH:C₂H₅OH:H₂O=1:1:2 и 0,25% Кумасси G-250). Сначала раствор доводили до кипения, затем отмывали гель 10%-ным раствором CH₃COOH до обесцвечивания фона.

Электрофорез синтетических олигонуклеотидов и реакционных смесей после метилирования олигонуклеотидов проводили в 20%-ном ПААГ (20% акриламида, 0.66% N,N'-метиленбисакриламида, 7 М мочевины в буфере И) толщиной 0.75 мм при напряженности поля 50 В/см. Пробы наносили в 10 мкл 80%-ного водного раствора формамида, содержащего 1 М ЭДТА и красители-маркеры ХС (0.1%) и ВРВ (0.1%).

Методики

Выделение белковых препаратов

Выделение Dnmt3a-CD и M.SssI, содержащих шесть аминокислотных остатков гистидина на N-конце проводили с помощью металл-аффинной хроматографии на смоле Co-Talon. Экспрессию Dnmt3a-CD проводили в клетках Rosetta2(DE3) *E. Coli* с использованием плазмид pET28a в присутствии канамицина (75 мкг/мл), а экспрессию M.SssI – в клетках ER1821 с плазмидой pCAL/nH в присутствии ампициллина (0,15 мг/мл). «Ночную культуру» (20 мл) *E. coli* с плазмидой в среде LB с антибиотиком разбавляли в ~50 раз средой LB с тем же антибиотиком. Клеточную культуру выращивали при 37°C с интенсивной аэрацией. Экспрессию белка инициировали добавлением 1 mM раствора ИПТГ при достижении мутности раствора 0,6 OD₆₀₀. Затем клеточную культуру растили в течении 4-х часов при 37°C, после чего клетки осаждали центрифугированием на центрифуге Beckman Coulter J2-21 (США) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора MSE Sonifier (Crawley, Великобритания) в буфере К, содержащем 5 mM и 2,5 mM HCl-имидазол в случае Dnmt3a-CD или в буфере Л, содержащем 2,5 mM HCl-имидазол, в случае M.SssI. Выделение белка проводили в присутствии ингибиторов протеиназ: фенилметансульфонилфторида (17 мкг/мл) и пепстатина (1 мкг/мл). Фрагменты клеток осаждали центрифугированием при 4°C (60 мин, 13700 об/мин) на центрифуге Eppendorf MiniSpin. Чистота конечного препарата белка определялась с помощью гель-электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в присутствии 0.1%-ного ДСН. После выделения и очистки белковые препараты хранились при -60°C.

Dnmt3a-CD. Супернатант пропускали через колонку с 500 мкл Co²⁺-содержащей смолы TALON для аффинной хроматографии (BD Biosciences Clontech), уравновешенную буфером К, содержащим 5 mM имидазол-HCl. Колонку промывали 20 мл буфера К, содержащего 20 mM HCl-имидазол, и 10 мл буфера К, содержащего 40 mM HCl-имидазол. Белок элюировали 1,8 мл буфера К, содержащего 250 mM HCl-имидазол. Элюированный белок диализовали при 4°C в буфере А в течение ночи, а затем в течение 2-х ч. В диализных кассетах Slide-A-Lyzer™ (Life Technologies) объемом 0,5 и 3 мл. Чистота конечного препарата Dnmt3a-CD составляла >90%. Концентрацию Dnmt3a-CD определяли по методу Бредфорд и использовали в качестве концентрации мономерных форм фермента, а также на спектрофотометре NanoDrop™ (Thermo Scientific).

M.SssI. Супернатант пропускали через колонку с 500 мкл Co^{2+} -содержащей смолы TALON для аффинной хроматографии (BD Biosciences Clontech), уравновешенную буфером Л, содержащим 2,5 мМ имидазол- HCl . Колонку промывали последовательно 20 мл буфера Л, содержащего 10 мМ HCl -имидазол, затем 10 мл буфера Л, содержащего 20 мМ HCl -имидазол. Белок элюировали 1,8 мл буфера Л, содержащего 150 мМ HCl -имидазол. Далее проводили диализ против буфера Б при 4°C в течение ночи, а затем в течение 2 ч. Чистота конечного препарата M.SssI составляла $>80\%$. Концентрацию M.SssI определяли по методу Бредфорд, а также на спектрофотометре NanoDropTM (Thermo Scientific).

Формирование ДНК-дуплексов

Смеси олигодезоксирибонуклеотидов в буфере А нагревали до $80\text{--}90^\circ\text{C}$ и охлаждали при комнатной температуре в течение 2-3-х часов.

Определение концентраций активных молекул Dnmt3a-CD с помощью метода поляризации флуоресценции

Концентрация FAM-меченного ДНК-дуплекса CG/CG составляла 100 нМ, что значительно больше ожидаемой величины K_d для комплекса Dnmt3a-AdoHcy-ДНК. В таких условиях каждая молекула фермента, добавленная в реакционную смесь, связывается с ДНК-дуплексом. FAM-меченный ДНК-дуплекс CG/CGf (100 нМ) и AdoHcy (0.1 мМ) инкубировали в 120 мкл буфера А и через ~ 30 с регистрировали поляризацию флуоресценции ДНК-дуплекса в отсутствие фермента (P_0). Затем добавляли к смеси аликвоты Dnmt3a так, чтобы после каждой добавки концентрация фермента в смеси увеличивалась на 100-200 нМ (до конечной концентрации 5 мкМ), каждый раз измеряя значение поляризации флуоресценции (P). Строили график зависимости P от общей концентрации фермента и по характерному излому на полученной зависимости определяли концентрацию активных молекул.

Метилирование ДНК с использованием [^3H - CH_3]AdoMet

ДНК-дуплексы ($C_{\text{ДНК}}$ 1,5 мкМ) инкубировали с Dnmt3a-CD (3,3 мкМ) в буфере А, содержащем [^3H - CH_3]AdoMet (2 мкМ) при температуре 37°C . Объем реакционной смеси составлял 40 мкл. В качестве положительного контроля ДНК-дуплекс CG/GM ($C_{\text{ДНК}}$ 200 нМ) инкубировали с M.NhaI (4,8 мкМ) в буфере М, содержащем [^3H - CH_3]AdoMet (2 мкМ). Реакцию инициировали добавлением раствора фермента, который готовили разбавлением концентрированного препарата фермента непосредственно перед каждой серией реакций.

По мере протекания реакции отбирали аликвоты реакционной смеси (9,7 мкл) по прошествии 5, 10, 15 и 20 мин с начала реакции и 2 ч (в случае M.NhaI) и переносили их на ионообменные фильтры DE81 («Whatman»). После высушивания фильтров их отмывали 50 мМ раствором KH_2PO_4 при комнатной температуре четыре раза по 3 минут и шесть раз по 5 минут. Фильтры высушивали, помещали в 5 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-106 и определяли радиоактивность ^3H -меченных препаратов. Уровень включения метильных групп в ДНК рассчитывали согласно [129]. Далее строили зависимость степени метилирования ДНК от времени, по тангенсу угла наклона которой определяли начальную скорость реакции (V_0).

Метилирование ДНК с использованием эндонуклеаз рестрикции

ФАМ-меченные 30-звенные ДНК-дуплексы (300 нМ) инкубировали с 2 мкМ Dnmt3a-CD в буфере А в присутствии 25 мкМ AdoMet в течение часа при 37°C. Метилирование дуплексов МТазой M.SssI (500 нМ) в буфере Б в тех же условиях. Далее ДНК-дуплексы расщепляли 2 ед. акт. эндонуклеазы Hin6I или 1 ед. акт. эндонуклеаз KroI или PcsI в течение часа при 37°C в 20 мкл буфера А, содержащего 3 мМ MgCl_2 (Hin6I), Б (KroI) или В (PcsI). Реакционные смеси упаривали, ресуспендировали в 10 мкл 80%-ного формамида с красителями и анализировали в 20%-ном денатурирующем ПААГ с 7М мочевиной. Полученные гели сканировали на приборах FUJIFILM FLA-3000 (Japan) или Typhoon FLA 9500 (GE Life Sciences) и определяли интенсивность флуоресценции продукта и исходной ДНК. Степени метилирования ДНК рассчитывали согласно [109] по формуле:

$$R = \frac{w_0 - w_{\text{Dnmt3a}}}{w_0} \times 100\%$$

где R – степень метилирования ДНК, w_{Dnmt3a} - степень расщепления ДНК после обработки МТазой Dnmt3a-CD, а w_0 - степень расщепления ДНК без метилирования.

Определение K_d комплексов Dnmt3a-CD с ДНК в присутствии AdoHcy методом поляризации флуоресценции

Изучение связывания Dnmt3a-CD с ДНК проводили методом поляризации флуоресценции путем прямого титрования ФАМ-меченных олигодезоксирибонуклеотидных дуплексов С5-МТазой Dnmt3a-CD, как описано ранее [129]. Значение поляризации флуоресценции (P) определяли согласно уравнению $P = (I_v - GI_h)/(I_v + I_h)$, где I_v и I_h – вертикальная и горизонтальная составляющие испускаемого света соответственно, G – поправочный

коэффициент. ДНК-дуплекс (10 нМ), содержащий FAM-метку в одной из цепей, инкубировали с 0,1 мМ AdoHcy в буфере А и измеряли значение поляризации флуоресценции ДНК-дуплекса в отсутствие фермента (P_0). Затем к смеси добавляли аликвоты раствора Dnmt3a-CD и через 2 мин после добавления фермента фиксировали значение поляризации флуоресценции. Измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse («Varian»). Полученные данные представляли в виде зависимости $\frac{(P - P_0)}{(P_m - P_0)}$ от концентрации Dnmt3a-CD. Кривые титрования каждого ДНК-дуплекса C5-МТазой анализировали в программе Origin 7.5 (OriginLab Corporation, США) в соответствии уравнением Хилла:

$$\frac{(P - P_0)}{(P_m - P_0)} = \frac{[E]^n}{[E]^n + [K_d]^n}$$

где P_0 и P_m – значения поляризации флуоресценции свободной и полностью связанной FAM-меченной ДНК; $[E]$ – концентрация Dnmt3a-CD; n – коэффициент Хилла.

Регистрация спектров кругового дихроизма

Измерения спектров кругового дихроизма проводили при комнатной температуре на дихрографе ChiroScan (Applied Photophysics, Великобритания) в интервале длин волн 200-450 нм. Использовались кюветы с длиной оптического пути 1 см. В качестве базовой линии были приняты спектры буфера А, содержащие 100 мкМ AdoHcy. Регистрация спектров КД фермент-субстратных комплексов проводилась в присутствии 33 мкМ Dnmt3a-CD (33 мкМ). Концентрация ДНК-дуплексов во всех опытах составила 10 мкМ. Объем пробы для регистрации спектра составлял 500 мкл. Регистрация спектров проводилась в присутствии 100 мкМ AdoHcy в буфере А.

Плавление ДНК-дуплексов.

Плавление ДНК-дуплексов (0,8 о.е./мл) проводили в буфере А. Образец нагревали от 40 до 95° с шагом 0,5 град/мин. Изменение поглощения фиксировали при длине волны 260 нм. Значение $T_{пл}$ определяли по максимуму на дифференциальной кривой плавления.

Связывание оливомицина А с ДНК в присутствии Mg^{2+} .

Комплексообразование оливомицина А с ДНК изучали по возрастанию интенсивности флуоресценции антибиотика при связывании ДНК-субстрата [130]. ДНК-дуплекс CG/GC,

(300 нМ), инкубировали с оливомицином А (5 мкМ) в буфере А в присутствии 0–50 мМ Mg^{2+} в течение 1 ч при 25 °С. Далее регистрировали спектры флуоресценции полученных смесей в интервале 430–650 нм на спектрофлуориметре Cary Eclipse («Varian», США) при $\lambda_{возб}$ 420 нм. Использовали микрокювету объемом 100 мкл и длиной оптического пути 1 см. Концентрацию Mg^{2+} , достаточную для полного связывания ДНК-дуплекса, определяли по зависимости интенсивности флуоресценции оливомицина А при 550 нм от концентрации Mg^{2+} .

Изучение образования ковалентных интермедиатов Dnmt3a с ДНК, содержащими Z. FAM-меченные ДНК-дуплексы (300 мкМ), не содержащие (fCG/GC_{sf}) или содержащие остаток Z (CGZ/GC_f и fCG/GZ), инкубировали с 6 мкМ МТазы Dnmt3a-CD или M.HhaI в буфере А в течение 60 мин. при 4 °С. Реакционные смеси содержали 100 мкМ AdoHcy, 0 или 3 мМ Mg^{2+} , и 0 или 10 мкМ оливомицина А. Далее смеси анализировали с помощью гель-электрофореза в 12%-ном ПААГ с 0,1% SDS. Гели визуализировали на приборе Typhoon FLA 9500.

Реактивация генов-супрессоров опухолей в клетках MCF7

Клетки рака молочной железы MCF-7 были приобретены в ATCC (Манассас, США). Клетки выращивали в среде 199 («ПанЭко», РФ), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, гентамицин 10 мкг/мл, NEPES 20 мкмоль/л («ПанЭко», РФ). Для всех экспериментов клетки высевали в одноразовые пластиковые слайд-флаконы, дорастивали до неплотного монослоя, добавляли CBL0137 или оливаמיד до нужной концентрации и культивировали в течение трех суток в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5% CO₂.

Выделение общей клеточной РНК проводилось с помощью RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) согласно прилагающемуся протоколу. РНК ресуспендировали в воде, содержащей 1% DEPC и хранили при температуре -20°C. Определение концентрации общей клеточной РНК проводили, измеряя флуоресценцию (487-526 нм) после окрашивания RiboGreen (Molecular Probes/Invitrogen, CA, США) (разбавление 1:2000).

Далее проводили процедуру обратной транскрипции с помощью набора для обратной транскрипции (Sileks, Россия). Для синтеза кДНК к 2 мкл общей РНК, выделенной так, как описано выше, добавили 1 мкл случайных гексапраймеров и воды, свободной от РНКаз до

18 мкл. Смесь инкубировали 5 минут при 70°C, после этого перенесли морозильную камеру (-20°C) на 1 мин, после чего добавили 10-кратный – M-MLV-буфер 2,5 мл, 1,5 мМ смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ) 4 мкл и M-MLV обратную транскриптазу 0,5 мкл. Смесь инкубировали в течение 10 минут при 25°C, затем в течение 60 минут при 37°C. Реакцию останавливали прогреванием при 70°C в течение 10 минут.

Для проведения количественного ПЦР-анализа в реальном времени к 1 мкл исследуемых матриц кДНК были добавлены 2,5 мкл дНТФ 2,5 мМ, 6 мкл MgCl₂ 25мМ, 0,2 мкл 5 е.а./мкл Taq-ДНК-полимеразы, а также 2,5 мкл буфера (50 мМ NaH₂PO₄ (pH 7.8), 300 мМ NaCl, 10%-ный (об/об) глицерин, 0.1%-ный тритон X-100, 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 20 мМ имидазол), содержащего краситель SYBR GREEN (все реактивы производства «Синтол», Россия). Кроме того, в реакционную смесь добавили по 1,5 мкл 10 мкМ растворов праймеров на соответствующие гены (табл. 9). Реакцию проводили в объеме 25 мкл. Температура отжига праймеров 58°C. Условия постановки ПЦР: после денатурации (95°C, 5 мин) проводили 45 циклов амплификации в режиме: 95°C – 20 сек, 58°C – 30 сек, 72°C - 30 сек, затем 72°C в течение 5 мин. Чистоту полученных амплифицированных фрагментов определяли по кривым плавления продуктов ПЦР. Проводили ПЦР на приборе StepOnePlus («AppliedBiosystems», США). Для расчета концентраций исходных матриц (C_{матриц}) из полученных по кривым накопления ПЦР-продукта значений C_T была использована калибровка, рассчитанная для данного прибора для высокой эффективности прохождения ПЦР (95%):

$$c = 10^{(-0,279 \cdot C_T + 5,932)} \text{ нг/мкл}$$

Относительный уровень экспрессии считали относительно количества мРНК в клетках, которые не подвергались воздействию противоопухолевых препаратов.

Таблица 9. Праймеры для амплификации при оценке уровня мРНК (Евроген, Россия).

Ген	F-праймер 5'-----→3'	R-праймер 5'-----→3'
<i>RUNX3</i>	AGGCAATGACGAGAACTACTCC	CGAAGGTCGTTGAACCTGG
<i>APC</i>	CCTCATCCAGCTTTTACATGGC	GCCCGAGCCTCTTTACTGC
<i>RARB</i>	CGTGGAGTTTGCTAAACGTCT	TGGTGTCTTGTCTGGGGTAT
<i>PTEN</i>	TTTGAAGACCATAACCCACCAC	ATTACACCAGTTCGTCCCTTTC

Список литературы

1. Minero A.S., Lukashevich O. V., Cherepanova N.A., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Gromova E.S. Probing murine methyltransferase Dnmt3a interactions with benzo[a]pyrene-modified DNA by fluorescence methods // *FEBS J.* 2012. Vol. 279, № 20. P. 3965–3980.
2. Streckowski L., Wilson B. Noncovalent interactions with DNA: An overview // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2007. Vol. 623, № 1–2. P. 3–13.
3. Bartkova J., Hořejší Z., Koed K., Krämer A., Tort F., Zieger K., Guldberg P., Sehested M., Nesland J.M., Lukas C., Orntoft T., Lukas J., Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis // *Nature.* 2005. Vol. 434, № 7035. P. 864–870.
4. Lord C.J., Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy // *Nature.* 2012. Vol. 481, № 7381. P. 287–294.
5. Brunetti L., Gundry M.C., Goodell M.A. DNMT3A in Leukemia // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. Vol. 7, № 2. P. a030320.
6. Issa J.-P.J., Roboz G., Rizzieri D., Jabbour E., Stock W., O'Connell C., Yee K., Tibes R., Griffiths E.A., Walsh K., Daver N., Chung W., Naim S., Taverna P., Oganessian A., Hao Y., Lowder J.N., Azab M., Kantarjian H. Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study // *Lancet Oncol.* 2015. Vol. 16, № 9. P. 1099–1110.
7. Yu J., Xie T., Wang Z., Wang X., Zeng S., Kang Y., Hou T. DNA methyltransferases: emerging targets for the discovery of inhibitors as potent anticancer drugs // *Drug Discov. Today.* 2019. Vol. 24, № 12. P. 2323–2331.
8. Daher-Reyes G.S., Merchan B.M., Yee K.W.L. Guadecitabine (SGI-110): an investigational drug for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2019. Vol. 28, № 10. P. 835–849.
9. Daskalakis M., Nguyen T.T., Nguyen C., Guldberg P., Köhler G., Wijermans P., Jones P.A., Lübbert M. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment // *Blood.* 2002. Vol. 100, № 8. P. 2957–2964.
10. Kim C.H., Marquez V.E., Mao D.T., Haines D.R., McCormack J.J. Synthesis of Pyrimidin-2-one Nucleosides as Acid-Stable Inhibitors of Cytidine Deaminase // *J. Med. Chem.* 1986. Vol. 29, № 8. P. 1374–1380.
11. Cheng J.C., Matsen C.B., Gonzales F.A., Ye W., Greer S., Marquez V.E., Jones P.A., Selker E.U. Inhibition of DNA Methylation and Reactivation of Silenced Genes by Zebularine // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2003. Vol. 95, № 5. P. 399–409.
12. Balch C., Yan P., Craft T., Young S., Skalnik D.G., Huang T.H.M., Nephew K.P. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer // *Mol. Cancer Ther.* 2005. Vol. 4, № 10. P. 1505–1514.
13. Cheng J.C., Yoo C.B., Weisenberger D.J., Chuang J., Wozniak C., Liang G., Marquez V.E., Greer S., Orntoft T.F., Thykjaer T., Jones P.A. Preferential response of cancer cells to zebularine // *Cancer Cell.* 2004. Vol. 6, № 2. P. 151–158.
14. Cheng J.C., Weisenberger D.J., Gonzales F.A., Liang G., Xu G.-L., Hu Y.-G., Marquez V.E., Jones P.A. Continuous Zebularine Treatment Effectively Sustains Demethylation in Human Bladder Cancer Cells // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, № 3. P. 1270–1278.
15. Aranda J., Attana F., Tuñón I. Molecular Mechanism of Inhibition of DNA Methylation by Zebularine // *ACS Catal.* 2017. Vol. 7, № 3. P. 1728–1732.

16. Zhou L., Cheng X., Connolly B.A., Dickman M.J., Hurd P.J., Hornby D.P. Zebularine: A novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 321, № 4. P. 591–599.
17. Champion C., Guianvarc'h D., Sénamaud-Beaufort C., Jurkowska R.Z., Jeltsch A., Ponger L., Arimondo P.B., Guieysse-Peugeot A.-L.L. Mechanistic insights on the inhibition of C5 DNA methyltransferases by zebularine // *PLoS One* / ed. Mayer C. 2010. Vol. 5, № 8. P. e12388.
18. Elion G.B. The purine path to chemotherapy // *Science*. 1989. Vol. 244, № 4900. P. 41–47.
19. Karran P. Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer // *Br. Med. Bull.* 2006. Vol. 79–80, № 1. P. 153–170.
20. Karran P., Attard N. Thiopurines in current medical practice: Molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer // *Nature Reviews Cancer*. 2008. Vol. 8, № 1. P. 24–36.
21. Zaza G., Cheok M., Krynetskaia N., Thorn C., Stocco G., Hebert J.M., McLeod H., Weinshilboum R.M., Relling M. V., Evans W.E., Klein T.E., Altman R.B. Thiopurine pathway // *Pharmacogenetics and Genomics*. 2010. Vol. 20, № 9. P. 573–574.
22. Loo T.L., Nelson J.A. Purine antimetabolites // *Cancer Medicine*. 1982. P. 790–801.
23. Yuan B., Wang Y. Mutagenic and cytotoxic properties of 6-thioguanine, S6-methylthioguanine, and guanine-S6-sulfonic acid // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 35. P. 23665–23670.
24. Ling Y.H., Chan J.Y., Beattie K.L., Nelson J.A. Consequences of 6-thioguanine incorporation into DNA on polymerase, ligase, and endonuclease reactions. // *Mol. Pharmacol.* 1992. Vol. 42, № 5.
25. Krynetskaia N.F., Krynetski E.Y., Evans W.E. Human RNase H-mediated RNA cleavage from DNA-RNA duplexes is inhibited by 6-deoxythioguanosine incorporation into DNA // *Mol. Pharmacol.* 1999. Vol. 56, № 4. P. 841–848.
26. Krynetskaia N.F., Cai X., Nitiss J.L., Krynetski E.Y., Relling M. V. Thioguanine substitution alters DNA cleavage mediated by topoisomerase II. // *FASEB J.* 2000. Vol. 14, № 14. P. 2339–2344.
27. Joyce C.M., Steitz T.A. Function and Structure Relationships in DNA Polymerases // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. Vol. 63, № 1. P. 777–822.
28. Frank P., Braunshofer-Reiter C., Wintersberger U., Grimm R., Büsen W. Cloning of the cDNA encoding the large subunit of human RNase HI, a homologue of the prokaryotic RNase HII. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. Vol. 95, № 22. P. 12872–12877.
29. Arudchandran A., Cerritelli S., Narimatsu S., Itaya M., Shin D.-Y., Shimada Y., Crouch R. The absence of ribonuclease H1 or H2 alters the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methanesulphonate: implications for roles of RNases H in DNA replication and repair // *Genes to Cells*. 2000. Vol. 5, № 10. P. 789–802.
30. KRYNETSKAIA N.F., FENG J.Y., KRYNETSKI E.Y., GARCIA J.V., PANETTA J.C., ANDERSON K.S., EVANS W.E. Deoxythioguanosine triphosphate impairs HIV replication: a new mechanism for an old drug // *FASEB J.* 2001. Vol. 15, № 11. P. 1902–1908.
31. Berkhout B., Jebbink M., Zsiros J. Identification of an Active Reverse Transcriptase Enzyme Encoded by a Human Endogenous HERV-K Retrovirus // *J. Virol.* 1999. Vol. 73, № 3. P. 2365–2375.
32. Wang H., Wang Y. 6-thioguanine perturbs cytosine methylation at the CpG dinucleotide site by DNA methyltransferases in vitro and acts as a DNA demethylating agent in vivo // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, № 10. P. 2290–2299.
33. Hemmens V.J., Moore D.E. Photo-oxidation of 6-mercaptopurine in aqueous solution // *J.*

- Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 1984. Vol. 0, № 2. P. 209–211.
34. Zhang X., Jeffs G., Ren X., O'Donovan P., Montaner B., Perrett C.M., Karran P., Xu Y.Z. Novel DNA lesions generated by the interaction between therapeutic thiopurines and UVA light // *DNA Repair (Amst)*. 2007. Vol. 6, № 3. P. 344–354.
 35. O'Donovan P., Perrett C.M., Zhang X., Montaner B., Xu Y.-Z., Harwood C.A., McGregor J.M., Walker S.L., Hanaoka F., Karran P. Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. // *Science*. 2005. Vol. 309, № 5742. P. 1871–1874.
 36. Bohon J., de los Santos C.R. Structural effect of the anticancer agent 6-thioguanine on duplex DNA. // *Nucleic Acids Res*. 2003. Vol. 31, № 4. P. 1331–1338.
 37. Lahoud G., Timoshchuk V., Lebedev A., Arar K., Hou Y.-M., Gamper H. Properties of pseudo-complementary DNA substituted with weakly pairing analogs of guanine or cytosine // *Nucleic Acids Res*. 2008. Vol. 36, № 22. P. 6999–7008.
 38. Leijon M., Gräslund A. Effects of sequence and length on imino proton exchange and base pair opening kinetics in DNA oligonucleotide duplexes // *Nucleic Acids Res*. 1992. Vol. 20, № 20. P. 5339–5343.
 39. Somerville L., Krynetski E.Y., Krynetskaia N.F., Beger R.D., Zhang W., Marhefka C.A., Evans W.E., Kriwacki R.W. Structure and Dynamics of Thioguanine-modified Duplex DNA // *J. Biol. Chem*. 2003. Vol. 278, № 2. P. 1005–1011.
 40. Cuevas C., Francesch A. Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem // *Nat. Prod. Rep*. 2009. Vol. 26, № 3. P. 322.
 41. Larsen A.K., Galmarini C.M., D'Incalci M., Maurizio D'incalci . Unique features of trabectedin mechanism of action // *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2016. Vol. 77, № 4. P. 663–671.
 42. Mannarino L., Paracchini L., Craparotta I., Romano M., Marchini S., Gatta R., Erba E., Clivio L., Romualdi C., D'Incalci M., Beltrame L., Pattini L. A systems biology approach to investigate the mechanism of action of trabectedin in a model of myelomonocytic leukemia // *Pharmacogenomics J*. 2018. Vol. 18, № 1. P. 56–63.
 43. Scotto K.W. ET-743: more than an innovative mechanism of action. // *Anticancer. Drugs*. 2002. Vol. 13 Suppl 1, № SUPPL. 1. P. S3-6.
 44. Marco E., Gago F. DNA structural similarity in the 2:1 complexes of the antitumor drugs trabectedin (Yondelis) and chromomycin A3 with an oligonucleotide sequence containing two adjacent TGG binding sites on opposing strands // *Mol. Pharmacol*. 2005. Vol. 68, № 6. P. 1559–1567.
 45. Germano G., Frapolli R., Belgiovine C., Anselmo A., Pesce S., Liguori M., Erba E., Ubaldi S., Zucchetti M., Pasqualini F., Nebuloni M., van Rooijen N., Mortarini R., Beltrame L., Marchini S., Fuso Nerini I., Sanfilippo R., Casali P.G., Pilotti S., et al. Role of Macrophage Targeting in the Antitumor Activity of Trabectedin // *Cancer Cell*. 2013. Vol. 23, № 2. P. 249–262.
 46. Di Giandomenico S., Frapolli R., Bello E., Ubaldi S., Licandro S.A., Marchini S., Beltrame L., Brich S., Mauro V., Tamborini E., Pilotti S., Casali P.G., Grosso F., Sanfilippo R., Gronchi A., Mantovani R., Gatta R., Galmarini C.M., Sousa-Faro J.M.F., et al. Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas // *Oncogene*. 2014. Vol. 33, № 44. P. 5201–5210.
 47. Preusser M., Spiegl-Kreinecker S., Lötsch D., Wöhrer A., Schmook M., Dieckmann K., Saringer W., Marosi C., Berger W. Trabectedin has promising antineoplastic activity in high-grade meningioma // *Cancer*. 2012. Vol. 118, № 20. P. 5038–5049.
 48. Tevyashova A.N. Olivomycin A – an Antitumor Antibiotic of the Aureolic Acid Group (Review) // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016. Vol. 50, № 7. P. 425–430.

49. DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. Cancer: principles and practice of oncology collections // Clin. Med. (Northfield. Il). 2005. P. 3120.
50. Ogawa M. A Recent Overview of Chemotherapy for Advanced Stomach Cancer in Japan // Antibiotics and chemotherapy. 1978. Vol. 24. P. 149–159.
51. Gause G.F. Chromomycin, Olivomycin, Mithramycin // Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. 1975. P. 615–622.
52. Kumar V., Remers W.A., Bradner W.T. Preparation and Antitumor Activity of Olivomycin A Analogues // J. Med. Chem. 1980. Vol. 23, № 4. P. 376–379.
53. Tevyashova A.N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N., Luzikov Y.N., Reznikova M.I., Dezhenkova L.G., Isakova E.B., Bukhman V.M., Durandin N.A., Vinogradov A.M., Kuzmin V.A., Preobrazhenskaya M.N. Modification of olivomycin A at the side chain of the aglycon yields the derivative with perspective antitumor characteristics // Bioorganic Med. Chem. 2011. Vol. 19, № 24. P. 7387–7393.
54. Lombó F., Menéndez N., Salas J.A., Méndez C. The aureolic acid family of antitumor compounds: Structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 73, № 1. P. 1–14.
55. Cheglakov I.B., Tevyashova A.N., Kurbatov L.K., Tatarsky V. V., Samusenko A. V., Preobrazhenskaya M.N., Shtil A.A. Altered transcription and replication are the mechanisms of cytotoxicity of antitumor antibiotic olivomycin A // Dokl. Biochem. Biophys. 2010. Vol. 435, № 1. P. 320–322.
56. Durandin N., Vinogradov A., Shtil A., Kuzmin V. Inhibition of c-Myc transcription by olivomycin a involves preferential drug binding to NFAT/Sp1 promoter site // Febs J. 2013. Vol. 280, № 1. P. SW01. W5–26.
57. Fernández-Guizán A., Mansilla S., Barceló F., Vizcaíno C., Núñez L.E., Morís F., González S., Portugal J. The activity of a novel mithramycin analog is related to its binding to DNA, cellular accumulation, and inhibition of Sp1-driven gene transcription // Chem. Biol. Interact. 2014. Vol. 219. P. 123–132.
58. Hou M.-H., Robinson H., Gao Y.-G., Wang A.H.-J. Crystal structure of the [Mg²⁺-(chromomycin A3)₂]-d(TTGGCCAA)₂ complex reveals GGCC binding specificity of the drug dimer chelated by a metal ion. // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32, № 7. P. 2214–2222.
59. CARPENTER M.L., MARKS J.N., FOX K.R. DNA-sequence binding preference of the GC-selective ligand mithramycin. Deoxyribonuclease-I/deoxyribonuclease-II and hydroxy-radical footprinting at CCCG, CCGC, CGGC, GCCC and GGGG flanked by (AT)_n and A_n. Tn // Eur. J. Biochem. 1993. Vol. 215, № 3. P. 561–566.
60. Aich P., Dasgupta D. Role of Magnesium Ion in Mithramycin-DNA Interaction: Binding of Mithramycin-Mg²⁺ Complexes with DNA // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 4. P. 1376–1385.
61. Chakrabarti S., Bhattacharyya D., Dasgupta D. Structural basis of DNA recognition by anticancer antibiotics, chromomycin A3, and mithramycin: Roles of minor groove width and ligand flexibility // Biopolymers. 2000. Vol. 56, № 2. P. 85–95.
62. Barceló F., Scotta C., Ortiz-Lombardía M., Méndez C., Salas J.A., Portugal J. Entropically-driven binding of mithramycin in the minor groove of C/G-rich DNA sequences // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35, № 7. P. 2215–2226.
63. Beniaminov A.D., Dezhenkova L.G., Mamaeva O.K., Shchyolkina A.K., Tevyashova A.N., Kaluzhny D.N., Shtil A.A. Divalent cations are dispensable for binding to DNA of a novel positively charged olivomycin A derivative // PLoS One. 2018. Vol. 13, № 2. P. 1–9.
64. Dutta S., Lahiri S., Banerjee A., Saha S., Dasgupta D. Association of antitumor antibiotic Mithramycin with Mn²⁺ and the potential cellular targets of Mithramycin after association

- with Mn²⁺ // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2015. Vol. 33, № 2. P. 434–446.
65. Slavik M., Carter S.K. Chromomycin A3, Mithramycin, and Olivomycin: Antitumor Antibiotics of Related Structure // *Adv. Pharmacol.* 1975. Vol. 12, № C. P. 1–30.
 66. Safe S., Abdelrahim M. Sp transcription factor family and its role in cancer // *Eur. J. Cancer.* 2005. Vol. 41, № 16. P. 2438–2448.
 67. Previdi S., Malek A., Albertini V., Riva C., Capella C., Broggin M., Carbone G.M., Rohr J., Catapano C. V. Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts // *Gynecol. Oncol.* 2010. Vol. 118, № 2. P. 182–188.
 68. Bell A., Kittler L., Löber G., Zimmer C. Influence of minor groove binders on the eukaryotic topoisomerase II cleavage reaction with 41 base pair model oligonucleotides // *Invest. New Drugs.* 1995. Vol. 13, № 4. P. 271–284.
 69. Saha S., Mukherjee S., Mazumdar M., Manna A., Khan P., Adhikary A., Kajal K., Jana D., Sa G., Mukherjee S., Sarkar D.K., Das T. Mithramycin A sensitizes therapy-resistant breast cancer stem cells toward genotoxic drug doxorubicin // *Transl. Res.* 2015. Vol. 165, № 5. P. 558–577.
 70. Scroggins B.T., Burkeen J., White A.O., Chung E.J., Wei D., Chung S.I., Valle L.F., Patil S.S., McKay-Corkum G., Hudak K.E., Linehan W.M., Citrin D.E. Mithramycin A Enhances Tumor Sensitivity to Mitotic Catastrophe Resulting From DNA Damage. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2018. Vol. 100, № 2. P. 344–352.
 71. Otjacques E., Binsfeld M., Rocks N., Blacher S., Vanderkerken K., Noel A., Beguin Y., Cataldo D., Caers J. Mithramycin Exerts an Anti-Myeloma Effect and Displays Anti-Angiogenic Effects through Up-Regulation of Anti-Angiogenic Factors // *PLoS One* / ed. de Carvalho D.P. 2013. Vol. 8, № 5. P. e62818.
 72. Rao M., Atay S.M., Shukla V., Hong Y., Upham T., Ripley R.T., Hong J.A., Zhang M., Reardon E., Fetsch P., Miettinen M., Li X., Peer C.J., Sissung T., Figg W.D., De Rienzo A., Bueno R., Schrupp D.S. Mithramycin depletes specificity protein 1 and activates p53 to mediate senescence and apoptosis of malignant pleural mesothelioma cells // *Clin. Cancer Res.* 2016. Vol. 22, № 5. P. 1197–1210.
 73. Bachur N.R., Yu F., Johnson R., Hickey R., Wu Y., Malkas L. Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. // *Mol. Pharmacol.* 1992. Vol. 41, № 6. P. 993–998.
 74. Minotti G. Adriamycin-dependent release of iron from microsomal membranes // *Arch. Biochem. Biophys.* 1989. Vol. 268, № 1. P. 398–403.
 75. Carter S.K. Adriamycin—A Review // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 1975. Vol. 55, № 6. P. 1265–1274.
 76. Hortobágyi G.N. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview // *Drugs.* 1997. Vol. 54, № SUPPL. 4. P. 1–7.
 77. Yokochi T., Robertson K.D. Doxorubicin Inhibits DNMT1, Resulting in Conditional Apoptosis // *Mol. Pharmacol.* 2004. Vol. 66, № 6. P. 1415–1420.
 78. Demeunynck M., Charmantray F., Martelli A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy // *Curr. Pharm. Des.* 2001. Vol. 7, № 17. P. 1703–1724.
 79. Cassileth P.A., Gale R.P. Amsacrine: A review // *Leuk. Res.* 1986. Vol. 10, № 11. P. 1257–1265.
 80. Robinson M.J., Osheroff N. Stabilization of the Topoisomerase II-DNA Cleavage Complex by Antineoplastic Drugs: Inhibition of Enzyme-Mediated DNA Religation by 4'-(9-Acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide // *Biochemistry.* 1990. Vol. 29, № 10. P. 2511–2515.
 81. Chen R., Huo L., Jaiswal Y., Huang J., Zhong Z., Zhong J., Williams L., Xia X., Liang Y., Yan Z. Design, Synthesis, Antimicrobial, and Anticancer Activities of Acridine

- Thiosemicarbazides Derivatives // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 11. P. 2065.
82. Shay J.W., Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer // *Eur. J. Cancer*. 1997. Vol. 33, № 5. P. 787–791.
 83. Harrison R.J., Gowan S.M., Kelland L.R., Neidle S. Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 1999. Vol. 9, № 17. P. 2463–2468.
 84. Gunaratnam M., Greciano O., Martins C., Reszka A.P., Schultes C.M., Morjani H., Riou J.-F., Neidle S. Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening // *Biochem. Pharmacol*. 2007. Vol. 74, № 5. P. 679–689.
 85. Dash R.P., Jayachandra Babu R., Srinivas N.R. Therapeutic Potential and Utility of Elacridar with Respect to P-glycoprotein Inhibition: An Insight from the Published In Vitro, Preclinical and Clinical Studies // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet*. 2017. Vol. 42, № 6. P. 915–933.
 86. Yao X., Watkins N.H., Brown-Harding H., Bierbach U. A membrane transporter determines the spectrum of activity of a potent platinum–acridine hybrid anticancer agent // *Sci. Rep*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 15201.
 87. Ding S., Qiao X., Kucera G.L., Bierbach U. Using a build-and-click approach for producing structural and functional diversity in DNA-targeted hybrid anticancer agents // *J. Med. Chem*. 2012. Vol. 55, № 22. P. 10198–10203.
 88. Gurova K. New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents // *Futur. Oncol*. 2009. Vol. 5, № 10. P. 1685–1704.
 89. Lock R., Carol H., Maris J.M., Kolb E.A., Gorlick R., Reynolds C.P., Kang M.H., Keir S.T., Wu J., Purmal A., Gudkov A., Kurmashev D., Kurmasheva R.T., Houghton P.J., Smith M.A. Initial testing (stage 1) of the curaxin CBL0137 by the pediatric preclinical testing program // *Pediatr. Blood Cancer*. 2017. Vol. 64, № 4. P. 1–8.
 90. Gasparian A. V., Burkhart C.A., Purmal A.A., Brodsky L., Pal M., Saranadasa M., Bosykh D.A., Commane M., Guryanova O.A., Pal S., Safina A., Sviridov S., Koman I.E., Veith J., Komar A.A., Gudkov A. V., Gurova K. V. Curaxins: Anticancer Compounds That Simultaneously Suppress NF- B and Activate p53 by Targeting FACT // *Sci. Transl. Med*. 2011. Vol. 3, № 95. P. 95ra74–95ra74.
 91. Burkhart C., Fleyshman D., Kohn R., Commane M., Garrigan J., Kurbatov V., Toshkov I., Ramachandran R., Martello L., Gurova K. V. Curaxin CBL0137 eradicates drug resistant cancer stem cells and potentiates efficacy of gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer // *Oncotarget*. 2014. Vol. 5, № 22. P. 11038–11053.
 92. Dermawan J.K.T., Hitomi M., Silver D.J., Wu Q., Sandlesh P., Sloan A.E., Purmal A.A., Gurova K. V., Rich J.N., Lathia J.D., Stark G.R., Venere M. Pharmacological Targeting of the Histone Chaperone Complex FACT Preferentially Eliminates Glioblastoma Stem Cells and Prolongs Survival in Preclinical Models // *Cancer Res*. 2016. Vol. 76, № 8. P. 2432–2442.
 93. Safina A., Cheney P., Pal M., Brodsky L., Ivanov A., Kirsanov K., Lesovaya E., Naberezhnov D., Nesher E., Koman I., Wang D., Wang J., Yakubovskaya M., Winkler D., Gurova K. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells // *Nucleic Acids Res*. 2017. Vol. 45, № 4. P. gkw1366.
 94. Nesher E., Safina A., Aljahdali I., Portwood S., Wang E.S., Koman I., Wang J., Gurova K. V. Role of chromatin damage and chromatin trapping of fact in mediating the anticancer cytotoxicity of DNA-binding small-molecule drugs // *Cancer Res*. 2018. Vol. 78, № 6. P. 1431–1443.
 95. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. p53 mutations in human cancers // *Science* (80-.). 1991. Vol. 253, № 5015. P. 49–53.

96. Kantidze O.L., Luzhin A. V., Nizovtseva E. V., Safina A., Valieva M.E., Golov A.K., Velichko A.K., Lyubitelev A. V., Feofanov A. V., Gurova K. V., Studitsky V.M., Razin S. V. The anti-cancer drugs curaxins target spatial genome organization // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 1441.
97. Barone T.A., Burkhardt C.A., Safina A., Haderski G., Gurova K. V., Purmal A.A., Gudkov A. V., Plunkett R.J. Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and -resistant glioblastoma. // *Neuro. Oncol.* 2017. Vol. 19, № 2. P. 186–196.
98. Jeltsch A., Jurkowska R.Z. New concepts in DNA methylation // *Trends Biochem. Sci.* 2014. Vol. 39, № 7. P. 310–318.
99. Jeltsch A., Jurkowska R.Z. Multimerization of the Dnmt3a DNA methyltransferase and its functional implications // *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 1st ed. 2013. Vol. 117. 445–464 p.
100. Zhang W., Xu J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis // *Biomark. Res.* 2017. Vol. 5, № 1. P. 1.
101. Dawson M.A., Kouzarides T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy // *Cell.* 2012. Vol. 150, № 1. P. 12–27.
102. Gowher H., Jeltsch A. Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 23. P. 20409–20414.
103. Zhang Z.M., Lu R., Wang P., Yu Y., Chen D., Gao L., Liu S., Ji D., Rothbart S.B., Wang Y., Wang G.G., Song J. Structural basis for DNMT3A-mediated de novo DNA methylation // *Nature.* 2018. Vol. 554, № 7692. P. 387–391.
104. Jia D., Jurkowska R.Z., Zhang X., Jeltsch A., Cheng X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation // *Nature.* 2007. Vol. 449, № 7159. P. 248–251.
105. Rajavelu A., Jurkowska R.Z., Fritz J., Jeltsch A. Function and disruption of DNA Methyltransferase 3a cooperative DNA binding and nucleoprotein filament formation // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 2. P. 569–580.
106. Ivanov A.A., Koval V.S., Susova O.Y., Salyanov V.I., Oleinikov V.A., Stomakhin A.A., Shalginskikh N.A., Kvasha M.A., Kirsanova O. V., Gromova E.S., Zhuze A.L. DNA specific fluorescent symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP(n): The synthesis, spectral properties, and biological activity // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2015. Vol. 25, № 13. P. 2634–2638.
107. Cherepanova N.A., Ivanov A.A., Maltseva D. V., Minero A.S., Gromyko A. V., Streltsov S.A., Zhuze A.L., Gromova E.S. Dimeric bisbenzimidazoles inhibit the DNA methylation catalyzed by the murine Dnmt3a catalytic domain // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2011. Vol. 26, № 2. P. 295–300.
108. Brennan C.A., Van Cleve M.D., Gumpert R.I. The effects of base analogue substitutions on the cleavage by the EcoRI restriction endonuclease of octadeoxyribonucleotides containing modified EcoRI recognition sequences. // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261, № 16. P. 7270–7278.
109. Sergeev A. V., Kirsanova O. V., Loiko A.G., Nomerotskaya E.I., Gromova E.S. Detection of DNA Methylation by Dnmt3a Methyltransferase using Methyl-Dependent Restriction Endonucleases // *Mol. Biol.* 2018. Vol. 52, № 2. P. 272–278.
110. Chernukhin V.A., Kileva E. V., Tomilova Y., Boltengagen A.A., Dedkov V.S., Mikhnenkova N.A., Gonchar D.A., Golikova L.N., Degtyarev Sk. A new methyl-directed site-specific endonuclease KfoI recognizes and cuts DNA sequence 5'-G^mC GGC-3' // *Ovchinnikov Bull. Biotechnol. Phys. Chem. Biol.(Moscow).* 2011. Vol. 7. P. 14–20.

111. Jurkowska R.Z., Siddique A.N., Jurkowski T.P., Jeltsch A. Approaches to Enzyme and Substrate Design of the Murine Dnmt3a DNA Methyltransferase // *ChemBioChem*. 2011. Vol. 12, № 10. P. 1589–1594.
112. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Тарасова Г.В., Голикова Л.Н., Акишев А.Г., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. ШТАММ БАКТЕРИИ *Paracoccus carotinifaciens* ЗК-ПРОДУЦЕНТ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ PcsI.: pat. RU 2377294 C1 USA. 2009.
113. Maltseva D. V., Baykov A.A., Jeltsch A., Gromova E.S. Impact of 7,8-dihydro-8-oxoguanine on methylation of the CpG site by dnmt3a // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, № 6. P. 1361–1368.
114. Maltseva D. V., Gromova E.S. Interaction of murine Dnmt3a with DNA containing O6-methylguanine // *Biochem*. 2010. Vol. 75, № 2. P. 173–181.
115. Wyszynski M.W., Gabbara S., Kubareva E.A., Romanova E.A., Oretskaya T.S., Gromova E.S., Shabarova Z.A., Bhagwat A.S. The cysteine conserved among DNA cytosine methylases required for methyl transfer, but not for specific DNA binding // *Nucleic Acids Res*. 1993. Vol. 21, № 2. P. 295–301.
116. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix // *Cell*. 1994. Vol. 76, № 2. P. 357–369.
117. Cheng X., Blumenthal R.M. Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective // *Structure*. 2008. Vol. 16, № 3. P. 341–350.
118. Abraham M.H., Platts J.A. Hydrogen bond structural group constants // *J. Org. Chem*. 2001. Vol. 66, № 10. P. 3484–3491.
119. Repges R., Beuck C., Weinhold E., Raabe G., Fleischhauer J. 6-Thioguanine in DNA as CD-spectroscopic probe to study local structural changes upon protein binding // *Chirality*. 2008. Vol. 20, № 9. P. 978–984.
120. Кирсанова О.В., Черепанова Н.А., Громова Е.С. Ингибирование C5-цитозин-ДНК-метилтрансфераз // *Биохимия*. 2009. Vol. 74, № 11. P. 1445–1458.
121. Черепанова Н.А., Жузе А.Л., Громова Е.С. ИНГИБИРОВАНИЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ МЫШИ Dnmt3a ДНК-ДУПЛЕКСАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ПИРИМИДИН-2 (Ш)-ОН // *Биохимия*. 2010. Vol. 75, № 9. P. 1244–1256.
122. Lukashevich O. V., Baskunov V.B., Darii M. V., Kolbanovskiy A., Baykov A.A., Gromova E.S. Dnmt3a-CD Is Less Susceptible to Bulky Benzo[a]pyrene Diol Epoxide-Derived DNA Lesions Than Prokaryotic DNA Methyltransferases // *Biochemistry*. 2011. Vol. 50, № 5. P. 875–881.
123. Biebricher A.S., Heller I., Roijmans R.F.H., Hoekstra T.P., Peterman E.J.G., Wuite G.J.L. The impact of DNA intercalators on DNA and DNA-processing enzymes elucidated through force-dependent binding kinetics // *Nat. Commun*. 2015. Vol. 6, № 1. P. 1–12.
124. Esteller M. ABERRANT DNA METHYLATION AS A CANCER-INDUCING MECHANISM // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2005. Vol. 45, № 1. P. 629–656.
125. Храброва Д.А., Якубовская М.Г., Громова Е.С. Мутации в ДНК-метилтрансферазе DNMT3A при остром миелоидном лейкозе // *Биохимия*. 2021. Vol. 86, № 3. P. 360–373.
126. Kostyuk S. V., Kvasha M.A., Khrabrova D.A., Kirsanova O. V., Ershova E.S., Malinovskaya E.M., Veiko N.N., Ivanov A.A., Koval V.S., Zhuze A.L., Tashlitsky V.H., Umriukhin P.E., Kutsev S.I., Gromova E.S. Symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP(n) reduce methylation of RARB and PTEN while significantly increase methylation of rRNA genes in MCF-7 cancer cells // *PLoS One* / ed. Bryk M. 2018. Vol. 13, № 1. P. e0189826.
127. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.

128. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, № 1–2. P. 248–254.
129. 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.* 2017. Vol. 36, № 6. P. 392–405.
130. Tevyashova A.N., Durandin N.A., Vinogradov A.M., Zbarsky V.B., Reznikova M.I., Dezhenkova L.G., Bykov E.E., Olsufyeva E.N., Kuzmin V.A., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. Role of the acyl groups in carbohydrate chains in cytotoxic properties of olivomycin A // *J. Antibiot. (Tokyo).* 2013. Vol. 66, № 9. P. 523–530.