

Кузнецов Виталий Викторович

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

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Научный руководитель: Нетесова Нина Александровна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией разработки средств ПЦР-диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН «Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Официальные оппоненты: Дейнеко Елена Викторовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биоинженерии растений ФГБУН «Института цитологии и генетики СО РАН»

Брускин Сергей Александрович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией функциональной геномики ФГБУН «Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «18» сентября 2015 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской области, 630559, тел. 8(383) 336-74-28. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

В.А. Белявская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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, но и родительский импринтинг, инактивацию X-хромосомы, поддержание целостности генома клетки и его защиту от встраивания ретровирусов и транспозонов (Jurkowska et al. 2011). Аберрантное метилирование ДНК может способствовать развитию неврологических, психических, эндокринных заболеваний (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, аутизм, шизофрения, сахарный диабет II типа и др.), а также возникновению и прогрессии опухолей (рак молочной железы, яичников, шейки матки и др.) (Feinberg 2007, 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 (ГСО), инвазии, метастазирования, неоангиогенеза, в том числе генов системы репарации ДНК и регуляции апоптоза, утрата функций которых обнаруживается на ранних стадиях опухолевой прогрессии (Lavríc 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 (Delpré et al. 2013). В настоящее время допущены к применению аналоги цитидина (Vidaza[®], Dacogen[®]) для терапии острого миелоидного лейкоза и миелодиспластического синдрома (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 аберрантное 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 (индекс селективности > 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.

Основные 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, шпилечной 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 48 часов.

3. Наиболее эффективные ингибиторы Dnmt1 обладают следующими характеристиками: ингибирование активности Dnmt1 *in vitro* 80-90%, IC₅₀ < 200 нМ, индекс селективности $\left(\frac{TC_{50, \text{нераковых клеток}}}{TC_{50, \text{раковых клеток}}}\right)$ 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 в клетках.

Апробация материалов диссертации. Материалы исследований по теме диссертации были представлены на пяти российских и международных конференциях.

Реализация результатов исследования. По материалам диссертации опубликованы четыре печатные работы (включая две в журналах, входящих в перечень ВАК) и два патента РФ.

Структура и объем 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 ГНЦ ВБ «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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались: препарат рекомбинантной Dnmt1 (2 е.а./мкл) (“New England Biolabs”, США), [³H-CH₃]AdoMet (15 кюри/ммоль), инозин-содержащий полимер поли(dI-dC)•поли(dI-dC) длиной 1755 п.н. (“GE Healthcare”, Великобритания); AdoMet (“Sigma-Aldrich”, США), эндонуклеазу рестрикции *TaqI* (20 е.а./мкл), MD-эндонуклеазу *GlaI* (8 е.а./мкл), высокоактивную T4 ДНК-лигазу (2000 е.а./мкл), HotStart ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, стабилизатор для GC-ПЦР (“СибЭнзим”, Россия) и Tween-80 – производства Sigma (Германия).

Олигодезоксирибонуклеотидные (ОДН) ингибиторы синтезированы ЗАО “Биосан” (Новосибирск), фосфорамидиты модифицированных оснований производства “Glen Research” (США). При получении фосфотиоатов использовали реактив Beaucage (“Glen Research”, США). Концентрации олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически. Дуплексные и шпилечные ДНК-структуры получали отжигом олигонуклеотидов — нагревом до 85 °С с последующим плавным охлаждением до комнатной температуры.

Измерение скоростей реакции метилирования ДНК

Реакционная смесь содержала 50 мМ Трис-НСl, рН 7,8, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 5 % глицерин и 0,1 мг/мл БСА. Концентрации 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. Реакцию метилирования ДНК проводили при 37 °С, время реакции 3 часа. Аликвоты реакционных смесей объемом 18 мкл наносили на диски анионообменных фильтров DE-81 (“Whatman”, Великобритания). Фильтры промывали трижды раствором 0,02 М NH_4HCO_3 , дважды дистиллированной водой и один раз 75 %-ным этанолом, после чего фильтры высушивали и подсчитывали их ^3H -радиоактивность в толуольном сцинтиляторе на счетчике Mark III (“Searle Analytic”, США).

Предварительную оценку субстратных и ингибиторных свойств проводили на основании сравнения степеней метилирования 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 (IC_{50}) согласно стандартному выражению: $A = \frac{A_{\text{max}}}{1 + (\frac{I}{\text{IC}_{50}})^n}$ где n – коэффициент Хилла.

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 (ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”) с добавлением 5 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

Изучение внутриклеточной локализации олигонуклеотидов в клетках

Для изучения внутриклеточной локализации олигонуклеотидов в клетках HeLa и CaSki использовали флуоресцентно меченные олигонуклеотиды. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах на покровных стеклах в 2 мл среды с сывороткой без антибиотиков (18 часов, 37 °С, 5 % CO_2), 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 Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2 mM KH₂PO₄, 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 SKX41 (“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 меченных ОДН в клетке.

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. Экспозиция ингибиторов составляла 4 часа после чего клетки культивировали в течение 24 часов. Затем среду удаляли, а монослой прокрашивали витальным красителем нейтральным красным. После удаления красителя и отмывки лунок добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированного живыми клетками монослоя, измеряли на планшетном спектрофотометре Emax (“Molecular Devices”, США) 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. Значения 50 %-ных цитотоксических концентраций (ТС₅₀) препаратов рассчитывали аналогично расчету IC₅₀. Статистическую обработку полученных результатов проводили по U-критерию Манна-Уитни.

Выделение ДНК из клеток

Промытый тоекратно 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-НСl, 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 °С 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).

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 °С в буфере следующего состава: 10 mM Tris-SO₄, pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 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-SO₄, pH 8.0, 4 mM MgCl₂, 1 mM β-меркаптоэтанол и 100 нг/мкл BSA, и проводили гидролиз в конечном

объеме 21,7 мкл в течение 15 минут при 30 °С с последующей инактивацией *GlaI* при 65 °С в течение 20 минут. Далее к *GlaI*-гидролизату вносили АТФ до конечной концентрации 0,5 мМ, β-меркаптоэтанол до 6,8 мМ, 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 °С, затем лигазу термоинактивировали при 65 °С в течение 20 минут. Для проведения ПЦР ко всему объему полученной смеси добавляли следующие компоненты до достижения итоговых концентраций: 50 мМ Tris-SO₄, рН 9,0, 30 мМ KCl, 10 мМ сульфата аммония, 3 мМ MgCl₂, 0,2 мМ 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 °С – 3 минуты, далее 5 циклов без детекции: 95 °С – 10 секунд, 61 °С – 15 секунд, 72 °С – 5 секунд; затем 40 циклов с детекцией (канал FAM) на стадии отжига: 95 °С – 10 секунд, 61 °С – 15 секунд, 72 °С – 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 трехкратно. Для анализа данных использовали программу Bio-Rad CFX Manager v.2.1 («Bio-Rad», США), статистическую обработку проводили по U-критерию Манна-Уитни.

Применяемые для GLAD-ПЦР анализа статуса метилирования ГСО праймеры, TaqMan-зонды и адаптер были синтезированы во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (табл. 1).

Таблица 1

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	5' CCTGCTCTTTCATCGGTTTC
RARB_TaqMan	5' FAM-TCCCAGTCCTCAAACAGCTCGCATGG-BHQ1
RASSF1	5' ATGTCGGGGGAGCCTGAG
RASSF1_GLAD	5' CCTGCTCTTTCATCGGCC
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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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. При выборе ДНК-последовательностей ориентировались на существующие литературные данные (Laayoun and Smith 1995, Sheikhnejad et al. 1999, Flynn et al. 2003), пытаясь максимально учесть совокупность известных экспериментальных фактов для получения эффективных лигандов таких как: длина субстратной ДНК при центрально расположенном CpG-сайте не менее 22 п.н.; эффективно взаимодействовать с Dnmt1 могут одноцепочечные и самокомплементарные шпилечные структуры; скорость метилирования зависит от наличия в сайте 5-метилцитозина (полуметилованный сайт) и некомплементарных или модифицированных оснований; сродство Dnmt1 к CpG сайту выше при наличии фланкирующих нуклеотидов 5'-CCG, 5'-GCGG, 5'-CCGC, 5'-CCGG и 5'-CGCTC; замена межнуклеотидных фосфатов на фосфотиоаты способна повышать сродство олигонуклеотида к ферменту.

В таблице 2 приведены синтезированные в результате ДНК-структуры, полученные на основе выбранной базовой 22-звенной последовательности 5'-GAAATGGATCCGCTCTAAACTG (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. 1). 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. Третье соединение — 6-метил-пирроло-[2,3-d]-2-пиримидинон — синтезированный флуоресцентный аналог цитозина.

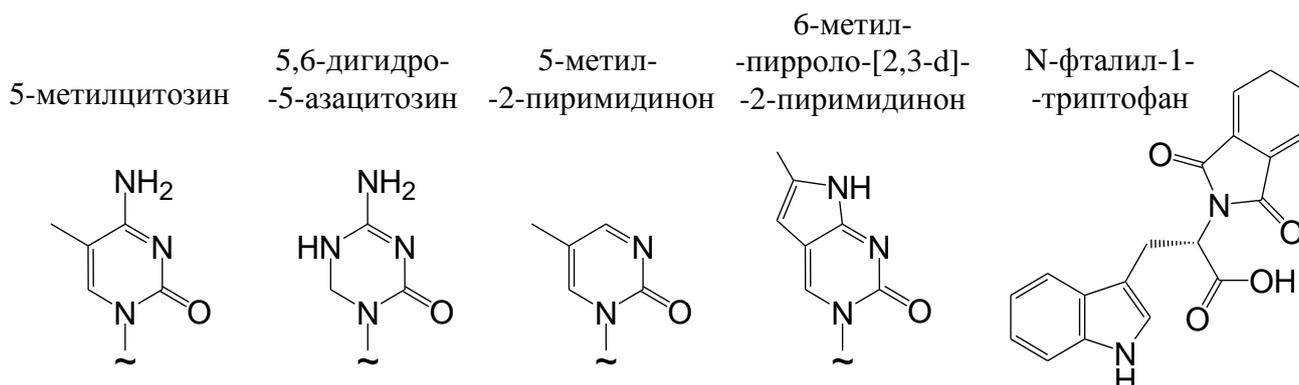


Рис. 1. Структурные формулы модифицированных аналогов цитозина и N-фталил-1-триптофана — низкомолекулярного ингибитора Dnmt1.

2. Субстратные свойства синтетических олигонуклеотидных структур

В качестве стандартной субстратной ДНК использовали полимер поли(dI-dC)·поли(dI-dC), характеризующийся высокой скоростью его метилирования Dnmt1.

Результаты оценки субстратных свойств олигонуклеотидных структур в сравнении с поли(dI-dC)·поли(dI-dC) представлены в таблице 2 (столбец СМ).

Таблица 2

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

Лиганд	Структура	СМ, %	МС, %	ИМ, %
RG108	См. рис. 1	0	86	14
GC-box ^{МЕТ}	5' CTGGATCCTTGCC MG CCCTTGAATTCCC	0	96	4
ОДН-1S	5' GAAATGGATC CG CTCTAAACTG	0	90	10
ОДН-2S	5' GAAATGGATC CG CTCTAAACTG CCMG CC	17	73	44
ОДН-3S	5' GAAATGGATC CG CTCTAAACTG	0	79	21
ОДН-4S	5' GAAATGGATC CG CTCTAAACTG	0	64	36
ОДН-5S	5' GAAATGGATC CG CTCTAAACTG CCMG CC	2	60	42
ОДН-6S	5' GAAATGGATC MG CTCTAAACTG CCMG CC	0	32	68
ОДН-7S	5' GAAATGGATC ZG CTCTAAACTG CCMG CC	0	53	47
ОДН-8S	5' GAAATGGATC DG CTCTAAACTG CCMG CC	0	21	79
ОДН-1D	5' GAAATGGATC CG CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	16	86	30
ОДН-2D	5' GAAATGGATC CG CTCTAAACTG CCMG CC 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	13	82	31
ОДН-3D	5' GAAATGGATC MG CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	0	43	57
ОДН-4D	5' GAAATGGATC C GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG AM GAGATTTGAC	400	229	–
ОДН-5D	5' GAAATGGATC C GCTCTAAACTG CCMG CC 3' CTTTACCTAG AM GAGATTTGAC	382	309	–
ОДН-6D	5' GAAATGGATC CC GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG A MGAGATTTGAC	179	170	–
ОДН-7D	5' GAAATGGATC CC GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG G MGAGATTTGAC	37	96	41
ОДН-8D	5' GAAATGGATC M GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG AM GAGATTTGAC	0	34	66
ОДН-9D	5' GAAATGGATC CC GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	23	67	56
ОДН-10D	5' GAAATGGATC CC GCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	0	43	57
ОДН-11D	5' GAAATGGATC MG CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	0	19	81
ОДН-12D	5' GAAATGGATC DG CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	0	17	83
ОДН-13D	5' GAAATGGATC ZG CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	0	12	88
ОДН-14D	5' GAAATGGATC PG CTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG GM GAGATTTGAC	0	15	85

Лиганд	Структура	СМ, %	МС, %	ИМ, %
ОДН-15D	5' GAAATGGATC ^C CGCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG ^{AM} GAGATTTGAC	0	14	86
ОДН-16D	5' GAAATGGATC ^M CGCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG ^{AM} GAGATTTGAC	0	35	65
ОДН-17D	5' GAAATGGATC ^Z CGCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG ^{AM} GAGATTTGAC	0	43	57
ОДН-18D	5' GAAATGGATC ^D CGCTCTAAACTG 3' CTTTACCTAG ^{AM} GAGATTTGAC	0	15	85
ОДН-1Н	5' GAAATGGATC ^G CTCTAAACTG ^{CC} C 3' CTTTACCTAG ^{GM} GAGATTTGAC ^{CC} C	0	32	68
ОДН-2Н	5' GAAATGGATC ^{CG} CTCTAAACTG ^{CC} C 3' CTTTACCTAG ^{GM} GAGATTTGAC ^{CC} C	23	53	70
ОДН-3Н	5' GAAATGGATC ^{CG} CTCTAAACTG ^{CC} ^M 3' CTTTACCTAG ^{GM} GAGATTTGAC ^{CC} ^G	25	60	65
ОДН-4Н	5' GAAATGGATC ^{CG} CTCTAAACTG ^{CC} C 3' CTTTACCTAG ^{GM} GAGATTTGAC ^{CC} C	0	22	78
ОДН-5Н	5' GAAATGGATC ^C CGCTCTAAACTG ^{CC} C 3' CTTTACCTAG ^{AM} GAGATTTGAC ^{CC} C	0	6	94
ОДН-1F	5' FAM-GAAATGGATC ^{CG} CTCTAAACTGCC ^{CG} CC	–	–	–
ОДН-2F	5' FAM-GAATGGATC ^{CG} CTCTAAACTG ^C _C 3' CTTACCTAG ^{GC} GAGATTGAC ^C _C	–	–	–
ОДН-К	5' GAAATGGATCATCTCTAAACTG	0	0	0
ОДН-1	5' GAAATGGATC ^M CGCTCTAAACTGCC ^M GCC	0	13	87
ОДН-2	5' GAATGGATC ^M GCTCTAACTG ^C _C 3' CTTACCTAG ^{GC} GAGATTGAC ^C _C	0	24	76
ОДН-3	5' GAATGGATC ^C CGCTCTAACTG ^C _C 3' CTTACCTAG ^{AM} GAGATTGAC ^C _C	0	18	82
ОДН-4	5' GAATGGATC ^M ACTCTAACTG ^C _C 3' CTTACCTAG ^{GC} GAGATTGAC ^C _C	0	18	82

Примечание. СМ — метилирование относительно dI-dC, МС — метилирование смеси с dI-dC, ИМ — ингибирование метилирования dI-dC. RG108 — N-фталил-1-триптофан (рис. 1). Реакционные смеси содержали 0.05 ед. акт./мкл Dnmt1, 10 мкМ [³H-CH₃]AdoMet, 1 мкМ поли(dI-dC)·поли(dI-dC) (в пересчете на сайты 5'-C1) и/или 1 мкМ лиганда.

В качестве контрольных ингибиторов использовали низкомолекулярное соединение N-фталил-1-триптофан (рис. 1) и дополнительно синтезированный 30-звенный олигонуклеотид GC-box^{МЕТ}, показавшие ранее ингибирующий эффект *in vitro* в отношении бактериальной МТазы SssI и мышшиной Dnmt1 и вызывавшие деметилирование геномной ДНК и реактивацию генов-супрессоров опухолей.

Как и ожидалось, одноцепочечные олигонуклеотиды не проявили заметных субстратных свойств, исключение составил олигонуклеотид ОДН-2S, который

оказался способным к модификации (табл. 2). Можно предположить, что дополнительно введенный в олигонуклеотид ОДН-2S метилированный динуклеотид 5'-MG стимулирует метилирование первого динуклеотида 5'-CG, что наблюдали и ранее при взаимодействии Dnmt1 с одноцепочечными олигонуклеотидами. Дальнейшее введение в структуру олигонуклеотида ОДН-2S фосфотиоатов резко снижало его субстратный потенциал (см. ОДН-5S, табл. 2). Двухцепочечные и шпилечные структуры, потенциально способные быть акцепторами метильной группы, проявляли субстратные свойства широкого диапазона. Структуры ОДН-1D, ОДН-2H и ОДН-3H, 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, 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-2H с ОДН-3H, табл. 2). 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-4H, ОДН-5H, табл. 2).

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 разности степеней метилирования, представлен в таблице 2 (столбец ИМ). Среди одноцепочечных олигонуклеотидов выраженные ингибиторные свойства проявил олигонуклеотид ОДН-2S (44 %), а также олигонуклеотиды ОДН-4S-8S, несущие в районе участка узнавания замены межнуклеотидных фосфатов на фосфотиоаты (36-79 %). Из последних наиболее эффективным ингибитором был ОДН-8S, содержащий дополнительную замену цитозина в участке узнавания на 5,6-дигидро-5-азацитозин (79 %). В ряду двухцепочечных 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 С:А (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-1Н ингибировать метилирование субстрата.

Далее для отдельных олигонуклеотидных структур измеряли зависимости скоростей реакции метилирования 1 мкМ поли(dI-dC)·поли(dI-dC) от количества ингибитора и определяли 50 %-ные ингибирующие концентрации (IC_{50}) (рис. 2).

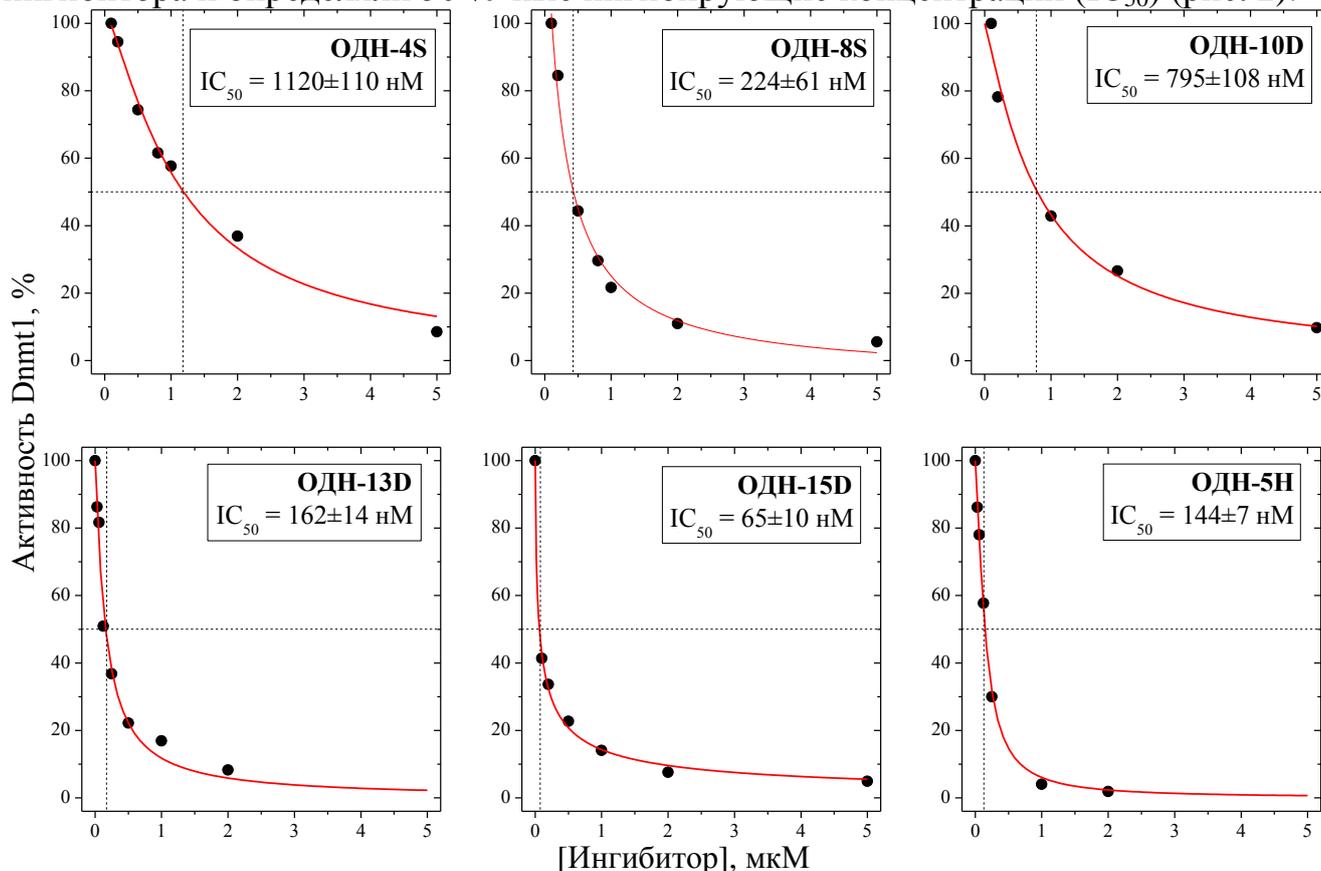


Рис. 2. Ингибирование активности Dnmt1 возрастающими концентрациями олигонуклеотидных ингибиторов. Реакционные смеси содержали 1 мкМ поли(dI-dC)·поли(dI-dC), 10 мкМ [3H -CH $_3$]AdoMet и 0,05 ед. акт./мкл Dnmt1.

Самое высокое значение IC_{50} (1120 нМ) зафиксировано у ОДН-4S, обладающего наименьшим процентом ингибирования (36%), однако добавление дополнительного сайта MG и наличие модифицированного основания — 5,6-дигидро-5-азацитозина (ОДН-8S) — уменьшают IC_{50} в 5 раз до значения 224 нМ (рис. 2). Показательно сравнение полученных величин IC_{50} в ряду фосфотиоат-содержащих структур ОДН-4S, ОДН-10D и ОДН-13D (рис. 2): 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-пиримидином (162 нМ). Ожидается хорошими параметрами IC_{50} характеризуются ингибиторы ОДН-15D и ОДН-5H (рис. 2), 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,

двухцепочечная или шпилечная структура и замена фосфатов на фосфотиоаты (например, ОДН-15D, ОДН-18D и ОДН-5H, табл. 2).

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. 2), тогда как сама по себе С:А некомплементарность в ОДН-15D снижает IC_{50} почти в три раза при сопоставимой эффективности ингибирования (табл. 2), 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 двухцепочечные структуры не применялись для экспериментов с раковыми клетками, а были заменены шпилечными аналогами. В результате были синтезированы следующие ОДН: одноцепочечный ОДН-1, шпилечные ОДН-2-4 и контрольный олигонуклеотид ОДН-К, не обладающий субстратными свойствами и способностью ингибировать реакцию метилирования (табл. 2), которые также были оценены с точки зрения способности ингибировать Dnmt1 в реакции метилирования субстрата *in vitro*.

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

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 меченые FAM олигонуклеотиды (ОДН-1F, аналог ОДН-1 и ОДН-2F аналог ОДН-2, см. табл. 2), в которых все фосфаты заменены фосфотиоатами.

На рисунке 3 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.

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. Следовательно, трансфецированные ОДН локализуются непосредственно там, где происходит реакция метилирования ДНК.

При изучении деградации олигонуклеотида ОДН-1F 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. 4. Для ОДН-2F получены аналогичные результаты). В клетках CaSki оба

олигонуклеотида продемонстрировали схожие результаты, 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.

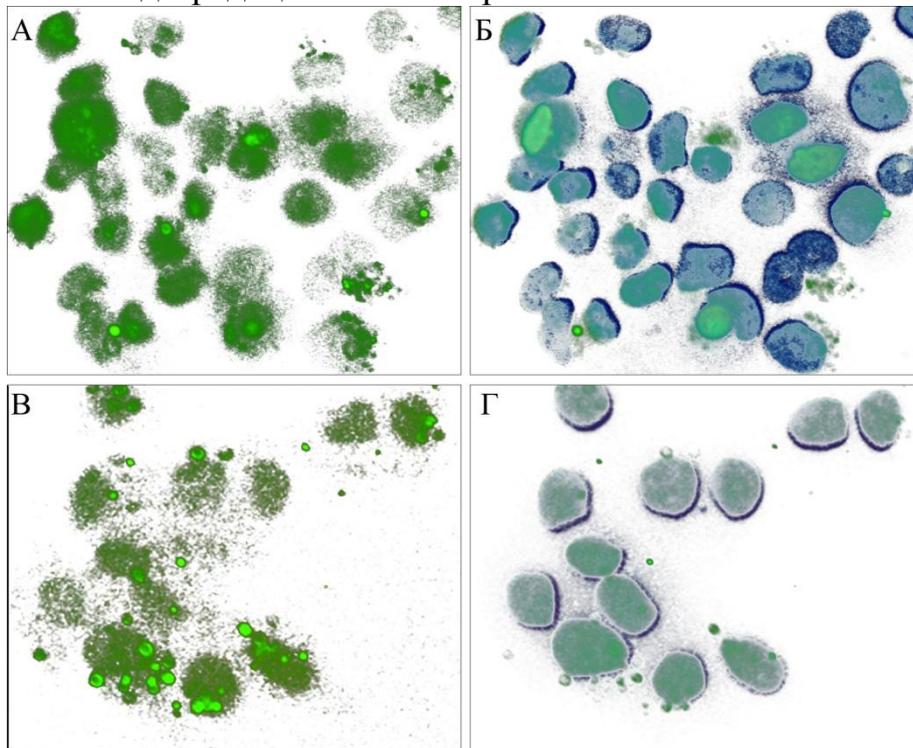


Рис. 3. Оценка проникновения и преимущественной локализации олигонуклеотида ОДН-1F в клетках HeLa (А, Б) и CaSki (В, Г). А, В — флуоресценция ОДН, Б, Г — то же, но с наложением свечения ядер клеток, окрашенных DAPI.

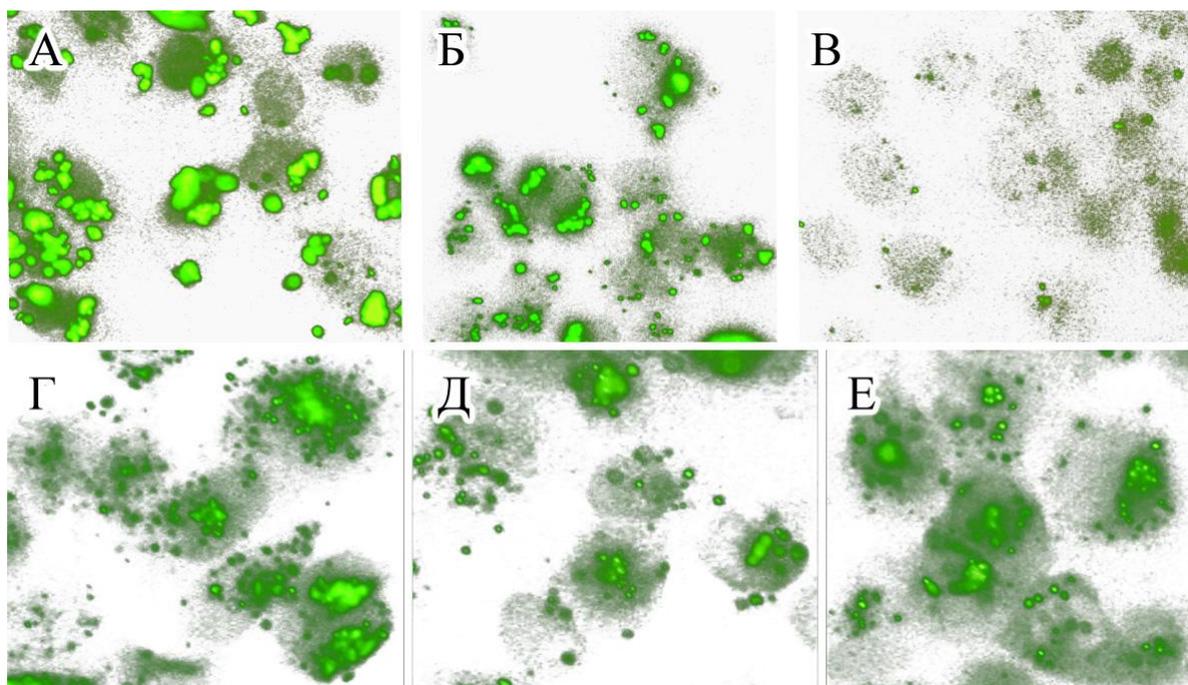


Рис. 4. Устойчивость ОДН-1F в клетках HeLa (А — 24 ч, Б — 48 ч, В — 72 ч) и CaSki (Г — 24 ч, Д — 48 ч, Е — 72 ч).

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 5 изображены зависимости количества живых клеток трех линий (в единицах оптической плотности) от концентрации ингибиторов в ростовой среде. Значения 50 %-ных токсических концентраций (TC_{50}) приведены в таблице 3.

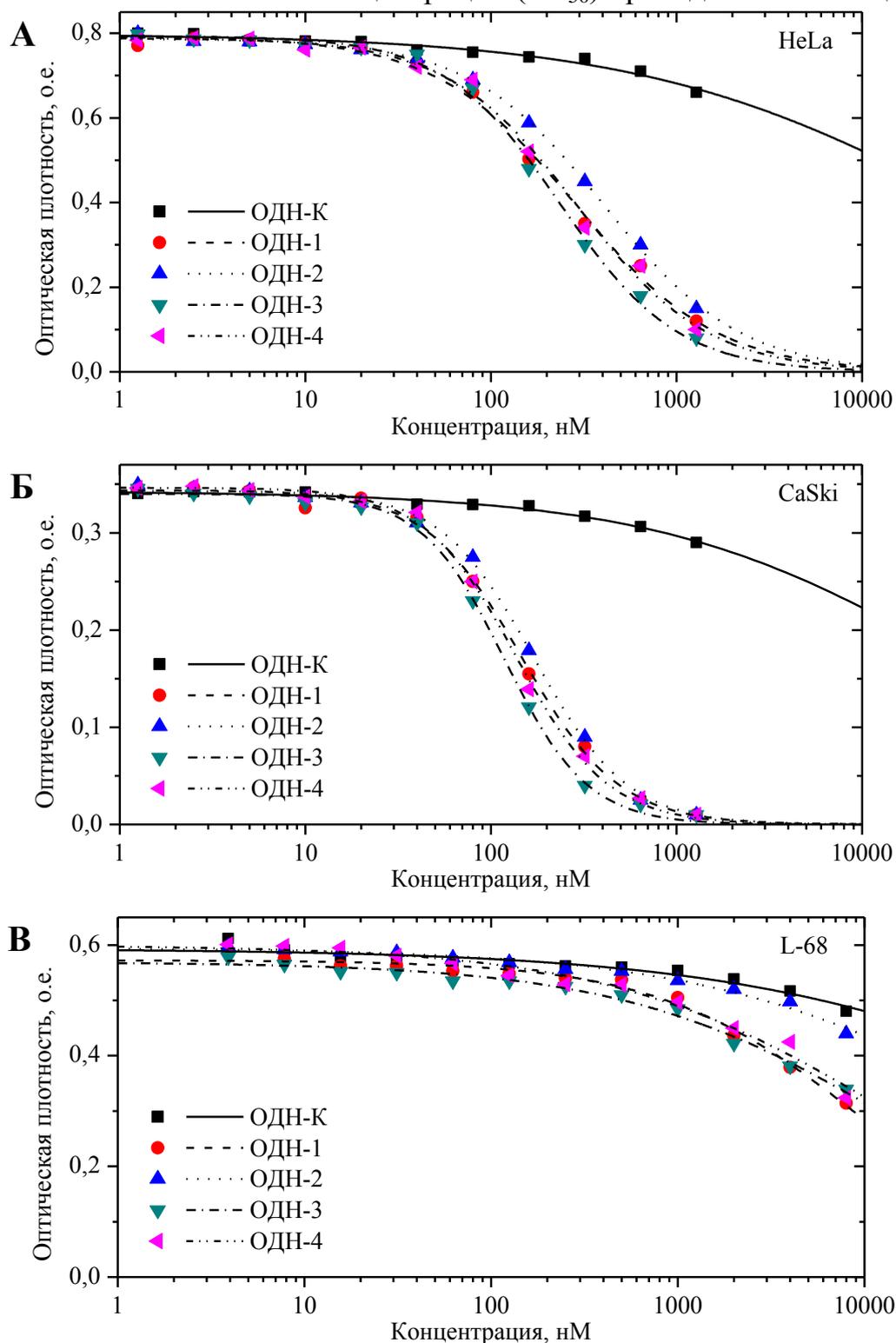


Рис. 5. Цитотоксическая активность олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 на культурах клеток HeLa (А), CaSki (Б) и L-68 (В) в зависимости от концентрации ОДН (нМ).

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

№	Структура (5'→3')	TC ₅₀ , нМ		
		HeLa	CaSki	L-68
ОДН-К	GAAATGGATCATCTCTAAACTG	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
ОДН-1	GAAATGGATC MG CTCTAAACTGCC MG CC	285±15*	147±5*	>10 ⁴
ОДН-2	GAATGGATC MG CTCTAAACTG _C CTTACCTAG GC GAGATTGAC _C	408±9*	170±5*	>10 ⁴
ОДН-3	GAATGGATC CG CTCTAAACTG _C CTTACCTAG AM GAGATTGAC _C	236±10*	118±3*	>10 ⁴
ОДН-4	GAATGGATC MA CTCTAAACTG _C CTTACCTAG GC GAGATTGAC _C	290±18*	136±5*	>10 ⁴

* – различия с контрольным ОДН статистически значимы, $p < 0,01$.

Для исследованных синтетических ингибиторов получены весьма низкие значения TC₅₀ в отношении раковых клеток (118-408 нМ, см. табл. 3), в то время как для фибробластов L-68 TC₅₀ оказалась на уровне контроля (>10⁴ нМ). Различие с контролем более чем в 100 раз указывает на хороший терапевтический потенциал сконструированных олигонуклеотидов. Наиболее эффективным оказался ОДН-3 (TC_{50,HeLa} = 236 нМ, TC_{50,CaSki} = 118 нМ, см. табл. 3), содержащий полуметилированный сайт с С:А некоплементарностью.

Сравнивая эффективность ингибирования роста клеток HeLa (TC₅₀ = 236-408 нМ) и CaSki (TC₅₀ = 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.

Для исследования влияния Липофектамина 2000 на жизнеспособность клеток в ростовую среду вносили липофектамин в количествах, необходимых для транспортировки ингибиторов ОДН-1-4, взятых в аналогичных опыту концентрациях. Полученные значения TC₅₀ для липофектамина более чем на порядок отличались от TC₅₀ ингибиторов, что позволило считать его вклад в цитотоксический эффект ОДН незначительным.

6. Выбор метода для анализа статуса метилирования ДНК

Метилирование *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' (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).

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 дегградации ДНК, многостадийность, длительность и трудоемкость исследования, что делает их применение нерациональным для анализа большого количества образцов ДНК по нескольким регионам.

С другой стороны, набирают популярность методы, основанные на использовании метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции так как для анализа используется ДНК без дополнительной обработки, сокращается время исследования (до 1,5-5 часов от момента выделения ДНК) и число необходимых манипуляций. 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, блокируются по-разному: *HpaII* не способна расщеплять последовательность 5'-(5mC)CGG, а *MspI* — 5'-C(5mC)GG (Zilberman and Henikoff 2007). К недостаткам метода для настоящей работы можно отнести возможность неполного гидролиза ДНК, дающего ложноположительный результат, а также то, что последовательность 5'-CCGG в отличие от RCGY не является сайтом для aberrантного метилирования *de novo*.

Альтернативным подходом является использование метилзависимых (MD) эндонуклеаз, которые специфически фрагментируют только метилированную ДНК. Недавно зарубежными исследователями в этих целях был использован фермент *McrBC*, узнающий последовательность R(5mC)N₄₀₋₃₀₀₀R(5mC) и расщепляющий ее вблизи от одного из двух узнаваемых динуклеотидов. 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) (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 {Акишев, 2011 365 /id; Гончар, 2010 366 /id}, однако его использование в данной работе было нерационально, так как он обладал недостатками присущими MSP методам. В частности, для правильной оценки результатов было 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 использовать новый способ определения метилированной последовательности R(5mC)GY в заданном положении протяженной ДНК — GLAD-ПЦР анализ (*GlaI* digestion and Ligation Adapter Dependent ПЦР, рис. 6) — для изучения изменения картины метилирования ДНК при использовании ингибиторов Dnmt1.

Метилированная ДНК

Неметилированная ДНК

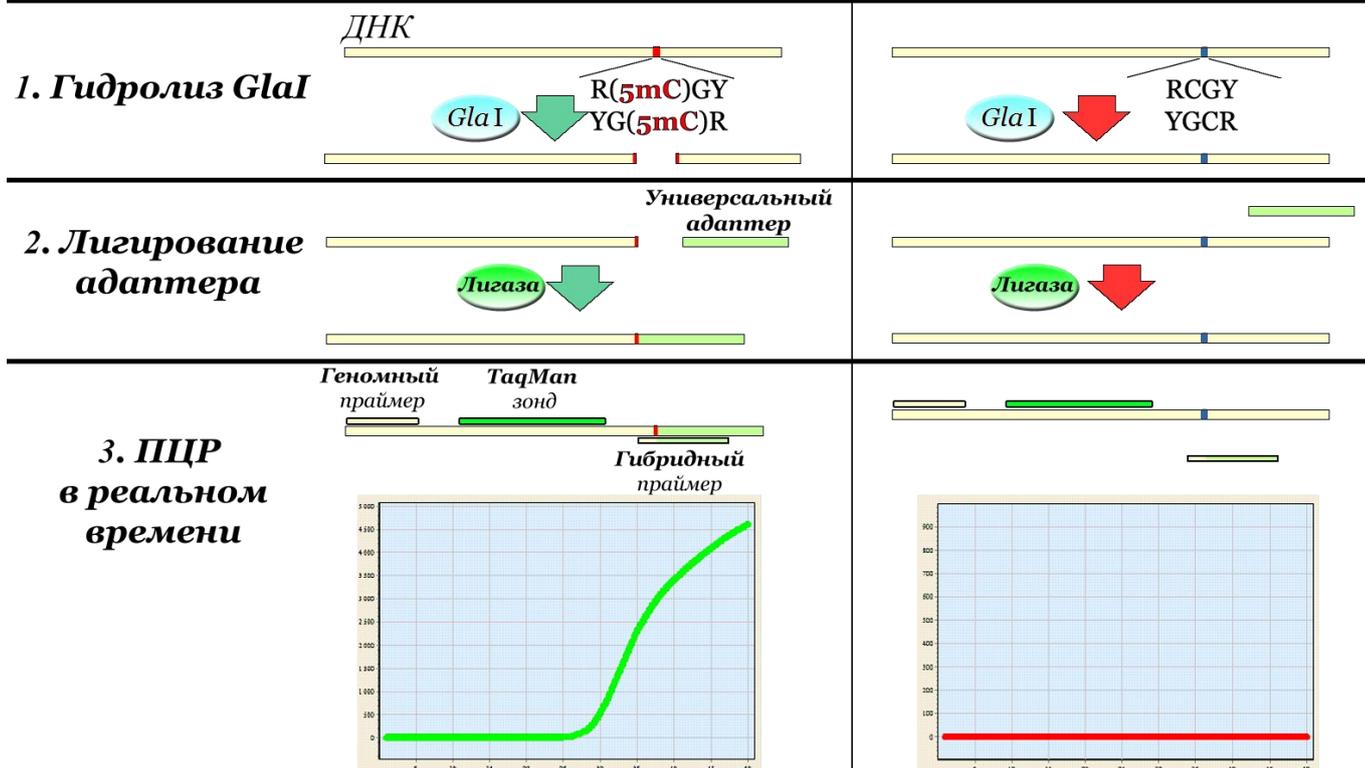


Рис. 6. Принцип GLAD-ПЦР анализа.

Выбор метода был не случаен, так как он выгодно отличался от широко распространенных на сегодняшний день методов (табл. 4).

Таблица 4

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
Дегградация 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

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

Для оценки деметилирующего эффекта ингибиторов на гиперметилированные регуляторные районы генов-супрессоров опухолей был применен GLAD-ПЦР анализ 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 последующим суточным культивированием. Эффективность ингибиторов оценивали исходя из

значений C_t , за 100 % уровень метилирования был принят сигнал, получаемый с нативной ДНК.

Основываясь на литературных данных, были выбраны пять ГСО, для которых показано наличие гиперметилирования регуляторных районов в карциномах шейки матки: ген-регулятор клеточного цикла *CDKN2A*, ген апоптоза *DAPK*, ген белка системы репарации ДНК *MGMT*, ген-регулятор процессов эмбрионального морфогенеза, клеточного роста и дифференциации *RARB* и ген негативного Ras-эффектора *RASSF1A*. Результаты анализа статуса метилирования этих генов приведены в таблице 5.

Таблица 5

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

Проба \ ГСО	<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.

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, 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 %), 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, а, значит, полученные данные указывают на различную скорость деления клеток HeLa и CaSki, что подтверждается литературными данными.

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. 5), для которого получено наименьшее значение IC_{50} . 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, 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.

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.

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 ($\frac{TC_{50, \text{нераковых клеток}}}{TC_{50, \text{раковых клеток}}}$) наилучшего ингибитора > 100.

5. Было оценено влияние ОДН ингибиторов на aberrантное 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
IC₅₀ — 50 %-ая ингибирующая концентрация
MD — Methylation Directed, метилзависимые
MSP — Methylation Sensitive PCR, метилчувствительная ПЦР
TC₅₀ — 50 %-ая цитотоксическая концентрация
ВПЧ — вирус папилломы человека
ГСО — ген-супрессор опухолей
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
МТаза — ДНК-метилтрансфераза
ОДН — олигодезоксирибонуклеотид
ПЦР — полимеразная цепная реакция
Обозначения нуклеотидов:
5mC, M — 5-метилцитозин
D — 5,6-дигидро-5-азацитозин
N — А или G, или Т, или С
P — 6-метил-пирроло-[2,3-d]-2-пиримидинон
R — А или G
Y — Т или С
Z — 5-метил-2-пиримидинон

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Нетесова Н. А. Создание ингибиторов ДНК-метилтрансферазы 1 человека // Достижения современной биотехнологии: Сб. науч. тр. / Под ред. проф. И. Г. Дроздова. – Новосибирск, 2008. – С. 264–270. (не входит в перечень ВАК)
2. Евдокимов А. А., Зиновьев В. В., Кузнецов В. В., Нетесова Н. А., Малыгин Э. Г. Конструирование олигонуклеотидных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы 1 человека // Молекулярная биология. – 2009. – Т. 43, №3. – С. 455-463.
3. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Акишев А. Г., Дегтярев С. Х., Нетесова Н. А. Влияние олигонуклеотидов-ингибиторов Dnmt1 человека на рост раковых клеток Hela и уровень метилирования генов-онкосупрессоров // Сборник трудов первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». 23-26 11.2010, Санкт-Петербург, Россия / под ред. А. П. Кудинова, Б. В. Крылова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та. – 2010. – Т. 4 – С. 70-74.
4. Кузнецов В. В., Акишев А. Г., Абдурашитов М. А., Дегтярев С. Х. Способ определения нуклеотидной последовательности Pu(5mC)GPy в заданном положении протяженной ДНК // Патент РФ №2525710 С1, опубл. 20.08.2014, Бюл. № 23.
5. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Нетесова Н. А. Олигодезоксирибонуклеотидный ингибитор ДНК-метилтрансферазы 1 человека // Заявка на патент РФ №2014118673 от 13.05.2014, решение о выдаче патента от 24.03.2015.
6. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Нетесова Н. А. Олигонуклеотидные ингибиторы Dnmt1: Проникновение и ингибирование роста клеток Hela и

ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. Евдокимов А. А., Зиновьев В. В., Кузнецов В. В., Нетесова Н. А., Малыгин Э. Г. Конструирование олигонуклеотидных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы Dnmt1 человека // Сборник трудов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск, 2008. – С. 58

2. Evdokimov A. A., Kuznetsov V. V., Zinoviev V. V., Netesova N. A., Malygin E. G. Specific oligonucleotide inhibitors of the human DNA methyltransferase 1 // Russian–European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability International conference. – St. Petersburg, June 24–26, 2008.

3. Petrusheva I. O., Khodyreva S. N., Nazarkina Z. K., Ilina E. S., Maltseva E. A., Malygin E. G., Zinov'ev V. V., Evdokimov A. A., Kuznetsov V. V., Lavrik O. I., Netesova N. A. Methylation as epigenetic factor in progression of human tumors associated with HPV infection. DNMT1 and DNA replication proteins - search for selective DNMT1 inhibitors // Russian–European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability International conference. – St. Petersburg, June 24 – 26, 2008.

4. Кузнецов В. В., Землянская Е. В., Дегтярев С. Х. Glal-qPCR анализ — новый инструмент количественной оценки метилирования ДНК и его применение для изучения генов-супрессоров опухоли // XXV Международная зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва, 2013 г.

5. Kuznetsov VV, Akishev AG, Abdurashitov MA, Degtyarev SKh GLAD PCR analysis of aberrant DNA methylation in cancer // Cell Symposia: Cancer Epigenomics 2013. Sitges, Spain. 2013.