

УДК 577.085.23

ДИМЕРНЫЕ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛЫ: ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ВЛИЯНИЕ НА МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. М. В. Дарий^{1#}, А. Р. Рахимова^{1#}, В. Н. Ташлицкий¹, С. В. Костюк², Н. Н. Вейко², А. А. Иванов^{3§}, А. Л. Жузе³, Е. С. Громова^{1*}

¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

²Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 14.08.2012 г.

Принята к печати 08.10.2012 г.

В раковых клетках наблюдается гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолей. Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз вызывают реактивацию этих генов, что позволяет рассматривать ДНК-метилтрансферазы как мишени для противораковой терапии. Ранее нами показано, что димерные бисбензимидазолы DB(*n*), различающиеся длиной олигометиленового линкера между двумя бисбензимидазольными фрагментами (*n* – число метиленовых групп в линкере), эффективно ингибируют метилирование ДНК-дуплексов ДНК-метилтрансферазой мыши Dnmt3a. В представленной работе изучена цитотоксичность некоторых из этих соединений, их способность проникать в клетки и их влияние на метилирование геномной ДНК в эмбриональных фибробластах легкого (Ф-977) и клетках рака шейки матки (HeLa). Показано, что в диапазоне концентраций 0–60 мкМ только соединение DB(11) оказывает значительное токсическое действие на нормальные клетки, в случае раковых клеток токсический эффект исследованных DB(*n*) был незначительным. Интересно, что DB(1) в небольшой степени стимулирует пролиферацию HeLa, а DB(3) – пролиферацию Ф-977. Соединения DB(1) и DB(3) проникают в ядра клеток HeLa и Ф-977 и накапливаются преимущественно в ядрышке и/или вблизи ядрышка участков ядра, а DB(11) не способен проникать в ядра этих клеток. В клетках HeLa при инкубировании с 26-мкМ DB(1) или DB(3) снижается уровень метилирования гена 18S рРНК, который находится в районах преимущественного накопления DB(1) и DB(3). Аналогичный эффект вызывает DB(3), в той же концентрации, в клетках Ф-977. Однако общий уровень метилирования геномной ДНК в обоих типах клеток остается без изменений. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования соединений типа DB(*n*) для деметилирования некоторых определенных генов, что представляется перспективным направлением для их разработки как противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: димерные бисбензимидазолы, эмбриональные фибробласты легкого человека Ф-977, клетки рака шейки матки HeLa, цитотоксичность, метилирование ДНК.

DIMERIC BISBENZIMIDAZOLES: CYTOTOXICITY AND EFFECTS ON DNA METHYLATION IN NORMAL AND CANCER HUMAN CELLS, by M. V. Darii¹, A. R. Rakhimova¹, V. N. Tashlitsky¹, S. V. Kostyuk², N. N. Veiko², A. A. Ivanov³, A. L. Zhuze³, E. S. Gromova^{1*} (¹Chemistry Department, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; * e-mail: gromova@genebee.msu.ru; ²Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia; ³Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). Cancer cells are characterized by the hypermethylation of promoter regions of tumor suppressor genes. DNA methyltransferase inhibitors cause re-activation of these genes that allows considering DNA methyltransferases as targets for anticancer therapy. As it was previously shown by us, dimeric bisbenzimidazoles, DB(*n*), differing in length of the oligomethylene linker between the two bisbenzimidazole fragments (*n* – number of methylene groups in linker) effectively inhibit the methylation of DNA duplexes by murine methyltransferase Dnmt3a. Here,

Принятые сокращения: DB(*n*) – димерный бисбензимидазол; m⁵dC – 5-метил-2'-дезоксцитидин; МТаза – С5-цитозин ДНК-метилтрансфераза; МТТ – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид; ДМСО – диметилсульфоксид; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; рДНК – рибосомный повтор.

Вклад этих авторов в работу равнозначен.

§ Место работы в настоящее время – Научно-исследовательский институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва 115478.

* Эл. почта: gromova@genebee.msu.ru

the cytotoxicity of some of these compounds, their penetration into cells and influence on the methylation of genomic DNA in fetal lung fibroblasts line F-977 and cervical cancer cells HeLa have been studied. In the 0–60 μM concentration range, only the DB(11) displayed a significant toxic effect on the normal cells, whereas the effect of DB(*n*) investigated on the cancer cells was not significant. Interestingly, the DB(1) and DB(3) to a small extent stimulate the proliferation of HeLa and F-977 cells, respectively. DB(1) and DB(3) display ability to penetrate into the nucleus of HeLa and F-977 cells and accumulate in various parts of the nuclei. DB(11) is not able to penetrate into the nuclei of these cells. The incubation of F-977 cells with 26 μM of DB(1) or DB(3) led to a decrease of the methylation of 18S rRNA gene, which is located in the region of DB(1) and DB(3) accumulation. A similar effect produces the same concentration of DB(3) in the F-977 cells. However, the overall level of genomic DNA methylation was not changed. These data suggest that DB(*n*) can be directed to act on specific genes demethylation and in the future may selectively inhibit the proliferation of cancer cells.

Keywords: dimeric bisbenzimidazoles, fetal lung fibroblasts F-977, cervical cancer cells HeLa, cytotoxicity, DNA methylation.

DOI: 10.7868/S0026898413020043

Метилирование ДНК — одна из наиболее активно изучаемых в настоящее время эпигенетических модификаций, играющая важную роль в контроле экспрессии генов в клетках эукариот [1]. От статуса метилирования ДНК в клетках эукариот зависят, в частности, регуляция экспрессии генов, геномный импринтинг, поддержание структуры хроматина. В клетках животных и человека метилирование CG-последовательностей в ДНК осуществляют C5-цитозин-ДНК-метилтрансферазы (МТазы) Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b [2]. Метилированные CG-участки располагаются в ДНК определенным образом, формируя профиль метилирования, который создается *de novo* МТазами Dnmt3a и Dnmt3b в процессе эмбриогенеза и копируется после каждого раунда репликации [1]. При некоторых заболеваниях, в том числе при развитии опухолей, наблюдается изменение профиля метилирования. Так, гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолей (большинство этих генов не метилировано в нормальных соматических клетках) приводит к инактивации соответствующих генов [3]. Однако гиперметилирование отдельных генов — это обратимый биологический процесс, что делает ДНК-метилтрансферазы (через их ингибирование) привлекательной мишенью для терапевтического вмешательства. В настоящее время известно несколько ингибиторов ДНК-метилтрансфераз, способствующих снижению уровня метилирования ДНК и реактивации генов-супрессоров опухолей [4–6]. Однако все известные ингибиторы обла-

дают рядом недостатков, к которым относятся высокая цитотоксичность, нестабильность в водных растворах и др [5].

Одними из новых перспективных ингибиторов МТаз считаются димерные бисбензимидазолы серии **DB(*n*)**, связывающиеся с узкой бороздкой ДНК [7, 8]. В этих соединениях бисбензимидазольные фрагменты соединены метиленовыми звеньями, число которых может варьировать: $n = 1–5, 7, 11$ (рис. 1).

Димерные бисбензимидазолы способны эффективно ингибировать ($IC_{50} = 5–78$ мкМ) реакцию метилирования 30-звенных ДНК-дуплексов эукариотической МТазой Dnmt3a, а также прокариотической МТазой M.SssI [8]. Однако на настоящий момент нет сведений о влиянии этих соединений на выживаемость клеток и на метилирование ДНК в клетках живых организмов.

Целью данной работы стало исследование влияния димерных бисбензимидазолов **DB(1)**, **DB(3)** и **DB(11)** на выживаемость и уровень метилирования ДНК в нормальных и раковых клетках человека — эмбриональных фибробластах легкого Ф-997 и клетках рака шейки матки HeLa. Исследовано распределение анализируемых производных в пространстве ядра клетки и обозначены районы, в которых происходит аккумуляция **DB(*n*)**. Определены уровни общего метилирования ДНК и метилирования тех участков генов, которые изначально гиперметилированы и локализируются в районах преимущественного накопле-

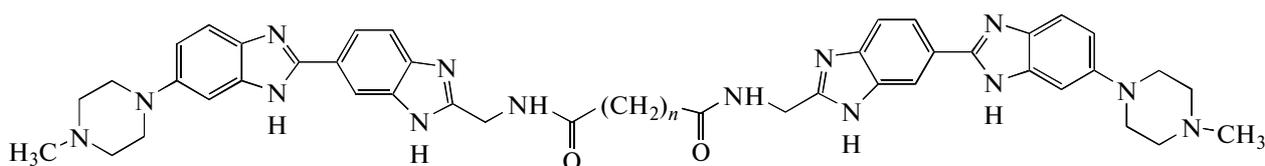


Рис. 1. Общая структурная формула димерных бисбензимидазолов **DB(*n*)**. **DB(1)**, $n = 1$; **DB(3)**, $n = 3$; **DB(11)**, $n = 11$.

ния производных **ДВ(n)** в клетках. Такой последовательностью оказался участок гена 18S рРНК, представляющий собой часть рибосомного повтора (рДНК), который входит в состав ядрышкообразующих районов хромосом. Выбранный для анализа участок (фрагмент гена 18S рРНК) метилирован в наибольшем количестве копий транскрибируемой области рибосомного повтора по сравнению с другими участками этой области [9, 10].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В исследовании использовали среду 199, пенициллин, стрептомицин, гентамицин (“ПанЭко”, Россия), 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) (“Serva”, Германия); трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) (“Merck”, Германия); бромистый этидий (“Fluka”, Швейцария); NaCl, KCl, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 (“Диа-М”, Россия); N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N’-(2-этансульфокислота) (HEPES; “Amresco”, США); диметилсульфоксид (ДМСО; “Pierce”, США). Димерные бисбензимидазолы **ДВ(1)**, **ДВ(3)** и **ДВ(11)** синтезировали по ранее описанной методике [8] и растворяли в ДМСО (концентрация 5.1 мМ). Олигонуклеотиды-праймеры для ПЦР получены от фирмы “Синтол” (Россия). Использованы следующие ферменты: R.MspI, щелочная фосфатаза и РНКазы А (“Fermentas”, Литва), R.NraII (“Promega”, США), нуклеаза Р1 (“Sigma”, США), протеиназа К (“Amresco”, США).

Культивирование клеток. Использовали клеточные линии Ф-977 эмбриональных фибробластов легкого человека и HeLa карциномы шейки матки человека. Клетки выращивали в одноразовых пластиковых слайд-флаконах или 96-луночных планшетах в условиях насыщающей влажности в атмосфере 5%-ного CO_2 . Клетки культивировали на среде 199, которая содержала 20% эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллин (50 ед./мл), стрептомицин (50 мкг/мл), гентамицин (10 мкг/мл), 20 мкМ HEPES, рН 7.4.

МТТ-тест выживаемости клеток в присутствии ДВ(n). Клетки рассеивали на 96-луночные планшеты (7 тыс. клеток/лунку, объем среды в лунке составлял 100 мкл), через 24 ч добавляли раствор **ДВ(n)** с таким расчетом, чтобы содержание ДМСО в лунке не превышало 1%, и культивировали в течение 72 ч. Количество клеток оценивали по методу Горяева. Далее клетки инкубировали в присутствии МТТ (0.25 мг/мл) в течение 1 ч и измеряли поглощение формазана – продукта восстановления МТТ – на планшетном счетчике “EnSpire” (Финляндия). Рассчитывали параметр $(A_1 \times 100\%) / A_0$, где A_0 и A_1 – поглощение формазана

на соответственно в контрольной (не прошедшей обработку) и в **ДВ(n)**-обработанной пробах.

Локализация ДВ(n) в клетках. Клетки Ф-977 и HeLa культивировали в слайд-флаконах с **ДВ(n)** как описано выше. Отделяли от слайд-флаконов предметные стекла, промывали их в теплом (37°C) фосфатно-солевом буфере (PBS) и переносили в свежеприготовленный 3.7%-ный формальдегид. Клетки фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре, дважды промывали в PBS (по 5 мин), добавляли по 10 мкл 20%-ного глицерина, накрывали покровным стеклом и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioplan (“Opton”, Германия). Съемку проводили цифровой камерой RETIGA 2000R (“IMAGING”, Канада), используя для визуализации изображения фильтры возбуждения с максимумом пропускания 300–400 нм и фильтры испускания с максимумом пропускания 400–500 нм.

Выделение геномной ДНК. К клеткам, культивацию которых проводили в 25 см² флаконах (как описано выше), добавляли 1 мл 10%-ного раствора лаурилсаркозината натрия в 0.05 М EDTA (рН 8.0), затем 1 мл воды и РНКазу А до концентрации 75 мкг/мл и инкубировали 45 мин при 37°C; после чего добавляли протеиназу К до концентрации 200 мкг/мл и инкубировали 24 ч при 37°C. Далее дважды проводили экстракцию белков насыщенным раствором фенола, а также смесью фенол-хлороформ (1 : 1). ДНК осаждали равным объемом пропанола-2 в присутствии 2 М раствора ацетата аммония в течение суток при температуре –20°C. Осадок дважды промывали 1 мл 75%-ного этанола, высушивали и растворяли в воде.

Гидролиз геномной ДНК до нуклеозидов и анализ общего содержания 5-метил-2'-дезокситидина с помощью UPLC/MS/MS. 1 мкг геномной ДНК, выделенной из клеток Ф-977 или HeLa, подвергали расщеплению нуклеазой Р1 (2 ед.) в 50 мкл буфера, содержащего 30 мМ NaOAc и 0.1 мМ ZnSO_4 (рН 5.5), в течение 14 ч. Далее к смеси добавляли щелочную фосфатазу (4 ед.) в 100 мкл 50 мМ Трис-НСl (рН 7.8) и инкубировали 4 ч. Для контроля полноты гидролиза наряду с исследуемыми пробами проводили расщепление такого же количества ДНК фага λ . Полученную смесь нуклеозидов анализировали с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии с детекцией методом тандемной квадрупольной масс-спектрометрии (UPLC/MS/MS). Использовали систему, состоящую из жидкостного хроматографа Acquity (“Waters”, США) и тандемного квадрупольного МС-детектора TQD (“Waters”, США). Анализ подвергали 11.2 мкл раствора образца на колонке 0.21 × 5.0 см Acquity HSS T3 (1.8 Мкм) при 35°C и скорости потока 0.5 мл/мин с использованием следующих элюентов: 10 мМ аммония ацетата в воде (рН 7.0) и ацетонитрила по градиентной

программе с MS-детекцией. Основные параметры MS-детектора: позитивный режим электрораспыления (ES+) в рабочем режиме мониторинга множественных реакций заданных ионов; температура источника ионов 120°C, температура испарения 450°C, напряжение на капилляре 1.5 кВ, скорость потока газа (аргон) 0.18 мл/мин. Сбор и обработку данных проводили с помощью программы Masslynks ("Waters", США) и ACD/Spec-Manager ("ACDlabs", Канада). Содержание нуклеозидов в пробе определяли по значению площадей пиков на MRM-хроматограммах отдельных ионов согласно калибровочной кривой, построенной для данного прибора. Процентное содержание m⁵dC согласно данным масс-спектрометрии оценивали, нормируя количество m⁵dC на количество dA в том же образце. dA использовали в качестве внутреннего стандарта ввиду интенсивности и селективности отклика для данного нуклеозидов.

Оценка влияния DB(n) на уровень метилирования гена 18S рРНК. 5 мкг геномной ДНК подвергали расщеплению R.NpaII (3 ед.) или R.MspI (3 ед.) в течение 4 ч при 37°C. Продукты гидролиза осаждали двумя объемами этанола в присутствии 2 М раствора ацетата аммония в течение суток. Осадок высушивали и растворяли в воде. Концентрацию полученных фрагментов ДНК определяли методом флуоресценции на спектрометре LS 55 ("PerkinElmer", Великобритания) с использованием красителя Hoechst 33258. К исследуемым образцам ДНК-фрагментов (по 150 нг) добавляли смесь реагентов для проведения ПЦР-РВ с SYBR Green I ("Синтол", Россия) и праймеры к гену 18S рРНК до концентрации 10 пкМ, объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Чистоту полученных амплифицированных фрагментов определяли по кривым плавления продуктов ПЦР. Проводили ПЦР на приборе StepOnePlus ("AppliedBiosystems", США). Праймеры к гену 18S рРНК:

Ф-праймер 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-CAGACC-3' и

Р-праймер 5'-TGACTCAACACGGGAAACCT-CAC-3';

праймеры к гену актина АКТВ (327 п.н.), используемого в качестве внутреннего стандарта:

Ф-праймер 5'-GCGGGAAATCGTGCGTGA-CATT-3' и

Р-праймер 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTT-TCGTG-3'.

Расчет концентраций исходных ДНК-матриц в каждой пробе (С) проводили по полученным из кривых накопления ПЦР-продукта значениям порогового цикла с помощью калибровки, рассчитанной для данного прибора. Значения С в пробах, полученных после расщепления R.NpaII или R.MspI, нормировали на С в пробах ДНК, не под-

вергшейся расщеплению эндонуклеазами (С^{отн}). Показатель метилирования (М) рассчитывали по формуле $M = C^{отн} (R.NpaII) / C^{отн} (R.MspI)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние DB(n) на выживаемость клеток и на метилирование геномной ДНК исследовали в двух модельных клеточных линиях человека: эмбриональных фибробластах легкого Ф-977, выделенных в качестве нормальных клеток, и клетках рака шейки матки HeLa. Известно, что в клетках HeLa, по сравнению с нормальными клетками, профиль метилирования нарушен — это выражается в гиперметилировании CpG-островков и общем гипометилировании геномной ДНК [11].

Оценка цитотоксичности DB(1), DB(3) и DB(11)

Цитотоксичность исследуемых соединений анализировали, оценивая выживаемость клеток Ф-977 и HeLa после их инкубации в течение трех суток с каждым из DB(n)-производных. Данный промежуток времени наиболее удобен для изучения токсического действия DB(n), так как за это время происходит 2–3 цикла деления клеток, в процессе которого можно выявить влияние DB(n) на клеточные процессы, в том числе на метилирование ДНК. Число живых клеток определяли с помощью МТТ-теста. Предварительно оценивали влияние ДМСО, как растворителя DB(n), на выживаемость (данные не приведены).

Зависимость показателя выживаемости клеток, $(A_i \times 100\%) / A_0$, от концентрации DB(n) в культуральной среде показана на рис. 2. Приведенные значения отражают относительное количество жизнеспособных клеток при их культивировании в присутствии DB(n). Из рис. 2а видно, что токсичность DB(1) по отношению к фибробластам незначительна, а на клетки HeLa это соединение оказывает небольшое стимулирующее действие. Соединение DB(3) проявляет невысокую токсичность по отношению к клеткам HeLa, но стимулирует пролиферативную активность клеток Ф-977 (рис. 2б). Соединение DB(11) практически не влияет на рост клеток HeLa, но оказалось высокотоксичным для Ф-977 (рис. 2в).

Проникновение DB(1), DB(3) и DB(11) в клетки Ф-977 и HeLa

Способность каждого из исследуемых производных бисбензимидазола проникать в ядра клеток оценивали, используя 26 мкМ концентрации DB(1), DB(3) и DB(11). В этом случае наблюдается средний уровень эффектов (токсичность или стимулирование пролиферации) для обоих типов клеток, а содержание ДМСО составляет около 0.5%, что нетоксично для клеток. Клетки инкуби-

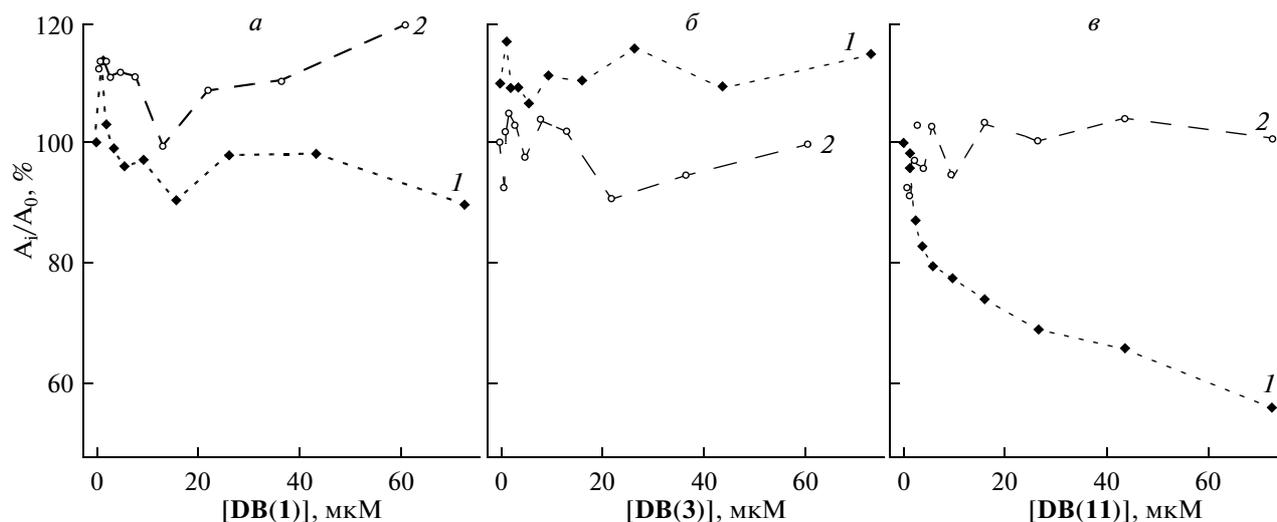


Рис. 2. Зависимость выживаемости клеток Φ -977 (кривая 1) и HeLa (кривая 2) от концентрации $\text{DB}(n)$ в среде культивирования. *a–в* – Выживаемость клеток в присутствии соответственно $\text{DB}(1)$, $\text{DB}(3)$ и $\text{DB}(11)$. Средняя относительная стандартная ошибка составляла $5 \pm 1\%$.

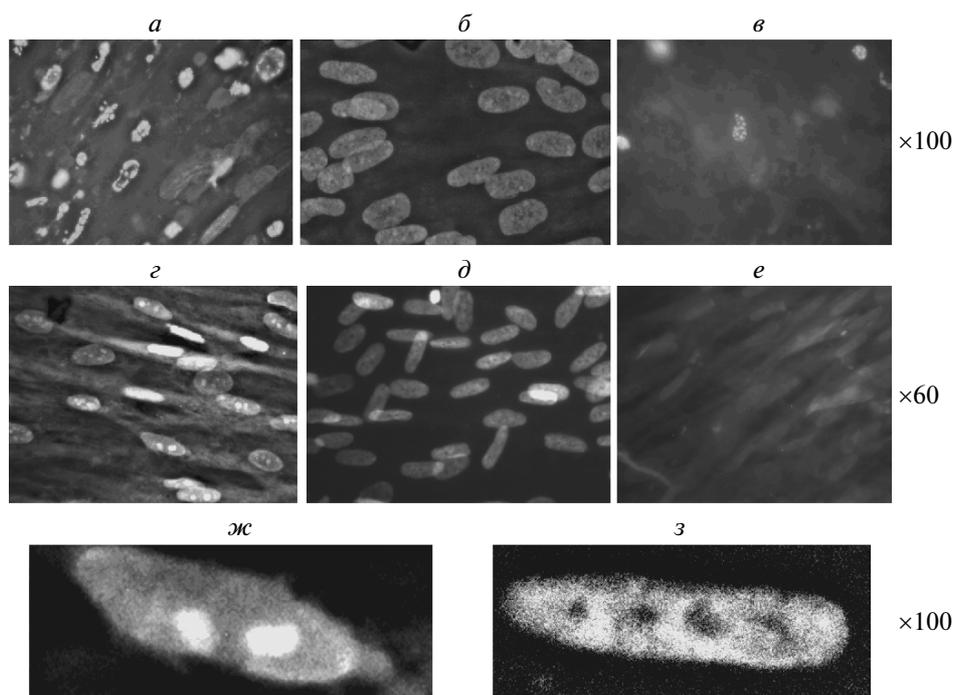


Рис. 3. Проникновение $\text{DB}(n)$ в клетки Φ -977. Клетки инкубировали с соединениями $\text{DB}(1)$ (*a*), $\text{DB}(3)$ (*б*) или $\text{DB}(11)$ (*в*), конечная концентрация которых составляла 26 μM ; и с теми же производными, взятыми в концентрации 10 μM (*з*, *д* или *е* соответственно). Изображения отдельных ядер клеток Φ -977 с локализованными в них $\text{DB}(1)$ (*ж*) и $\text{DB}(3)$ (*з*). Увеличение указано цифрой справа.

рвали с каждым из $\text{DB}(n)$ в течение трех суток, а затем фиксировали с помощью формальдегида и изучали распределение $\text{DB}(n)$ в клетках с помощью флуоресцентной микроскопии.

Клетки Φ -977. Из рис. 3*a* видно, что $\text{DB}(1)$ проникает в клетки Φ -977 и накапливается в тех клетках, которые по морфологическим показателям

(конденсированные участки хроматина и неправильная форма ядра) считаются мертвыми. Соединение $\text{DB}(3)$ проникает в ядра клеток Φ -977 и при этом не влияет на их жизнеспособность (рис. 3*б*). Хотя нами не выявлена способность $\text{DB}(11)$ проникать в ядра клеток Φ -977 (рис. 3*в*), морфология отдельных ядер указывает на его повышенную ток-

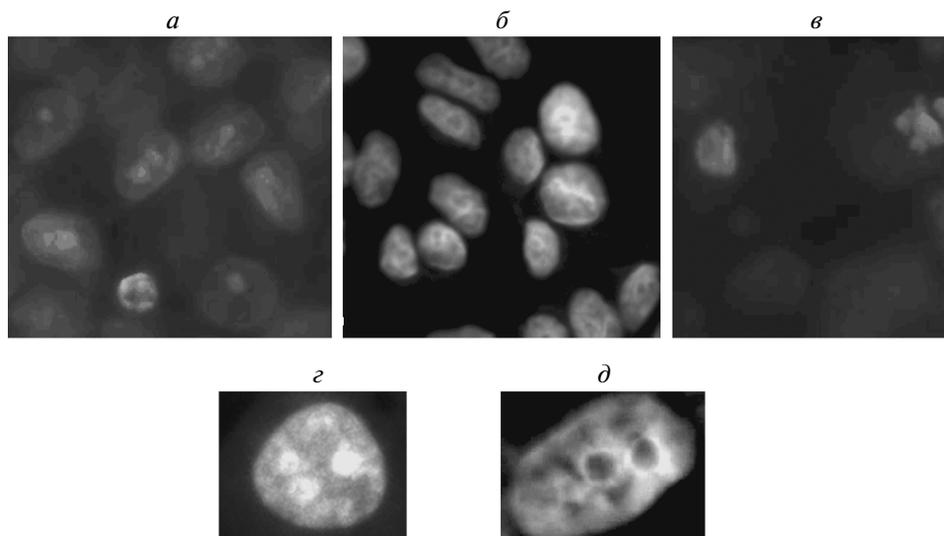


Рис. 4. Проникновение $DB(n)$ в клетки HeLa. $DB(1)$ (а), $DB(3)$ (б) или $DB(11)$ (в); концентрация 26 мкМ; з и д — изображения отдельных ядер клеток HeLa с локализованными в них $DB(1)$ и $DB(3)$ соответственно. Увеличение в 100 раз.

сичность (ярко окрашенный конденсированный хроматин). Можно предположить, что $DB(11)$ сначала вызывает гибель клеток, что сопровождается нарушением клеточной мембраны, и уже затем проникает в ядро.

При снижении концентрации $DB(n)$ до 10 мкМ для $DB(3)$ и $DB(11)$ эффект оставался прежним (рис. 3з–е). Соединение $DB(1)$ в этой концентрации оказалось малотоксичным для клеток Ф-977, сохранив способность проникать в ядра клеток, где распределялось диффузно с преимущественным накоплением в области ядрышек (рис. 3ж). Однако при этом в цитоплазме клеток также наблюдается свечение, что говорит о связывании $DB(1)$ с компонентами цитоплазмы. Соединение $DB(3)$ распределено по ядру неравномерно, преимущественно накапливаясь в участках хроматина, прилегающих к ядрышку (рис. 3з).

Клетки HeLa. Влияние $DB(n)$ на клетки HeLa оказалось несколько иным, чем на фибробласты. Так, $DB(1)$ и $DB(3)$ в концентрации 26 мкМ проникают в ядра клеток HeLa и хорошо окрашивают хроматин, причем схожим образом, не оказывая при этом цитотоксического действия на клетки (рис. 4а, б). Соединение $DB(11)$, как и в случае эмбриональных фибробластов, не проникает в ядра клеток HeLa (рис. 4в). Характер распределения соединений в ядрах живых клеток HeLa аналогичен таковому для Ф-977: $DB(1)$ накапливается в области ядрышка, а $DB(3)$ преимущественно в районах, окружающих ядрышко (рис. 4з, д).

По-видимому, в клетках Ф-977 и HeLa $DB(1)$ и $DB(3)$ окрашивают одни и те же прилегающие к ядрышку области. Но в отличие от $DB(1)$, $DB(3)$ не окрашивает само ядрышко в большинстве клеток. Для выявления более тонких различий в ло-

кализации $DB(1)$ и $DB(3)$ необходимы дополнительные исследования.

Влияние $DB(1)$ и $DB(3)$ на общий уровень метилирования геномной ДНК

Влияние $DB(n)$ на общий уровень метилирования геномной ДНК в клетках HeLa изучали, используя как $DB(3)$, так и $DB(1)$, а в клетках Ф-977 — только с $DB(3)$, так как $DB(1)$ в выбранной концентрации (26 мкМ) токсичен для этих клеток. Клетки инкубировали с 26 мкМ $DB(1)$ или $DB(3)$ в течение трех суток, выделяли геномную ДНК, проводили ее гидролиз до нуклеозидов и определяли процентное содержание m^5dC с помощью UPLC/MS/MS (см. “Экспериментальную часть” и рис. 5). Как видно, процентное содержание m^5dC в обоих типах клеток при обработке $DB(1)$ или $DB(3)$ практически не отличалось от контрольных клеток, что свидетельствует об отсутствии ДНК-деметилирующего эффекта $DB(1)$ и $DB(3)$ в целом.

Влияние $DB(1)$ и $DB(3)$ на метилирование отдельных участков геномной ДНК

Чтобы оценить, меняется ли уровень метилирования отдельных участков геномной ДНК, в качестве последовательности-мишени мы выбрали участок гена 18S рРНК (270 п.н.). Выбор этого фрагмента транскрибируемой области рибосомного повтора обусловлен тем, что именно в месте локализации метилированных копий рДНК в ядре наблюдается аккумуляция соединений $DB(1)$ и $DB(3)$.

Из необработанных клеток и клеток, инкубированных с 26 мкМ $DB(n)$ в течение трех суток,

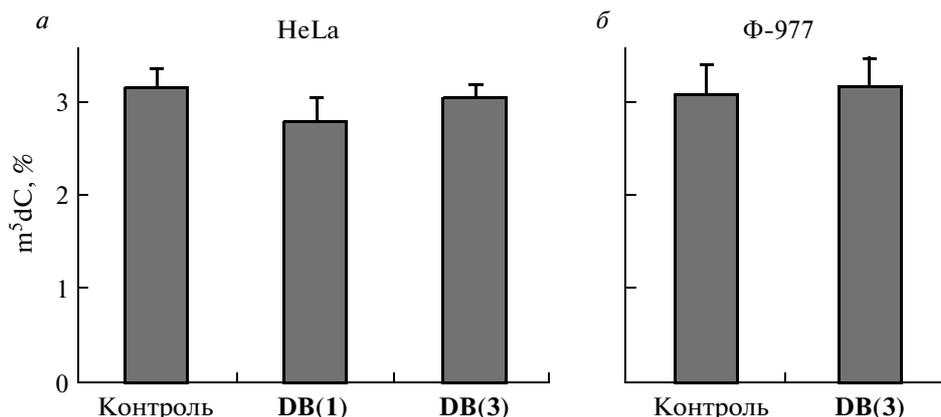


Рис. 5. Влияние **DB(1)** и **DB(3)** на общий уровень метилирования геномной ДНК в клетках HeLa и Φ-977. Содержание m^5dC в геномной ДНК: *a* – клеток HeLa при обработке **DB(1)** или **DB(3)**; *б* – клеток Φ-977 при обработке **DB(3)** – оценивали методом UPLC/MS/MS. Концентрация **DB(n)** 26 мкМ.

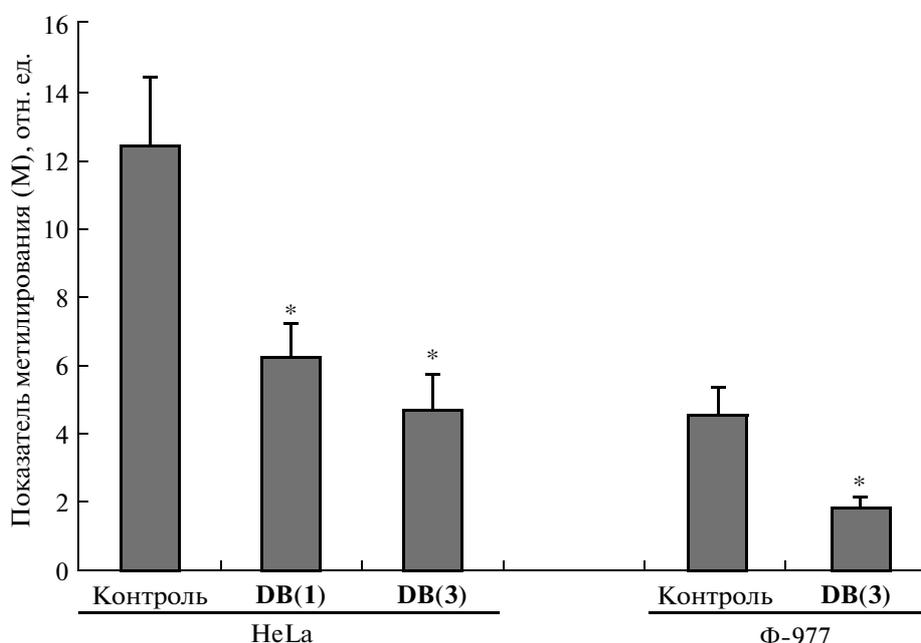


Рис. 6. Влияние **DB(1)** и **DB(3)** на метилирование гена 18S рРНК в клетках HeLa и Φ-977. ДНК обрабатывали чувствительной к метилированию эндонуклеазой R.HpaII или ее изоизомером R.MspI, не чувствительным к метилированию. Реакционные смеси анализировали с помощью ПЦР-РВ. Показатель метилирования М рассчитывали, как описано в “Экспериментальной части”. * – Данные достоверно отличаются от соответствующих контрольных значений ($p < 0.05$; U-тест).

выделяли ДНК и расщепляли чувствительной к метилированию эндонуклеазой R.HpaII (сайт узнавания CCGG) или ее изоизомером, R.MspI, не чувствительным к метилированию. Анализируемый участок рДНК содержит два CCGG-сайта. Если интересующий нас участок ДНК метилирован, он не расщепляется R.HpaII и будет амплифицироваться в ходе ПЦР. С другой стороны, R.MspI расщепляет как метилированную, так и неметилированную ДНК, поэтому в этом случае амплификации исследуемого участка не будет.

Все реакционные смеси анализировали методом ПЦР-РВ.

Показано, что в R.MspI- гидролизатах, даже при избытке фермента в реакционной смеси, в небольшом количестве содержатся продукты амплификации нерасщепленного фрагмента ДНК (данные не приведены). Это может быть обусловлено присутствием в небольшой части копий гена 18S рРНК прочно связанных белков, которые блокируют расщепляемый сайт ДНК, и/или высоким уровнем мутаций (C → T) и перестроек последовательности

в гиперметилированных копиях рДНК [10]. На рис. 6 приведены данные по влиянию **DB(1)** и **DB(3)** на статус метилирования фрагмента гена 18S рРНК в клетках HeLa и Ф-977. Мы ввели показатель метилирования $(M) = C^{\text{отн}}(R.HpaII)/C^{\text{отн}}(R.MspI)$, который отражает соотношение метилированных и неметилированных копий исследуемого гена в геноме клеток. Чем больше этот показатель, тем большее число копий гена содержат метилированные сайты используемых эндонуклеаз рестрикции. Снижение этого показателя говорит о деметилировании последовательности. Видно, что в присутствии **DB(1)** или **DB(3)** показатель метилирования фрагмента гена 18S рРНК в клетках HeLa уменьшается соответственно в 2 и 2.6 раза. В клетках Ф-977 соединение **DB(3)** вызывает снижение M в 2.3 раза. Таким образом, под действием **DB(1)** и **DB(3)** может происходить деметилирование метилированных копий рибосомного повтора человека, в месте локализации которых в ядрах, как раковых, так и нормальных клеток, наблюдается накопление этих соединений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день установлено, что отличительная черта опухолевых клеток — это гиперметилирование CpG-островков в промоторных областях генов-супрессоров опухолей [12]. Использование ингибиторов МТаз с целью реэкспрессии этих генов лежит в основе эпигенетической терапии рака [13]. В настоящее время в качестве противоопухолевых средств получили распространение такие деметилирующие агенты как 5-азациитидин (коммерческое название “Видаза”) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (“Децитабин”) [6]. Это нуклеозидные ингибиторы МТаз, действие которых основано на том, что при замене метилируемого цитозина на эти соединения интермедиат реакции метилирования — ковалентный комплекс МТазы с ДНК — теряет способность к диссоциации и, как следствие, к осуществлению реакции метилирования [5]. Однако нестабильность в водных растворах и токсичность, вызванная встраиванием этих нуклеозидных аналогов в ДНК, снижают возможности их клинического применения [5]. Попытки преодолеть недостатки нуклеозидных ингибиторов привели к поиску низкомолекулярных ненуклеозидных ингибиторов МТаз [5]. Среди них (–)-эпигаллокатехин-3-галлат (полифенол, полученный из зеленого чая) [14], производные 4-аминобензойной кислоты — прокаин и прокаинамид [15, 16], гидралазин [17], а также ингибитор хинолиновой природы SGI-1027 [18]. К недостаткам этих ненуклеозидных ингибиторов относятся их токсичность, неспецифичность действия и высокие эффективные концентрации [5].

Ранее мы сообщали о новом классе синтетических ненуклеозидных ингибиторов МТаз — димерных бисбензимидазолах, способных эффективно ингибировать метилирование модельных 30-звенных ДНК-дуплексов МТазой мыши Dnmt3a [8, 19]. Так, очень эффективными ингибиторами метилирования ДНК оказались димерные бисбензимидазолы **DB(1)** и **DB(3)** — значение IC_{50} для них соответствует 12.5 мкМ и 11.2 мкМ [8].

С целью исследования цитотоксического действия **DB(n)** в данной работе проанализирована выживаемость клеток Ф-977 и HeLa в зависимости от концентрации **DB(1)**, **DB(3)** и **DB(11)** (рис. 2). В исследуемом диапазоне концентраций только соединение **DB(11)** проявляло высокий токсический эффект на нормальные клетки человека. Токсическое действие **DB(1)**, **DB(3)** и **DB(11)** на раковые клетки было незначительным. При более детальном рассмотрении обнаружено, что **DB(1)** оказывает незначительное токсическое действие только на клетки Ф-977. Этот результат подтвержден при визуальном анализе морфологии ядер клеток Ф-977 методом флуоресцентной микроскопии (рис. 3). Соединение **DB(3)** незначительно стимулирует деление нормальных клеток и в некоторой степени подавляет рост раковых. Недавно мы выяснили, что это соединение значительно подавляет рост клеток и другой опухолевой линии клеток MCF-7 (*Н.Н. Вейко и др., неопубликованные данные*).

Усиление пролиферации клеток Ф-977 в присутствии **DB(n)** свидетельствует о том, что исследуемые соединения могут вызывать в клетках адаптивный ответ, направленный на выживание культуры. Наиболее привлекательными в качестве потенциальных лекарственных препаратов представляются соединения, избирательно действующие на клетки опухоли и вызывающие минимальный цитотоксический эффект при действии на нормальные клетки. С этой точки зрения наиболее перспективным следует считать соединение **DB(3)**, которое в нормальных клетках умеренно стимулирует пролиферацию, но токсично по отношению к раковым клеткам.

Исследовав распределение **DB(n)** в живых клетках Ф-977 и HeLa, мы не обнаружили существенных различий между клетками этих двух линий в локализации **DB(1)** и **DB(3)** (рис. 3 и рис. 4). **DB(1)** и **DB(3)** проникают в ядра клеток и распределяются по ядру очень неравномерно, концентрируясь в основном в ядрышке (**DB(1)**) и в областях, непосредственно прилегающих к нему (**DB(1)** и **DB(3)**). Такое распределение может быть вызвано взаимодействием димерных бисбензимидазолов с АТ-богатыми районами гетерохроматина, которые окружают ядрышко [8, 20]. Нельзя также исключить взаимодействия этих соединений с отрицательно заряженными белками ядрышка и рибо-

нуклепротеидными комплексами. Неравномерное накопление **ДВ(n)** в пространстве ядра, вероятно, будет способствовать их избирательному воздействию на разные участки генома. В дальнейшем этот факт можно использовать для направленного действия **ДВ(n)** на конкретные гены, расположенные в определенных областях пространства ядра. Представляется интересным более глубокое исследование локализации исследованных соединений в ядре и более детальный анализ генов, потенциально подверженных воздействию каждого из них.

Соединение **ДВ(11)** оказалось не способным проникать в ядра клеток Φ -977 и HeLa. По-видимому, это обусловлено большим размером гидрофобного линкера, соединяющего бисбензимидазольные фрагменты молекулы **ДВ(11)**, что препятствует свободному прохождению этого соединения через ядерную мембрану. Таким образом, чтобы понять механизм токсического действия **ДВ(11)** на Φ -977, необходимы специальные исследования. Возможно, **ДВ(11)** образует комплексы с ключевыми рецепторами на поверхности мембраны клетки, нарушая нормальную физиологию клетки, что индуцирует клеточную гибель.

Как указано выше, **ДВ(1)** и **ДВ(3)** в концентрации 26 мкМ не оказывают общего деметилирующего действия на геномную ДНК ни в клетках HeLa, ни в клетках Φ -977. Однако отсутствие общего деметилирующего эффекта **ДВ(n)** не исключало возможности их влияния на метилирование отдельных участков генома. Мы выбрали фрагмент транскрибируемой области рибосомного повтора, который локализован в той области ядра, где нами обнаружено накопление **ДВ(1)** и **ДВ(3)** — район ядрышка с прилегающим к нему участком гетерохроматина, и оценили статус метилирования этого фрагмента. Известно, что 300–600 копий рибосомных генов человека состоят, как минимум, из трех фракций: 1) активно транскрибируемой (неметилированной), 2) потенциально активной (неметилированной/гипометилированной) и 3) неактивной (гиперметилированной). Локализация в ядре этих фракций различна. Неметилированные и гипометилированные копии рДНК локализованы в структурах ядрышка. Гиперметилированные копии рибосомных генов локализованы вне структуры ядрышка, в прилегающих к ядрышку районах гетерохроматина [10]. В результате нами показано, что **ДВ(1)** и **ДВ(3)** вызывают снижение уровня метилирования гиперметилированных копий гена 18S рРНК в клетках Φ -977 и HeLa в месте накопления исследуемых **ДВ(n)**.

В целом, наблюдаемые эффекты говорят о том, что димерные бисбензимидазолы в перспективе могут быть использованы для избирательного по-

давления роста клеток опухолей. Возможно, это отчасти обусловлено их влиянием на процесс метилирования ДНК, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения с использованием различных линий опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 12-04-01229а, № 11-04-00589а) и программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21.
2. Hermann A., Gowher H., Jeltsch A. 2004. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2571–2587.
3. Eden A., Gaudet F., Waghmare A., Jaenisch R. 2003. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science.* **300**, 455.
4. Mani S., Herceg Z. 2010. DNA demethylating agents and epigenetic therapy of cancer. *Adv. Genetics.* **70**, 327–340.
5. Кирсанова О.В., Черепанова Н.А., Громова Е.С. 2009. Ингибирование C5-цитозин-ДНК-метилтрансфераз. *Биохимия.* **74**, 1445–1458.
6. Garcia-Manero G. 2008. Demethylating agents in myeloid malignancies. *Curr. Opin. Oncol.* **20**, 705–710.
7. Streltsov S.A., Gromyko A.V., Oleinikov V.A., Zhuze A.L. 2006. The Hoechst 33258 covalent dimer covers a total turn of the double-stranded DNA. *J. Biomol. Struct. Dynamics.* **24**, 285–302.
8. Cherepanova N.A., Ivanov A.A., Maltseva D.V., Minero A.S., Gromyko A.V., Streltsov S.A., Zhuze A.L., Gromova E.S. 2011. Dimeric bisbenzimidazoles inhibit the DNA methylation catalyzed by the murine Dnmt3a catalytic domain. *J. Enzyme Inhibition Med. Chemistry.* **26**, 295–300.
9. Вейко Н.Н., Ляпунова Н.А., Косякова Н.В., Спитковский Д.М. 2001. Элементы структурной организации транскрибируемой области рибосомного повтора (рДНК) в лимфоцитах периферической крови человека. *Молекуляр. биология.* **35**, 52–64.
10. Ляпунова Н.А., Вейко Н.Н. 2010. Рибосомные гены в геноме человека: идентификация четырех фракций, их организация в ядрышке и метафазных хромосомах. *Генетика.* **46**, 1205–1209.
11. Costello J.F., Fruhwald M.C., Smiraglia D.J., Rush L.J., Robertson G.P., Gao X., Wright F.A., Feramisco J.D., Peltomaki P., Lang J.C., Schuller D.E., Yu L., Bloomfield C.D., Caligiuri M.A., Yates A., Nishikawa R., Su Huang H., Petrelli N.J., Zhang X., O’Dorisio M.S., Held W.A., Cavenee W.K., Plass C. 2000. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genetics.* **24**, 132–138.
12. Esteller M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. *Hum. Mol. Genet.* **16. Spec. No. 1**, R50–59.
13. Ren J., Singh B.N., Huang Q., Li Z., Gao Y., Mishra P., Hwa Y.L., Li J., Dowdy S.C., Jiang S.W. 2011. DNA

- hypermethylation as a chemotherapy target. *Cell Signal.* **23**, 1082–1093.
14. Fang M.Z., Wang Y., Ai N., Hou Z., Sun Y., Lu H., Welsh W., Yang C.S. 2003. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* **63**, 7563–7570.
 15. Villar-Garea A., Fraga M.F., Espada J., Esteller M. 2003. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res.* **63**, 4984–4989.
 16. Lee B.H., Yegnasubramanian S., Lin X., Nelson W.G. 2005. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* **280**, 40749–40756.
 17. Segura-Pacheco B., Trejo-Becerril C., Perez-Cardenas E., Taja-Chayeb L., Mariscal I., Chavez A., Acuna C., Salazar A.M., Lizano M., Duenas-Gonzalez A. 2003. Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.: Official J. Am. Ass. Cancer Res.* **9**, 1596–1603.
 18. Datta J., Ghoshal K., Denny W.A., Gamage S.A., Brooke D.G., Phiasivongsa P., Redkar S., Jacob S.T. 2009. A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res.* **69**, 4277–4285.
 19. Иванов А.А., Саяннов В.И., Стрельцов С.А., Черепанова Н.А., Громова Е.С., Жузе А.Л. 2011. Лиганды, специфичные к определенным последовательностям пар оснований ДНК. XIV. Синтез флуоресцентных биологически активных димерных бисбензимидазолов – DB(3,4,5,7, 1). *Биоорганическая химия.* **37**, 530–541.
 20. Petrova N.V., Iarovaia O.V., Verbovoy V.A., Razin S.V. 2005. Specific radial positions of centromeres of human chromosomes X, 1, and 19 remain unchanged in chromatin-depleted nuclei of primary human fibroblasts: evidence for the organizing role of the nuclear matrix. *J. Cell. Biochemistry.* **96**, 850–857.