

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

*На правах рукописи*

**Кузнецов Виталий Викторович**

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ 1  
ЧЕЛОВЕКА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АБЕРРАНТНОЕ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ  
ДНК В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ

03.01.03 – молекулярная биология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Нетесова Н. А.

Кольцово – 2015

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	9
1.1. ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.....	9
1.1.1. ДНК-метилтрансфераза 1 .....	12
1.1.2. Семейство ДНК-метилтрансфераз 3 .....	19
1.2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК У МЛЕКОПИТАЮЩИХ .....	24
1.3. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ СИСТЕМЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК .....	33
1.3.1. Методы, основанные на применении 5-метилцитозин-специфичных антител .....	34
1.3.2. Методы, основанные на бисульфитной конверсии ДНК.....	34
1.3.3. Методы, основанные на применении метилчувствительных и метилзависимых эндонуклеаз рестрикции .....	40
1.4. ДЕМЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК.....	44
1.5. ИНГИБИРОВАНИЕ МТаз.....	47
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	53
2.1. МАТЕРИАЛЫ.....	53
2.1.1. Олигодезоксирибонуклеотидные ингибиторы Dnmt1 .....	53
2.1.2. Клеточные линии .....	56
2.1.3. Праймеры и TaqMan-зонды .....	57
2.2. МЕТОДЫ.....	58
2.2.1. Измерение скоростей реакции метилирования ДНК .....	58
2.2.2. Изучение внутриклеточной локализации олигонуклеотидов в клетках .....	60
2.2.3. Исследование цитотоксичности и ингибирующей активности олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 .....	61
2.2.4. Выделение ДНК из клеток .....	61
2.2.5. GLAD-ПЦР анализ статуса метилирования ДНК.....	62
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	64

3.1. Дизайн олигонуклеотидов, специфичных к Dnmt1 .....	64
3.2. Субстратные свойства синтетических олигонуклеотидных структур .....	65
3.3. Ингибиторные свойства олигонуклеотидных структур в отношении активности Dnmt1 .....	69
3.4. Локализация олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 в клетках карцином шейки матки.....	74
3.5. Оценка цитотоксичности олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1.....	78
3.6. Адаптация метода GLAD-ПЦР для анализа статуса метилирования ДНК .....	81
3.7. Оценка деметилирующего эффекта ингибиторов на гиперметилированные регуляторные районы генов-супрессоров опухолей.....	88
3.8. Заключение.....	93
4. ВЫВОДЫ .....	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что все клетки человеческого организма несут одинаковую генетическую информацию, в ходе клеточной дифференцировки формируется более 100 различных цитотипов. Основная роль в этом процессе принадлежит системе метилирования ДНК, регулирующей транскрипционную активность генов.

Профиль метилирования ДНК эукариот поддерживается ферментом ДНК-метилтрансферазой I (МТазой Dnmt1), которая обеспечивает модификацию вновь синтезированной цепи ДНК при ее репликации. Известно, что метилирование ДНК является ключевым эпигенетическим механизмом, контролирующим не только экспрессию генов (Lande-Diner et al. 2007, Miranda and Jones 2007), но и родительский импринтинг (Hore et al. 2007, Sha 2008), инактивацию X-хромосомы (Straub and Becker 2007, Yen et al. 2007), поддержание целостности генома клетки и его защиту от встраивания ретровирусов и транспозонов (Yoder et al. 1997, Howard et al. 2008). Аберрантное метилирование ДНК может способствовать развитию неврологических, психических, эндокринных заболеваний (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, аутизм, шизофрения, сахарный диабет II типа и др.) (Robertson 2005, Feinberg 2007), а также возникновению и прогрессии опухолей (рак молочной железы, яичников, шейки матки и др.) (Feinberg and Tycko 2004, Jones and Baylin 2007).

Сбои в работе Dnmt1 обуславливают масштабные изменения паттерна метилирования ДНК, включающие гиперметилирование CpG-островков (последовательностей, содержащих кластеры CpG-динуклеотидов) в составе генных промоторов или первых экзонов. Избыточное метилирование регуляторных областей, сопровождающееся подавлением транскрипции генов, рассматривается в настоящее время как альтернативный механизм (наряду с мутациями) инактивации большой группы генов-супрессоров опухолевого роста, инвазии, метастазирования, неоангиогенеза, в том числе генов системы репарации

ДНК и регуляции апоптоза, утрата функций которых обнаруживается на ранних стадиях опухолевой прогрессии (Lavric et al. 2002).

Поскольку присоединение метильной группы к цитозину в составе ДНК не приводит к изменению генетического кода, использование ингибиторов МТаз позволяет добиться реактивации генов-онкосупрессоров, приводящей к обратному развитию опухоли (Delpe et al. 2013). В настоящее время допущены к применению аналоги цитидина (Vidaza<sup>®</sup>, Dacogen<sup>®</sup>) для терапии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и миелодиспластического синдрома (МДС) (Singh et al. 2013). Однако помимо высокой эффективности данные препараты обладают сильным токсическим и мутагенным эффектом. Таким образом, остается актуальным поиск прямых ингибиторов МТаз, обладающих наряду с противоопухолевой активностью умеренным воздействием на нормальные клетки.

**Цель работы:** разработать олигонуклеотидные ингибиторы ДНК-метилтрансферазы 1 человека и изучить их влияние на aberrантное гиперметилирование ДНК в раковых клетках (на примере карциномы шейки матки).

**Задачи исследования:**

1. Сконструировать и синтезировать конкурентные олигодезоксирибонуклеотидные ингибиторы Dnmt1 человека, как наиболее близкие к природному субстрату фермента — клеточной ДНК.
2. Оценить субстратные свойства и ингибирующий потенциал полученных олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН) *in vitro*.
3. Изучить локализацию и устойчивость ингибиторов Dnmt1 в клетках рака шейки матки линий HeLa и CaSki.
4. Сравнить токсическое влияние ингибиторов Dnmt1 на клетки рака шейки матки (HeLa и CaSki) и неопухолевые клетки (на примере линии L-68).

5. Оценить деметилирующий эффект ингибиторов Dnmt1 в отношении гиперметилированных регуляторных районов генов-супрессоров опухолей *CDKN2A*, *DAPK*, *MGMT*, *RARB* и *RASSF1* в клетках HeLa и CaSki.

#### **Научная новизна:**

Впервые получены высокоаффинные ингибиторы Dnmt1, сконструированные на основе выбранной базовой 22-звенной последовательности 5'-GAAATGGATCCGCTCTAAACTG-3' (и комплементарной ей цепи).

Установлено, что в условиях эксперимента выбранные ОДН характеризуются высокой проникающей способностью и устойчивостью в ядрах опухолевых клеток.

Показано, что полученные синтетические структуры обладают способностью эффективно подавлять рост клеточных культур карциномы шейки матки в сочетании с низкой токсичностью в отношении нераковых клеток.

Для оценки деметилирующего эффекта полученных ингибиторов применен метод GLAD-ПЦР анализа (*GlaI* digestion and Ligation Adapter Dependent ПЦР), впервые разработанный и запатентованный автором совместно с А.Г. Акишевым, к.б.н. М.А. Абдурашитовым и д.х.н., проф. С.Х. Дегтяревым.

#### **Теоретическая и практическая значимость:**

Результаты, полученные при исследовании влияния ингибиторов Dnmt1 на aberrантное гиперметилирование ДНК в клетках карциномы шейки матки, развивают современные представления о роли эпигенетических изменений в патогенезе злокачественных опухолей.

Полученные данные о высокой ингибирующей активности синтезированных ОДН в сочетании с их устойчивостью к действию клеточных экзо- и эндонуклеаз и низкой токсичностью в отношении нераковых клеток (терапевтический индекс > 100) позволяют рекомендовать данные соединения для дальнейших экспериментов с целью получения эффективных противоопухолевых препаратов.

Высокоспецифичный метод GLAD-ПЦР анализа может быть использован для типирования различных образцов ДНК, включая линии опухолевых клеток.

Высокая чувствительность GLAD-ПЦР, позволяющая детектировать порядка 20 пг метилированной ДНК среди суммарного пула, делает предложенный метод перспективным инструментом ранней диагностики злокачественных новообразований.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. ДНК-структуры, синтезированные на основе единой базовой последовательности 5'-GAAATGGATCCGCTCTAAACTG-3' (и комплементарной ей цепи) и содержащие модифицированный сайт узнавания фермента 5'-CG-3', обладают выраженными ингибирующими свойствами в отношении Dnmt1. Показано, что сочетание C:A некомплементарности в сайте узнавания, шпильчатой структуры и замены фосфатов на фосфотиоаты значительно повышает сродство олигонуклеотида к ферменту.

2. После трансфекции в клетки карциномы шейки матки ОДН ингибиторы способны накапливаться в клеточном ядре, не подвергаясь деградации в течение минимум 48 часов.

3. Наиболее эффективные ингибиторы Dnmt1 обладают следующими характеристиками: ингибирование активности Dnmt1 *in vitro* 80-90%,  $IC_{50} < 200$  нМ, индекс селективности  $\left(\frac{TC_{50.нераковых\ клеток}}{TC_{50.раковых\ клеток}}\right)$  наилучшего ингибитора  $> 100$ , эффективность деметилирования ДНК в клетках HeLa порядка 90%, CaSki — до 80%.

4. Метод GLAD-ПЦР анализа может быть использован для оценки изменения статуса метилирования ДНК опухолевых клеток, обусловленного действием ингибиторов Dnmt1.

### **Апробация работы и публикации:**

Материалы исследований по теме диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: «IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов» (Новосибирск, 2008), «Russian–European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability» (Санкт-Петербург, 2008), «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010), «XXV Международная зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии"» (Москва, 2013), «Cell Symposia: Cancer Epigenomics 2013» (Ситжес, Испания, 2013). По материалам диссертации опубликовано четыре печатные работы (две в журналах входящих в перечень ВАК) и два патента РФ.

#### **Объем и структура диссертации:**

Диссертация состоит из шести разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 131 странице машинописного текста и включает 17 рисунков и 10 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 305 источников, включая 10 отечественных и 295 зарубежных.

#### **Вклад автора в диссертационную работу:**

Все основные эксперименты, представленные в работе, а также анализ полученных данных выполнены автором лично. Дизайн ОДН ингибиторов проводился совместно с к.б.н. А.А. Евдокимовым (ФБУН ГНЦВБ «Вектор»). Работа выполнялась в ФБУН ГНЦ ВБ Вектор в рамках научных тем организации, а также грантов МНТЦ 3312 и US Public Health Service grant from the Fogarty International Center (No. TW00529), в которых автор являлся исполнителем.



## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ДНК-метилтрансферазы (МТазы) катализируют реакцию переноса метильной группы от универсального донора S-аденозил-L-метионина (AdoMet) в определенное положение основания ДНК в составе специфической последовательности с образованием метилированного ДНК-продукта и S-аденозил-L-гомоцистеина (AdoHcy). ДНК-метилтрансферазы подразделяют на две группы: [C5-цитозин]-МТазы (КФ 2.1.1.37) и amino-МТазы (Malone et al. 1995, Ahmad and Rao 1996). На рисунке 1 представлены структуры продуктов реакции метилирования ДНК.

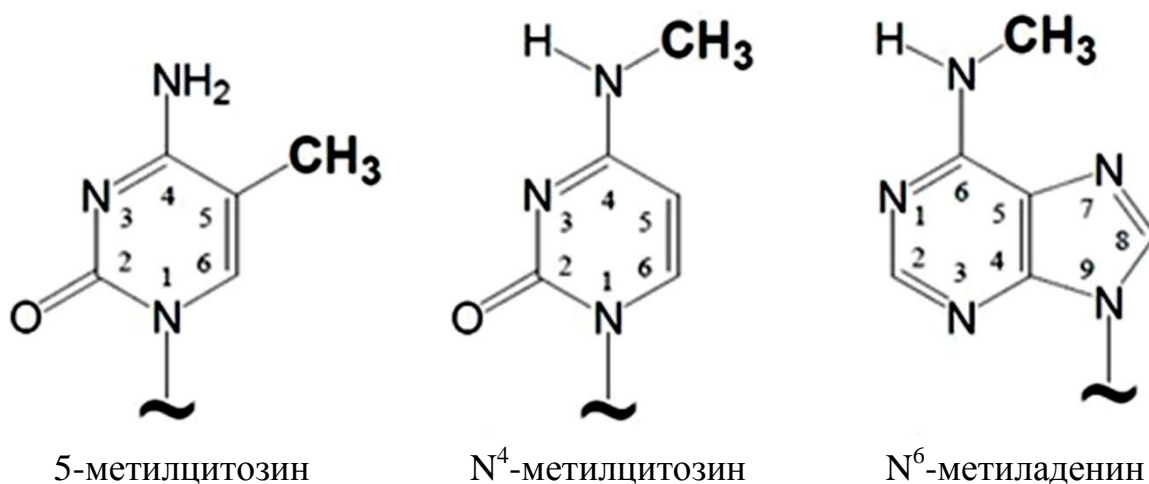


Рис. 1. Структура метилированных оснований ДНК.

Амино-МТазы, широко распространенные в природе (от бактериофагов до низших эукариот, включительно), метилируют экзоциклические аминогруппы аденина ([ $\text{N}^6$ -аденин]-МТазы, КФ 2.1.1.72) либо цитозина ([ $\text{N}^4$ -цитозин]-МТазы, КФ 2.1.1.113). [C5-цитозин]-МТазы метилируют эндоциклический атом углерода в 5-ом положении цитозина. Данная модификация обнаруживается в ДНК как прокариотических, так и эукариотических клеток, и представляет собой единственный тип метилирования ДНК, известный у высших эукариот (Bird 1999,

Vertino 1999). Впервые 5-метилцитозин был обнаружен в 1948 г. Р.Д. Хотчкисом в составе ДНК, выделенной из клеток тимуса теленка (Hotchkiss R.D. 1948).

На сегодняшний день охарактеризованы три активные МТазы, функционирующие в клетках млекопитающих: Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b, а также белок со сходной структурой, но не обладающий каталитической активностью — Dnmt3L (DNMT3-like). Молекулы МТаз состоят из двух частей: большой мультидоменной N-концевой области, осуществляющей регуляторную функцию, и С-концевого фрагмента, обладающего каталитическими свойствами. N-концевая область обеспечивает правильную внутриклеточную локализацию фермента и его взаимодействие с другими белками, ДНК и хроматином. Меньший по размерам С-концевой домен, гомологичный у прокариотических и эукариотических [С5-цитозин]-МТаз, содержит активный центр фермента и обладает десятью аминокислотными мотивами, характерными для всех [С5-цитозин]-МТаз (Cheng X. 1995). Этот домен участвует в связывании с кофактором (мотивы I и X) и катализе реакции (мотивы IV, VI и VIII). Неконсервативная область между VIII и IX мотивами обеспечивает специфическое узнавание ДНК (Cheng X. 1995, Jeltsch 2002).

Помимо структурной гомологии, МТазы млекопитающих и прокариот характеризуются сходством механизмов взаимодействия с ДНК: и те, и другие ферменты “выворачивают” целевое основание из спирали ДНК в гидрофобный карман своего активного центра (рис. 2). Каталитический механизм [С5-цитозин]-метилтрансфераз заключается в нуклеофильной атаке фермента на шестую позицию цитозина с участием каталитически активного остатка цистеина в IV мотиве (Jeltsch 2002), что ведет к формированию ковалентной связи между ферментом и субстратом. В результате увеличивается отрицательный заряд на С5-атоме цитозина, который атакуется метильной группой AdoMet. Предполагается, что данная реакция регулируется консервативным остатком глутамина из VI мотива. Этот остаток также взаимодействует с экзоциклической аминогруппой N4 и стабилизирует “вывернутое” основание. В дополнение, остаток аргинина из мотива VIII, возможно, способствует правильному позиционированию глутамата

и “вывернутого” основания. Присоединение метильной группы к цитозиновому основанию приводит к депротонированию атома С5 и разрушению ковалентной связи между ферментом и ДНК.

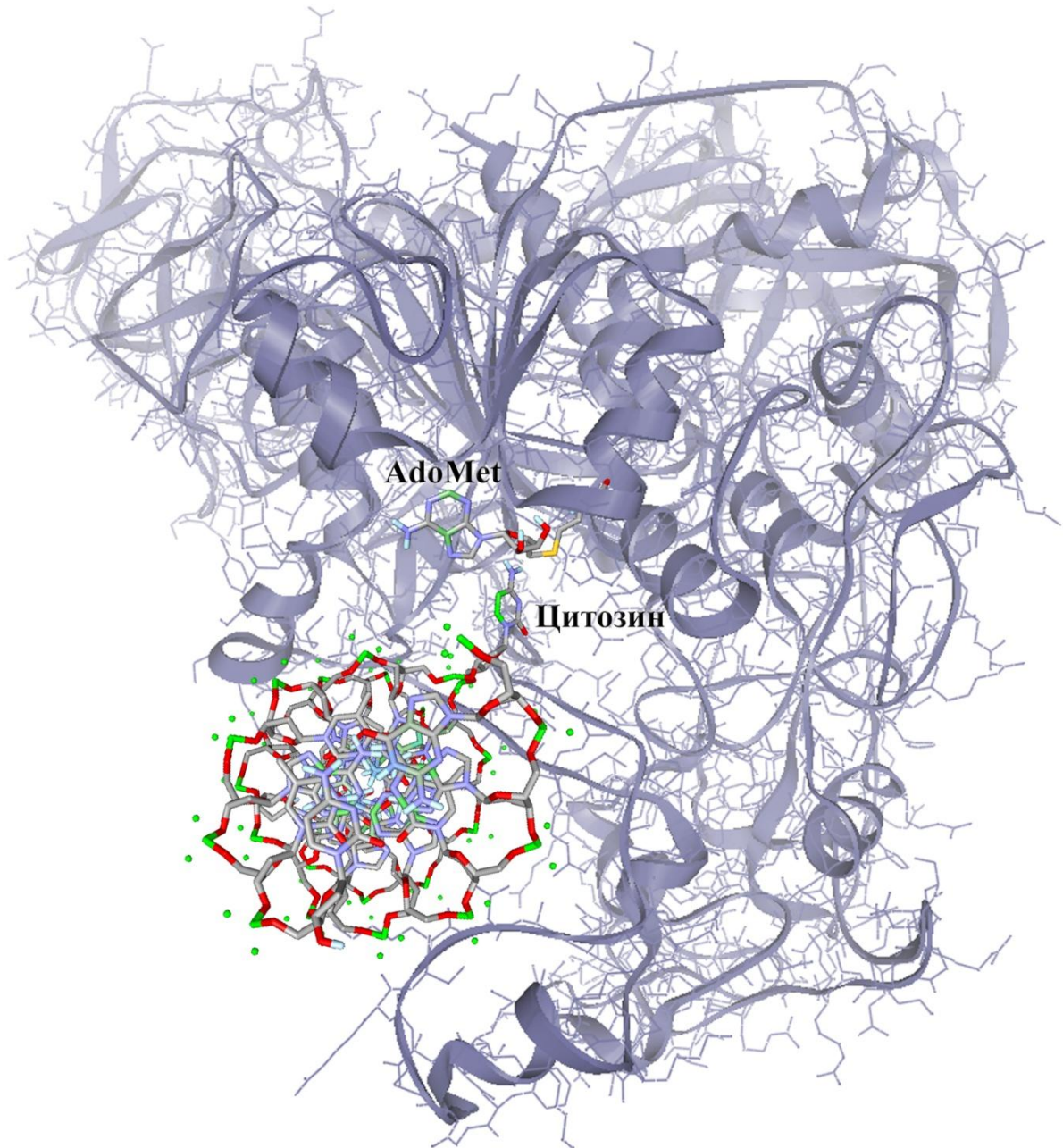


Рис. 2. Взаимодействие ДНК-метилтрансферазы 1 человека с ДНК. Показано “вывернутое” из спирали ДНК цитозиновое основание, обращенное к активному центру фермента с находящимся там донором метильной группы — AdoMet.

### 1.1.1. ДНК-метилтрансфераза 1

ДНК-метилтрансфераза 1 (*Dnmt1*) стала первой клонированной и биохимически охарактеризованной метилтрансферазой млекопитающих (Bestor et al. 1988). МТазы 1 человека представляет собой белок с молекулярной массой 185 кДа, содержащий 1632 аминокислотных остатка. Сайтом узнавания *Dnmt1* является CpG-динуклеотид, причем активность фермента повышается, если комплементарная цепь ДНК в соответствующем положении содержит метилцитозин (Fatemi et al. 2001, Goyal et al. 2006). *Dnmt1* локализуется на репликационной вилке в течение S-периода клеточного цикла (Leonhardt et al. 1992). Основной функцией данной МТазы является поддержание исходного паттерна метилирования в клетке, что обеспечивается метилированием полуметилированных CpG-динуклеотидов после репликации ДНК.

В ходе многочисленных исследований было установлено, что *Dnmt1* играет ключевую роль в развитии и делении клеток, а нарушение функций фермента напрямую связано с канцерогенезом (Gaudet et al. 2003, Eden et al. 2003).

В экспериментах на мышах нокаут гена *Dnmt1* приводит к деметилированию генома на 60 % и гибели эмбрионов на 10-11 день развития (Li et al. 1992). Также мутации в данном гене сопровождаются потерей импринтинга (Li et al. 1993, Howell et al. 2001) и невозможностью инактивации X-хромосомы (Panning and Jaenisch 1996, Sado et al. 2000).

Работы со стволовыми клетками показали, что недостаток *Dnmt1* не сказывается на их развитии, но инициация дифференцировки клеток приводит к апоптозу (Li et al. 1992). Кроме того, у таких клеток повышен уровень митотических рекомбинаций, приводящих к хромосомным перестройкам (Chen et al. 1998). Разрушение гена *Dnmt1* в клетках карциномы прямой кишки человека приводит к торможению пролиферации и серьезным митотическим дефектам, приводящим к гибели клетки (Chen et al. 2007).

**Строение Dnmt1.** Молекула Dnmt1 состоит из большого N-концевого регуляторного участка и каталитического С-концевого домена, соединенных при помощи Gly-Lys-повторов (GK-мостик) (рис. 3). Большая, чем у прокариотических МТаз, молекулярная масса белка и наличие многочисленных регуляторных последовательностей позволяют предположить, что ген *Dnmt1* образовался путем слияния гена прокариотической ДНК-МТазы с одним или несколькими генами ДНК-связывающих белков.



Рис. 3. Доменное строение ДНК-МТазы 1. Указаны функциональные домены N-конца и консервативные для [C5-цитозин]-МТаз мотивы С-конца (I-X).

N-конец фермента состоит из нескольких функциональных доменов:

1. DMAP1 — домен, ответственный за связывание Dnmt1 с CpG-сайтом (Fatemi et al. 2001, Araujo et al. 2001), взаимодействующий с репрессором транскрипции Dmap1 (DNA methyltransferase associated protein 1) (Rountree et al. 2000) и поддерживающий стабильность Dnmt1 (Ding and Chaillet 2002).
2. PBD (PCNA binding domain) — участвует в связывании с PCNA (ядерный антиген пролиферирующей клетки) и обеспечивает перемещение фермента по направлению к репликационной вилке (Chuang et al. 1997).
3. NLS (nuclear localization signal) — сигнал ядерной локализации. N-концевая область белка содержит минимум три функциональных NLS-последовательности (Cardoso and Leonhardt 1999).
4. RFD (replication foci domain) — обеспечивает связывание Dnmt1 с репликационной вилкой (Leonhardt et al. 1992) и участвует в димеризации фермента (функция димера до конца не ясна) (Fellinger et al. 2009).
5. zf-CXXC (CXXC zinc finger domain) — этот домен, характерный для многих хроматин-связывающих белков, содержит восемь консервативных цистеиновых остатков в кластере из двух CXXCXXC повторов, которые



связывают два иона цинка. Он обеспечивает связывание Dnmt1 с неметилованными CpG-динуклеотидами и отвечает за каталитическую активность фермента (Pradhan et al. 2008).

6. ВАН1 и ВАН2 (Bromo-adjacent homology 1 and 2) образуют так называемый PBHD-домен (polybromo-homology domain). Домены такого типа имеются у некоторых белков, участвующих в регуляции транскрипции, и служат для обеспечения белок-белкового взаимодействия в процессе сайленсинга генов. Функциональная роль ВАН1 и ВАН2 в составе Dnmt1 не выяснена (Jurkowska et al. 2011).

7. GK-мостик соединяет N- и C-концевые области белка и состоит из нескольких повторов остатков глицина и лизина. Наличие таких повторов обеспечивает связь Dnmt1 с Z-ДНК и, возможно, необходимо для взаимодействия Dnmt1 с ДНК за пределами репликационной вилки (Lau et al. 2006).

8. С-концевой домен Dnmt1 содержит каталитический центр фермента. Однако он не проявляет каталитической активности в изолированном виде, даже при наличии всех аминокислотных мотивов, необходимых для метилирования (Fatemi et al. 2001, Margot et al. 2003).

**Экспрессия гена, кодирующего Dnmt1, и локализация фермента в клетке.** Высокий уровень экспрессии гена *Dnmt1* наблюдается во всех в пролиферирующих клетках, тогда как в неделящихся клетках его активность невысока (Robertson et al. 1999). Синтез мРНК *Dnmt1* имеет ярко выраженную зависимость от фазы клеточного деления, достигая максимума в S-период (Kimura et al. 2003).

Ядерная локализация Dnmt1 динамически изменяется в течение митотического цикла. Во время интерфазы фермент диффузно распределен в ядре. В ранней и средней S-фазе он перемещается в область репликационной вилки, воссоздавая паттерн метилирования клетки (Leonhardt et al. 1992, Easwaran et al. 2004). За перемещение Dnmt1 по направлению к репликационной вилке ответственны три домена белка: PBD (Chuang et al. 1997), RFT (replication foci

targeting domain, являющийся частью RFD домена) (Leonhardt et al. 1992) и PBHD (Liu et al. 1998). Однако делеция RFT или PBHD не влияет на доставку Dnmt1 к репликационной вилке (Easwaran et al. 2004), что указывает на ведущую роль PDB-домена в этом процессе. Кроме того, некоторое количество Dnmt1 остается связанным с центромерным гетерохроматином в поздней S- и G2-фазах даже после репликации гетерохроматина. Данное взаимодействие опосредовано RFD-доменом и возникает независимо от репликации ДНК (Easwaran et al. 2004).

**Изоформы Dnmt1.** Кроме базовой изоформы Dnmt1 (Dnmt1s), обнаруженной в большинстве соматических клеток, известны два тканеспецифичных варианта белка: Dnmt1o (ооцитарная Dnmt1) и Dnmt1p (пахитенная Dnmt1), встречающиеся, соответственно, в ооцитах и сперматоцитах (Mertineit et al. 1998). Dnmt1o человека характеризуется утратой 114 первых N-концевых аминокислот, содержащих DMAP1-домен. Эта изоформа более стабильна, чем Dnmt1 (Ding and Chaillet 2002), что объясняет накопление белка в цитоплазме в преимплантационный период и его последующую транслокацию в ядро после оплодотворения (Cardoso and Leonhardt 1999, Ratnam et al. 2002). Было показано, что соматическая изоформа Dnmt1 в малых количествах также присутствует в ядрах неоплодотворенных ооцитов и клеток неимплантированных эмбрионов (Kurihara et al. 2008). Примечательно, что Dnmt1o может полностью функционально заменить Dnmt1 в соматических клетках. Мыши, во всех соматических клетках которых экспрессируется ген *Dnmt1o* вместо *Dnmt1*, жизнеспособны, фенотипически нормальны и характеризуются нормальным уровнем метилирования генома (Ding and Chaillet 2002).

**Посттрансляционные модификации Dnmt1.** Dnmt1 является объектом таких посттрансляционных модификаций, как фосфорилирование, метилирование и сумоилирование — присоединение убиквитин-подобных модификаторов активности (Small Ubiquitin-like Modifier, SUMO). Основным сайтом фосфорилирования считается серин 515 (Glickman et al. 1997), в то время как в

клетках человека встречается также модификация серина 717, 958 и 1108 (Beausoleil et al. 2004, Olsen et al. 2006). Фосфорилированный остаток S515 N-концевой области участвует в регуляции функции каталитического домена, являясь необходимым компонентом активации ферментативных свойств Dnmt1 (Goyal et al. 2007). Функциональная значимость других сайтов фосфорилирования в настоящее время неизвестна. Сумоилирование Dnmt1 также приводит к активации фермента (Lee and Muller 2009). Кроме того, было показано, что Dnmt1 метилируется метилтрансферазой SET7/9 по остатку лизина. Данная модификация проявляется в отсутствии LSD1-деметиلاзы (Wang et al. 2009), что позволяет предполагать обратимый характер метилирования Dnmt1. Монометилирование лизина 142 приводит к протеосомальной деградации фермента (Esteve et al. 2009).

**Ферментативные свойства Dnmt1.** Dnmt1 проявляет до 30-40 раз большую активность в отношении полуметилированного субстрата, чем неметилированного (Jeltsch 2006), что характерно для МТазы, поддерживающей уровень метилирования в клетке (Fatemi et al. 2001, Goyal et al. 2006). Предпочтение полуметилированных CpG-сайтов обусловлено их специфическим взаимодействием с активным центром фермента, с последующими метилзависимыми конформационными изменениями белка, приводящими к его активации. Детальный механизм узнавания комплементарного метилцитозина в составе CpG-сайта до конца не изучен.

Dnmt1 воспроизводит паттерн метилирования клеточной ДНК после ее репликации. Фермент располагается на репликационной вилке, где может быстро модифицировать полуметилированные CpG-динуклеотиды. Dnmt1 является высокопроцессивным ферментом, способным метилировать протяженные участки ДНК без диссоциации (Vilkaitis et al. 2005, Goyal et al. 2006). Примечательно, что процессивное метилирование затрагивает только одну цепь ДНК, следовательно, фермент не меняет целевую цепь в процессе перемещения по ДНК (Hermann et al.



2004). Эти свойства помогают МТазе восстанавливать профиль метилирования ДНК до начала сборки хроматина.

Помимо каталитической активности Dnmt1, важную роль играет сродство фермента к определенным участкам ДНК, которое определяется различными факторами (Jeltsch 2008). Вначале было открыто прямое взаимодействие PBD-домена Dnmt1 и PCNA, являющегося важным компонентом репликационной вилки (Chuang et al. 1997). PCNA образует гомотримерное кольцо вокруг спирали ДНК и служит платформой для Dnmt1 в процессе восстановления метилирования ДНК при ее репликации. Однако данное взаимодействие является не единственным условием правильной локализации Dnmt1, что подтверждается в опытах *in vivo* с мутантной МТазой, не способной взаимодействовать с PCNA и характеризующейся снижением метилазной активности всего в два раза (Egger et al. 2006, Schermelleh et al. 2007). Показано, что PCNA необходим для ускорения посадки Dnmt1 на вновь синтезированную цепь ДНК, после чего фермент начинает линейное движение по субстрату. Тем временем, репликационная вилка продолжает синтез ДНК и взаимодействует с новой молекулой Dnmt1. Подобный циклический процесс позволяет значительно повысить эффективность реметилирования генома.

Впоследствии было описано взаимодействие Dnmt1 и белка UHRF1 (ubiquitin-like PHD and RING finger 1) (Bostick et al. 2007, Sharif et al. 2007). UHRF1 специфично связывается с полуметилированной ДНК своим SRA-доменом (Avvakumov et al. 2008, Hashimoto et al. 2008) и, таким образом, помечает в реплицированном гетерохроматине участки полуметилированной ДНК (Sharif et al. 2007). Ключевая роль UHRF1 в поддержании паттерна метилирования ДНК была подтверждена рядом экспериментов на животных. Нокаутирование генов *UHRF1* и *Dnmt1* у мышей имеет общие функциональные проявления: в обоих случаях в клетках эмбрионов, погибающих на стадии гастрюляции, происходит значительное снижение общего уровня метилирования ДНК (Sharif et al. 2007). Точно так же выключение гена *UHRF1* в стволовых клетках не приводит к потере

их жизнеспособности, несмотря на глобальное гипометилирование генома, но препятствует дальнейшей дифференцировке.

Помимо выполнения функции “поддерживающей” метилазы, Dnmt1 также обеспечивает метилирование *de novo* (Feltus et al. 2003, Jair et al. 2006). Подобная активность была показана *in vitro* в присутствии МТаз Dnmt3a и Dnmt3b. Dnmt1 завершает модификацию полуметилированного продукта реакции ферментов Dnmt3 (Fatemi et al. 2002).

Молекула Dnmt1 содержит множество ДНК-связывающих сайтов. Считается, что связывание N-концевых доменов с полуметилированной ДНК вызывает аллостерическую активацию фермента. Молекулярный механизм данной активации неизвестен, однако предполагается, что zf-CXXC-домен (Fatemi et al. 2001) и аминокислотные остатки 284–287 мышиной Dnmt1 (Pradhan and Esteve 2003) принимают активное участие в этом процессе. Связывание участка N-концевой части белка, включающего 501 аминокислотный остаток, с неметилированной ДНК оказывает ингибирующее влияние, снижая эффективность метилирования полуметилированного субстрата (Flynn et al. 2003, Svedruzic and Reich 2005a). Было показано, что каталитическая активность C-концевой области Dnmt1 напрямую зависит от аллостерического контроля со стороны N-концевого домена (Fatemi et al. 2001). Однако до конца не ясно, являются ли эффекты активации и ингибирования результатом взаимодействия ДНК с одними и теми же или с разными доменами белка. Интересно отметить, что все исследователи сходятся на том, что связывание с неметилированной ДНК приводит к снижению активности фермента, в то время как метилированная ДНК ее повышает. Этот факт позволяет предполагать, что паттерны метилирования генома характеризуются бимодальностью, то есть области ДНК, как правило, либо гиперметилированы, либо неметилированы вовсе (Meissner et al. 2008, Zhang et al. 2009). Бимодальность паттернов метилирования оказывает своего рода регуляторный эффект: аллостерическое взаимодействие неметилированной ДНК препятствует метилированию, в то время как полуметилированный субстрат стимулирует восстановление метильного профиля. Соответственно,

гиперметилированный паттерн стремится накапливать метилирование, а слабометилированная ДНК — избавляться от остаточного метилирования. Аллостерический контроль каталитического домена объясняет отсутствие ферментативной активности изолированного С-конца, несмотря на сильное сходство с прокариотическими МТазами и наличие всех консервативных метилтрансферазных мотивов (Bacolla et al. 2001, Fatemi et al. 2001). Было показано, что, кроме взаимодействия N- и С- концев, активность фермента значительно усиливает фосфорилирование серина 515 в N-домене за счет аллостерических процессов (Goyal et al. 2007). Функциональная роль аллостерического контроля N-концевого домена до конца не ясна, однако можно предположить, что именно благодаря ей происходит активация метилирования полуметилированной ДНК в S-фазе либо смена специфичности при метилировании *de novo*. Контроль подобного рода, возможно, обеспечивает защиту от спонтанного метилирования фрагментами С-домена, образующимися в результате протеолиза клеток.

### 1.1.2. Семейство ДНК-метилтрансфераз 3

Семейство ДНК-метилтрансфераз Dnmt3 у млекопитающих состоит из трех белков: Dnmt3a, Dnmt3b и Dnmt3L (Dnmt3-Like). Dnmt3a и Dnmt3b являются активными МТазами, ответственными за установление профиля метилирования на ранних стадиях развития организма. Dnmt3L каталитически неактивна и выступает в роле регуляторного фактора в зародышевых клетках. Dnmt3a и Dnmt3b традиционно относят к *de novo* ДНК-метилтрансферазам, так как их активность в отношении полуметилированной и неметилированной ДНК существенно не различается (Okano et al. 1998, Gowher and Jeltsch 2001). Помимо метилирования *de novo*, они также участвуют в воспроизведении профиля метилирования гетерохроматиновой ДНК (Chen et al. 2003, Jeong et al. 2009).

Нокаут генов *Dnmt3a* и *Dnmt3b* у эмбрионов мышей летален (Okano et al. 1999). Мутации в гене *Dnmt3b* у человека приводят к редкому аутосомному

заболеванию – ICF-синдрому (Okano et al. 1999, Hansen et al. 1999). В результате сниженной активности мутантного белка происходит специфическая потеря метилирования определенных областей ДНК, например, в прецентромерных регионах хромосом 1, 9 и 16.

Мыши с выключенным геном *Dnmt3L*, напротив, жизнеспособны и не имеют заметных отклонений в развитии (Hata et al. 2002). Тем не менее, такие самцы стерильны из-за нарушений сперматогенеза, вызванных реактивацией ретротранспозонов классов LINE-1 (long interspersed nuclear element 1) и IAP (intracisternal A particles) (Bourc'his and Bestor 2004, Webster et al. 2005). Самки с выключенным геном *Dnmt3L* остаются фертильными, но не могут дать жизнеспособное потомство из-за аномалий в развитии нервной трубки плода в результате нарушения импринтинга материнских генов (Bourc'his et al. 2001, Hata et al. 2002). Таким образом, роль белка Dnmt3L гендерспецифична: с одной стороны, он обеспечивает геномный импринтинг в ооцитах, с другой — сайленсинг ДНК повторов в спермиях.

**Строение МТаз семейства Dnmt3.** МТазы семейства Dnmt3 имеют структуру, сходную с Dnmt1: N-концевая регуляторная область, С-концевой каталитический домен, содержащий все консервативные мотивы [С5-цитозин]-МТаз, и участок Gly-Lys-повторов, соединяющий их (рис. 4).

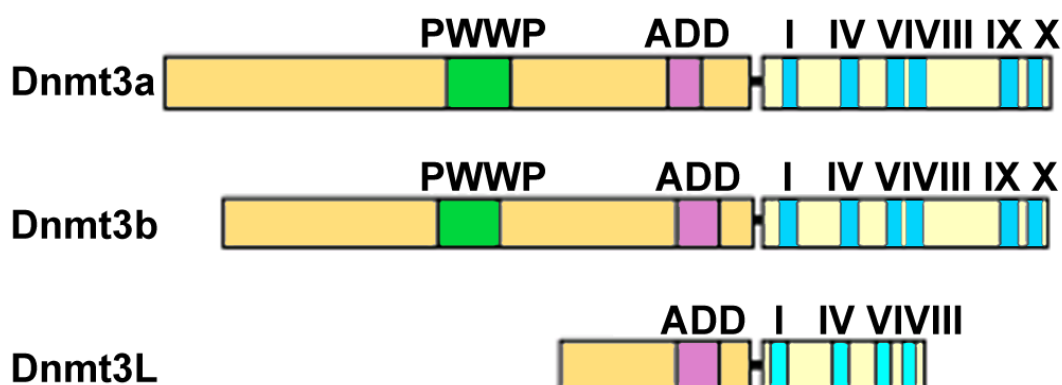


Рис. 4. Доменное строение ДНК-МТаз семейства Dnmt 3. Указаны функциональные домены N-концевой области и консервативные для [С5-цитозин]-МТаз мотивы С-концевого домена (I-X).

N-концевой участок Dnmt3a/3b значительно отличается от аналогичного фрагмента Dnmt1 по размерам и структуре. В его составе выделяют две области: цистеин-богатый ADD- (ATRX-DNMT3-DNMT3L) домен, также известный как PHD- (plant homeodomain) домен, и PWWP-домен. PWWP-домен отсутствует в Dnmt3L, которая также лишена МТазных мотивов IX и X, а также всех важных каталитически активных аминокислотных остатков в С-концевом домене.

ADD-домен связывает ионы цинка и обеспечивает многие белок-белковые взаимодействия, например, он опосредует связывание Dnmt3a с фактором транскрипции PU.1 (Suzuki et al. 2006), Мус (Brenner et al. 2005), RP58, гистоновой деацетилазой HDAC1 (Fuks et al. 2001), гетерохроматиновым белком HP1, гистоновыми метилтрансферазами SUV39H1 (Fuks et al. 2003), SETDB1 (Li et al. 2006) и EZH2 (Vire et al. 2006), метил-CG-связывающим белком Mbd3 и фактором ремоделирования хроматина Brg1 (Datta et al. 2005). Дополнительно ADD-домен обеспечивает связь с N-концевой частью гистона H3, которая блокируется метилированием лизина 4 гистона H3 (Otani et al. 2009, Zhang et al. 2010). Данное взаимодействие стимулирует метилирование ДНК в составе хроматина МТазой Dnmt 3a (Zhang et al. 2010). Таким образом, наличие или отсутствие метилирования K4 в гистоне является своеобразной хроматиновой меткой для *de novo* МТаз.

PWWP-домен в Dnmt3a и Dnmt3b является слабоконсервативным регионом длиной 100-150 аминокислотных остатков, содержащих консервативный пролин-триптофановый мотив (отсюда и название PWWP). Схожий домен был найден более чем в 20-ти человеческих белках, большинство которых ассоциировано с хроматином. PWWP-домены МТаз Dnmt3a и Dnmt3b необходимы для связывания ферментов с прецентромерным хроматином (Chen et al. 2004, Ge et al. 2004), хотя данный механизм до конца не изучен. Недавно было показано, что PWWP-домен Dnmt3a специфично распознает триметилированный H3K36, что приводит к направленному метилированию нуклеосомной ДНК (Zhang et al. 2010), которое можно рассматривать как еще одну хроматиновую метку.

**Экспрессия генов, кодирующих МТазы семейства Dnmt3, и локализация ферментов в клетке.** Экспрессия генов *Dnmt3a* и *Dnmt3b* активно осуществляется в эмбриональных и недифференцированных стволовых клетках и снижается в процессе клеточной дифференцировки. Белок Dnmt3a образуется в большинстве тканей, в то время как его более короткая изоформа Dnmt3a2 синтезируется только в эмбриональных клетках (стволовые клетки и клетки эмбриональной карциномы, селезенки и тимуса) (Chen et al. 2002, Weisenberger et al. 2004).

В ядрах клеток млекопитающих МТазы семейства Dnmt3 стабильно связаны с прецентромерным хроматином, содержащим метилированную ДНК (Jeong et al. 2009), включая хромосомы в митозе (Ge et al. 2004, Chen et al. 2004). Домен PWWP, расположенный в N-концевой области белков Dnmt3a и Dnmt3b, определяет сродство ферментов к хроматину (Ge et al. 2004, Chen et al. 2004). Локализация Dnmt3L зависит от взаимодействия с Dnmt3a и Dnmt3b. В их отсутствии Dnmt3L диффузно располагается в ядре и цитоплазме клетки, а при активации синтеза Dnmt3a и Dnmt3b начинает концентрироваться в участках хроматина (Nimura et al. 2006).

**Изоформы МТаз семейства Dnmt3.** Для Dnmt3a и Dnmt3b описано несколько изоформ. Белок Dnmt3a2 является укороченной (на 233 аминокислотных N-концевых остатка) формой Dnmt3a, образующейся в результате транскрипции с альтернативного интронного промотора. (Weisenberger et al. 2004).

У Dnmt3b выявлены шесть основных изоформ (Robertson et al. 1999, Xie et al. 1999). Dnmt3b1 транслируется с полной мРНК. Dnmt3b2 образуется в результате альтернативного сплайсинга экзонов 10 и 11 в N-концевой части белка. Dnmt3b3 и Dnmt3b6 содержат консервативные мотивы I, IV, VI и X в каталитическом домене, но у них отсутствуют мотивы VII, VIII и часть мотива IX. Кроме этого, ген *Dnmt3b3* не имеет экзонов 10 и 11 в регуляторном домене. Dnmt3b4 и Dnmt3b5 являются белками с усеченными мотивами IX и X, в их генах

также отсутствуют экзоны 10 и 11. Изоформы 1 и 2 каталитически активны, тогда как остальные варианты не проявляют метилтрансферазной активности из-за делеций в каталитическом домене.

Кроме вышеперечисленных, было открыто новое подсемейство изоформ Dnmt3b, названное DDnmt3b, в клетках немелкоклеточного рака легких (Vakos et al. 2006). Изоформа DDnmt3b образуется в результате транскрипции с промотора, обнаруженного вблизи экзона 5. Синтезирующийся затем белок оказывается короче на 200 аминокислот с N-конца, чем Dnmt3b1.

Функция каталитически неактивных изоформ Dnmt3b до конца не ясна, хотя предполагается, что они участвуют в регуляции и направленности метилирования, подобно Dnmt3L (Saito et al. 2002, Weisenberger et al. 2004).

**Посттрансляционные модификации МТаз семейства Dnmt3.** Регуляция МТаз семейства Dnmt3 при помощи посттрансляционных изменений в данный момент не достаточно изучена. В литературе описано только сумоилирование N-концевых доменов белков Dnmt3a (Ling et al. 2004, Li et al. 2007) и Dnmt3b (Kang et al. 2001). Сумоилирование Dnmt3a нарушает способность к связыванию с гистоновыми деацетилазами и подавляет транскрипцию (Ling et al. 2004), назначение сумоилирования Dnmt3b остается неизвестным.

**Ферментативные свойства МТаз семейства Dnmt3.** Каталитические домены Dnmt3a и Dnmt3b сходны по структуре на 85 % и, в отличие от Dnmt1, могут проявлять активность в изолированном виде (Gowher and Jeltsch 2002). Третий член семейства — Dnmt3L, несмотря на высокую гомологию с первыми двумя, не способен связываться с AdoMet и проявляет очень слабое сродство к ДНК (Gowher et al. 2005, Kareta et al. 2006). Тем не менее, Dnmt3L взаимодействует с Dnmt3a и Dnmt3b (Hata et al. 2002), напрямую связываясь с каталитическим доменом и стимулируя активность обоих ферментов как *in vivo* (Chedin et al. 2002, Chen et al. 2005) так и *in vitro* (Suetake et al. 2004, Gowher et al. 2005, Kareta et al. 2006). Предположительно обуславливая конформационные

изменения, повышающие сродство к ДНК и AdoMet, а также увеличивая каталитическую активность (Gowher et al. 2005, Jia et al. 2007), Dnmt3L действует как положительный регулятор *de novo* МТаз.

Dnmt3a и Dnmt3b метилируют цитозиновые остатки в составе CpG-динуклеотидов, хотя в исследованиях *in vitro* и *in vivo* была показана их способность к модификации цитозина в других комбинациях: CpA (Lister et al. 2009, Laurent et al. 2010), CpT и в меньшей степени CpC (Ramsahoye et al. 2000, Gowher and Jeltsch 2001). Биологическая значимость не-CpG-метилирования в настоящее время неясна. Dnmt3a и Dnmt3b обладают сильным сродством к CpG-сайтам, фланкированным с 5'-конца пуриновыми, а с 3'-конца — пиримидиновыми остатками (Lin et al. 2002, Handa and Jeltsch 2005). Комплекс Dnmt3a/Dnmt3L предпочитает сайты, периодически повторяющиеся через 8-10 п.о. (Jurkowska et al. 2008, Lister et al. 2009). Подобное расположение CpG-сайтов обнаружено в регуляторных элементах 12 генов, характеризующихся материнским импринтингом (Jia et al. 2007). Дополнительно было показано, что в гиперметилированных регионах ДНК сайты узнавания МТаз повторяются через 9, 18 и 27 нуклеотидов (Zhang et al. 2009).

## 1.2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Для ДНК млекопитающих характерно С5-метилирование остатков цитозина, локализованных преимущественно в составе CpG-динуклеотидов. В человеческом геноме насчитывается около 56 миллионов CpG-сайтов, из которых 60-80 % метилированы, что составляет 4-6 % всех цитозиновых оснований в ДНК (Lister et al. 2009, Laurent et al. 2010). Кроме этого, недавно был обнаружен 5-гидроксиметилцитозин, образующийся в результате окисления метильной группы 5-метилцитозина (Kriaucionis and Heintz 2009, Tahiliani et al. 2009). В целом, количество CpG-динуклеотидов в геноме в 5-10 раз меньше в сравнении с другими типами динуклеотидов по причине высоких мутагенных свойств 5-



метилцитозина. Его гидролитическое дезаминирование приводит к образованию тимина и формированию ТрG-динуклеотида (Pfeifer et al. 2000). В то же время, дезаминирование неметирированного цитозина и превращение его в урацил происходит в 2-4 раза реже (Shen et al. 1994). Система репарации ДНК с участием урацил-ДНК-гликозилазы эффективно устраняет УрG-замены. Напротив, вероятность закрепления ТрG-мутаций достаточно высока, что способствовало сокращению числа СрG-сайтов в процессе молекулярной эволюции. Распределение СрG-динуклеотидов в геноме неравномерно: снижение их числа наблюдается в межгенных и внутригенных пространствах, в то время как в повторяющихся последовательностях ДНК (например, транспозонных, ретровирусных) и СрG-островках их количество практически не меняется. СрG-островки представляют собой области ДНК длиной минимум 550 п.н. с GC-составом > 65 % (Takai and Jones 2004). Они встречаются в промоторах около 70 % человеческих генов, включая большинство генов домашнего хозяйства и тканеспецифичных генов. (Weber et al. 2007, Schilling and Rehli 2007).

Метилирование ДНК в клетках человека связано со следующими ключевыми процессами (Smith and Meissner 2013):

#### **а) Регуляция экспрессии генов**

Строгий контроль экспрессии генов является необходимым условием для нормального протекания всех процессов жизнедеятельности клетки. Кратковременное изменение уровня активности генов в основном происходит под воздействием факторов транскрипции, тогда как долговременная регуляция обеспечивается комплексным влиянием ремоделирования хроматина, модификации ДНК-связанных гистонов, локализации хромосом в ядре, регуляторных РНК и, не в последнюю очередь, паттерна метилирования ДНК (Fullgrabe et al. 2011, Meister et al. 2011). В большинстве экспрессирующихся генов наблюдается гипометилирование вблизи сайта инициации транскрипции и гиперметилирование тела гена, напрямую зависящее от активности его экспрессии (Lister et al. 2009, Laurent et al. 2010). Предполагается, что метилирование тела гена носит регуляторный характер, препятствуя образованию

укороченных мРНК и белков с неспецифических точек инициации транскрипции. Кроме того, уровень метилирования меняется в участках сплайсинга РНК: экзоны являются более метилированными, чем интроны (Hodges et al. 2009, Laurent et al. 2010).

#### **б) Геномный импринтинг**

Сущность геномного импринтинга заключается в том, что некоторые гены экспрессируются только с материнских или только с отцовских хромосом. Данный процесс регулируется метилированием соответствующих материнских или отцовских аллелей (Ferguson-Smith 2011).

#### **в) Инактивация X-хромосомы**

Метилирование ДНК вовлечено в инактивацию одной X-хромосомы у женщин, что приводит к функциональному равенству X-хромосом в мужском и женском организме (Chow et al. 2005).

#### **г) Поддержание целостности генома**

Паразитические элементы в геноме, такие как ретротранспозоны, инактивируются при метилировании их последовательностей, что обеспечивает целостность генома клетки (Maksakova et al. 2008).

#### **Формирование профиля метилирования ДНК у млекопитающих.**

Паттерн метилирования ДНК устанавливается на ранних стадиях эмбрионального развития организма. После оплодотворения в зиготе происходит интенсивное перепрограммирование генома для приобретения клеткой тотипотентности (Reik et al. 2001, Morgan et al. 2005). На этой стадии наблюдается обширное деметилирование генома, не затрагивающее импринтированные гены и некоторые транспозоны. Ко времени имплантации эмбриона МТазы семейства Dnmt3 устанавливается новый паттерн метилирования, который затем поддерживается в течение всей жизни организма (Lees-Murdock and Walsh 2008, Popp et al. 2010). Вторая волна метилирования *de novo* протекает в первичных половых клетках и является важнейшим условием правильного импринтинга генов в гаметах (Lees-Murdock and Walsh 2008, Popp et al. 2010). Молекулярные механизмы,

обеспечивающие формирование картины метилирования, до конца не исследованы. Сродство МТаз Dnmt3a и Dnmt3b к CpG-динуклеотидам невысоко, что указывает на необходимость их взаимодействия с другими белками.

**Метилирование ДНК и модификация хроматина.** Ремоделирование хроматина может определять, какие области ДНК будут метилированы или деметилированы, а какие нет. Это происходит из-за снижения доступности метилированных ДНК-связанных белков. Было показано, что активность МТаз много ниже в отношении нуклеосомального субстрата, чем “голой” ДНК (Gowher et al. 2005). Так, присоединение гистона H1 значительно ингибирует реакцию метилирования (Takeshima et al. 2008). Однако существуют модификации гистонов, специфически направляющие МТазы к определенным участкам ДНК. Так, например, неметилированный H3K4 (Otani et al. 2009, Zhang et al. 2010) и/или триметилированный H3K36 (Dhayalan et al. 2010) существенно повышают сродство фермента к ДНК, способствуя ее метилированию. Метилирование гистона H3 по лизину 4 является хроматиновой меткой, сопутствующей активным генам, а, значит, ее утрата расценивается как сигнал об инактивации гена (Hodges et al. 2009, Laurent et al. 2010). Хроматиновая метка H3K36me3, которая также служит активатором метилирования ДНК, присутствует в телах активных генов (Larschan et al. 2007, Edmunds et al. 2008), локализуясь преимущественно на стыке интронов и экзонов (Hodges et al. 2009, Laurent et al. 2010), что указывает на ее регуляторную функцию при сплайсинге.

**Поддержание профиля метилирования ДНК.** Однажды установленный профиль метилирования клеточной ДНК должен сохраняться неизменным в течение всей жизни организма. В процессе репликации ДНК полимеразы синтезируют новую неметилированную цепь, образуя тем самым полуметилированную двуцепочечную ДНК, которая, в свою очередь, является наиболее предпочтительным субстратом для Dnmt1. Таким образом, классическая модель поддержания профиля метилирования ДНК в клетке предполагает

ключевую роль Dnmt1 в процессе воспроизводства паттерна метилирования ДНК после каждого раунда репликации (Riggs 1975, Holliday and Pugh 1975).

Любое нарушение метилирования ДНК — ключевого регуляторного механизма эукариотических клеток — приводит к развитию ряда серьезных заболеваний. Например, неполная инактивация X-хромосомы у женщин способствует проявлению X-сцепленных рецессивных расстройств (Puck and Willard 1998). Мутации в генах MТаз, приводящие к нарушениям экспрессии генов, становятся причиной ICF-синдрома (Immunodeficiency — иммунодефицит, Centromere instability — нестабильность гетерохроматина, Facial abnormalities — нарушение строения лица) (Gibbons et al. 2000, Jin et al. 2008). Кроме того, аномальное метилирование ДНК может лежать в основе аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит (Liu et al. 2013). Следует упомянуть также последствия нарушений импринтинга генов — синдром Прадера-Вилли и синдром Ангельмана, связанные с потерей функций в регионе 15q11-q13 отцовского и материнского аллелей, соответственно. Синдром Прадера-Вилли характеризуется гипотонией, пониженным аппетитом, когнитивными расстройствами, истерическим поведением и гипогонадизмом. Для синдрома Ангельмана характерна значительная задержка развития, отсутствие речи, атаксия и специфические приступы хохота (Ramsden et al. 2010).

Нарушение паттерна метилирования ДНК является одной из отличительных характеристик раковых клеток (Jones and Baylin 2007). Большое количество работ описывают репрессию генов-супрессоров опухолей (ГСО), ответственных за различные регуляторные процессы (такие как регуляция клеточного цикла, апоптоза или поддержание целостности генома), путем гиперметилирования ДНК в регуляторных районах генов. Несмотря на локальное гиперметилирование, раковые клетки характеризуются тотальным гипометилированием, приводящим к нестабильности генома и реактивации «выключенных» генов (Jones and Baylin 2007, Berdasco and Esteller 2010). Причины такого парадокса до сих пор неясны. Считается, что аберрантное метилирование может возникать независимо от наличия или отсутствия генетических мутаций, в результате ошибок регуляции

механизма метилирования (так называемые эпимутации) (Martin et al. 2011), причиной которых могут быть факторы окружающей среды, например диета (Waterland and Jirtle 2003). Недавние исследования показали, что гиперметилирование промотора гена увеличивает вероятность гиперметилирования промоторов соседних генов (De et al. 2013). Важно отметить, что подобное изменение профиля метилирования ДНК раковой клетки может быть формой ее физиологической адаптации, непосредственно не связанной с канцерогенезом. В целом, вопрос aberrантного метилирования в опухолевых клетках имеет два аспекта: ассоциированные с канцерогенезом эпимутации, такие как гиперметилирование промоторов ГСО, и изменения, носящие приспособительный характер (Kalari and Pfeifer 2010).

Наиболее частой эпигенетической причиной злокачественной трансформации клетки является гиперметилирование промотора ГСО, ведущее к снижению уровня экспрессии соответствующего гена. В норме гиперметилирование промотора является важным элементом, препятствующим его взаимодействию с факторами транскрипции в случае спонтанной мутации в регулируемом гене: экспрессия гена прекращается на время, необходимое системе репарации ДНК на устранение ошибки (Esteller 2002, Jin and Robertson 2013). При сбоях данного механизма происходит накопление мутаций и увеличивается риск злокачественного перерождения клетки.

Охарактеризован ряд генов, гиперметилирование промоторов которых предшествует злокачественному перерождению клеток. Примером может служить ген *MLH1*, регулирующий репарацию неспаренных нуклеотидов (Gazzoli et al. 2002, Dobrovic and Kristensen 2009). Гиперметилирование генов *hMLH1* и *MGMT*, а также *miR-148a* характерно для ранних стадий разных видов рака поджелудочной железы (House et al. 2003, Hanoun et al. 2010). Нарушение метилирования ДНК гена *hMLH1* было описано как предвестник развития рака желудка (Lee et al. 2004), а гиперметилирование промотора *GSTP1* является прогностическим маркером для рака простаты (Brooks et al. 1998).

**Нарушение экспрессии генов МТаз.** Избыточная экспрессия гена *Dnmt1* также может быть расценена как предраковое состояние. Глобальные нарушения паттерна метилирования при раке очень часто связаны с нарушениями экспрессии генов МТаз, что было показано для опухолей поджелудочной железы, прямой кишки, молочной железы, острого и хронического лейкозов и многих других онкопатологий (Mizuno et al. 2001, Girault et al. 2003). Даже незначительное повышение уровня экспрессии генов МТаз в пренеопластический период приводит к изменению профиля метилирования клеточной ДНК (Sato et al. 2008). Связь данного явления с канцерогенезом остается малоизученной. Было установлено, что некоторые типы рака отличает дупликация гена *Dnmt3b*, что приводит к увеличению образования мРНК и белка (Simo-Riudalbas et al. 2011). Избыточный синтез МТазы *Dnmt3b* в клетках карциномы прямой кишки линии RKO обусловлен повышением стабильности кодирующей ее мРНК (Lopez, I et al. 2009). Также считается, что активация синтеза МТаз может быть обусловлена перестройкой эпигенома при канцерогенезе: нарушается режим активности генов МТаз вследствие установления ошибочных метильных меток и несвоевременной инициации экспрессии в результате неспецифического взаимодействия белков с такими метками (Robertson et al. 1999).

**Эпигенетические онкомаркеры.** В отношении многих генов была выявлена закономерная связь их аномального метилирования с развитием опухолей определенного типа. Некоторые из них используются в качестве маркеров коммерческих тест-систем на выявление онкозаболеваний, например, *SEPT9*, *MGMT*, *MLH1* и *SHOX2*. Далее приводится информация о генах, исследованных в настоящей работе, для которых описано aberrантное метилирование регуляторных областей при карциноме шейки матки.

***CDKN2A*.** Ген-регулятор клеточного цикла *CDKN2A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor, циклин-зависимый ингибитор киназ), или *P16<sup>ink4</sup>*, несет множество функций ГСО. Он ингибирует формирование активного транскрипционного комплекса E2F-DB и стимулирует образование

ингибиторного комплекса Rb-E2F. В результате блокируется E2F-зависимая транскрипция и происходит остановка клеточного цикла на стадии перехода G<sub>1</sub>/S (Rocco and Sidransky 2001). *CDKN2A* гиперметилован в большом количестве опухолей: при раке прямой кишки — в 27 %, раке печени — в 59 %, раке легких — в 24 % и в клетках карциномы шейки матки — в 20 % случаев (Belinsky et al. 1998, Wong et al. 1999, Rocco and Sidransky 2001, Zou et al. 2002, Qiang et al. 2012).

***DAPK*.** Ген апоптоза *DAPK* (Death-associated protein kinase, ассоциированная с апоптозом протеинкиназа 1) был открыт в 1995 году (Deiss et al. 1995). Кодированный им белок является актин-ассоциированным, кальций/кальмодулин-зависимым ферментом с выраженной серин/треонин-протеинкиназной активностью (Cohen et al. 1997). Являясь ГСО, *DAPK* подавляет рост опухолей и процесс метастазирования, инициируя апоптотическую гибель клеток (Inbal et al. 1997). Инактивирование гена *DAPK* путем гиперметилования его промотора часто встречается в опухолях различных типов, что позволяет рассматривать его в качестве онкомаркера (Dong et al. 2001, Narayan et al. 2003, Yang et al. 2004, Kang et al. 2006, Wisman et al. 2006, Shivapurkar et al. 2007, Henken et al. 2007).

***MGMT*.** Белок системы репарации ДНК *MGMT* (O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA-Methyltransferase, O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза) является важным элементом поддержания целостности генома. Способствует удалению минорных оснований ДНК путем одностадийной реакции переноса метильной или хлорэтильной группы в активный центр молекулы фермента, в результате чего происходит восстановление позиции гуанина в цепи ДНК и необратимая инактивация *MGMT*. Из-за подобного механизма действия *MGMT* часто называют “ферментом-смертником” (Kaina et al. 2010). Роль этого белка в канцерогенезе двойственна: с одной стороны, его дефицит увеличивает вероятность появления мутаций ДНК, с другой — гиперэкспрессия гена *MGMT* также ведет к малигнизации клетки, что было показано для многих видов рака, устойчивых к химиотерапии. Гиперметилование его промотора встречается у 40 % пациентов с опухолями мозга (Esteller et al. 2000) и в 46 % случаев карцином прямой кишки (Shen et al. 2005). При раке шейки матки его частота варьирует от 5

до 81 % (Virmani et al. 2001, Narayan et al. 2003, Kang et al. 2005, Zambrano et al. 2005).

***RARB***. Белок *RARB* (**R**etinoic **a**cid **r**eceptor **b**eta, рецептор ретиноевой кислоты  $\beta$ ) связывает ретиноевую кислоту, биологически активную форму витамина А, которая участвует в процессах эмбрионального морфогенеза, клеточного роста и дифференциации. *RARB* ограничивает рост множества типов клеток. Снижение экспрессии гена *RARB* вследствие гиперметиличирования промотора было впервые открыто в клетках рака молочной железы и прямой кишки, а в дальнейшем описано и для множества других типов злокачественных опухолей (Widschwendter et al. 2000). *RARB* играет важную роль в развитии аденокарцином шейки матки, так как ретиноевая кислота ингибирует злокачественную трансформацию кератиноцитов под воздействием вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов (Khan et al. 1993, Meyskens, Jr. et al. 1994). Частота метилирования *RARB* варьирует в зависимости от стадии заболевания: от 11-29 % в пренеопластический период до 33-63 % при инвазивном раке (Ivanova et al. 2002, Narayan et al. 2003, Feng et al. 2005, Zambrano et al. 2005).

***RASSF1***. Ген *RASSF1* (The RAS association domain family 1, ген белка, содержащего домен, гомологичный онкогену *ras*, семейства 1) имеет два основных варианта: *RASSF1A* и *RASSF1C*, которые транскрибируются с разных промоторов. Аберрантное метилирование промотора гена и снижение его экспрессии было описано для многих видов рака (Qiang et al. 2012). Белок *RASSF1A* активно участвует в формировании веретена деления, поддержании стабильности генома, регуляции клеточного цикла, апоптоза, подвижности клеток и многих других процессов, выступая негативным Ras-эффектором, ингибирующим клеточный рост и вызывающим гибель клетки (Vos et al. 2000, Shivakumar et al. 2002, Liu et al. 2003, Vos et al. 2004, Whang et al. 2005, Dallol et al. 2005, Vos et al. 2006, Donninger et al. 2007, Matallanas et al. 2007). Изучение эпигенетического статуса этого гена у больных раком шейки матки выявило метилирование промотора в 30 % случаев опухолей, неассоциированных с ВПЧ,



тогда как в клеточных линиях ВПЧ-ассоциированных карцином гиперметилирование *RASSF1A* не встречается (Cohen et al. 2003, Kuzmin et al. 2003, Yu et al. 2003, Kang et al. 2005). Низкая встречаемость метилирования промотора *RASSF1A* в клетках ВПЧ-негативных опухолей позволяет предположить взаимодействие ВПЧ и *RASSF1A* в процессе малигнизации клеток (Cohen et al. 2003, Kang et al. 2007, Lai et al. 2007).

### **1.3. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ СИСТЕМЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК**

Изучение системы метилирования ДНК и функциональной роли ее отдельных компонентов осуществляется преимущественно по двум направлениям: выяснение функций белков-эффекторов путем нокаута кодирующих их генов и определение статуса метилирования ДНК в различных клетках на разных этапах клеточного цикла. Данный раздел посвящен обзору существующих методов для определения наличия метилцитозина в исследуемой ДНК, а также описанию их сильных сторон и недостатков с точки зрения применимости их для достижения цели настоящей работы.

За последние сорок лет ученые получили возможность перейти от количественного определения содержания остатков 5-метилцитозина в ДНК такими методами, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (Singer et al. 1977), высокоэффективный капиллярный электрофорез (Fraga et al. 2000) или анализ “ближайших соседей” (Ramsahoye 2002), к подробному анализу их локализации в геноме. Определение паттерна метилирования ДНК в определенной последовательности нуклеотидов встречает ряд трудностей, главной из которых является невозможность в ходе полимеразной цепной реакции восстанавливать позиции метилцитозина во вновь синтезированных копиях ДНК. Современные методы анализа можно разделить на три категории в зависимости от способа решения данной проблемы.

### **1.3.1. Методы, основанные на применении 5-метилцитозин-специфичных антител**

Антитела, специфичные к метилцитозину, были открыты в восьмидесятые годы XX века (Adouard et al. 1985), благодаря чему стало возможным детектировать метилирование ДНК, используя методы иммунофлюоресценции (Santos et al. 2002) и иммунопреципитации. Иммунопреципитация позволяет обогатить исследуемый образец метилированными ДНК и провести последующий анализ полноразмерного генома на микрочипах (Mohn et al. 2009) или в реакции секвенирования нового поколения (NGS, next-generation sequencing) (Down et al. 2008).

### **1.3.2. Методы, основанные на бисульфитной конверсии ДНК**

М. Фроммер с соавторами впервые обнаружили, что обработка ДНК бисульфитом натрия приводит к дезаминированию неметилованных цитозиновых оснований с образованием урацила, в то время как остатки метилцитозина остаются интактными (Frommer et al. 1992). После проведения ПЦР и последующего секвенирования по Сэнгеру были получены секвенограммы, содержащие цитозин в позициях, соответствующих метилцитозину в исходной ДНК, и тимин (замещающий урацил в ПЦР) в участках локализации неметилованных остатков цитозина.

В настоящее время используется множество методов на основе бисульфитной конверсии ДНК. Например, анализ такой ДНК с помощью NGS позволяет, наряду с иммунопреципитацией, анализировать картину метилирования генома в целом (Cokus et al. 2008). Анализ специфических локусов обычно проводят при помощи ПЦР с использованием метилнеспецифичных или метилспецифичных праймеров.

**Метилнеспецифичные праймеры** гибридизуются как с метилированной, так и с неметилованной ДНК, а статус метилирования определяется в другой

независимой реакции (Herman et al. 1996). Эта вторая реакция направлена на то, чтобы отличить цитозин (метилцитозин исходной ДНК) от тимина (неметилированного цитозина исходной ДНК). При использовании соответствующих стандартов практически любой из нижеперечисленных методов можно превратить в количественный, однако чувствительность к малым количествам метилированной ДНК у них существенно отличается.

В качестве второй реакции может выступать секвенирование предварительно клонированных фрагментов с терминирующими дидезоксирибонуклеотидами (метод Сэнгера), позволяющее проанализировать статус метилирования всей амплифицированной области ДНК (Frommer et al. 1992). Данный метод привлекает объемом получаемых данных, но получение достоверных результатов возможно только при условии, что метилированные последовательности ДНК составляют не менее 20 % от общего числа копий и при анализе не менее десяти клонов (Shen and Qin 2012). Применение пиросеквенирования позволяет определять метилцитозин при наличии 5 % метилированной ДНК (White et al. 2006), в то время как при помощи NGS можно проанализировать метилирование всех цитозиновых оснований в геноме за короткое время.

Конверсия цитозина в тимин в процессе обработки бисульфитом натрия приводит к изменению температур плавления ПЦР-продуктов. На таком принципе базируется метод MS-MCA (Methylation-Sensitive Melting Curve Analysis) и его усовершенствованная версия MS-HRM (Methylation-Sensitive High-Resolution Melting). Так, исходно метилированная ДНК будет иметь более высокую температуру плавления из-за большего содержания GC-динуклеотидов. Это может учитываться при анализе кривых плавления ампликонов в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Worm et al. 2001). Флуоресценция SYBR Green I будет угасать в процессе нагревания образца по мере диссоциации двуцепочечной ДНК, таким образом, GC-богатая ДНК будет флуоресцировать дольше. Предел определения для данного метода составляет около 5 % метилированной ДНК в образце (Kristensen and Hansen 2009). Однако применение

этого подхода может быть затруднительным в случае значительной гетерогенности паттерна метилирования амплифицируемой области.

Кроме вышеперечисленных методов, возможно использование гибридного метода HeavyMethyl (Cottrell et al. 2004), использующего метилспецифичные и метилнеспецифичные праймеры. Основная реакция (ПЦР) идет с метилнеспецифичных праймеров с TaqMan-зондом, однако в реакционной смеси присутствуют еще два олигонуклеотида, высокоспецифичных к неметилированной ДНК и неспособных к элонгации. Они блокируют ПЦР с неметилированной ДНК и, в результате, рост флуоресцентного сигнала означает наличие метилированной ДНК в исследуемом образце (Kristensen and Hansen 2009). Описанный метод позволяет достоверно выявить в реакционной смеси одну метилированную молекулу ДНК на 1600 неметилированных (Cottrell et al. 2004).

Существует также ряд методов, которые позволяют оценивать статус метилирования единичных оснований цитозина. К ним относятся: COBRA (COmbined Bisulfite Restriction Analysis), основанный на появлении сайтов для эндонуклеаз рестрикции после конверсии, что дает возможность после метилнеспецифичной ПЦР гидролизовать ампликон рестриктазами, провести электрофорез продуктов гидролиза и осуществить количественный анализ данных; MS-SnuPE (Methylation-Sensitive Single-Nucleotide Primer Extension), использующий наработанный в ходе метилнеспецифичной ПЦР ампликон в качестве матрицы для гибридизации праймера рядом с изучаемым основанием, затем происходит однократное включение в синтезируемую цепь ДНК меченного  $^{32}\text{P}$ -цитозина или  $^{32}\text{P}$ -тимина, а детекция результата осуществляется с помощью электрофореза апличионов и автордиографии; и MALDI-TOF (Mass Spectrometry With Base-Specific Cleavage And Primer Extension), который включает синтез РНК, комплементарной продукту метилнеспецифичной ПЦР, гидролиз РНК РНКазой А с последующей масс-спектрометрией продуктов гидролиза, позволяющей дифференцировать РНК, синтезированную с метилированной и

неметилированной ДНК, и тем самым определить положение метилцитозина в исследуемом ампликоне (Kristensen and Hansen 2009).

**Метилспецифичные праймеры** в ПЦР позволяют амплифицировать только метилированную ДНК. Следовательно, наработка продукта свидетельствует о том, что исследуемый локус метилирован хотя бы частично. Использование таких праймеров лежит в основе метилчувствительной ПЦР (MSP, Methyl-Sensitive PCR) с электрофоретической детекцией результата. Данный метод прост в постановке и не требует специального оборудования (Herman et al. 1996). Однако MSP в таком варианте является только качественным методом с детекцией результата по конечной точке, к тому же двустадийным (ПЦР и электрофорез), что увеличивает как время анализа, так и вероятность допущения ошибки со стороны исследователя. Для решения данных проблем был разработан метод qMSP (quantitative Methyl-Sensitive PCR), который позволяет детектировать результат в режиме реального времени (с использованием соответствующего амплификатора) и оценивать количество метилированной ДНК, взятой в реакцию. Примером qMSP является MethyLight-анализ (Eads et al. 2000): ПЦР с деградируемым флуоресцентным зондом, аналогом TaqMan-зонда. Также возможно использовать интеркалирующий краситель SYBR Green I для детекции накопления продукта реакции, что помогает избавиться от необходимости синтезировать зонды, но снижает специфичность метода за счет привноса флуоресценции с неспецифически амплифицируемых участков ДНК (Chan et al. 2004, Arya et al. 2005).

Для qMSP тоже разработаны методы оценки паттерна метилирования ДНК на основе анализа кривой плавления: McMSP (melting curve MSP) и его усовершенствованный вариант SMART-MSP (Sensitive Melting Analysis After Real-time MSP), а также MS-FLAG (Methylation-Specific Fluorescent Amplicon Generation), основанный на том, что один из праймеров для MSP несет флуорофор и тушитель флуоресценции, а между ними — сайт узнавания для термостабильной рестриктазы *PspGI*, которая гидролизует двуцепочечную ДНК,

т.е. ампликоны, образующиеся в результате ПЦР, что приводит к флуоресценции реакционной смеси (Kristensen and Hansen 2009).

Независимо от формата детекции, MSP-методы могут давать ложноположительные результаты за счет неспецифичного отжига праймеров. При этом повышение температуры отжига в целях увеличения специфичности сопровождается потерей чувствительности метода. Оптимальным вариантом MSP является использование не только метилчувствительных праймеров, но и метилчувствительных зондов. В такой комбинации MethyLight-анализ может выявить метилированную ДНК в смеси с 10000-кратным избытком неметилированной ДНК (Eads et al. 2000).

Благодаря высокой чувствительности и специфичности методы, основанные на бисульфитной конверсии цитозина, стали “золотым стандартом” для анализа метилирования ДНК в диагностике рака. Идеальный метод должен давать возможность исключения ложноотрицательных результатов ПЦР благодаря наличию соответствующего контроля, а также определения полноты конверсии неметилированного цитозина в урацил (Rand et al. 2002), связанной со специфической особенностью бисульфитной реакции (Warnecke et al. 2002). Иначе непрореагировавшие цитозиновые основания будут интерпретироваться как соответствующие остаткам метилцитозина, что приведет к ложноположительному результату.

В таблице 1 приведено сравнение современных методов анализа паттерна метилирования ДНК, основанных на бисульфитной конверсии ДНК, с точки зрения информативности и удобства применения.

**Сравнение методов анализа паттерна метилирования ДНК, основанных на  
бисульфитной конверсии ДНК**

<b>Метод</b>	<b>Чув.</b>	<b>Пр.</b>	<b>ТКО</b>	<b>Преимущества</b>	<b>Недостатки</b>
Бисульфитное секвенирование	–	±	–	Анализ метилирования каждого конкретного цитозинового основания	Необходимость клонирования фрагмента ДНК или использования цифровой ПЦР
Пиросеквенирование	±	±	+	Количественный анализ метилирования каждого конкретного цитозинового основания	Необходимость клонирования фрагмента ДНК или использования цифровой ПЦР
NGS	+	++	+	Анализ метилирования каждого конкретного цитозинового основания	Дорогостоящее оборудование
COBRA	±	±	+	Низкая стоимость исследования	Ограниченность сайтов узнавания рестриктаз
MS-SnuPE	±	±	+	Возможность мультиплексного варианта	Необходимость применения радиоактивной метки
MS-MCA	±	+	±	Нетрудоемкость Реакция в одной пробирке	Сложность осуществления анализа множества CpG-сайтов
MS-HRM	+	+	±	Высокая чувствительность Реакция в одной пробирке	Сложность осуществления анализа множества CpG-сайтов
MALDI-TOF	±	++	+	Количественный анализ метилирования каждого конкретного цитозинового основания	Дорогостоящее оборудование
HeavyMethyl	+	+	+	Высокая специфичность Реакция в одной пробирке	Большое количество олигонуклеотидов, необходимых для проведения реакции
MSP	+	±	–	Низкая стоимость исследования	Низкая специфичность
MethyLight	+	+	+	Нетрудоемкость Реакция в одной пробирке	Необходимость контрольного метода
McMSP	+	+	–	Низкая стоимость исследования Реакция в одной пробирке	Низкая специфичность
SMART-MSP	+	+	+	Высокая специфичность Реакция в одной пробирке	Необходимость контрольного метода
MS-FLAG	+	±	+	Возможность мультиплексного варианта	Электрофоретическая детекция

Примечание: Чув. — чувствительность, Пр. — производительность, ТКО — точность количественной оценки. Характеристики параметров: “–” — низкая, “±” — средняя, “+” — высокая, “++” — очень высокая.

Несмотря на использование методов бисульфитной конверсии в качестве “золотого стандарта” для анализа метилирования ДНК, они не лишены ряда серьезных недостатков. Помимо того, что неполное протекание реакции дезаминирования цитозина может снижать достоверность результатов, для данной группы методов характерны многостадийность, длительность исследования и большое число манипуляций, что существенно повышает риск кросс-контаминации анализируемых образцов.

### **1.3.3. Методы, основанные на применении метилчувствительных и метилзависимых эндонуклеаз рестрикции**

Существует мнение, что наличие в бактериальных клетках метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции обеспечивает расщепление неметилированной ДНК бактериофагов, в то время как метилирование генома клетки-хозяина предотвращает гидролиз ее собственной ДНК. Такая субстратная специфичность позволила использовать эти рестриктазы (MS, methylation-sensitive) для анализа паттерна метилирования ДНК. Наиболее широко применяемыми ферментами являются *HpaII* и *HhaI* (расщепляют неметилированные последовательности CCGG и GCGC, соответственно). Впервые они были использованы в сочетании с Саузерн-блот-анализом для определения гидролизованной/негидролизованной ДНК. Такой способ определения статуса метилирования был трудоемким, длительным и требовал большого количества исходной ДНК.

Альтернативой Саузерн-блоттингу послужила ПЦР, когда после гидролиза ДНК MS-эндонуклеазой проводили амплификацию с праймерами, фланкирующими исследуемый регион, содержащий сайты узнавания данной рестриктазы. В результате сигнал ПЦР, флуоресцентный или бэнд в геле, получали только с метилированной (негидролизованной) ДНК. Электрофоретическая детекция по конечной точке дает качественный результат, что ограничивает ее применение в диагностике, тогда как использование ПЦР в



режиме реального времени с использованием флуоресцентных TaqMan-зондов или интеркалирующего красителя SYBR Green I позволяет проводить количественную оценку метилирования ДНК (Oakes et al. 2006, Bruce et al. 2008). Система контролей для количественной ПЦР позволяет выявить наличие ингибиторов MS-эндонуклеаз, определить процент метилирования изучаемой ДНК и даже оценить функциональную копийность исследуемого локуса (von Kanel et al. 2010). Последнее очень помогает при изучении нарушений импринтинга генов и делеций хромосом.

Важным преимуществом использования MS-рестриктаз и количественной ПЦР является возможность проведения полного анализа в одной пробирке (von Kanel et al. 2010). Это достигается благодаря различию температур, при которых происходят соответствующие реакции: при температуре гидролиза 37°C Hot-Start ДНК-полимераза неактивна, а последующая ПЦР начинается при 95°C, в результате чего инактивируется MS-эндонуклеаза. У данного метода есть много достоинств: используется ДНК без дополнительной обработки, время анализа 35 образцов (в формате 96-луночной ПЦР) занимает 90 минут от момента выделения ДНК, кроме того, раскапывание материала и реакционных смесей происходит один раз, что позволяет существенно минимизировать риск кросс-контаминации. Главным недостатком метода является сложность анализа GC-богатых участков (von Kanel et al. 2007, von Kanel et al. 2011), что обусловлено плохой денатурацией тугоплавкой ДНК. Так как в основном анализируется метилирование именно CpG-островков, снижение эффективности ПЦР с GC-богатой последовательности может давать значительные погрешности в количественных данных. Данный недостаток может быть частично компенсирован добавлением денатурирующих агентов, таких как DMSO, в реакционную смесь.

Другой широко используемый метод — MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) (Schouten et al. 2002). Основой метода является использование олигонуклеотидных зондов двух видов: у первого 5'-конец содержит последовательность для ПЦР-праймера, тогда как 3'-конец комплементарен изучаемому участку ДНК, у второго — наоборот, причем при

специфичной гибридизации с геномной ДНК зонды оказываются прилегающими вплотную друг к другу. Одновременно можно использовать множество вариантов “левых” и “правых” зондов различной длины для анализа до 50 участков ДНК на наличие мутаций или делеций. После гибридизации осуществляется лигирование олигонуклеотидных зондов между собой с образованием матрицы для последующей ПЦР с флуоресцентно меченными праймерами. Полученные ампликоны анализируют при помощи секвенаторов электрофорезного типа (т.н. фрагментарный анализ). Длина фрагментов зависит от нуклеотидного состава изучаемых локусов, а интенсивность пиков ПЦР-продуктов можно отобразить количественно. MLPA-анализ не лишен недостатков: метод является полуколичественным и не позволяет расширять число исследуемых локусов; исследование, длящееся более 18-ти часов, включает пять стадий постановки, и требует наличия секвенатора. Тем не менее, в сравнении с количественной ПЦР MLPA выигрывает за счет возможности применения мультиплексного варианта, а также более высокой чувствительности и специфичности.

Для анализа метилирования ДНК используют также MS-MLPA-анализ (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification в сочетании с MS-эндонуклеазами). Добавление MS-эндонуклеазы на стадии лигирования делает невозможным образование продукта реакции с неметилованной ДНК. Степень метилирования оценивают, исходя из различия количества продукта, полученного с гидролизованной и негидролизованной ДНК. Как и любой количественный метод, MS-MLPA нуждается в системе контролей полноты и специфичности гидролиза, однако его принцип позволяет проводить все контрольные реакции в одной и той же пробирке, используя зонды, комплементарные соответствующим участкам ДНК (Nygren et al. 2005).

В настоящее время ферментативные методы используются в диагностике аберрантного метилирования и нарушения импринтинга генов. Несмотря на то, что MS-эндонуклеазы позволяют идентифицировать биомаркеры метилирования (Lofton-Day et al. 2008), их применение в рутинной практике ограничено неполным догидролизом ДНК, способным внести существенную ошибку в

количественную ПЦР и привести к ложноположительному результату. Это некритично для анализа импринтинга генов, степень метилирования ДНК которых близка к 0, 50 или 100 %, но при эпигенетической диагностике рака иногда значимым бывает даже небольшое изменение уровня метилирования ДНК. Кроме того, полнота гидролиза снижается при анализе фрагментированной ДНК (von Kanel and Huber 2013), что является серьезной проблемой, так как для анализа или онкодиагностики используется ДНК, выделенная из замороженных, фиксированных в формалине или парафине образцов, а также из плазмы периферической крови. Поэтому очень важно иметь контроль гидролиза ДНК и тщательно подбирать концентрацию фермента, стремясь свести возможные погрешности к минимуму.

Кроме метилчувствительных рестриктаз, активность которых блокируется метилированием сайта узнавания, существуют также метилзависимые рестриктазы (MD, methylation-dependent), способные гидролизовать только метилированную ДНК, однако эти ферменты немногочисленны и малоизучены. Типичными и наиболее полно охарактеризованными представителями являются *DpnI*, сайт узнавания G(6mA)↓TC (место гидролиза указано стрелкой) (Lacks and Greenberg 1975), и *McrBC*, которая узнает пару сайтов R(5mC), разделенных неспецифическим участком длиной 40-3000 нуклеотидов, и вносит двуцепочечный разрыв на расстоянии 30-35 нуклеотидов от одного из узнаваемых элементов (Raleigh 1992, Stewart F.J. and Raleigh E.A. 1998). Применение этих ферментов для анализа метилирования ДНК человека было невозможно из-за сродства *DpnI* к метиладенину и сложного строения сайта узнавания *McrBC* при неспецифичности гидролиза.

Не так давно были открыты метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы рестрикции, обладающие сродством к 5-метилцитозину: *GlaI* (Tarasova et al. 2008), *BlsI* (Чернухин и др. 2007a), *GluI* (Чернухин и др. 2007b), *PcsI* (Чернухин и др. 2009), *KroI* (Чернухин и др. 2011b), *PkrI* (Чернухин и др. 2011a), *MteI* (Чернухин и др. 2012), способные гидролизовать только метилированную ДНК в строго определенном месте, что делает возможным их

применение для анализа паттерна метилирования ДНК (Гончар и др. 2010, Акишев и др. 2011).

В 2013 году был разработан способ определения метилированной последовательности R(5mC)GY в заданном положении протяженной ДНК — GLAD-ПЦР анализ (*GlaI* digestion and Ligation Adapter Dependent ПЦР, патент РФ 2525710 C1 (2013)), в разработке которого принимал участие автор настоящей работы. Данный метод интересен для анализа метилирования ДНК, так как он обладает следующими особенностями: он способен выявлять метилированный остаток цитозина в составе сайта R(5mC)GY (поскольку именно такая последовательность является наиболее предпочтительной мишенью при aberrantном метилировании *de novo* (Handa and Jeltsch 2005, Jurkowska et al. 2011)) даже при сильном избытке неметилированной ДНК; аналитическая чувствительность ~20 пг ДНК, специфичность определения 100 %, продолжительность исследования не более пяти часов; возможность проведения всех этапов анализа в одной пробирке; отсутствие в ПЦР-смеси дополнительных олигонуклеотидов, кроме пары праймеров и TaqMan-зонда.

Методы в формате MSP, когда анализируется гидролизованная ДНК против контроля интактной матрицы, имеют существенный недостаток в виде высокой вероятности ошибки измерений вследствие неполного гидролиза. GLAD-ПЦР анализ лишен этого недостатка, так как сигнал идет только с метилированной ДНК, т. е. в результате комплекса реакций мы детектируем появление сигнала в ПЦР, а не снижение. Это реализовано благодаря лигированию универсального адаптера к тупым концам гидролизованной *GlaI* ДНК, благодаря чему появляются условия для правильной гибридизации гибридного праймера (описание в п. 3.6).

#### 1.4. ДЕМЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Деметилирование, как обратный метилированию процесс, также необходимо для регуляции жизнедеятельности клетки, поскольку может

приводить к реактивации генов, деконденсации ДНК и изменению ее конформации. Деметилирование ДНК бывает пассивным и активным (рис. 5).

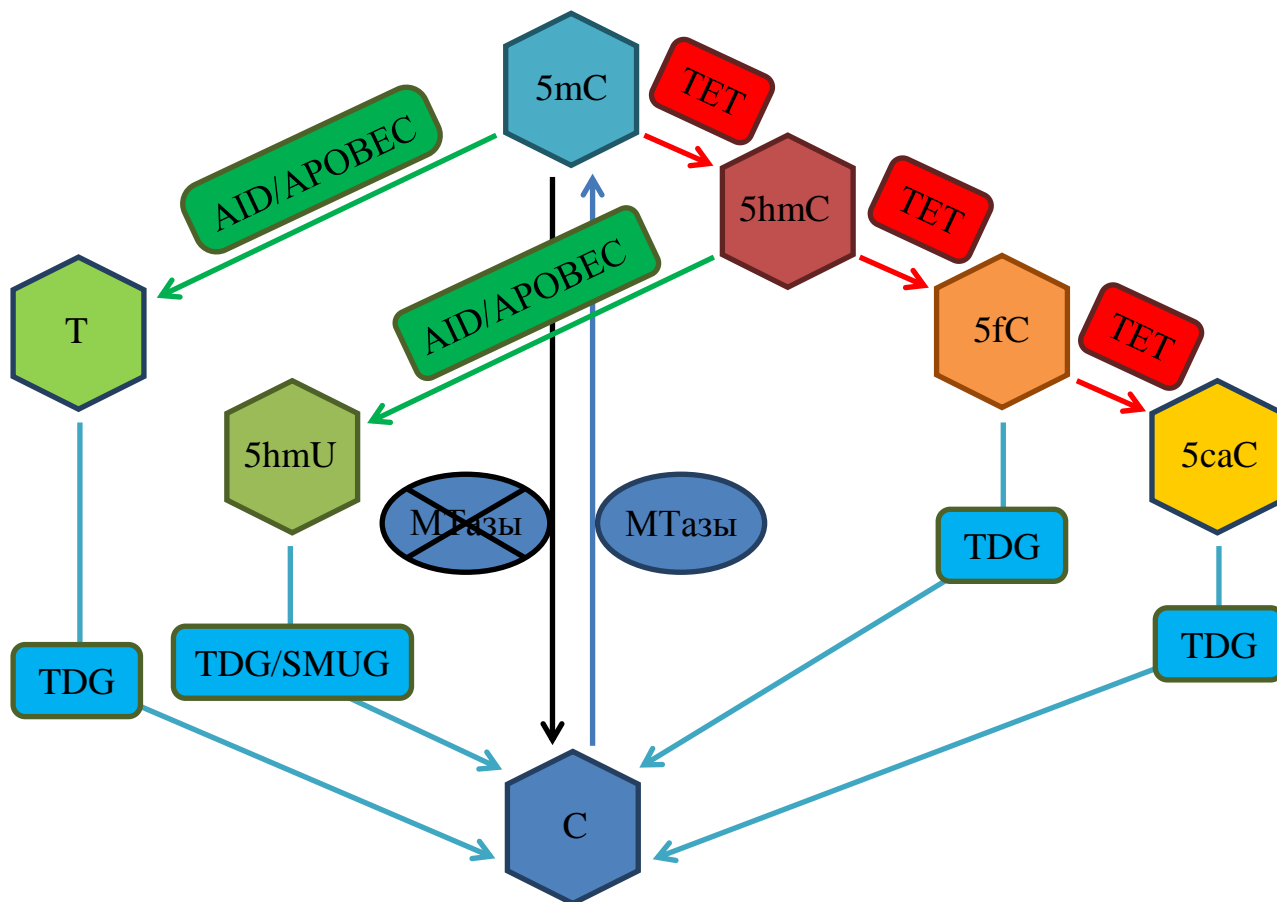


Рис. 5. Пути метилирования и деметилирования ДНК. Условные обозначения: С — цитозин, 5mC — 5-метилцитозин, 5hmC — 5-гидроксиметилцитозин, 5fC — 5-формилцитозин, 5caC — 5-карбоксцитозин, 5hmU — 5-гидроксиметилурацил, Т — тимин, AID/APOBEC — Activation-Induced Cytidine Deaminase/Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Complex, TET — Ten–Eleven Translocation, TDG — тимин-ДНК-гликозилаза, SMUG — Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1. Процессы выделены цветными стрелками: красным — окисление по метильной группе, зеленым — дезаминирование, бирюзовым — процессы репарации ДНК, синим — метилирование цитозина, черным — пассивное деметилирование.

Пассивное деметилирование ДНК происходит в делящихся клетках, если в процессе репликации ДНК активность Dnmt1 ингибирована или отсутствует вовсе. Так как вновь синтезируемая цепь ДНК несет неметилированные остатки цитозина, общий уровень метилирования снижается вдвое в результате каждого клеточного деления (Mayer et al. 2000, Zhang et al. 2007).

На сегодняшний день в клетках млекопитающих не известно ни одного механизма непосредственного удаления метильной группы метилцитозина путем разрыва углерод-углеродной связи. Вместо этого деметилирование происходит через серию реакций дезаминирования и/или окисления, превращающих 5-метилцитозин в субстрат для системы репарации ДНК (ЭРО, эксцизионная репарация оснований), которая вырезает модифицированное основание и заменяет его остатком цитозина. Общеизвестно, что ферментативное удаление таких оснований является финальным этапом любого пути активного деметилирования, тогда как участие различных ферментов и типы модификаций метилцитозина до сих пор активно изучаются (Bhutani et al. 2011). 5-метилцитозин может быть модифицирован по двум сайтам: метильной группе и аминогруппе (рис. 5). Дезаминирование аминогруппы в карбонильную группу комплексом ферментов AID/APOBEC (Activation-Induced Cytidine Deaminase/Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Complex) эффективно превращает 5mC в тимин и активирует последующую репарацию неспаренного основания. Было показано, что избыточная экспрессия генов *AID/APOBEC* приводит к деметилированию в организме рыбы *Danio rerio* (Rai et al. 2008), тогда как их выключение приводит к невозможности деметилирования некоторых генов, необходимых для клеточного репрограммирования (Popp et al. 2010, Bhutani et al. 2011). В экспериментах на мышах было показано, что полное выключение гена *AID* не приводит к гибели животных и не оказывает влияния на их фертильность.

Модификации метильной группы также могут приводить к активному деметилированию ДНК. Открыт механизм присоединения гидроксильной группы к метильной группе 5-метилцитозина с образованием 5-гидроксиметилцитозина, катализируемый ферментами семейства TET (Ten–Eleven Translocation): TET1, TET2, и TET3 (Tahiliani et al. 2009, Ito et al. 2011). Полученный 5hmC может быть превращен обратно в цитозин двумя способами. Первый заключается в последующем окислении 5-гидроксиметилцитозина до 5-формилцитозина и 5-карбоксицитозина, которое также опосредовано TET-ферментами (Ito et al. 2011).

Второй — в дезаминировании 5hmC комплексом AID/APOBEC с образованием 5-гидроксиметилурацила (Guo et al. 2011). Ключевая роль TET в образовании 5-гидроксиметилцитозина подтверждена в экспериментах с нокаутированием гена *TET* у мышей (Dawlaty et al. 2011).

Во всех вышеперечисленных случаях активное деметилирование ДНК завершается удалением модифицированного основания (5-гидроксиметилурацила, 5-формилцитозина или 5-карбоксицитозина) или тимина и его заменой на цитозин. Данный процесс, осуществляемый ЭРО-системой, инициируется ферментом тимин-ДНК-гликозилазой (TDG) (Cortellino et al. 2011, He et al. 2011). Выключение гена *TDG* у мышей приводит к гибели эмбрионов. Более того, в клетках мутантов наблюдается гиперметилирование генов, особенно импринтированных, таких как *Igf2* и *H19*. Это позволяет предполагать, что активное деметилирование с участием TDG защищает импринтированные гены от спонтанного метилирования *de novo* (Cortellino et al. 2011). Другой фермент репаративной системы — SMUG1 (Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1) относится к тому же семейству гликозилаз, что и TDG, и также функционирует на финальной стадии активного деметилирования (Cortellino et al. 2011, Guo et al. 2011). В целом, активное деметилирование ДНК включает множество путей модификации 5-метилцитозина, многие из которых пока неизвестны, с неизменным участием системы репарации ДНК, завершающей процесс заменой модифицированного основания на цитозин.

### 1.5. ИНГИБИРОВАНИЕ МТаз

Система метилирования ДНК является перспективной мишенью для терапии с целью реактивации ГСО при онкопатологиях, связанных с гиперэкспрессией МТаз. Ингибиторы МТаз подразделяют на две большие группы: нуклеозидные и ненуклеозидные ингибиторы. Несмотря на то, что ингибиторы МТаз хорошо проявляют себя в модельных экспериментах, только

небольшая часть из них допущена до клинических испытаний или используется на практике.

**Нуклеозидные ингибиторы.** Механизм действия нуклеозидных ингибиторов первого поколения основан на их встраивании в реплицирующуюся ДНК и ковалентном связывании с МТазами, что препятствует восстановлению aberrантных гиперметилованных паттернов приводя тем самым к реактивации генов-онкосупрессоров. Основной проблемой, связанной с применением этих препаратов, является невозможность их адресной доставки в опухолевые клетки, что позволило бы избегать сильного мутагенного воздействия на нормальные ткани организма.

**Азациитидин.** Азациитидин или 5-азациитидин (Vidaza®) является аналогом цитидина, в котором атом углерода 5 заменен на азот. После проникновения в клетку азациитидин превращается в активную форму нуклеозидтрифосфата и встраивается в ДНК и РНК при их синтезе (Gros et al. 2012). Этот аналог цитидина блокирует реакцию метилирования ДНК на стадии формирования ковалентного фермент-субстратного комплекса, что приводит к снижению числа активных МТаз в клетке (Santi et al. 1984, Cheng et al. 2004). Данный препарат одобрен FDA (Food and Drug Administration, США) для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и миелодиспластического синдрома (МДС) (Lubbert 2000). Азациитидин нестабилен в водной среде и обладает выраженным цитотоксическим эффектом *in vitro* (Santi et al. 1984, Robak 2011). В настоящее время в США проводятся клинические испытания по его применению для терапии рецидивирующих или резистентных миелоидных онкопатологий (ClinicalTrials.gov Identifier NCT00412919). Последние эксперименты на мышах показали, что низкие дозы азациитидина можно использовать и при лечении рака молочной железы, прямой кишки и легкого (Tsai et al. 2012). В сочетании с другими лекарствами, например препаратом Entinostat (ингибитор HDAC, гистоновой деацетилазы), азациитидин может применяться для терапии немелкоклеточного рака легких (Juergens et al.



2011), а эффективность комбинации азациитидин+доцетаксел+преднизолон исследуется в отношении метастазирующего рака простаты (NCT00503984).

**Децитабин.** Децитабин (Dacogen®) или 5-аза-2'-дезоксцитидин является дезоксирибозным аналогом цитидина. В отличие от азациитидина, он встраивается только в синтезирующуюся ДНК, для чего ему также необходимо принять активную форму нуклеозидтрифосфата. Децитабин уменьшает число активных молекул МТаз, тем самым способствуя деметилированию генома. Препарат обладает сильным токсическим эффектом в высоких дозах, однако хорошо переносится в низких концентрациях (Bryan et al. 2011). Последние исследования показали, что производное децитабина 2'-дезоксиде-5,6-дигидро-5-азациитидин обладает более низкой токсичностью при сопоставимой способности к деметилированию ДНК и реактивации генов (Matousova et al. 2011). Так же как азациитидин, децитабин используется в настоящее время для лечения ОМЛ и МДС (Robak 2011). Кроме того, его комбинации с другими препаратами проходят клинические испытания в терапии меланомы (NCT00791271, NCT00925132) и метастазирующего рака молочной железы (NCT01194908). Другой аналог, 5-флуоро-2'-дезоксцитидин, в комбинации с тетрагидроуридином проходит испытания в качестве препарата для лечения новообразований головы, шеи, легких, мочевого пузыря и молочной железы (NCT00978250). В настоящее время получены соединения, относящиеся ко второму поколению аналогов цитидина. Например, динуклеотид децитабин-фосфат-дезоксигуанозин (SGI-110), проявляющий противораковые свойства *in vivo* (Chuang et al. 2010), проходит испытания на пациентах с ОМЛ и МДС (NCT01261312).

**Зебуларин.** Зебуларин или 1-(β-D-рибофуранозил)-2(1H)-пиримидинон также является аналогом цитидина, проявляет свойства ингибитора цитидиндеаминазы, связывающегося с ее активным центром (Schroeder et al. 2012), и ингибитора МТаз с выраженной противоопухолевой активностью и низкой токсичностью (Zhou et al. 2002). Зебуларин показал хорошие результаты при лечении ОМЛ (Scott et al. 2007). Действие зебуларина на культуру клеток ОМЛ Kasumi-1 в экспериментах *in vitro* приводило к деметилированию генов,

однако полученный профиль метилирования клеточной ДНК отличался от паттерна метилирования, установившегося после использования децитабина и азацитина (Flotho et al. 2009). Несмотря на потенциальный противоопухолевый эффект, зебуларин до сих пор не используется в медицинской практике.

Хотя перечисленные нуклеозидные ингибиторы показали высокую эффективность в отношении ОМЛ и МДС, не исключено, что в клетках опухолей других типов они могут активировать прометастатические гены (Chik and Szyf 2011). Кроме того, остается нерешенным вопрос возможного мутагенного эффекта этих препаратов.

**Ненуклеозидные ингибиторы.** В отличие от веществ предыдущей группы, механизм действия ненуклеозидных ингибиторов не подразумевает их обязательной встройки в последовательность ДНК, более того, для многих представителей класса механизмы влияния на систему метилирования ДНК не изучены.

**Гидралазин.** Гидралазин относится к классу гидразинофалазинов и действует как мягкий миорелаксант. В 1988 году было описано гидралазин-ассоциированное заболевание, похожее на системную красную волчанку, связанное с его способностью ингибировать метилирование ДНК (Cornacchia et al. 1988). Дальнейшие работы показали способность гидралазина к реактивации гиперметилированных ГСО, таких как *CDKN2A*, при обработке им некоторых клеточных линий (Segura-Pacheco et al. 2003). Клинические испытания фазы I на четырех пациентках с карциномой шейки матки привели к реактивации ГСО без влияния на общий уровень метилирования ДНК в опухолевых клетках (Zambrano et al. 2005). Механизм действия гидралазина не изучен, хотя известно, что в комбинации с другими веществами, например с вальпроатом магния, он эффективен в отношении резистентных к химиотерапии опухолей. Комбинация этих двух препаратов в настоящее время проходит вторую фазу клинических испытаний (NCT00404508).

**Производные прокаина.** Прокаин хорошо известен как средство местного обезболивания из группы аминоэфиров. Прокаинамид, производное прокаина, применяется как противоаритмический препарат (Fenster et al. 1983). Однако эти два препарата могут также взаимодействовать с CpG-богатыми регионами и приводить к деметилированию ГСО, таких как *RARB* (Villar-Garea et al. 2003). Прокаинамид является еще и специфичным ингибитором Dnmt1, что показано на клетках рака молочной железы MCF-7 (Lee et al. 2005). Недавно было получено шесть конъюгатов прокаинамида, способных ингибировать комплекс Dnmt3a/3L и Dnmt1 (Halby et al. 2012). Несмотря на потенциально высокую противоопухолевую активность, к клиническим испытаниям производные прокаина пока не допущены.

**Флавоноиды.** Флавоноиды представляют собой обширное семейство вторичных метаболитов растений. Наиболее изученными флавоноидами, применяемыми для лечения рака, являются (–)эпигаллокатехин-3-О-галлат (EGCG) и генистеин — компоненты зеленого чая и соевых бобов, соответственно. Противоопухолевая активность флавоноидов, связанная с деметилированием ДНК и реактивацией ГСО, была открыта в клетках плоскоклеточного рака пищевода (Fang et al. 2005). Кроме того, EGCG является прямым ингибитором МТаз, хотя механизм его действия остается предметом споров (Stresemann et al. 2006, Wang et al. 2013). Несмотря на это, проводятся клинические испытания флавоноидов как противораковых препаратов. В частности, изучается эффективность предварительного лечения генистеином рака простаты перед простатэктомией (NCT01126879).

**Другие ингибиторы.** Существуют и другие вещества, такие как куркумин и его производные, обладающие выраженной способностью к ингибированию МТаз. Отдельно стоит выделить перспективные ингибиторы RG108 (фталимидо-1-триптофан), MG98 (антисмысловый олигонуклеотид к Dnmt1) и SGI-1027 (липофильный квинолин) (Gros et al. 2012), сочетающие высокую эффективность и низкую цитотоксичность. MG98, например, проходит первую фазу клинических

испытаний в терапии ОМЛ, МДС и других опухолей (Klisovic et al. 2008, Plummer et al. 2009).

Нужно также отметить возможность применения высокоаффинных олигонуклеотидов — аналогов природного ДНК субстрата — для конкурентного ингибирования МТаз. Обладая большим сродством к Dnmt1, они могут инициировать пассивное деметилирование ДНК и реактивацию ГСО (Flynn et al. 2003). Так как в клетке в норме присутствует значительное количество коротких последовательностей нуклеиновых кислот (miRNA, siRNA, microRNA и др.), есть основания предполагать слабый токсический эффект синтетических ОДН-ингибиторов (Delpu et al. 2013).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система метилирования ДНК в клетке представляет огромный интерес с точки зрения перспектив терапии рака и ранней онкодиагностики. Потенциальная обратимость такой модификации ДНК и возможность реактивации генов-онкосупрессоров делает поиск ингибиторов Dnmt1 актуальной задачей. С другой стороны, разработка препаратов эпигенетической терапии (в том числе и ингибиторов МТаз) должна сопровождаться оценкой их эффективности на клеточном уровне, поэтому не менее важным является применение современных, воспроизводимых и адекватных методов оценки.

Настоящая работа посвящена созданию конкурентных ингибиторов на основе природных субстратов МТаз — коротких фрагментов ДНК, обладающих большим сродством к ферменту, чем геномная ДНК клетки, и их использованию для подавления aberrантного гиперметилирования в клетках карцином шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека 16 (CaSki) и 18 (HeLa).

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали: препарат рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы человека Dnmt1 (2 е.а./мкл) (“New England Biolabs”, США), меченный тритием донор метильной группы, [ $^3\text{H-CH}_3$ ]AdoMet (15 кюри/ммоль), и инозин-содержащий полимер поли(dI-dC)·поли(dI-dC) длиной 1755 п.н. (“GE Healthcare”, Великобритания); немеченный AdoMet (“Sigma-Aldrich”, США), дополнительно очищенный с помощью обращенно-фазовой хроматографии на колонке C18 (Kossykh et al. 1995); эндонуклеазу рестрикции *TaqI* (20 е.а./мкл), метилзависимую сайт-специфическую эндонуклеазу *GlaI* (8 е.а./мкл), высокоактивную T4 ДНК-лигазу (2000 е.а./мкл), HotStart ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, а также стабилизатор для GC-ПЦР (“СибЭнзим”, Россия) и Tween-80 – производства Sigma (Германия).

#### 2.1.1. Олигодезоксирибонуклеотидные ингибиторы Dnmt1

Олигодезоксирибонуклеотидные ингибиторы (ОДН) (табл. 2) синтезированы ЗАО “Биосан” (Новосибирск), фосфорамидиты для включения в синтетические ДНК модифицированных оснований (5-метилцитозина, 5,6-дигидро-5-азацитозина, 5-метил-2-пиримидинона и 6-метил-пирроло-[2,3-d]-2-пиримидинона) (рис. 6) производства “Glen Research” (США). Синтез олигонуклеотидов проводили по стандартной схеме с использованием фосфорамидитов. При получении фосфотиоатов на стадии окисления использовали реактив Beaucage (“Glen Research”, США) как сульфорирующий агент, при этом вероятно образование диастереомеров. Концентрации олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, молярные коэффициенты экстинкции рассчитывали на основании структуры каждой последовательности. Дуплексные и шпилечные ДНК-структуры получали отжигом олигонуклеотидов

— нагревом до 85 °С с последующим плавным охлаждением до комнатной температуры.

Таблица 2

Структура синтетических олигодезоксирибонуклеотидных ингибиторов Dnmt1

Лиганд	Структура*
GC-box <sup>bMET</sup>	5' CTGGATCCTTGCCC <b>MG</b> CCCCTTGAATTCCC
ОДН-1S	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTG
ОДН-2S	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC
ОДН-3S	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTG
ОДН-4S	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTG
ОДН-5S	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC
ОДН-6S	5' GAAATGGATC <b>MG</b> CTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC
ОДН-7S	5' GAAATGGATC <b>ZG</b> CTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC
ОДН-8S	5' GAAATGGATC <b>DG</b> CTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC
ОДН-1D	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-2D	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-3D	5' GAAATGGATC <b>MG</b> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-4D	5' GAAATGGATC <b>C</b> GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC
ОДН-5D	5' GAAATGGATC <b>C</b> GCTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC
ОДН-6D	5' GAAATGGATC <b>C</b> GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>A</b> <b>M</b> GAGATTTGAC
ОДН-7D	5' GAAATGGATCC <b>C</b> GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>G</b> <b>M</b> GAGATTTGAC
ОДН-8D	5' GAAATGGATC <b>M</b> GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC

Лиганд	Структура*
ОДН-9D	5' GAAATGGATC <u>CG</u> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-10D	5' GAAATGGATC <u>CCG</u> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-11D	5' GAAATGGATC <u>CMG</u> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-12D	5' GAAATGGATC <u>DG</u> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-13D	5' GAAATGGATC <u>ZG</u> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-14D	5' GAAATGGATC <b>PG</b> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC
ОДН-15D	5' GAAATGGATC <u>C</u> GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC
ОДН-16D	5' GAAATGGATC <u>M</u> GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC
ОДН-17D	5' GAAATGGATC <u>Z</u> GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC
ОДН-18D	5' GAAATGGATC <u>D</u> GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC
ОДН-1H	5' GAAATGGATC <b>G</b> CTCTAAACTG <sup>CC</sup> C 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC <sup>CC</sup> C
ОДН-2H	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTG <sup>CC</sup> C 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC <sup>CC</sup> C
ОДН-3H	5' GAAATGGATC <b>CG</b> CTCTAAACTG <sup>CC</sup> <b>M</b> 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC <sup>CC</sup> <b>G</b>
ОДН-4H	5' GAAATGGATC <u>CCG</u> CTCTAAACTG <sup>CC</sup> C 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC <sup>CC</sup> C
ОДН-5H	5' GAAATGGATC <u>C</u> GCTCTAAACTG <sup>CC</sup> C 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC <sup>CC</sup> C
ОДН-1F	5' FAM- <u>GAAATGGATCCGCTCTAAACTG</u> CCCCGCC

Лиганд	Структура*
ОДН-2F	$  \begin{array}{l}  5' \text{ FAM-GAATGGATCCGCTCTAACTG}^{\text{C}}_{\text{C}} \\  3' \quad \quad \quad \text{CTTACCTAGGCGAGATTGAC}^{\text{C}}_{\text{C}}  \end{array}  $
ОДН-К	$5' \text{ GAAATGGATCATCTCTAAACTG}$
ОДН-1	$5' \text{ GAAATGGATC}^{\text{M}}\text{GCTCTAAACTGCC}^{\text{M}}\text{GCC}$
ОДН-2	$  \begin{array}{l}  5' \text{ GAATGGATC}^{\text{M}}\text{GCTCTAACTG}^{\text{C}}_{\text{C}} \\  3' \text{ CTTACCTAGGCGAGATTGAC}^{\text{C}}_{\text{C}}  \end{array}  $
ОДН-3	$  \begin{array}{l}  5' \text{ GAATGGATC}^{\text{C}}\text{GCTCTAACTG}^{\text{C}}_{\text{C}} \\  3' \text{ CTTACCTAG}^{\text{A}}\text{MGAGATTGAC}^{\text{C}}_{\text{C}}  \end{array}  $
ОДН-4	$  \begin{array}{l}  5' \text{ GAATGGATC}^{\text{M}^{\text{A}}}\text{CTCTAACTG}^{\text{C}}_{\text{C}} \\  3' \text{ CTTACCTAGG}^{\text{C}}\text{GAGATTGAC}^{\text{C}}_{\text{C}}  \end{array}  $

Примечание. \*М – 5-метилцитозин, D – 5,6-дигидро-5-азацитозин, Z – 5-метил-2-пиримидинон и Р – 6-метил-пирроло-[2,3-d]-2-пиримидинон (см. рис. 6). Подчеркнуты нуклеотиды, содержащие по 5'- и 3'-концам фосфотиоаты; жирным шрифтом выделены нативные либо модифицированные участки 5'-CG-3'.

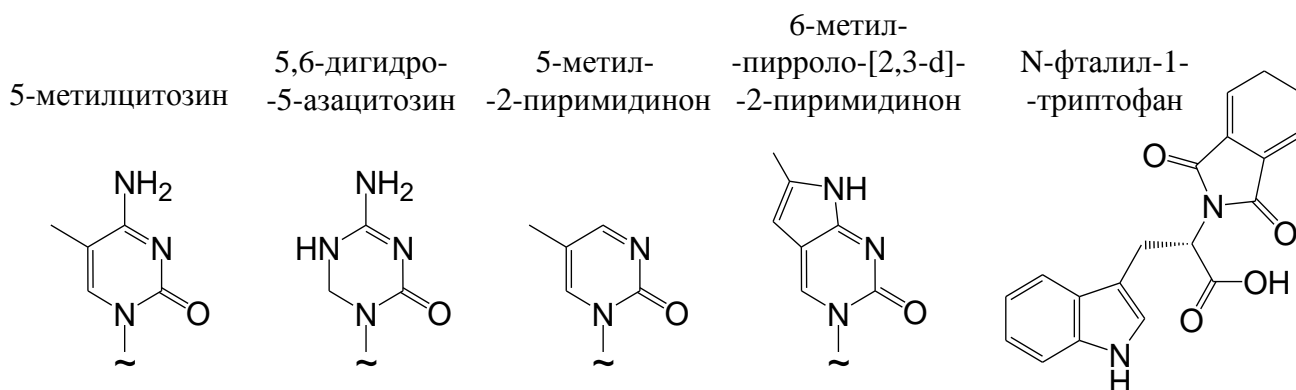


Рис. 6. Структурные формулы модифицированных аналогов цитозина и N-фталил-1-триптофана — низкомолекулярного ингибитора Dnmt1.

### 2.1.2. Клеточные линии

Для экспериментов использовали клеточные линии HeLa (карцинома шейки матки, ассоциированная с ВПЧ-18), CaSki (карцинома шейки матки,



ассоциированная с ВПЧ-16) и L-68 (легочные фибробласты эмбриона человека) из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”, посевная концентрация  $10^5$  клеток/мл. Использовалась среда Игла MEM (производства ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”) с добавлением 5 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (КРС).

### 2.1.3. Праймеры и TaqMan-зонды

В таблице 3 представлены исследованные в настоящей работе гены, для которых показано наличие aberrантного метилирования в клетках рака шейки матки (Qiang et al. 2012).

Таблица 3

Гены человека, для которых показано наличие aberrантного метилирования в злокачественных клетках

Ген	Локус	Расположение гена в геноме человека*	Позиция изучаемого цитозинового основания относительно сайта инициации транскрипции
<i>CDKN2A</i>	9p21	21967752..21994491, complement	–595
<i>DAPK1</i>	9q21.33	87497228..87708651	+64
<i>MGMT</i>	10q26	129467190..129767519	+91
<i>RARB</i>	3p24.2	25428263..25597932	+113, +166
<i>RASSF1A</i>	3p21.3	50329786..50340936, complement	+183

\* по данным GenBank, согласно сборке GRCh38.

Применяемые для GLAD-ПЦР анализа статуса метилирования выбранных генов олигонуклеотидные праймеры, флуоресцентно меченные деградируемые зонды, а также универсальный адаптер были синтезированы во ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”. Их структура приведена в таблице 4. Расчет праймеров и зондов проводился в программе AlleleID 7 (PremierBiosoft, США). Для ГСО выбирался сайт RCGY, отвечающий требованию наличия фланкирующих участков, не

содержащих других сайтов RCGY, достаточных для отжига геномного праймера и зонда.

Таблица 4

### Структура праймеров, зондов и адаптера для GLAD-ПЦР анализа

Универсальный адаптер	5' CTCCCGCCTGCTCTTTCATCG 3' ACGAGAAAGTAGC
CDKN2A	5' GGAAGAAAGGAAAGCGAGGTC
CDKN2A_GLAD	5' CCTGCTCTTTCATCGGTGC
CDKN2A_TaqMan	5' FAM-TTGCTCTATCCGCCAATCAGGAGG-BHQ1
DAPK	5' CTTGCAGGGTCCCCATTGG
DAPK_GLAD	5' CCTGCTCTTTCATCGGTTG
DAPK_TaqMan	5' FAM-CCTCCTCACACTCCGAAGCAGCC-BHQ1
MGMT	5' GAGAGCTCCGCACTCTTC
MGMT_GLAD	5' CCTCTTTCATCGGCACCGT
MGMT_TaqMan	5' FAM-CCAGACACTCACCAAGTCGCAA-BHQ1
RARB	5' TTCAGAGGCAGGAGGGTCTATTC
RARB_GLAD_3	5' GCCTGCTCTTTCATCGGTT
RARB_GLAD_4	5' CCTGCTCTTTCATCGGTTT
RARB_GLAD_5	5' TGCTCTTTCATCGGTTCT
RARB_GLAD_6	5' GCTCTTTCATCGGTTCTC
RARB_GLAD_7	5' CTCTTTCATCGGTTCTCG
RARB_TaqMan	5' FAM-TCCCAGTCCTCAAACAGCTCGCATGG-BHQ1
RASSF1	5' ATGTCGGGGGAGCCTGAG
RASSF1_GLAD	5' CCTGCTCTTTCATCGGCCC
RASSF1_TaqMan	5' FAM-TGCCAGCTCCCGCAGCTCAAT-BHQ1

Примечание: FAM — 5-(and-6)-Carboxyfluorescein, BHQ1 — Black Hole Quencher®-1. В составе гибридных праймеров красным цветом выделены нуклеотиды, комплементарные геномной ДНК.

## 2.2. МЕТОДЫ

### 2.2.1. Измерение скоростей реакции метилирования ДНК

Реакцию метилирования ДНК проводили при 37 °С. Реакционная смесь содержала 50 мМ Трис-НCl, pH 7,8, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 5 % глицерин и 0,1 мг/мл БСА. Концентрации МТазы Dnmt1, AdoMet, поли(dI-dC)-поли(dI-dC) и олигонуклеотидов составляли 0,05 е.а./мкл ( $\sim 10^{-9}$  М), 10 мкМ, 1 мкМ (в пересчете

на сайты) и 1 мкМ, соответственно, либо варьировались согласно типу эксперимента. Реакции запускали добавлением раствора Dnmt1 к смеси [ $^3\text{H-CH}_3$ ]AdoMet и субстратной ДНК (с олигонуклеотидами или без них) до конечного объема 20 мкл. Смешиваемые растворы предварительно прогревали до 37 °С. Время реакции составляло 3 часа. Аликвоты реакционных смесей объемом 18 мкл наносили на диски анионообменных фильтров DE-81 (“Whatman”, Великобритания). Фильтры промывали трижды раствором 0,02 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , дважды дистиллированной водой и один раз 75 %-ным этанолом, после чего фильтры высушивали и подсчитывали их  $^3\text{H}$ -радиоактивность в толуольном сцинтилляторе на счетчике Mark III (“Searle Analytic”, США).

Предварительную оценку субстратных и ингибиторных свойств проводили на основании сравнения степеней метилирования МТазой Dnmt1 субстрата поли(dI-dC)·поли(dI-dC) (D), синтетических олигонуклеотидных структур (B) и их смесей с субстратом (C). Процент ингибирования реакции метилирования поли(dI-dC)·поли(dI-dC) в смесях вычисляли следующим образом:

$$\text{Процент ингибирования} = 100 \% \times \frac{1 - (C - B)}{D}$$

Зависимости активности Dnmt1 (A) от концентрации ингибиторов (I) анализировали с помощью программы для нелинейного регрессионного анализа Origin 8.0 (“OriginLab”), вычисляя 50 %-ные ингибирующие концентрации ( $\text{IC}_{50}$ ) согласно стандартному выражению:  $A = \frac{A_{\max}}{1 + (\frac{I}{\text{IC}_{50}})^n}$ , где n – коэффициент Хилла

(Курганов 1978).

### 2.2.2. Изучение внутриклеточной локализации олигонуклеотидов в клетках

Для изучения внутриклеточной локализации олигонуклеотидов в клетках HeLa и CaSki использовали олигонуклеотиды, меченные по 5'-концу флуоресцентным красителем (карбоксифлуоресцеин, FAM). Клетки культивировали в 6-луночных планшетах на покровных стеклах (посевная концентрация  $10^5$  клеток/мл) в 2 мл среды Игла MEM с 5 % сывороткой КРС без антибиотиков (18 часов, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>), затем ее заменяли на среду без сыворотки и антибиотиков. Доставку ОДН в клетки осуществляли с помощью трансфекционного агента Липофектамин 2000 ("Invitrogen", США) согласно инструкции производителя. Для этого преинкубированные смеси липофектамина и ОДН разводили средой Игла MEM, вносили по 100 мкл в лунки планшета и культивировали клетки в течение 4 часов. Количество ОДН подбиралось согласно условиям эксперимента. Затем среду заменяли обычной ростовой с ампициллином и культивировали еще 24-72 часа, после чего стекла с клетками помещали на 10 минут в 4 % раствор формалина для фиксации, трижды отмывали в однократном фосфатном буфере (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Далее вносили по 1 мкл 1000-кратного раствора DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) ("Invitrogen", США) на 15 минут для окрашивания ядер и вновь трижды отмывали в фосфатном буфере. После этого проводили микроскопию образцов на люминесцентно-инверсионном микроскопе СКХ41 ("Olympus", Япония). При микроскопии делали отдельно снимки ядер клеток (DAPI, синее свечение) и метки на олигонуклеотидах (FAM, зеленое свечение), затем при помощи компьютерной обработки фотографии совмещали и оценивали распределение меченых ОДН в клетке.

### 2.2.3. Исследование цитотоксичности и ингибирующей активности олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1

Для оценки цитотоксической активности олигонуклеотидных ингибиторов использовали следующую стандартную методику. Монослой культуры клеток L-68, HeLa и CaSki выращивали в лунках плоскодонных 96-луночных планшетов. После замены среды на свежую без сыворотки КРС и антибиотиков в культуральную среду добавляли серийные разведения исследуемых препаратов ингибиторов, смешанных с трансфецирующим агентом в подобранной пропорции. После инкубирования в течение 4 часов среду меняли на ростовую с сывороткой и культивировали в течение 24 часов. Затем среду удаляли, а монослой прокрашивали витальным красителем нейтральным красным, который включается только в жизнеспособные клетки и не окрашивает погибшие. После удаления красителя и отмывки лунок добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированного живыми клетками монослоя, измеряли спектрофотометрически по интенсивности поглощения на длине волны 540 нм. В качестве контролей использовали лунки планшета, в которые препараты не вносили, а также лунки без ингибиторов, но с добавлением липофектамина. Учет результатов проводили с использованием планшетного спектрофотометра Emax ("Molecular Devices", США). Значения 50 %-ных цитотоксических концентраций (TC<sub>50</sub>) препаратов рассчитывали при помощи программы Origin 8.0 ("OriginLab", США) по стандартному выражению:  $OD = \frac{OD_{max}}{1 + (\frac{C}{TC_{50}})^n}$ , где OD – оптическая плотность, C – концентрация ОДН, n – коэффициент Хилла. Статистическую обработку полученных результатов проводили по U-критерию Манна-Уитни.

### 2.2.4. Выделение ДНК из клеток

Высокоочищенную ДНК получали выделением из клеточных линий по методике, описанной (Sambrook and Russel 2001). Промытый троекратно в ТЕ-

буфере (pH=8,0) осадок клеток растворяли в 1,8 мл лизирующего буфера (10 mM EDTA; 0,1 M NaCl; 50 mM Трис-HCl, pH=8,0), с добавлением 2 мкл РНКазы (10 мг/мл), 5 мкл Протеиназы К (20 мг/мл) и SDS до концентрации 0,5 %. Смесь перемешивали и инкубировали в термостате при 37 °C до полного растворения осадка (2-4 часа). В дальнейшем проводили фенол-хлороформную экстракцию со спиртовой преципитацией ДНК. Полученную ДНК растворяли в ТЕ-буфере и определяли концентрацию нуклеиновых кислот на спектрофотометре NanoVue Plus (“GE Helthcare”, США).

### 2.2.5. GLAD-ПЦР анализ статуса метилирования ДНК

Предварительную фрагментацию ДНК проводили в 18,35 мкл реакционной смеси, содержащей 45 нг ДНК и 3 е.а. эндонуклеазы рестрикции *TaqI* в течение 15 минут при 65 °C в буфере следующего состава: 10 mM Tris-SO<sub>4</sub>, pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM β-меркаптоэтанол. Затем к *TaqI*-гидролизату добавляли 1-2 е.а. *GlaI* и компоненты буфера до достижения конечного состава 20 mM Tris-SO<sub>4</sub>, pH 8.0, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM β-меркаптоэтанол и 100 нг/мкл BSA, и проводили гидролиз в конечном объеме 21,7 мкл в течение 15 минут при 30 °C с последующей инактивацией *GlaI* при 65 °C в течение 20 минут. Далее к *GlaI*-гидролизату вносили АТФ до конечной концентрации 0,5 mM, β-меркаптоэтанол до 6,8 mM, универсальный адаптер до конечной концентрации 500 нМ и 1000 е.а. высокоактивной Т4 ДНК-лигазы. Реакцию лигирования адаптера проводили в 30 мкл реакционной смеси в течение 15 минут при 25 °C, затем лигазу термоинактивировали при 65 °C в течение 20 минут. Для проведения ПЦР ко всему объему полученной смеси добавляли следующие компоненты до достижения итоговых концентраций: 50 mM Tris-SO<sub>4</sub>, pH 9,0, 30 mM KCl, 10 mM сульфата аммония, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM смеси дезоксирибонуклеозид-трифосфатов, 0,01 % Tween-20, смесь праймеров и зонда по 0,4 мкМ каждого и 0,04 е.а./мкл Hot Start ДНК-полимеразы в конечном объеме равном 60 мкл, который разделяли на три равные части. Для повышения эффективности реакции

использовали стабилизатор для GC-ПЦР. Амплификацию проводили на детектирующем амплификаторе CXF-96 («Bio-Rad», США). Программа амплификации: 95 °C – 3 минуты, далее 5 циклов без детекции: 95 °C – 10 секунд, 61 °C – 15 секунд, 72 °C – 5 секунд; затем 40 циклов с детекцией (канал FAM) на стадии отжига: 95 °C – 10 секунд, 61 °C – 15 секунд, 72 °C – 5 секунд. Появление флуоресцентного сигнала в ходе ПЦР означало наличие последовательности R(5mC)GY в заданном положении протяженной ДНК.

Для оценки изменения статуса метилирования проводили GLAD-ПЦР анализ ДНК из клеток HeLa и CaSki после обработки ОДН в концентрации, равной 1 мкМ, против контроля ДНК из необработанных клеток HeLa и CaSki. Все измерения проводили троекратно. Для анализа данных использовали программу Bio-Rad CFX Manager v.2.1 («Bio-Rad», США), статистическую обработку проводили по U-критерию Манна-Уитни.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Дизайн олигонуклеотидов, специфичных к Dnmt1

С целью поиска эффективных олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 был синтезирован ряд олигодезоксирибонуклеотидов для получения различных одно-, двуцепочечных и шпилечных структур, содержащих неметилованный, полуметилованный или модифицированный участок узнавания фермента 5'-CpG-3'. При выборе ДНК-последовательностей ориентировались на существующие литературные данные, пытаясь максимально учесть совокупность известных экспериментальных фактов для получения эффективных лигандов. Так, во-первых, для эффективного взаимодействия с Dnmt1 длина субстратной ДНК при центрально расположенном CpG-сайте должна составлять не менее 22 п.н. (Laayoun and Smith 1995). Во-вторых, в ряде случаев показано, что фермент способен эффективно взаимодействовать с одноцепочечными (Flynn et al. 1998, Flynn et al. 2003) и самокомплементарными шпилечными структурами (Laayoun and Smith 1995, Christman et al. 1995, Bigey et al. 1999). В-третьих, скорость метилирования существенно зависит от наличия в сайте 5-метилцитозина (полуметилованный сайт) и некомплементарных или модифицированных оснований (Laayoun and Smith 1995, Christman et al. 1995, Sheikhnejad et al. 1999). В-четвертых, на сродство Dnmt1 к специфическому сайту оказывают сильное влияние фланкирующие нуклеотидные последовательности. В частности, показано преимущественное взаимодействие фермента с последовательностями 5'-CCG-3' (Kho et al. 1998), 5'-GCGG-3', 5'-CCGC-3' (Flynn et al. 1998), 5'-CCGG-3' и 5'-CGCTC-3' (Goyal et al. 2006), поэтому нами была выбрана консенсусная шестизвенная последовательность 5'-CCGCTC-3'. В-пятых, известно, что замена межнауклеотидных фосфатов на фосфотиоаты в районе сайта 5'-CpG-3' и прилегающих последовательностей способна заметно повышать сродство олигонуклеотида к ферменту и его ингибиторные свойства (Flynn et al. 2003).

В таблице 2 приведены синтезированные в результате ДНК-структуры, полученные на основе выбранной базовой 22-звенной последовательности



5'-GAAATGGATCCGCTCTAAACTG-3' (и комплементарной ей цепи). В часть структур дополнительно вводили замены цитозина-мишени метилирования на 5,6-дигидро-5-азацитозин, 5-метил-2-пиримидинон и 6-метил-пирроло-[2,3-d]-2-пиримидинон (рис. 6). Известно, что 5,6-дигидро-5-азацитозин и 2-пиримидинон (без 5-метильной группы) характеризуются более высоким сродством к цитозин-специфичным МТазам, чем к нативному цитозину (Sheikhnejad et al. 1999, Zhou et al. 2002). Третье соединение — 6-метил-пирроло-[2,3-d]-2-пиримидинон — синтезированный флуоресцентный аналог цитозина (Liu and Martin 2001), тестируемый здесь впервые.

### 3.2. Субстратные свойства синтетических олигонуклеотидных структур

В качестве стандартной субстратной ДНК использовали полимер поли(dI-dC)·поли(dI-dC), характеризующийся высокой скоростью его метилирования МТазой Dnmt1. Нужно отметить, что низкая стабильность фермента и невысокая скорость его каталитического оборота *in vitro* требуют тщательного подбора условий эксперимента для достижения уверенно детектируемых степеней метилирования ДНК.

На рисунке 7А представлена зависимость катализируемого Dnmt1 переноса меченных тритием метильных групп от [ $^3\text{H-CH}_3$ ]AdoMet на ДНК от времени реакции. Линейный характер зависимости показывает, что в течение 3 часов фермент сохранял активность. Этот временной интервал выбран для дальнейших экспериментов. Оптимальные концентрации субстратов определены по соответствующим концентрационным зависимостям активности Dnmt1 (рис. 7Б и 7В). На рисунке 7Б видно характерное субстратное ингибирование фермента высокими концентрациями поли(dI-dC)·поли(dI-dC), обусловленное, по-видимому, взаимодействием субстратной ДНК с аллостерическим сайтом, расположенным в N-концевом домене Dnmt1 (Svedruzic and Reich 2005b).

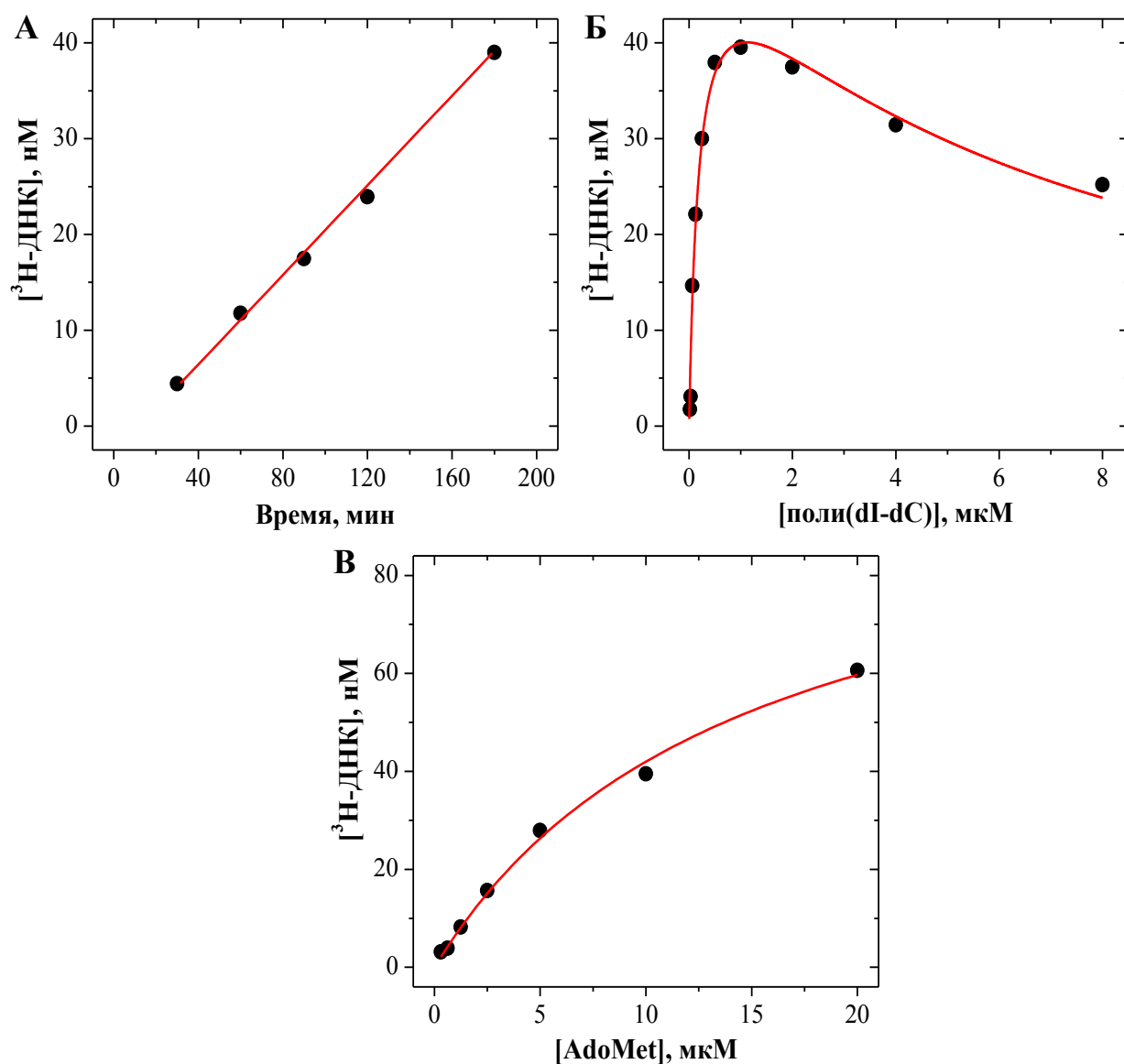


Рис. 7. Анализ ферментативной активности Dnmt1. Реакционные смеси содержали 0,05 е.а./мкл фермента. Зависимости: включения  $^3\text{H}$ -метки в субстратную ДНК ( $\text{поли(dI-dC)} \cdot \text{поли(dI-dC)} = 1 \text{ мкМ}$ ,  $[^3\text{H-CH}_3]\text{AdoMet} = 10 \text{ мкМ}$ ) от времени реакции (А); активности Dnmt1 от концентрации субстратной ДНК ( $[^3\text{H-CH}_3]\text{AdoMet} = 10 \text{ мкМ}$ ) (Б); активности Dnmt от концентрации AdoMet ( $\text{поли(dI-dC)} \cdot \text{поли(dI-dC)} = 1 \text{ мкМ}$ ) (В).

Результаты оценки субстратных свойств олигонуклеотидных структур в сравнении с  $\text{поли(dI-dC)} \cdot \text{поли(dI-dC)}$  представлены в таблице 5.

Таблица 5

Оценка субстратных/ингибиторных свойств синтетических олигонуклеотидных структур в конкуренции с ДНК-полимером поли(dI-dC)·поли(dI-dC)

Лиганд	% метилирования относительно dI-dC	% метилирования смеси с dI-dC	% ингибирования метилирования dI-dC
RG108	0	86	14
GC-box <sup>bMET</sup>	0	96	4
ОДН-1S	0	90	10
ОДН-2S	17	73	44
ОДН-3S	0	79	21
ОДН-4S	0	64	36
ОДН-5S	2	60	42
ОДН-6S	0	32	68
ОДН-7S	0	53	47
ОДН-8S	0	21	79
ОДН-1D	16	86	30
ОДН-2D	13	82	31
ОДН-3D	0	43	57
ОДН-4D	400	229	–
ОДН-5D	382	309	–
ОДН-6D	179	170	–
ОДН-7D	37	96	41
ОДН-8D	0	34	66
ОДН-9D	23	67	56
ОДН-10D	0	43	57
ОДН-11D	0	19	81
ОДН-12D	0	17	83
ОДН-13D	0	12	88
ОДН-14D	0	15	85
ОДН-15D	0	14	86
ОДН-16D	0	35	65

Лиганд	% метилирования относительно dI-dC	% метилирования смеси с dI-dC	% ингибирования метилирования dI-dC
ОДН-17D	0	43	57
ОДН-18D	0	15	85
ОДН-1Н	0	32	68
ОДН-2Н	23	53	70
ОДН-3Н	25	60	65
ОДН-4Н	0	22	78
ОДН-5Н	0	6	94

Примечание. RG108 — N-фталил-1-триптофан (рис. 6). Реакционные смеси содержали 0,05 ед. акт./мкл Dnmt1, 10 мкМ [ $^3\text{H}$ -CH $_3$ ]AdoMet, 1 мкМ поли(dI-dC)·поли(dI-dC) (в пересчете на сайты 5'-CI-3') и/или 1 мкМ лиганда.

В качестве контрольных ингибиторов использовали низкомолекулярное соединение N-фталил-1-триптофан (рис. 6) и дополнительно синтезированный 30-звенный олигонуклеотид GC-box<sup>bMET</sup> (см. табл. 2), показавшие ранее ингибирующий эффект *in vitro* в отношении бактериальной МТаза SssI и мышиной Dnmt1 и вызывавшие деметилирование геномной ДНК и реактивацию генов-супрессоров опухолей (Flynn et al. 2003, Brueckner et al. 2005). Как и ожидалось, одноцепочечные олигонуклеотиды не проявили заметных субстратных свойств, исключение составил олигонуклеотид ОДН-2S, который оказался способным к модификации (табл. 5). Можно предположить образование короткоживущего дуплекса ОДН-2S-ОДН-2S за счет спаривания олигонуклеотидов по имеющейся палиндромной последовательности 5'-GGATCC-3', с которым МТаза способна взаимодействовать, катализируя метилирование 3'-концевых остатков цитозина палиндрома. Ранее на примере ДНК-метилтрансферазы *EcoDam* было показано, что МТаза действительно могут стабилизировать и метилировать подобные дуплексы (Buryanov et al. 1988). Однако этот же палиндром содержится и в остальных олигонуклеотидах. Таким образом, более вероятно, что дополнительно введенный в олигонуклеотид ОДН-

2S метилированный динуклеотид 5'-MG-3' стимулирует метилирование первого динуклеотида 5'-CG-3', что наблюдали и ранее при взаимодействии Dnmt1 с одноцепочечными олигонуклеотидами (Bacolla et al. 2001, Flynn et al. 2003). Дальнейшее введение в структуру олигонуклеотида ОДН-2S фосфотиоатов резко снижало его субстратный потенциал (см. ОДН-5S, табл. 4). Двухцепочечные и шпильчатые структуры, потенциально способные быть акцепторами метильной группы (содержащие в участке узнавания нативный цитозин), проявляли субстратные свойства широкого диапазона. Структуры ОДН-1D, ОДН-2Н и ОДН-3Н, несущие канонический полуметилированный сайт, ожидаемо являлись субстратами для Dnmt1 и метилировались в 4-6 раз медленнее поли(dI-dC)·поли(dI-dC). Интересно, что дополнительный динуклеотид 5'-MG-3', стимулирующий взаимодействие Dnmt1 с одноцепочечной структурой ОДН-2S, терял свою эффекторную активность в двухцепочечных структурах, уже содержащих канонический полуметилированный сайт (ср. ОДН-1D с ОДН-2D и ОДН-2Н с ОДН-3Н, табл. 5). Резко выделялись своими “суперсубстратными” свойствами дуплексы ОДН-4D-6D, метилировавшиеся в 2-4 раза быстрее поли(dI-dC)·поли(dI-dC), наиболее эффективного из известных субстратов Dnmt1. Их общей отличительной особенностью является некомплементарное размещение цитозина-мишени метилирования против аденина, а в случае дуплекса ОДН-6D – экстраспиральное расположение динуклеотида CC. По-видимому, эти структурные особенности существенно облегчают “выворачивание” цитозина-мишени из двойной спирали ДНК в активный центр фермента. Дополнительное введение пяти фосфотиоатов в район участка узнавания предотвращало реакцию метилирования (см. ОДН-10D, ОДН-15D, ОДН-4Н, ОДН-5Н, табл. 5).

### **3.3. Ингибиторные свойства олигонуклеотидных структур в отношении активности Dnmt1**

Оценку ингибиторных свойств синтетических олигонуклеотидных структур проводили, сравнивая степень их собственного метилирования Dnmt1 со

степенью метилирования их смесей с ДНК-субстратом поли(dI-dC)·поли(dI-dC). Процент ингибирования реакции метилирования ДНК-субстрата в смесях, вычисленный по разнице степеней метилирования, представлен в табл. 5. Среди одноцепочечных олигонуклеотидов выраженные ингибиторные свойства проявил олигонуклеотид ОДН-2S (44 %), содержащий дополнительный метилированный динуклеотид 5'-MG-3' (Bacolla et al. 2001, Flynn et al. 2003), а также олигонуклеотиды ОДН-4S-8S, несущие в районе участка узнавания замены межнуклеотидных фосфатов на фосфотиоаты (36-79 %) (Bigey et al. 1999, Flynn et al. 2003). Из последних наиболее эффективным ингибитором был ОДН-8S, содержащий дополнительную замену цитозина в участке узнавания на 5,6-дигидро-5-азацитозин (79 %). Неожиданно слабым ингибитором оказался синтезированный в качестве дополнительного контроля олигонуклеотид GC-box<sup>bMET</sup> (4 %), показавший ранее сильный ингибирующий эффект на мышинной Dnmt1 (Flynn et al. 2003), что может быть связано с определенными различиями ферментов мыши и человека. Также сравнительно слабым был известный низкомолекулярный ингибитор Dnmt1 N-фталил-1-триптофан (14 %). В ряду двуцепочечных и шпилечных олигонуклеотидных структур практически все соединения демонстрировали выраженные ингибирующие свойства (30-94 %), а семь из них показали ингибирование >80 %. В первую очередь стоит отметить структуры ОДН-15D (86 %), ОДН-18D (85 %) и ОДН-5H (94 %), общими элементами для которых являлись некомплементарность C:A (D:A для ОДН-18D) и замещение фосфатов на фосфотиоаты, а также дуплекс ОДН-14D (85 % ингибирования), содержащий в участке узнавания новый аналог цитозина — 6-метил-пирроло-[2,3-d]-2-пиримидинон. Сравнение свойств шпилечных структур ОДН-1H и ОДН-2H показало, что делеция остатка цитозина в верхней цепи сайта узнавания не сказывается на способности дуплекса ОДН-1H ингибировать метилирование субстрата. В случае дуплексов ОДН-4D-6D подобная методика оценки ингибирования реакции метилирования альтернативной ДНК оказалась неприемлемой в силу обнаруженных их “суперсубстратных” свойств.

Далее для отдельных олигонуклеотидных структур, показавших хороший ингибирующий эффект, с целью его дальнейшей оценки измеряли зависимости скоростей реакции метилирования 1 мкМ поли(dI-dC)·поли(dI-dC) от количества ингибитора и определяли 50 %-ные ингибирующие концентрации ( $IC_{50}$ ) (табл. 6 и рис. 8). Олигонуклеотиды для данного эксперимента подбирали исходя из структуры и ингибирующего потенциала, чтобы была возможность оценить влияние модификаций и/или замен на подавление реакции метилирования субстрата Dnmt1.

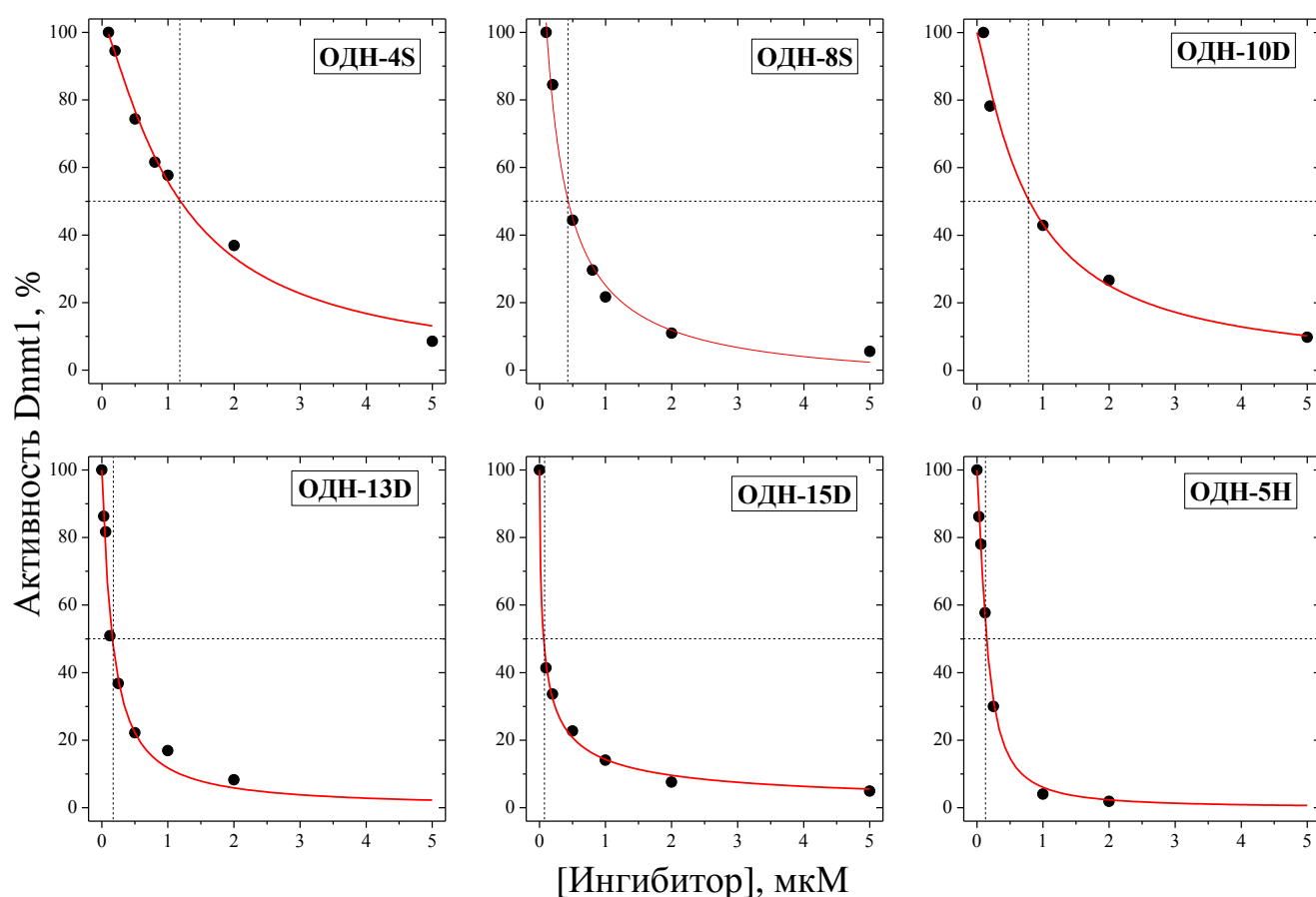


Рис. 8. Ингибирование активности Dnmt1 возрастающими концентрациями олигонуклеотидных ингибиторов. Реакционные смеси содержали 1 мкМ поли(dI-dC)·поли(dI-dC), 10 мкМ [ $^3H$ -CH $_3$ ]AdoMet и 0,05 ед. акт./мкл Dnmt1. Расчетные значения  $IC_{50}$  и структуры ОДН приведены в таблице 6.

Таблица 6

Значения  $IC_{50}$  для отдельных ОДН при ингибировании реакции метилирования  
1 мкМ поли(dI-dC)·поли(dI-dC)

Лиганд	Структура*	$IC_{50}$ , нМ
ОДН-4S	5' GAAATGGATC <u>CG</u> CTCTAAACTG	1120±110
ОДН-8S	5' GAAATGGATC <u>DG</u> CTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC	224±61
ОДН-10D	5' GAAATGGATC <u>CG</u> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC	795±108
ОДН-13D	5' GAAATGGATC <u>ZG</u> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>GM</b> GAGATTTGAC	162±14
ОДН-15D	5' GAAATGGATC <u>CG</u> CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGAC	65±10
ОДН-5H	5' GAAATGGATC <u>CG</u> CTCTAAACTGCC <sub>C</sub> 3' CTTTACCTAG <b>AM</b> GAGATTTGACCC <sub>C</sub>	144±7

Примечание. \*М – 5-метилцитозин, D – 5,6-дигидро-5-азацитозин и Z – 5-метил-2-пиримидинон (см. рис. 6). Подчеркнуты нуклеотиды, содержащие по 5'- и 3'-концам фосфотиоаты; жирным шрифтом выделены нативные либо модифицированные участки 5'-CG-3'.

Самое высокое значение  $IC_{50}$  (1120 нМ) зафиксировано у ОДН-4S (табл. 6), обладающего наименьшим процентом ингибирования (36 %). Это можно объяснить неэффективностью одноцепочечной структуры в качестве субстрата для Dnmt1. Однако добавление дополнительного сайта 5'-MG-3' и наличие модифицированного основания — 5,6-дигидро-5-азацитозина (ОДН-8S) — уменьшают 50 %-ную ингибирующую концентрацию в 5 раз до значения 224 нМ (табл. 6). Показательно сравнение полученных величин  $IC_{50}$  в ряду фосфотиоат-содержащих структур ОДН-4S, ОДН-10D и ОДН-13D (рис. 8 и табл. 6): значения  $IC_{50}$  отчетливо понижаются при переходе от одно- (1120 нМ) к двуцепочечной структуре (795 нМ) и при дальнейшей замене цитозина его более аффинным аналогом — 5-метил-2-пиримидиноном (162 нМ). Ожидаемо хорошими параметрами  $IC_{50}$  характеризуются ингибиторы ОДН-15D и ОДН-5H (табл. 6),



отличительной особенностью которых является некомплементарное размещение цитозина-мишени против аденина.

Таким образом, наибольший ингибирующий эффект проявляли олигонуклеотиды, у которых сочетались несколько модификаций базовой последовательности, а именно: введение в структуру ингибитора высокоаффинных аналогов цитозина, наличие неспаренных оснований в сайте узнавания, двуцепочечная или шпилечная структура и замена фосфатов на фосфотиоаты (например, ОДН-15D, ОДН-18D и ОДН-5H, табл. 2 и 5). На основании того, что модифицированные аналоги цитозина (5,6-дигидро-5-азацитозин и 5-метил-2-пиримидинон), введенные в сайт узнавания МТазы, показывают существенное снижение  $IC_{50}$  только в сравнении с интактной структурой (ср. ОДН-10D и ОДН-13D в табл. 6), тогда как сама по себе С:А некомплементарность в ОДН-15D снижает  $IC_{50}$  почти в три раза (табл. 6) при сопоставимой эффективности ингибирования (табл. 5), было решено в дальнейшие эксперименты на раковых клетках брать структуры с неспаренными основаниями в сайте-мишени Dnmt1 и дополнительно модифицировать все фосфаты в фосфотиоаты для защиты от экзо- и эндонуклеазной активности ферментов клетки. Кроме того, во избежание спонтанной денатурации двуцепочечные структуры не применялись для экспериментов с раковыми клетками, а были заменены шпилечными аналогами.

В итоге для экспериментов на клеточных культурах были синтезированы следующие ингибиторы: одноцепочечный ОДН-1 и шпилечные ОДН-2-4 (табл. 2). Они также были оценены с точки зрения способности ингибировать Dnmt1 в реакции метилирования субстрата *in vitro*. Результаты представлены в таблице 7. Кроме того, был дополнительно синтезирован контрольный олигонуклеотид ОДН-К, не обладающий субстратными свойствами и способностью ингибировать реакцию метилирования.

Таблица 7

Оценка субстратных/ингибиторных свойств синтетических олигонуклеотидных структур в конкуренции с ДНК-полимером поли(dI-dC)·поли(dI-dC)

Лиганд	% метилирования относительно dI-dC	% метилирования смеси с dI-dC	% ингибирования метилирования dI-dC
ОДН-К	0	0	0
ОДН-1	0	13	87
ОДН-2	0	24	76
ОДН-3	0	18	82
ОДН-4	0	18	82

Как видно из таблицы, некоторые выбранные структуры проявляют лучшие ингибиторные свойства по сравнению со своими прототипами: ОДН-1 значительно превосходит ОДН-6S по эффективности ингибирования (87 % против 68 %, см. табл. 5 и 7), а ОДН-2 (76 %) ненамного, но эффективнее, чем ОДН-4Н (70 %). ОДН-3 и ОДН-4 (по 82 %), напротив, проигрывают в способности ингибировать реакцию метилирования dI-dC ОДН-5Н (94 %) и ОДН-15D (86 %), соответственно (см. табл. 5 и 7).

### **3.4. Локализация олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 в клетках карцином шейки матки**

Для исследования способности ОДН проникать в клетки HeLa и CaSki и сохраняться в них длительное время были синтезированы олигонуклеотиды (ОДН-1F и ОДН-2F, см. табл. 2), меченные по 5'-концу флуоресцентным красителем (карбоксифлуоресцеином, FAM), не обладающие ингибирующим потенциалом в отношении Dnmt1, но максимально близкие по составу к ингибиторам ОДН-1-4. В качестве дополнительной защиты от нуклеаз клетки все фосфаты в них были заменены фосфотиоатами. Олигонуклеотид ОДН-1F

представляет собой одноцепочечный лиганд (аналог ОДН-1, см. табл. 2), а олигонуклеотид ОДН-2F образует самокомплементарную шпильчатую структуру (аналог ОДН-2, см. табл. 2). В эксперименте использовали ингибиторы в концентрациях 10, 50 и 100 нМ. Эффективность трансфекции оценивали при соотношениях олигонуклеотид/липофектамин 1:2 и 1:3 по массе.

На рисунке 9 приведены фотографии флуоресценции ОДН-1F в клетках HeLa и CaSki после экспозиции 100 нМ олигонуклеотида. Использование ОДН-2F вместо ОДН-1F, а также снижение концентрации препарата в среде, вплоть до 10 нМ, не приводило к значительному изменению картины флуоресценции.

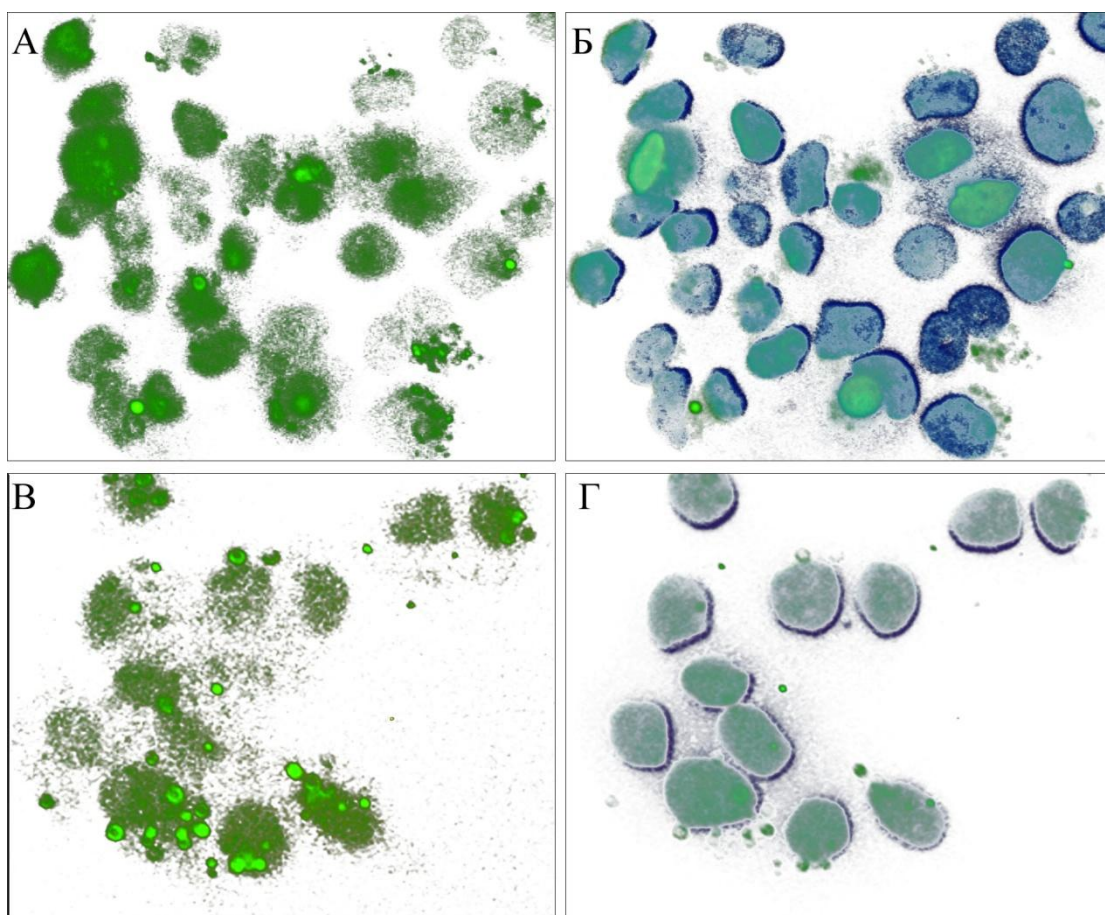


Рис. 9. Оценка проникновения и преимущественной локализации олигонуклеотида ОДН-1F (концентрация в среде 100 нМ) в клетках HeLa (А, Б) и CaSki (В, Г). А, В — флуоресценция ОДН, Б, Г — то же, но с наложением свечения ядер клеток, окрашенных DAPI.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что выбранные условия эксперимента обеспечивают эффективную доставку синтетических

структур в клетки. При этом интенсивность флуоресценции (а, следовательно, и концентрация ОДН) в подавляющем большинстве (до 90-100 %) клеточных ядер практически одинакова. Ранее многими авторами также было показано, что некоторая часть (10-50 % от общего количества) радиоактивно и флуоресцентно меченных олигонуклеотидов, поглощенных клетками, оказывается в клеточном ядре (Beltinger et al. 1995, Shestova et al. 1999). Таким образом, исследованные в настоящей работе ингибиторы Dnmt1 после трансфекции локализуются непосредственно там, где происходит реакция метилирования ДНК.

Путем подбора соотношения “ингибитор/липофектамин” с целью оптимизации процесса трансфекции было установлено, что олигонуклеотиды ОДН-1F и ОДН-2F, взятые во всех указанных концентрациях, одинаково хорошо проникают в ядра клеток при соотношении “ингибитор/липофектамин” 1:2 и 1:3. Исходя из этого, в дальнейших экспериментах было использовано массовое соотношение ОДН и трансфецирующего агента, равное 1:2, в целях снижения цитотоксического эффекта самого липофектамина.

При изучении деградации олигонуклеотидов ОДН-1F и ОДН-2F в клетках HeLa в течение 72 часов было выявлено постепенное снижение интенсивности свечения в цитоплазме начиная с первого дня эксперимента, тогда как флуоресценция в клеточных ядрах начинала снижаться только после трех дней культивации (рис. 10). В клетках CaSki оба олигонуклеотида продемонстрировали схожие результаты (рис. 11), однако, окрашивание ядер на третий день было интенсивнее, чем в клетках HeLa. Это можно объяснить расходом ОДН в результате деления клеток, а различия во флуоресценции на третий день являются следствием неодинакового темпа клеточных делений, что подтверждается литературными данными (Радаева и др. 2009). Таким образом, можно предполагать, что в суточных экспериментах с немечеными ОДН не происходит значимой деградации ингибитора в клетках.

Однако при планировании долгосрочных опытов можно порекомендовать повторную обработку клеток ОДН на третьи сутки, чтобы компенсировать снижение количества ингибитора в результате деления клеток.



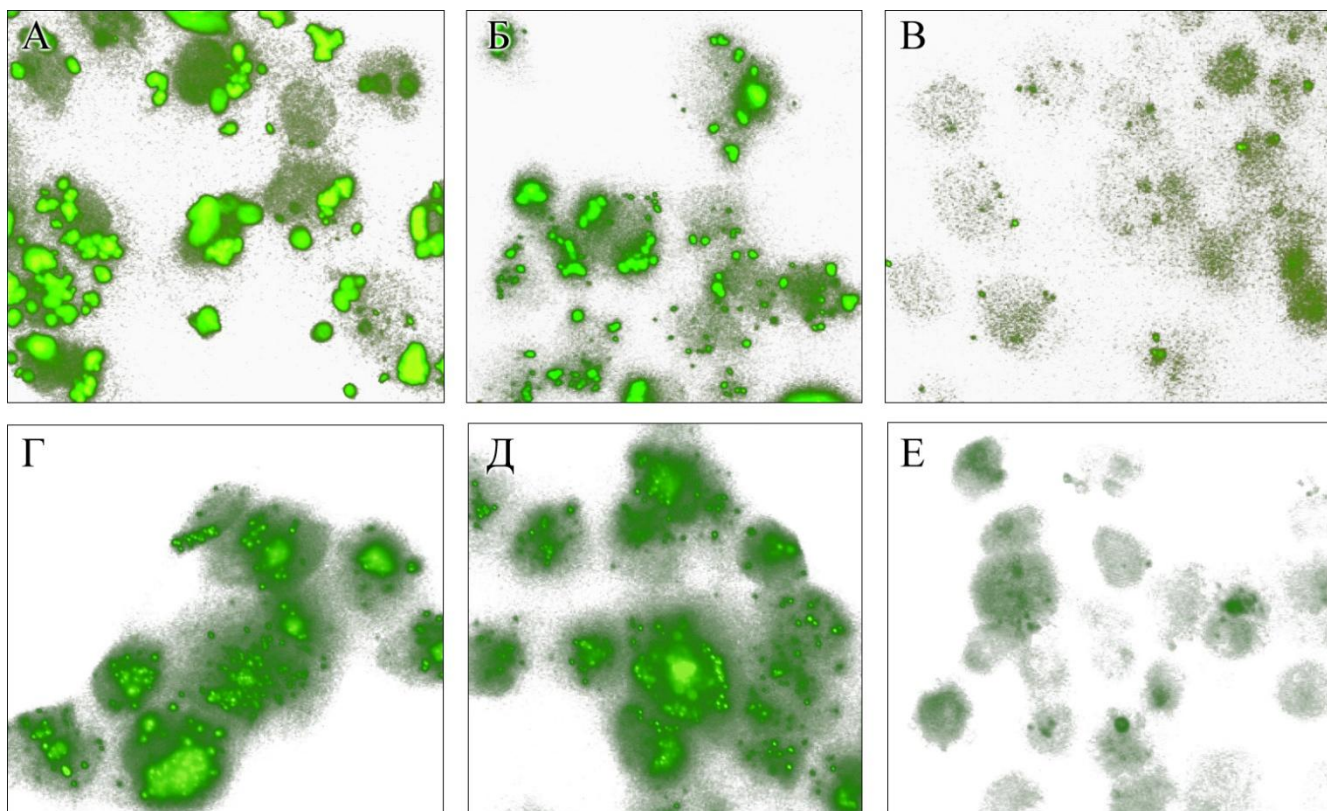


Рис. 10. Устойчивость олигонуклеотидов ОДН-1F (А — 24 ч, Б — 48 ч, В — 72 ч) и ОДН-2F (Г — 24 ч, Д — 48 ч, Е — 72 ч) в клетках HeLa.

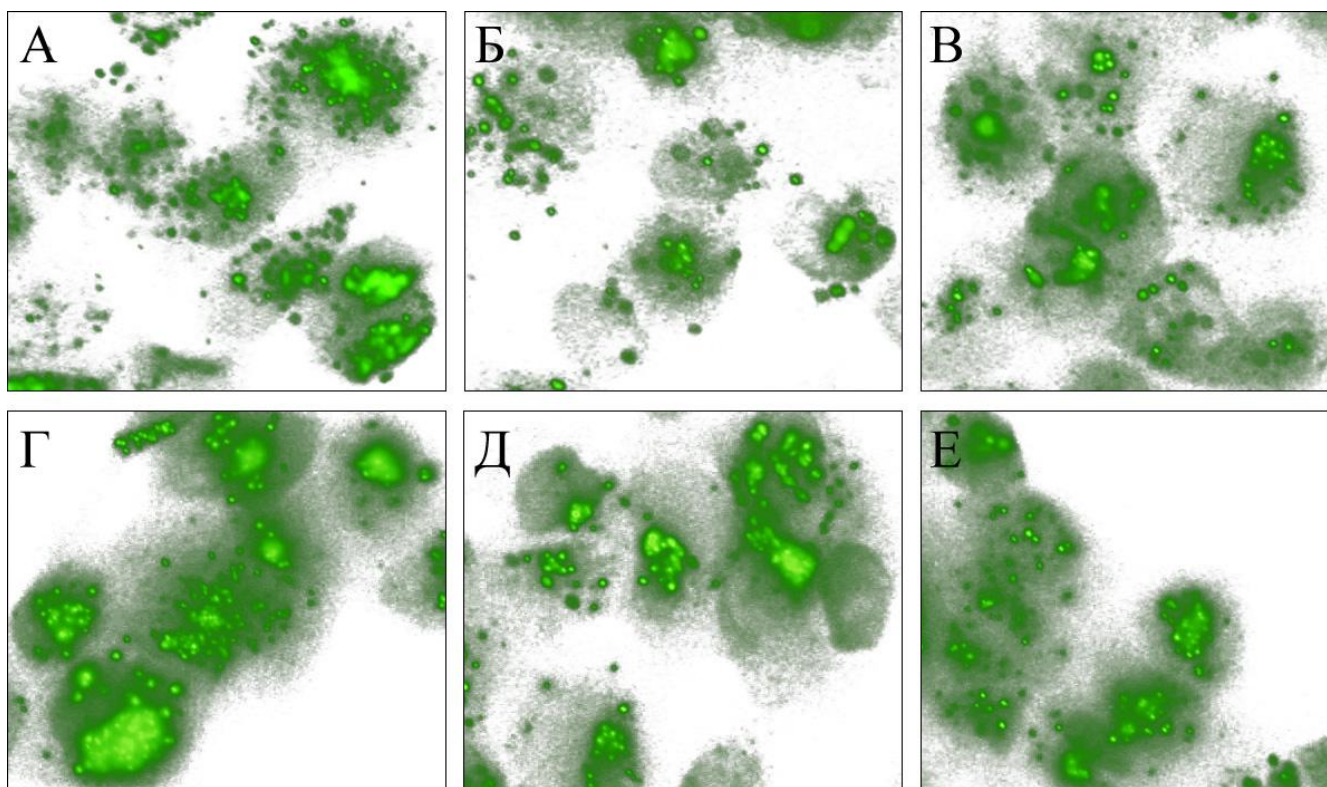


Рис. 11. Устойчивость олигонуклеотидов ОДН-1F (А — 24 ч, Б — 48 ч, В — 72 ч) и ОДН-2F (Г — 24 ч, Д — 48 ч, Е — 72 ч) в клетках CaSki.

### **3.5. Оценка цитотоксичности олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1**

Для оценки токсического действия ингибиторов Dnmt1 на клетки HeLa, CaSki и L-68 были проведены эксперименты по изучению влияния различных концентраций олигонуклеотидов (от 1,25 до 1280 нМ) на жизнеспособность клеток. На рисунке 12 изображены зависимости количества живых клеток трех линий (в единицах оптической плотности) от концентрации ингибиторов в ростовой среде. Значения 50 %-ных токсических концентраций (ТС<sub>50</sub>) приведены в таблице 8.

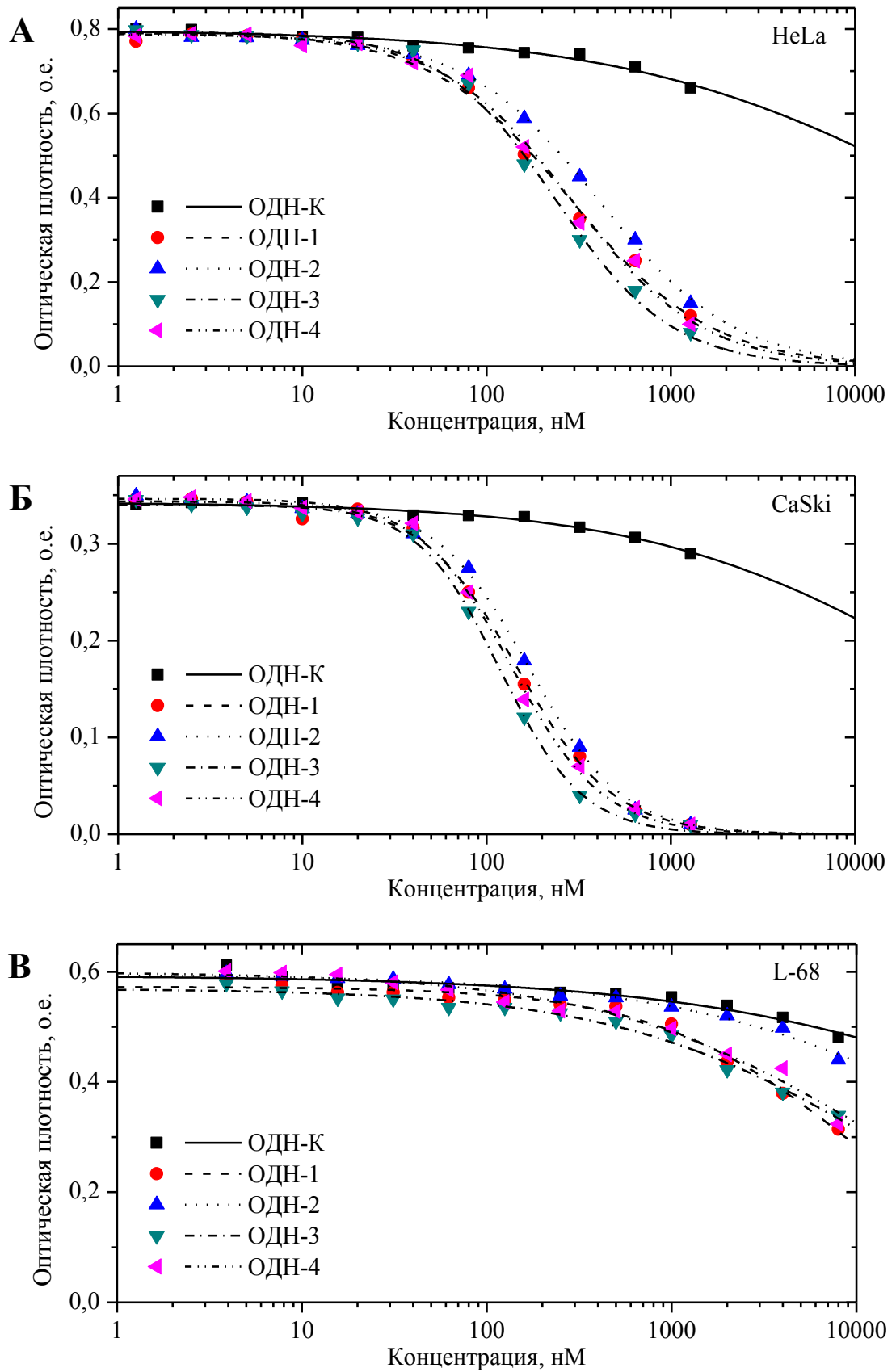


Рис. 12. Цитотоксическая активность олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 на культурах клеток HeLa (А), CaSki (Б) и L-68 (В) в зависимости от концентрации ОДН (нМ).

Оценка цитотоксического действия олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 в отношении клеточных линий HeLa, CaSki и L-68

№	Структура (5'→3')*	TC <sub>50</sub> , нМ		
		HeLa	CaSki	L-68
ОДН-К	<u>GAAATGGATCATCTCTAAACTG</u>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>
ОДН-1	<u>GAAATGGATC<b>MG</b>CTCTAAACTGCC<b>MG</b>CC</u>	285±15*	147±5*	>10 <sup>4</sup>
ОДН-2	<u>GAATGGATC<b>MG</b>CTCTAACTG</u> <sub>C</sub> <u>CTTACCTAG<b>GC</b>GAGATTGAC</u> <sub>C</sub>	408±9*	170±5*	>10 <sup>4</sup>
ОДН-3	<u>GAATGGATC<b>CG</b>CTCTAACTG</u> <sub>C</sub> <u>CTTACCTAG<b>A</b>MGAGATTGAC</u> <sub>C</sub>	236±10*	118±3*	>10 <sup>4</sup>
ОДН-4	<u>GAATGGATC<b>MA</b>CTCTAACTG</u> <sub>C</sub> <u>CTTACCTAG<b>GC</b>GAGATTGAC</u> <sub>C</sub>	290±18*	136±5*	>10 <sup>4</sup>

Примечание: **М** — 5-метилцитозин. Подчеркнуты нуклеотиды, содержащие по 5'- и 3'-концам фосфотиоаты; жирным шрифтом выделены нативные либо модифицированные участки 5'-CG-3'. \* – различия с контрольным ОДН статистически значимы,  $p < 0,01$ .

Для исследованных синтетических ингибиторов получены весьма низкие значения TC<sub>50</sub> в отношении раковых клеток (118-408 нМ, см. табл. 8), в то время как для фибробластов L-68 TC<sub>50</sub> оказалась на уровне контроля (>10<sup>4</sup> нМ). Различие с контролем более чем в 100 раз указывают на хороший терапевтический потенциал сконструированных олигонуклеотидов. Наиболее эффективным оказался ОДН-3 (TC<sub>50,HeLa</sub> = 236 нМ, TC<sub>50,CaSki</sub> = 118 нМ, см. табл. 8), содержащий полуметилированный сайт с С:А некомплементарностью. Несколько хуже проявил себя ОДН-4 (TC<sub>50,HeLa</sub> = 290 нМ, TC<sub>50,CaSki</sub> = 136 нМ, см. табл. 8), являющийся аналогом ОДН-3 с той лишь разницей, что метилированный остаток цитозина располагается на комплементарной цепи. Достаточно близкие показатели TC<sub>50</sub> получены для ОДН-1 (285 нМ и 147 нМ соответственно, см. табл. 8), а ОДН-2 продемонстрировал максимальные значения TC<sub>50</sub> (408 и 170 нМ).



Сравнивая эффективность ингибирования роста клеток HeLa ( $TC_{50}$  ингибиторов Dnmt1 = 236-408 нМ) и CaSki ( $TC_{50}$  ингибиторов Dnmt1 = 118-170 нМ), можно предположить, что выявленное различие в чувствительности клеточных линий к ОДН обусловлено неодинаковым функциональным значением aberrантного гиперметилирования ДНК для прогрессии различных типов рака шейки матки (Qiang et al. 2012). Поскольку доставка ингибитора в клетку осуществляется посредством катионных липосом (трансфекция), было решено также оценить цитотоксическое действие препарата Липофектамин 2000. Для исследования влияния трансфецирующего агента на жизнеспособность клеток в ростовую среду вносили липофектамин в количествах, необходимых для транспортировки ингибиторов ОДН-1-4, взятых в аналогичных опыту концентрациях. Полученные значения  $TC_{50}$  для липофектамина более чем на порядок отличались от  $TC_{50}$  ингибиторов, что позволило считать его вклад в цитотоксический эффект ОДН незначительным.

### **3.6. Адаптация метода GLAD-ПЦР для анализа статуса метилирования ДНК**

В настоящее время “золотым стандартом” для оценки статуса метилирования ДНК являются методы, основанные на бисульфитной конверсии ДНК (von Kanel and Huber 2013). Однако у данной группы методов имеются существенные недостатки: высокая вероятность неполной конверсии и деградации ДНК, многостадийность, длительность и трудоемкость исследования (Warnecke et al. 2002, von Kanel and Huber 2013), что делает их применение нерациональным для анализа большого количества образцов ДНК по нескольким регионам.

С другой стороны, методы, основанные на использовании эндонуклеаз рестрикции, активность которых определяется наличием или отсутствием 5-метилцитозина в сайтах узнавания, обладают рядом преимуществ: для анализа используется ДНК без дополнительной обработки, сокращается как время исследования (до 1,5-5 часов от момента выделения ДНК), так и число

необходимых манипуляций (von Kanel and Huber 2013). Для исследования эпигенетического статуса участков ДНК чаще всего применяются эндонуклеазы рестрикции, ингибируемые метилированием цитозиновых оснований в сайтах узнавания. Например, эндонуклеазы *HpaII* и *MspI*, узнающие последовательность 5'-CCGG-3', блокируются по-разному: *HpaII* не способна расщеплять последовательность 5'-(5mC)CGG-3', а *MspI* — 5'-C(5mC)GG-3' (Zilberman and Henikoff 2007). К недостаткам метода можно отнести возможность неполного гидролиза ДНК, дающего ложноположительный результат, а также то, что последовательность 5'-CCGG-3' в отличие от RCGY не является сайтом для аберрантного метилирования *de novo*. Другие метилчувствительные эндонуклеазы рестрикции (*HhaI*, *BstUI*, *AclI* и т.д.) тоже неприменимы для полноценного анализа статуса метилирования ДНК, поскольку узнаваемые ими последовательности включают в себя лишь некоторые из возможных сайтов метилирования ДНК эукариот. Кроме того, указанные ферменты не имеют изошизомеров, отличающихся по чувствительности к метилированию цитозинового основания в CG-динуклеотиде (что желательно для создания положительных контролей в экспериментах).

Альтернативным подходом является использование метилзависимых эндонуклеаз, которые специфически фрагментируют только метилированную ДНК. Недавно зарубежными исследователями в этих целях был использован фермент *McrBC*, узнающий последовательность R(5mC)N<sub>40-3000</sub>R(5mC) и расщепляющий ее вблизи от одного из двух узнаваемых динуклеотидов (Yamada et al. 2004, Oakes et al. 2006, Hublarova et al. 2009). Неспецифичность гидролиза и большое расстояние между узнаваемыми последовательностями R(5mC) существенно ограничивает возможность применения *McrBC* для исследования произвольно выбранной области ДНК. В то же время сайт узнавания метилзависимой ДНК-эндонуклеазы *GlaI* (R(5mC)↓GY, место гидролиза указано стрелкой) (Чернухин и др. 2006, Tarasova et al. 2008) полностью соответствует последовательности ДНК, модифицируемой *de novo* клеточными метилазами *Dnmt3a* и *Dnmt3b*, что позволяет применять основанные на ней методы для

анализа aberrантного метилирования ДНК. Стоит отметить, что ранее был предложен метод анализа статуса метилирования участков ДНК — *GlaI*-ПЦР анализ (Гончар и др. 2010, Акишев и др. 2011), однако его использование в данной работе было нерационально, так как он обладал недостатками присущими MSP методам. В частности, для правильной оценки результатов необходимо точно разделять исследуемую ДНК на две равные части, одну из которых обрабатывали *GlaI*, а другая служила контролем, что приводило к инструментальным погрешностям. Поэтому было решено адаптировать новый способ определения метилированной последовательности R(5mC)GY в заданном положении протяженной ДНК — GLAD-ПЦР анализ (*GlaI* digestion and Ligation Adapter Dependent ПЦР) — для изучения изменения картины метилирования ДНК при использовании ингибиторов Dnmt1. На рисунке 13 схематично отображен принцип метода.

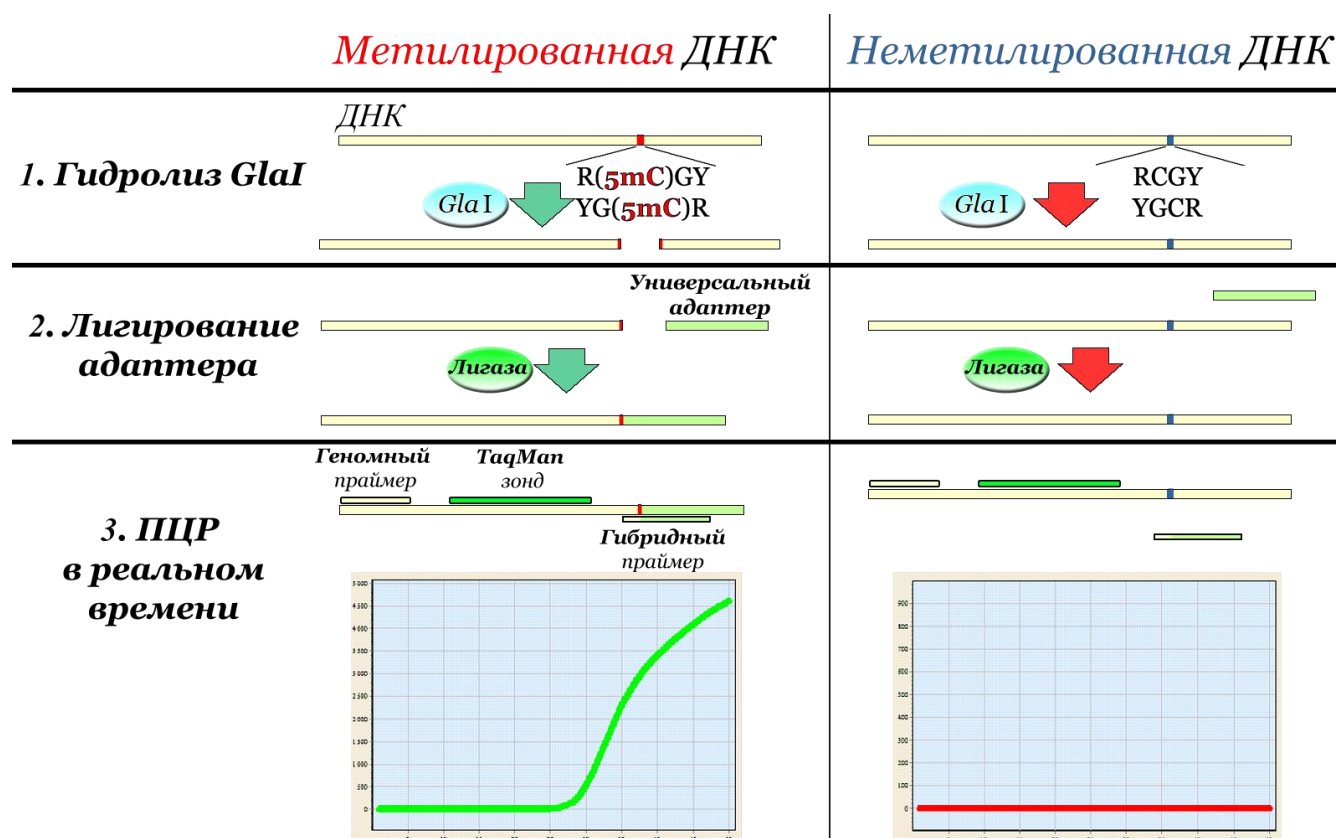


Рис. 13. Принцип GLAD-ПЦР анализа.

Выбор метода был не случаен, так как он выгодно отличался от широко распространенных на сегодняшний день методов. В таблице 9 приведено сравнение GLAD-ПЦР анализа с методами, основанными на бисульфитной конверсии ДНК.

Таблица 9

Сравнение GLAD-ПЦР анализа и бисульфитных методов.

Параметр	Бисульфитные методы	GLAD-ПЦР анализ
Аналитическая чувствительность	От 500 пг	От 20 пг
Специфичность	До 80%	100%
Время анализа	> 12 часов	< 5 часов
Предобработка ДНК	Есть	Нет
Деградация ДНК	Значительная	Нет
Сложность	От 5 стадий в разных пробирках	3 реакции в одной пробирке
Экономичность	Часто требуют дорогостоящего оборудования	Не требует дорогостоящего оборудования
Чувствительность к примеси неметилированной ДНК	Высокая	Нет

Так как GLAD-ПЦР анализ раньше не применялся для оценки эффективности подавления аберрантного гиперметилирования под воздействием ОДН ингибиторов, необходимо было адаптировать следующие условия реакций: подобрать оптимальную концентрацию универсального адаптера, подобрать оптимальную структуру гибридного праймера и определить влияние предварительного гидролиза ДНК на эффективность реакции.

**Подбор оптимальной концентрации адаптера.** GLAD-ПЦР анализ базируется на гидролизе метилированной ДНК и последующем лигировании нуклеотидного адаптера к тупым концам ДНК. Именно благодаря этой модификации возникают условия для прохождения ПЦР. Поэтому было необходимо подобрать оптимальную концентрацию адаптера для увеличения эффективности анализа. В качестве субстрата использовалась ДНК клеток HeLa. Анализировался статус метилирования гена *RARB*, так как для него было показано гиперметилирование исследуемой области (Гончар и др. 2010, Акишев и др. 2011). Результаты представлены на рисунке 14.

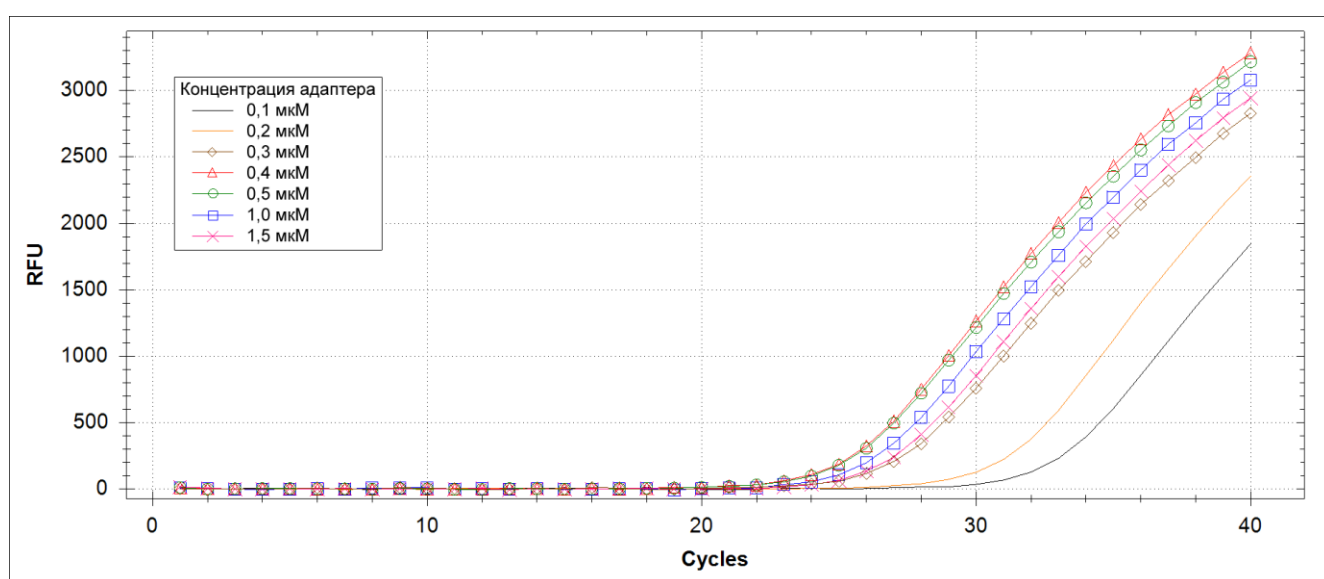


Рис. 14. Графики накопления флуоресценции, полученные в результате GLAD-ПЦР анализа статуса метилирования гена *RARB* в 3 нг ДНК клеток HeLa при изменении концентрации адаптера от 0,1 до 1,5 мкМ. RFU – относительные единицы флуоресценции.

Проведенные эксперименты позволяют сделать вывод, что GLAD-ПЦР анализ оптимально проводить при концентрации адаптера 0,4-0,5 мкМ. В дальнейшем все эксперименты проводили, используя 0,5 мкМ концентрацию.

**Подбор оптимальной структуры гибридного праймера.** Для повышения специфичности ПЦР авторами GLAD-ПЦР анализа было предложено использование гибридных праймеров — структур, строго специфично гибридизующихся вблизи изучаемого метилцитозинового основания. Гибридный

праймер состоит из двух частей: геномная — 3'-конец, комплементарный 5'-концу ДНК у исследуемого сайта гидролиза *GlaI*, и адаптерная — оставшаяся 5'-область, комплементарная адаптерной последовательности. Если же использовать праймер, комплементарный лишь адаптерной последовательности, то вследствие лигирования адаптера ко всем местам гидролиза ДНК, применение подобного праймера привело бы к массовой неспецифичной амплификации ДНК и быстрому расходованию компонентов реакционной смеси.

Для достижения задачи необходимо было подобрать соотношение длины частей, позволяющее исключить множественный отжиг праймера на адаптерную последовательность и неспецифичную гибридизацию с исследуемой ДНК. Для этого были синтезированы гибридные праймеры с различным числом нуклеотидов в геномной части, а именно: 3, 4, 5, 6 и 7. Структуры с одним и двумя комплементарными нуклеотидами не рассматривались из-за низкой вариабельности, так как в случае с MD-эндонуклеазой *GlaI* первый нуклеотид всегда G, а второй — либо C, либо T.

Рисунок 15А демонстрирует сходную эффективность ПЦР при использовании различных праймеров (значения  $C_t$  приблизительно одинаковые), кроме гибридного праймера RARB\_GLAD\_3. По-видимому, комплементарный геному 3'-конец GTT является часто встречающимся вариантом, что приводит к интенсивному расходованию его на неспецифичную амплификацию и снижению эффективности ПЦР. Результаты исследования способности гибридных праймеров неспецифично связываться с негидролизованной матрицей приведены на рисунке 15Б. Показано, что во всех экспериментах неспецифичной наработки продукта не наблюдается. Дальнейшие эксперименты по увеличению количества комплементарных геному нуклеотидов в гибридном праймере (до 8 и более) приводили к неспецифичному отжигу на негидролизованную ДНК. Исходя из этого для дальнейших экспериментов использовали гибридные праймеры с четырьмя комплементарными нуклеотидами.

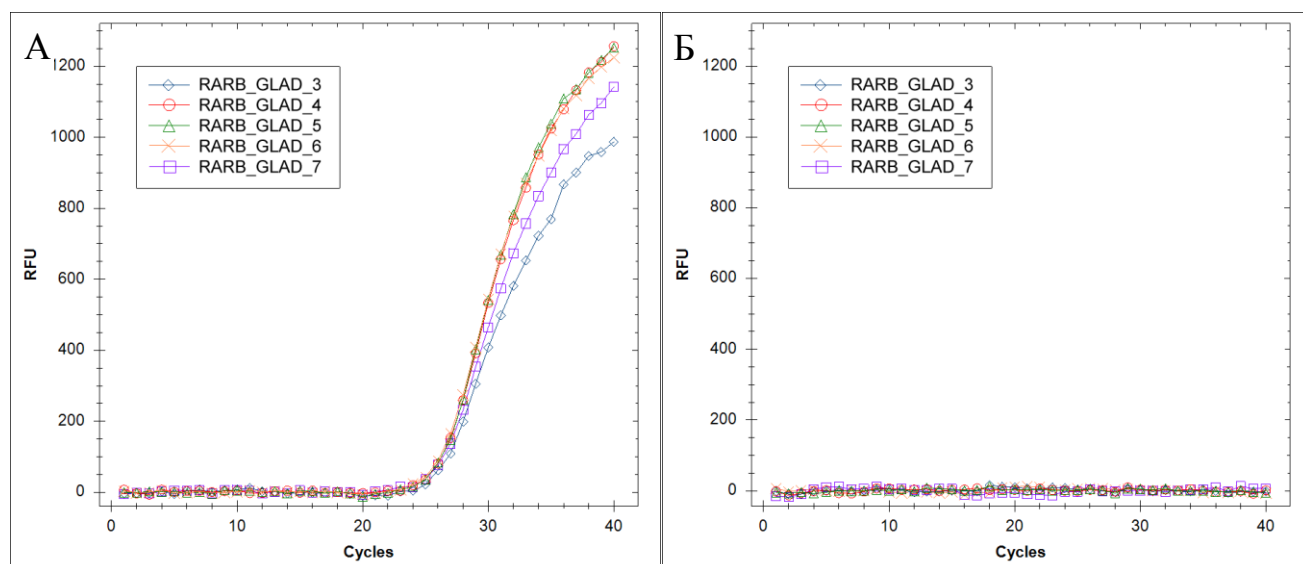


Рис. 15. Графики накопления флуоресценции, полученные в результате GLAD-ПЦР анализа статуса метилирования гена *RARB* в 3 нг ДНК клеток HeLa (А) и контроля негидролизованной *GlaI* ДНК (Б) при использовании гибридных праймеров с различным количеством оснований в геномной части (от 3 до 7). RFU – относительные единицы флуоресценции. В легенде приведены названия используемых в GLAD-ПЦР анализе гибридных праймеров.

**Определение влияния предварительного гидролиза ДНК на эффективность GLAD-ПЦР.** Для повышения эффективности реакции было предложено проводить предварительную обработку исследуемой ДНК эндонуклеазой рестрикции, не имеющей сайта узнавания в исследуемом районе. На рисунке 16 показаны результаты GLAD-ПЦР анализа статуса метилирования гена *RARB* в клетках HeLa с обработкой ДНК эндонуклеазой *TaqI* и без нее. Эксперимент проводился в трех повторах. Полученные данные говорят о том, что первоначальная фрагментация геномной ДНК позволяет повысить эффективность GLAD-ПЦР анализа. В дальнейших экспериментах исследуемая ДНК всегда подвергалась предварительной обработке эндонуклеазой рестрикции *TaqI*.

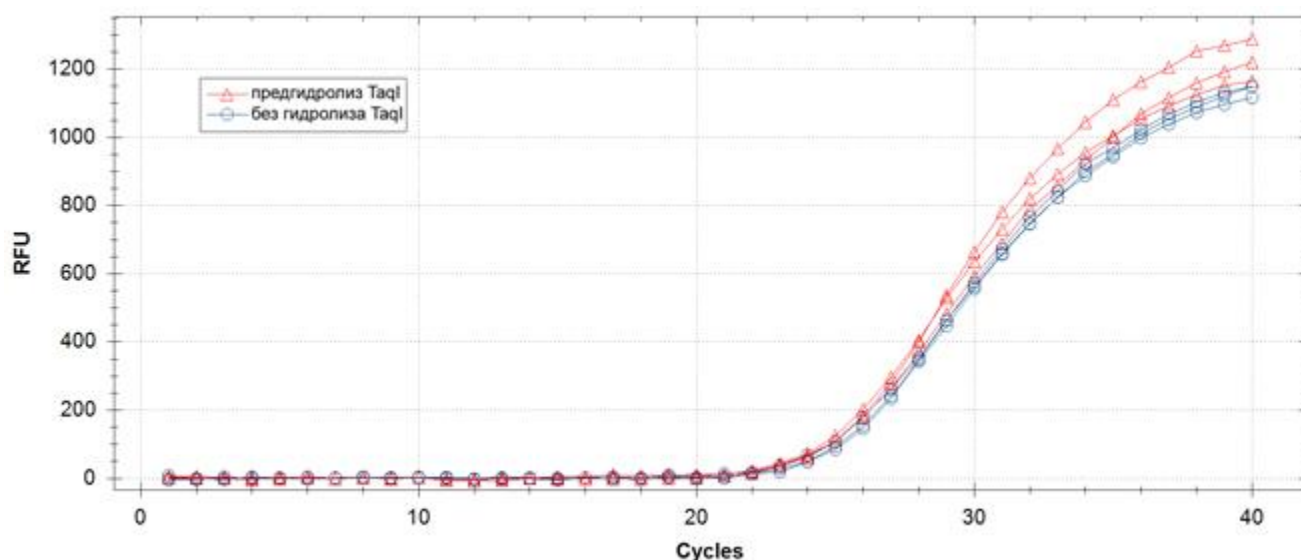


Рис. 16. Графики накопления флуоресценции, полученные в результате GLAD-ПЦР анализа статуса метилирования гена *RARB* в 3 нг ДНК клеток HeLa с предварительной фрагментацией эндонуклеазой рестрикции *TaqI* и без нее. RFU — относительные единицы флуоресценции.

### 3.7. Оценка деметилирующего эффекта ингибиторов на гиперметилированные регуляторные районы генов-супрессоров опухолей

Метилирование регуляторных областей генов *de novo* осуществляется в клетках человека и млекопитающих ДНК-метилтрансферазами Dnmt3a и Dnmt3b. В ходе реакции метилирования ферменты Dnmt3a и Dnmt3b узнают тетрануклеотид 5'-RCGY-3' и модифицируют цитозиновый остаток внутреннего CG-динуклеотида с образованием последовательности 5'-R(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)R-5' (Handa and Jeltsch 2005). Таким образом, к изменению статуса метилирования гена и его выключению приводит метилирование именно сайтов 5'-RCGY-3' в области промотора и первого экзона. Следовательно, для оценки деметилирующего эффекта ингибиторов можно исследовать степень метилирования не всего региона в целом, а только точек метилирования *de novo* (RCGY).



На рисунке 17 приведены данные GLAD-ПЦР анализа статуса метилирования в первом экзоне гена *RARB* в ДНК из клеточных линий HeLa, CaSki и L-68.

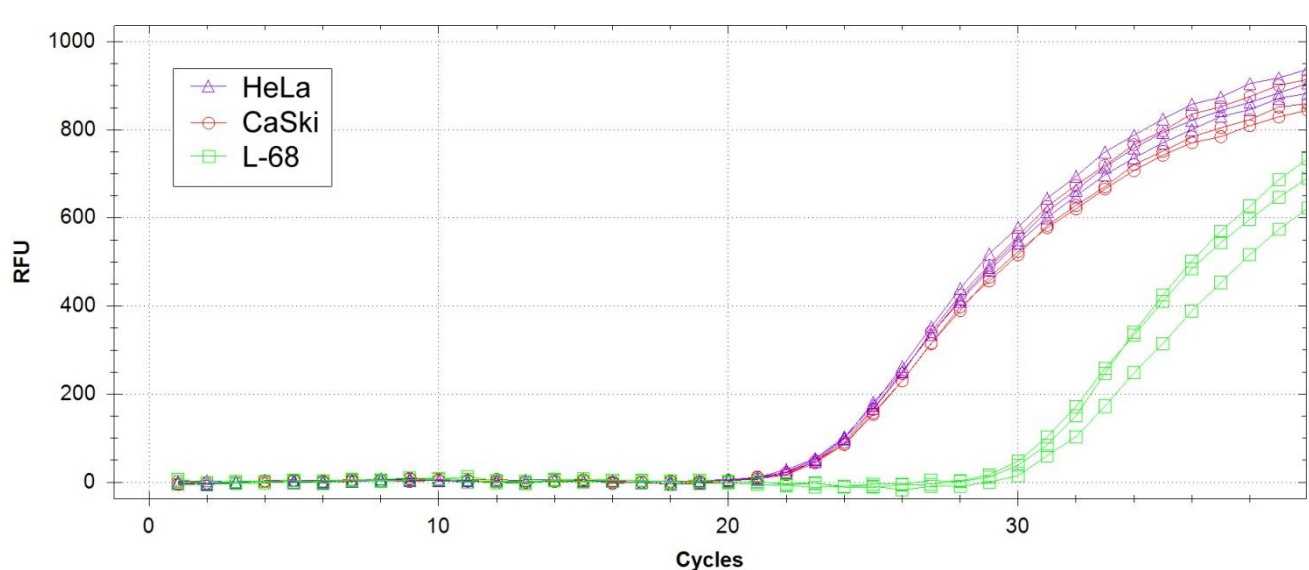


Рис. 17. Кривые флуоресценции GLAD-ПЦР анализа гена *RARB* с различных ДНК. В анализ брали 3 нг каждой ДНК.

Из рисунка видно, что обе малигнанные клеточные линии имеют достаточно высокий уровень метилирования ДНК, в то время как ДНК из клеточной линии L-68 демонстрирует слабое прохождение реакции полимеризации. Судя по значениям  $C_t$ , уровень метилирования сайта ACGC в ДНК L-68 составляет лишь ~1 % от уровня метилирования ДНК из клеток HeLa. Наличие слабого фона метилирования гена *RARB* в нераковых клетках является нормальным явлением, если учитывать его роль в процессах роста и дифференциации клетки.

Полученные данные хорошо согласуются с опубликованными ранее результатами *GlaI*-ПЦР анализа первого экзона гена *RARB* в ДНК клеточных линий L-68 и HeLa (Гончар и др. 2010, Акишев и др. 2011). Однако в отличие от *GlaI*-ПЦР анализа, применяемый метод GLAD-ПЦР обладает значительно более высокой чувствительностью, позволяя детектировать присутствие незначительной доли метилированных молекул среди суммарного пула ДНК.

В дальнейшем GLAD-ПЦР анализ был применен для определения статуса метилирования регуляторных районов ряда генов-онкосупрессоров в ДНК из клеток HeLa и CaSki — как интактных, так и после однократной экспозиции с ингибиторами в концентрации 1 мкМ с последующей суточной культивацией. Эффективность ингибиторов оценивали исходя из значений  $C_t$ , за 100 % метилирования был принят сигнал, получаемый с нативной ДНК. Результаты экспериментов приведены в таблице 10.

Таблица 10

Степень метилирования регуляторных областей ГСО в клетках карциномы шейки матки HeLa и CaSki при обработке ОДН-ингибиторами и без нее (в процентах от уровня метилирования ДНК интактных клеток)

ГСО Проба	<i>CDKN2A</i>	<i>DAPK</i>	<i>MGMT</i>	<i>RARB</i>	<i>RASSF1</i>
HeLa	100	0	0	100	0
HeLa+ОДН-1	10,3±3,5*	0	0	12,5±2,1*	0
HeLa+ОДН-2	11,3±2,2*	0	0	11,9±2,8*	0
HeLa+ОДН-3	9,5±0,3*	0	0	11,7±1,3*	0
HeLa+ОДН-4	10,8±2,5*	0	0	13,1±2,1*	0
CaSki	100	0	100	100	0
CaSki+ОДН-1	21,6±6,3*	0	27,3±5,2*	19,5±1,9*	0
CaSki+ОДН-2	23,5±5,9*	0	25,6±4,7*	19,8±3,0*	0
CaSki+ОДН-3	19,2±0,6*	0	20,1±4,2*	20,4±0,3*	0
CaSki+ОДН-4	22,8±3,9*	0	25,7±5,9*	22,9±2,5*	0

\* — различия с контролем (соответствующая ДНК без обработки ингибитором) статистически значимы,  $p < 0,01$ .

Полученные данные выявили различия в метилировании исследуемых районов клеток HeLa и CaSki. Так, в случае с HeLa GLAD-ПЦР анализ выявил наличие метилирования сайтов RCGY в генах *CDKN2A* и *RARB*, тогда как в ДНК

из клеток CaSki исследуемый сайт был метилирован и в гене *MGMT*. Таким образом, выбранный набор генов позволил дифференцировать один ДНК-препарат от другого на основании проведенного исследования, что позволяет использовать GLAD-ПЦР анализ для типирования малигнанных клеточных линий, как это предлагалось ранее родственным методом *GlaI*-ПЦР анализа (Акишев и др. 2011).

Регуляторные районы генов *DAPK* и *RASSF1A* оказались неметилированными в обеих клеточных линиях. Стоит отметить, что отсутствие метилирования гена *RASSF1A* в изученных ВПЧ-ассоциированных карциномах подтверждается литературными данными (Cohen et al. 2003, Kuzmin et al. 2003, Yu et al. 2003, Kang et al. 2005), что свидетельствует в пользу высокой специфичности метода.

Сравнение уровня метилирования ДНК клеток карцином шейки матки до и после обработки синтетическими олигонуклеотидами выявило значительное деметилирование изучаемых сайтов (72-90 %). Наиболее выраженный деметилирующий эффект был отмечен в отношении клеток HeLa (87-90 % для всех ингибиторов), в то время как для CaSki данный показатель был ниже (72-80 %). Это можно объяснить как принципом воздействия ингибитора на *Dnmt1*, так и физиологическими особенностями клеток: поскольку синтетические олигонуклеотидные структуры являются более аффинным субстратом для клеточной МТазы 1, чем геномная ДНК, большинство молекул фермента оказываются связаны с ингибитором, что индуцирует пассивное деметилирование дочерних ДНК в процессе репликации. Следовательно, скорость деметилирования будет зависеть от устойчивости ингибитора в клетке и частоты клеточных делений. Выбранные условия эксперимента (инкубация клеток в течение 24 часов после экспозиции с ОДН) позволяют считать, что ингибитор в клетке не деградирует (см. результаты раздела 3.4), а, значит, полученные данные указывают на различную скорость деления клеток HeLa и CaSki, что подтверждается литературными данными (Радаева И.Ф. и др. 2009). Если считать, что дочерняя цепь ДНК полностью неметилирована благодаря воздействию

ингибитора, то клетки HeLa успевают пройти четыре митотических цикла, в то время как CaSki — только три.

Все исследованные в настоящей работе ингибиторы Dnmt1 в экспериментах с ДНК обеих клеточных линий рака шейки матки проявили практически одинаковую активность (статистически значимых различий уровней метилирования генов *CDKN2A* и *RARB* в клетках HeLa и *CDKN2A*, *RARB* и *MGMT* в клетках CaSki не выявлено, табл. 10), что подтверждает гипотезу о протекании процесса деметилирования ДНК по пассивному пути.

Наиболее эффективным ингибитором Dnmt1 оказался ОДН-3 (степень деметилирования ДНК составила 88-90 % и 79-81 %, здесь и далее для клеток HeLa и CaSki, соответственно, табл. 10), для которого получено наименьшее значение  $IC_{50}$ . Несколько хуже проявили себя двуцепочечные олигонуклеотиды ОДН-2 (~88 % и 74-80 %) и ОДН-4 (86-89 % и 74-77 %). Максимальная ингибирующая активность ОДН-3 может быть обусловлена наиболее выгодным пространственным расположением шпилечной структуры относительно фермента. Dnmt1 является высокопроцессивным ферментом и характеризуется строгой направленностью перемещения ( $3' \rightarrow 5'$ ) по неметилированной цепи ДНК (Hermann et al. 2004, Vilkaitis et al. 2005, Goyal et al. 2006), а в случае с ОДН-2 и ОДН-4 шпилька располагается по ходу движения Dnmt1 (табл. 2), что, видимо, снижает эффективность взаимодействия олигонуклеотида с аллостерическим сайтом в регуляторном домене белка. Деметилирующие свойства одноцепочечного ингибитора ОДН-1 (87-89 % и 72-80 %) оказались сопоставимы с характеристиками двуцепочечных шпилечных олигонуклеотидов. Вполне вероятно, что наличие в его структуре двух метилированных сайтов CpG и палиндрома 5'-GGATCM-3', за счет которого возможно образование короткоживущего комплекса ОДН-1-ОДН-1, создает условия для образования большого количества полностью метилированного двуцепочечного субстрата и аллостерической инактивации МТазы (Bacolla et al. 1999, Flynn et al. 2003, Svedruzic and Reich 2005a).

### 3.8. Заключение

В ходе проведения настоящей работы были получены и запатентованы (заявка №2014118673 от 13.05.2014 г., решение о выдаче патента от 24.03.2015 г.) ингибиторы ДНК-метилтрансферазы 1 человека, способные подавлять aberrантное гиперметилирование в клетках рака шейки матки.

Полученные ингибиторы являются высокоаффинными синтетическими олигонуклеотидами — аналогами природных субстратов ДНК-метилтрансфераз, способными ингибировать Dnmt1, подавлять рост культур опухолевых клеток HeLa и CaSki и вызывать деметилирование промоторы генов-супрессоров опухолей *CDKN2A*, *RARB* и *MGMT*.

При изучении субстратных и ингибиторных свойств олигонуклеотидов было показано, что сочетание нескольких структурных особенностей — наличие полуметилированного сайта 5'-CG-3'/3'-G(5mC)-5' с C:A некомплементарностью, образование “шпильки” за счет самокомплементарности олигонуклеотида и замена фосфатов на фосфотиоаты — значительно усиливало активность ОДН *in vitro* (степень ингибирования реакции метилирования ДНК составляла 76-94 %).

Исследование способности ингибиторов Dnmt1 к проникновению и персистенции в ядрах клеток HeLa и CaSki показало предельную насыщенность 90-100 % клеточных ядер при том, что внутриядерная концентрация ингибитора существенно не изменялась в течение 48 часов. Наряду с низкой 50 %-ной токсической дозой для раковых клеток ( $TC_{50,HeLa} = 236$  нМ,  $TC_{50,CaSki} = 118$  нМ для наиболее эффективного ингибитора ОДН-3) и высокими значениями  $TC_{50}$  для нераковых клеток ( $TC_{50,L-68} = >10^4$  нМ для всех ОДН), созданные соединения обладают хорошим терапевтическим потенциалом ( $\frac{TC_{50,нераковых\ клеток}}{TC_{50,раковых\ клеток}}$ ): например, соотношение для ОДН-3 превышает 100. Это позволяет проводить дальнейшие исследования возможности применения ОДН для лечения онкологических заболеваний.

Несмотря на то, что малигнизация клеток как линии HeLa, так и линии CaSki была индуцирована вирусами папилломы человека (HeLa — ВПЧ-18, CaSki — ВПЧ-16), эффективность ингибиторов для них оказалась неодинаковой (значения  $IC_{50}$  для клеток CaSki, в 2-4 раза ниже). Полученные данные позволили предположить, что деметилирующий эффект ОДН будет неодинаковый в отношении опухолей даже одного типа. В связи с этим возникла необходимость исследовать влияние ОДН на метилирование генов-онкомаркеров. Данная задача была решена посредством адаптации нового метода определения наличия метилцитозина в составе сайта RCGY в геномной ДНК — GLAD-ПЦР анализа — для оценки их влияния на aberrантное гиперметилирование ДНК в раковых клетках. Выбор последовательности RCGY был неслучайным, поскольку метилирование ДНК *de novo* (в т. ч. и aberrантное) осуществляется МТазами Dnmt3a и Dnmt3b именно по сайтам RCGY, что в итоге приводит к изменению транскрипционной активности гена. Таким образом, GLAD-ПЦР анализ позволяет определять изменение статуса метилирования «функциональных» сайтов, обусловленное воздействием ингибиторов МТаз. Кроме того, использованный метод обладает рядом преимуществ по сравнению с имеющимся «золотым стандартом» — бисульфитным секвенированием ДНК: невосприимчивостью к фону неметилированной ДНК, аналитической чувствительностью порядка 10-20 пг ДНК, специфичностью 100 %. При этом время исследования не превышает пяти часов, все реакции проводятся в одной пробирке, GLAD-ПЦР анализ основан на ПЦР в режиме реального времени и не использует никаких дополнительных компонентов реакции, кроме пары праймеров и TaqMan-зонда. Простота и гибкость метода делают его пригодным для создания на его основе эпигенетических тест-систем.

Метод GLAD-ПЦР анализа был впервые применен для изучения паттерна метилирования «функциональных» сайтов RCGY в регуляторных районах ГСО *CDKN2A*, *DAPK1*, *MGMT*, *RARB* и *RASSF1A*. Проведенный анализ выявил интересные различия в картине метилирования ДНК клеток HeLa и CaSki: промотор гена *CDKN2A* и первый экзон *RARB* оказались гиперметилированы в

клетках обеих линий, тогда как метилирование гена *MGMT* было зафиксировано только в клетках CaSki. Подобные отличия могут быть использованы для создания «паспортов» клеточных линий и их быстрого типирования, а также для детекции изменений эпигенома с целью ранней диагностики онкозаболеваний.

Эффективность деметилирования ГСО под влиянием синтетических ОДН также была оценена методом GLAD-ПЦР анализа. Все изученные ингибиторы продемонстрировали хороший деметилирующий эффект (72-90 %) на обеих линиях раковых клеток, что может свидетельствовать об индукции пассивного деметилирования клеточной ДНК за счет ингибирования клеточных МТаз. Различия в полученных значениях  $IC_{50}$ , по-видимому, обусловлены неодинаковым функциональным значением аберрантного гиперметилирования ДНК для прогрессии различных типов рака шейки матки.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. На основе выбранной базовой 22-звенной последовательности были сконструированы и синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды для получения различных одно-, двуцепочечных и шпилечных структур, содержащих неметилированный, полуметилированный или модифицированный участок узнавания фермента 5'-CpG-3'.

2. В результате оценки ингибирующего потенциала и субстратных свойств полученных олигонуклеотидов *in vitro* были отобраны четыре структуры с наиболее высоким процентом ингибирования (76-87%), не проявляющие субстратных свойств.

3. Показано, что флуоресцентно меченые аналоги отобранных ингибиторов локализуются преимущественно в ядре клеток и не подвергаются явной деградации в течение как минимум двух суток.

4. Определены величины  $TC_{50}$  ингибиторов для клеток карцином шейки матки HeLa и CaSki (0,2-0,4 мкМ и 0,1-0,2 мкМ соответственно), а также фибробластов легкого L-68 (>10 мкМ). Индекс селективности  $\left(\frac{TC_{50.нераковых\ клеток}}{TC_{50.раковых\ клеток}}\right)$  наилучшего ингибитора > 100.

5. Было оценено влияние ОДН ингибиторов на аберрантное гиперметилирование ДНК в раковых клетках. Степень метилирования генов *CDKN2A* и *RARB* в клетках HeLa снизилась на 88-90 %, а генов *CDKN2A*, *RARB* и *MGMT* в клетках CaSki на 79-81 %.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Dnmt — DNA methyltransferase, ДНК-метилтрансфераза

IC<sub>50</sub> — 50 %-ая ингибирующая концентрация

MD — Methylation Directed, метилзависимые

MS — Methylation Sensitive, метилчувствительные

NGS — Next Generation Sequencing, секвенирование нового поколения

PCNA — ядерный антиген пролиферирующей клетки

TC<sub>50</sub> — 50 %-ая цитотоксическая концентрация

БСА — бычий сывороточный альбумин

ВПЧ — вирус папилломы человека

ГСО — ген-супрессор опухолей

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

КРС — крупный рогатый скот

МДС — миелодиспластический синдром

МТаза — ДНК-метилтрансфераза

ОДН — олигодезоксирибонуклеотид

ОМЛ — острый миелоидный лейкоз

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РНК — рибонуклеиновая кислота

Обозначения нуклеотидов:

5hmC — 5-гидроксиметилцитозин

5mC , М — 5-метилцитозин

D — 5,6-дигидро-5-азацитозин

N — A или G, или T, или C

P — 6-метил-пирроло-[2,3-d]-2-пиримидинон

R — A или G

Y — T или C

Z — 5-метил-2-пиримидинон

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Adouard V., Dante R., Niveleau A., Delain E., Revet B., Ehrlich M. The accessibility of 5-methylcytosine to specific antibodies in double-stranded DNA of *Xanthomonas* phage XP12 // *Eur.J.Biochem.* 1985. V. 152. № 1. P. 115-121.
2. Ahmad I., Rao D. N. Chemistry and biology of DNA methyltransferases // *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* 1996. V. 31. № 5-6. P. 361-380.
3. Araujo F. D., Croteau S., Slack A. D., Milutinovic S., Bigey P., Price G. B., Zannis-Hadjopoulos M., Szyf M. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus // *J.Biol.Chem.* 2001. V. 276. № 10. P. 6930-6936.
4. Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H. R. Basic principles of real-time quantitative PCR // *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 2005. V. 5. № 2. P. 209-219.
5. Avvakumov G. V., Walker J. R., Xue S., Li Y., Duan S., Bronner C., Arrowsmith C. H., Dhe-Paganon S. Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1 // *Nature.* 2008. V. 455. № 7214. P. 822-825.
6. Bacolla A., Pradhan S., Roberts R. J., Wells R. D. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna // *J.Biol.Chem.* 1999. V. 274. № 46. P. 33011-33019.
7. Bacolla A., Pradhan S., Larson J. E., Roberts R. J., Wells R. D. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. III. Allosteric control, reaction order, and influence of plasmid topology and triplet repeat length on methylation of the fragile X CGG.CCG sequence // *J.Biol.Chem.* 2001. V. 276. № 21. P. 18605-18613.
8. Beausoleil S. A., Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J. E., Villen J., Li J., Cohn M. A., Cantley L. C., Gygi S. P. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2004. V. 101. № 33. P. 12130-12135.
9. Belinsky S. A., Nikula K. J., Palmisano W. A., Michels R., Saccomanno G., Gabrielson E., Baylin S. B., Herman J. G. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an

early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998. V. 95. № 20. P. 11891-11896.

10. Beltinger C., Saragovi H. U., Smith R. M., LeSauter L., Shah N., DeDionisio L., Christensen L., Raible A., Jarett L., Gewirtz A. M. Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides // *J.Clin.Invest.* 1995. V. 95. № 4. P. 1814-1823.

11. Berdasco M., Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry // *Dev.Cell.* 2010. V. 19. № 5. P. 698-711.

12. Bestor T., Laudano A., Mattaliano R., Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases // *J.Mol.Biol.* 1988. V. 203. № 4. P. 971-983.

13. Bhutani N., Burns D. M., Blau H. M. DNA demethylation dynamics // *Cell.* 2011. V. 146. № 6. P. 866-872.

14. Bigey P., Knox J. D., Croteau S., Bhattacharya S. K., Theberge J., Szyf M. Modified oligonucleotides as bona fide antagonists of proteins interacting with DNA. Hairpin antagonists of the human DNA methyltransferase // *J.Biol.Chem.* 1999. V. 274. № 8. P. 4594-4606.

15. Bird A. DNA methylation de novo // *Science.* 1999. V. 286. № 5448. P. 2287-2288.

16. Bostick M., Kim J. K., Esteve P. O., Clark A., Pradhan S., Jacobsen S. E. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells // *Science.* 2007. V. 317. № 5845. P. 1760-1764.

17. Bourc'his D., Xu G. L., Lin C. S., Bollman B., Bestor T. H. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints // *Science.* 2001. V. 294. № 5551. P. 2536-2539.

18. Bourc'his D., Bestor T. H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L // *Nature.* 2004. V. 431. № 7004. P. 96-99.

19. Brenner C., Deplus R., Didelot C., Lorient A., Vire E., De Smet C., Gutierrez A., Danovi D., Bernard D., Boon T., Pelicci P. G., Amati B., Kouzarides T., de Launoit Y., Di Croce L., Fuks F. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 2. P. 336-346.
20. Brooks J. D., Weinstein M., Lin X., Sun Y., Pin S. S., Bova G. S., Epstein J. I., Isaacs W. B., Nelson W. G. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998. V. 7. № 6. P. 531-536.
21. Bruce S., Hannula-Jouppi K., Lindgren C. M., Lipsanen-Nyman M., Kere J. Restriction site-specific methylation studies of imprinted genes with quantitative real-time PCR // *Clin. Chem.* 2008. V. 54. № 3. P. 491-499.
22. Brueckner B., Garcia Boy R., Siedlecki P., Musch T., Kliem H. C., Zielenkiewicz P., Suhai S., Wiessler M., Lyko F. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 14. P. 6305-6311.
23. Bryan J., Kantarjian H., Garcia-Manero G., Jabbour E. Pharmacokinetic evaluation of decitabine for the treatment of leukemia // *Expert Opin. Drug Metab Toxicol.* 2011. V. 7. № 5. P. 661-672.
24. Buryanov Y. I., Zinoviev V. V., Gorbunov YuA, Tuzikov F. V., Rechkunova N. I., Malygin E. G., Bayev A. A. Interaction of the EcoDam methyltransferase with synthetic oligodeoxyribonucleotides // *Gene.* 1988. V. 74. № 1. P. 67-69.
25. Cardoso M. C., Leonhardt H. DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development // *J. Cell Biol.* 1999. V. 147. № 1. P. 25-32.
26. Chan M. W., Chu E. S., To K. F., Leung W. K. Quantitative detection of methylated SOCS-1, a tumor suppressor gene, by a modified protocol of quantitative real time methylation-specific PCR using SYBR green and its use in early gastric cancer detection // *Biotechnol. Lett.* 2004. V. 26. № 16. P. 1289-1293.

27. Chedin F., Lieber M. R., Hsieh C. L. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002. V. 99. № 26. P. 16916-16921.
28. Chen R. Z., Pettersson U., Beard C., Jackson-Grusby L., Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates // *Nature*. 1998. V. 395. № 6697. P. 89-93.
29. Chen T., Ueda Y., Xie S., Li E. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation // *J.Biol.Chem.* 2002. V. 277. № 41. P. 38746-38754.
30. Chen T., Ueda Y., Dodge J. E., Wang Z., Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b // *Mol.Cell Biol.* 2003. V. 23. № 16. P. 5594-5605.
31. Chen T., Tsujimoto N., Li E. The PWWP domain of Dnmt3a and Dnmt3b is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin // *Mol.Cell Biol.* 2004. V. 24. № 20. P. 9048-9058.
32. Chen T., Hevi S., Gay F., Tsujimoto N., He T., Zhang B., Ueda Y., Li E. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells // *Nat.Genet.* 2007. V. 39. № 3. P. 391-396.
33. Chen Z. X., Mann J. R., Hsieh C. L., Riggs A. D., Chedin F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family // *J.Cell Biochem.* 2005. V. 95. № 5. P. 902-917.
34. Cheng X. Structure and function of DNA methyltransferases // *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 1995. № 25. P. 293-318.
35. 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. V. 6. № 2. P. 151-158.
36. Chik F., Szyf M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors // *Carcinogenesis*. 2011. V. 32. № 2. P. 224-232.

37. Chow J. C., Yen Z., Ziesche S. M., Brown C. J. Silencing of the mammalian X chromosome // *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 2005. V. 6. P. 69-92.
38. Christman J. K., Sheikhejad G., Marasco C. J., Sufrin J. R. 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995. V. 92. № 16. P. 7347-7351.
39. Chuang J. C., Warner S. L., Vollmer D., Vankayalapati H., Redkar S., Bearss D. J., Qiu X., Yoo C. B., Jones P. A. S110, a 5-Aza-2'-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth // *Mol.Cancer Ther.* 2010. V. 9. № 5. P. 1443-1450.
40. Chuang L. S., Ian H. I., Koh T. W., Ng H. H., Xu G., Li B. F. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1 // *Science.* 1997. V. 277. № 5334. P. 1996-2000.
41. Cohen O., Feinstein E., Kimchi A. DAP-kinase is a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 5. P. 998-1008.
42. Cohen Y., Singer G., Lavie O., Dong S. M., Beller U., Sidransky D. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix // *Clin.Cancer Res.* 2003. V. 9. № 8. P. 2981-2984.
43. Cokus S. J., Feng S., Zhang X., Chen Z., Merriman B., Haudenschild C. D., Pradhan S., Nelson S. F., Pellegrini M., Jacobsen S. E. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning // *Nature.* 2008. V. 452. № 7184. P. 215-219.
44. Cornacchia E., Golbus J., Maybaum J., Strahler J., Hanash S., Richardson B. Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity // *J.Immunol.* 1988. V. 140. № 7. P. 2197-2200.
45. Cortellino S., Xu J., Sannai M., Moore R., Caretti E., Cigliano A., Le Coz M., Devarajan K., Wessels A., Soprano D., Abramowitz L. K., Bartolomei M. S., Rambow F., Bassi M. R., Bruno T., Fanciulli M., Renner C., Klein-Szanto A. J., Matsumoto Y., Kobi D., Davidson I., Alberti C., Larue L., Bellacosa A. Thymine DNA

glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair // *Cell*. 2011. V. 146. № 1. P. 67-79.

46. Cottrell S. E., Distler J., Goodman N. S., Mooney S. H., Kluth A., Olek A., Schwöpe I., Tetzner R., Ziebarth H., Berlin K. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 1. P. e10.

47. Dallol A., Agathangelou A., Tommasi S., Pfeifer G. P., Maher E. R., Latif F. Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 17. P. 7653-7659.

48. Datta J., Majumder S., Bai S., Ghoshal K., Kutay H., Smith D. S., Crabb J. W., Jacob S. T. Physical and functional interaction of DNA methyltransferase 3A with Mbd3 and Brg1 in mouse lymphosarcoma cells // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 23. P. 10891-10900.

49. Dawlaty M. M., Ganz K., Powell B. E., Hu Y. C., Markoulaki S., Cheng A. W., Gao Q., Kim J., Choi S. W., Page D. C., Jaenisch R. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 9. № 2. P. 166-175.

50. De S., Shaknovich R., Riester M., Elemento O., Geng H., Kormaksson M., Jiang Y., Woolcock B., Johnson N., Polo J. M., Cerchietti L., Gascoyne R. D., Melnick A., Michor F. Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity // *PLoS.Genet.* 2013. V. 9. № 1. P. e1003137.

51. Deiss L. P., Feinstein E., Berissi H., Cohen O., Kimchi A. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death // *Genes Dev.* 1995. V. 9. № 1. P. 15-30.

52. Delpu Y., Cordelier P., Cho W. C., Torrisani J. DNA methylation and cancer diagnosis // *Int.J.Mol.Sci.* 2013. V. 14. № 7. P. 15029-15058.

53. Dhayalan A., Rajavelu A., Rathert P., Tamas R., Jurkowska R. Z., Ragozin S., Jeltsch A. The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation // *J.Biol.Chem.* 2010. V. 285. № 34. P. 26114-26120.

54. Ding F., Chaillet J. R. In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002. V. 99. № 23. P. 14861-14866.
55. Dobrovic A., Kristensen L. S. DNA methylation, epimutations and cancer predisposition // *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2009. V. 41. № 1. P. 34-39.
56. Dong S. M., Kim H. S., Rha S. H., Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix // *Clin.Cancer Res.* 2001. V. 7. № 7. P. 1982-1986.
57. Donninger H., Vos M. D., Clark G. J. The RASSF1A tumor suppressor // *J.Cell Sci.* 2007. V. 120. № Pt 18. P. 3163-3172.
58. Down T. A., Rakyan V. K., Turner D. J., Flicek P., Li H., Kulesha E., Graf S., Johnson N., Herrero J., Tomazou E. M., Thorne N. P., Backdahl L., Herberth M., Howe K. L., Jackson D. K., Miretti M. M., Marioni J. C., Birney E., Hubbard T. J., Durbin R., Tavaré S., Beck S. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis // *Nat.Biotechnol.* 2008. V. 26. № 7. P. 779-785.
59. Eads C. A., Danenberg K. D., Kawakami K., Saltz L. B., Blake C., Shibata D., Danenberg P. V., Laird P. W. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 8. P. E32.
60. Easwaran H. P., Schermelleh L., Leonhardt H., Cardoso M. C. Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases // *EMBO Rep.* 2004. V. 5. № 12. P. 1181-1186.
61. Eden A., Gaudet F., Waghmare A., Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation // *Science.* 2003. V. 300. № 5618. P. 455.
62. Edmunds J. W., Mahadevan L. C., Clayton A. L. Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation // *EMBO J.* 2008. V. 27. № 2. P. 406-420.
63. Egger G., Jeong S., Escobar S. G., Cortez C. C., Li T. W., Saito Y., Yoo C. B., Jones P. A., Liang G. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1)



hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2006. V. 103. № 38. P. 14080-14085.

64. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты // М.: Наука. 1978.

65. Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E., Goodman S. N., Hidalgo O. F., Vanaclocha V., Baylin S. B., Herman J. G. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents // *N.Engl.J.Med.* 2000. V. 343. № 19. P. 1350-1354.

66. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 35. P. 5427-5440.

67. Esteve P. O., Chin H. G., Benner J., Feehery G. R., Samaranayake M., Horwitz G. A., Jacobsen S. E., Pradhan S. Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2009. V. 106. № 13. P. 5076-5081.

68. Fang M. Z., Chen D., Sun Y., Jin Z., Christman J. K., Yang C. S. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy // *Clin.Cancer Res.* 2005. V. 11. № 19 Pt 1. P. 7033-7041.

69. Fatemi M., Hermann A., Pradhan S., Jeltsch A. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA // *J.Mol.Biol.* 2001. V. 309. № 5. P. 1189-1199.

70. Fatemi M., Hermann A., Gowher H., Jeltsch A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA // *Eur.J.Biochem.* 2002. V. 269. № 20. P. 4981-4984.

71. Feinberg A. P., Tycko B. The history of cancer epigenetics // *Nat.Rev.Cancer.* 2004. V. 4. № 2. P. 143-153.

72. Feinberg A. P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease // *Nature.* 2007. V. 447. № 7143. P. 433-440.

73. Fellingner K., Rothbauer U., Felle M., Langst G., Leonhardt H. Dimerization of DNA methyltransferase 1 is mediated by its regulatory domain // *J.Cell Biochem.* 2009. V. 106. № 4. P. 521-528.
74. Feltus F. A., Lee E. K., Costello J. F., Plass C., Vertino P. M. Predicting aberrant CpG island methylation // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2003. V. 100. № 21. P. 12253-12258.
75. Feng Q., Balasubramanian A., Hawes S. E., Toure P., Sow P. S., Dem A., Dembele B., Critchlow C. W., Xi L., Lu H., McIntosh M. W., Young A. M., Kiviat N. B. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia // *J.Natl.Cancer Inst.* 2005. V. 97. № 4. P. 273-282.
76. Fenster P. E., Comess K. A., Marsh R., Katzenberg C., Hager W. D. Conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm by acute intravenous procainamide infusion // *Am.Heart J.* 1983. V. 106. № 3. P. 501-504.
77. Ferguson-Smith A. C. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm // *Nat.Rev.Genet.* 2011. V. 12. № 8. P. 565-575.
78. Flotho C., Claus R., Batz C., Schneider M., Sandrock I., Ihde S., Plass C., Niemeyer C. M., Lubbert M. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells // *Leukemia.* 2009. V. 23. № 6. P. 1019-1028.
79. Flynn J., Azzam R., Reich N. DNA binding discrimination of the murine DNA cytosine-C5 methyltransferase // *J.Mol.Biol.* 1998. V. 279. № 1. P. 101-116.
80. Flynn J., Fang J. Y., Mikovits J. A., Reich N. O. A potent cell-active allosteric inhibitor of murine DNA cytosine C5 methyltransferase // *J.Biol.Chem.* 2003. V. 278. № 10. P. 8238-8243.
81. Fraga M. F., Rodriguez R., Canal M. J. Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis // *Electrophoresis.* 2000. V. 21. № 14. P. 2990-2994.
82. Frommer M., McDonald L. E., Millar D. S., Collis C. M., Watt F., Grigg G. W., Molloy P. L., Paul C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive

display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1992. V. 89. № 5. P. 1827-1831.

83. Fuks F., Burgers W. A., Godin N., Kasai M., Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription // EMBO J. 2001. V. 20. № 10. P. 2536-2544.

84. Fuks F., Hurd P. J., Deplus R., Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. № 9. P. 2305-2312.

85. Fullgrabe J., Kavanagh E., Joseph B. Histone onco-modifications // Oncogene. 2011. V. 30. № 31. P. 3391-3403.

86. Gaudet F., Hodgson J. G., Eden A., Jackson-Grusby L., Dausman J., Gray J. W., Leonhardt H., Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation // Science. 2003. V. 300. № 5618. P. 489-492.

87. Gazzoli I., Loda M., Garber J., Syngal S., Kolodner R. D. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor // Cancer Res. 2002. V. 62. № 14. P. 3925-3928.

88. Ge Y. Z., Pu M. T., Gowher H., Wu H. P., Ding J. P., Jeltsch A., Xu G. L. Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain // J.Biol.Chem. 2004. V. 279. № 24. P. 25447-25454.

89. Gibbons R. J., McDowell T. L., Raman S., O'Rourke D. M., Garrick D., Ayyub H., Higgs D. R. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation // Nat.Genet. 2000. V. 24. № 4. P. 368-371.

90. Girault I., Tozlu S., Lidereau R., Bieche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas // Clin.Cancer Res. 2003. V. 9. № 12. P. 4415-4422.

91. Glickman J. F., Flynn J., Reich N. O. Purification and characterization of recombinant baculovirus-expressed mouse DNA methyltransferase // *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1997. V. 230. № 2. P. 280-284.
92. Gowher H., Jeltsch A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites // *J.Mol.Biol.* 2001. V. 309. № 5. P. 1201-1208.
93. Gowher H., Jeltsch A. Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases // *J.Biol.Chem.* 2002. V. 277. № 23. P. 20409-20414.
94. Gowher H., Liebert K., Hermann A., Xu G., Jeltsch A. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L // *J.Biol.Chem.* 2005. V. 280. № 14. P. 13341-13348.
95. Goyal R., Reinhardt R., Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. № 4. P. 1182-1188.
96. Goyal R., Rathert P., Laser H., Gowher H., Jeltsch A. Phosphorylation of serine-515 activates the Mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1 // *Epigenetics.* 2007. V. 2. № 3. P. 155-160.
97. Gros C., Fahy J., Halby L., Dufau I., Erdmann A., Gregoire J. M., Ausseil F., Vispe S., Arimondo P. B. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches // *Biochimie.* 2012. V. 94. № 11. P. 2280-2296.
98. Guo J. U., Su Y., Zhong C., Ming G. L., Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain // *Cell.* 2011. V. 145. № 3. P. 423-434.
99. Halby L., Champion C., Senamaud-Beaufort C., Ajjan S., Drujon T., Rajavelu A., Ceccaldi A., Jurkowska R., Lequin O., Nelson W. G., Guy A., Jeltsch A., Guianvarc'h D., Ferroud C., Arimondo P. B. Rapid synthesis of new DNMT inhibitors derivatives of procainamide // *Chembiochem.* 2012. V. 13. № 1. P. 157-165.

100. Handa V., Jeltsch A. Profound flanking sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome // *J.Mol.Biol.* 2005. V. 348. № 5. P. 1103-1112.
101. Hanoun N., Delpu Y., Suriawinata A. A., Bournet B., Bureau C., Selves J., Tsongalis G. J., Dufresne M., Buscail L., Cordelier P., Torrisani J. The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis // *Clin.Chem.* 2010. V. 56. № 7. P. 1107-1118.
102. Hansen R. S., Wijmenga C., Luo P., Stanek A. M., Canfield T. K., Weemaes C. M., Gartler S. M. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999. V. 96. № 25. P. 14412-14417.
103. Hashimoto H., Horton J. R., Zhang X., Bostick M., Jacobsen S. E., Cheng X. The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix // *Nature.* 2008. V. 455. № 7214. P. 826-829.
104. Hata K., Okano M., Lei H., Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice // *Development.* 2002. V. 129. № 8. P. 1983-1993.
105. He Y. F., Li B. Z., Li Z., Liu P., Wang Y., Tang Q., Ding J., Jia Y., Chen Z., Li L., Sun Y., Li X., Dai Q., Song C. X., Zhang K., He C., Xu G. L. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA // *Science.* 2011. V. 333. № 6047. P. 1303-1307.
106. Henken F. E., Wilting S. M., Overmeer R. M., van Rietschoten J. G., Nygren A. O., Errami A., Schouten J. P., Meijer C. J., Snijders P. J., Steenbergen R. D. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis // *Br.J.Cancer.* 2007. V. 97. № 10. P. 1457-1464.
107. Herman J. G., Graff J. R., Myohanen S., Nelkin B. D., Baylin S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996. V. 93. № 18. P. 9821-9826.

108. Hermann A., Goyal R., Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites // *J.Biol.Chem.* 2004. V. 279. № 46. P. 48350-48359.
109. Hodges E., Smith A. D., Kendall J., Xuan Z., Ravi K., Rooks M., Zhang M. Q., Ye K., Bhattacharjee A., Brizuela L., McCombie W. R., Wigler M., Hannon G. J., Hicks J. B. High definition profiling of mammalian DNA methylation by array capture and single molecule bisulfite sequencing // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 9. P. 1593-1605.
110. Holliday R., Pugh J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development // *Science.* 1975. V. 187. № 4173. P. 226-232.
111. Hore T. A., Rapkins R. W., Graves J. A. Construction and evolution of imprinted loci in mammals // *Trends Genet.* 2007. V. 23. № 9. P. 440-448.
112. Hotchkiss R.D. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography // *J.Biol.Chem.* 1948. V. 175. № 1. P. 315-332.
113. House M. G., Guo M., Iacobuzio-Donahue C., Herman J. G. Molecular progression of promoter methylation in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) of the pancreas // *Carcinogenesis.* 2003. V. 24. № 2. P. 193-198.
114. Howard G., Eiges R., Gaudet F., Jaenisch R., Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice // *Oncogene.* 2008. V. 27. № 3. P. 404-408.
115. Howell C. Y., Bestor T. H., Ding F., Latham K. E., Mertineit C., Trasler J. M., Chaillet J. R. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene // *Cell.* 2001. V. 104. № 6. P. 829-838.
116. Hublarova P., Hrstka R., Rotterova P., Rotter L., Coupkova M., Badal V., Nenutil R., Vojtesek B. Prediction of human papillomavirus 16 e6 gene expression and cervical intraepithelial neoplasia progression by methylation status // *Int.J.Gynecol.Cancer.* 2009. V. 19. № 3. P. 321-325.
117. Inbal B., Cohen O., Polak-Charcon S., Kopolovic J., Vadai E., Eisenbach L., Kimchi A. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis // *Nature.* 1997. V. 390. № 6656. P. 180-184.

118. Ito S., Shen L., Dai Q., Wu S. C., Collins L. B., Swenberg J. A., He C., Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine // *Science*. 2011. V. 333. № 6047. P. 1300-1303.
119. Ivanova T., Petrenko A., Gritsko T., Vinokourova S., Eshilev E., Kobzeva V., Kisseljov F., Kisseljova N. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in cervical cancer // *BMC.Cancer*. 2002. V. 2. P. 4.
120. Jair K. W., Bachman K. E., Suzuki H., Ting A. H., Rhee I., Yen R. W., Baylin S. B., Schuebel K. E. De novo CpG island methylation in human cancer cells // *Cancer Res*. 2006. V. 66. № 2. P. 682-692.
121. Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases // *Chembiochem*. 2002. V. 3. № 4. P. 274-293.
122. Jeltsch A. On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme // *Epigenetics*. 2006. V. 1. № 2. P. 63-66.
123. Jeltsch A. Reading and writing DNA methylation // *Nat.Struct.Mol.Biol*. 2008. V. 15. № 10. P. 1003-1004.
124. Jeong S., Liang G., Sharma S., Lin J. C., Choi S. H., Han H., Yoo C. B., Egger G., Yang A. S., Jones P. A. Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA // *Mol.Cell Biol*. 2009. V. 29. № 19. P. 5366-5376.
125. 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. V. 449. № 7159. P. 248-251.
126. Jin B., Tao Q., Peng J., Soo H. M., Wu W., Ying J., Fields C. R., Delmas A. L., Liu X., Qiu J., Robertson K. D. DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function // *Hum.Mol.Genet*. 2008. V. 17. № 5. P. 690-709.
127. Jin B., Robertson K. D. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer // *Adv.Exp.Med.Biol*. 2013. V. 754. P. 3-29.

128. Jones P. A., Baylin S. B. The epigenomics of cancer // *Cell*. 2007. V. 128. № 4. P. 683-692.
129. Juergens R. A., Wrangle J., Vendetti F. P., Murphy S. C., Zhao M., Coleman B., Sebree R., Rodgers K., Hooker C. M., Franco N., Lee B., Tsai S., Delgado I. E., Rudek M. A., Belinsky S. A., Herman J. G., Baylin S. B., Brock M. V., Rudin C. M. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer // *Cancer Discov*. 2011. V. 1. № 7. P. 598-607.
130. Jurkowska R. Z., Anspach N., Urbanke C., Jia D., Reinhardt R., Nellen W., Cheng X., Jeltsch A. Formation of nucleoprotein filaments by mammalian DNA methyltransferase Dnmt3a in complex with regulator Dnmt3L // *Nucleic Acids Res*. 2008. V. 36. № 21. P. 6656-6663.
131. Jurkowska R. Z., Jurkowski T. P., Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases // *Chembiochem*. 2011. V. 12. № 2. P. 206-222.
132. Kaina B., Margison G. P., Christmann M. Targeting O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy // *Cell Mol.Life Sci*. 2010. V. 67. № 21. P. 3663-3681.
133. Kalari S., Pfeifer G. P. Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis // *Adv.Genet*. 2010. V. 70. P. 277-308.
134. Kang E. S., Park C. W., Chung J. H. Dnmt3b, de novo DNA methyltransferase, interacts with SUMO-1 and Ubc9 through its N-terminal region and is subject to modification by SUMO-1 // *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 2001. V. 289. № 4. P. 862-868.
135. Kang S., Kim J. W., Kang G. H., Park N. H., Song Y. S., Kang S. B., Lee H. P. Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer // *Gynecol.Oncol*. 2005. V. 96. № 1. P. 173-180.
136. Kang S., Kim J. W., Kang G. H., Lee S., Park N. H., Song Y. S., Park S. Y., Kang S. B., Lee H. P. Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma // *Int.J.Cancer*. 2006. V. 118. № 9. P. 2168-2171.



137. Kang S., Kim H. S., Seo S. S., Park S. Y., Sidransky D., Dong S. M. Inverse correlation between RASSF1A hypermethylation, KRAS and BRAF mutations in cervical adenocarcinoma // *Gynecol.Oncol.* 2007. V. 105. № 3. P. 662-666.
138. Karetz M. S., Botello Z. M., Ennis J. J., Chou C., Chedin F. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L // *J.Biol.Chem.* 2006. V. 281. № 36. P. 25893-25902.
139. Khan M. A., Jenkins G. R., Tolleson W. H., Creek K. E., Pirisi L. Retinoic acid inhibition of human papillomavirus type 16-mediated transformation of human keratinocytes // *Cancer Res.* 1993. V. 53. № 4. P. 905-909.
140. Kho M. R., Baker D. J., Laayoun A., Smith S. S. Stalling of human DNA (cytosine-5) methyltransferase at single-strand conformers from a site of dynamic mutation // *J.Mol.Biol.* 1998. V. 275. № 1. P. 67-79.
141. Kimura F., Seifert H. H., Florl A. R., Santourlidis S., Steinhoff C., Swiatkowski S., Mahotka C., Gerharz C. D., Schulz W. A. Decrease of DNA methyltransferase 1 expression relative to cell proliferation in transitional cell carcinoma // *Int.J.Cancer.* 2003. V. 104. № 5. P. 568-578.
142. Klisovic R. B., Stock W., Cataland S., Klisovic M. I., Liu S., Blum W., Green M., Odenike O., Godley L., Burgt J. V., Van Laar E., Cullen M., Macleod A. R., Besterman J. M., Reid G. K., Byrd J. C., Marcucci G. A phase I biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia // *Clin.Cancer Res.* 2008. V. 14. № 8. P. 2444-2449.
143. Kossykh V. G., Schlagman S. L., Hattman S. Phage T4 DNA [N6-adenine]methyltransferase. Overexpression, purification, and characterization // *J.Biol.Chem.* 1995. V. 270. № 24. P. 14389-14393.
144. Kriaucionis S., Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain // *Science.* 2009. V. 324. № 5929. P. 929-930.

145. Kristensen L. S., Hansen L. L. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment // *Clin.Chem.* 2009. V. 55. № 8. P. 1471-1483.
146. Kurihara Y., Kawamura Y., Uchijima Y., Amamo T., Kobayashi H., Asano T., Kurihara H. Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1 // *Dev.Biol.* 2008. V. 313. № 1. P. 335-346.
147. Kuzmin I., Liu L., Dammann R., Geil L., Stanbridge E. J., Wilczynski S. P., Lerman M. I., Pfeifer G. P. Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 8. P. 1888-1893.
148. Laayoun A., Smith S. S. Methylation of slipped duplexes, snapbacks and cruciforms by human DNA(cytosine-5)methyltransferase // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. № 9. P. 1584-1589.
149. Lacks S., Greenberg B. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA // *J.Biol.Chem.* 1975. V. 250. № 11. P. 4060-4066.
150. Lai H. C., Lin Y. W., Chang C. C., Wang H. C., Chu T. W., Yu M. H., Chu T. Y. Hypermethylation of two consecutive tumor suppressor genes, BLU and RASSF1A, located at 3p21.3 in cervical neoplasias // *Gynecol.Oncol.* 2007. V. 104. № 3. P. 629-635.
151. Lande-Diner L., Zhang J., Ben-Porath I., Amariglio N., Keshet I., Hecht M., Azuara V., Fisher A. G., Rechavi G., Cedar H. Role of DNA methylation in stable gene repression // *J.Biol.Chem.* 2007. V. 282. № 16. P. 12194-12200.
152. Larschan E., Alekseyenko A. A., Gortchakov A. A., Peng S., Li B., Yang P., Workman J. L., Park P. J., Kuroda M. I. MSL complex is attracted to genes marked by H3K36 trimethylation using a sequence-independent mechanism // *Mol.Cell.* 2007. V. 28. № 1. P. 121-133.
153. Lau N. C., Seto A. G., Kim J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Bartel D. P., Kingston R. E. Characterization of the piRNA complex from rat testes // *Science.* 2006. V. 313. № 5785. P. 363-367.

154. Laurent L., Wong E., Li G., Huynh T., Tsigos A., Ong C. T., Low H. M., Kin Sung K. W., Rigoutsos I., Loring J., Wei C. L. Dynamic changes in the human methylome during differentiation // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 3. P. 320-331.
155. Lavric O. I., Kolpashchikov D. M., Sobol R., Wilson S. Binary system for selective photoaffinity labeling of base excision repair DNA polymerases // *Nucleic Acids Research.* 2002. V. 30. № 14. e73.
156. Lee B., Muller M. T. SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity // *Biochem.J.* 2009. V. 421. № 3. P. 449-461.
157. Lee B. H., Yegnasubramanian S., Lin X., Nelson W. G. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1 // *J.Biol.Chem.* 2005. V. 280. № 49. P. 40749-40756.
158. Lee J. H., Park S. J., Abraham S. C., Seo J. S., Nam J. H., Choi C., Juhng S. W., Rashid A., Hamilton S. R., Wu T. T. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 26. P. 4646-4654.
159. Lees-Murdock D. J., Walsh C. P. DNA methylation reprogramming in the germ line // *Adv.Exp.Med.Biol.* 2008. V. 626. P. 1-15.
160. Leonhardt H., Page A. W., Weier H. U., Bestor T. H. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei // *Cell.* 1992. V. 71. № 5. P. 865-873.
161. Li B., Zhou J., Liu P., Hu J., Jin H., Shimono Y., Takahashi M., Xu G. Polycomb protein Cbx4 promotes SUMO modification of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a // *Biochem.J.* 2007. V. 405. № 2. P. 369-378.
162. Li E., Bestor T. H., Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality // *Cell.* 1992. V. 69. № 6. P. 915-926.
163. Li E., Beard C., Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting // *Nature.* 1993. V. 366. № 6453. P. 362-365.
164. Li H., Rauch T., Chen Z. X., Szabo P. E., Riggs A. D., Pfeifer G. P. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact

directly and localize to promoters silenced in cancer cells // J.Biol.Chem. 2006. V. 281. № 28. P. 19489-19500.

165. Lin I. G., Han L., Taghva A., O'Brien L. E., Hsieh C. L. Murine de novo methyltransferase Dnmt3a demonstrates strand asymmetry and site preference in the methylation of DNA in vitro // Mol.Cell Biol. 2002. V. 22. № 3. P. 704-723.

166. Ling Y., Sankpal U. T., Robertson A. K., McNally J. G., Karpova T., Robertson K. D. Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. № 2. P. 598-610.

167. Lister R., Pelizzola M., Dowen R. H., Hawkins R. D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J. R., Lee L., Ye Z., Ngo Q. M., Edsall L., Antosiewicz-Bourget J., Stewart R., Ruotti V., Millar A. H., Thomson J. A., Ren B., Ecker J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences // Nature. 2009. V. 462. № 7271. P. 315-322.

168. Liu C., Martin C. T. Fluorescence characterization of the transcription bubble in elongation complexes of T7 RNA polymerase // J.Mol.Biol. 2001. V. 308. № 3. P. 465-475.

169. Liu L., Tommasi S., Lee D. H., Dammann R., Pfeifer G. P. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor // Oncogene. 2003. V. 22. № 50. P. 8125-8136.

170. Liu Y., Oakeley E. J., Sun L., Jost J. P. Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 4. P. 1038-1045.

171. Liu Y., Aryee M. J., Padyukov L., Fallin M. D., Hesselberg E., Runarsson A., Reinius L., Acevedo N., Taub M., Ronninger M., Shchetynsky K., Scheynius A., Kere J., Alfredsson L., Klareskog L., Ekstrom T. J., Feinberg A. P. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis // Nat.Biotechnol. 2013. V. 31. № 2. P. 142-147.

172. Lofton-Day C., Model F., Devos T., Tetzner R., Distler J., Schuster M., Song X., Lesche R., Liebenberg V., Ebert M., Molnar B., Grutzmann R., Pilarsky C.,

Sledziewski A. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening // *Clin.Chem.* 2008. V. 54. № 2. P. 414-423.

173. Lopez de Silanes, I, Gorospe M., Taniguchi H., Abdelmohsen K., Srikantan S., Alaminos M., Berdasco M., Urduingio R. G., Fraga M. F., Jacinto F. V., Esteller M. The RNA-binding protein HuR regulates DNA methylation through stabilization of DNMT3b mRNA // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. № 8. P. 2658-2671.

174. Lubbert M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action // *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000. V. 249. P. 135-164.

175. Maksakova I. A., Mager D. L., Reiss D. Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective // *Cell Mol.Life Sci.* 2008. V. 65. № 21. P. 3329-3347.

176. Malone T., Blumenthal R. M., Cheng X. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes // *J.Mol.Biol.* 1995. V. 253. № 4. P. 618-632.

177. Margot J. B., Ehrenhofer-Murray A. E., Leonhardt H. Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family // *BMC.Mol.Biol.* 2003. V. 4. P. 7.

178. Martin D. I., Cropley J. E., Suter C. M. Epigenetics in disease: leader or follower? // *Epigenetics.* 2011. V. 6. № 7. P. 843-848.

179. Matallanas D., Romano D., Yee K., Meissl K., Kucerova L., Piazzolla D., Baccarini M., Vass J. K., Kolch W., O'Neill E. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein // *Mol.Cell.* 2007. V. 27. № 6. P. 962-975.

180. Matousova M., Votruba I., Otmar M., Tloustova E., Gunterova J., Mertlikova-Kaiserova H. 2 -deoxy-5,6-dihydro-5-azacytidine - a less toxic alternative of 2 -deoxy-5-azacytidine: a comparative study of hypomethylating potential // *Epigenetics.* 2011. V. 6. № 6. P. 769-776.

181. Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome // *Nature.* 2000. V. 403. № 6769. P. 501-502.

182. Meissner A., Mikkelsen T. S., Gu H., Wernig M., Hanna J., Sivachenko A., Zhang X., Bernstein B. E., Nusbaum C., Jaffe D. B., Gnirke A., Jaenisch R., Lander E. S. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells // *Nature*. 2008. V. 454. № 7205. P. 766-770.
183. Meister P., Mango S. E., Gasser S. M. Locking the genome: nuclear organization and cell fate // *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2011. V. 21. № 2. P. 167-174.
184. Mertineit C., Yoder J. A., Taketo T., Laird D. W., Trasler J. M., Bestor T. H. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells // *Development*. 1998. V. 125. № 5. P. 889-897.
185. Meyskens F. L., Jr., Surwit E., Moon T. E., Childers J. M., Davis J. R., Dorr R. T., Johnson C. S., Alberts D. S. Enhancement of regression of cervical intraepithelial neoplasia II (moderate dysplasia) with topically applied all-trans-retinoic acid: a randomized trial // *J.Natl.Cancer Inst.* 1994. V. 86. № 7. P. 539-543.
186. Miranda T. B., Jones P. A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression // *J.Cell Physiol.* 2007. V. 213. № 2. P. 384-390.
187. Mizuno S., Chijiwa T., Okamura T., Akashi K., Fukumaki Y., Niho Y., Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia // *Blood*. 2001. V. 97. № 5. P. 1172-1179.
188. Mohn F., Weber M., Schubeler D., Roloff T. C. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) // *Methods Mol.Biol.* 2009. V. 507. P. 55-64.
189. Morgan H. D., Santos F., Green K., Dean W., Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals // *Hum.Mol.Genet.* 2005. V. 14 Spec No 1. P. R47-R58.
190. Narayan G., Arias-Pulido H., Koul S., Vargas H., Zhang F. F., Vilella J., Schneider A., Terry M. B., Mansukhani M., Murty V. V. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome // *Mol.Cancer*. 2003. V. 2. P. 24.
191. Nimura K., Ishida C., Koriyama H., Hata K., Yamanaka S., Li E., Ura K., Kaneda Y. Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation // *Genes Cells*. 2006. V. 11. № 10. P. 1225-1237.

192. Nygren A. O., Ameziane N., Duarte H. M., Vijzelaar R. N., Waisfisz Q., Hess C. J., Schouten J. P., Errami A. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. № 14. P. e128.
193. Oakes C. C., La Salle S., Robaire B., Trasler J. M. Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR // *Epigenetics.* 2006. V. 1. № 3. P. 146-152.
194. Okano M., Xie S., Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases // *Nat.Genet.* 1998. V. 19. № 3. P. 219-220.
195. Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development // *Cell.* 1999. V. 99. № 3. P. 247-257.
196. Olsen J. V., Blagoev B., Gnad F., Macek B., Kumar C., Mortensen P., Mann M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks // *Cell.* 2006. V. 127. № 3. P. 635-648.
197. Otani J., Nankumo T., Arita K., Inamoto S., Ariyoshi M., Shirakawa M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain // *EMBO Rep.* 2009. V. 10. № 11. P. 1235-1241.
198. Panning B., Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes // *Genes Dev.* 1996. V. 10. № 16. P. 1991-2002.
199. Pfeifer G. P., Tang M., Denissenko M. F. Mutation hotspots and DNA methylation // *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000. V. 249. P. 1-19.
200. Plummer R., Vidal L., Griffin M., Lesley M., de Bono J., Coulthard S., Sludden J., Siu L. L., Chen E. X., Oza A. M., Reid G. K., McLeod A. R., Besterman J. M., Lee C., Judson I., Calvert H., Boddy A. V. Phase I study of MG98, an oligonucleotide antisense inhibitor of human DNA methyltransferase 1, given as a 7-

day infusion in patients with advanced solid tumors // Clin.Cancer Res. 2009. V. 15. № 9. P. 3177-3183.

201. Popp C., Dean W., Feng S., Cokus S. J., Andrews S., Pellegrini M., Jacobsen S. E., Reik W. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency // Nature. 2010. V. 463. № 7284. P. 1101-1105.

202. Pradhan M., Esteve P. O., Chin H. G., Samaranyake M., Kim G. D., Pradhan S. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity // Biochemistry. 2008. V. 47. № 38. P. 10000-10009.

203. Pradhan S., Esteve P. O. Allosteric activator domain of maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and its role in methylation spreading // Biochemistry. 2003. V. 42. № 18. P. 5321-5332.

204. Puck J. M., Willard H. F. X inactivation in females with X-linked disease // N.Engl.J.Med. 1998. V. 338. № 5. P. 325-328.

205. Qiang L, Dehua M, Shuping Z DNA methylation changes in cervical cancers // Cancer Epigenetics. 2012. P. 155-176.

206. Rai K., Huggins I. J., James S. R., Karpf A. R., Jones D. A., Cairns B. R. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45 // Cell. 2008. V. 135. № 7. P. 1201-1212.

207. Raleigh E. A. Organization and function of the mcrBC genes of Escherichia coli K-12 // Mol.Microbiol. 1992. V. 6. № 9. P. 1079-1086.

208. Ramsahoye B. H., Biniszkiewicz D., Lyko F., Clark V., Bird A. P., Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 2000. V. 97. № 10. P. 5237-5242.

209. Ramsahoye B. H. Nearest-neighbor analysis // Methods Mol.Biol. 2002. V. 200. P. 9-15.

210. Ramsden S. C., Clayton-Smith J., Birch R., Buiting K. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes // BMC.Med.Genet. 2010. V. 11. P. 70.



211. Rand K., Qu W., Ho T., Clark S. J., Molloy P. Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives // *Methods*. 2002. V. 27. № 2. P. 114-120.
212. Ratnam S., Mertineit C., Ding F., Howell C. Y., Clarke H. J., Bestor T. H., Chaillet J. R., Trasler J. M. Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development // *Dev.Biol*. 2002. V. 245. № 2. P. 304-314.
213. Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development // *Science*. 2001. V. 293. № 5532. P. 1089-1093.
214. Riggs A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation // *Cytogenet.Cell Genet*. 1975. V. 14. № 1. P. 9-25.
215. Robak T. New nucleoside analogs for patients with hematological malignancies // *Expert.Opin.Investig.Drugs*. 2011. V. 20. № 3. P. 343-359.
216. Robertson K. D., Uzvolgyi E., Liang G., Talmadge C., Sumegi J., Gonzales F. A., Jones P. A. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors // *Nucleic Acids Res*. 1999. V. 27. № 11. P. 2291-2298.
217. Robertson K. D. DNA methylation and human disease // *Nat.Rev.Genet*. 2005. V. 6. № 8. P. 597-610.
218. Rocco J. W., Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression // *Exp.Cell Res*. 2001. V. 264. № 1. P. 42-55.
219. Rountree M. R., Bachman K. E., Baylin S. B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci // *Nat.Genet*. 2000. V. 25. № 3. P. 269-277.
220. Sado T., Fenner M. H., Tan S. S., Tam P., Shioda T., Li E. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation // *Dev.Biol*. 2000. V. 225. № 2. P. 294-303.
221. Saito Y., Kanai Y., Sakamoto M., Saito H., Ishii H., Hirohashi S. Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated

with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002. V. 99. № 15. P. 10060-10065.

222. Sambrook J., Russel D. Molecular cloning: a laboratory manual. // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2222 P.

223. Santi D. V., Norment A., Garrett C. E. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1984. V. 81. № 22. P. 6993-6997.

224. Santos F., Hendrich B., Reik W., Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo // *Dev.Biol.* 2002. V. 241. № 1. P. 172-182.

225. Sato N., Fukushima N., Hruban R. H., Goggins M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia // *Mod.Pathol.* 2008. V. 21. № 3. P. 238-244.

226. Schermelleh L., Haemmer A., Spada F., Rosing N., Meilinger D., Rothbauer U., Cardoso M. C., Leonhardt H. Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. № 13. P. 4301-4312.

227. Schilling E., Rehli M. Global, comparative analysis of tissue-specific promoter CpG methylation // *Genomics.* 2007. V. 90. № 3. P. 314-323.

228. Schouten J. P., McElgunn C. J., Waaijer R., Zwiijnenburg D., Diepvens F., Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. № 12. P. e57.

229. Schroeder G. K., Zhou L., Snider M. J., Chen X., Wolfenden R. Flight of a cytidine deaminase complex with an imperfect transition state analogue inhibitor: mass spectrometric evidence for the presence of a trapped water molecule // *Biochemistry.* 2012. V. 51. № 32. P. 6476-6486.

230. Scott S. A., Lakshimikuttysamma A., Sheridan D. P., Sanche S. E., Geyer C. R., DeCoteau J. F. Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression // *Exp.Hematol.* 2007. V. 35. № 2. P. 263-273.

231. Segura-Pacheco B., Trejo-Becerril C., Perez-Cardenas E., Taja-Chayeb L., Mariscal I., Chavez A., Acuna C., Salazar A. M., Lizano M., Duenas-Gonzalez A. Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy // Clin.Cancer Res. 2003. V. 9. № 5. P. 1596-1603.
232. Sha K. A mechanistic view of genomic imprinting // Annu.Rev.Genomics Hum.Genet. 2008. V. 9. P. 197-216.
233. Sharif J., Muto M., Takebayashi S., Suetake I., Iwamatsu A., Endo T. A., Shinga J., Mizutani-Koseki Y., Toyoda T., Okamura K., Tajima S., Mitsuya K., Okano M., Koseki H. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA // Nature. 2007. V. 450. № 7171. P. 908-912.
234. Sheikhnejad G., Brank A., Christman J. K., Goddard A., Alvarez E., Ford H., Jr., Marquez V. E., Marasco C. J., Sufrin J. R., O'gara M., Cheng X. Mechanism of inhibition of DNA (cytosine C5)-methyltransferases by oligodeoxyribonucleotides containing 5,6-dihydro-5-azacytosine // J.Mol.Biol. 1999. V. 285. № 5. P. 2021-2034.
235. Shen J. C., Rideout W. M., III, Jones P. A. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. № 6. P. 972-976.
236. Shen L., Kondo Y., Rosner G. L., Xiao L., Hernandez N. S., Vilaythong J., Houlihan P. S., Krouse R. S., Prasad A. R., Einspahr J. G., Buckmeier J., Alberts D. S., Hamilton S. R., Issa J. P. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer // J.Natl.Cancer Inst. 2005. V. 97. № 18. P. 1330-1338.
237. Shen S., Qin D. Pyrosequencing data analysis software: a useful tool for EGFR, KRAS, and BRAF mutation analysis // Diagn.Pathol. 2012. V. 7. P. 56.
238. Shestova O. E., Andreeva A. I., Vlasov V. V., Iakubov L. A. Transport of oligonucleotides-cell surface proteins complexes into cell nucleus // Dokl.Akad.Nauk. 1999. V. 368. № 2. P. 264-267.
239. Shivakumar L., Minna J., Sakamaki T., Pestell R., White M. A. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation // Mol.Cell Biol. 2002. V. 22. № 12. P. 4309-4318.

240. Shivapurkar N., Sherman M. E., Stastny V., Echebiri C., Rader J. S., Nayar R., Bonfiglio T. A., Gazdar A. F., Wang S. S. Evaluation of candidate methylation markers to detect cervical neoplasia // *Gynecol.Oncol.* 2007. V. 107. № 3. P. 549-553.
241. Simo-Riudalbas L., Melo S. A., Esteller M. DNMT3B gene amplification predicts resistance to DNA demethylating drugs // *Genes Chromosomes.Cancer.* 2011. V. 50. № 7. P. 527-534.
242. Singer J., Stellwagen R. H., Roberts-Ems J., Riggs A. D. 5-Methylcytosine content of rat hepatoma DNA substituted with bromodeoxyuridine // *J.Biol.Chem.* 1977. V. 252. № 15. P. 5509-5513.
243. Singh V., Sharma P., Capalash N. DNA methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer // *Curr.Cancer Drug Targets.* 2013. V. 13. № 4. P. 379-399.
244. Smith Z. D., Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development // *Nat.Rev.Genet.* 2013. V. 14. № 3. P. 204-220.
245. Stewart F.J., Raleigh E.A. Dependence of McrBC cleavage on distance between recognition elements // *Biol.Chem.* 1998. V. 379. № 4-5. P. 611-616.
246. Straub T., Becker P. B. Dosage compensation: the beginning and end of generalization // *Nat.Rev.Genet.* 2007. V. 8. № 1. P. 47-57.
247. Stresemann C., Brueckner B., Musch T., Stopper H., Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 5. P. 2794-2800.
248. Suetake I., Shinozaki F., Miyagawa J., Takeshima H., Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction // *J.Biol.Chem.* 2004. V. 279. № 26. P. 27816-27823.
249. Suzuki M., Yamada T., Kihara-Negishi F., Sakurai T., Hara E., Tenen D. G., Hozumi N., Oikawa T. Site-specific DNA methylation by a complex of PU.1 and Dnmt3a/b // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 17. P. 2477-2488.
250. Svedruzic Z. M., Reich N. O. DNA cytosine C5 methyltransferase Dnmt1: catalysis-dependent release of allosteric inhibition // *Biochemistry.* 2005a. V. 44. № 27. P. 9472-9485.

251. Svedruzic Z. M., Reich N. O. Mechanism of allosteric regulation of Dnmt1's processivity // *Biochemistry*. 2005b. V. 44. № 45. P. 14977-14988.
252. Tahiliani M., Koh K. P., Shen Y., Pastor W. A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L. M., Liu D. R., Aravind L., Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1 // *Science*. 2009. V. 324. № 5929. P. 930-935.
253. Takai D., Jones P. A. Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome // *Mol.Biol.Evol.* 2004. V. 21. № 3. P. 463-467.
254. Takeshima H., Suetake I., Tajima S. Mouse Dnmt3a preferentially methylates linker DNA and is inhibited by histone H1 // *J.Mol.Biol.* 2008. V. 383. № 4. P. 810-821.
255. Tarasova G. V., Nayakshina T. N., Degtyarev S. K. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal // *BMC.Mol.Biol.* 2008. V. 9. P. 7.
256. Tsai H. C., Li H., Van Neste L., Cai Y., Robert C., Rassool F. V., Shin J. J., Harbom K. M., Beaty R., Pappou E., Harris J., Yen R. W., Ahuja N., Brock M. V., Stearns V., Feller-Kopman D., Yarmus L. B., Lin Y. C., Welm A. L., Issa J. P., Minn I., Matsui W., Jang Y. Y., Sharkis S. J., Baylin S. B., Zahnow C. A. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells // *Cancer Cell*. 2012. V. 21. № 3. P. 430-446.
257. Vakoc C. R., Sachdeva M. M., Wang H., Blobel G. A. Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin // *Mol.Cell Biol.* 2006. V. 26. № 24. P. 9185-9195.
258. Vertino P. M. Eukaryotic DNA Methyltransferases // In: Sadenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions / Eds.Cheng X., Blumenthal R.M.Singapore: World Scientific. 1999. P. 341-372.
259. Vilkaitis G., Suetake I., Klimasauskas S., Tajima S. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase // *J.Biol.Chem.* 2005. V. 280. № 1. P. 64-72.

260. Villar-Garea A., Fraga M. F., Espada J., Esteller M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 16. P. 4984-4989.

261. Vire E., Brenner C., Deplus R., Blanchon L., Fraga M., Didelot C., Morey L., Van Eynde A., Bernard D., Vanderwinden J. M., Bollen M., Esteller M., Di Croce L., de Launoit Y., Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation // *Nature.* 2006. V. 439. № 7078. P. 871-874.

262. Virmani A. K., Muller C., Rathi A., Zochbauer-Mueller S., Mathis M., Gazdar A. F. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis // *Clin.Cancer Res.* 2001. V. 7. № 3. P. 584-589.

263. von Kanel T., Adolf F., Schneider M., Sanz J., Gallati S. Sample number and denaturation time are crucial for the accuracy of capillary-based LightCyclers // *Clin.Chem.* 2007. V. 53. № 7. P. 1392-1394.

264. von Kanel T., Gerber D., Schaller A., Baumer A., Wey E., Jackson C. B., Gisler F. M., Heinimann K., Gallati S. Quantitative 1-step DNA methylation analysis with native genomic DNA as template // *Clin.Chem.* 2010. V. 56. № 7. P. 1098-1106.

265. von Kanel T., Gerber D., Wittwer C. T., Hermann M., Gallati S. Detecting and resolving position-dependent temperature effects in real-time quantitative polymerase chain reaction // *Anal.Biochem.* 2011. V. 419. № 2. P. 161-167.

266. von Kanel T., Huber A. R. DNA methylation analysis // *Swiss.Med.Wkly.* 2013. V. 143. P. w13799.

267. Vos M. D., Ellis C. A., Bell A., Birrer M. J., Clark G. J. Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis // *J.Biol.Chem.* 2000. V. 275. № 46. P. 35669-35672.

268. Vos M. D., Martinez A., Elam C., Dallol A., Taylor B. J., Latif F., Clark G. J. A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 12. P. 4244-4250.

269. Vos M. D., Dallol A., Eckfeld K., Allen N. P., Donninger H., Hesson L. B., Calvisi D., Latif F., Clark G. J. The RASSF1A tumor suppressor activates Bax via MOAP-1 // *J.Biol.Chem.* 2006. V. 281. № 8. P. 4557-4563.

270. Wang J., Hevi S., Kurash J. K., Lei H., Gay F., Bajko J., Su H., Sun W., Chang H., Xu G., Gaudet F., Li E., Chen T. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation // *Nat.Genet.* 2009. V. 41. № 1. P. 125-129.
271. Wang Y., Li Y., Liu X., Cho W. C. Genetic and epigenetic studies for determining molecular targets of natural product anticancer agents // *Curr.Cancer Drug Targets.* 2013. V. 13. № 5. P. 506-518.
272. Warnecke P. M., Stirzaker C., Song J., Grunau C., Melki J. R., Clark S. J. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing // *Methods.* 2002. V. 27. № 2. P. 101-107.
273. Waterland R. A., Jirtle R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation // *Mol.Cell Biol.* 2003. V. 23. № 15. P. 5293-5300.
274. Weber M., Hellmann I., Stadler M. B., Ramos L., Paabo S., Rebhan M., Schubeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome // *Nat.Genet.* 2007. V. 39. № 4. P. 457-466.
275. Webster K. E., O'Bryan M. K., Fletcher S., Crewther P. E., Aapola U., Craig J., Harrison D. K., Aung H., Phutikanit N., Lyle R., Meachem S. J., Antonarakis S. E., de Kretser D. M., Hedger M. P., Peterson P., Carroll B. J., Scott H. S. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2005. V. 102. № 11. P. 4068-4073.
276. Weisenberger D. J., Velicescu M., Cheng J. C., Gonzales F. A., Liang G., Jones P. A. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation // *Mol.Cancer Res.* 2004. V. 2. № 1. P. 62-72.
277. Whang Y. M., Kim Y. H., Kim J. S., Yoo Y. D. RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 9. P. 3682-3690.
278. White H. E., Durston V. J., Harvey J. F., Cross N. C. Quantitative analysis of SNRPN(correction of SRNPN) gene methylation by pyrosequencing as a diagnostic

test for Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome // Clin.Chem. 2006. V. 52. № 6. P. 1005-1013.

279. Widschwendter M., Berger J., Hermann M., Muller H. M., Amberger A., Zeschnigk M., Widschwendter A., Abendstein B., Zeimet A. G., Daxenbichler G., Marth C. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer // J.Natl.Cancer Inst. 2000. V. 92. № 10. P. 826-832.

280. Wisman G. B., Nijhuis E. R., Hoque M. O., Reesink-Peters N., Koning A. J., Volders H. H., Buikema H. J., Boezen H. M., Hollema H., Schuurin E., Sidransky D., van der Zee A. G. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia // Int.J.Cancer. 2006. V. 119. № 8. P. 1908-1914.

281. Wong I. H., Lo Y. M., Zhang J., Liew C. T., Ng M. H., Wong N., Lai P. B., Lau W. Y., Hjelm N. M., Johnson P. J. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients // Cancer Res. 1999. V. 59. № 1. P. 71-73.

282. Worm J., Aggerholm A., Guldberg P. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis // Clin.Chem. 2001. V. 47. № 7. P. 1183-1189.

283. Xie S., Wang Z., Okano M., Nogami M., Li Y., He W. W., Okumura K., Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family // Gene. 1999. V. 236. № 1. P. 87-95.

284. Yamada Y., Watanabe H., Miura F., Soejima H., Uchiyama M., Iwasaka T., Mukai T., Sakaki Y., Ito T. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q // Genome Res. 2004. V. 14. № 2. P. 247-266.

285. Yang H. J., Liu V. W., Wang Y., Chan K. Y., Tsang P. C., Khoo U. S., Cheung A. N., Ngan H. Y. Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients // Gynecol.Oncol. 2004. V. 93. № 2. P. 435-440.

286. Yen Z. C., Meyer I. M., Karalic S., Brown C. J. A cross-species comparison of X-chromosome inactivation in Eutheria // Genomics. 2007. V. 90. № 4. P. 453-463.

287. Yoder J. A., Soman N. S., Verdine G. L., Bestor T. H. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe // J.Mol.Biol. 1997. V. 270. № 3. P. 385-395.



288. Yu M. Y., Tong J. H., Chan P. K., Lee T. L., Chan M. W., Chan A. W., Lo K. W., To K. F. Hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A and frequent concomitant loss of heterozygosity at 3p21 in cervical cancers // *Int.J.Cancer*. 2003. V. 105. № 2. P. 204-209.

289. Zambrano P., Segura-Pacheco B., Perez-Cardenas E., Cetina L., Revilla-Vazquez A., Taja-Chayeb L., Chavez-Blanco A., Angeles E., Cabrera G., Sandoval K., Trejo-Becerril C., Chanona-Vilchis J., Duenas-Gonzalez A. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes // *BMC.Cancer*. 2005. V. 5. P. 44.

290. Zhang F., Pomerantz J. H., Sen G., Palermo A. T., Blau H. M. Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2007. V. 104. № 11. P. 4395-4400.

291. Zhang Y., Rohde C., Tierling S., Jurkowski T. P., Bock C., Santacruz D., Ragozin S., Reinhardt R., Groth M., Walter J., Jeltsch A. DNA methylation analysis of chromosome 21 gene promoters at single base pair and single allele resolution // *PLoS.Genet*. 2009. V. 5. № 3. P. e1000438.

292. Zhang Y., Jurkowska R., Soeroes S., Rajavelu A., Dhayalan A., Bock I., Rathert P., Brandt O., Reinhardt R., Fischle W., Jeltsch A. Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail // *Nucleic Acids Res*. 2010. V. 38. № 13. P. 4246-4253.

293. 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. V. 321. № 4. P. 591-599.

294. Zilberman D., Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns // *Development*. 2007. V. 134. № 22. P. 3959-3965.

295. Zou H. Z., Yu B. M., Wang Z. W., Sun J. Y., Cang H., Gao F., Li D. H., Zhao R., Feng G. G., Yi J. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients // *Clin.Cancer Res*. 2002. V. 8. № 1. P. 188-191.

296. Акишев А. Г., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С. Х. Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с

помощью Bln- и GluI-ПЦР анализа // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. 2011. № 7. С. 5-12.

297. Гончар Д. А., Акишев А. Г., Дегтярев С. Х. BlnI- и GluI-ПЦР анализ – новый метод исследования метилированных участков ДНК // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. 2010. № 6. С. 5-12.

298. Радаева И.Ф., Нечаева Е.А., Дроздов И.Г. Коллекция культур клеток ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора // Новосибирск: Изд-во "ЦЭРИС". 2009. 251 с.

299. Чернухин В. А., Наякшина Т. Н., Абдурашитов М. А., Томилова Ю. Э., Мезенцева Н. В., Дедков В. С., Михненко Н. А., Гончар Д. А., Дегтярев С. Х. Новая эндонуклеаза рестрикции GluI узнает метилированную последовательность 5'-G(5mC)<sup>^</sup>GC-3' // Биотехнология. 2006. № 4. С. 31-35.

300. Чернухин В. А., Томилова Ю. Э., Чмуж Е. В., Соколова О. О., Дедков В. С., Дегтярев С. Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза BlnI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N<sup>^</sup>GC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. 2007а. № 3. С. 28-33.

301. Чернухин В. А., Чмуж Е. В., Томилова Ю. Э., Наякшина Т. Н., Гончар Д. А., Дедков В. С., Дегтярев С. Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)<sup>^</sup>NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN<sup>^</sup>(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. 2007б. № 3. С. 13-17.

302. 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* 3К – продуцент сайт-специфической эндонуклеазы Pcs I // Патент РФ №2377294 С1. 2009.

303. Чернухин В. А., Наякшина Т. Н., Гончар Д. А., Томилова Ю. Э., Тарасова М. В., Дедков В. С., Михненко Н. А., Дегтярев С. Х. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза PkrI узнаёт и расщепляет

метилованную последовательность 5'-GCN<sup>^</sup>GC-3'/3'-CG<sup>^</sup>NCG-5', содержащую не менее 3-х 5-метилцитозин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. 2011а. № 7. С. 35-42.

304. Чернухин В. А., Килева Е. В., Томилова Ю. Э., Болтенгаген А. А., Дедков В. С., Михненко Н. А., Гончар Д. А., Голикова Л. Н., Дегтярев С. Х. Новая метилзависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KfoI узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G<sup>^</sup>C(5mC)GGC-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. 2011b. № 7. С. 14-20.

305. Чернухин В. А., Гончар Д. А., Килева Е. В., Соколова В. А., Голикова Л. Н., Дедков В. С., Михненко Н. А., Дегтярев С. Х. Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза MteI расщепляет последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. 2012. № 8. С. 16-26.