

УДК 577.085.23

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА ОЛИВОМИЦИНА А И НОВОГО ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО, ОЛИВАМИДА, НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ МЫШИ Dnmt3a^{*,**}

© 2019 А.В. Сергеев^{1***}, А.Н. Тевяшова^{2,3}, А.П. Воробьев¹,
Е.С. Громова¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: avsergeev@genebee.msu.ru

² Научно-исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, 119021, Москва, Россия

³ Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева, 125047, Москва, Россия

Поступила в редакцию 05.07.18

После доработки 28.09.18

Принята к публикации 28.09.18

Оливомицин А является высокоактивным противоопухолевым препаратом, относящимся к классу антибиотиков группы ауреоловой кислоты (АК). Противоопухолевое действие оливомицина А связано с его способностью связываться с малой бороздкой ДНК в GC-богатых участках в виде Mg²⁺-координированных комплексов. Определение клеточных мишеней и понимание механизма действия этого препарата необходимо для его успешного применения в клинической практике и создания полусинтетических производных, обладающих улучшенными фармакологическими свойствами. Ранее мы показали, что малобороздочные лиганды способны нарушать ключевой эпигенетический процесс метилирования ДНК. В данной работе исследовано влияние оливомицина А и улучшенного полусинтетического аналога, N,N-диметиламиноэтиламида 1'-дез-(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбоксо-оливомицина А (оливамида), на функционирование *de novo* ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a, осуществляющей метилирование остатков цитозина в CG-участках ДНК эукариотических клеток. Эффекты были изучены в системе *in vitro*, состоящей из каталитического домена Dnmt3a мыши и 30-звенного ДНК-дуплекса, содержащего четыре последовательные GC-пары. Показано, что оливомицин А и оливамида способны ингибировать Dnmt3a со значениями IC₅₀, составившими 6 ± 1 мкМ и 7,1 ± 0,7 мкМ соответственно. Исследуемые антибиотики практически не затрудняют образование специфического фермент-субстратного комплекса, но препятствуют формированию ковалентного интермедиата ДНК-Dnmt3a, необходимого для протекания реакции метилирования. Ингибирующий эффект оливомицина А и оливамида может быть связан с нарушением движения каталитической петли фермента через малую бороздку ДНК – стадии реакции метилирования, предшествующей образованию ковалентной связи фермента с ДНК. На основании результатов работы можно сделать вывод о возможном эпигенетическом вкладе в механизм противоопухолевого действия антибиотиков группы ауреоловой кислоты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метилирование ДНК, оливомицин А, оливамида, малобороздочные лиганды, ДНК-метилтрансфераза Dnmt3a, ингибирование метилирования.

DOI: 10.1134/S0320972519020064

Оливомицин А (рис. 1) является противоопухолевым антибиотиком группы ауреоловой кислоты (АК), включающей также митрамицин, хромомицины и дурамицины [1]. Показаниями к применению митрамицина в клинике является болезнь Педжета и карцинома яичек [2], хромо-

мицины ограниченно используется в Японии для лечения рака желудка [3], а оливомицин А применяется для лечения опухолей яичка, ретикулосарком и некоторых других видов опухолей [4]. Однако серьезные побочные эффекты лечения ограничивают применение этих антибиотиков в

Принятые сокращения: АК – ауреоловая кислота, AdoMet – S-аденозил-L-метионин, AdoHcy – S-аденозил-L-гомоцистеин, МТаз – ДНК-метилтрансфераза, Z – пиримидин-2-он, Р – поляризация флуоресценции.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-190, 10.12.2018.

** Статья на английском языке опубликована в томе 84, вып. 1, 2019.

*** Адресат для корреспонденции.

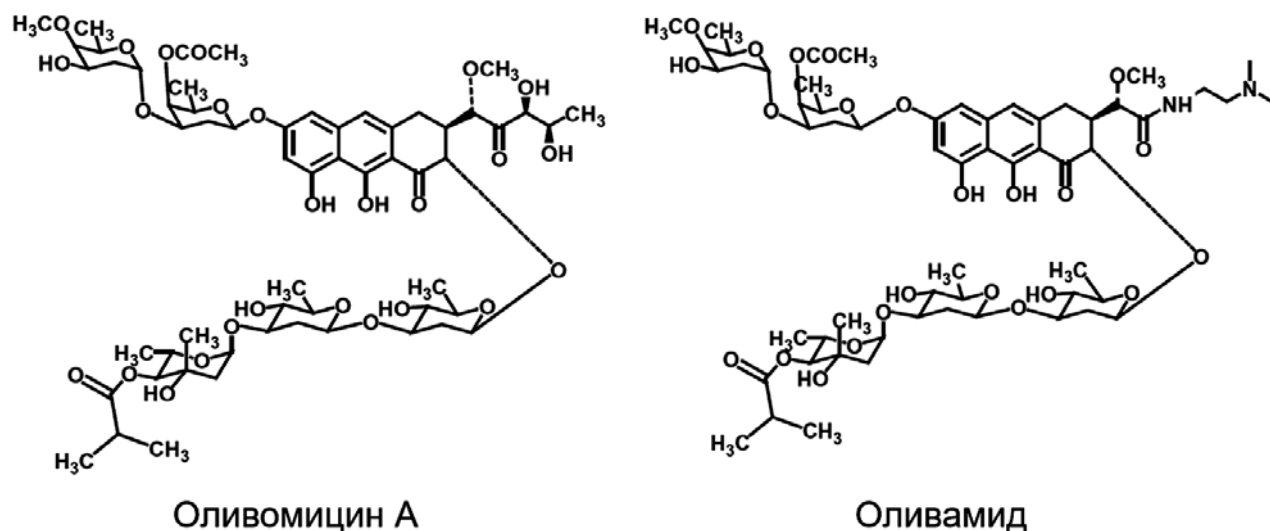


Рис. 1. Структуры противоопухолевых антибиотиков оливомицина А и оливамида

клинике. Поскольку оливомицин А обладает наилучшим химиотерапевтическим индексом среди антибиотиков группы АК, он наиболее интересен с точки зрения получения на его основе полусинтетических производных, обладающих сниженной токсичностью и улучшенными фармакологическими характеристиками [5, 6]. Среди серий аналогов оливомицина А, полученных в ФГБНУ «НИИНА», было отобрано соединение, N,N-диметиламиноэтиламид 1'-дез-(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбокси-оливомицина А (оливаמיד) (рис. 1), проявившее наиболее высокую активность на различных линиях опухолевых клеток и обладающее, по предварительным данным, сниженной токсичностью, в сравнении с оливомицином А [6]. Обработка человеческих опухолевых клеточных линий HCT116 и K562 этим соединением приводила к ингибированию роста опухолей, кроме того, антипролиферативный эффект данного антибиотика был продемонстрирован на моделях мышей, содержащих транспланты Т-клеточной лимфомы Р-388 и меланомы В16 [6].

Известно, что, как и другие антибиотики группы АК, оливомицин А способен связываться с малой бороздкой ДНК в GC-богатых участках в виде Mg^{2+} -координированных комплексов. Механизм цитотоксичности оливомицина А в отношении опухолевых клеток связывают, прежде всего, с нарушением процессов транскрипции и репликации [7, 8]. Связываясь с GC-богатыми последовательностями в промоторных участках различных генов, антибиотики группы АК блокируют связывание транскрипционных факторов, таких как Sp1 и c-Myc, со своими участками узнавания, что приводит к ингибированию экспрессии этих генов [9, 10].

Открытие новых аспектов механизма действия антибиотиков группы АК значительно расширит потенциал их терапевтического применения, как противоопухолевых агентов [11]. Противоопухолевое действие оливомицина А и его аналогов может проявляться в том числе и через влияние на метилирование ДНК, осуществляемое ДНК-метилтрансферазами (МТазами). Эукариотическая *de novo* МТаза Dnmt3a осуществляет перенос метильной группы с кофактора S-аденозил-L-метионина в положение 5 цитозина в CpG-участках при эмбриогенезе, формируя профиль метилирования ДНК [12]. С-концевые домены Dnmt3a и каталитически неактивного фактора Dnmt3L образуют тетрамерный комплекс, содержащий два активных центра [13]. Рентгеноструктурный анализ комплекса Dnmt3a/Dnmt3L с 25-звенным ДНК-субстратом показал, что активные центры фермента расположены на расстоянии одного витка двойной спирали ДНК [14]. Dnmt3a способна связывать и метилировать ДНК-субстрат и, в отсутствие Dnmt3L, Dnmt3a также склонна к олигомеризации на ДНК с образованием протяженных филаментов [15, 16]. В клетках млекопитающих метилирование ДНК играет важную роль в регуляции экспрессии генов, дифференцировки, геномного импринтинга и других процессов [12, 17]. Нарушение профиля метилирования ДНК часто наблюдается в раковых клетках: гиперметилирование промоторов генов приводит к инактивации генов-супрессоров опухолей [18, 19]. Влияние антибиотиков группы АК на метилирование ДНК не изучалось. Ранее мы показали влияние других малобороздочных лигандов, димерных бисбензимидазолов, на функционирование Dnmt3a [20–22]. В данной работе мы изучили влияние

двух антибиотиков группы АК, оливомицина А и его полусинтетического производного – оливамида, на функционирование каталитического домена МТазы мыши Dnmt3a (Dnmt3a-CD) в системе *in vitro* с использованием 30-звенного ДНК-дуплекса, содержавшего четыре последовательные GC-пары, в качестве субстрата МТазы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты. Все олигонуклеотиды (табл. 1) являются коммерческими препаратами («Синтол», Россия). Часть олигонуклеотидов содержала флуоресцентный краситель 6-карбоксивуоресцеин (FAM, f), ковалентно присоединенный через аминокликер -NH-(CH₂)₆- к 5'-концевой фосфатной группе. Олигонуклеотиды, содержащие пиримидин-2-он (Z), были синтезированы С.Н. Михайловым (ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН). Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, как описано ранее [23]. Использовали S-аденозил-L-метионин (AdoMet) и S-аденозил-L-гомоцистеин (AdoHcy) («Sigma», Германия). В работе использовали буферный раствор А – 20 мМ HEPES-NaOH (рН 7,5), 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 1,4-дитиотреитол.

Ферменты. Эндонуклеаза рестрикции HinBI является коммерческим препаратом («СибЭнзим», Россия). Dnmt3a-CD экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3), («Stratagene», США) несущих плазмиду рЕТ28a с геном, кодирующим Dnmt3a-CD, содержащую N-концевую His₆-кластер. Выделение фермента производили с помощью металл-аффинной хроматографии на Co²⁺-содержащей смоле Talon® («GE Healthcare», США) по ранее описанной методике [24]. Чистота выде-

ленных белковых препаратов была оценена с помощью электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле по Леммли [25] и составила >95%. Концентрацию Dnmt3a-CD определяли в расчете на мономер по методу Бредфорда [26]. Белковые препараты хранили при -80 °С.

Связывание оливомицина А с ДНК в присутствии Mg²⁺. Комплексообразование оливомицина А с ДНК изучали по возрастанию интенсивности флуоресценции антибиотика при связывании ДНК-субстрата [27]. ДНК-дуплекс CG/GC (I), 300 нМ, инкубировали с оливомицином А (5 мкМ) в буфере А в присутствии 0–50 мМ Mg²⁺ в течение 1 ч при 25 °С. Далее регистрировали спектры флуоресценции полученных смесей в интервале 430–650 нм на спектрофлуориметре Cary Eclipse («Varian», США) при λ_{возб.} 420 нм. Использовали микрокювету объемом 100 мкл и длиной оптического пути 1 см. Концентрацию Mg²⁺, достаточную для полного связывания ДНК-дуплекса, определяли по зависимости интенсивности флуоресценции оливомицина А при 550 нм от концентрации Mg²⁺.

Влияние оливомицина А и оливамида на метилирование ДНК МТазой Dnmt3a-CD. FAM-меченый ДНК-дуплекс fCG/GCf (II), 300 нМ, инкубировали в буфере А, содержащем 3 мМ Mg²⁺ в течение 1 ч при комнатной температуре в отсутствие или в присутствии оливомицина А или оливамида (0–19 мкМ). После этого проводили метилирование дуплекса 2 мкМ Dnmt3a-CD в присутствии 25 мкМ AdoMet в течение часа при 37 °С [28]. Далее ДНК-дуплекс расщепляли эндонуклеазой HinBI в течение 1 ч при 37 °С без замены буфера. В контрольных смесях расщепление проводили без предварительного метилирования. Смеси упаривали, ресуспендировали в 10 мкл 80%-ного формамида с красителями и

Таблица 1. Используемые ДНК-дуплексы

№	ДНК-дуплекс	Обозначение
I	5'-CTGAATACTACTTGC ^{CG} CTCTCTAACCTGAT-3' 3'-GACTTATGATGAACGC ^{CG} GAGAGATTGGACTA-5'	<u>CG/GC</u>
II	5'-FAM-CTGAATACTACTTGC ^{CG} CTCTCTAACCTGAT-3' 3'-GACTTATGATGAACGC ^{CG} GAGAGATTGGACTA-FAM-5'	f <u>CG/GC</u> f
III	5'-FAM-GAGCCAAGCG ^{CG} CACTCTGA-3' 3'-CTCGGTTTCG ^{CG} TGAGACT-FAM-5'	f <u>CG/GC</u> fs
IV	5'-GAGCCAAGCG ^Z ACTCTGA-3' 3'-CTCGGTTTCG ^{CG} TGAGACT-FAM-5'	<u>CGZ/GC</u> f
V	5'-FAM-GAGCCAAGCG ^{CG} CACTCTGA-3' 3'-CTCGGTTTCG ^Z TGAGACT-5'	f <u>CG/GZ</u>

Примечание. FAM (f), 6-карбоксивуоресцеин; Z, пиримидин-2-он и CG-динуклеотиды выделены полужирным шрифтом. Метилируемые остатки цитозина выделены подчеркиванием.

анализировали в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной. Полученные гели сканировали на приборе Typhoon FLA 9500 («GE Healthcare Life Sciences», Великобритания) и определяли интенсивность флуоресценции продукта и исходной ДНК. Степени расщепления ДНК (w) рассчитывали, как отношение интенсивности флуоресценции продуктов расщепления к суммарной интенсивности флуоресценции нерасщепленной ДНК и продуктов расщепления в каждой дорожке.

Степень метилирования (R) рассчитывали по формуле:

$$R = \frac{w_0 - w_{Dnmt3a}}{w_0},$$

где w_0 – степень расщепления ДНК без метилирования, w_{Dnmt3a} – степень расщепления ДНК после метилирования МТазой Dnmt3a-CD [28].

Величины IC_{50} рассчитывали с помощью аппроксимации зависимости степени метилирования от концентрации антибиотика логистическим уравнением в программе OriginPro 2015 («OriginLab», США):

$$R = R_{min} + \frac{R_{max} - R_{min}}{1 + \left(\frac{c}{IC_{50}}\right)^p},$$

где R – степень метилирования, R_{min} и R_{max} – нижняя и верхняя асимптоты, c – концентрация антибиотика (мкМ), p – параметр наклона.

Кроме того, ДНК-дуплекс II (300 нМ) инкубировали в буфере А с 10 мкМ оливомицина А в присутствии различных концентраций Mg^{2+} (0–5 мМ) в течение 1 ч при комнатной температуре. В смесях, содержащих 0–1 мМ Mg^{2+} , перед расщеплением эндонуклеазой Hin6I, концентрацию Mg^{2+} доводили до 3 мМ. Степень метилирования рассчитывали по вышеописанной методике.

Комплексообразование Dnmt3a-CD с ДНК. Связывание Dnmt3a-CD с 10 нМ ДНК в присутствии 0,1 мМ AdoHcy и антибиотиков изучали методом поляризации флуоресценции (P) [29] FAM-содержащего ДНК-дуплекса II. Смеси инкубировали с оливомицином А или оливамидом в течение 1 ч при комнатной температуре в буфере А, содержащем 3 мМ Mg^{2+} . Далее смеси титровали МТазой Dnmt3a-CD (0–800 нМ). Флуоресценцию FAM возбуждали при 495 нм и регистрировали при 520 нм в микрокувете объемом 100 мкл. Значение P регистрировали через 2 мин. после добавления МТазы. Измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse. Константы диссоциации (K_d) комплексов получали с помощью аппроксимации полученных

зависимостей P от концентрации Dnmt3a-CD уравнением Хилла в программе OriginPro 2015:

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

где P_0 и P_m – значения поляризации флуоресценции для свободных и полностью связанных FAM-меченых ДНК-дуплексов соответственно. $[E]$ – концентрация Dnmt3a-CD, n – коэффициент Хилла.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе было исследовано влияние оливомицина А и оливамида на метилирование ДНК, а также изучено влияние данных антибиотиков на различные стадии реакции метилирования. Первым этапом работы стала разработка удобной модельной системы для изучения влияния этих препаратов на функционирование Dnmt3a-CD, обладающей ферментативной активностью и в отсутствие N-концевого регуляторного домена [30]. Следует отметить очень высокую степень сходства первичной структуры Dnmt3a-CD мыши и человека. В качестве субстратов МТазы были использованы 30- и 18-звенные ДНК-дуплексы, содержащие метилируемый CpG-сайт (табл. 1). При конструировании ДНК-дуплексов мы учитывали данные о способности антибиотиков группы АК связываться с ДНК в участках, содержащих 4 последовательные GC-пары [31]. В ДНК-дуплексы II–V ввели FAM-метки на 5'-концы одной или обеих цепей.

Связывание оливомицина А с ДНК в присутствии ионов Mg^{2+} . Для изучения особенностей комплексообразования Dnmt3a-CD с ДНК-субстратом в присутствии оливомицина А или оливамида, нам было необходимо подобрать условия, в которых происходит наилучшее связывание исследуемых антибиотиков в комплекс с ДНК-дуплексом. Так как для связывания оливомицина А с ДНК необходимо наличие ионов Mg^{2+} [7], была подобрана оптимальная концент-

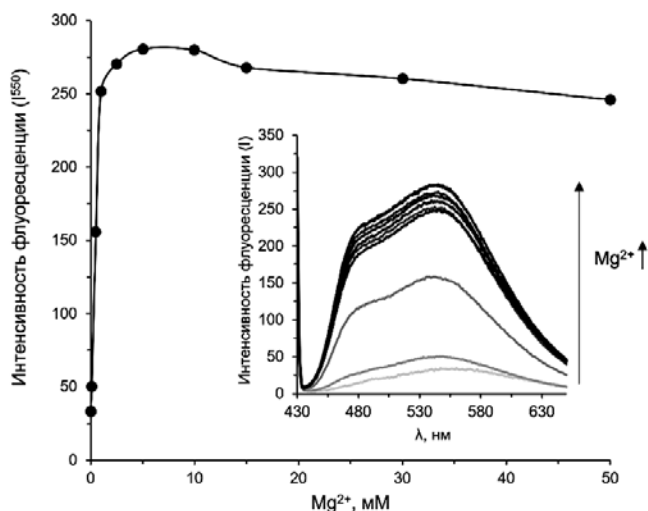


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции при 550 нм (I^{550}) комплекса оливомицина А с ДНК-дуплексом **CG/GC** (I) от концентрации Mg^{2+} . На вставке: спектры флуоресценции комплексов оливомицина А с ДНК-дуплексом I и 0–50 мМ Mg^{2+} . 300 нМ **CG/GC**, 5 мкМ оливомицин А, буфер А

рация Mg^{2+} , при которой происходит связывание оливомицина А с ДНК, а также возможно функционирование Dnmt3a-CD. Мы воспользовались тем, что при связывании с ДНК интенсивность флуоресценции оливомицина А увеличивается [6]. Были получены спектры флуоресценции оливомицина А в присутствии ДНК-дуплекса I при различных концентрациях Mg^{2+} (рис. 2). При изменении концентрации Mg^{2+} от

0 до 5 мМ значения интенсивности флуоресценции оливомицина А при 550 нм, что может свидетельствовать о заполнении антибиотиком всех участков связывания на ДНК. Во всех дальнейших экспериментах концентрация Mg^{2+} составляла 3 мМ. Недавно было показано, что наличие ионов Mg^{2+} необязательно для связывания оливомицина с ДНК [32], но стабильность таких комплексов зависела от ионной силы раствора. В данной работе связывание оливомицина А и оливамида проводили в присутствии ионов Mg^{2+} с целью сравнения результатов, полученных в одинаковых условиях.

Влияние оливомицина А и оливамида на метилирование ДНК. Для исследования влияния оливомицина А на эффективность реакции метилирования мы использовали метод определения эффективности метилирования ДНК по защите от расщепления эндонуклеазами рестрикции. [28]. Дуплекс II был использован в качестве субстрата Dnmt3a-CD. Для формирования комплекса ДНК с оливомицином А или оливамидом дуплекс II инкубировался в течение 1 ч с антибиотиком в присутствии 3 мМ Mg^{2+} с последующим проведением метилирования субстратов МТазой Dnmt3a. После этого ДНК-дуплексы расщепляли эндонуклеазой Hin6I (GCGC, место расщепления указано стрелкой), способной гидролизовать только неметилированную ДНК. После расщепления смеси анализировали в 20%-ном денатурирующем ПААГ (рис. 3, а). **fCG/GCf** расщеплялся с образованием 14-звенного флуоресцентного продукта. Активность

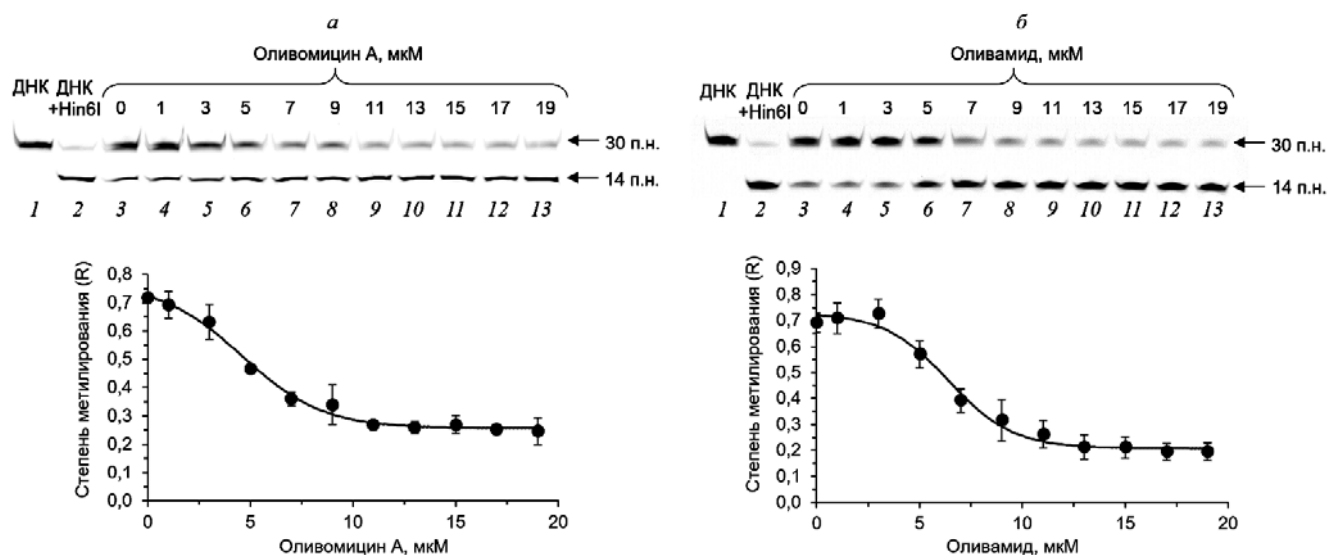


Рис. 3. Влияние оливомицина А (а) и оливамида (б) на реакцию метилирования ДНК. Сверху показан анализ расщепления ДНК-дуплекса **fCG/GCf** (II) эндонуклеазой Hin6I после его метилирования МТазой Dnmt3a-CD в присутствии 0–19 мкМ оливомицина А или оливамида (дор. 3–13) в 20%-ном ПААГ с 7М мочевиной. Дуплекс **fCG/GCf** (дор. 1) и продукты его расщепления Hin6I (дор. 2) приведены в качестве контролей. Ниже показаны зависимости степени метилирования ДНК от концентрации оливомицина А или оливамида. 300 нМ **fCG/GCf**, 3 мМ Mg^{2+} , 25 мкМ AdoMet, буфер А

Dnmt3a-CD в присутствии 3 мМ Mg²⁺ не нарушалась (рис. 3, а, дор. 2 и 3). Степень метилирования ДНК уменьшалась при добавлении в реакционную смесь оливомицина А (рис. 3, а, дор. 4–13). Из полученной зависимости степени метилирования от концентрации оливомицина А была рассчитана величина IC₅₀, составившая 6 ± 1 мкМ (табл. 2). Метилирование ДНК в присутствии оливамида было исследовано аналогично (рис. 3, б). В случае оливамида также наблюдалось ингибирование реакции метилирования, IC₅₀ составила 7,1 ± 0,7 мкМ (табл. 2). При добавлении оливомицина А к уже сформированному комплексу ДНК–(Dnmt3a-CD) наблюдалось такое же ингибирование реакции метилирования, как и при добавлении Dnmt3a-CD к комплексу оливомицина А с ДНК (данные не приведены). Следовательно, оливомицин А и Dnmt3a-CD не конкурируют за участок связывания на ДНК.

Комплексообразование Dnmt3a-CD с ДНК в присутствии оливомицина А и оливамида. Механизм работы МТаз включает несколько стадий: 1) узнавание и связывание ДНК-субстрата; 2) выведение цитозина-мишени из состава двойной спирали; 3) движение каталитической петли фермента через малую бороздку ДНК; 4) образование ковалентного интермедиата фермент-субстрат; 5) перенос метильной группы в положение 5 метилируемого цитозина; 6) высвобождение продуктов реакции [12, 33]. Для того, чтобы определить, на какую стадию реакции метилирования оказывают влияние исследуемые препараты, мы изучили действие оливомицина А на стадии образования фермент-субстратного комплекса и формирования ковалентного интермедиата.

Влияние оливомицина А и оливамида на связывание Dnmt3a-CD с ДНК-субстратом изучалось по поляризации флуоресценции FAM-меченого ДНК-дуплекса II в присутствии AdoHcy. На рис. 4 представлены характерные кривые связывания при концентрациях оливомицина А

и оливамида 0, 5 и 15 мкМ. При добавлении Dnmt3a-CD в реакционную смесь, содержащую ДНК-дуплекс II и исследуемый антибиотик, значения поляризации флуоресценции увеличивались и выходили на плато. Полученные кривые связывания были аппроксимированы уравнением Хилла, после чего были рассчитаны K_d комплексов Dnmt3a-CD с ДНК и коэффициенты Хилла (*n*) (табл. 2). Величины K_d практически не изменялись при добавлении 5 и 15 мкМ оливомицина А или оливамида. Таким образом, оливомицин А и оливамид не приводили к значимому ухудшению связывания фермента с ДНК-субстратом. Полученные значения (*n*) свидетельствовали о положительной кооперативности связывания [34].

Образование ковалентных интермедиатов ДНК-Dnmt3a-CD в присутствии оливомицина А. Далее было исследовано влияние оливомицина А на одну из ключевых стадий реакции метилирования ДНК: образование ковалентного интермедиата в результате нуклеофильной атаки положения С6 цитозина-мишени высококонсервативным остатком цистеина из активного центра С5-МТаз [12, 35]. Этот интермедиат нестабилен и быстро распадается с высвобождением ДНК-субстрата, несущего остаток 5-метилцитозина. Ранее было показано, что FAM-меченные ДНК-субстраты, содержащие Z вместо цитозина-мишени, образуют значительно более стабильные ковалентные интермедиаты с МТазами M.SssI и Dnmt3a, которые могут быть детектированы по флуоресценции FAM-метки в полиакриламидном геле [36]. Недавно методом рентгеноструктурного анализа (РСА) был охарактеризован ковалентный интермедиат 25-звенного Z-содержащего ДНК-дуплекса с тетрамером DNMT3A-DNMT3L человека [14]. Нами были использованы 18-звенные ДНК-дуплексы (табл. 1), содержащие FAM-метку на 5'-концах и остаток Z, расположенный рядом с CG-сайтом (IV), либо замещающий один из остатков цитозина-мише-

Таблица 2. Влияние оливомицина А и оливамида на связывание ДНК-дуплекса II с Dnmt3a-CD и ингибирование реакции метилирования

Соединение	K _d , нМ			<i>n</i>			IC ₅₀ , мкМ
	Концентрация антибиотика, мкМ						
	0	5	15	0	5	15	
Оливомицин А	110 ± 13	101 ± 8	180 ± 39	1,8 ± 0,4	1,6 ± 0,2	2,7 ± 0,3	6 ± 1
Оливамид	95 ± 3	88 ± 8	115 ± 17	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	7,1 ± 0,7

Примечание. K_d, *n* и IC₅₀ представлены с указанием величин стандартных отклонений трех независимых экспериментов.

ни (V). Эти ДНК-дуплексы инкубировали с МТазой Dnmt3a-CD в течение 1 ч при 4 °С, далее смеси анализировали в 12%-ном ПААГ с 0,1% SDS (рис. 5). Прокариотическая МТаза M.HhaI была использована в качестве положительного контроля образования ковалентного

интермедиата (рис. 5, дор. 6). Дуплексы, не содержащие остатков Z (III), или содержащие Z рядом с CG-сайтом (IV), не образовывали стабильных ковалентных интермедиатов (рис. 5, дор. 2 и 4). Дуплекс V образовывал ковалентный интермедиат с Dnmt3a-CD, в том числе в присут-

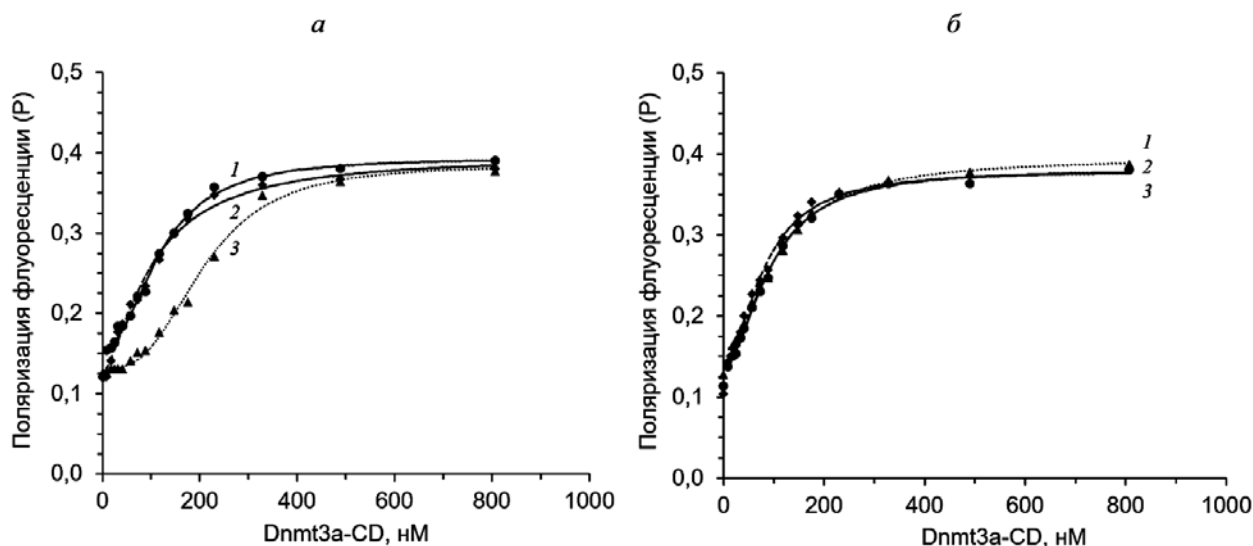


Рис. 4. Кривые связывания ДНК-дуплекса fCG/GCf (II) с Dnmt3a-CD в присутствии 0–15 мкМ оливомицина А (а) или оливамида (б), полученные методом поляризации флуоресценции. 10 нМ fCG/GCf, 3 мМ Mg²⁺, 100 мкМ AdoHcy, буфер А. 1 – 0 мкМ, 2 – 5 мкМ, 3 – 15 мкМ оливомицина А или оливамида

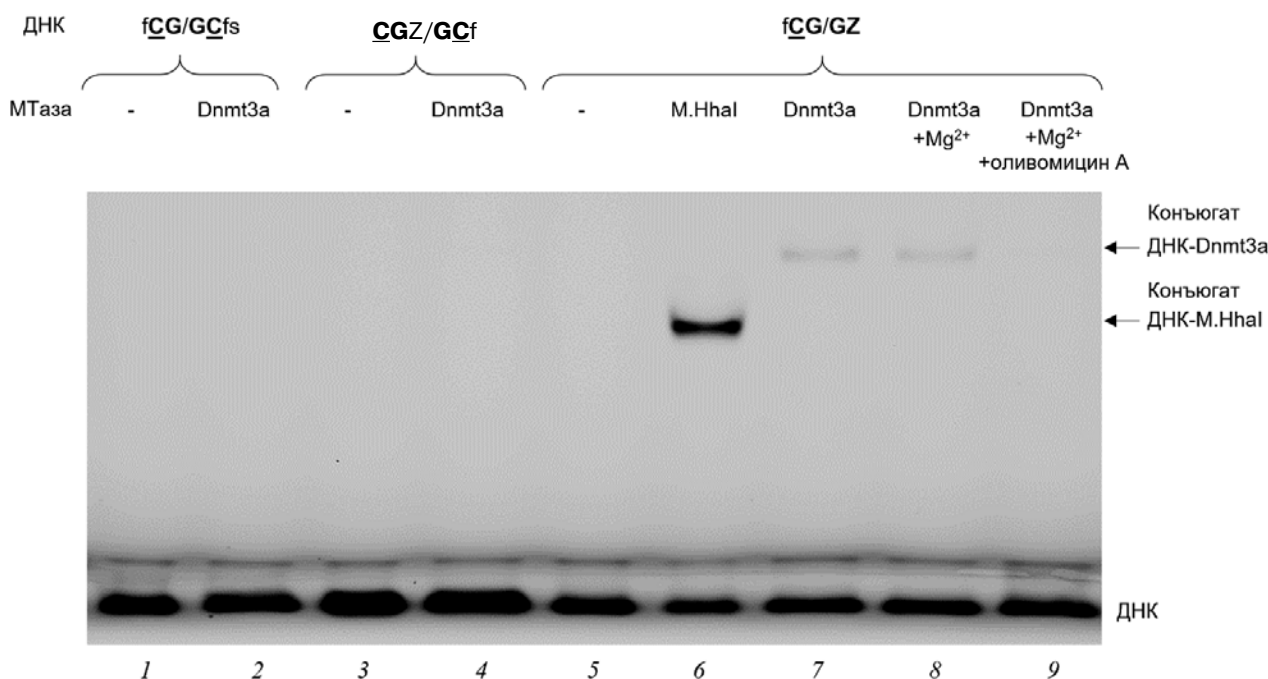


Рис. 5. Анализ влияния оливомицина А на образование конъюгатов Dnmt3a-CD с ДНК-дуплексами, содержащими и не содержащими остаток Z. Реакционные смеси содержали 300 нМ ДНК-дуплекса fCG/GCfs, III (дор. 1, 2), CGZ/GCf, IV (дор. 3, 4) или fCG/GZ, V (дор. 5–9), 6 мкМ МТазы Dnmt3a-CD (дор. 2, 4, 7, 8, 9) или M.HhaI (дор. 6), 100 мкМ AdoHcy (дор. 1–9), 3 мМ Mg²⁺ (дор. 8, 9), и 10 мкМ оливомицина А (дор. 9). 12%-ный ПААГ с 0,1% SDS

ствии 3 мМ Mg^{2+} , необходимого для связывания оливомицина А с ДНК (рис. 5, дор. 8). При введении оливомицина А в реакционную смесь перед добавлением МТазы такой интермедиат не образовывался (рис. 5, дор. 7 и 9). Таким образом, стадия образования ковалентного интермедиата не реализуется при добавлении в смесь оливомицина А.

О возможности связывания оливомицина А с Dnmt3a-CD. Может ли ингибирование реакции метилирования объясняться связыванием антибиотика с Dnmt3a-CD, а не с ДНК-дуплексом? Во-первых, как показано выше, величины K_d в присутствии 0, 5 или 15 мкМ оливомицина А были практически одинаковы (табл. 2). Если допустить наличие конкуренции между ДНК-дуплексом и оливомицином А за связывание с активным центром фермента, то увеличение концентрации антибиотика приводило бы к существенному росту K_d .

Во-вторых, мы изучили эффективность реакции метилирования ДНК-дуплекса II в присутствии 10 мкМ оливомицина А и 0–5 мМ Mg^{2+} (рис. 6). В отсутствие ионов Mg^{2+} , необходимых для связывания антибиотика с ДНК, ингибирования реакции метилирования не наблюдалось (рис 6, дор. 4). Увеличивая концентрацию Mg^{2+} в смеси, мы наблюдали резкое уменьшение эффективности метилирования, причем значения этого параметра выходили на плато при концентрации Mg^{2+} более 1 мМ (рис 6, дор. 5–11). Ионы

Mg^{2+} необходимы для образования димеров оливомицина А, способных связываться с GC-парами ДНК [7]. При отсутствии возможности образования таких димеров ингибирования реакции метилирования не происходило.

Кроме того, возможность связывания оливомицина А с Dnmt3a-CD была изучена с помощью флуоресцентного титрования 1 мкМ оливомицина А МТазой Dnmt3a-CD (0–2 мкМ) в присутствии 3 мМ Mg^{2+} в буфере А. Измерения флуоресценции проводили, как описано в разделе «Связывание оливомицина А с ДНК в присутствии Mg^{2+} » («Методы исследования»). Изменений интенсивности флуоресценции при 550 нм по сравнению со свободным антибиотиком не наблюдалось, и только при добавлении в смесь ДНК-дуплекса II интенсивность флуоресценции оливомицина А увеличивалась (данные не приведены). Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что влияние оливомицина А на метилирование не может объясняться связыванием антибиотика с Dnmt3a-CD.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оливомицин А и его аналоги являются перспективными препаратами, противоопухолевая активность которых обусловлена их способностью связываться с малой бороздкой ДНК в GC-богатых участках и влиять на работу ДНК-оперирующих ферментов и факторов транскрипции. В данной работе было исследовано влияние оливомицина А и оливамида на метилирование ДНК, катализируемое МТазой Dnmt3a-CD, узнающей участки CpG, с использованием синтетических ДНК-субстратов.

При конструировании ДНК-дуплексов мы учитывали данные о специфичности связывания оливомицина А с ДНК и устойчивости этих комплексов [Бениаминов с соавт., неопубликованные данные]. Оливомицин А способен связывать участки из 4 последовательных GC-пар на ДНК, при этом наиболее прочный комплекс образуется при наличии динуклеотида GpC в центре этой GC-богатой последовательности. В данной работе ключевым требованием к ДНК-субстрату являлось наличие сайта CpG, являющегося участком узнавания Dnmt3a-CD. GC-пары, фланкирующие центральный CpG-сайт, были подобраны таким образом, чтобы образующийся кластер был участком узнавания эндонуклеазы Hin6I ($G\downarrow CGC$), чувствительной к статусу метилирования центрального остатка С. Это дало возможность определения эффективности метилирования полученных ДНК-дуплексов по защите от расщепления эндонуклеа-

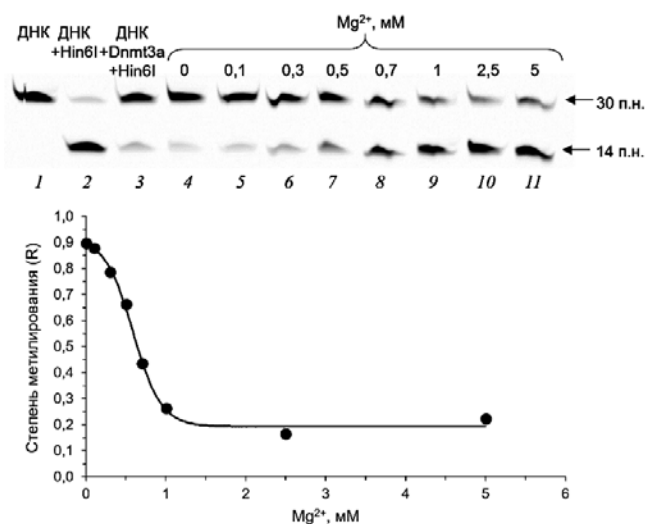


Рис. 6. Влияние Mg^{2+} на функционирование Dnmt3a-CD в присутствии оливомицина А. Анализ расщепления 300 нМ ДНК-дуплекса fCG/GCf (II) эндонуклеазой Hin6I после его метилирования МТазой Dnmt3a-CD в присутствии 10 мкМ оливомицина А, 25 мкМ AdoMet и 0–5 мМ Mg^{2+} . В смесях, содержащих 0–1 мМ Mg^{2+} , концентрацию Mg^{2+} доводили до 3 мМ перед расщеплением (дор. 2–9). Денатурирующий 20%-ный ПААГ с 7М мочевиной, буфер А

зой Hn1b1 после метилирования в условиях, способствующих связыванию оливомицина А и оливамида с ДНК.

Эффективность метилирования ДНК-дуплексов МТазой Dnmt3a-CD в присутствии высоких концентраций оливомицина А и оливамида составила ~20%, при этом значения IC₅₀ исследуемых антибиотиков (6 ± 1 и 7,1 ± 0,7 мкМ соответственно) не показали существенных различий. Это может объясняться высоким сходством их химической структуры (рис 1). Кроме того, пространственная структура комплексов обоих антибиотиков с ДНК предполагается сходной со структурой комплекса другого антибиотика группы АК, хромомицина А3, с ДНК [37]. Сравнивая IC₅₀ оливомицина А и оливамида с ранее изученными в нашей лаборатории малобороздочными лигандами, димерными бисбензимидазолами, DB(n) [20], в которых бисбензимидазольные фрагменты соединены метиленовыми мостиками различной длины (3–11), можно сделать вывод, что исследуемые антибиотики являются такими же эффективными ингибиторами Dnmt3a-CD, как и DB(11), IC₅₀ которого составляет 5,0 ± 1,5 мкМ.

С учетом предполагаемого молекулярного механизма С5 МТаз можно предположить, что влияние малобороздочных лигандов на метилирование ДНК может проявляться через нарушение комплексообразования Dnmt3a с CpG-содержащим ДНК-субстратом, затруднение выведения цитозина-мишени из двойной спирали ДНК, происходящее, как показано в случае прокаринотической МТазы M.HhaI, через малую бороздку, и затруднение движения каталитической петли фермента, проходящей через малую бороздку [12, 38]. Недавно наличие контактов Dnmt3a с малой бороздкой ДНК было продемонстрировано с помощью РСА каталитически активных переходных комплексов пиримидин-2-он-содержащей ДНК с тетрамерами DNMT3A-DNMT3L человека [14]. Из полученных нами данных о комплексообразовании Dnmt3a-CD с субстратом II можно сделать вывод о слабом влиянии оливомицина А и оливамида на связывание ДНК ферментом. Следовательно, исследуемые

малобороздочные лиганды не препятствуют образованию фермент-субстратного комплекса. Перебор субстратов с различной локализацией Z показал, что Dnmt3a-CD способна образовывать стабильные ковалентные интермедиаты только с ДНК-дуплексом, содержащим остаток Z на месте цитозина-мишени в участке CpG (V), а в присутствии оливомицина А такого интермедиата не наблюдалось (рис 5). Учитывая важность контактов Dnmt3a с малой бороздкой ДНК [14] для протекания реакции метилирования, невозможность образования конъюгатов с Z-содержащей ДНК в присутствии оливомицина А может объясняться нарушением контактов каталитической петли Dnmt3a с группами атомов, экспонированными в малую бороздку. Это, в свою очередь, может приводить к затруднению протекания других стадий реакции метилирования, таких, как выведение цитозина-мишени из двойной спирали ДНК.

Суммируя все полученные результаты, можно сделать вывод о возможном эпигенетическом вкладе в механизм противоопухолевого действия антибиотиков группы АК, включающем ингибирование Dnmt3a.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-34-00364 и № 16-04-01087).

Благодарности

Авторы выражают благодарность А. Елшу за предоставленную плазмиду для экспрессии МТазы Dnmt3a-CD, С. Климашаускасу за предоставленный препарат M.HhaI и С.Н. Михайлову за синтез олигонуклеотидов, содержащих пиримидин-2-он.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tevyashova, A.N. (2016) Olivomycin A – an Antitumor Antibiotic of the Aureolic Acid Group, *Pharm. Chem. J.*, **50**, 425–430.
2. DeVita, V.T.J., Hellman, S., and Rosenberg, S.A. (2005) in *Cancer: principles and practice of oncology*, 7th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
3. Ogawa, M. (1978) A recent overview of chemotherapy for advanced stomach cancer in Japan, *Antibiot. Chemother.*, **24**, 149–159.
4. Gause, G.F. (1975) Chromomycin, olivomycin, mithramycin, in *Antineoplastic and immunosuppressive agents. Handbook of experimental pharmacology* (Sartorelli, A.C., et al., eds) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol, 38, pp. 615–622.
5. Kumar, V., Remers, W.A., and Bradner, W.T. (1980) Preparation and antitumor activity of olivomycin A analogs, *J. Med. Chem.*, **23**, 376–379.
6. Tevyashova, A. N., Shtil, A.A., Olsufyeva, E.N., Luzikov, Y.N., Reznikova, M.I., Dezhenkova, L.G., and

- Kuzmin, V.A. (2011) Modification of olivomycin A at the side chain of the aglycon yields the derivative with perspective antitumor characteristics, *Bioorgan. Med. Chem.*, **19**, 7387–7393.
7. Lombo, F., Menendez, N., Salas, J.A., and Mendez, C. (2006) The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives, *Appl. Microbiol. Biot.*, **73**, 1–14.
 8. Cheglakov, I.B., Tevyashova, A.N., Kurbatov, L.K., Tatarsky, V.V., Samusenko, A.V., Preobrazhenskaya, M.N., and Shtil, A.A. (2010) Altered transcription and replication are the mechanisms of cytotoxicity of antitumor antibiotic olivomycin A, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **435**, 320–322.
 9. Durandin, N., Vinogradov, A., Shtil, A., and Kuzmin, V. (2013) Inhibition of c-Myc transcription by olivomycin A involves preferential drug binding to NFAT/Sp1 promoter site, *FEBS J.*, **280**, 86–87.
 10. Fernandez-Guizan, A., Mansilla, S., Barcelo, F., Vizcaino, C., Nunez, L.E., Moris, F., Gonzalez, S., and Portugal, J. (2014) The activity of a novel mithramycin analog is related to its binding to DNA, cellular accumulation, and inhibition of Sp1-driven gene transcription, *Chem-Biol. Interact.*, **219**, 123–132.
 11. Gonzalez-Sabin, J., and Moris, F. (2013) Exploring novel opportunities for aureolic acids as anticancer drugs, *Biochem and Pharmacol.*, **2**, 1–3.
 12. Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011) Structure and function of mammalian DNA methyltransferases, *ChemBiochem*, **12**, 206–222.
 13. Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A., and Cheng, X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation, *Nature*, **449**, 248–251.
 14. Zhang, Z.M., Lu, R., Wang, P., Yu, Y., Chen, D., Gao, L., Liu, S., Ji, D., Rothbart, S.B., Wang, Y., and Wang, G.G. (2018) Structural basis for DNMT3A-mediated *de novo* DNA methylation, *Nature*, **554**, 387–391.
 15. Jurkowska, R.Z., Rajavelu, A., Anspach, N., Urbanke, C., Jankevicius, G., Ragozin, S., Nellen, W., and Jeltsch, A. (2011) Oligomerization and binding of the Dnmt3a DNA methyltransferase to parallel DNA molecules heterochromatic localization and role of Dnmt3L, *J. Biol. Chem.*, **286**, 24200–24207.
 16. Jeltsch, A. and Jurkowska, R.Z. (2013) Multimerization of the Dnmt3a DNA methyltransferase and its functional implications, *Prog. Mol. Biol. Transl.*, **117**, 445–464.
 17. Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Gene Dev.*, **16**, 6–21.
 18. Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation, *Science*, **300**, 455.
 19. Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2007) The epigenomics of cancer, *Cell*, **128**, 683–692.
 20. Cherepanova, N.A., Ivanov, A.A., Maltseva, D.V., Minero, A.S., Gromyko, A.V., Streltsov, S.A., and Gromova, E.S. (2011) Dimeric bisbenzimidazoles inhibit the DNA methylation catalyzed by the murine Dnmt3a catalytic domain, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **26**, 295–300.
 21. Darii, M.V., Rakhimova, A.R., Tashlitsky, V.N., Kostyuk, S.V., Veiko, N.N., Ivanov, A.A., Zhuze, A.L., and Gromova, E.S. (2013) Dimeric bisbenzimidazoles: Cytotoxicity and effects on DNA methylation in normal and cancer human cells, *Mol. Biol.*, **47**, 259–266.
 22. Kostyuk, S.V., Kvasha, M.A., Khrabrova, D.A., Kirsanova, O.V., Ershova, E.S., Malinovskaya, E.M., Veiko, N.N., Ivanov, A.A., Koval, V.S., Zhuze, A.L., Tashlitsky, V.H., Umriukhin, P.E., Kutsev S.I., and Gromova E.S. (2018) Symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP(n) reduce methylation of RARB and PTEN while significantly increase methylation of rRNA genes in MCF-7 cancer cells, *PLoS One*, **13**, e0189826.
 23. Baskunov, V.B., Subach, F.V., Kolbanovskiy, A., Kolbanovskiy, M., Eremin, S.A., Johnson, F., Bonala, R., Geacintov, N.E., and Gromova, E.S. (2005) Effects of benzo[a]pyrene-deoxyguanosine lesions on DNA methylation catalyzed by EcoRII DNA methyltransferase and on DNA cleavage effected by EcoRII restriction endonuclease, *Biochemistry*, **44**, 1054–1066.
 24. Lukashevich, O.V., Baskunov, V.B., Darii, M.V., Kolbanovskiy, A., Baykov, A.A., and Gromova, E.S. (2011) Dnmt3a-CD is less susceptible to bulky benzo[a]pyrene diol epoxide-derived DNA lesions than prokaryotic DNA methyltransferases, *Biochemistry*, **50**, 875–881.
 25. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680.
 26. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
 27. Tevyashova, A.N., Durandin, N.A., Vinogradov, A.M., Zbarsky, V.B., Reznikova, M.I., Dezhenkova, L.G., Bykov, E.E., Olsufyeva, E.N., Kuzmin, V.A., Shtil, A.A., and Preobrazhenskaya, M.N. (2013) Role of the acyl groups in carbohydrate chains in cytotoxic properties of olivomycin A, *J. Antibiot.*, **66**, 523–530.
 28. Sergeev, A.V., Kirsanova, O.V., Loiko, A.G., Nomerot-skaya, E.I., and Gromova, E.S. (2018) Detection of DNA methylation by Dnmt3a methyltransferase using methyl-dependent restriction endonucleases, *Mol. Biol.*, **52**, 272–278.
 29. Minero, A.S., Lukashevich, O.V., Cherepanova, N.A., Kolbanovskiy, A., Geacintov, N.E., and Gromova, E.S. (2012) Probing murine methyltransferase Dnmt3a interactions with benzo[a]pyrene modified DNA by fluorescence methods, *FEBS J.*, **279**, 3965–3980.
 30. Gowher, H., and Jeltsch, A. (2002) Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20409–20414.
 31. Carpenter, M.L., Marks, J.N., and Fox, K.R. (1993) DNA-sequence binding preference of the GC-selective ligand mithramycin, *FEBS J.*, **215**, 561–566.
 32. Beniaminov, A.D., Dezhenkova, L.G., Mamaeva, O.K., Shcholkina, A.K., Tevyashova, A.N., Kaluzhny, D.N., and Shtil, A.A. (2018) Divalent cations are dispensable for binding to DNA of a novel positively charged olivomycin A derivative, *PLoS One*, **13**, e0191923.
 33. Vilkaitis, G., Serva, S., Weinhold, E., and Klimasauskas, S. (2001) The mechanism of DNA cytosine-5 methylation. Kinetic and mutational dissection of HhaI methyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **276**, 20924–20934.
 34. Maltseva, D., Baykov, A., Jeltsch, A., and Gromova, E. (2009) Impact of 7,8-dihydro-8-oxoguanine on methylation of the CpG Site by Dnmt3a, *Biochemistry*, **48**, 1361–1368.
 35. Kirsanova, O.V., Cherepanova, N.A., and Gromova, E.S. (2009) Inhibition of C5-cytosine-DNA-methyltransferases, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1175–1186.
 36. Cherepanova, N.A., Zhuze, A.L. and Gromova, E.S. (2010) Inhibition of murine DNA methyltransferase Dnmt3a by DNA duplexes containing pyrimidine-2 (1H)-one, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1115–1125.
 37. Hou, M.H., Robinson, H., Gao, Y.G., and Wang, A.H.J. (2004) Crystal structure of the [Mg²⁺-(chromomycin A3) 2]–d(TTGGCCAA)2 complex reveals GGCC binding specificity of the drug dimer chelated by a metal ion, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2214–2222.
 38. Gerasimaite, R., Merkiene, E., and Klimasauskas, S. (2011) Direct observation of cytosine flipping and covalent catalysis in a DNA methyltransferase, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3771–3780.

**THE EFFECT OF ANTITUMOR ANTIBIOTIC OLIVOMYCIN A
AND ITS NEW SEMI-SYNTHETIC DERIVATIVE OLIVAMIDE
ON THE ACTIVITY OF MURINE DNA
METHYLTRANSFERASE Dnmt3a**

**A. V. Sergeev^{1*}, A. N. Tevyashova^{2,3}, A. P. Vorobyov¹,
and E. S. Gromova¹**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,
119991 Moscow, Russia; E-mail: avsergeev@genebee.msu.ru*

² *Gause Institute of New Antibiotics, 119021 Moscow, Russia*

³ *Mendeleev University of Chemical Technology of Russia,
125047 Moscow, Russia*

Received July 5, 2018

Revision received September 28, 2018

Accepted September 28, 2018

Olivomycin A is a highly active antitumor drug that belongs to family of aureolic acid antibiotics. The antitumor effect of olivomycin A is related to its ability to bind to the minor groove of DNA in GC-rich regions as Mg²⁺-coordinated complexes. Identification of cellular targets and elucidation of the mechanism of action of this drug are crucial for its successful application in clinical practice and creation of its semi-synthetic derivatives with improved pharmacological properties. Previously, we have shown that minor groove ligands are able to disrupt the key epigenetic process – DNA methylation. In this paper, we have studied the impact of olivomycin A and its improved semi-synthetic analogue, N,N-dimethylaminoethylamide of 1'-des-(2,3-dihydroxy-*n*-butyroyl)-1'-carboxy-olivomycin A (olivamide), on *de novo* functioning of DNA methyltransferase Dnmt3a that methylates cytosine residues in DNA CG-sites in eukaryotic cells. The methylation reaction was studied in an *in vitro* system consisting of murine Dnmt3a catalytic domain and 30-mer DNA duplex containing four consecutive GC pairs. Olivomycin A and olivamide inhibited Dnmt3a with IC₅₀ values of 6 ± 1 and 7.1 ± 0.7 μM, respectively. None of the studied antibiotics hampered formation of a specific enzyme–substrate complex, but they prevented formation of the covalent DNA–Dnmt3a intermediate, which is necessary for the methylation reaction to proceed. The inhibitory effect of olivomycin A and olivamide can be explained by disruption of movement of the enzyme catalytic loop through the DNA minor groove, a methylation reaction stage that precedes the formation of DNA–enzyme covalent bond. The results of this work may indicate an epigenetic contribution to the antitumor effect of antibiotics of the aureolic acid group.

Keywords: DNA methylation, olivomycin A, olivamide, minor groove ligands, DNA methyltransferase Dnmt3a, inhibition of methylation