

УДК 577.15;577.29

МУТАЦИИ В ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЕ DNMT3A ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Обзор

© 2021 Д.А. Храброва^{1*}, М.Г. Якубовская², Е.С. Громова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: khrabrova_da@mail.ru

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.07.2020

После доработки 08.10.2020

Принята к публикации 15.10.2020

У млекопитающих метилирование ДНК является важной эпигенетической модификацией, необходимой для регуляции экспрессии генов, поддержания стабильности генома и других процессов. При канцерогенезе наблюдаются изменения как в генах ДНК-метилтрансфераз (МТаз), так и в паттерне (рисунке) метилирования ДНК, и часто они ассоциированы с плохим прогнозом выживаемости пациентов. МТазы DNMT3A человека, ответственная за *de novo* метилирование ДНК, является одним из ферментов, в котором часто происходят мутации уже на ранних стадиях канцерогенеза. Они часто выявляются при злокачественных гематологических заболеваниях, в особенности при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) с преимущественной распространенностью мутации R882H. Биохимическая характеристика мутантных форм МТазы DNMT3A необходима для понимания потенциальных последствий этих изменений для функционирования фермента. В обзоре описаны известные на сегодняшний день нарушения в DNMT3A, характерные для ОМЛ, с более подробным анализом мутаций в каталитическом домене фермента. Особое внимание уделено молекулярным механизмам функционирования DNMT3A при наличии R882H и менее распространенных мутаций как на модельных ДНК-субстратах, так и на линиях опухолевых клеток. Понимание общих закономерностей функционирования DNMT3A при наличии различных мутаций будет способствовать совершенствованию ранней диагностики гематологических заболеваний и персонализированной терапии рака.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК-метилтрансфераза Dnmt3a, метилирование ДНК, мутации, острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром, гематологические заболевания.

DOI: 10.31857/S0320972521030064

ВВЕДЕНИЕ

Метилирование ДНК – важная эпигенетическая модификация, необходимая для регуляции многих клеточных процессов как у прокариот, так и у эукариот [1, 2]. У эукариот с метилированием ДНК связаны такие важнейшие процессы, как регуляция экспрессии генов, защита генома от мобильных генетических элементов, импринтинг генов, инактивация X-хромосомы и др. [1, 2]. За метилирование ДНК во всех организмах ответственны ферменты се-

мейства ДНК-метилтрансфераз. У эукариот ДНК-метилтрансферазы (МТазы) Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b осуществляют перенос метильной группы с кофактора S-аденозил-L-метионина (AdoMet) на атом углерода C5 в остатке цитозина в CpG-последовательности ДНК [1]. Dnmt3a и Dnmt3b ответственны за *de novo* метилирование ДНК. Таким образом, они создают паттерн (рисунок) метилирования, заключающийся в определенном чередовании метилированных и неметилированных CpG-последовательностей и поддерживающийся далее МТазой Dnmt1 [2]. Метилирование ДНК является важной эпигенетической модификацией, в результате которой повторяющиеся и мобильные элементы генома (транспозоны, эндогенные ретровирусы и микросателлиты) метилированы, а так называемые CpG-островки в промоторных участках генов в основном не метилированы [3]. Аберрантное метилирование (нарушение паттерна метилирования) является од-

Принятые сокращения: МДС – миелодиспластический синдром; МТазы – ДНК-метилтрансферазы; ОЛСТ – острый лейкоз смешанного типа; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ADD – ATRX-DNMT3A/3B-DNMT3L-домен; AdoHcy – S-аденозил-L-гомоцистеин; AdoMet – S-аденозил-L-метионин; Dnmt3a-CD – каталитический домен ДНК-метилтрансферазы DNMT3A; PWWP – Pro-Trp-Trp-Pro-домен; TRD – узнающий домен.

* Адресат для корреспонденции.

ним из факторов, вовлеченных в патогенез многих заболеваний, в том числе приводящих к канцерогенезу [4, 5]. Этот процесс сопряжен с изменениями в самих МТаз.

Обнаружено, что при канцерогенезе МТазы DNMT3A человека является одним из ферментов, в котором наиболее часто происходят мутации уже на ранних стадиях гематологических заболеваний [4, 6–8]. В частности, при развитии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) выявлен ряд точечных мутаций в DNMT3A [8–12]. Опубликовано большое количество исследований по структурно-функциональным особенностям мутантных форм DNMT3A, выявляемых при ОМЛ, затрагивающих также и обусловленные этими особенностями изменения в метилировании ДНК. Чаще всего мутация происходит в триplete, кодирующем R882, что приводит к замене R на H, и эта мутация активно изучается с точки зрения влияния на активность DNMT3A [13–16]. Однако если вопрос о последствиях данной мутации, сказывающихся на функционировании DNMT3A, подробно исследован, то вопрос о том, является ли предложенный молекулярный механизм одним из триггерных нарушений в клетке, до сих пор остаётся дискуссионным [14–17]. Другие мутации, часто встречающиеся при развитии лейкоза (так называемые «не-аргининовые»), менее изучены как с точки зрения их влияния на работу фермента, так и с точки зрения обнаружения связи между мутацией и нарушениями в паттерне метилирования, присущими опухолевым клеткам. Систематизация накопленных данных по биохимической характеристике мутантных форм МТазы DNMT3A необходима для понимания потенциальных последствий этих изменений для функционирования фермента, а также для выявления наблюдаемых противоречий и определения перспектив дальнейших исследований и использования в медицинской практике. В обзоре будет рассмотрено влияние точечных мутаций в гене МТазы DNMT3A, выявляемых при гематологических заболеваниях, на ее функционирование. Особое внимание будет уделено мутациям, обнаруженным при ОМЛ в каталитическом домене фермента.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ФЕРМЕНТЕ: СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ DNMT3A

Все эукариотические МТазы (Dnmt1 и семейство Dnmt3) имеют две функциональные части: протяженный N-концевой регуляторный фрагмент и меньший по размеру C-концевой каталитический домен [1, 18–23]. N-Концевой

фрагмент содержит несколько доменов, выполняющих регуляторные функции и обеспечивающих привлечение МТаз к хроматину [20, 24].

В семейство DNMT3 человека (обозначается Dnmt3 – у всех млекопитающих) входят МТазы DNMT3A, её укороченная изоформа DNMT3A2 и МТазы DNMT3B, а также регуляторный фактор DNMT3L (рис 1). DNMT3A представляет собой белок, содержащий 912 а.о., высоко консервативный у позвоночных и имеющий гомологию 98% у человека и мыши. Соответствующий ген локализован на хромосоме человека 2p23 [20]. Регуляторный фрагмент в случае ферментов DNMT3 содержит два важных домена, отвечающих за взаимодействие с хроматином: Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP-домен) и ATRX-DNMT3A/3B-DNMT3L (ADD-домен) (рис. 1) [1]. PWWP-домен обеспечивает привлечение МТаз DNMT3A и DNMT3B к хроматину путём специфического взаимодействия с хвостом гистона H3, содержащим триметилированный остаток K36 (H3K36me3). ADD-Домен специфически узнает и связывается с хвостом гистона H3, не метилированного по остатку K4 (H3K4me0), а также является посредником во взаимодействии с различными белковыми факторами и участвует в аллостерическом контроле активности МТазы DNMT3A [22].

В изоформе DNMT3A2, отличающейся укороченной регуляторной частью, участок а.о. 1–212 заменён на 24 другие аминокислоты, остальная часть молекулы полностью совпадает с основной формой DNMT3A [20] (рис. 1). Роль N-концевого сегмента, отсутствующего у DNMT3A2, до конца не ясна, однако есть предположения, что он участвует в таргетировании DNMT3A к CpG-островкам [21]. Изоформы DNMT3A и DNMT3A2 в клетках тканей человека не экспрессируются одновременно, и, как правило, экспрессируется DNMT3A [20, 21]. В эмбриональных стволовых клетках экспрессируется DNMT3A2, но при дифференцировке происходит подавление экспрессии DNMT3A2 и активация экспрессии DNMT3A [20, 21]. Интересно, что, по некоторым данным, при ОМЛ у отдельных пациентов выявляют транскрипт, соответствующий DNMT3A2, характерный для эмбриональных клеток, в то время как в нормальных миелобластах выявляют транскрипт, соответствующий DNMT3A [25].

C-Концевой домен отвечает за метилирующую активность ферментов; он схож у всех МТаз, включая прокариотические, и содержит десять высоко консервативных мотивов, играющих ключевую роль в реакции метилирования ДНК [20, 23] (рис. 2). C-Концевой домен (Dnmt3a-CD) может функционировать без ре-

гуляторной части МТазы [1]. Dnmt3a-CD мыши часто используют как модель DNMT3A-CD человека. Для прокариотических МТаз известно, что реакция метилирования ДНК включает несколько ключевых стадий: 1) образование комплекса МТазы–ДНК–AdoMet, 2) выпетливание цитозина-мишени из двойной спирали ДНК, 3) образование ковалентной связи между цитозином-мишенью и ферментом в переходном комплексе, 4) перенос метильной группы с AdoMet на цитозин, 5) диссоциация комплекса и высвобождение продуктов реакции [26, 27]. Предполагается, что эукариотические МТазы действуют по аналогичному механизму [1, 20–23]. Аминокислотные остатки, участвующие в выпетливании цитозина-мишени, расположены в области узнающего домена (TRD, Target Recognition Domain) и мотивах IV, VI и VIII. Мотивы I–III образуют вместе сайт связывания кофактора AdoMet. Мотивы IV и VI необходимы для осуществления самой реакции, при этом мотив IV содержит инвариантный остаток цистеина, который атакует цитозин-мишень, в результате чего образуется ковалентный ДНК-белковый интермедиат [23]. Между мотивами VIII и IX находится переменная область TRD, участвующая в узнавании определенной нуклеотидной последовательности в ДНК (CpG – в случае эукариотических ферментов) [1, 20, 23]. Следует отметить, что в случае эукариотической Dnmt3a имеется предпочтение к определенным нуклеотидным последовательностям, фланкирующим CpG-сайт [21].

Для работы МТаз Dnmt3a и Dnmt3b в клетках млекопитающих необходимо присутствие регуляторного фактора Dnmt3-like (Dnmt3L) [20, 27]. Dnmt3L частично гомологичен упомянутым МТазам, но не содержит PWWP-домена и не активен каталитически (рис. 1) [20, 28]. При метилировании ДНК МТазы Dnmt3a (или Dnmt3b) образует активный тетрамер с Dnmt3L [20]. На примере комплекса DNMT3A–DNMT3L человека видно, что тетрамер состоит из двух димеров с субъединицами DNMT3A в центре и субъединицами DNMT3L по краям, при этом ДНК располагается в центре комплекса, а общая структура напоминает бабочку (рис. 3) [20, 28, 29]. Таким образом, в комплексе присутствуют два активных центра, за счет чего возможно метилирование обеих цепей ДНК.

При метилировании не имеющая жёсткого закрепления каталитическая петля движется по малой бороздке ДНК, и Dnmt3L способствует стабилизации её положения, тем самым повышая каталитическую активность МТазы. Кроме того, в свободном комплексе Dnmt3a–Dnmt3L в области TRD наблюдается недостаток электронной плотности, что повышает сродство к отрицательно заряженной ДНК и повышает устойчивость образуемого комплекса при взаимодействии с большой бороздкой ДНК [28, 29]. Для МТаз млекопитающих в комплексе Dnmt3a–Dnmt3L наблюдаются два типа белок-белковых взаимодействий: гидрофобные между четырьмя остатками Р в так называемом FF-интерфейсе при контакте Dnmt3a с

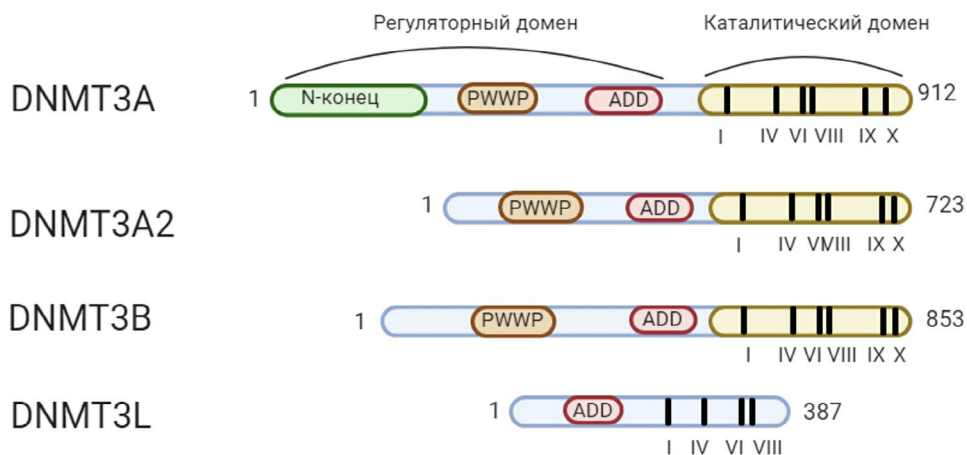


Рис. 1. Строение ДНК-метилтрансфераз человека семейства DNMT3, а также регуляторного фактора DNMT3L. Области, ответственные за одинаковые функции, отмечены одним и тем же цветом, PWWP-домен выделен каштановым, ADD – малиновым, каталитический домен – бледно-желтым; N-концевой участок DNMT3A – светло-зеленым. Высоко консервативные мотивы в каталитическом домене отмечены черным. Справа указано число аминокислотных остатков в белках. (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

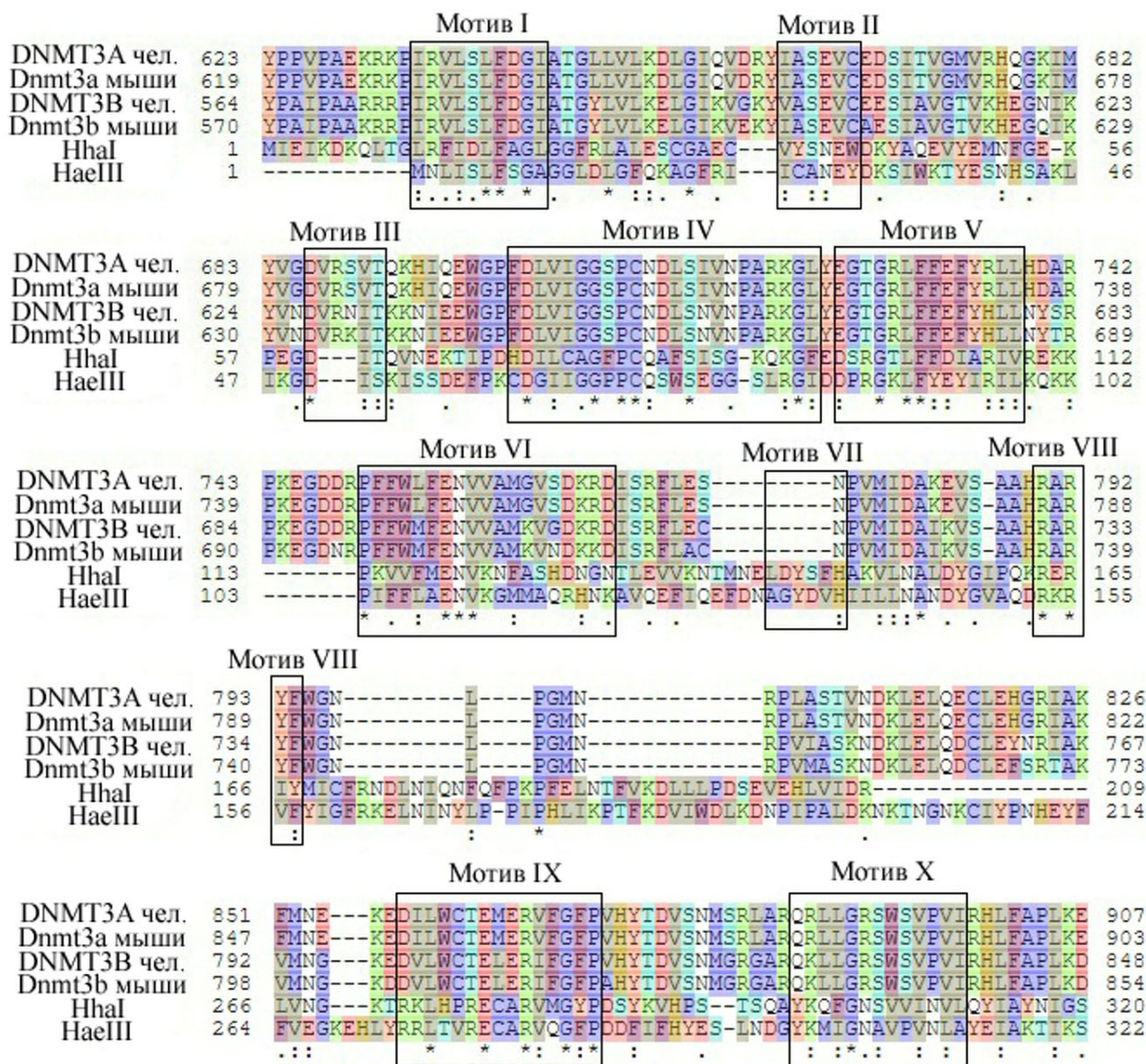


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей каталитических доменов МТаз человека (DNMT3A и DNMT3B), мыши (Dnmt3a и Dnmt3b) и прокариотических МТаз (HhaI и HaeIII). Отмечены консервативные мотивы I–X. Отрицательно заряженные аминокислоты даны на красном фоне, положительно заряженные – на салатном, гидрофобные – на синем, ароматические – на фиолетовом, алифатические – на зелёном, S/T – на темно-жёлтом. Высоко консервативные аминокислоты отмечены звездочками под последовательностью, консервативные – двумя точками, часто сохраняющиеся – одной точкой

Dnmt3L и полярные – за счёт водородных связей между остатками R и D в RD-интерфейсе при контакте Dnmt3a с другой молекулой Dnmt3a, когда формируется сайт связывания ДНК (рис. 3) [1]. Оба интерфейса вместе необходимы для правильного связывания кофактора AdoMet и правильного функционирования фермента [29, 30]. Однако отсутствие Dnmt3L в системе не является критичным для Dnmt3a, так как в этом случае МТазы способна образовывать аналогичные активные тетрамеры сама с собой [20, 27].

НАРУШЕНИЯ В МЕТИЛИРОВАНИИ ДНК ПРИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

При развитии онкологических заболеваний происходят различные нарушения, ассоциированные с метилированием ДНК (абберрантное метилирование) и с МТазой DNMT3A (точечные мутации в гене DNMT3A и гиперэкспрессия DNMT3A) [4–7].

Нарушения паттерна метилирования ДНК могут происходить уже на ранних стадиях разви-

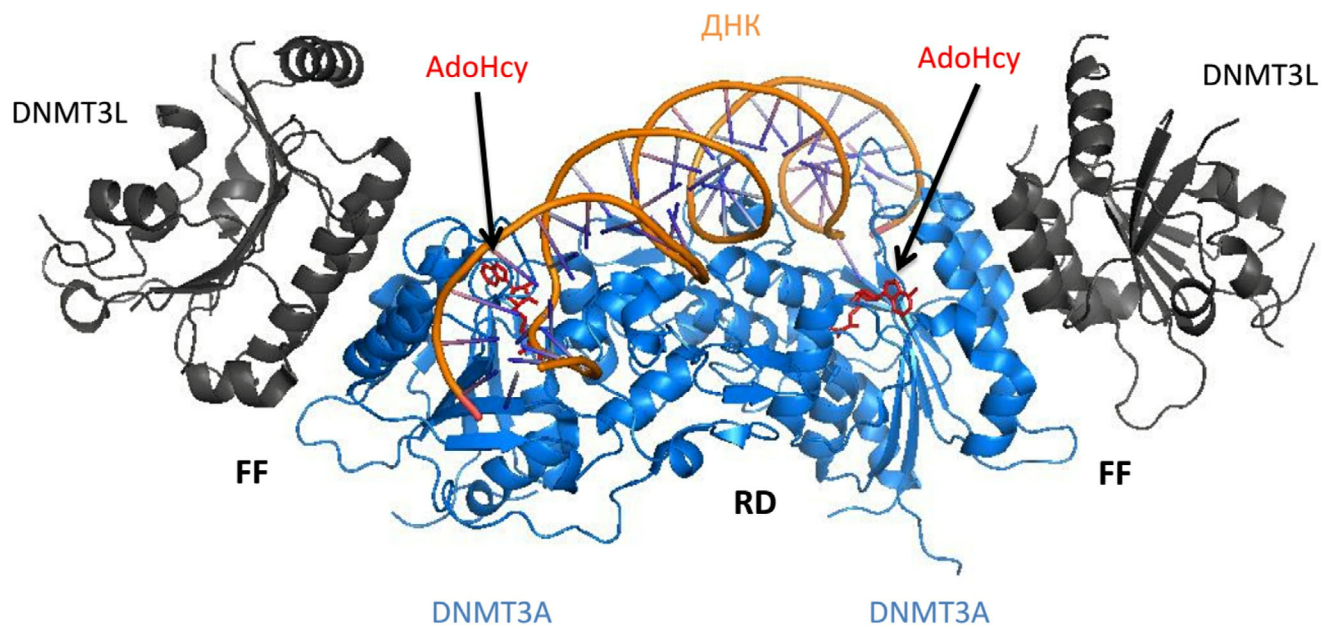


Рис. 3. Структура комплекса DNMT3A–DNMT3L с 25-звенным ДНК-дуплексом, содержащим два CpG-сайта, и с двумя молекулами S-аденозил-L-гомоцистеина (AdoHcy) в активных центрах Dnmt3a (PDB: 5YX2). ДНК и AdoHcy даны в структурном представлении, окрашены оранжевым и красным соответственно; DNMT3A и DNMT3L – в точечном представлении, окрашены голубым и темно-серым соответственно; отмечены области RD- и FF-интерфейсов

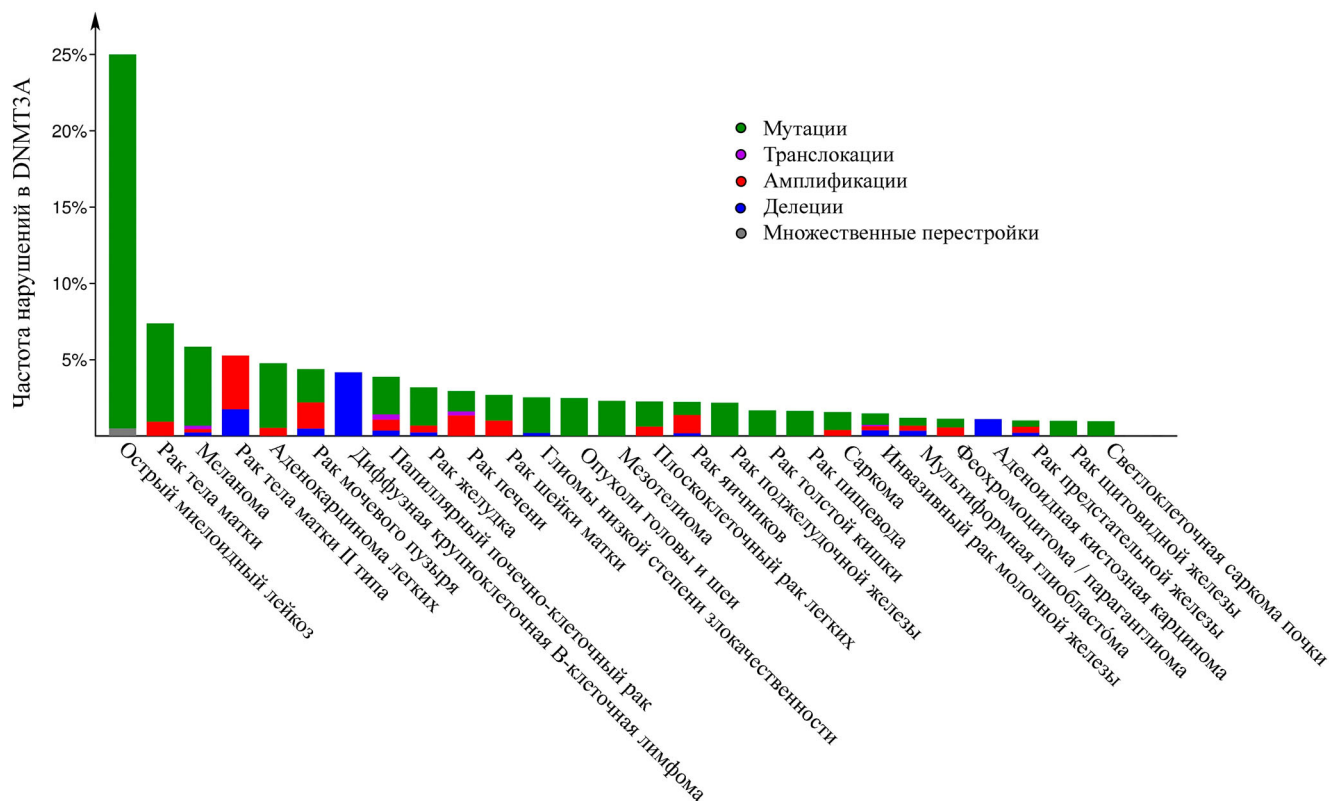


Рис. 4. Частота нарушений в DNMT3A при онкологических заболеваниях различного типа (построено с помощью базы данных CBioPortal [8]). Зеленые столбцы соответствуют точечным мутациям, красные – амплификациям, синие – делециям, фиолетовые – транслокациям, черный – множественным перестройкам. Заболевания с частотой менее 2% не приведены

тия онкологических заболеваний, сопутствуя их прогрессии [5, 6, 31–37]. Для опухолевых клеток характерно обширное гипометилирование повторяющихся и мобильных элементов генома, сопровождающееся локальным гиперметилированием отдельных участков ДНК [5, 38]. Чаще всего наблюдается гиперметилирование промоторных участков генов-супрессоров опухолей и других генетических локусов, важных для запуска внутриклеточных процессов апоптоза, контроля клеточного цикла и обеспечения стабильности генома [5, 6, 38]. Интересно отметить, что locus, который в нормальных клетках частично метилирован, может быть гиперметилирован в одних типах опухолей и гипометилирован – в других [5, 38]. При развитии гематологических заболеваний (и ОМЛ, в частности) большинство опухолевых клеток экспрессируют мутантную форму DNMT3A, и при этом наблюдаются нарушения паттерна метилирования [5, 31, 33–35, 39]. Однако между этими событиями не установлена однозначная причинно-следственная связь. В исследовании больших групп пациентов (более 300 человек) на основании определения паттерна метилирования было выявлено 16 подтипов ОМЛ, а также построен классификатор 15-ти типов нарушений метилирования для предсказания выживаемости пациентов с тем или иным подтипом ОМЛ [33].

Нарушения в гене *DNMT3A* бывают нескольких типов: неправильный сплайсинг, сдвиг рамки считывания и появление мутаций, среди которых последний занимает лидирующую позицию при онкозаболеваниях [6, 8]. Известно, что мутации являются характерными маркерами многих онкологических заболеваний и вносят вклад в трансформацию нормальных клеток [4]. Согласно базе данных CBioPortal, мутации в гене *DNMT3A* присущи многим онкозаболеваниям и составляют 1,8% от всех известных случаев нарушений в ферменте (176 исследований, 44 347 пациентов); из них 77% приходится именно на точечные мутации [8] (рис. 4).

Мутации в *DNMT3A* играют важную роль в патогенезе гематологических заболеваний (ОМЛ, миелодиспластического синдрома (МДС) и миелопролиферативных новообразований) [6]. Полноэкзомное секвенирование выявило наличие точечных мутаций в гене *DNMT3A* и нарушение паттерна метилирования ДНК в 20,5% случаев у пациентов с ОМЛ (более 100 человек) [34]. При изучении обнаруженных мутантных форм *DNMT3A* в культурах клеток для некоторых из них отмечены пониженная активность и нарушенное сродство к гистону H3 [34]. Наблюдалась связь выявленных нарушений с прогрессией онкозаболевания. Эти данные

подтверждаются более поздним исследованием, включавшим 110 онкопациентов и 15 здоровых людей (контрольная группа), в котором выявили точечные мутации в *DNMT3A* у 2,7% пациентов [35]. Было показано, что эти мутации оказывали влияние на уровень экспрессии генов, вовлечённых в развитие ОМЛ. Более подробно точечные мутации будут обсуждаться в следующем разделе.

По данным CBioPortal [8], гиперэкспрессия *DNMT3A* наблюдается в случае многих онкозаболеваний (рис. 5, см. ниже). Гиперэкспрессия *DNMT3A* ассоциирована с плохим прогнозом выживаемости [4, 36, 37, 40–42]. Гиперэкспрессия *MTaz* семейства *DNMT3* вовлечена в регуляцию пролиферации клеток карциномы печени, а также играет ключевую роль в инактивации гена-супрессора опухолей *BRCA1* в клетках рака молочной железы [43, 44]. Кроме того, гиперэкспрессия *DNMT3A* часто сопровождается пониженной экспрессией других ферментов из-за гиперметилирования их промоторов, например факторов *ESR1/PGR* при развитии эндометриоидной карциномы [40]. В таком случае уровень экспрессии *DNMT3A* может являться потенциальным маркером выживаемости пациентов [40]. По последним данным, гиперэкспрессия *DNMT3A* коррелирует с морфологическими нарушениями в опухолевых клетках, а также может быть сопряжена с нарушениями дифференцировки клеток [41].

Биоинформатический анализ данных по экспрессии *DNMT3A* в системе CBioPortal, позволяющий выявить опухоли с гиперэкспрессией фермента на основании расчёта z-фактора по всем имеющимся в системе данным [8], свидетельствует о том, что при ОМЛ по сравнению с другими онкозаболеваниями диапазон увеличения уровня экспрессии *DNMT3A* составляет примерно 4 порядка (рис. 5). Смещение столбца, соответствующего характеристикам опухолевых клеток по уровню экспрессии *DNMT3A* при ОМЛ в правую область гистограммы, позволяет заключить, что гиперэкспрессия *DNMT3A* наиболее ярко выражена именно при ОМЛ. При этом наряду с гиперэкспрессией *DNMT3A* наблюдаются также и мутации в гене *DNMT3A* [5, 37].

Интересно, что гиперэкспрессия *DNMT3A* без мутаций является одной из нескольких причин инициации гиперметилирования ДНК при развитии онкозаболеваний [5]. Гиперметилирование ДНК в сочетании с повышенной активностью *DNMT3A* без мутаций является характерным маркером онкозаболеваний и заболеваний, поражающих сосуды и ткань мозга [5]. К сожалению, подробных исследований послед-

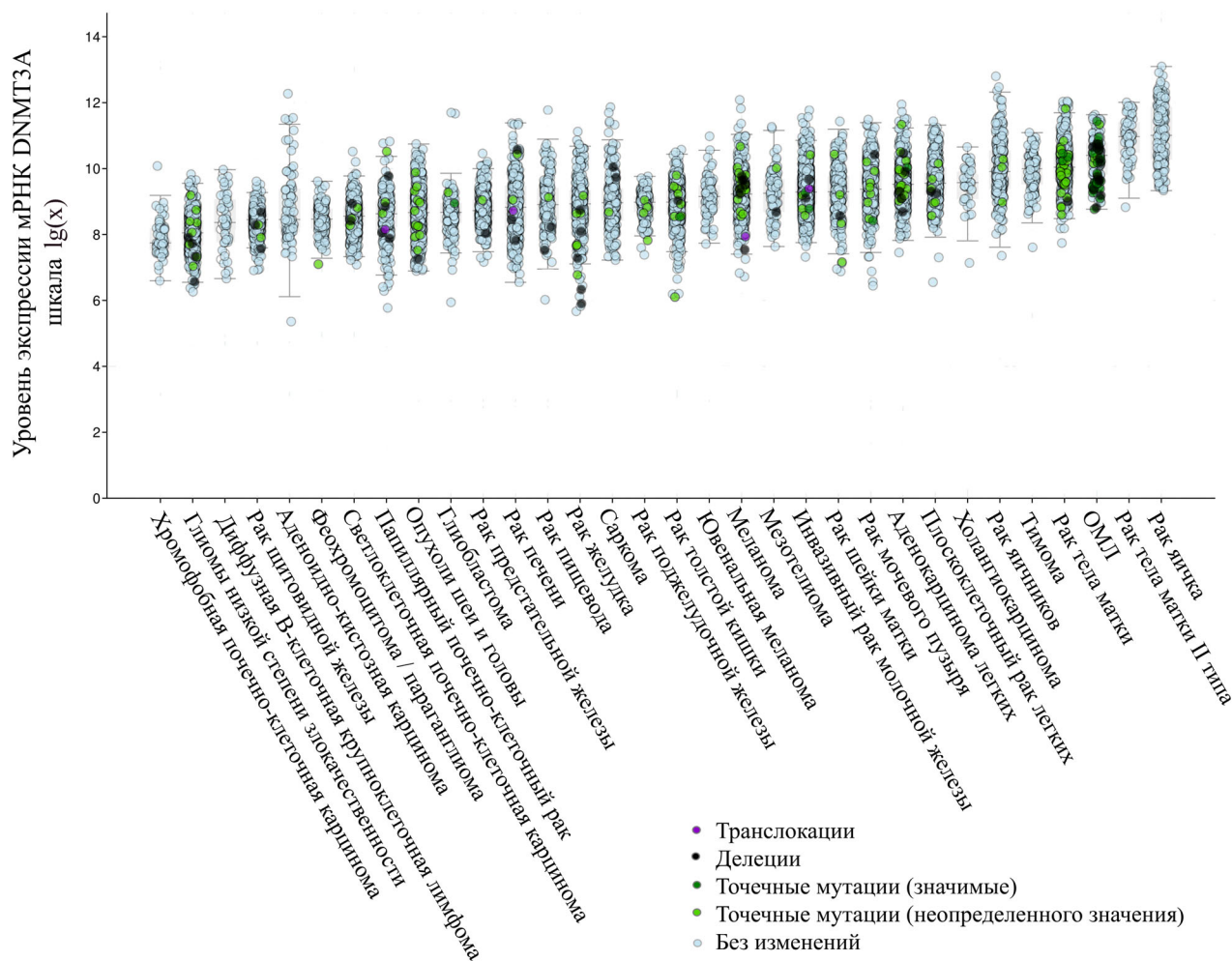


Рис. 5. Экспрессия DNMT3A при различных типах онкологических заболеваний (данные CBioPortal [8]). Ось абсцисс отражает тип онкологического заболевания, ось ординат – уровень мРНК, соответствующей гену *DNMT3A* в клетках онкопациентов. Темно-зелеными и зелеными кружками отмечена экспрессия DNMT3A с точечными мутациями, голубыми – DNMT3A без мутаций, черными – делеции, фиолетовыми – транслокации

ствий гиперэкспрессии мутантных форм DNMT3A не проводилось, но известно, что при развитии ОМЛ гиперэкспрессия мутантной формы DNMT3A2 приводит к повышению пролиферативной активности опухолевых клеток [25].

Мутации в каталитическом домене DNMT3A при ОМЛ. Суммируя данные по DNMT3A, можно выделить две группы мутаций в ферменте, сопутствующих разным типам заболеваний [4, 6]. К первой группе относятся мутации в каталитическом домене МТазы, которые наблюдаются в основном при развитии гематологических заболеваний и ОМЛ, в частности [8, 9, 45]. Вторая группа включает в себя мутации в PWWP- и ADD-доменах N-концевого регуляторного фрагмента, встречающиеся чаще при иных типах онкологических заболеваний [4, 6, 45].

Как видно из распределения на рис. 6, при развитии ОМЛ точечные мутации в PWWP- и ADD-доменах немногочисленны (зеленые точки), чаще образуются делеции (черные точки) [8, 45]. Изучение мутаций в этих доменах представляет интерес с точки зрения их влияния не только на метилирование ДНК и функционирование генов, но и на взаимодействие DNMT3A с гистоновыми белками в клетке. В основном исследованы мутантные формы DNMT3A, найденные у больных с наследственными заболеваниями [45]. В этом случае немногочисленные биохимические данные свидетельствуют о нарушениях взаимодействия таких мутантных форм DNMT3A с хвостами гистонов [33, 45].

Основная же часть мутаций (более 50%) приходится на каталитический домен DNMT3A [4,

6, 8, 37, 45] (рис. 6, зелёные точки), поэтому далее мы сосредоточимся на более подробном их рассмотрении.

Мутация остатка R882. В каталитическом домене DNMT3A можно выделить несколько аминокислотных остатков, замена которых чаще всего происходит при развитии ОМЛ: R882 (58%), R736 (2%), H631 (~1%) и G543 (~1%) [8, 9, 10] (рис. 6). На сегодняшний день наиболее подробно изученной является лишь «горячая точка мутагенеза» – остаток R882 заменяется чаще всего на остаток Н (~40% всех случаев) или С (~11%) [9]. Эта мутация, как и другие в DNMT3A у онкопациентов, является соматической и присутствует в опухолевых клетках в одном аллеле [9].

Структурно-функциональный аспект. В 2014 г. Russler-Germain et al. [13] было установлено, что мутация R882H попадает в область полярного RD-интерфейса, формирующегося за счёт «гомодимерного» взаимодействия DNMT3A–DNMT3A в тетрамере (рис. 3), и нарушает образующиеся там контакты. Таким образом, нарушается способность МТазы образовывать активные тетрамеры, что приводит к 80% потере метилирующей активности фермента [13]. Эти данные коррелируют с исследованиями с использованием Dnmt3a мыши, указывающими, что мутация R878H (соответствует R882H в DNMT3A) приводит к снижению каталитической активности фермента [37]. Кроме того, наличие такой замены влияет на способность фермента связываться с ДНК [37]. Исследования 2018–2020 гг. выявили новый аспект возможного влияния мутации R882H: у ферментов с мутациями изменяются предпочтительные нуклеотидные последовательности, фланкирующие CpG-сайт метилирования [15, 17]. Anteneh et al. [17] продемонстри-

ровали различными методами, включая РСА, что замена R882 на Н приводит к изменениям во взаимной ориентации RD-интерфейса и узнающей петли из TRD-домена относительно друг друга, что, в свою очередь, приводит к нарушению способности DNMT3A–R882H узнавать CpG-сайт в оптимальном нуклеотидном контексте.

Мутация R882 в опухолевых клетках. В 2019 г. было обнаружено, что мутация R882H приводит в клетках к стабилизации протяженных олигомеров DNMT3A со сниженной каталитической активностью, что и может являться одной из механистических причин прогрессии лейкоза [16]. Кроме того, исследования *in vivo* показали, что в опухолевых клетках практически полностью подавлена экспрессия DNMT3B, таким образом, наблюдаемые нарушения паттерна метилирования в миелобластах связаны именно с функционированием DNMT3A [13].

Для R882H была выдвинута гипотеза о существовании связи между характерным для ОМЛ нарушенным паттерном метилирования, не наблюдающимся при других типах онкологических заболеваний, и мутацией R882H в DNMT3A [39]. Было проведено полногеномное бисульфитное секвенирование ДНК клеток-предшественников (бластных опухолевых клеток) и нормальных клеток крови, экспрессирующих DNMT3A дикого типа или с мутацией R882H/С, и определена степень метилирования ДНК в CpG-островках и вне таких островков [39]. Оказалось, что мутация R882H/С в миелобластных клетках приводит к гипометилированию CpG-островков, фактически удаляя их гиперметилирование, которое наблюдается в этих клетках в отсутствие мутации. Мутация R882H/С в здоровых клетках вызывает гипометилирование CpG. Было сделано предпо-

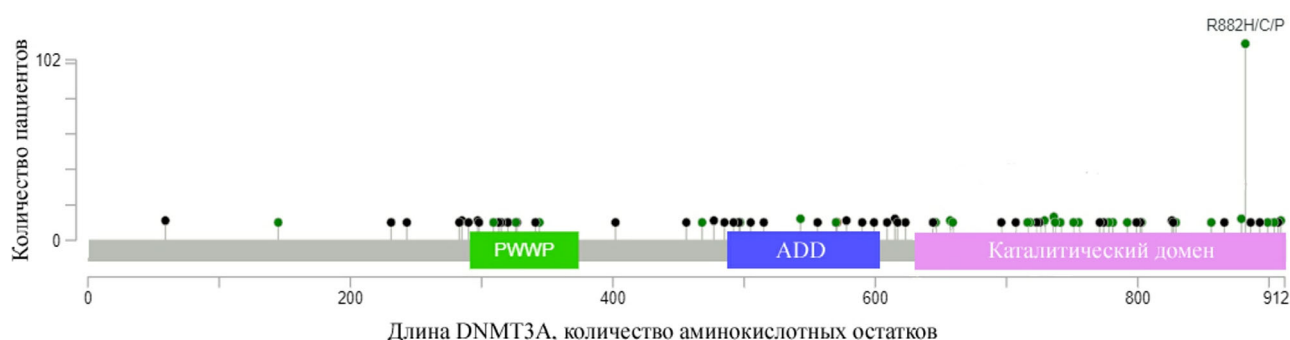


Рис. 6. Схема DNMT3A человека с распределением нарушений, сопутствующих ОМЛ (построено с помощью базы данных SVBioPortal [8], 1278 пациентов в выборке). Темно-зеленым цветом отмечены точечные мутации, черным – укороченные формы, высота каждого столбика отражает количество пациентов с данным нарушением. Указаны три главных домена фермента: PWWP- (292–350 а.о., зеленый цвет), ADD- (482–614 а.о., синий цвет) и каталитический (634–912 а.о., розовый цвет)

ложение, что гиперметилирование может играть роль результата неудачных попыток организма ограничить пролиферацию лейкозных клеток, а наличие мутации R882H/C в DNMT3A приводит к серьёзному нарушению этого процесса, что, в свою очередь, может инициировать процесс трансформации [39]. Это согласуется с исследованием Russler-Germain et al. [13], где было показано, что при ОМЛ наблюдается гиперэкспрессия DNMT3A дикого типа и с мутацией R882H/C, а паттерн метилирования ДНК зависит от того, какой именно фермент присутствует в клетках. Показано, что в лейкозных клетках с DNMT3A дикого типа происходит гиперметилирование ДНК, а с мутацией R88H/C – гипометилирование. При продукции обоих ферментов одновременно наблюдается даже большее снижение активности DNMT3A, чем в случае присутствия одного только R882H/C. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о доминантно-негативной роли мутации R882H в DNMT3A, то есть о том, что в гетерозиготных по DNMT3A клетках с ОМЛ продукция DNMT3A–R882H/C способствует подавлению экспрессии DNMT3A дикого типа. Однако есть данные, опровергающие доминантно-негативную гипотезу. Так, в опытах на клеточных культурах со смешанными тетрамерами DNMT3A–R882H наблюдаемые доминантно-негативные эффекты не обнаруживаются [14]. Более того, активность этих смешанных комплексов оказалась даже чуть выше ожидаемой для них (с учётом декларируемой потери метилирующей активности [13]) и приводила к гиперметилированию. Таким образом, вопрос о доминантно-негативной роли DNMT3A с мутацией R882H в прогрессии ОМЛ остаётся дискуссионным.

Мутации «не-аргининового» типа. Наряду с мутацией R882H/C в каталитическом домене DNMT3A имеются многочисленные мутации, которые встречаются только у 1–5% пациентов с ОМЛ и достаточно разнообразны по своей природе (рис. 6) [4, 9, 12]. На данный момент времени «не-аргининовые» мутации менее подробно изучены с точки зрения их влияния на функционирование DNMT3A, чем R882H/C, и если в случае мутации R882H под нарушение метилирования подведен структурный базис, то для «не-аргининовых» мутаций такая информация отсутствует [10, 17]. Далее приводится анализ посвященных им исследований как с использованием модельных ДНК-субстратов, так и на клеточных линиях.

С точки зрения установления молекулярной основы наблюдаемых эффектов, мутации удобно разбить по группам в соответствии с функци-

онально значимыми областями DNMT3A: а.о., участвующими в связывании с ДНК, интерфейсами RD и FF, а также с консервативными мотивами I–X.

ДНК-связывающие аминокислотные остатки. Эти остатки расположены в каталитической петле DNMT3A (G707–K721) и в петле в TRD (R831–F848) [29]. Некоторые из них (S714, V716, P718, R792, T835, N838, R836 и K841) подвергаются мутациям при ОМЛ [29]. Наиболее подробно изучено влияние мутации остатка S714, расположенного в каталитической петле DNMT3A, на функционирование фермента [29, 46, 47]. Показано снижение метилирующей активности полноразмерной DNMT3A человека с этой мутацией, что согласуется с таким же эффектом в случае соответствующей мутации (S124C) в Dnmt3a-CD мыши [29, 46, 47]. Активность фермента частично восстанавливалась в присутствии регуляторного фактора Dnmt3L [29, 47]. Согласно структуре комплекса DNMT3A с ДНК-дуплексом, остаток S714 образует контакты с углеводофосфатным остовом вблизи цитозина-мишени [29]. Этот факт, а также отсутствие ковалентного интермедиата реакции метилирования при взаимодействии мутантной формы фермента с ДНК позволил Khrabrova et al. [46] сделать предположение, что S714 играет важную роль в выпетливании цитозина-мишени из двойной спирали, а при замене С на S, вероятно, этот процесс нарушается. В случае мутаций V716D, R792H, P718L, N838D, R836W, T835M и K841E было показано значительное снижение метилирующей активности DNMT3A без дальнейшего изучения молекулярного механизма [29].

Интерфейсы RD и FF. В области FF-интерфейса (рис. 3) (контакт DNMT3A с DNMT3L) мутациям подвергаются остатки R736, R729, P904 и R771 [8, 10]. В случае мутаций R736H, R729W и P904L метилирующая активность DNMT3A снижается, а в случае Dnmt3a мыши для мутации R146H (соответствует R736H человека) – полностью отсутствует [46–48]. Добавление в систему регуляторного фактора Dnmt3L увеличивало активность мутантных форм R736H и P904L, но не R729W [47, 48]. Исследуя причины этого явления, Sandoval et al. [47] и Holz-Schietinger et al. [48] установили, что замена R729W приводит к димеризации DNMT3A без дальнейшего присоединения субъединиц DNMT3L, а все остальные замены – к образованию менее активных тетрамеров, чем в случае DNMT3A дикого типа. Таким образом, в случае R729W, R736H и P904L выявлено возможное нарушение важных контактов в области взаимодействия DNMT3A и DNMT3L [47, 48].

Отдельно следует рассмотреть остаток R771, в случае которого выявлены замены на L, P, G или Q [8]. При замене R на L, P и G наблюдается снижение каталитической активности DNMT3A, которая полностью (R771L) или частично (R771P и R771G) восстанавливается при добавлении регуляторного фактора DNMT3L [47, 48]. Эти наблюдения предполагают, что в случае мутации остатка R771 также происходит нарушение контактов в области взаимодействия DNMT3A и DNMT3L, как и в случае остатков R736 и P904 [47, 48]. Интересно, что замена R771Q, наоборот, приводит к повышению активности DNMT3A, которая усиливается в присутствии DNMT3L [47]. На этом примере становится очевидно, что замена аминокислоты в одной и той же позиции на аминокислоты с отличными от исходных свойствами каждый раз даёт различный результат.

Для мутаций R771Q и R736H, расположенных в FF-интерфейсе, а также для мутации W893S, попадающей в область RD-интерфейса (рис. 3), показан удивительный факт: в случае субстратов с большим содержанием CpG и субстратов, не содержащих CpG, отсутствовало различие в метилировании ДНК [47]. В связи с этим Sandoval et al. [47] впервые поднимают вопрос о способности DNMT3A с мутациями к неспецифическому («не-CpG») метилированию ДНК. Подобный эффект, по всей видимости, необходимо проверить для каждой конкретной мутации.

Консервативные мотивы I–X. Следует выделить остатки R635 и F752, мутирующие при ОМЛ [8]. R635 находится в пределах консервативного мотива I (рис. 2), вовлечённого в связывание с AdoMet, и для него характерны замены на W и G [1, 8]. На модельной системе с использованием каталитического домена МТазы Dnmt3a-CD мыши в случае мутации R45W (R635W у человека) показана полная потеря метилирующей активности и способности связываться с ДНК [46]. Для мутации R635G в полно-размерной человеческой DNMT3A наблюдалось снижение активности фермента либо её полная потеря в зависимости от количества CpG-сайтов в протяжённых ДНК-субстратах [47]. Возможно, остаток R635 важен для способности МТазы связывать AdoMet, и мутация R635W нарушает этот процесс [46].

Остаток F752 расположен рядом с важной для катализа ENV-последовательностью мотива VI (рис. 2), и для него характерна замена на V [8]. Показано, что мутация F162V в Dnmt3a-CD мыши (F752V у человека) приводит к полной потере активности фермента, в том числе и в присутствии Dnmt3L, и к ухудшению

связывания с ДНК более чем в 3 раза [46]. Вероятно, замена F на V создаёт стерическое препятствие, которое может повлиять на взаимодействие аминокислот из мотива VI (ENV) с цитозин-мишенью.

Вне консервативных мотивов. В работе Khrabrova et al. [46] на модельной Dnmt3a-CD мыши была исследована мутация P187R (P777R у человека), не попадающая в функционально значимые области МТазы, но представляющая интерес с точки зрения значительных различий в структуре и свойствах заменяемых аминокислот. Показано снижение каталитической активности и ухудшение способности связывания с ДНК этой мутантной формы [46]. Авторы этой работы заключили, что мутация P187R может критическим образом нарушать третичную структуру DNMT3A и приводить к наблюдаемым эффектам.

Следует отметить, что в рассмотренных исследованиях на модельных системах использовали различные ДНК-субстраты: короткие с одним или многими CpG-сайтами или протяжённые, тоже с разным количеством CpG-сайтов [29, 46, 47]. Зачастую получаемые данные для одной и той же мутантной формы варьируют в зависимости от использованного ДНК-субстрата и даже противоречат друг другу. Возможно, именно со строением субстрата связаны наблюдаемые различия в метилирующей активности для мутантных форм R771Q, R736H и P904L [46, 47].

Мутации «не-аргининового» типа в опухолевых клетках. Подобных исследований немного, и их результаты не всегда согласуются с данными, полученными вне клеточных культур [29, 47]. В частности, описанные результаты с использованием модельных ДНК-субстратов хорошо коррелируют с данными, полученными на клеточных линиях для S714C [47], а также R836W, V716D, R792H и K841E [29]. Однако для мутации R771Q подобная корреляция отсутствует, и наблюдаемые эффекты зависят от используемой системы: активность фермента при использовании модельных ДНК-субстратов повышается, а в случае эмбриональных стволовых клеток наблюдается противоположный эффект [47].

Подводя итоги, можно заключить, что практически все точечные мутации «не-аргининового» типа в каталитическом домене DNMT3A, выявленные при ОМЛ, приводят к полной или частичной потере метилирующей активности этой МТазы. Лишь для S714C и R729W установлен молекулярный механизм, лежащий в основе снижения активности фермента. Для других мутантных форм DNMT3A установленного молекулярного механизма нет.

кулярного механизма нет, но прослеживается несколько факторов, определяющих работу МТазы. Для мутаций R771Q/L/P/G/H и R635W/G наблюдается зависимость активности мутантной формы DNMT3A от химической природы заменяемых и заменяющихся аминокислот. Кроме того, мутации R771Q, R736H и W983S демонстрируют нехарактерное для DNMT3A неспецифичное метилирование ДНК. Эффекты очень немногих мутаций (S714C, R771Q, R836W, V716D, R792H и K841E) изучены на клеточных линиях, а полученные данные не всегда совпадают с результатами экспериментов на системах с использованием модельных ДНК-субстратов. Таким образом, очевидно, что для выявления молекулярного механизма, лежащего в основе наблюдаемых при ОМЛ нарушений, исследования следует проводить отдельно для каждой мутации, анализируя эффекты как на уровне изучения отдельных стадий функционирования фермента, так и на уровне экспериментов в опухолевых клетках.

Мутации в каталитическом домене DNMT3A при других гематологических заболеваниях. Мутации в каталитическом домене DNMT3A распространены не только при развитии ОМЛ, но и при других типах гематологических заболеваний [4, 6, 7, 36, 37]. Следует выделить МДС, мутации при котором часто формируют профиль распределения в DNMT3A схожий с наблюдаемым при ОМЛ [8, 32]. При МДС нарушения в DNMT3A наблюдаются у 7% пациентов, а в группе всех типов гематологических заболеваний – у 10% [8, 32]. Более 6% из наблюдаемых при МДС нарушений в DNMT3A – точечные мутации [32]. При МДС точно так же, как и при ОМЛ, самой распространенной мутацией является R882 [32]. Есть исследования, указывающие, что клетки с такими мутациями в DNMT3A имеют большую вероятность опухолевой трансформации по сравнению с нормальными [49].

Еще одним заболеванием, при котором часто наблюдаются мутации, совпадающие с мутациями при ОМЛ, является острый лейкоз смешанного типа (ОЛСТ) [50]. Для ОЛСТ характерно развитие фенотипических признаков сразу двух других типов заболеваний – В-клеточного и Т-клеточного лимфоидных лейкозов; они составляют 5% от всех типов лейкозов [50]. При этом у трети пациентов с ОЛСТ мутируют эпигенетические модификаторы с превалированием мутаций в DNMT3A [8, 50]. Как в случае ОМЛ и МДС, при данной форме заболевания чаще всего наблюдаются мутации остатка R882, а мутации в гене DNMT3A происходят уже в клетках-предшественниках [8, 32, 50–52]. Как и в случае МДС, при ОЛСТ в этих клетках точеч-

ные мутации в DNMT3A возникают раньше последующих изменений, а также, по данным некоторых исследований, предшествуют дальнейшей трансформации клеток [32, 50–52]. Таким образом, мутации в DNMT3A могут быть рассмотрены в качестве потенциального маркера для диагностики ОЛСТ и МДС.

Ингибиторы МТаз и терапия ОМЛ при наличии мутаций в DNMT3A. Как обсуждалось выше, в случае злокачественных новообразований наблюдается гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста, что приводит к их инактивации. Нуклеозидные ингибиторы МТаз: 5-азациитидин (видаза) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин), а также 2'-деокси-5-азациитидил-((3'→5')-2'-дезоксигуанозин (гвадесцитабин) очень давно широко используются как эффективные химиотерапевтические средства при злокачественных заболеваниях крови (в частности, одобрены для ОМЛ и МДС) [53–56]. Они включаются в ДНК в процессе её синтеза, что приводит к замене цитозина-мишени на 5-азацитозин и блокированию МТазы за счет её необратимого связывания с ДНК. Эти деметилирующие агенты вызывают реэкспрессию молчащих генов (активируются гены-супрессоры опухолей). Применение классической гипометилирующей терапии кажется проблематичным в случае пациентов с мутациями в DNMT3A, при наличии которых, как показано выше, в большинстве случаев также снижается метилирующая активность этого фермента. Однако, по некоторым данным, применение деметилирующих препаратов было успешным и даже способствовало быстрой ремиссии у пациентов с миелодиспластическим синдромом [37, 57, 58]. Очевидно, что ответ на этот вопрос требует проведения масштабных клинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушения в метилировании ДНК были выявлены при различных онкозаболеваниях. В последнее время был опубликован ряд исследований, демонстрирующих, что для злокачественных новообразований системы крови характерны точечные мутации в гене МТазы DNMT3A. При этом мутации локализованы в основном в каталитическом домене DNMT3A. Отдельные виды онкозаболеваний системы крови имеют характерные распределения мутаций, но некоторые мутации могут быть характерными для разных заболеваний этой группы. Это позволяет предположить, что, возможно, при развитии онкозаболеваний системы крови су-

существует некая общность последствий в нарушениях процесса метилирования, ассоциированных с мутациями в гене *DNMT3A*. Наиболее часто мутации в *DNMT3A* наблюдаются при развитии ОМЛ, и проведенные на сегодняшний день исследования позволяют однозначно утверждать, что они приводят к нарушению функционирования МТазы DNMT3A. В случае мутации R882H, известной в качестве «горячей точки мутагенеза», вскрыт ее многосторонний эффект: ухудшение каталитической активности DNMT3A, нарушение специфичности взаимодействия с CpG-сайтом и фланкирующими его нуклеотидными последовательностями [17]. Важно, что и «не-аргининовые» мутации, несмотря на их малую распространенность, вносят значительный вклад в наблюдаемые нарушения в работе DNMT3A, даже когда они не затрагивают функциональные центры этой МТазы [4, 45–48]. Однако выявить молекулярный механизм, лежащий в основе наблюдаемых явлений,

удается лишь в отдельных случаях. Понимание молекулярных механизмов, ведущих к проявлению описанных эффектов, будет способствовать разработке новых подходов к лечению ОМЛ с мутациями в гене *DNMT3A* и таким образом совершенствованию персонализированной терапии гематологических онкозаболеваний, а также созданию новых методов ранней диагностики и мониторинга ОМЛ.

Финансирование. Написание данного обзора стало возможным благодаря финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00533-а).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., and Jeltsch, A. (2011) Structure and function of mammalian DNA methyltransferases, *Chembiochem.*, **12**, 206-222, doi: 10.1002/cbic.201000195.
- Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, **16**, 6-21, doi: 10.1101/gad.947102.
- Jones, P. A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 484-492, doi: 10.1038/nrg3230.
- Zhang, W., and Xu, J. (2017) DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis, *Biomarker Res.*, **5**, 1-7, doi: 10.1186/s40364-017-0081-z.
- Ehrlich, M. (2019) DNA hypermethylation in disease: mechanisms and clinical relevance, *Epigenetics*, **14**, 1141-1163, doi: 10.1080/15592294.2019.1638701.
- Hamidi, T., Singh, A. K., and Chen, T. (2015) Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases, *Epigenomics*, **7**, 247-265, doi: 10.2217/epi.14.80.
- Robertson, K. D. (2005) DNA methylation and human disease, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 597-610, doi: 10.1038/nrg1655.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., et al. (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data, *Cancer Discov.*, **2**, 401-404, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11112-05.
- O'Brien, E. C., Brewin, J., and Chevassut, T. (2014) DNMT3A: the DioNysian MonsTer of acute myeloid leukaemia, *Ther. Adv. Hematol.*, **5**, 187-196, doi: 10.1177/2040620714554538.
- Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., et al. (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **363**, 2424-2433, doi: 10.1056/NEJMoa1005143.
- Sun, Y., Shen, H., Xu, T., Yang, Z., Qiu, H., et al. (2016) Persistent DNMT3A mutation burden in DNMT3A mutated adult cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients in long-term remission, *Leuk. Res.*, **49**, 102-107, doi: 10.1016/j.leukres.2016.09.001.
- Hou, H. A., Kuo, Y. Y., Liu, C. Y., Chou, W. C., Lee, M. C., et al. (2012) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications, *Blood*, **119**, 559-568, doi: 10.1182/blood-2011-07-369934.
- Russler-Germain, D. A., Spencer, D. H., Young, M. A., Lamprecht, T. L., Miller, C. A., et al. (2014) The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers, *Cancer Cell*, **25**, 442-454, doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.010.
- Emperle, M., Dukatz, M., Kunert, S., Holzer, K., Rajavelu, A., et al. (2018) The DNMT3A R882H mutation does not cause dominant negative effects in purified mixed DNMT3A/R882H complexes, *Sci. Rep.*, **8**, 13242-13251, doi: 10.1038/s41598-018-31635-8.
- Emperle, M., Rajavelu, A., Kunert, S., Arimondo, P. B., Reinhardt, R., et al. (2018) The DNMT3A R882H mutant displays altered flanking sequence preferences, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3130-3139, doi: 10.1093/nar/gky168.
- Nguyen, T. V., Yao, S., Wang, Y., Rolfé, A., Selvaraj, A., et al. (2019) The R882H DNMT3A hotspot mutation stabilizes the formation of large DNMT3A oligomers with low DNA methyltransferase activity, *J. Biol. Chem.*, **294**, 16966-16977, doi: 10.1074/jbc.RA119.010126.
- Anteneh, H., Fang, J., and Song, J. (2020) Structural basis for impairment of DNA methylation by the DNMT3A R882H mutation, *Nat. Commun.*, **11**, 2294-2306, doi: 10.1038/s41467-020-16213-9.
- Chen, T., and Li, E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **60**, 55-89, doi: 10.1016/S0070-2153(04)60003-2.
- Cheng, X., and Blumenthal, R. M. (2008) Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective, *Structure*, **16**, 341-350, doi: 10.1016/j.str.2008.01.004.
- Chédin, F. (2011) The DNMT3 family of mammalian *de novo* DNA methyltransferases, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **101**, 255-285, doi: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00007-X.

21. Gowher, H., and Jeltsch, A. (2018) Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1191-1202, doi: 10.1042/BST20170574.
22. Ravichandran, M., Jurkowska, R. Z., and Jurkowski, T. P. (2018) Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery, *Org. Biomol. Chem.*, **16**, 1419-1435, doi: 10.1039/c7ob02574b.
23. Posfai, J., Bhagwat, A. S., Posfai, G., and Roberts, R. J. (1989) Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 2421-2435, doi: 10.1093/nar/17.7.2421.
24. Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., and Jeltsch, A. (2005) Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosineC5)-methyltransferases by Dnmt3L, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13341-13348, doi: 10.1074/jbc.M413412200.
25. Lin, N., Fu, W., Zhao, Ch., Li, B., Yan, X., and Li, Y. (2017) Biologico-clinical significance of DNMT3A variants expression in acute myeloid leukemia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **494**, 270-277, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.041.
26. Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., and Cheng, X. (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix, *Cell*, **76**, 357-369, doi: 10.1016/0092-8674(94)90342-5.
27. Gromova, E. S., and Khoroshaev, A. V. (2003) Prokaryotic DNA methyltransferases: structure and mechanism of interaction with DNA, *Mol. Biol.*, **37**, 260-272, doi: 10.1023/A:1023301923025.
28. 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, doi: 10.1038/nature06146.
29. Zhang, Z. M., Lu, R., Wang, P., Yu, Y., Chen, D., et al. (2018) Structural basis for DNMT3A-mediated *de novo* DNA methylation, *Nature*, **554**, 387-391, doi: 10.1038/nature25477.
30. Holz-Schietinger, C., Matje, D. M., Harrison, M. F., and Reich, N. O. (2011) Oligomerization of DNMT3A controls the mechanism of *de novo* DNA methylation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 41479-41488, doi: 10.1074/jbc.M111.284687.
31. Gros, C., Fahy, J., Halby, L., Dufau, I., Erdmann, A., et al. (2012) DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches, *Biochimie*, **94**, 2280-2296, doi: 10.1016/j.biochi.2012.07.025.
32. Heuser, M., Yun, H., and Thol, F. (2017) Epigenetics in myelodysplastic syndromes, *Semin. Cancer Biol.*, **51**, 170-179, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.07.009.
33. Figueroa, M. E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., et al. (2010) DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **17**, 13-27, doi: 10.1016/j.ccr.2009.11.020.
34. Yan, X. J., Xu, J., Gu, Z. H., Pan, C. M., Lu, G., et al. (2011) Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia, *Nat. Genet.*, **43**, 309-315, doi: 10.1038/ng.788.
35. Ponciano-Gómez, A., Martínez-Tovar, A., Vela-Ojeda, J., Olarte-Carrillo, I., Centeno-Cruz, F., and Garrido, E. (2017) Mutations in TET2 and DNMT3A genes are associated with changes in global and gene-specific methylation in acute myeloid leukemia, *Tumour Biol.*, **39**, 1-12, doi: 10.1177/1010428317732181.
36. Jin, B., and Robertson, K. D. (2013) DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer, in *Epigenetic Alterations in Oncogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Karpf, A., eds.) Vol. 754, Springer, New York, NY, doi: 10.1007/978-1-4419-9967-2_1.
37. Yang, L., Rau, R., and Goodell, M. A. (2015) DNMT3A in haematological malignancies, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 152-165, doi: 10.1038/nrc3895.
38. Belle, R., Kawamura, A., and Arimondo, P. (2019) Chemical compounds targeting DNA methylation and hydroxymethylation, in *Chemical epigenetics*, Springer Nature, Cham, pp. 255-286.
39. Spencer, D. H., Russler-Germain, D. A., Ketkar, S., Helton, N. M., Lamprecht, T. L., et al. (2017) CpG island hypermethylation mediated by DNMT3A is a consequence of AML progression, *Cell*, **168**, 1-16, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.021.
40. He, D., Wang, X., Zhang, Y., Zhao, J., Han, R., and Dong, Y. (2019) DNMT3A/3B overexpression might be correlated with poor patient survival, hypermethylation and low expression of ESR1/PGR in endometrioid carcinoma: an analysis of The Cancer Genome Atlas, *Chin. Med. J. (Engl.)*, **132**, 161-170, doi: 10.1097/CM9.0000000000000054.
41. Kataoka, I., Funata, S., Nagahama, K., Isogaya, K., Takeuchi, H., et al. (2020) DNMT3A overexpression is associated with aggressive behavior and enteroblastic differentiation of gastric adenocarcinoma, *Ann. Diagn. Pathol.*, **44**, 151456-151462, doi: 10.1016/j.anndiagpath.2019.151456.
42. Esteller, M. (2008) Epigenetics in cancer, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1148-1159, doi: 10.1056/NEJMra072067.
43. Zhao, Z., Wu, Q., Cheng, J., Qiu, X., Zhang, J., and Fan, H. (2010) Depletion of DNMT3A suppressed cell proliferation and restored PTEN in hepatocellular carcinoma cell, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 1-10, doi: 10.1155/2010/737535.
44. Butcher, D. T., and Rodenhiser, D. I. (2007) Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours, *Eur. J. Cancer*, **43**, 210-219, doi: 10.1016/j.ejca.2006.09.002.
45. Norvil, A. B., Saha, D., Dar, M. S., and Gowher, H. (2019) Effect of disease-associated germline mutations on structure function relationship of DNA methyltransferases, *Genes*, **10**, 369-385, doi: 10.3390/genes10050369.
46. Khrabrova, D. A., Loiko, A. G., Tolkacheva, A. A., Cherepanova, N. A., Zvereva, M. I., et al. (2020) Functional analysis of DNMT3A DNA methyltransferase mutations reported in patients with acute myeloid leukemia, *Biomolecules*, **10**, 8-25, doi: 10.3390/biom10010008.
47. Sandoval, J. E., Huang, Y. H., Muijs, A., Goodell, M. A., and Reich, N. O. (2019) Mutations in the DNMT3A DNA methyltransferase in AML patients cause both loss and gain of function and differential regulation by protein partners, *J. Biol. Chem.*, **294**, 4898-4910, doi: 10.1074/jbc.RA118.006795.
48. Holz-Schietinger, C., Doug, M., Matje, S., and Reich, N. O. (2012) Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation, *J. Biol. Chem.*, **287**, 30941-30951, doi: 10.1074/jbc.M112.366625.
49. Mayle, A., Yang, L., Rodriguez, B., Zhou, T., Chang, E., et al. (2015) Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation, *Blood*, **125**, 629-638, doi: 10.1182/blood-2014-08-594648.
50. Eckstein, O. S., Wang, L., Punia, J. N., Kornblau, S. M., Andreeff, M., et al. (2016) Mixed-phenotype acute leukemia (MPAL) exhibits frequent mutations in DNMT3A and activated signaling genes, *Exp. Hematol.*, **44**, 740-744, doi: 10.1016/j.exphem.2016.05.003.
51. Cole, C. B., Verdoni, A. M., Ketkar, S., Leight, E. R., Russler-Germain, D. A., et al. (2016) PML-RARA requires DNA methyltransferase 3A to initiate acute promyelocytic leukemia, *J. Clin. Invest.*, **126**, 85-98, doi: 10.1172/JCI82897.
52. Cole, C. B., Russler-Germain, D. A., Ketkar, S., Verdoni, A. M., Smith, A. M., et al. (2017) Haploinsufficiency for

- DNA methyltransferase 3A predisposes hematopoietic cells to myeloid malignancies, *J. Clin. Invest.*, **127**, 3657-3674, doi: 10.1172/JCI93041.
53. Brunetti, L., Gundry, M. C., and Goodell, M. A. (2017) DNMT3A in leukemia, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **7**, 1-18, doi: 10.1101/cshperspect.a030320.
54. Kirsanova, O. V., Cherepanova, N. A., and Gromova, E. S. (2009) Inhibition of C5-cytosine-DNA-methyltransferases, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1175-1186, doi: 10.1134/s0006297909110017.
55. Yu, J., Xie, T., Wang, Z., Wang, X., Zeng, S., Kang, Y., and Hou, T. (2019) DNA methyltransferases: emerging targets for the discovery of inhibitors as potent anticancer drugs, *Drug Discov. Today*, **24**, 2323-2331, doi: 10.1016/j.drudis.2019.08.006.
56. Daher-Reyes, G. S., Merchan, B. M., and Yee, K. (2019) Guadecitabine (SGI-110): an investigational drug for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia, *Expert Opin. Investing. Drugs*, **28**, 835-849, doi: 10.1080/13543784.2019.1667331.
57. Traina, F., Visconte, V., Elson, P., Tabarroki, A., Jankowska, A. M., et al. (2014) Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms, *Leukemia*, **28**, 78-87, doi: 10.1038/leu.2013.269.
58. Klco, J. M., Spencer, D. H., Lamprecht, T. L., Sarkaria, S. M., Wylie, T., et al. (2013) Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cell, *Blood*, **121**, 1633-1643, doi: 10.1182/blood-2012-09-459313.

AML-ASSOCIATED MUTATIONS IN DNMT3A DNA METHYLTRANSFERASE

Review

D. A. Khrabrova^{1*}, M. G. Yakubovskaya², and E. S. Gromova¹

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: khrabrova_da@mail.ru

² Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia

In mammals, DNA methylation is an essential epigenetic modification necessary to maintain genome stability, to regulate gene expression, and for other processes. Many changes have been identified both in the DNA methylation pattern and in the DNA methyltransferase (DNMT) genes during carcinogenesis that are often associated with poor patient prognosis. Human DNMT3A is responsible for *de novo* DNA methylation and it is one of the enzymes in which missense mutations occur most frequently during the early stages of tumor development. DNMT3A mutations are often observed in hematological malignancies especially in acute myeloid leukemia (AML) with a large prevalence of the R882H mutation. This mutation is the only one that has been widely studied both using model DNA substrates and cancer cell lines. Biochemical characterization of other DNMT3A mutants is necessary to assess potential effects of the observed mutations on the functioning of DNMT3A. In this review we consider the currently known DNMT3A mutation observed during AML progression providing a more detailed analysis of the missense mutations in the catalytic domain of the DNMT3A. The effects of R882H and of less common missense mutations on DNMT3A functioning with model DNA substrates and in the cancer cell lines are presented with emphasis on underlying molecular mechanisms. Understanding general features of these mechanisms would be useful for further development of both early diagnostics approaches of hematologic diseases and personalized cancer therapy.

Keywords: DNA methyltransferase Dnmt3a, DNA methylation, mutations, acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, hematological malignancies