

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.152.211

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ Dnmt3a  
С ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА  
И S-АДЕНОЗИЛГОМОЦИСТЕИНА

© 2023 г. В. Л. Филонов<sup>а</sup>, М. А. Хомутов<sup>а</sup>, А. В. Сергеев<sup>б</sup>, А. Л. Хандажинская<sup>а</sup>, С. Н. Кочетков<sup>а</sup>,  
Е. С. Громова<sup>б, \*</sup>, А. Р. Хомутов<sup>а, \*\*</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>б</sup>Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: gromova@genebee.msu.ru

\*\*e-mail: alexkhom@list.ru

Поступила в редакцию 02.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 08.12.2022 г.

Реакции ферментативного метилирования, катализируемые метилтрансферазами, играют важнейшую роль в метаболизме клеток. Основным донором метильных групп в этих реакциях служит S-аденозил-L-метионин. Акцепторами метильных групп могут быть нуклеиновые кислоты, белки, а также различные низкомолекулярные соединения. У млекопитающих метилирование остатков цитозина по положению C5 в CpG-последовательностях ДНК осуществляется *de novo* ДНК-метилтрансферазой Dnmt3a, а “рисунок метилирования” относится к факторам, определяющим эпигенетическую регуляцию экспрессии генов. В настоящей работе впервые исследовано взаимодействие фосфонистых и фосфоновых аналогов S-аденозил-L-метионина и S-аденозил-L-гомоцистеина, в которых карбоксильная группа заменена на соответствующий фосфорсодержащий фрагмент, с каталитическим доменом Dnmt3a. В реакции метилирования ДНК, катализируемой Dnmt3a, эти аналоги S-аденозил-L-метионина оказались лишь в 2 раза менее эффективными донорами метильной группы, чем природный S-аденозил-L-метионин. Оба фосфорсодержащих аналога S-аденозил-L-гомоцистеина, природного ингибитора метилтрансфераз, проявляли близкую ингибиторную активность в отношении Dnmt3a и были примерно в 4 раза менее активными, чем S-аденозил-L-гомоцистеин. Весьма неожиданной оказалась сопоставимость величин активностей фосфонистых и фосфоновых аналогов S-аденозил-L-метионина и S-аденозил-L-гомоцистеина, поскольку геометрия и заряд фосфорсодержащих фрагментов существенно различаются. Обсуждаются возможности использования фосфоаналогов S-аденозил-L-метионина и S-аденозил-L-гомоцистеина в качестве инструментов исследования метилтрансфераз.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, S-аденозил-L-метионин, S-аденозил-L-гомоцистеин, фосфорорганические аналоги, субстраты, ингибиторы

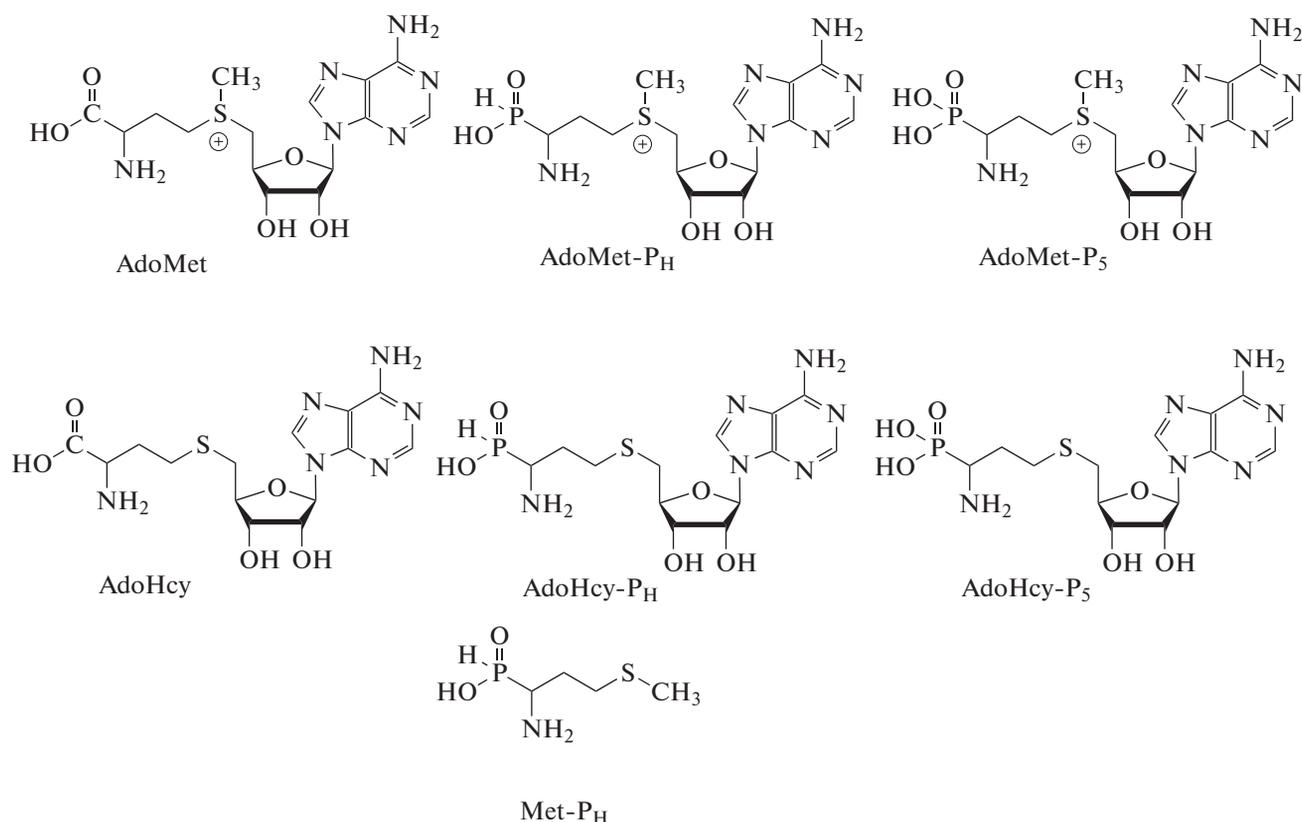
DOI: 10.31857/S0026898423040079, EDN: QLCJBH

## ВВЕДЕНИЕ

Реакции переноса одноуглеродных остатков, в том числе реакции метилирования, катализируемые метилтрансферазами, играют важную роль в метаболизме клеток, а S-аденозил-L-метионин

(AdoMet) — основной донор метильных групп, занимает второе место после АТФ по разнообразию биохимических превращений, в которых он участвует [1]. Субстратами реакций метилирования служат ДНК, РНК, белки, а также низкомолекулярные соединения, а AdoMet может рассматриваться как второй субстрат во всех этих превращениях. Метилирование ДНК является одним из факторов, определяющих эпигенетическую регуляцию экспрессии генов эукариот [2, 3]. У млекопитающих метилированию подвергаются остатки цитозина по C5-положению в CpG-последовательностях ДНК, а распределение метилированных оснований образует “рисунок метилирования”, который устанавливается *de novo* C5-ДНК-метилтрансферазой (MTазой) Dnmt3a

Сокращения: МТазы — C5-ДНК-метилтрансферазы; Dnmt3a-CD — каталитический домен ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a; AdoMet — S-аденозил-L-метионин; AdoMet-P<sub>H</sub> — 5'-{S-[3-амино-3-(гидрогидроксифосфорил)пропил]-S-метил}-5'-дезоксаденозин; AdoMet-P<sub>5</sub> — 5'-{S-[3-амино-3-(дигидроксифосфорил)пропил]-S-метил}-5'-дезоксаденозин; AdoHcy — S-аденозил-L-гомоцистеин; AdoHcy-P<sub>H</sub> — 5'-[3-амино-3-(гидрогидроксифосфорил)пропил]-5'-дезоксаденозин; AdoHcy-P<sub>5</sub> — 5'-[3-амино-3-(дигидроксифосфорил)пропил]-5'-дезоксаденозин; PLP — пиридоксаль-5'-фосфат.



**Рис. 1.** Структуры *S*-аденозил-*L*-метионина (AdoMet), *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина (AdoHcy), их фосфонистых (AdoMet-P<sub>H</sub> и AdoHcy-P<sub>H</sub>) и фосфоновых (AdoMet-P<sub>5</sub> и AdoHcy-P<sub>5</sub>) аналогов, соответственно, а также фосфонистого аналога метионина (Met-P<sub>H</sub>).

[4, 5]. Нарушения метилирования ДНК часто выявляют при онкологических заболеваниях — при общем гипометилировании генома наблюдается локальное гиперметилирование промоторных участков генов-супрессоров опухолей, а снижение активности МТаз приводит к реактивации этих генов и подавлению роста опухолевых клеток [6].

Как правило, модификации сульфониевого центра, амино- или карбоксильной групп AdoMet приводят к полной или частичной потере его сродства к ферменту [7]. Необычная способность МТазы Dnmt3a использовать вместо AdoMet некоторые его аналоги выделяет этот фермент среди других метилтрансфераз. В ряду производных AdoMet, в которых метильная группа сульфониевого центра заменена на этильную или пропильную, скорость переноса алкильного заместителя резко падает с увеличением его размера [8, 9]. Модификации AdoMet по аминогруппе метионинового фрагмента приводят к потере субстратных свойств AdoMet. Метиловый и этиловый эфиры AdoMet оказались донорами метильных групп в реакции, катализируемой прокариотической CpG-узнающей МТазой M.SssI, но несколько худшими, чем AdoMet [10]. Сходство каталитиче-

ских механизмов прокариотических цитозиновых МТаз [11, 12] и соответствующих эукариотических ферментов [4] открывает дополнительные возможности для исследования Dnmt3a при помощи аналогов AdoMet с модифицированной HOOC-группой. Следует отметить, что подобные аналоги должны иметь свободную аминогруппу и сульфониевый центр, важные для их продуктивного связывания в активном центре Dnmt3a [13].

В настоящей работе химическими инструментами исследований служили фосфорорганические аналоги AdoMet и *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина (AdoHcy), в которых карбоксильная группа заменена на фосфорсодержащий фрагмент (рис. 1), а основным из них был фосфонистый аналог AdoMet (AdoMet-P<sub>H</sub>). Известно, что этот аналог является донором метильной группы в тРНК-метилтрансферазных реакциях (использована суммарная тРНК и препарат суммарных метилтрансфераз *E. coli* [14]). AdoMet-P<sub>H</sub> синтезируется в клетках L1210, растущих в среде, содержащей фосфонистый аналог метионина (рис. 1, Met-P<sub>H</sub>) [15]. AdoMet-P<sub>H</sub> в отличие от AdoMet химически стабилен [16], а поскольку механизмы химического гидролиза AdoMet и AdoMet-лиазной реак-

ции заключаются во внутримолекулярном алкилировании карбоксильной группы, приводящем к образованию лактона гомосерина и 5'-метилтиоаденозина [17], то AdoMet-P<sub>H</sub> можно рассматривать не только как функционально активный, но и как катаболически устойчивый миметик AdoMet. Взаимодействие фосфоаналогов AdoMet и AdoHcy (рис. 1) с ДНК-метилтрансферазами ранее не изучали. В настоящей работе исследована способность AdoMet-P<sub>H</sub> и AdoMet-P<sub>5</sub> (рис. 1) служить донорами метильной группы в реакции метилирования ДНК, катализируемой Dnmt3a, а также ингибирование этой реакции фосфоаналогами AdoHcy – AdoHcy-P<sub>H</sub> и AdoHcy-P<sub>5</sub> (рис. 1).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Фосфоаналоги AdoMet и AdoHcy синтезированы согласно [18]. AdoMet, AdoHcy, остальные реагенты и соли получены от фирм “Sigma” (США), “Merck” (Германия), “Helicon” (Россия). Каталитический домен МТазы Dnmt3a (Dnmt3a-CD) выделяли согласно [19]. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда [20]. Эндонуклеаза рестрикции Hin6I получена от компании “Сибэнзим” (Россия). В работе использовали FAM-меченый 30-звенный ДНК-дуплекс (fGCGC/CGCGf):

5'-FAM-CTGAATACTACTTTGCGCTCTCTAACCTGAT

3'-GACTTATGATGAACGCGAGAGATTGGACTA-FAM

который содержит метилируемый CpG-сайт в составе последовательности G\*CGC – сайта узнавания Hin6I (звездочкой указаны места расщепления). Олигонуклеотиды, содержащие флуоресцентный краситель 6(5)-карбоксифлуоресцеин (FAM), присоединенный к 5'-концу через аминоклипер –NH–(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>–, получены от компании “Синтол” (Россия). Буферный раствор А содержал 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7.5), 100 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ 1,4-дителиотреитол.

**Анализ образования тройного комплекса ДНК·(Dnmt3a-CD)·AdoHcy.** Константу диссоциации ( $K_d$ ) комплекса определяли с помощью метода поляризации флуоресценции прямым титрованием раствора ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf раствором Dnmt3a-CD. Смесь (120 мкл), содержащую 10 нМ ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf и 100 мкМ AdoHcy или его фосфоаналога в буфере А, инкубировали в течение 2 мин и регистрировали значение поляризации флуоресценции. Затем полученную смесь титровали 2 мкМ раствором Dnmt3a-CD, прибавляя аликвоты (0.5–2.0 мкл) фермента до конечной концентрации 700 нМ, и регистрировали значение поляризации флуоресценции через 2 мин после каждого прибавления. Зависимости поляризации флуоресценции от

концентрации фермента обрабатывали в соответствии с методикой, описанной в [19], используя уравнение Хилла:

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

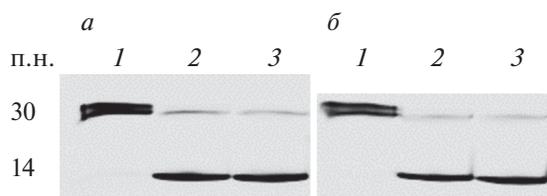
где  $[E]$  – концентрация Dnmt3a-CD;  $P_0$  и  $P_m$  – значения поляризации флуоресценции свободной и полностью связанной FAM-меченой ДНК соответственно;  $n$  – коэффициент Хилла. Измерения поляризации флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 495$  нм,  $\lambda_{em} = 520$  нм) проводили на приборе Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (“Varian”, США). Экспериментальные данные обрабатывали, используя программу OriginPro 2015.

**Определение субстратных свойств фосфоаналогов AdoMet в реакции метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, катализируемой Dnmt3a-CD.** Эффективность метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf изучали, используя способность эндонуклеазы Hin6I осуществлять расщепление по метилированному сайту рестрикции (G<sup>m</sup>GC), аналогично [19]. Реакционную смесь, содержащую 0.3 мкМ ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, 0.6–10 мкМ AdoMet или его фосфоаналогов (AdoMet-P<sub>H</sub> и AdoMet-P<sub>5</sub>) и 2 мкМ Dnmt3a-CD в буфере А, инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Реакцию останавливали нагреванием (95°C, 1 мин). Расщепление ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf эндонуклеазой рестрикции Hin6I (2 ед. акт. на 10 мкл смеси) проводили в той же реакционной смеси после добавления MgCl<sub>2</sub> (конечная концентрация 3 мкМ) в течение 60 мин при 37°C. Продукты реакции анализировали при помощи электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной. Интенсивность флуоресценции ДНК в геле определяли с помощью Typhoon FLA 9500 (“GE Healthcare Life Science”, Австралия), используя программу GelQuantNET. Контролем служила смесь AdoMet или его фосфоаналогов с ДНК-дуплексом fGCGC/CGCGf и такая же смесь, содержащая Hin6I. Степень метилирования ДНК-дуплекса определяли по соотношению расщепленной и нерасщепленной ДНК, которое рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{\omega_{R.Hin6I} - \omega_{Dnmt3a}}{\omega_{R.Hin6I}} \times 100\%,$$

где  $\omega_{Dnmt3a}$  – степень расщепления ДНК эндонуклеазой после обработки Dnmt3a-CD;  $\omega_{R.Hin6I}$  – степень расщепления ДНК без предварительного метилирования.

В случае реакций с участием фосфоаналогов AdoMet степень метилирования рассчитывали относительно соответствующей реакции с использованием AdoMet.



**Рис. 2.** Влияние AdoMet и его фосфоаналогов на активность эндонуклеазы рестрикции Hin6I. *a* – ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf (1); ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I (2); ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I + 25 мкМ AdoMet (3). *б* – ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf (1); ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I + 25 мкМ AdoMet-Р<sub>H</sub> (2); ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I + 25 мкМ AdoMet-Р<sub>5</sub> (3). Продукты расщепления анализировали методом электрофореза в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной.

**Определение ингибиторной активности фосфоаналогов AdoHcy в реакции метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, катализируемой Dnmt3a-CD.** Ингибиторные свойства фосфоаналогов AdoHcy ( $IC_{50}$ ) оценивали, сравнивая с активностью AdoHcy. С этой целью реакционную смесь, содержащую 0.3 мкМ ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, 0.6 мкМ AdoMet, 0–50 мкМ AdoHcy или одного из его фосфоаналогов и 2 мкМ Dnmt3a в буфере А, инкубировали в течение 60 мин при 37°C, реакцию останавливали нагреванием (95°C, 1 мин). Продукты реакции анализировали, как описано выше. Величины  $IC_{50}$  рассчитывали с помощью программы OriginPro 2015 согласно [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активная форма Dnmt3a представляет собой тетрамер, содержащий по две молекулы Dnmt3a и регуляторного фактора Dnmt3L. В отсутствие Dnmt3L активную форму образуют четыре субъединицы Dnmt3a [21]. Субъединица Dnmt3a состоит из N-концевой регуляторной области и каталитического C-концевого домена (Dnmt3a-CD) [22], который способен осуществлять метилирование ДНК в отсутствие регуляторной части [23]. При этом каталитические свойства C-концевого домена и полноразмерного фермента идентичны [22]. В настоящей работе использован Dnmt3a-CD мыши, первичная структура которого совпадает с первичной структурой DNMT3A-CD человека [4, 24], что позволяет использовать Dnmt3a-CD мыши в качестве адекватной модели DNMT3A человека. В качестве модельного субстрата использовали FAM-меченый 30-звенный ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf [25], содержащий сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции Hin6I (GCGC). Если фрагмент CpG в составе этого сайта метилирован, то фермент не способен расщеплять модифицированный уча-

сток цепи ДНК. Флуоресцентные FAM-метки на 5'-концах модельного дуплекса позволяют определять активность Dnmt3a методом электрофореза в ПААГ, выявляя как интактный дуплекс, так и продукты его расщепления, количество которых зависит от степени метилирования [25].

### *Фосфоаналоги AdoMet и AdoHcy не влияют на активность эндонуклеазы рестрикции Hin6I*

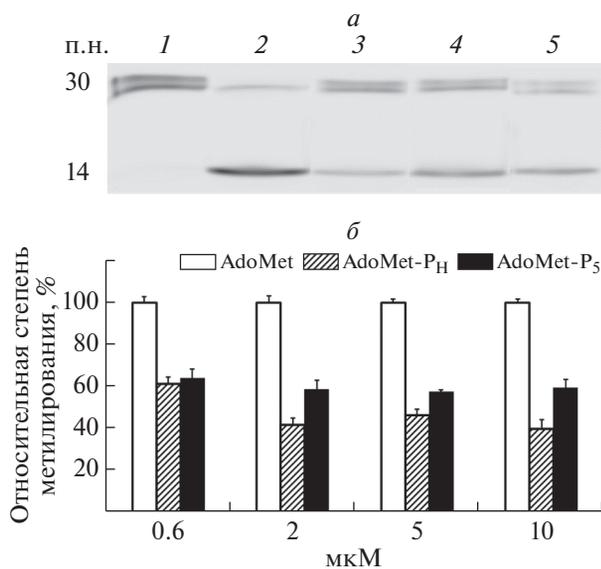
Метод определения активности Dnmt3a предусматривает использование двух последовательных ферментативных реакций: метилирования и расщепления ДНК-субстрата эндонуклеазой рестрикции Hin6I. Для исследования влияния фосфоаналогов AdoMet и AdoHcy на активность этой эндонуклеазы в реакционную смесь, не содержащую Dnmt3a-CD, вносили фосфоаналоги AdoMet или AdoHcy в концентрации 25 мкМ и расщепляли ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf эндонуклеазой. Оказалось, что степень расщепления этого дуплекса в присутствии как AdoMet, так и обоих его аналогов (рис. 1) составила около 90% (рис. 2). Подобные результаты получены для AdoHcy и его аналогов (данные не приведены).

Следовательно, расщепление эндонуклеазой можно проводить в той же реакционной смеси, в которой проводили метилирование, после добавления в нее ионов  $Mg^{2+}$ . Полученные данные позволили перейти к изучению субстратных свойств фосфоаналогов AdoMet и ингибиторной активности фосфоаналогов AdoHcy в реакции метилирования ДНК, катализируемое Dnmt3a.

### *Фосфоаналоги AdoMet являются донорами метильной группы в реакции метилирования ДНК, катализируемой Dnmt3a*

Субстратом Dnmt3a служит неметилированный ДНК-дуплекс, а донор метильной группы, AdoMet, в ходе ферментативной реакции превращается в AdoHcy. Фосфоаналоги AdoMet, содержащие реакционноспособный сульфониевый центр (рис. 1), могут рассматриваться в качестве возможных доноров метильной группы несмотря на то, что карбоксильная группа AdoMet заменена на кислый фосфорсодержащий фрагмент. Метилирование ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf с использованием двух фосфоаналогов AdoMet (рис. 1) изучено при четырех различных концентрациях (0.6–10 мкМ) аналогов в течение 60 мин, так как после 60 мин дальнейшее накопление метилированной ДНК практически не наблюдается. Обнаружено, что и AdoMet-Р<sub>H</sub>, и AdoMet-Р<sub>5</sub> являются примерно в 2 раза менее эффективными донорами метильных групп, чем природный AdoMet (рис. 3).

Таким образом, несмотря на существенное различие в строении фосфорсодержащих фраг-

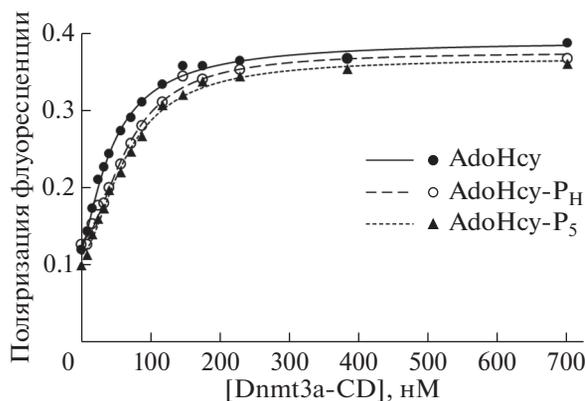


**Рис. 3.** Метилирование ДНК-дуплекса fGCGC/CGC-Gf МТазой Dnmt3a-CD с использованием AdoMet, AdoMet-P<sub>H</sub> и AdoMet-P<sub>5</sub> в качестве доноров метильной группы. а – Анализ расщепления ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf эндонуклеазой Hin6I до и после метилирования (60 мин), электрофорез в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной. 1 – ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf; 2 – ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I; 3–5 – метилированный ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf (0.6 мкМ AdoMet или 0.6 мкМ AdoMet-P<sub>H</sub>, или 0.6 мкМ AdoMet-P<sub>5</sub> соответственно) после обработки эндонуклеазой рестрикции Hin6I. б – Сравнение эффективности метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf при использовании в качестве доноров метильной группы AdoMet, AdoMet-P<sub>H</sub> и AdoMet-P<sub>5</sub> (0.6, 2, 5 и 10 мкМ). Значения степеней метилирования приведены относительно AdoMet, среднее из шести независимых экспериментов. Указаны стандартные отклонения.

ментов, и AdoMet-P<sub>H</sub>, и AdoMet-P<sub>5</sub> служат донорами метильных групп в реакции метилирования ДНК, а их активность оказалась сопоставимой с активностью AdoMet.

*AdoHcy-P<sub>H</sub> и AdoHcy-P<sub>5</sub> образуют тройные комплексы с ДНК-дуплексом fGCGC/CGCGf и Dnmt3a-CD*

AdoHcy, копродукт реакций метилирования и эффективный природный ингибитор многих метилтрансфераз [26], взаимодействует с Dnmt3a и ДНК, формируя тройной комплекс ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf·Dnmt3a·AdoHcy. Нами изучена возможность образования и стабильность тройных комплексов ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf·Dnmt3a-CD·AdoHcy-P<sub>H</sub>(P<sub>5</sub>) методом поляризации флуоресценции в сравнении с комплексом, образованным AdoHcy. Константы диссоциации ( $K_d$ ) этих тройных комплексов вычисляли на основе данных прямого титрования растворов,



**Рис. 4.** Изотермы образования тройных комплексов ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf·Dnmt3a-CD·AdoHcy/AdoHcy-P<sub>H</sub>/AdoHcy-P<sub>5</sub>, полученные методом поляризации флуоресценции. Состав реакционной смеси: 10 нМ ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, 100 мкМ AdoHcy, 100 мкМ AdoHcy-P<sub>H</sub> или 100 мкМ AdoHcy-P<sub>5</sub> в буфере А.

содержащих ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf (10 нМ), AdoHcy или один из его фосфоаналогов (100 мкМ), раствором Dnmt3a-CD до достижения конечной концентрации фермента 700 нМ (рис. 4). Во всех случаях коэффициент Хилла ( $n$ ) был больше единицы (табл. 1), что свидетельствовало о кооперативности связывания ДНК с Dnmt3a-CD. Значения  $K_d$  всех трех комплексов приблизительно равны (табл. 1), таким образом, строение кислого фрагмента AdoHcy мало влияет на устойчивость тройных комплексов ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf·Dnmt3a-CD·AdoHcy/AdoHcy-P<sub>H</sub>(P<sub>5</sub>).

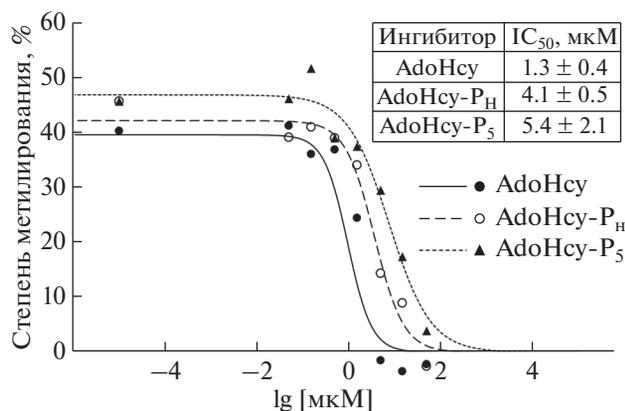
*Фосфоаналоги AdoHcy ингибируют метилирование ДНК, катализируемое Dnmt3a*

Способность фосфоаналогов AdoHcy стабилизировать комплекс Dnmt3a-CD с ДНК так же эффективно, как и AdoHcy, позволяет предположить, что эти соединения могут быть и ингибиторами Dnmt3a. Ингибирующую активность фосфоаналогов AdoHcy определяли в реакционной смеси, содержащей AdoMet (0.6 мкМ), варьируя концентрации фосфоаналогов AdoHcy (0–50 мкМ). Зна-

**Таблица 1.** Значения констант диссоциации ( $K_d$ ) и коэффициентов Хилла ( $n$ ) тройных комплексов ДНК·Dnmt3a-CD·AdoHcy/AdoHcy-P<sub>H</sub>/AdoHcy-P<sub>5</sub>, рассчитанные на основании трех экспериментов

Лиганд	$K_d$ , нМ	$n$
AdoHcy	51 ± 7	1.5 ± 0.3
AdoHcy-P <sub>H</sub>	66 ± 2	2.2 ± 0.4
AdoHcy-P <sub>5</sub>	64 ± 12	1.9 ± 0.2

Примечание. Указаны стандартные отклонения.



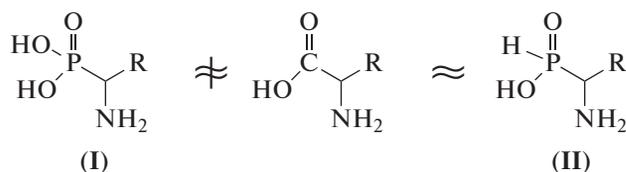
**Рис. 5.** Зависимость эффективности ингибирования метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf МТазой Dnmt3а-CD за 60 мин от логарифма концентрации AdoHcy, AdoHcy-P<sub>H</sub> или AdoHcy-P<sub>5</sub>. На вставке приведены значения IC<sub>50</sub> для AdoHcy, AdoHcy-P<sub>H</sub> и AdoHcy-P<sub>5</sub>, рассчитанные на основании трех независимых экспериментов. Указаны стандартные отклонения.

чения IC<sub>50</sub> для трех ингибиторов вычисляли, исходя из зависимостей степени метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf МТазой Dnmt3а-CD от концентрации AdoHcy, AdoHcy-P<sub>H</sub> и AdoHcy-P<sub>5</sub> (рис. 5). Оказалось, что оба фосфоаналого являются ингибиторами Dnmt3а-CD, а значения IC<sub>50</sub> этих соединений близки между собой и примерно в 4 раза выше, чем у AdoHcy (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Замена карбоксильной группы в молекулах аминокислот на кислый фосфорсодержащий фрагмент приводит к аналогам разных видов, включая аминокислотные (I) и аминокислотные (II) кислоты (рис. 6).

Наиболее хорошо исследованы аминокислотные кислоты (I), которые, как правило, оказываются слабыми конкурентными ингибиторами соответствующих ферментов метаболизма аминокислот или, намного реже, субстратами, средство которых ниже, чем у природных аминокислот [27, 28]. Это связано с тем, что фосфоновый остаток, представляющий собой двухзарядный тетраэдр, плохо моделирует плоскую карбоксильную группу. Однако существует и ряд исключений. Так, фосфоновый аналог аланина (*L*-Ala-P<sub>5</sub>, рис. 6, R = CH<sub>3</sub>), не содержащий реакционноспособных групп, необратимо ингибирует рацемазу аланина [29], а фосфоновый аналог *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина (AdoHcy-P<sub>5</sub>, рис. 1) необратимо ингибирует AdoHcy-гидролазу [30]. Следует отметить, что в последнем случае активны как *S*-, так и *R*-изомеры, но активность *S*-изомера намного выше, чем у *R*-изомера: K<sub>1</sub> = 345 ± 3 мкМ,



**Рис. 6.** Аминокислоты, их α-аминофосфоновые (I) и α-аминофосфонистые (II) аналоги.

$k_{\text{inact}} = 0.0049 \text{ мин}^{-1}$  и  $K_1 = 1094 \pm 49 \text{ мкМ}$ ,  $k_{\text{inact}} = 0.0145 \text{ мин}^{-1}$  соответственно [30]. Обычно аминокислотные используют в качестве аналогов промежуточных состояний HOOC-группы. Среди соответствующих производных найдены эффективные ингибиторы ферментов, в том числе и соединения, находящие практическое применение в медицине и сельском хозяйстве [27].

Аминокислотные кислоты (II) существенно менее исследованы по сравнению с аминокислотными (I) [28]. В этом случае однозарядный фосфонистый фрагмент, представляющий собой сплюснутый тетраэдр, достаточно хорошо моделирует плоскую карбоксильную группу, поэтому аминокислотные кислоты, в отличие от аминокислотных, оказываются субстратами некоторых ферментов. Фосфонистый аналог аланина (рис. 6, II, R = CH<sub>3</sub>) эффективно превращается под действием PLP-зависимой аланин-аминотрансферазы в фосфонистый аналог пирувата [31, 32], который является необратимым наномолярным ингибитором пируватдегидрогеназы [33]. Проксимальные фосфонистые аналоги аспарагиновой и глутаминовой кислот (рис. 6, II, R = HO(O)CCH<sub>2</sub>- и R = HO(O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- соответственно) превращаются PLP-зависимой аспарат-аминотрансферазой в соответствующие α-кетопосфонистые кислоты [34]. PLP-зависимая тирозин-фенол-лиаза расщепляет фосфонистый аналог тирозина с образованием фосфонистого аналога пирувата [35, 36]. Фосфонистые кислоты оказались субстратами некоторых NAD-зависимых ферментов, например, фосфонистые аналоги пирувата и лактата легко взаимопревращаются под действием лактатдегидрогеназы [31], а полуальдегид фосфонистого аналога янтарной кислоты окисляется до фосфонистого аналога сукцината под действием сукцинил-полуальдегиддегидрогеназы [37]. Фосфонистые аналоги метионина (Met-P<sub>H</sub>, рис. 1) и AdoMet-P<sub>H</sub> (рис. 1) не являются исключением. Еще в ранних работах показали, что Met-P<sub>H</sub> служит субстратом обмена АТФ-PP<sub>i</sub>, катализируемого аминокислот-тРНК-синтетазой [38]. Met-P<sub>H</sub> был субстратом PLP-зависимой Met-γ-лиазы, расщепляясь до фосфонистого аналога α-кетобутирата [39]. Met-P<sub>H</sub>, подобно природному Met, способен индуцировать биосинтез Met-

$\gamma$ -лиазы в клетках *Citrobacter intermedius* [40]. Эти данные свидетельствуют о структурно-функциональном подобии Met- $P_H$  и Met. Наконец, образование AdoMet- $P_H$  в клетках L1210, выращенных в присутствии нетоксичных концентраций Met- $P_H$ , по-видимому, можно рассматривать как одну из причин ингибирования роста этих клеток, поскольку экзогенный AdoMet- $P_H$  был даже несколько эффективнее Met- $P_H$  [15].

В настоящей работе впервые изучена способность фосфонистого (AdoMet- $P_H$ ) и фосфонового (AdoMet- $P_5$ ) аналогов AdoMet служить донорами метильной группы в реакции, катализируемой Dnmt3a. Оказалось, что субстратные свойства этих аналогов не зависят от строения фосфорсодержащего фрагмента молекулы, и оба соединения примерно в 2 раза менее активны, чем природный AdoMet (рис. 3б). AdoHcy- $P_H$  и AdoHcy- $P_5$  (рис. 1) представляют собой аналоги AdoHcy, природного ингибитора метилтрансфераз. Оба фосфоаналога в равной степени ингибировали Dnmt3a, но несколько менее эффективно, чем AdoHcy (рис. 5). Следует отметить, что преинкубация фермента с AdoHcy- $P_H$  или AdoHcy- $P_5$  не влияла на эффективность торможения (данные не приведены), что может указывать на обратимый характер ингибирования фермента. Если сравнивать субстратные свойства аналогов AdoMet и ингибиторную активность аналогов AdoHcy в отношении Dnmt3a и суммарных тРНК-метилтрансфераз *E. coli*, то в последнем случае AdoMet- $P_H$  был на 1–2 порядка активнее AdoMet- $P_5$ , а его сродство к ферменту было таким же, как и у природного AdoMet [14]. Аналогичные закономерности наблюдались и в случае ингибирования тРНК-метилтрансфераз *E. coli* фосфоаналогами AdoHcy [14]. Такие различия между двумя ферментами обусловлены, скорее всего, особенностями связывания субстрата в активных центрах – система связывания метионинового фрагмента AdoMet в активном центре МТаз мало зависит от ионного состояния карбоксильной группы, поскольку метиловый и этиловый эфиры AdoMet все-таки оказываются донорами метильной группы [10].

Изучение взаимодействия AdoMet- $P_H$  с метилтрансферазами важно для создания регуляторов этих ферментов, так как очевидно, что AdoMet- $P_H$  не будет донором метильной группы во всех метилтрансферазных реакциях. Следует отметить, что в клетках L1210, выращенных в присутствии Met- $P_H$ , детектируется AdoMet- $P_H$ , но не AdoHcy- $P_H$  [15]. Можно предположить, что *de novo* синтезированный AdoMet- $P_H$  в присутствии природного AdoMet оказывается малоэффективным субстратом метилтрансфераз. Нельзя исключить, что *de novo* синтезированный AdoMet- $P_H$  может рас-

познаваться клетками L1210 как AdoMet подобно тому, как клетки *C. intermedius* узнают Met- $P_H$  как Met [40]. В пользу такого предположения свидетельствуют и субстратные свойства фосфонистых аналогов аминокислот в отношении соответствующих ферментов метаболизма аминокислот (см. выше), подтверждающие, что фосфонистый остаток можно рассматривать в качестве биозостера НООС-группы. Соответственно, если AdoMet- $P_H$  действительно распознается клетками L1210 как AdoMet, то это может привести к изменению соотношения AdoMet/AdoHcy, критичному для эффективного протекания реакций метилирования, и ингибированию роста клеток.

Способность AdoMet- $P_H$  быть донором метильной группы в реакции метилирования ДНК, катализируемой Dnmt3a, представляет безусловный интерес. В совокупности с описанными выше субстратоподобными превращениями Met- $P_H$ , включая и биосинтез AdoMet- $P_H$  в клетках L1210, формирует базу для использования этого аналога AdoMet в качестве инструмента изучения реакций, катализируемых метилтрансферазами. Химическая и ферментативная устойчивость AdoMet- $P_H$  делает этот аналог удобным в работе, в отличие от AdoMet, недостаточно стабильного в физиологических условиях.

Настоящее исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда проект № 22-24-00368 (исследование образования тройных комплексов методом поляризации флуоресценции) и проект № 22-14-00291 (остальные части работы).

Статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klimasauskas S., Lukinavicius G. (2008) AdoMet-dependent methyltransferases. *Chemistry of Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
2. Mensah I.K., Norvil A.B., AlAbdi L., McGovern S., Petell Ch.J., He M., Gowher H. (2021) Misregulation of the expression and activity of DNA methyltransferases in cancer. *NAR Cancer*. **3**, 1–20.
3. Moore L.D., Le T., Fan G. (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. **38**, 23–38.
4. Jurkowska R.Z., Jurkowski T.P., Jeltsch A. (2011) Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*. **12**, 206–222.
5. Bird A. (1999) DNA methylation *de novo*. *Science*. **286**, 2287–2288.
6. Gros C., Fahy J., Halby L., Dufau I., Erdmann A., Gregorie J.-M., Ausseil F., Vispé S., Arimondo P.B.

- (2012) DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie*. **94**, 2280–2296.
7. Huber T.D., Johnson B.R., Zhang J., Thorson J.S. (2016) AdoMet analog synthesis and utilization: current state of the art. *Curr. Opin. Biotechnol.* **42**, 189–197.
  8. Dalhoff Ch., Lukinavicius G., Klimasauskas S., Weinhold E. (2006) Synthesis of *S*-adenosyl-*L*-methionine analogs and their use for sequence-specific transalkylation of DNA by methyltransferases. *Nat. Protoc.* **1**, 1879–1886.
  9. Klimasauskas S., Weinhold E. (2007) A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases. *Trends Biotechnol.* **25**, 99–104.
  10. Wijayasinghe Y.S., Blumenthal R.M., Viola R.E. (2014) Producing proficient methyl donors from alternative substrates of *S*-adenosylmethionine synthetase. *Biochemistry*. **53**, 1521–1526.
  11. Wu J.C., Santi D.V. (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **262**, 4778–4786.
  12. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X. (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*. **76**, 357–369.
  13. Tomkuvienė M., Kriukienė E., Klimašauskas S. (2016) DNA labeling using DNA methyltransferases. DNA methyltransferases – role and function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **945**, 511–535.
  14. Сырку В.И., Завалова Л.Л., Хомутов Р.М. (1986) Химическое регулирование *S*-аденозилметионинзависимых ферментативных реакций фосфорорганическими аналогами *S*-аденозилметионина и *S*-аденозилгомоцистеина. *Биоорган. химия*. **12**, 839–841.
  15. Хомутов Р.М., Жуков Ю.Н., Хомутов А.Р., Хурс Е.Н., Крамер Д.Л., Миллер Дж.Т., Портер К.В. (2000) Фосфиновый аналог метионина тормозит рост лейкозных клеток L1210 и превращается в фосфиновый аналог *S*-аденозилметионина. *Биоорган. химия*. **26**, 718–720.
  16. Alferov K.V., Zhukov Yu.N., Khurs E.N., Khomutov R.M. (2003) Stable organophosphorus analogues of *S*-adenosylmethionine and *S*-methylmethionine. *Mendeleev Commun.* **13**, 243–244.
  17. Guo X., Söderholm A., Kanchugal P. S., Isaksen G.V., Warsi O., Eckhard U., Trigüis S., Gogoll A., Jerlström-Hultqvist J., Åqvist J., Andersson D.I., Selmer M. (2021) Structure and mechanism of a phage-encoded SAM lyase revises catalytic function of enzyme family. *eLife*. **10**, 1–29.
  18. Жуков Ю.Н., Хомутов А.Р., Осипова Т.И., Хомутов Р.М. (1999) Синтез фосфиновых аналогов серосодержащих аминокислот. *Изв. АН. Сер. хим.* **7**, 1360–1363.
  19. Сергеев А.В., Тевяшова А.Н., Воробьев А.П., Громова Е.С. (2019) Влияние противоопухолевого антибиотика оливомицина А и нового полусинтетического производного, оливамида, на функционирование ДНК-метилтрансферазы мыши Dnmt3a. *Биохимия*. **84**, 229–239.
  20. 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.
  21. Jia D., Jurkowska R.Z., Zhang X., Jeltsch A., Cheng X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for *de novo* DNA methylation. *Nature*. **449**, 248–251.
  22. Chen T., Li E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol.* **60**, 55–89.
  23. Gowher H., Jeltsch A. (2002) Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **277**, 20409–20414.
  24. Okano M., Xie S., Li E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19**, 219–220.
  25. Сергеев А.В., Кирсанова О.В., Лойко А.Г., Номероцкая Е.И., Громова Е.С. (2018) Определение степени метилирования ДНК метилтрансферазой Dnmt3a с использованием метилзависимых эндонуклеаз рестрикции. *Молекуляр. биология*. **52**, 318–325.
  26. Lu S.C., Mato J.M. (2012) *S*-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiol. Rev.* **92**, 1515–1542.
  27. Kafarski P. (2020) Phosphonopeptides containing free phosphonic groups: recent advances. *RSC Adv.* **10**, 25898–25910.
  28. Horsman G.P., Zechel D.L. (2017) Phosphonate biochemistry. *Chem. Rev.* **117**, 5704–5783.
  29. Badet B., Inagaki K., Soda K., Walsh C.T. (1986) Time-dependent inhibition of *Bacillus stearothermophilus* alanine racemase by (1-aminoethyl)phosphonate isomers by isomerization to noncovalent slowly dissociating enzyme-(1-aminoethyl)phosphonate complexes. *Biochemistry*. **25**, 3275–3282.
  30. Steere J.A., Sampson P.B., Honek J.F. (2002) Synthesis of an  $\alpha$ -aminophosphonate nucleoside as an inhibitor of *S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 457–460.
  31. Laber B., Amrhein N. (1987) Metabolism of 1-aminoethylphosphinate generates acetylphosphinate, a potent inhibitor of pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* **248**, 351–358.
  32. Хомутов Р.М., Хурс Е.Н., Джавахия В.Г., Воинова Т.М., Ермолинский Б.С. (1987) 1-Аминоэтилфосфонистая кислота – новый ингибитор поликетидного пути биосинтеза природных соединений. *Биоорган. химия*. **13**, 1422–1424.
  33. Bunik V.I., Artiukhov A., Kazantsev A., Goncalves R., Daloso D., Oppermann H., Kulakovskaya E., Lukashov N., Fernie A., Brand M., Gaunitz F. (2015) Specific inhibition by synthetic analogs of pyruvate reveals that the pyruvate dehydrogenase reaction is essential for metabolism and viability of glioblastoma cells. *Oncotarget*. **6**, 40036–40052.
  34. Хурс Е.Н., Осипова Т.И., Хомутов Р.М. (1989) Ферментативное переаминирование фосфорорганических аналогов аспартата и глутамата. *Биоорган. химия*. **15**, 552–555.
  35. Хомутов Р.М., Фалеев Н.Г., Белянкин А.В., Хурс Е.Н., Хомутов А.Р., Перышкова О.Е., Беликов В.М. (1997) 1-Амино-2-(4-гидроксифенил)этилфосфонистая кислота – новый субстрат тирозин-фенол-лиазы. *Биоорган. химия*. **23**, 919–921.

36. Faleev N.G., Zhukov Yu.N., Khurs E.N., Gogoleva O.I., Barbolina M.V., Bazhulina N.P., Belikov V.M., Demidkina T.V., Khomutov R.M. (2000) Interaction of tyrosine phenol-lyase with phosphoroorganic analogues of substrate amino acids. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6897–6902.
37. De Biase D., Cappadocio F., Pennacchietti E., Giovannercole F., Coluccia A., Vepsäläinen J., Khomutov A. (2020) Enzymatic kinetic resolution of desmethylphosphinothricin indicates that phosphinic group is a bioisostere of carboxyl group. *Commun. Chem.* **3**, 121.
38. Biryukov A.I., Osipova T.I., Khomutov R.M. (1978)  $\alpha$ -Aminophosphonous acids: the substrates of ATP-PPi exchange reaction, catalysed by aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* **91**, 246–248.
39. Faleev N.G., Alferov K.V., Tsvetikova M.A., Morozova E.A., Revtovich S.V., Khurs E.N., Vorob'ev M.M., Phillips R.S., Demidkina T.V., Khomutov R.M. (2009) Methionine  $\gamma$ -lyase: mechanistic deductions from the kinetic pH-effects. The role of the ionic state of a substrate in the enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**, 1414–1420.
40. Alferov K.V., Faleev N.G., Khurs E.N., Zhukov Yu.N., Khomutov R.M. (2002) A phosphinic analogue of methionine is a substrate of *L*-methionine- $\gamma$ -lyase and induces the synthesis of the enzyme in *Citrobacter intermedius* cells. *Mendeleev Commun.* **12**, 2–3.

## Interaction of DNA Methyltransferase Dnmt3a with Phosphorus Analogues of *S*-Adenosylmethionine and *S*-Adenosylhomocysteine

V. L. Filonov<sup>1</sup>, M. A. Khomutov<sup>1</sup>, A. V. Sergeev<sup>2</sup>, A. L. Khandazhinskaya<sup>1</sup>, S. N. Kochetkov<sup>1</sup>, E. S. Gromova<sup>2, \*</sup>, and A. R. Khomutov<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: gromova@genebee.msu.ru

\*\*e-mail: alexkhom@list.ru

Enzymatic methyltransferase reactions are of crucial importance for cellular metabolism, and *S*-adenosyl-*L*-methionine is the main donor of the methyl group. DNA, RNA, proteins, and low-molecular-weight compounds are the substrates of methyltransferases. In mammals, methylation of the C5 position of cytosine residues in CpG sequences in DNA is performed *de novo* by DNA methyltransferase Dnmt3a. “Methylation pattern” is one of the factors determining the epigenetic regulation of gene expression. In the present work, we investigated the interaction of phosphonous and phosphonic analogues of *S*-adenosyl-*L*-methionine and *S*-adenosyl-*L*-homocysteine with the catalytic domain of Dnmt3a. The phosphonous and phosphonic analogs of *S*-adenosyl-*L*-methionine were shown to be substrates of Dnmt3a, and the efficiency of the methylation was only two times less than that of natural *S*-adenosyl-*L*-methionine. Both phosphorus-containing analogs of *S*-adenosyl-*L*-homocysteine, a natural methyltransferase inhibitor, exhibited similar inhibitory activity against Dnmt3a and were approximately four times less active than *S*-adenosyl-*L*-homocysteine. The activities of the phosphonous and phosphonic analogs turned out to be close that was quite unexpected, since the geometry and charge of the phosphorus-containing groups differ significantly. The possibilities of using phosphorus-containing analogs of *S*-adenosyl-*L*-methionine and *S*-adenosyl-*L*-homocysteine as promising tools for the investigation of methyltransferases are discussed.

**Keywords:** DNA methylation, *S*-adenosyl-*L*-methionine, *S*-adenosyl-*L*-homocysteine, organophosphorous analogues, substrates, inhibitors