

**Rozprawa doktorska**

**Beata Patrycja Plitta**

**Nowe inhibitory DNA metylotransferazy**

Promotor: Prof. dr hab. Mirosława Z. Naskręt-Barciszewska

Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Poznań, 2012

*Serdecznie dziękuję  
Pani Prof. dr hab. Mirosławie Z. Naskręt-Barciszewskiej  
za opiekę naukową i okazaną pomoc*

*Panu Prof. dr. hab. Janowi Barciszewskiemu  
składam podziękowania za współpracę i cenne rady*

*Panu Prof. dr. hab. Wojciechowi T. Markiewiczowi  
bardzo dziękuję za współpracę i okazaną pomoc*

*Dziękuję Panu Prof. dr. hab. A. Kraszewskiemu  
oraz pracownikom Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów  
za okazaną życzliwość*

Serdecznie dziękuję

*Pani prof. nadzw. dr hab. Małgorzacie Giel-Pietraszuk,  
za wszystko, czego się od niej nauczyłam*

*Pani prof. nadzw. dr hab. Elizie Wyszko  
za okazaną pomoc*

*dr Ewelinie Adamskiej*

*mgr Agnieszce Belter*

*mgr Mirosławie Skupińskiej*

*koleżankom, dzięki którym wszystkie moje sukcesy były radośniejsze, a porażki mniej gorzkie*

*dr Katarzynie Rolle*

*za wszystkie ważne rozmowy i wsparcie w trudnych chwilach*

*dr Agnieszce Fedoruk-Wyszomirskiej*

*mgr Marcie Gabryelskiej*

*Iwonie Gawrońskiej*

*dr Monice Piweckiej*

*mgr inż. Patrycji Sosińskiej*

*mgr Dariuszowi Wawrzyniakowi*

*oraz wszystkim Pracownikom Zespołu Biosyntezy Białka  
za miłą atmosferę pracy oraz okazaną pomoc i wyrozumiałość*

Szczególne podziękowania składam

*Mojej Mamie*

*Wszystko jest łatwiejsze, gdy ma się wsparcie kochających osób*

*Marcinowi,*

*za ogromną cierpliwość,*

*wiarę we mnie i nieustający doping*

*Alicji i Wojciechowi Zdrojewskim,*

*przyjaciołom, którzy nigdy nie zawodzą i zawsze są blisko*

Spis treści:

<b>1. Wstęp i cel pracy</b>	7
<b>2. Wykaz stosowanych skrótów</b>	10
<b>3. Opracowanie literaturowe</b>	14
3.1. Enzymy metylujące cytozynę w DNA	14
3.2. Mechanizm reakcji metylacji cytozyny	19
3.3. Metylacja cytozyny w DNA	21
3.4. Demetylacja cytozyny	34
3.5. Przyczyny zaburzeń w profilu epigenetycznym	40
3.6. Inhibitory DNMT1	43
3.7. Inhibitory UHRF1	53
3.8. Analiza zależności pomiędzy strukturą i właściwościami fizyko-chemicznymi a aktywnością związków	54
<b>4. Materiały i metody</b>	57
4.1. Wykaz materiałów stosowanych w pracy	57
4.2. Metody rozdziału i analizy oligodeoksyrybonukleotydów	66
4.3. Znakowanie [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP przy końcu 5' DNA	67
4.4. Hodowle bakteryjne	68
4.5. Izolacja plazmidowego DNA z hodowli bakteryjnych	69
4.6. Hydroliza plazmidu enzymami restrykcyjnymi	70
4.7. Reakcja metylacji plazmidowego DNA katalizowana przez prokariotyczną metylotransferazę SssI	70
4.8. Analiza inhibicji ludzkiej DNMT1	75
4.9. Hodowle komórkowe	76
4.10. Analiza poziomu globalnej metylacji	77
4.11. Analiza cytotoksyczności i hamowania proliferacji linii komórkowych przez badane związki niskocząsteczkowe (test MTT)	79
4.12. Test kometkowy	80
4.13. Hybrydyzacja oligodeoksyrybonukleotydów	81
4.14. Przygotowanie testu inhibicji kompleksu SRA-oligoDNA przez związki niskocząsteczkowe	82
<b>5. Wyniki i dyskusja</b>	85

5.1. Reakcja metylacji <i>in vitro</i>	88
5.2. Analiza restrykcyjna DNA metylowanego w obecności inhibitora	114
5.3. Analiza inhibicji ludzkiej DNMT1 w teście kolorymetrycznym ELISA	115
5.4. Analiza cytotoksyczności wybranych pochodnych zasad azotowych	116
5.5. Analiza genotoksyczności wybranych związków za pomocą testu kometkowego	136
5.6. Analiza wpływu związków niskocząsteczkowych na poziom metylacji genomowego DNA	139
5.7. Nadprodukcja domeny SRA i analiza wydajności powstawania kompleksów SRA-dsDNA34AB	141
<b>6. Podsumowanie</b>	149
<b>7. Literatura</b>	151
Załącznik 1	163

## 1. Wstęp i cel pracy

Informacja dotycząca budowy i funkcjonowania organizmu zakodowana jest w DNA. W zależności od typu komórki i aktualnego etapu jej rozwoju, geny ulegają specyficznej ekspresji. Sekwencja genomu w większości komórek danego organizmu jest identyczna (z wyjątkiem limfocytów B i T u ssaków), co oznacza, że ich zróżnicowanie nie jest wynikiem gromadzenia się mutacji w sekwencji DNA. Stwierdzono również, że czynniki transkrypcyjne nie są jedynymi regulatorami tego procesu. Muszą zatem istnieć dodatkowe elementy odgrywające rolę w aktywowaniu i hamowaniu ekspresji genów.

Epigenetyka jest nauką o dziedziczeniu pozagenowym, a głównym przedmiotem jej badań są czynniki regulujące aktywność genów. Tworzą one charakterystyczny dla danego organizmu kod epigenetyczny (epigenom). Jego elementami są kowalencyjne modyfikacje DNA (metylacja DNA) i histonów (acetylacja, metylacja, fosforylacja, ubikwitynacja, sumoilacja, rybozylacja ADP, deaminacja, izomeryzacja proliny itd.) oraz niekodujące RNA.

W przeciwieństwie do genomu, epigenom nie jest identyczny we wszystkich komórkach organizmu. Każdy z ich około 200 typów posiada swój specyficzny epigenom, który może ulegać zmianom w zależności od etapu rozwoju oraz wpływu czynników zewnętrznych.

Jedną z cech komórek nowotworowych są zaburzenia dotyczące modyfikacji epigenetycznych związane z ich redukcją oraz niewłaściwym miejscem lub czasem wprowadzenia. Analiza ich DNA wskazała na obniżenie poziomu globalnej metylacji DNA (hipometylacja) z jednoczesnym podwyższeniem ilości  $m^5C$  w obrębie promotorów regulatorów cyklu komórkowego (hipermetylacja), co prowadzi do wyciszenia ich aktywności. Istotny udział mutacji epigenetycznych (epimutacji), a jednocześnie ich odwracalny charakter (w przeciwieństwie do mutacji genetycznych) sprawiły, że stały się celem poszukiwań związków o potencjalnym znaczeniu w terapii chorób nimi związanych.

Wiedza na temat metylacji DNA, analiza zmian jej wzoru i poziomu oraz skorelowanie tych zjawisk z procesem nowotworzenia, doprowadziły do ukształtowania nowego podejścia w leczeniu i diagnostyce nowotworów.

W przeciwieństwie do obecnie stosowanej chemioterapii, celem terapii

epigenetycznej nie jest wywołanie śmierci komórki, ale odtworzenie prawidłowego wzoru metylacji, a tym samym uruchomienie naturalnych mechanizmów hamujących rozwój nowotworu. Zmusza to do innego niż dotychczas sposobu rozumienia terminu terapia antynowotworowa. Czynniki demetylujące nie powodują szybkiej śmierci komórek nowotworowych, lecz wpływają na wydłużenie cyklu komórkowego wywołane aktywacją sygnałów regulujących. Dlatego uważa się, że terapia epigenetyczna będzie bardziej specyficzna, mniej toksyczna i bardziej efektywna niż standardowa chemioterapia.

Ponad 30 lat temu wykazano, że dwie pochodne cytozyny (5-azacytydina, 2'-deoksy-5-azacytydina) są modulatorami epigenetycznymi i hamują aktywność enzymu metylującego cytozynę w DNA. Są one stosowane w leczeniu, jednak ich efektem ubocznym jest wysoka toksyczność. W związku z tym kontynuowane są badania mające na celu wyselekcjonowanie nowych związków cechujących się wyższym potencjałem terapeutycznym i niższą cytotoxycznością.

Niniejsza rozprawa jest wynikiem prac związanych z poszukiwaniem nowych inhibitorów procesu metylacji DNA.

Realizowałam następujące cele badawcze:

1. Opracowanie warunków reakcji metylacji *in vitro* dla oceny aktywności potencjalnych inhibitorów,
2. Wyznaczenie wartości stałej inhibicji ( $K_i$ ) oraz określenie typu inhibicji badanych związków niskocząsteczkowych,
3. Ocena zależności pomiędzy ich właściwościami fizykochemicznymi a aktywnością inhibitorową,
4. Ocenienie wpływu wyselekcjonowanego inhibitora na aktywność ludzkiej DNMT1,
5. Określenie wpływu wybranych związków na poziom globalnej metylacji DNA w komórkach eukariotycznych,
6. Analiza cytotoxyczności badanych związków w liniach komórkowych,
7. Badanie wpływu wybranych pochodnych cytozyny na aktywność domeny SRA białka UHRF1 (białko towarzyszące DNMT1).



Część zagadnień omawianych w niniejszej pracy zostało opublikowanych:

- Plitta B, Giel-Pietraszuk M, Barciszewski J. (2008) Inhibicja metylotransferazy 1 – cel terapii chorób nowotworowych. *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, tom XX: 225-249.
- Plitta B, Giel-Pietraszuk M, Markiewicz WT, Barciszewski J. (2010) Metylacja cytozyny w DNA i jej znaczenie w terapii przeciwnowotworowej. *Postępy Biochemii*, 57: 24-32.
- Plitta B, Adamska E, Giel-Pietraszuk M, Fedoruk-Wyszomirska A, Naskręt-Barciszewska M, Markiewicz WT, Barciszewski J. (2012) New cytosine derivatives as inhibitors of DNA methylation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.07.024>.

Prezentowane w tej rozprawie wyniki zostały częściowo zawarte w następujących zgłoszeniach patentowych:

- RP 390769; Analog cytozyny, sposób otrzymywania analogu cytozyny, inhibitor DNA metylotransferazy 1, sposób inhibowania metylacji DNA, zastosowanie analogów w leczeniu chorób związanych z odstępstwami od normy metylacji DNA.
- PCT/PL2011/000032; A cytosine analogue, a method of preparation of cytosine analogue, a DNA methyltransferase 1 inhibitor, a method for DNA methylation inhibition, the use of analogue in the treatment of disease associated with deviations from normal DNA methylation.

## 2. Wykaz stosowanych skrótów

- ADMET – parametry farmakokinetyczne: wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, eliminacja, toksyczność (ang. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity*)
- AID – indukowana aktywacją limfocytów B deaminaza cytydyny (ang. *activation-induced cytidine deaminase*)
- AP – miejsce apurynowe, apirymidynowe
- APOBEC – deaminaza cytydyny (ang. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*)
- APS – nadsiarczan amonu
- ATP – adenozyotrójfosforan
- AzaC – 5-azacytydina
- AzadC – 5-aza-2'-deoksycytydina
- BER – naprawa DNA poprzez wycięcie zasady (ang. *base excision repair*)
- Bicyna – N,N-di-(2-hydroksyetylo)-glicyna
- BrEt – bromek etydyny
- C – cytozyna
- *CDKN2B* – gen zależnego od cyklin inhibitora kinaz 2B (białko p15) (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*)
- cpm – ilość rozpadów promieniotwórczych na minutę
- CpG – dinukleotyd cytozyna-guanina
- CXXC – domena palca cynkowego
- Da – dalton, jednostka masy atomowej
- DHAC – 5,6-dihydro-5-azacytydina
- DMAP1 – białko związane z DNMT1 (ang. *DNA methyltransferase 1 associated protein 1*)
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
- *DNMT1* – gen ludzkiej metylotransferazy 1 DNA
- *Dnmt1* – gen mysiej metylotransferazy 1 DNA
- DNMT – metylotransferaza DNA
- dsDNA – dwuniciowy DNA
- DTT – ditiotretiol
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EHMT2 – metylotransferaza lizyny 9 histonu 3 (ang. *histone H3-Lys-9-methyltransferase*)

- *EZH2* – onkogen kodujący białko z grupy białek Polycomb aktywne jako metylotransferaza histonów (ang. *enhancer of zeste homologue 2*)
- FdC – 5-fluoro-2'-deoksycytydina
- FPG – glikozylaza foramidopirymidynowa DNA
- FU – 5-fluorourydyna
- G – guanozyna
- GADD45a – białko hamujące wzrost komórek, indukowane uszkodzeniami DNA (ang. *growth arrest and DNA-damage-inducible 45a*)
- GSH – glutation
- *GSTP1* – gen transferazy S-glutationowej P1
- H – histon
- H4IIE – linia komórkowa pierwotnego nowotworu wątroby szczurów (ang. *rat hepatoma*)
- Ha – atom będący akceptorem wiązania wodorowego
- HCP – promotory o wysokiej ilości powtórzeń dinukleotydu CpG (ang. *high CpG*)
- HCT116 – linia nowotworu okrężnicy (ang. *colon cancer line*)
- HDAC1 – deacetylaza histonów 1 (ang. *histon deacetylase 1*)
- Hd – atom będący donorem wiązania wodorowego
- hESC – ludzkie zarodkowe komórki macierzyste (ang. *human embryonic stem cells*)
- HhaI – prokariotyczna metylotransferaza DNA pochodząca z *Haemophilus haemolyticus*
- hm<sup>5</sup>C – 5-hydroksymetylocytozyna
- HP1 – białko nie-histonowe wchodzące w skład heterochromatyny, wiążące metylowaną lizynę 9 histonu 3 (ang. *heterochromatin protein 1*)
- ICP – promotory o średniej ilości powtórzeń dinukleotydu CpG (ang. *intermediate CpG*)
- iPSC – indukowane pluripotentne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem cells*)
- K – lizyna
- LCP – promotory o niskiej ilości powtórzeń dinukleotydu CpG (ang. *low CpG*)
- LogP – logarytm współczynnika rozdziału P, będącego stosunkiem stężeń danego związku w dwóch niemieszających się rozpuszczalnikach (oktanol/woda) w stanie równowagi
- MBD – białka zawierające domenę wiążącą m<sup>5</sup>C (ang. *methyl binding domain proteins*)
- m<sup>5</sup>C – 5-metylocytozyna
- m<sup>5</sup>dC – 5-metylo-2'-deoksycytydina
- MDS – zespół mielodysplastyczny (ang. *myelodysplastic syndrome*)

- MGMT – metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny (ang. *O6-methylguanine-DNA-methyltransferase*)
- MTT – bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-ylo]-2,5-difenylotetrazolowy
- MW – masa cząsteczkowa (ang. *molecular weight*)
- NER – naprawa DNA poprzez wycięcie nukleotydu (ang. *nucleotide excision repair*)
- NLS – sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*)
- 8-okso-dG – 8-okso-7,8-dihydro- 2’ deoksyguanozyna
- PAA – poliakrylamid
- piRNA – RNA oddziałujące z białkami (ang. *Piwi-interacting RNA*).
- PCNA – antygen jądrowy komórek proliferujących (ang. *proliferating cell nuclear antigen*)
- PGC – komórki prąpciove (ang. *primordial germ cells*)
- PHD – domena wiążąca trimetylowaną lizynę 4 histonu 3 (ang. *plant homeodomain*)
- PMSF – fluorek fenylo-metylosulfonylu
- PRC – kompleks represyjny białek Polycomb (ang. *polycomb repressive complex*)
- pRNA – RNA oddziałujące z promotorami (ang. *promotor-associated-RNA*)
- pz – para zasad
- PWWP – domena białek DNMT3 zawierająca sekwencję prolina-tryptofan-tryptofan-prolina, odpowiadająca za wiązanie z DNA
- Rb – białko retinoblastoma (ang. *retinoblastoma protein*)
- RdDM – metylacja DNA kierowana przez RNA (ang. *RNA directed DNA methylation*)
- RFTS – miejsce wiązania do widełek replikacyjnych (ang. *replication factory targeting sequence*)
- RING – domena zawierająca motyw 3 x cysteina-histydyna-4 x cysteina, wiążący 2 atomu cynku (ang. *really interesting new gene domain*)
- RNaza A – rybonukleaza A
- rpm – obrot na minutę (ang. *rotation per minute*)
- RFT – reaktywne formy tlenu
- SAR – zależność pomiędzy budową a działaniem biologicznym (ang. *structure activity relationship*)
- SAH – S-adenozyl-L-homocysteina
- SAM – S-adenozyl-L-metionina
- SETDB1 – metylotransferaza trójmetylująca lizynę 9 histonu 3 (ang. *SET domain bifurcated 1*)
- SMUG1 – rozpoznająca jednoniciowe DNA glikozylaza uracylu (ang. *single-strand-*

*selective monofunctional U DNA glycosylase 1)*

- SRA – domena białka UHRF1 oddziałująca z m<sup>5</sup>C w DNA (ang. *set and ring-associated*)
- ssDNA – jednoniciowy DNA
- SssI – prokariotyczna metylotransferaza DNA pochodząca ze *Spiroplasma* sp. szczep MQ1
- SUMO – białko podobne do ubikwityny, biorące udział w procesie sumoilacji (ang. *small ubiquitin-related modifier*)
- SUV39H1/2 – metylotransferaza lizyny 9 histonu 3 (ang. *suppressor of variegation 3-9 homologue 1/2*)
- T – tymina
- TEMED – tetrametylenodwuamina
- TET – dioksygenaza metylocytozyny (ang. *ten-eleven translocation*)
- TF – czynnik transkrypcyjny (ang. *transcription factor*)
- TDG – glikozylaza tyminy w DNA (ang. *human T DNA glycosylase*)
- TLC – chromatografia cienkowarstwowa (ang. *thin layer chromatography*)
- TRD – domena rozpoznająca cel (ang. *target-recognition domain*)
- Tris – hydroksymetyloaminometan
- T-DMRs – metylacja specyficzna dla danego typu tkanki (ang. *tissue differential methylation regions*)
- U – jednostka aktywności enzymatycznej
- UHRF1 – białko podobne do ubikwityny posiadające domeny PHD i RING (ang. *ubiquitin-like with PHD and RING finger protein 1*)
- WR – wiązanie rotujące

### 3. Opracowanie literaturowe

#### 3.1. Enzymy metylujące cytozynę w DNA

W komórkach ssaków reakcję metylacji cytozyny w pozycji C5 w DNA katalizują 3 enzymy: DNMT1, DNMT3A i DNMT3B. Można je podzielić na dwie klasy: metylotransferazy przyłączające grupy metylowe *de novo* (DNMT3A i 3B) i metylotransferazę odtwarzającą wzór metylacji po replikacji (DNMT1). Białko pomocnicze DNMT3L o budowie metylotransferazy nie wykazuje aktywności katalitycznej (Cheng i Blumenthal, 2008).

Obecność charakterystycznych dla DNMT motywów aminokwasowych spowodowała, że DNMT2 początkowo przypisywana była do tej grupy enzymów. Białko to katalizuje reakcję przyłączenia grupy metylowej do cytozyny w tRNA, a modyfikacji ulegają zasady w pozycji 38 (pętla antykodonowa) tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Val</sup> i 48 (ramę dodatkowe) tRNA<sup>Asp</sup> (Schaefer i in., 2009; Schaefer i in., 2010). Metylacja cytozyny hamuje hydrolizę tRNA katalizowaną przez endorybonukleazę (angiogeninę), wykazującą podobieństwo do RNazy A. Obecność grupy metylowej wpływa na strukturę pętli antykodonowej ograniczając dostępność tego regionu tRNA dla Dnmt2. Brak aktywności tego enzymu w komórkach *Drosophila* prowadzi w warunkach stresu np. oksydacyjnego czy temperaturowego do powstawania małych RNA pochodzących z tRNA, które mogą pełnić funkcje regulatorowe oddziałując np. z mRNA (Schaefer i in., 2010).

W strukturze DNMT można wyróżnić domenę regulatorową znajdującą się przy końcu N i domenę katalityczną przy końcu C (Xu i in., 2010). Domeny regulatorowe DNMT1, 3A i 3B różnią się wielkością i sekwencją. Są one odpowiedzialne za oddziaływanie z białkami, lokalizację w jądrze oraz rozpoznawanie specyficznych sekwencji DNA (Hermann i in., 2004). Porównanie struktur pierwszorzędowych prokariotycznych i eukariotycznych metylotransferaz DNA, wskazało na podobieństwo charakterystycznych motywów znajdujących się w domenie katalitycznej każdego z enzymów, które stanowią kryterium ich identyfikacji (Lauster i in., 1989; Kumar i in., 1994; Cheng, 1995).

### 3.1.1. DNMT1

Ludzki gen *DNMT1* znajdujący się na chromosomie 19p13.2 koduje białko o masie 183,5 kDa zbudowane z 1616 aminokwasów (Bestor i in., 1988; Bestor, 1988; Yen i in., 1992). Specyficzne tkankowo i gatunkowo różnice w wielkości DNMT1 związane są ze zmianą ramki odczytu i alternatywnym składaniem mRNA. W różnych tkankach ludzkich wykazano obecność 7 alternatywnie złożonych mRNA DNMT1, jednakże nie stwierdzono istnienia białek odpowiadających tym wariantom (Pradhan i in., 1997; Deng i Szyf, 1998; Gaudet i in., 1998; Margot i in., 2000). Wykazano natomiast obecność izoformy DNMT1b dłuższej o 16 aminokwasów w komórkach krwi ludzkiej (Hsu i in., 1999; Bonfils i in., 2000). *Dnmt1* myszy ulega ekspresji w komórkach rozwijającego się zarodka, a powstające białko wykrywane jest w obrębie jądra komórkowego na etapie wczesnej implantacji (Trasler i in., 1996). Natomiast w oocytach i stadiach preimplantacyjnych obserwuje się *Dnmt1* krótszą o 118 aminokwasów (Ratnam i in., 2002), pozbawioną sygnału lokalizacji jądrowej (NLS), która występuje w cytoplazmie w postaci kompleksu z aneksyną V (Howell i in., 2001).

Uważa się, że powodem międzytkankowych różnic we wzorze metylacji jest obecność różnych wariantów DNMT1, rozpoznających dinukleotydy CpG w innych kontekstach sekwencyjnych DNA (Bogdanović i Veenstra, 2009).

W budowie DNMT1 można wyróżnić (Ryc. 1):

- domenę przy końcu N (regulatorową),
- odcinek centralny zawierający 12 powtórzeń Gly-Lys
- domenę przy końcu C (katalityczną) (Bestor, 1988; Bestor, 1992;

Kumar i in., 1994; Ramchandani i in., 1998; Margot i in., 2000). Prawidłowe powielanie wzoru  $m^5C$  wymaga skoordynowania dwóch procesów: replikacji i metylacji. W związku z tym w obrębie domeny regulatorowej znajdują się takie motywy jak: sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) oraz miejsca wiązania białka DMAP1 i jądrowego antygeny komórek proliferujących (PCNA), a także miejsce wiązania do widełek replikacyjnych (RFTS) (Pradhan i Esteve, 2003a).

Znana jest struktura krystaliczna mysiej *Dnmt1* w kompleksie z SAM i SAH skróconej o 290 aminokwasów przy końcu N (Takeshita i in., 2011). Pokazała ona oddziaływania pomiędzy RFTS a domeną katalityczną białka. RFTS „zamyka” tę domenę blokując kieszeń wiążącą DNA. Układ taki jest stabilizowany

dzięki tworzącym się wiązaniom wodorowym oraz oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy ujemnym potencjałem RFTS a dodatnim powierzchni domeny katalitycznej (Takeshita i in., 2011).

W obrębie domeny regulatorowej znajduje się także motyw palca cynkowego typu CXXC (C - cysteina, X – dowolny aminokwas) wiążący DNA oraz 2 miejsca oddziaływania z białkami Rb. Za oddziaływanie z acetylowanymi lizynami histonów odpowiadają 2 tandemowo ułożone domeny BAH. Pomiędzy RFTS a motywem CXXC znajduje się łącznik, który oddziałuje z pętlą PCQ (prolina–cysteina–glutamina) domeny katalitycznej. W połączeniu z umiejscowieniem RFTS w kieszeni katalitycznej prowadzi to do całkowitego zamaskowania miejsca wiążącego DNA w sytuacji braku substratu. Oddziaływanie pomiędzy motywem CXXC a DNA jest niezbędne dla uwolnienia RFTS z centrum katalitycznego (Takeshita, 2011).

Pozbawienie enzymu domeny regulatorowej prowadzi do utraty zdolności rozpoznawania hemimetylowanego DNA, a DNMT1 katalizuje reakcję metylacji tak, jak prokariotyczna metylotransferaza, wykorzystując obie nici DNA (Bestor, 1992). Należy jednak zaznaczyć, że do aktywności katalitycznej potrzebny jest fragment domeny przy końcu N skrócony o 300 pierwszych aminokwasów. Ponadto uważa się, że domena regulatorowa niezbędna jest dla prawidłowego fałdowania się DNMT1 (Zimmermann i in., 1997).

W obrębie domeny przy końcu N DNMT1 znajdują się miejsca oddziaływania z DNMT3A i 3B oraz motyw wiążący białko UHRF1 (Pradhan i Esteve, 2003a,b; Takeshita, 2011).

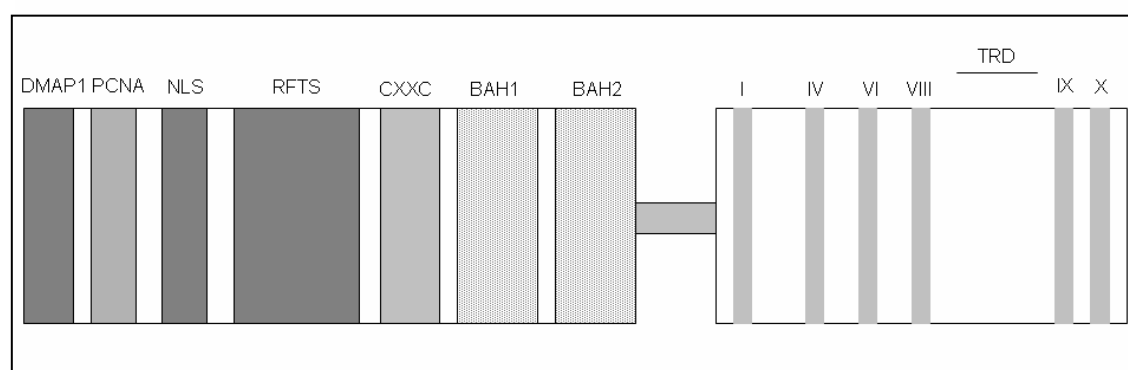
Obie domeny enzymu połączone są polipetydem bogatym w aminokwasy Lys-Gly (lizyna-glicyna; reszty 1112-1124). Podobną sekwencję zaobserwowano przy końcu aminowym histonu H4. Jest ona prawdopodobnym miejscem modyfikacji potranslacyjnej (Goll i Bestor, 2005; Takeshita, 2011).

Model budowy domeny katalitycznej DNMT1 opracowany został na podstawie struktury krystalograficznej enzymu *HhaI* (Kumar i in., 1994). Potwierdzono go dzięki rozwiązaniu struktury krystalograficznej mysiej *Dnmt1* (Takeshita i in., 2011). Domena ta zbudowana jest z ok. 500 aminokwasów. W jej obrębie wyróżnia się 10 charakterystycznych motywów, z czego 6 jest wysoce zachowawczych i bierze udział w aktywności katalitycznej (Zangi i in., 2010). Wśród nich motywy I i X tworzą miejsce wiązania kofaktora - S-adenozyl-L-metioniny. W obrębie motywu IV w sekwencji Pro-



Cys-Gln (prolina-cysteina-glutamina) znajduje się cysteina, posiadająca grupę tiolową, poprzez którą następuje atak nukleofilowy na węgiel 6 pierścienia cytozyny. W motywie VI znajduje się reszta kwasu glutaminowego (motyw glutaminian-asparagina-walina), która jest donorem protonu dla azotu N3 cytozyny. Natomiast motyw IX utrzymuje strukturę miejsca wiązania substratu (Kumar i in., 1994; Takeshita i in., 2011).

W przeciwieństwie do prokariotycznych metylotransferaz (np. *HhaI*), domena TRD DNMT1 jest większa. W momencie związania nici DNA w centrum aktywnym, dochodzi do oddziaływań dwóch reszt tryptofanu (W1500 i W1512) znajdujących się w obrębie TRD z metylowaną nicią znajdującą się po drugiej stronie helisy (Takeshita i in., 2011).



**Rycina 1.** Budowa DNMT1. Domeny przy końcach C i N połączone są 12 aminokwasowym łącznikiem. I, IV, VI, VIII, IX, X - motywy domeny katalitycznej cechujące się największą zachowawczością (Pradhan i Esteve, 2003a; Song i in., 2011; Takeshita i in., 2011).

### 3.1.2. Rodzina DNMT3

W skład rodziny DNMT3 wchodzi dwa enzymy: DNMT3A i DNMT3B oraz białko pomocnicze DNMT3L (Xu i in., 2010). Geny obu enzymów ulegają ekspresji przede wszystkim (lecz nie wyłącznie) na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego oraz w komórkach germinalnych. Natomiast ekspresja *DNMT3L* zachodzi tylko podczas wymienionych etapów (Xu i in., 2010; Sharma i in., 2011). DNMT3A i 3B ustanawiają wzór metylacji *de novo* (Xu i in., 2010), jednak w komórkach germinalnych DNMT3A wraz z DNMT3L (a nie DNMT3B) biorą udział w metylacji *de novo loci* mających ulec piętnowaniu (Okano i in., 1999; Chen i Riggs, 2011).

Geny kodujące DNMT3A i 3B leżące odpowiednio na chromosomie 2p23 i

20q11.2 (Robertson, 2002). mRNA *DNMT3A* i *DNMT3B* u człowieka ma wielkość odpowiednio 4,3 i 4,4 kpz, a powstające z nich produkty białkowe składają się z 912 i 853 aminokwasów (Xu i in., 2010). Obserwowane są 4 tkankowo specyficzne warianty splicingowe *DNMT3A* (Xu i in., 2010). Na przykład *DNMT3A* ulega ekspresji w embrionach oraz w wielu tkankach dorosłych organizmów, podczas gdy *DNMT3A2* występuje głównie w zarodku oraz jądrach, jajnikach, śledzionie i grasicy (Xu i in., 2010).

*DNMT3B* ma 6 tkankowo specyficznych wariantów splicingowych. Tworzą one 2 grupy. Pierwsza cechuje się stałą aktywnością katalityczną, druga to białka nieaktywne (w testach *in vitro*) (Xu i in., 2010).

Mimo intensywnych badań nie wiadomo, jakie funkcje spełniają poszczególne warianty splicingowe i czy związane są z modyfikowaniem cytozyny w różnych kontekstach sekwencyjnych (Xu i in., 2010).

Tak jak w przypadku *DNMT1*, w budowie *DNMT3A* i *3B* można wyróżnić domenę regulatorową i katalityczną. W przeciwieństwie do domen przy końcach N, części katalityczne obu białek cechuje duże podobieństwo (w 84%) (Goll i Bestor, 2005; Xu i in., 2010). W odróżnieniu od *DNMT1* domeny katalityczne białek z rodziny *DNMT3* są aktywne po usunięciu domen regulatorowych (Gowher i Jeltsch, 2002).

Gen *DNMT3L* zlokalizowany jest na chromosomie 21q22.3, a jego ekspresja zachodzi przede wszystkim podczas gametogenezy, w czasie piętnowania genomowego (Aapola i in., 2000). Nie można rozróżnić fenotypu myszy *Dnmt3L*<sup>-/-</sup> od tego z nieaktywnym *Dnmt3A*. Oba fenotypy cechowały się zmienionymi wzorami metylacji w komórkach germinalnych oraz rozproszonymi retrotranspozonomami. Świadczy to o istotnej funkcji *DNMT3L* w procesie wprowadzania wzoru metylacji i konieczności oddziaływań między tym białkiem a *DNMT3A* w czasie piętnowania genomowego w komórkach germinalnych. *DNMT3L* wpływa na aktywność *DNMT3A* stabilizując konformację pętli aktywnej oraz podnosząc wydajność związania SAM (Jia i in., 2007; Cheng i Blumenthal, 2008).

### 3.1.3. Modyfikacje potranslacyjne DNMT

DNA metylotransferazy ulegają licznym kowalencyjnym modyfikacjom potranslacyjnym (PTS), które wpływają na ich funkcjonowanie oraz oddziaływanie z innymi białkami.

Sumoilacja DNMT1 oraz DNMT3A i 3B prawdopodobnie wpływa na oddziaływanie z białkami HDAC (Denis i in., 2011). Metylacja reszty lizyny 1094 w DNMT1 jest sygnałem do degradacji tego białka przez proteasom. Regulując ilość enzymu wpływa ona na globalny poziom metylacji (Denis i in., 2011). Natomiast fosforylacja DNMT1 aktywuje bądź hamuje oddziaływania białko-białko i wpływa na wiązanie do DNA (Denis i in., 2011). Modyfikacji tej ulega seryna 515 znajdująca się w obrębie domeny przy końcu N w motywie RFTS. Jest ona prawdopodobnie niezbędna dla oddziaływania pomiędzy domenami regulatorową i katalityczną, co jest konieczne dla aktywności enzymatycznej białka (Goyal i in., 2007). Zidentyfikowano kinazę CDKL5 fosforylującą DNMT1 przy końcu N (Kameshita i in., 2008), jednak znaczenie tej modyfikacji nie jest jasne. Wiadomo natomiast, że aktywność DNMT1 jest hamowana przez fosforylację seryny 146 katalizowaną przez kinazę kazeinową 1delta/epsilon (Sugiyama i in., 2010). Obserwowane są także modyfikacje reszt serynowych 127 i 143 przez kinazy PKC i AKT, które mogą wpływać na stabilność DNMT1 (Esteve i in., 2011; Denis i in., 2011). Fosforylacja tych reszt aminokwasowych hamuje oddziaływanie DNMT1 z PCNA i UHRF1, które niezbędne są dla prawidłowego przebiegu procesu kopiowania wzoru metylacji (Denis i in., 2011).

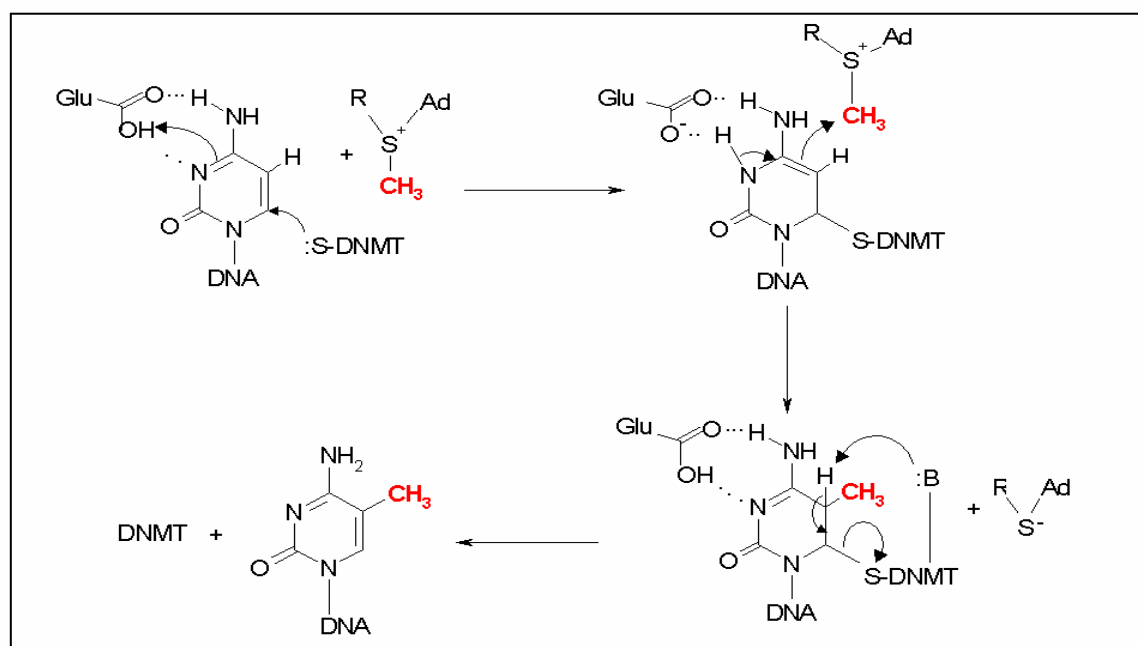
### 3.2. Mechanizm reakcji metylacji cytozyny

DNMT katalizują reakcję przyłączenia grupy metylowej pochodzącej z donora – S-adenozyl-L-metioniny do węgla 5 cytozyny (Ryc. 2). W pierwszym etapie następuje wiązanie SAM do DNMT1, a następnie tworzy się kompleks z DNA. Ta kolejność zdarzeń różni się od mechanizmu metylacji katalizowanej przez prokariotyczną *HhaI*, gdzie najpierw dochodzi do wiązania DNA do enzymu, co powoduje przemieszczenie pętli katalitycznej zawierającej motyw IV i skierowanie cysteiny (Cys81) do miejsca aktywnego.

Utworzenie kompleksu DNMT1 - SAM powoduje zmianę pozycji cysteiny

katalitycznej (Cys 1229) i ustawienie jej w pobliżu mającej ulec metylacji cytozyny. Następnie w wyniku oddziaływania DNA z motywem CXXC dochodzi do zmian konformacyjnych, prowadzących do usunięcia motywu RFTS z kieszeni katalitycznej (Takeshita i in., 2011).

Przemieszczenie cytozyny na zewnątrz helisy wiąże się z zerwaniem oddziaływań warstwowych pomiędzy pierścieniami zasad w helisie DNA oraz zmianą położenia atomów fosforu o 4Å w stosunku do pozycji wyjściowej (Cheng, 1995; Ramchandani i in., 1998; Takeshita i in., 2011). Ponieważ węgiel C5 w pierścieniu cytozyny jest słabym nukleofilem i nie może oddziaływać z elektrofilowym donorem grup metylowych, dochodzi do ataku nukleofilowej grupy tiolanowej (:S) enzymu na węgiel C6. Prowadzi to do przeniesienia elektronów na węgiel C5 i jego aktywację. Tiolan powstaje w wyniku odciążenia protonu przez ujemnie naładowaną grupę fosforanową DNA, a następnie przeniesienia go na cząsteczkę wody (Zangi i in., 2010).



**Rycina 2.** Mechanizm metylacji cytozyny w DNA. W wyniku oddziaływania cytozyny z resztą Glu motywu VI (ENV) następuje protonacja atomu N3 i powstanie 4,5-enaminy. Następnie dochodzi do ataku grupy tiolanowej (:S) cysteiny na atom C6 w pierścieniu cytozyny. Powoduje to wzrost nukleofilowości w wyniku delokalizacji elektronów i aktywację węgla w pozycji 5, a następnie jego atak na grupę metylową S-adenozyl-L-metioniny. Produktami powstającymi po przyłączeniu grupy metylowej do C5 są  $m^5C$  i SAH. Ostatnim etapem jest uwolnienie  $m^5C$  oraz enzymu poprzez odtworzenie podwójnego wiązania pomiędzy C5 i C6 w cytozynie na drodze  $\beta$ -eliminacji. Akceptorem wodoru jest zasada (B), prawdopodobnie reszta argininy motywu VIII lub odchodząca grupa tiolanowa lub grupa fosfodiostrowa. Ad – adenozylna (Wu i Santi, 1987; Cheng, 1995; Szyf, 2000; Gowher i Jeltsch, 2004; Zangi i in., 2010; Takeshita i in., 2011).

### 3.3. Metylacja cytozyny w DNA

#### 3.3.1. Znaczenie metylacji

Metylacja DNA odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji genów. Związana jest z piętnowaniem genomowym, inaktywacją chromosomu X i powstawaniem dymorfizmu płciowego, wyciszaniem sekwencji retrotranspozonowych, naprawą DNA oraz regulacją cyklu komórkowego, a także z nowotworzeniem (Fujita i in., 1999; Hendrich i in., 1999; Goll i Bestor, 2005; Yoo i Jones, 2006). Najwyższy poziom metylacji obserwuje się w niezróżnicowanych komórkach macierzystych hESC (Laurent i in., 2010).

Metylacja cytozyny jest modyfikacją dziedziczną, przekazywaną na drodze mejozy do kolejnego pokolenia, przy czym ten rodzaj dziedziczenie nie podlega prawom Mendla (Migicovsky i Kovalchuk, 2011). Oznacza to, że efekt, jaki wywołuje otaczające środowisko w krytycznych okresach rozwoju organizmu (ciąża) może mieć długoterminowe konsekwencje, ponieważ zmiany we wzorze metylacji mogą być przekazywane między pokoleniami (Mitchell i in., 2011).

Modyfikacje epigenetyczne, w tym metylacja, mogą być także przekazywane między komórkami somatycznymi na drodze podziałów mitotycznych (Mitchell i in., 2011).

Metylacja cytozyny w DNA związana jest z długoterminowym (lecz nie trwałym) wyciszaniem aktywności genów (Zilberman, 2007). Istnieją jednak szczególne wyjątki od tej reguły, ponieważ obserwuje się także dynamiczne zmiany we wzorze metylacji w obrębie promotorów genów aktywnych transkrypcyjnie. Początkowo niemetylowany promotor genu pS2 podlegał dwukrotnie procesom metylacji i demetylacji w czasie 3 godzin w komórkach nowotworu piersi traktowanych doksorubicyną. Podobny wynik uzyskano dla promotorów genów ER $\alpha$ , TFF3, GRM4 i KCNJ8 (Kangaspeska i in., 2008). Pomimo tego odstępstwa metylacja DNA jest długoterminową modyfikacją epigenetyczną, w przeciwieństwie do modyfikacji histonów uznawanych za krótkoterminowe (Wu i Zhang, 2010).

Postuluje się, że funkcją metylacji nie jest hamowanie ekspresji genu *per se*, ale przywracanie stanu wyciszenia poprzez inicjowanie zdefiniowanej sekwencji wielu zdarzeń, takich jak m.in. związanie białek MBD, rekrutacja deacetylaz i

metylotransferaz histonów oraz białek HP1. Wyjaśnia to, dlaczego metylacja w obrębie promotorów jest obecna tylko w przypadku wyciszenia długoterminowego (Raynal i in., 2012).

W wyciszenie ekspresji genu za pomocą metylacji zaangażowane są dwa mechanizmy. Pierwszy zakłada, że obecność grupy metylowej stanowi bezpośrednią blokadę przeciwdziałającą wiązaniu czynników transkrypcyjnych do promotora genu. Niektóre czynniki transkrypcyjne (TF) jak Sp1 są wrażliwe na metylację, ale nie wszystkie TF mają miejsca metylacji w obrębie sekwencji, do których się wiążą. Wówczas metylacja nie wpływa na ich aktywność (Pelizzola i in., 2009; Pelizzola i Ecker, 2011).

Drugi mechanizm zakłada wiązanie białek MBD do grup metylowych, a następnie oddziaływanie z deacetylazami histonów, co indukuje kondensację chromatyny (Lan i in., 2010). Wśród białek MBD 5 cechuje się homologią w obrębie domen wiążących metylowane CpG (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4), natomiast trzy z rodziny Kaiso (Kaiso, ZBTB4, ZBTB38) oddziałują z metylovanym DNA za pomocą motywu palca cynkowego (Bogdanović i Veenstra, 2009).

### **3.3.2. Metylacja CpG**

Metylacja cytozyny jest jedyną dziedziczną modyfikacją występującą w eukariotycznym genomie polegającą na utworzeniu kowalencyjnego wiązania węgiel-węgiel. Z jednej strony jest ona stabilna i może być dziedziczona, z drugiej wzór metylacji genomu podlega dynamicznym zmianom w czasie życia organizmu i jest podatny na wpływy środowiska zewnętrznego (Pelizzola i Ecker, 2011).

$m^5C$  jest obecna w genomach wszystkich kręgowców i roślin kwitnących, a jej całkowita ilość w genomie ssaków wynosi ~1% wszystkich nukleozydów. Oznacza to, że ok. 5% wszystkich cytozyn ulega metylacji. Zatem większość z nich występuje w genomie w formie niezmetylowanej (ok. 95%) (Goll i Bestor, 2005; Laurent i in., 2010). Metylacji ulegają symetryczne sekwencje CpG : GpC, których ilość w genomie ludzkim wynosi 27639 (Maunakea i in., 2010) i ze względu na częstą tranzycję  $m^5C$  do tyminy jest mniejsza od statystycznie szacowanej o ok. 20% (Bird, 1986; Zilberman, 2007). CpG nie są równomiernie rozmieszczone w genomie. Skumulowane są w odcinkach o długości 0,5-4 kpz zawierających 60-70% tego dinukleotydu zwanych z wyspami CpG

(Jones i Baylin, 2002; Siedlecki i Zielenkiewicz, 2006).

Metylacji ulega 70-80% wszystkich CpG. Ilość m<sup>5</sup>C jest zróżnicowana w obrębie chromosomów. Najbardziej zmetylowane są chromosomy 16, 17, 19 i 22, co związane jest z większą ilością genów (Laurent i in., 2010).

### 3.3.3. Metylacja sekwencji niesymetrycznych

Analiza ludzkiego metylomu wykazała, że oprócz dinukleotydów CpG metylacji ulegają także sekwencje niesymetryczne CpNpG i CpNpN, gdzie N oznacza adeninę, cytozynę lub tyminę. W zarodkowych komórkach macierzystych 20-25% wszystkich zmetylowanych cytozyn znajduje się w obrębie tych sekwencji (Lister i in., 2009). Najczęściej spotykanym zmetylowanym dinukleotydem nie-CpG jest CpA, a wzrost poziomu jego metylacji obserwuje się w genach kodujących białka związane z dojrzewaniem RNA i jego udziałem w procesach metabolicznych (Lister i in., 2009; Laurent i in., 2010). CpA nie ulega metylacji w sposób przypadkowy. W promotorach genów aktywnych transkrypcyjnie (niezależnie od obecności CpG) widoczna jest hipometylacja tych dinukleotydów. Natomiast w obrębie genu ilość m<sup>5</sup>CpA wzrasta (Laurent i in., 2010).

Ponieważ m<sup>5</sup>CpA nie jest sekwencją palindromową jak CpG, wydaje się, że poreplikacyjne odbudowywanie tego typu metylacji jest niemożliwe. Prawdopodobnie za metylowanie cytozyn w sekwencjach CpNpG i CpNpN, w tym także CpA, muszą odpowiadać białka z grupy DNMT3 (Laurent i in., 2010). Zauważono, że w komórkach macierzystych ekspresja DNMT3A i 3B jest wyższa w porównaniu z komórkami zróżnicowanymi (Laurent i in., 2010). Różnicowanie się zarodkowych komórek macierzystych prowadzi do częściowej utraty metylacji CpNpG i CpNpN. Zauważono jednak, że ulega ona odtworzeniu w indukowanych pluripotentnych komórkach macierzystych (iPSC). Sugeruje to, że metylacja tego typu może być cechą charakterystyczną komórek macierzystych i pełni rolę w utrzymywaniu stanu pluripotencji oraz zapobiega starzeniu się i śmierci komórek (Cheng i Blumenthal, 2008; Lister i in., 2009).

### 3.3.4. Metylacja rejonów promotorowych

Okolo 70% wszystkich ludzkich genów posiada w obrębie promotorów wyspy CpG (Saxonow i in., 2006), które można podzielić na 3 klasy różniące się zawartością tego dinukleotydu (Ryc. 3).

Pierwszy typ to promotory CpG o niskiej zawartości miejsc metylacji (LCG) (Brenet i in., 2011). Analiza DNA komórek fibroblastów wykazała, że promotory tego typu w 42% były hipermetylowane. Jednakże zaobserwowano brak korelacji pomiędzy ilością m<sup>5</sup>C a aktywnością genu. Poziom metylacji dla genów aktywnych i nieaktywnych był zbliżony. Zatem dla wyciszenia aktywności genu istotne jest nie tylko pojawienie się m<sup>5</sup>C, ale „gęstość” w jakiej ta zasada występuje. Powstaje pytanie, dlaczego wyspy CpG pozostają niezmetylowane i ten status nie zmienia się nawet po wielu podziałach? Doświadczenia wykorzystujące egzogenną metylotransferazę SssI pokazały, że wyspy CpG potencjalnie mogą ulec metylacji i nie obserwuje się blokowania wiązania metylotransferazy do sekwencji DNA. Gdyby na terenie komórki były „wolne” metylotransferazy to wyspy CpG uległyby metylacji *de novo*. Oznacza to, że metylotransferazy ulegają sekwestracji i kompartmentacji, co reguluje ich aktywność na terenie jądra komórkowego (Jones i Liang, 2009).

Drugi typ stanowią promotory CpG o średniej zawartości powtórzeń tego dinukleotydu (ICG). Natomiast trzeci to sekwencje o wysokiej zawartości CpG (HCG), które charakteryzują się niskim poziomem metylacji nawet w końcowo różnicowanych komórkach. Występują one między innymi w genach ulegających stałej transkrypcji (Enlago i Yi, 2008).

Związek pomiędzy aktywnością genu a metylacją jego promotora nie jest do końca oczywisty. Istnieje różnica w częstotliwości metylacji nieaktywnych promotorów ICP i HCP (Ryc. 4). 75% HCP jest niezmetylowanych, podczas gdy 33% ICP ulega hipermetylacji. HCP pozostają niezmetylowane nawet jeśli geny są nieaktywne, natomiast nieaktywne ICP są częściej zmetylowane, co może sugerować że ulegają metylacji *de novo* (Weber i in., 2007). Jest to zgodne ze wcześniejszymi doniesieniami, które wskazywały, że większość wysp CpG w obrębie promotorów jest niezmetylowanych, nawet jeśli dany gen nie ulega ekspresji w tkance (Bird, 2002). Może być to związane z obecnością w obrębie hipometylowanych wysp nieaktywnych genów znacznika w postaci dimetylowanej lizyny histonu 3 (H3K4). Jest on związany z



aktywną chromatyną i prawdopodobnie zapobiega metylacji (Weber i in., 2007).

Przykładem genu aktywnego, metylowanego w obrębie promotora jest onkogen *TWIST* kodujący czynnik transkrypcyjny o właściwościach antyapoptotycznych i prometastatycznych. Obecność  $m^5C$  nie powoduje jego wyciszenia i nie obniża ekspresji ani w komórkach zdrowych, ani w komórkach raka piersi (Gort i in., 2008).

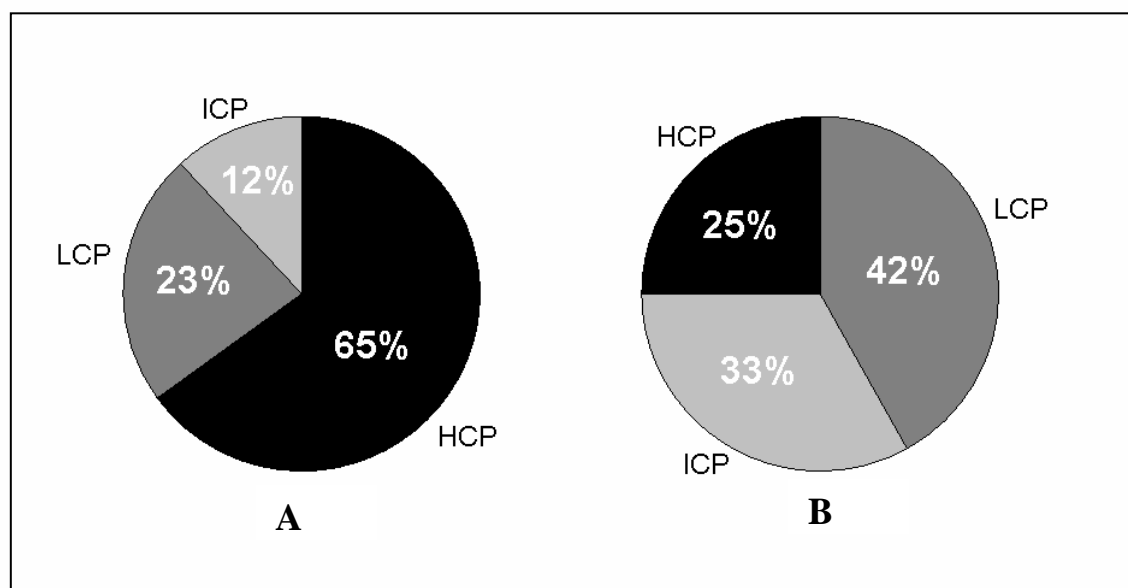
Należy podkreślić, że aby sygnał metylacji wpłynął na wyciszenie, w obrębie promotora muszą znajdować się zmetylowane CpG w dużej gęstości (ICP i HCP). Jest to związane m.in. z wydajnością wiązania się białek MBD do tych sekwencji (Weber i in., 2007).

79% promotorów typu LCP jest hipermetylowanych w komórkach germinalnych i somatycznych i w obu przypadkach wzrost zawartości CpG wiązał się ze wzrostem ilości zmetylowanych cytozyn. Zauważono jednak, że hipermetylacja promotorów typu ICP i HCP obserwowana w komórkach fibroblastów nie występowała w komórkach germinalnych. Wśród promotorów typu HCP i ICP, które były hipermetylowane w komórkach somatycznych, 86 i 49% pozostawało niezmetylowanych w komórkach linii germinalnej. Zatem w czasie rozwoju organizmu dochodzi do hipermetylacji promotorów CpG w zróżnicowanych komórkach somatycznych. Promotory typu ICP są najbardziej podatne na regulację poprzez metylację i częściej ulegają metylacji *de novo* w procesie różnicowania się komórek (Weber i in., 2007; Ball i in., 2009).

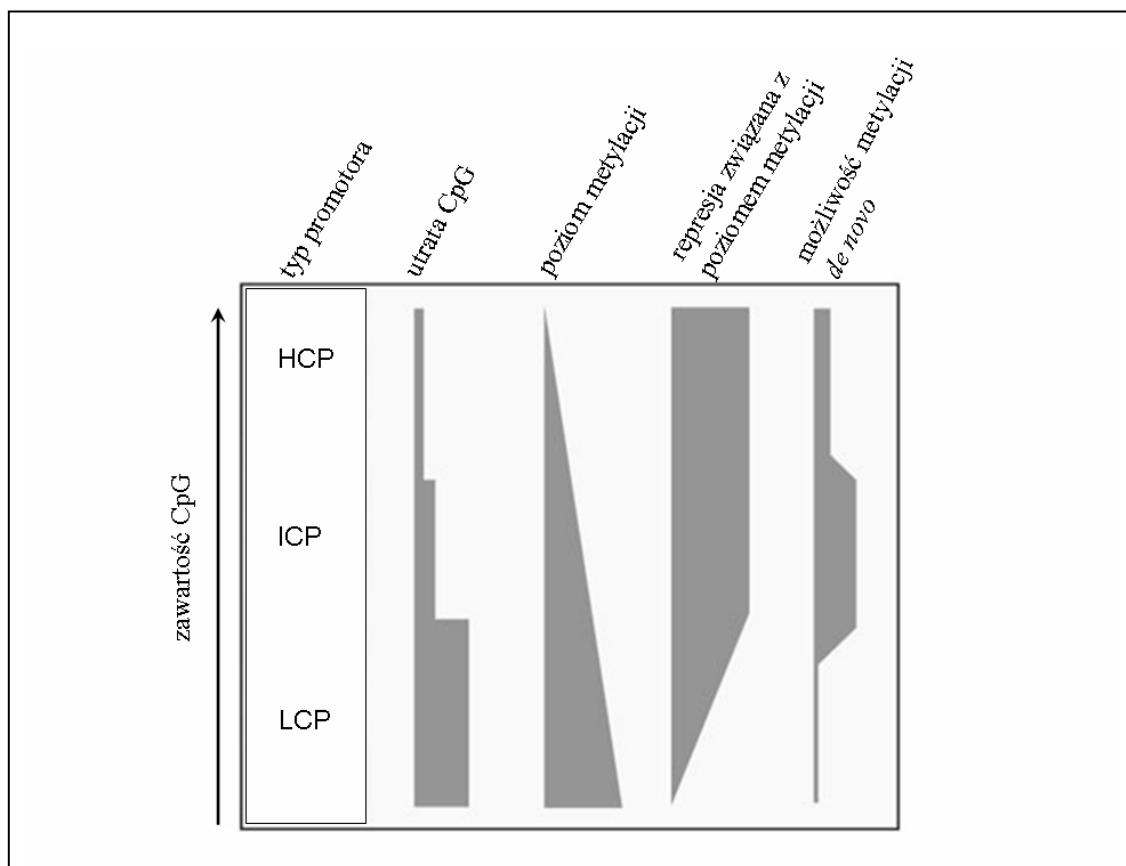
Na skutek spontanicznej deaminacji  $m^5C$  do tyminy (tranzycja  $m^5C \rightarrow T$ ) CpG stanowią tzw. „gorące miejsca” mutacji. Analizując utratę CpG w procesie różnicowania się komórek, zauważono częstszy spadek ilości tego dinukleotydu w promotorach typu LCP niż ICP i HCP, przy czym obniżenie ilości CpG w LCP było większe w promotorach zmetylowanych niż niezmetylowanych. Porównując promotory ICP i HCP, spadek ilości CpG w ICP był większy, nawet w promotorach niezmetylowanych, co sugeruje że mogą one być okresowo zmetylowane w komórkach germinalnych (Ryc. 4) (Weber i in., 2007).

W komórkach somatycznych geny specyficzne dla komórek germinalnych (DAZL, SPO11, SOX30, BRDT, ALF, TPTE, REC8) są hipermetylowane. Dotyczy to także genów, których promotory są bogate w CpG, a które normalnie są chronione przed metylacją w komórkach somatycznych (Weber i in., 2007).

Analizując promotory zróżnicowanych komórek somatycznych pochodzących z wątroby (endoderma), śledziony (mezoderma) i mózgu zauważono, że tylko 4-8% wysp CpG w obrębie promotorów jest zmetylowanych specyficjnie dla danego typu tkanki (T-DMRs – rejon zmetylowany specyficjnie) (Irizarry i in., 2009). Metylacja tych fragmentów podlega zmianom w czasie różnicowania się komórek czy karcenogenezie (Doi i in., 2009). Największe zróżnicowanie międzytkankowe (~76%) obserwuje się w odległości do 2kbp od końców tych wysp w obrębie tzw. brzegów (ang. *shores*). 18% T-DMRs znajduje się w odległości powyżej 2kbp od promotorów. Oznacza to, że T-DMRs w 96% zlokalizowane są poza wyspami CpG znajdującymi się w obrębie promotorów, a ich metylacja została skorelowana z hamowaniem ekspresji genów (Irizarry i in., 2009).



**Rycina 3.** Typy promotorów CpG i ich metylacja. **A)** Udział procentowy promotorów typu HCP, ICP, LCP **B)** Częstość występowania hipermetylacji w poszczególnych typach promotorów (Weber i in., 2007).



**Rycina 4.** Typy promotorów i ich metylacja. Zależność pomiędzy zawartością dinukleotydów CpG w sekwencji promotora a częstotliwością ich metylacji i jej wpływem na zamianę  $m^5C \rightarrow T$  oraz represję aktywności genu i podatność na metylację *de novo* w komórkach somatycznych. Promotory typu ICP są podatne na regulację związaną z metylacją i cechują się częstą metylacją w komórkach somatycznych, powodującą wyciszenie związanych z nimi genów. Szerokość słupków wskazuje częstotliwość, z jaką dany proces zachodzi lub też siłę (w przypadku represji transkrypcyjnej) (Weber i in., 2007).

### 3.3.5. Metylacja wewnątrzgenowa

Analizując wzór metylacji DNA z mózgu człowieka zauważono, że 16% wszystkich CpG było zmetylowanych, z czego 34% stanowiły CpG wewnątrzgenowe. 24,4% CpG wewnątrzgenowych charakteryzowało się specyficznym tkankowo wzorem metylacji. Zróżnicowana metylacja tych fragmentów sugeruje istotną funkcję tej modyfikacji. Liczne prace wskazały na pozytywną korelację pomiędzy metylacją wewnątrz genu a jego aktywnością (Maunakea i in., 2010). Wysoki poziom  $m^5C$  wewnątrz genu może poprawiać wydajność transkrypcji poprzez zapobieganie inicjacji tego procesu z alternatywnych miejsc startu (Ball i in., 2009). Obniżenie metylacji wewnątrz genu może spowodować spadek poziomu jego ekspresji (Shann i in., 2008).

Obserwując wzór metylacji na chromosomach X zauważono, że stosunek metylacji na chromosomie nieaktywnym Xi do chromosomu aktywnego Xa wynosił 2,4. Jednakże większy poziom metylacji wewnątrz aktywnych genów znaleziony został na chromosomie aktywnym. Jednocześnie promotory CpG były chronione przed metylacją na chromosomie aktywnym (Hellman i Chess, 2007).

Aktywację ekspresji genów wywołaną metylacją wewnątrzgenową zauważono także w komórkach limfocytów B (Ball i in., 2009). Natomiast geny cechujące się średnim poziomem ekspresji były najsilniej zmetylowane wewnątrzgenowo w komórkach pochodzących z istoty szarej (Maunakea i in., 2010). Ponieważ wiele genów posiada alternatywne miejsca inicjacji transkrypcji powyżej miejsca startu translacji bądź wewnątrz genu, dlatego uważa się, że główną funkcją wewnątrzgenowej specyficznej tkankowo metylacji może być regulowanie aktywności alternatywnych promotorów (Maunakea i in., 2010).

Badając poziom metylacji wewnątrzgenowej zauważono także, że ilość zmetylowanych cytozyn jest większa w obrębie egzonów (ok. 10% w ludzkich zarodkowych komórkach macierzystych) niż intronów, które zmetylowane są na poziomie średniej genomu. Obserwuje się jednak wzrost poziomu metylacji w rejonie 5' splicingowym, a w miejscu 3' spadek. Jest to prawdopodobnie wywołane wpływem sekwencji donora i akceptora wokół miejsca splicingu i może brać udział w regulowaniu tego procesu (Laurent i in., 2010).

### **3.3.6. Ustanawianie wzoru metylacji**

Według obowiązującej reguły nowy wzór metylacji ustanawiany jest *de novo* na wczesnych etapach embriogenezy w okresie implantacji zarodka. Odbywa się to dzięki aktywności DNMT3A i 3B, dla których matrycą może być niezmetrylowane i hemimetrylowane DNA (Pelizzola i Ecker, 2011). Jest to poprzedzone usunięciem m<sup>5</sup>C odziedziczonej z gamet (He i in., 2011b). Wymazywany jest prawie całkowicie wzór metylacji ustanowiony w poprzednich pokoleniach, przy czym demetylacja genomu pochodzącego od ojca następuje gwałtownie, poprzedzając replikację DNA. Sugeruje to aktywną demetylację za pomocą enzymu. Jak do tej pory nie wskazano białka wykazującego taką aktywność. DNA pochodzące od matki ulega pasywnej, zależnej od replikacji demetylacji (Mayer i in., 2000). Nowy wzór jest genowo specyficzny i

umożliwia różnicowanie się komórek, a po każdym podziale jest przekazywany do potomnych komórek somatycznych (Ji i in., 2010).

W późniejszych etapach (dzień 11.5-12.5) dochodzi do metylacji *de novo* w pierwotnych komórkach prapłciowych (ang. *primordial germ cells*), co prowadzi do ustanowienia nowego wzoru specyficznego dla gamet (Chen i Riggs, 2011). Piętnuje on odpowiednie *loci* w zależności od ich pochodzenia (ojcowskie bądź matczyne) oraz wycisza i utrzymuje w tym stanie elementy transpozonowe i sekwencje repetytywne (Law i Jacobson, 2010; He i in., 2011b). Za metylowanie elementów transpozonowych i piętnowanie genów mogą być odpowiedzialne dwa różne mechanizmy. Pierwszy związany jest z piRNA. W procesie tym niezbędne jest oddziaływanie pomiędzy białkami Piwi i piRNA a składnikami kompleksu metylującego DNA. Piwi należą do białek z rodziny Argonaute, które wiążą się do cząsteczek piRNA o długości 24-32 nukleotydów ulegających ekspresji z fragmentów transpozonowych. Ekspresja białek Piwi i piRNA zachodzi tylko w komórkach germinalnych. U myszy dwa białka z rodziny Piwi – MILI i MIWI2 są zaangażowane w powstawanie piRNA w gonadach męskich w fazie płodowej. piRNA bierze udział w wyciszaniu transpozonów poprzez kierowanie do nich kompleksów metylujących (He i in., 2011b). Przypuszczalnie może się to odbywać poprzez inicjowanie przez Piwi-piRNA kompleksów zawierających enzymy modyfikujące chromatynę, a następnie metylowanie cytozyny przez DNMT3A/3L (Aravin i in., 2008). Wyniki eksperymentów prowadzonych *in vitro* pokazują, że DNMT3A i 3B mogą tworzyć kompleksy białko-RNA, a DNMT3A oddziałuje z małymi niekodującymi RNA (Weinberg i in., 2006; Denis i in., 2011).

Prawdopodobne jest, że metylacja DNA kierowana przez RNA (RdDM) występuje nie tylko u roślin, ale także w komórkach ssaczy (Denis i in., 2011). Przykładem jest pRNA (ang. *promotor-associated RNA*). Jest to niekodujące RNA komplementarne do promotora rybosomalnego RNA (rRNA). Bierze udział w tworzeniu tripleksu DNA-RNA w obrębie tegoż promotora, który jest specyficznie rozpoznawany przez DNMT3B (Schmitz i in., 2010).

Zjawisko ustanawiania wzoru metylacji i piętnowania genomowego związane jest także z „odczytywaniem” przez DNMT modyfikacji znajdujących się na histonach. Istnieje silna zależność pomiędzy metylacją lizyny 4 histonu 3 (H3K4) a metylacją cytozyny w DNA. Do allosterycznej aktywacji DNMT3A dochodzi w wyniku oddziaływania pomiędzy demetylowaną przez demetylazę 1B (KDM1B) lizyną

histonu 3 (H3K4) a DNMT3A i 3L (Wang i in., 2009; Law i Jacobson, 2010; Li i in., 2011). W badaniach *in vitro* wykazano także, że DNMT3A i B mogą wiązać się do niemetylowanej H3K4 nawet bez obecności białka pomocniczego DNMT3L (Otani i in., 2009; Zhang i in., 2010). Dodatkowo DNMT3A oddziałuje z trimetylowaną Lys histonu 3 (H3K36me3), co aktywuje metylację DNA (Dhayalan i in., 2010). Sygnałem metylacji jest także H3K27me3, modyfikacja wprowadzana przez kompleks EZH2 i białka Polycomb (Denis i in., 2011).

Szczegółowy mechanizm metylacji *de novo* badany jest poprzez analizę oddziaływania pomiędzy DNMT3A i DNMT3L (Jia i in., 2007). Tworzą one tetrameryczny kompleks, w którym 2 cząsteczki DNMT3A znajdują się obok siebie, natomiast 2 DNMT3L rozmieszczone są po bokach i oddziałują z lizynami histonu H3. Pomiedzy miejscami aktywnymi obu cząsteczek DNMT3A znajduje się około 1 skręt helisy DNA, co oznacza, że każdy tetrameryczny kompleks jednocześnie metyluje dwie cytozyny znajdujące się w odległości ~ 8-10 par zasad (27,2-34Å). Tłumaczy to cykliczność występowania dinukleotydów CpG (Law i Jacobson, 2010).

W procesie metylacji *de novo* biorą udział także inne białka jak metylotransferaza histonów G9a, EZH2 i SETDB1. Metylacja heterochromatyny pericentrycznej zachodzi dzięki oddziaływaniu białka HP1 z DNMT3A i 3B. Sygnałem dla tego procesu jest metylacja lizyny 9 histonu 3 (H3K9me3) katalizowana przez metylotransferazę histonów SUV39H1/2. W obrębie euchromatyny enzym G9a metylujący H3K9 rekrutuje DNMT3A i 3B do wyciszenia genów aktywnych we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego (Sharma i in., 2011). Wszystkie podane przykłady są bezpośrednim dowodem na połączenie dwóch epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów tj. modyfikacji histonów i metylacji DNA (Law i Jacobson, 2010).

W komórkach embrionalnych DNMT3 ulegają wzmożonej ekspresji, co jest zgodne z zapotrzebowaniem na enzymy wprowadzające wzór metylacji (Jones i Liang, 2009). Natomiast w komórkach somatycznych ich ekspresja jest znacznie niższa, chociaż nadal występuje. Jedynie izoforma DNMT3A2 ulega całkowitemu wyciszeniu w komórkach somatycznych (Jones i Liang, 2009). Wykazano także, że oddziaływanie pomiędzy trzema metylotransferazami jest niezbędne w ustanawianiu prawidłowego wzoru metylacji (Pelizzola i Ecker, 2011).

### 3.3.7. Powielanie wzoru metylacji

Model dotyczący wprowadzenia i utrzymywania wzoru metylacji został zaproponowany przez Riggs'a (1975) oraz Holliday'a i Pugh'a (1975). Wzór globalnej metylacji ustanowiony w komórkach rozrodczych i na wczesnych etapach rozwoju jest powielany, aby zapewnić komórce tożsamość oraz utrzymać transpozony w stanie wyciszonym (Law i Jacobsen, 2010). Podtrzymywanie wzoru m<sup>5</sup>C polega na metylacji nowo syntetyzowanej nici potomnej DNA wg wzoru z nici matczynej. Odbywa się w czasie fazy S cyklu komórkowego (Leonhardt i in., 1992; Margot i in., 2000; Eden i in., 2003ab). Dodatkowo obserwuje się przesunięcie procesu poza fazę replikacji o ponad godzinę (Liang i in., 2002). W proces zaangażowana jest DNMT1, której miejsca aktywności definiowane są przez modyfikacje histonów wprowadzone przez kompleks PRC (Brenet i in., 2011). DNMT1 oddziałuje z PCNA w obrębie widełek replikacyjnych. Zahamowanie tego oddziaływania tylko nieznacznie skutkuje obniżeniem poziomu metylacji DNA (Spada i in., 2007; Law i Jacobson, 2010). Jednakże całkowity brak DNMT1 w kompleksie replikacyjnym może spowodować skierowanie komórki na jedną z licznych ścieżek programowanej śmierci (Brown i Robertson, 2007). Dodatkowo wykazano, że nokaut genu *DNMT1* w komórkach nowotworu okrężnicy powoduje obniżenie poziomu całkowitej metylacji genomu, które pogłębia się jeszcze bardziej w przypadku podwójnego nokautu *DNMT1* i *3B* (Pradhan i Esteve, 2003b).

Chociaż model powielania wzoru metylacji po każdej replikacji jest szeroko akceptowany to liczne badania pokazują, że musi on ulec rozszerzeniu. Komórki, w których aktywna jest tylko DNMT1, pozbawione są metylacji zaangażowanej w piętnowanie genomowe czy wyciszenie elementów repetytywnych oraz stopniowo tracą metylację wraz z wzrastającą ilością podziałów komórki (Jones i Liang, 2009). Wykazano też, że DNMT1 może katalizować reakcję *de novo* (Pradhan i in., 1999). Ponadto w modelu powielania wzoru metylacji brakuje elementu naprawczego. Wszystkie systemy oparte na kopiowaniu (np. synteza DNA) mają elementy sprawdzające poprawność tego procesu. Jest mało prawdopodobne, żeby wielokrotne kopiowanie nie powodowało powstawania błędów. Sugeruje to, że oprócz DNMT1 niezbędne są dodatkowe aktywności enzymatyczne (Jones i Liang, 2009).

Istotny jest także fakt obecności miejsc hemimetylowanych w DNA.

Zakładano, że są one słabo rozpoznawane, co prowadzi do ich niepełnej poreplikacyjnej metylacji. Jednakże ilość tych miejsc jest znacznie większa niż sądzono. Po wyłączeniu genów (ang. *knock-out*) *DNMT3A* i *3B*, 30% CpG w obrębie sekwencji powtórzonych pozostaje hemimetylowanych, co sugeruje, że enzymy te związane są z symetryczną metylacją tych sekwencji (Liang i in., 2002; Chen i in., 2003; Sharma i in., 2011). Analizując metylację jednego z chromosomów X zauważono, że aż 16% grup metylowych po każdym podziale wprowadzanych jest *de novo* (Riggs i Xiong, 2004). Ponieważ poziom metylacji danego allelu nie jest charakteryzowany tylko przez dwie graniczne wartości – 0 i 100%, ale przyjmuje cały zakres wartości pośrednich, obecnie uważa się, że proces metylacji jest procesem stochastycznym, losowym i kopiowany jest raczej „status” metylacji a obserwowana heterogenność nie jest wynikiem wiernego przepisywania wzoru. Utrzymanie takiego wzoru metylacji wymaga po każdym podziale aktywności *de novo* (Laird i in., 2004; Jones i Liang, 2009).

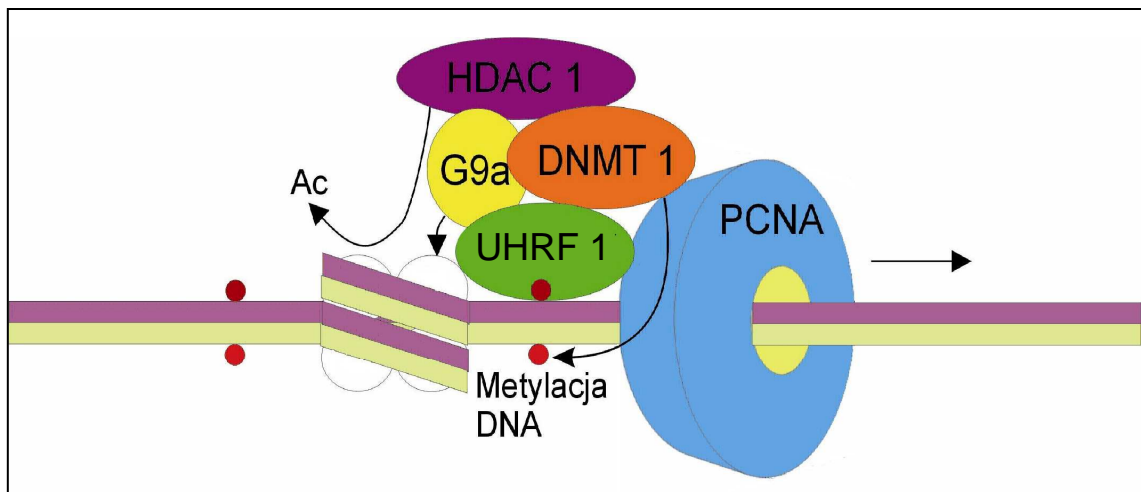
Pierwotny model utrzymywania wzoru metylacji nie uwzględniał także faktu, że DNA nie występuje w komórce jako samodzielna cząsteczka, ale nawinięty jest na oktamer histonów tworząc strukturę zwaną nucleosomem. DNMT metylujące *de novo* nie występują w komórce w stanie wolnym, ale związane są z nukleosomami. Obecność zmetylowanego DNA w nukleosomach jest niezbędna dla wiązania DNMT3A i 3B oraz utrzymania odpowiedniego ich poziomu w komórce. Redukcja poziomu metylacji poprzez np. wyciszenie genu *DNMT1* prowadzi do degradacji wolnych DNMT3. Natomiast odbudowanie metylacji prowadzi do zwiększenia poziomu DNMT3 poprzez stabilizację ich wiązania do nukleosomów. Dzięki takiemu systemowi kontroli aktywności obu DNMT3 komórka unika błędnej metylacji *de novo* po każdym podziale komórki (Jia i in., 2007; Sharma, 2011).

Można uznać, że DNMT1 jest enzymem kopiującym bez względu na strukturę chromatyny, natomiast DNMT3 oddziałują z nukleosomami poprzez związanie z nicią matczyną i pozostają w tym kontakcie w komórkach somatycznych, uzupełniając błędy w kopiowaniu wzoru na nici nowo zsyntetyzowanej. DNMT3 biorą udział w utrzymywaniu wzoru metylacji w obrębie wysp CpG oraz sekwencji repetytywnych. Metylacja poza wyspami CpG katalizowana jest przez główny enzym utrzymujący metylację (DNMT1). Świadczy o tym spadek ilości m<sup>5</sup>C w obrębie rejonów z mniejszą ilością CpG w komórkach z wyciszonym genem *DNMT1* (Liang i in., 2002).



Niezwykle istotne dla specyficzności reakcji metylacji katalizowanej przez DNMT1 jest oddziaływanie z białkiem UHRF1 (Ryc. 5), które tworzy kompleks z PCNA (Muto i in., 1995; Hopfner i in., 2000), a następnie za pośrednictwem domeny SRA wiąże hemimetylowany DNA (Bostick i in., 2007; Sharif i in., 2007; Achour i in., 2008). Do tego kompleksu przyłącza się DNMT1 (Unoki i in., 2009). UHRF1 uczestniczy również w procesie metylacji histonu H3K9 oddziałując z enzymem G9a/EHMT2, katalizującym tę reakcję. W dalszym etapie zmetylowana H3K9 oddziałuje z UHRF1, które dalej wiąże HDAC1 biorąc udział w powstawaniu heterochromatyny (Unoki i in., 2009).

Na podstawie analizy struktury krystalicznej kompleksu domeny SRA z oligonukleotydem DNA zawierającym sekwencję m<sup>5</sup>CpG stwierdzono, że m<sup>5</sup>C zostaje wysunięta na zewnątrz helisy i umieszczona w hydrofobowej kieszeni białka utworzonej przez Tyr471 i Tyr483, co pozwala na jej stabilizację poprzez oddziaływania warstwowe (Avvakumov i in., 2008; Hashimoto i in., 2008). Domena SRA „obejmuje” docelową m<sup>5</sup>C, oddziałując zarówno w małym jak i dużym rowku DNA. Wysunięcie zasady na zewnątrz helisy, opisane wcześniej dla metylotransferazy, obserwowane jest często w kompleksach enzymów modyfikujących zasady zarówno w DNA jak i RNA. Związanie m<sup>5</sup>C przez UHRF1 wskazuje DNMT1 cytozynę, która ma ulec metylacji. Stwierdzono, że UHRF1 nie ulega ekspresji w tkankach serca, płuc, wątroby, nerek i pęcherza moczowego, natomiast jego wysoki poziom można obserwować w grasicy i szpiku kostnym oraz w komórkach nowotworowych (Unoki i in., 2009). Zmniejszenie poziomu UHRF1 prowadzi to znaczącej redukcji zdolności proliferacyjnej komórek progenitorowych naskórka, podtrzymywanej przez współdziałanie DNMT1 i UHRF1. Skutkiem tego jest ograniczona zdolność tkanki do samoodnowy (Sen i in., 2010).



**Rycina 5.** *Udział białka UHRF1 w metylacji DNA i kondensacji chromatinu (Bostick i in., 2007).*

### 3.4. Demetylacja cytozyny

Aktywna demetylacja cytozyny jest procesem enzymatycznym, w którym usunięcie grupy metylowej związane jest z zerwaniem wiązania pomiędzy dwoma atomami węgla. Demetylacja może zachodzić również w wyniku pasywnej utraty  $m^5C$ , gdy brakuje DNMT1 w czasie kolejnych rund replikacji. Podczas gdy pasywna demetylacja jest procesem znanym i akceptowanym, istnieje wiele kontrowersji na temat aktywnej formy tego procesu (Wu i Zhang, 2010).

Postuluje się, że globalna aktywna demetylacja zachodzi dwukrotnie w czasie rozwoju embrionalnego: pierwsza dotyczy ojcowskiego DNA i zachodzi przed pierwszym podziałem zygoty, druga komórek prapłciowych (PGC) pomiędzy dniami 11.25 a 13.5 (Teperek-Tkacz i in., 2011). Obserwuje się także aktywną demetylację obejmującą specyficzne *loci* w komórkach somatycznych takich jak neurony czy limfocyty T (Chen i Riggs, 2011).

#### 3.4.1. Globalna demetylacja

Globalną demetylację DNA pochodzącego od ojca obserwuje się 4-8 godzin po zapłodnieniu. Jest mało prawdopodobne, żeby proces ten przebiegał w sposób pasywny, tym bardziej, że po zastosowaniu inhibitora replikacji (afidikolina) demetylacja genomu pochodzącego od ojca nadal zachodzi. Nie jest jednak jasne czy sygnał indukujący ten proces pochodzi z gamety żeńskiej czy męskiej. Zauważono, że niektóre fragmenty nie

podlegają demetylacji tj. te, które ulegają piętnowaniu, retrotranspozony oraz fragmenty heterochromatyny okołocentromerowej i w obrębie centromerów. Dodatkowo w tym samym czasie matczynej DNA pozostaje odporny na falę demetylacji. Może być to wynikiem specyficznych modyfikacji histonów bądź obecności odpowiednich ich wariantów (Wu i Zhang, 2010).

Około 7 dnia rozwoju embrionalnej komórki PGC różnicują się, a następnie przemieszczają. Początkowo ich wzór metylacji jest taki jak pozostałych komórek epiblastu. Po przemieszczeniu do grzebienia płciowego (ang. *genital ridge*) wzór ten zostaje po raz drugi wymazany. Ponieważ w komórkach PGC zachodzi ekspresja DNMT1 w czasie ich podziałów, globalna demetylacja obejmująca także geny podlegające piętnowaniu i będące do tej pory wyciszone, musi mieć charakter aktywny (Wu i Zhang, 2010; Okada i in., 2010). Szacuje się, że w przypadku drugiej rundy demetylacji w męskich komórkach PGS pozostaje 40%, a w żeńskich 30% m<sup>5</sup>C (Migicovsky i Kovalchuk, 2011).

Aktywna demetylacja obserwowana jest w obrębie pojedynczych *loci* także w komórkach somatycznych w odpowiedzi na odpowiednie sygnały. Na przykład w aktywowanych limfocytach T dochodzi do aktywnej demetylacji (bez replikacji) w obrębie enhancera promotora genu interleukiny 2 (Wu i Zhang, 2010).

### 3.4.2. Procesy aktywnej demetylacji

Proponuje się kilka procesów mogących odpowiadać za demetylację DNA:

- enzymatyczne usunięcie m<sup>5</sup>C,
- naprawa poprzez wycięcie zasady (BER),
- deaminacja m<sup>5</sup>C prowadząca do powstania tyminy, po której następuje proces BER usuwający nieprawidłowe sparowanie T-G,
- naprawa poprzez wycięcie nukleotydów (NER),
- oksydacyjna demetylacja poprzez utlenianie,
- demetylacja związana z SAM i rodnikami (Wu i Zhang, 2010).

Najprostszym mechanizmem demetylacji wydaje się być enzymatyczne usunięcie grupy metylowej z m<sup>5</sup>C. Wymaga to jednak aktywności enzymatycznej, która byłaby w stanie zerwać silne wiązanie C-C. Pojawiły się doniesienia, że białka wiążące zmetylowane CpG (MBD2) mogą katalizować taką reakcję uwalniając metanol

(CH<sub>3</sub>OH) (Bhattacharya i in., 1999), jednak wyniki te nie zostały potwierdzone. Nie udało się do tej pory zidentyfikować żadnego białka wykazującego aktywność demetylasy (Wu i Zhang, 2010).

Proponuje się udział procesu BER w demetylacji DNA. Mechanizm miałby polegać na wycięciu 5-metylocytozyny przez DNA glikozylazę, a następnie usunięciu szkieletu fosfocukrowego przez liazę AP i endonukleazę. Miejsce apirymidynowe jest uzupełniane przez polimerazę mającą zdolność naprawy i zszywane z resztą nici DNA przez ligazę (Sancar i in., 2004). Mechanizm ten został zaproponowany ze względu na występowanie u roślin enzymów z rodziny Demeter, które posiadają aktywność glikozylazy i AP liazy (Wu i Zhang, 2010), i które rozpoznają i usuwają m<sup>5</sup>C z DNA. W przypadku organizmów roślinnych ten sposób usuwania m<sup>5</sup>C jest dobrze opisany, natomiast u ssaków nie potwierdzono jego obecności. Przede wszystkim nie ma ortologów enzymów z rodziny Demeter. Wykazano jednak aktywność m<sup>5</sup>C glikozylazy w ekstraktach z embrionów kurzych (Jost, 1993). Dalsze badania ujawniły, że w skład kompleksu wchodzi RNA, helikaza RNA i homolog glikozylazy TDG usuwający T. Jednakże aktywność związana z wycinaniem m<sup>5</sup>C była znacznie niższa (30-40 krotnie). Podobnie MBD4 posiada aktywność glikozylazową w stosunku do m<sup>5</sup>C, jednakże wydajność wiązania do pary T-G jest wyższa. Wykazano jednak, że MBD4 hydrolizuje wiązanie glikozydowe uwalniając 5-metylocytozynę, przez co aktywnie demetyluje promotor genu CYP27B1 (cytochrom p450 27B1) w odpowiedzi na PTH (parathormon). Fosforylacja MBD4 przez kinazę białkową C zwiększa powinowactwo MBD4 do m<sup>5</sup>C (Wu i Zhang, 2010; Teperek-Tkacz i in., 2011).

Naprawa typu BER może zachodzić także po deaminacji m<sup>5</sup>C, w wyniku której powstaje T i prowadzi do zastąpienia tyminy przez cytozynę (Wu i Zhang, 2010). Pierwszy etap deaminacji mogą katalizować deaminazy lub DNMT. Aktywność glikozylazy T posiadają TDG i MBD4. Badania na *Danio rerio* pokazały, że w demetylacji DNA biorą udział działające kooperatywnie deaminazy posiadające cynk w miejscu aktywnym: AID i APOBEC oraz MBD4 i GADD45a (Wu i Zhang, 2010). AID i APOBEC1 ulegają ekspresji w embrionach ssaków w momencie globalnej demetylacji (Morgan i in., 2004), natomiast GADD45a wzmacnia oddziaływanie pomiędzy AID/APOBEC1 a MBD4, które jest glikozylazą i usuwa powstałą T z niesparowania T-G (Teperek-Tkacz i in., 2011). Potwierdzeniem związku pomiędzy AID a demetylacją jest utrata aktywacji wywołanej demetylacją genów pluripotencji

OCT4 i NANOG w heterokarionach (komórki, które po fuzji posiadają wiele genetycznie różnych jąder) w wyniku wyciszenia aktywności genu AID z wykorzystaniem siRNA. Jednakże znane są ograniczenia w aktywności tych enzymów, związane z ich specyficzną substratową. Substratem AID jest ssDNA, natomiast ani TDG ani MBD4 nie usuwają T z miejsc tandemowych niesparowań T-G. Prawdopodobnie demetylacja zainicjowana aktywnością AID skorelowana jest z transkrypcją, w czasie której obecne jest ssDNA (Wu i Zhang, 2010; Teperek-Tkacz i in., 2011).

Miejsca deaminacji katalizowanej przez AID/APOBEC mogą być wskazywane przez odpowiednie modyfikacje histonów. W czasie demetylacji genom pozbawiony jest metylacji lizyny 9 histonu H3 (H3K9me2/3). Natomiast acetylacja lizyny 9 oraz 14 histonu 3, a także metylacja lizyny 4 H3 (H3K4me3) związane są z kierowaniem AID do miejsca deaminacji (Teperek-Tkacz i in., 2011).

Badania DNMT3A i 3B ssaków pokazały, że w sytuacji ograniczonego dostępu SAM lub jej braku, mają one aktywność deaminazy i współdziałają z TDG. Ponieważ jednak SAM jest związkem ważnym w wielu procesach, wahania w jego stężeniu na terenie komórki miałyby poważne konsekwencje biologiczne (Wu i Zhang, 2010).

Wszystkie białka uczestniczące w naprawie typu BER (MBD4, endonukleaza AP, Pol $\beta$ , ligaza DNA) ulegają ekspresji na etapach przedimplantacyjnych, co wspiera założenie, że proces deaminacji i system BER zaangażowane są w usuwanie m<sup>5</sup>C (Teperek-Tkacz i in., 2011). Dodatkowo, enzymy BER są obecne w ojcowskim *pronucleus* i w komórkach PGC w czasie ich globalnej demetylacji.

Inną proponowaną metodą demetylacji jest NER. W wyniku tego procesu usuwane są fragmenty długości około 29 par zasad zawierające błędne sparowanie T-G. Białka GADD45A i B zostały powiązane z demetylacją, ponieważ wyciszenie GADD45A prowadziło do hipermetylacji a nadekspresja do demetylacji związanej z naprawą NER. Jednakże wyniki uzyskane dla GADD45A nie zostały zweryfikowane (Wu i Zhang, 2010; Teperek-Tkacz i in., 2011).

### 3.4.3. Usuwanie 5-metylocytozyny poprzez utlenianie

Oksygenazy TET zależne od  $\alpha$ -ketoglutaranu katalizują utlenienie  $m^5C$  do  $hm^5C$ . TET1 oraz TET2 ulegają zwiększonej ekspresji w komórkach embrionalnych i PGC w czasie globalnej demetylacji, a także w przypadku reprogramowania fibroblastów w celu ich przemiany w indukowane pluripotentne komórki macierzyste (Hajkova i in., 2010; Koh i in., 2011; Nabel i Kohli, 2011). Ponieważ  $hm^5C$  nie występuje we wszystkich tkankach organizmów zwierzęcych, pojawia się pytanie, czy jest ona istotna dla fizjologii ssaków. Obecność  $hm^5C$  stwierdzono w komórkach nerwowych Purkiniego, gdzie stanowi około 40%  $m^5C$ . Natomiast w niektórych komórkach embrionalnych szacowana ilość  $hm^5C$  wynosi 1 na każde 3000 pz (~ 1%). Jej funkcja jest jednak nadal nie znana. Ponieważ  $hm^5C$  jest stabilnym nukleozydem, może tak jak inne zmodyfikowane składniki DNA wpływać na lokalną strukturę chromatyny lub oddziaływać z czynnikami regulującymi transkrypcję poprzez ich wiązanie bądź blokowanie im dostępu do chromatyny. Na przykład represory transkrypcji takie jak MECP2, MBD1, MBD2 i MBD4 wiążą się do  $m^5C$ , natomiast nie dochodzi do takich oddziaływań z  $hm^5C$ . Prawdopodobnie białka TET mogą być związane z pasywną demetylacją w dzielących się komórkach embrionalnych, ponieważ DNMT1 nie rozpoznaje  $hm^5C$ , przez co nie wprowadza symetrycznej metylacji na nici nowo powstałej (Wu i Zhang, 2010).

$hm^5C$  może także stanowić produkt przejściowy demetylacji, prowadząc w konsekwencji do zastąpienia  $hm^5C$  przez C. Mogłoby to przebiegać dzięki naprawie typu BER i wiązać się z wycięciem  $hm^5C$  przez odpowiednią glikozydazę, bądź też z etapem deaminacji  $hm^5C$  do 5-hydroksymetylouracylu, a następnie usunięciem tego nukleozydu przez specyficzną glikozydazę np. SMUG1 (Wu i Zhang, 2010).

Konwersja  $hm^5C$  do C i usunięcie formaldehydu może następować także w wyniku działania światła UV oraz wysokiego pH (Wu i Zhang, 2010).

W związku z dużą ilością  $hm^5C$  w komórkach embrionalnych badana jest rola białek TET w tych komórkach. W czasie ich różnicowania się poziom mRNA TET1 i  $hm^5C$  spada, co może oznaczać, że białko to jest ważne dla utrzymania przez nie tożsamości. Białko TET1 reguluje ekspresję genu *NANOG*, wiążąc się do jego promotora i blokując jego hipermetylację. Potwierdza to utrata zdolności do samoodnowy przez komórki embrionalne w wyniku wyłączenia (ang. *knock-down*)

TET1 ale nie TET2 lub TET3. Efektem braku TET1 jest śmierć embrionu (Wu i Zhang, 2010).

Wykazano także, że białka TET katalizują reakcje utleniania  $m^5C$ , w wyniku których powstają 5-formylocytozyna (fC) i 5-karboksylocytozyna (caC) nazwane siódmą i ósmą zasadą DNA. Sposób ich usuwania z DNA jest na razie niejasny, może przebiegać z udziałem hipotetycznej dekarboksylazy (Ito i in., 2011), bądź przy udziale TDG (He i in., 2011a).

#### **3.4.4. Usuwanie $m^5C$ zależne od S-adenozylu-L-metioniny**

Poszukując białka biorącego udział w demetylacji ojcowskiej części genomu zygoty wyselekcjonowano białko ELP3. Kryterium stanowiła obecność motywu CXXC, który posiada wysokie powinowactwo do niezmetylowanych sekwencji CpG. Białka ELP tworzą kompleks elongacyjny składający się z 6 podjednostek (ELP1-6), który oddziałuje z RNA polimerazą II w czasie etapu elongacji transkrypcji (Okada i in., 2010; Wu i Zhang, 2010). Białko ELP3 posiada domenę HAT – acetylotransferazy histonów oraz domenę wiążącą SAM i centrum żelazowo-siarkowe (Fe-S), dzięki któremu powstaje czynnik utleniający w postaci rodnika 5'-deoksyadenozynowego w cząsteczce SAM. Rodnik ten odbiera wodór z grupy metylowej prowadząc do powstania rodnika  $m^5C$ . W kolejnych etapach dochodzi do powstania  $hm^5C$  dzięki obecności cząsteczki wody. Zerwanie wiązania węgiel-węgiel następuje prawdopodobnie według mechanizmu zbliżonego do reakcji katalizowanej przez metylotransferazę. Atak reszty cysteiny na węgiel 6 prowadzi do uwolnienia formaldehydu (Wu i Zhang, 2010).

Obserwowana w czasie rozwoju embrionalnego i w komórkach somatycznych demetylacja DNA jest przyczyną pojawienia się wielu pytań dotyczących tego procesu. Przede wszystkim nadal poszukuje się enzymu posiadającego aktywność demetylazy oraz jednego mechanizmu, według którego proces demetylacji miałby zachodzić. Jest prawdopodobne, że w przeciwieństwie do metylacji cytozyny, wiele procesów zaangażowanych jest w usuwanie  $m^5C$ . Istotne jest także rozpoznanie czynników, które decydują o tym, że to ojcowski a nie matczyzny genomowy DNA ulega aktywnej demetylacji.

### 3.5. Przyczyny zaburzeń w profilu epigenetycznym

Wprowadzany na etapie epiblastu wzór metylacji nie jest stały. W kolejnych etapach rozwoju obserwuje się metylację i demetylację genów według specyficznego programu. Procesy te są ściśle kontrolowane. Zmiany we wzorze metylacji są niezbędne dla rozwoju i różnicowania. W czasie życia mogą być one także indukowane przez otaczające środowisko, bądź też przypadkowo pojawiać się jako błędy w kopiowaniu wzoru metylacji. Wraz ze starzeniem się organizmu, obserwowany jest spadek poziomu metylacji, który jest odwrotnie proporcjonalny do długości życia (Richardson, 2003; Gravina i Vijg, 2010). Zjawisko to obserwowano w większości tkanek kręgowców (myszy, szczurów, krów, ludzi). Analizując proces powielania wzoru metylacji genu *FMRI* po każdym podziale komórki, zauważono, że stopień poprawności kopiowania metylacji każdej cytozyny w allelu hipermetylowanym wynosi 0,96. Gdy analizowano cytozyny niezmetylowane w allelu niezmetylowanym stopień poprawności tego procesu wzoru wynosił 0,99. Większe odchylenie (0,83) zaobserwowano dla cytozyn niezmetylowanych w allelu hipermetylowanym. Wyniki jednoznacznie pokazują, że po każdej replikacji pojawiają się błędy we wzorze metylacji (Gravina i Vijg, 2010). Proces ten związany jest z faktem, że wraz z wiekiem obniża się aktywność enzymów metylujących DNA (Richardson, 2003; Donkena i in., 2010).

Przyczyną hipometylacji może być aktywność RFT. Stres oksydacyjny spowodowany zaburzeniami metabolizmu bądź też czynnikami zewnętrznymi takimi jak dieta czy czynniki środowiskowe związany jest z powstawaniem zwiększonej ilości RFT. Zmiany w DNA polegające na modyfikacji zasad (5-OH-cytozyna, 5-OH-uracyl), delecjach czy przerwaniu nici, wynikają z aktywności powstających rodników hydroksylowych. Ma to wpływ na proces metylacji, w którym takie uszkodzone podlegające mutacjom DNA, jest substratem. W wyniku działania RFT powstaje 8-okso-dG. Atom N7 guaniny jest akceptorem protonu w wiązaniu wodorowym tworzącym się pomiędzy DNA a MBD. Utlenienie guaniny powoduje zamianę akceptora w donor oraz wymianę protonu na atom tlenu. Obecność 8-okso-dG obniża możliwość wiązania się białek MBD do  $m^5CpG$ , co wpływa na proces kondensacji chromatyny. Dodatkowo  $m^5C$  może być utleniana do  $hm^5C$ . Zastąpienie grupy metylowej grupą hydroksymetylową również obniża zdolność wiązania MBD.  $hm^5C$  może być usuwana przez system BER (Wu i Zhang, 2010).



RFT wpływają także na aktywność DNMT1 przyczyniając się do demetylacji genomu (Donkena i in., 2010).

Przyczyną zaburzeń we wzorze metylacji mogą być również niedobory prekursorów syntezy S-adenozyl-L-metioniny, do których należą metionina, kwas foliowy, witamina B12, cholina. Niedostateczna ilość tych składników prowadzi do ograniczenia ilości donora grupy metylowej, co może skutkować hipometylacją (Donkena i in., 2010). Niezwykle istotna jest także mutagenność  $m^5C$ , która może ulegać spontanicznej deaminacji, w wyniku której powstaje tymina (Lutsenko i Bhagwat, 1999). Obecność metylowanych dinukleotydów CpG zwiększa także podatność genu na mutacje powodowane promieniowaniem UV (Jones i Baylin, 2002).

Obniżenie poziomu metylacji prowadzi do rozregulowania precyzyjnej kontroli ekspresji genów, a w konsekwencji do niestabilności genomu (Yoo i Jones, 2006; Fraga i Esteller, 2007), ponieważ wiąże się to z utratą piętnowania genomowego i translokacjami fragmentów chromosomów, które uległy hipometylacji (Donkena i in., 2010). Gromadzące się w czasie życia błędy we wzorze metylacji, powodujące zaburzenia w profilu ekspresji genów, indukują rozwój procesów chorobowych, w tym chorób neurologicznych, autoimmunologicznych i nowotworów (Gravina i Vijg, 2010).

W DNA komórek nowotworowych globalna ilość  $m^5C$  jest od 20 do 60% mniejsza niż w komórkach prawidłowych (Esteller, 2003). Dodatkowo widoczne są różnice we wzorze metylacji w obrębie promotorów oraz tzw. brzegów wysp CpG DNA komórek nowotworowych i prawidłowych (Doi i in., 2009). Może być to skutkiem wymienionych wcześniej zaburzeń w ekspresji i aktywności metylotransferaz, które obserwowane są w nowotworach płuc, wątroby, piersi, żołądka, chłoniakach i retinoblastomie (Chik i in., 2011). Przyczyną może być wzrost ekspresji enzymu DNMT3B, powodowany globalną demetylacją wywołaną obniżeniem aktywności DNMT1 (Casillas i in., 2003; Fraga i Esteller, 2007; Donkena i in., 2010) lub też nadekspresja DNMT1 (Chik i in., 2011). Obie te zmiany powodują zwiększenie poziomu  $m^5C$  również w obrębie promotorów i brzegów wysp, które w normalnych komórkach danego organizmu nie powinny być zmetylowane. Wykazano również, że efektem uszkodzeń oksydacyjnych DNA jest kierowanie kompleksu białkowego składającego się z DNMT, sirtuin oraz białek Polycomb do promotorów zawierających wyspy CpG. Wynika to z pojawienia się w obrębie tych sekwencji zwiększonej ilości 8-okso-dG (O'Hagan i in., 2011).

Uważa się, że spowodowany hipermetylacją brak aktywności genów, w obrębie których mutacje obserwowane są rzadko, ma istotne znaczenie w procesie nowotworzenia. Przykładami są takie geny jak: *MGMT*, który koduje białko związane z naprawą DNA, *CDKN2B* kodujący białko p15 i *RASSF1A* będące regulatorem cyklu komórkowego (Jones i Baylin, 2002). W procesie starzenia obserwuje się także hipermetylację promotorów genów RB1, p16, APC. Nadmierna metylacja promotora genu *GSTP1* występuje w ponad 90% przypadków nowotworu raka prostaty i prowadzi do braku enzymu transferazy S-glutationowej P1, co zwiększa wrażliwość komórki i DNA na RFT (Donkena i in., 2010). Hipermetylację obserwuje się także w obrębie rybosomowego DNA, co prowadzi do ograniczenia jego transkrypcji, a w konsekwencji do zahamowanie procesu translacji w czasie starzenia się organizmu (Jones i Baylin, 2002). Takie procesy mogą powodować trwałe dziedziczne zmiany w epigenomie, związane z zaburzeniami w kondensacji chromatyny (Chik i in., 2011).

Globalna hipometylacja DNA prowadząca do zaburzeń w obrębie chromosomów, połączona z hipermetylacją rejonów promotorowych genów supresji nowotworowej i zmienioną ekspresją DNMT1 ma podobne konsekwencje jak transformacja nowotworowa indukowana przez mutacje genetyczne (Jones i Baylin, 2002; Esteller, 2003; Stresemann i in., 2006; Fraga i Esteller, 2007). Dodatkowo uważa się, że zaburzenia we wzorze metylacji powodujące nowotworzenie występują znacznie częściej niż mutacje (Donkena i in., 2010). Na przykład w genach *VHL* (supresor, którego mutacje powodują ujawnienie się syndromu von Hippela-Lindau) oraz *BCR1* i serynowo-treoninowej kinazie 11 (*STK11*) pojawiają się mutacje w komórkach germinalnych, które są przyczyną rodzinnych form nowotworów nerek, piersi czy okrężnicy. W innych przypadkach nowotwory te są wywoływane poprzez hipermetylację promotorów tych genów (Jones i Baylin, 2002). Najlepiej zbadane jest to w przypadku genu *BRCA1*, którego mutacje obserwuje się w rodzinnych nowotworach piersi. Jednakże 10-15% tych nowotworów to formy nierodzinne, gdzie następuje wyciszenie genu przez metylację (Jones i Baylin, 2002). W komórkach nowotworowych mutacje w obrębie jednego z alleli są aktywnie podtrzymywane, podczas gdy drugi allel ulega hipermetylacji, która jest kopiowana po kolejnych podziałach (Jones i Baylin, 2002). Jest to istotne biorąc pod uwagę, że wyłączenie dwóch alleli danego genu np. związanego z kontrolą cyklu bądź naprawą DNA, jest niezbędne dla uzyskania fenotypu nowotworowego (Knudson, 2000).

Jak istotne jest epigenetyczne wyciszenie genów w procesie nowotworzenia podkreśla także fakt wzrostu podatności genomowego DNA na mutagenezę. Produkt genu *MLH1* bierze udział w naprawie nieprawidłowych sparowań w DNA. Hipermetylację tego genu obserwuje się w nowotworach charakteryzujących się niestabilnością sekwencji mikrosatelitarnych. Gen *MGMT*, którego produkt zaangażowany jest w proces naprawy adduktów O<sup>6</sup>-metyloguaninowych (ich pozostawienie prowadzi do tranzycji G-A), ulega hipermetylacji w nowotworach okrężnicy, płuc, chłoniaków. Inaktywacja tego genu związana jest także z gromadzeniem się mutacji w p53 i K-RAS (Jones i Baylin, 2002).

### 3.6. Inhibitory DNMT1

Zaburzenia we wzorze metylacji są najlepiej scharakteryzowaną epimutacją (Denis, 2011). Odwracalność metylacji czyni z niej atrakcyjny cel w terapii chorób nowotworowych. Zahamowanie tego procesu w kolejnych podziałach komórki nie powoduje jej natychmiastowej śmierci, ale pozwala na aktywację wyciszonych przez hipermetylację genów supresorowych. Zatem farmakologiczne ograniczenie aktywności enzymu biorącego udział w kopiowaniu wzoru metylacji (DNMT1), prowadzące do reaktywacji genów proapoptycznych i regulatorów cyklu komórkowego w wyniku demetylacji, daje szansę na zatrzymanie procesu nowotworzenia (Lyko i Brown, 2005; Yoo i Jones, 2006). Celem terapii epigenetycznej jest zahamowanie rozwoju nowotworu i indukcja apoptozy w wyniku aktywacji wyciszonych genów supresorowych i proapoptycznych (Ryc. 6A) (Kaiser, 2010).

Obecnie stosowane leki będące inhibitorami DNMT1 - Vidaza (AzaC) i Dacogen (decytabina – AzadC) są pochodnymi cytydyny (Yoo i Jones, 2006). AzaC została opisana jako cytotoksyczna w stosunku do komórek nowotworowych (Constantinides i in., 1977). Wykazano jednocześnie, że powodowała ona przekształcanie się mysich komórek embrionalnych w komórki mięśniowe (Constantinides i in., 1977). Zasugerowano, że może mieć to związek ze zmianami w profilu metylacji DNA. Zatem azanukleozydy wykazują 2 typy aktywności antynowotworowej: – cytotoksyczność i demetylacja DNA (Cai i in., 2011).

Po wnikięciu do komórki AzaC i jej analogi ulegają fosforylacji przez kinazę urydynowo-cytydynową, a następnie wbudowaniu do łańcucha RNA. Po redukcji grupy

hydroksylowej znajdującej się przy C'2 rybozy przez reduktazę rybonukleotydową stają się substratem w syntezie DNA (Santini i in., 2001). Ok. 10% AzaC ulega tej reakcji (Martinet i in., 2012). Inhibicja procesu metylacji przez azanukleozydy polega na kowalencyjnym wiązaniu enzymu do DNA. Obecność bardziej elektroujemnego azotu w pozycji 5 pierścienia cytozyny powoduje wzrost elektrofilowości C6, co ułatwia atak katalitycznej cysteiny enzymu i metylację w pozycji 5. Przy braku protonu w pozycji N5, niezbędnego do odtworzenia podwójnego wiązania między pozycjami 5 i 6, wiązanie kowalencyjne pomiędzy enzymem a pierścieniem zasady nie ulega zerwaniu (Ryc. 6B) (Gowher i Jeltsch, 2004). Związanie enzymu do substratu (DNA) powoduje zmniejszanie puli aktywnych DNMT, w konsekwencji czego poziom m<sup>5</sup>C w powielanym genomie maleje. Traktowanie komórek nowotworowych związkami hamującymi metylację prowadzi do uaktywnienia grupy genów np. *p16*, *MLH1*, *RB*, które kontrolują proliferację komórki, jej różnicowanie, proces apoptozy i inne procesy utrzymujące homeostazę komórki (Yoo i Jones, 2006). Podnosi także acetylację histonów H3 i H4 w obrębie promotorów, co związane jest z utrzymaniem chromatyny w formie aktywnej (Cai i in., 2011). W celu obniżenia cytotoksyczności pochodnych 5-azacytydyny wykorzystano analogi deoksyrybonukleotydów: AzadC i jej pochodne, które ulegają fosforylacji za pośrednictwem kinazy deoksycytydynowej i są wbudowywane bezpośrednio do DNA (Yoo i Jones, 2006). AzadC hamuje aktywność nie tylko DNMT1 ale także DNMT3B (Cai i in., 2011). Potwierdzeniem aktywności AzadC w komórkach było obserwowane obniżenie stopnia złośliwości nowotworu w mysim modelu neoplazji przewodu pokarmowego poprzez hipometylację DNA (Laird i in., 1995) oraz aktywacja genu supresji nowotworowej *PDLIM2* hipermetylowanego w komórkach nowotworu piersi, prowadząca do zahamowania procesu nowotworowego (Qu i in., 2010). Zauważono także, że AzadC wzmacnia wrażliwość komórek nowotworu piersi MDA-231 na aktywność cytostatyków (taksol, doksorubicyna, 5-fluorouracyl) poprzez wpływ na geny regulujące cykl komórkowy (Xu i in., 2007; Mirza i in., 2010). Efektem działania AzadC w komórce jest również selektywna degradacja DNMT1 w proteasomach przebiegająca szybciej niż replikacja (Ghoshal i in., 2005).

Istotny jest fakt, że sygnał demetylacji jest trwały i w linii YB5 (linia nowotworu okrężnicy) traktowanej 5-aza-2'deoksycytydyną utrzymywał się nawet do 6 miesięcy.

AzaC i AzadC znalazły zastosowanie w leczeniu mielodysplazji (Kaminskas i in., 2005; Egger i in., 2004). Wykazano, że niskie dawki AzaC poprawiały stan zdrowia (o 30%) i długość przeżycia (o 60%) u starszych pacjentów z MDS (Silverman i in., 1993). Podobne wyniki uzyskano dla AzadC (Kantarjian i in., 2006). Stosowanie niskich dawek azanukleozydów w leczeniu epigenetycznym jest uzasadnione mechanizmem działania tych związków. Wysokie dawki powodują śmierć komórki wywołaną toksycznością związku. Natomiast w obecności niskich stężeń komórki przeżywają, ale z poprawionym wzorem metylacji (Kaiser, 2010). Potwierdzono utrzymywanie się zmian w ekspresji genów i ważnych szlakach sygnalizacyjnych zaangażowanych w proces nowotworzenia w wyniku inkubowania w krótkim czasie komórek z niskimi, nanomolarnymi dawkami azanukleozydów. Nie zaobserwowano natomiast uszkodzeń DNA, apoptozy czy zatrzymania cyklu komórkowego, które byłyby dowodem na ich cytotoksyczność. Natomiast komórki nabywały nowego, nienowotworowego fenotypu (Tsai i in., 2012). Nie potwierdzono jednak efektu terapeutycznego tych związków w terapii guzów litych (Weiss i in., 1977). Czynnikiem obniżającym efektywność azanukleozydów jest ich krótki okres półtrwania w roztworach wodnych. W roztworach o zasadowym pH pierścień zasady otwiera się, podczas gdy w pH kwaśnym hydrolizie ulega wiązanie glikozydowe. Wpływa to ujemnie na możliwość wykorzystania azanukleozydów jako leków stosowanych doustnie (Notari i DeYoung, 1975; Lin i in., 1981). Powstał jednak prolek w formie 2'3'5'-tiacetylo-5-azacytydyny, który w badaniach na myszach cechuje się lepszą biodostępnością, rozpuszczalnością i stabilnością i może być podawany doustnie (Ziemba i in., 2011).

W badaniach klinicznych, w czasie których ograniczono czas podawania AzaC do 2 tygodni, nie obserwowano indukcji nowotworów wtórnych, będących wynikiem hipometylacji (Yang in., 2003). Chociaż stosowanie AzaC poprawia przeżywalność pacjentów, to u większości z nich rozwijała się oporność na stosowany lek (Komashko i Farnham, 2010). W trakcie długotrwałej terapii należy także brać pod uwagę możliwość spowodowania mutacji i niestabilności chromosomów (Eden i in., 2003ab). Ponadto AzadC może aktywować nie tylko wyciszone geny supresji nowotworowej, ale także geny prometastatyczne (Cai i in., 2011). Zaobserwowano także, że długoterminowe stosowanie AzaC może prowadzić do uzłośliwienia ostrej białaczki promielocytowej (APL) w modelu mysim, prawdopodobnie poprzez hipometylację powodującą

aktywację onkogenów czy niestabilność chromosomów (Scaglioni i in., 2011). Inne badania pokazały, że związek ten wpływa na ekspresję genów znajdujących w aktywnej chromatynie, których promotory nie uległy wcześniejszej hipermetylacji (Komashko i Farnham, 2010). Wykazano, że AzaC blokuje metylację tRNA poprzez inhibicję DNMT2, co może wiązać się z prawdopodobnym hamowaniem innych RNA metylotransferaz oraz wpływać na strukturę i funkcjonowanie RNA (Schaeffer i in., 2009).

Anomer AzadC -  $\alpha$ -5-aza-2'-deoksycytydina wykazuje niższą aktywność w porównaniu do anomeru  $\beta$ , ponieważ nie może być inkorporowany do DNA. Związek ten jest także mniej toksyczny. Hamuje jednak aktywność DNMT1, co potwierdzono na komórkach mysiej białaczki L1210 i ludzkich komórkach białaczkowych CCRF-CEM (ang. *human T-cell lymphoblast-like cell line*) (Ferguson i in., 2011).

Analizowany był także wpływ dinukleotydu S110 (5-Aza-CpG) na reakcję metylacji. Stabilność oraz cytotoksyczność tego związku była porównywalna z AzadC. Azacytydina w S110 nie ulega deaminacji, co potencjalnie może wydłużyć okres półtrwania tego związku i jego biodostępność. Związek ten hamuje aktywność DNMT1 według tego samego mechanizmu jak decytabina (Ferguson i in., 2011).

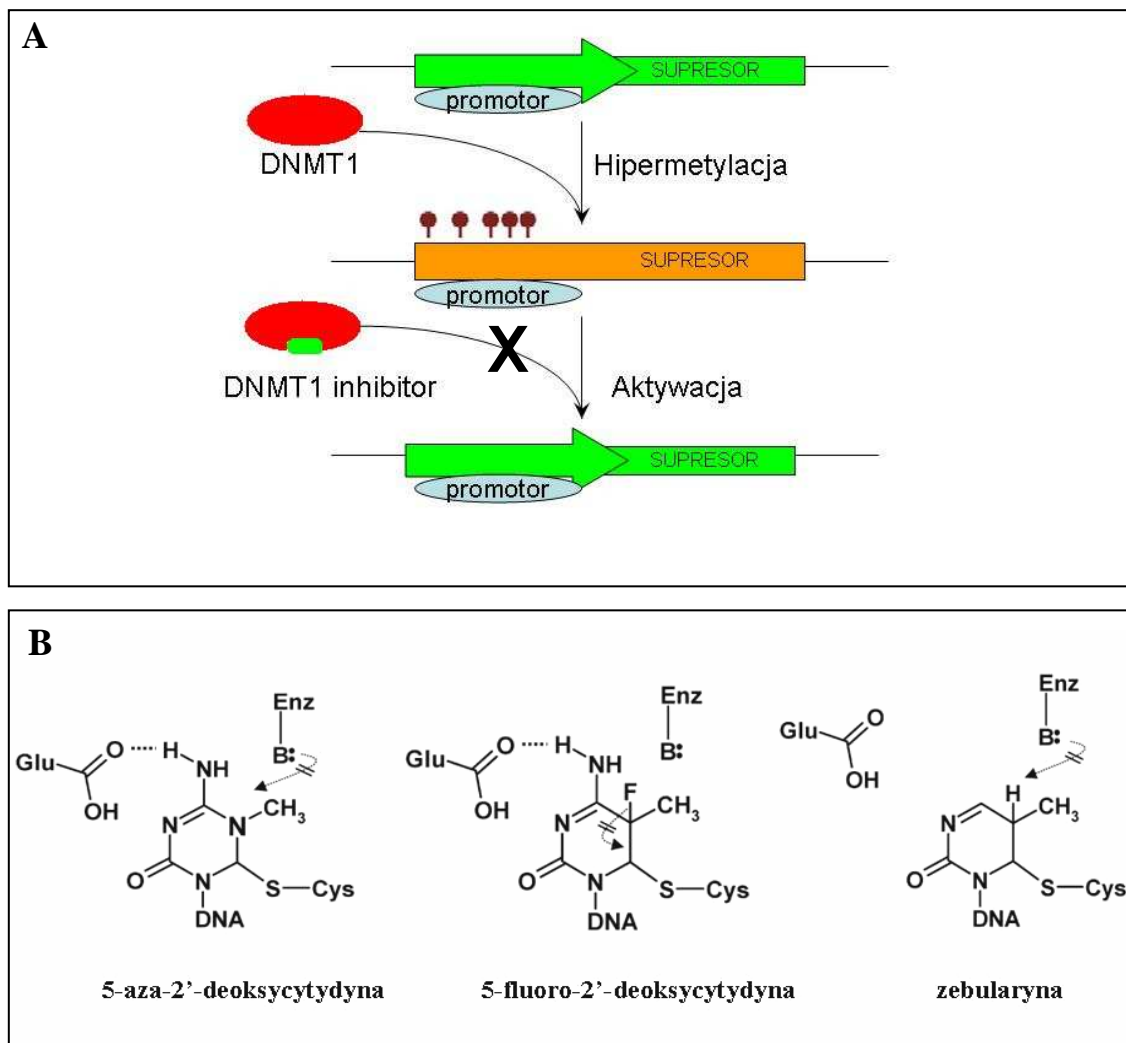
Niższą toksycznością i wyższą stabilnością w roztworach wodnych charakteryzuje się 5,6-dihydro-5-azacytydina (DHAC) (Beisler i in., 1976; Beisler i in., 1977; Presant i in., 1981; Stopper i in., 1995). Ponieważ wyniki uzyskane w etapie I i II były przeciwstawne i nie zauważono istotnego wpływu DHAC na demetylację *p16<sup>INK4a</sup>* w mesotheliomie, zaprzestano zatem badań nad tym związkiem (Curt i in., 1985; Ferguson i in., 2011).

Lepszy efekt uzyskano dla 5-fluoro-2'-deoksycytydyny (FdC). Podstawienie fluorem atomu wodoru przy C5, blokuje możliwość odtworzenia wiązania podwójnego pomiędzy atomami C5 i C6 i odłączenie enzymu (Ryc. 6B) (Eidinoff i in., 1959; Gowher i Jeltsch, 2004). Związek ten wykazuje wielokierunkową aktywność metaboliczną związaną z deaminacją do 5-fluorourydyny w komórkach ssaków, co ogranicza jego zastosowanie w terapii epigenetycznej (Yoo i Jones, 2006; Ferguson i in., 2011).

Inny analog cytydyny, zebularyna (1-beta-D-ribofuranosyl-2(1H)-pirymidyna), pozbawiona jest egzocyklicznej grupy aminowej, co ogranicza jej oddziaływanie z guanozyną, obniżając tym samym energię wiązania DNA z enzymem (Gowher

i Jeltsch, 2004). Związek ten pierwotnie został scharakteryzowany jako skuteczny inhibitor deaminazy cytydynowej. Zaletą zebularyny jest stabilność w środowisku obojętnym i kwaśnym oraz mniejsza toksyczność w stosunku do linii komórkowych niż 5-azanukleozydów, co stwarza potencjalną możliwość doustnego przyjmowania tego leku (Cheng i in., 2003). Ponadto w badaniach na komórkach nowotworowych obserwowano znaczne ograniczenie wzrostu komórek pod wpływem zebularyny w porównaniu z linią fibroblastów. Było to efektem zwiększonej aktywacji ekspresji genu *p21*, którego produkt hamuje proliferację (Cheng i in., 2004). Ze względu na znacznie wyższą aktywność kinazy urydynowo-cytydynowej w komórkach nowotworowych, zebularyna jest inkorporowana do DNA w większym stopniu niż w komórkach prawidłowych (Cheng i in. 2004). Oprócz hamowania aktywności DNMT1 zebularyna wpływa na hamowanie wiązania MBD oraz zmienia profil acetylacji histonów. Wykazano, że związek ten ma właściwości antymitogenne i angiostatyczne (Cai i in., 2011). Istotną wadą jest jednak jego niska biodostępność, co powoduje konieczność stosowania milimolowych stężeń w celu uzyskania stężenia terapeutycznego w surowicy krwi (Holleran i in., 2005). Ponadto wykazano, że jest ona wysoce mutagenna dla komórek *E. coli* (Lee i in., 2004).

W celu obniżenia wysokiej toksyczności AzadC wynikającej z wbudowania do łańcucha DNA, została ona wprowadzona w dziesięcionukleotydowy oligomer DNA o strukturze helisy zamkniętej na końcach przez dwie pętle. Cząsteczka ta wiąże się kowalencyjnie z DNMT1 (Vives i in., 2004; Kuch i in., 2008). Jej charakterystyczny kształt ma na celu przedłużenie okresu półtrwania w surowicy pacjenta (Kuch i in. 2008). Wykazano, że związek ten wydajnie wnika do jądra komórkowego powodując znaczne obniżenie aktywności proliferacyjnej komórek. Jednocześnie pozbawiony jest toksyczności charakteryzującej wolną AzadC. Powstawanie kompleksu dodekamer-DNMT1 potwierdzono w badaniach *in vitro* (Kuch i in., 2008).



**Rycina 6. A-** Cel terapii epigenetycznej. Zastosowanie inhibitorów DNMT1 ogranicza aktywność tego enzymu. Demetylacja promotorów wyciszonych genów, np. supresji nowotworowej prowadzi do ich aktywacji. **B-** Mechanizm inhibicji DNMT1 przez pochodne nukleozydowe. Przyczyną tworzenia się trwałego kowalencyjnego kompleksu enzym-DNA jest zastąpienie w cząsteczce AzadC węgla akceptorowego bardziej elektroujemnym atomem azotu. Zwiększa to elektrofilowość atomu C6, co ułatwia atak grupie tiolowej enzymu. W obecności SAM, grupa metylowa przenoszona jest na N5, jednak brak jest protonu, który niezbędny jest do uwolnienia enzymu i odtworzenia wiązania podwójnego pomiędzy atomami 5 i 6. 5-fluoro-2'-deoksycytydina ma atom fluoru zamiast protonu przy atomie C6, który w procesie metylacji zastępowany jest grupą metylową. Ponieważ atom fluoru jest słabą grupą odchodzącą, jego obecność hamuje proces  $\beta$ -eliminacji i uwolnienia enzymu. Zebularyna hamuje DNA metylotransferazę poprzez tworzenie wiązania kowalencyjnego w następstwie ataku cysteiny na C6. Mimo obecności protonu przy atomie C5 proces  $\beta$ -eliminacji nie zachodzi. Wynika to z braku grupy 4-aminowej powodującego przesunięcie reakcji w kierunku tworzenia kompleksu enzym-DNA. Glu- reszta kwasu glutaminowego motywu VI. B- akceptor wodoru (prawdopodobnie reszta arginy motywu VIII lub odchodząca grupa tiolanowa lub grupa fosfodiesterowa) (Gowher i Jeltsch, 2004).



Analizowany jest efekt terapii łączonej, w której wykorzystywane są inhibitory nie tylko DNMT1, ale także innych enzymów biorących udział w regulacji epigenetycznej, w tym deacetylaz histonów (HDAC). Jednoczesne podanie dwóch typów inhibitorów podnosi skuteczność działania związków hamujących aktywność HDAC. Zaobserwowano także, że zastosowanie inhibitorów HDAC prowadzi do aktywacji genów, których promotory pozostają hipermetylowane (Raynal i in., 2012).

Oznacza to, że metylacja nie uniemożliwia ekspresji genów i nie zapobiega ich aktywacji w wyniku remodelowania chromatyny, a jednoczesne zastosowanie obu typów inhibitorów zwiększa szanse na aktywację wyciszonych genów supresorowych (Raynal i in., 2012).

W badaniach klinicznych wykazano, że terapia łączona (inhibitory DNMT1/HDAC) zahamowała lub ograniczyła wzrost nowotworu u 8 z 28 pacjentów. Jednakże oznacza to, że u ok. 2/3 pacjentów terapia ta nie zakończyła się sukcesem. Tłumaczone jest to słabą absorpcją leków do zmienionej tkanki i/lub mutacjami wywołanymi przez wcześniejszą chemioterapię, które spowodowały nabycie odporności na leki, których miejscem docelowym są jądra komórkowe (Kaiser, 2010).

Obecnie prowadzonych jest ponad 30 badań klinicznych związanych z zastosowaniem terapii azanukleozydami w połączeniu z standardową chemoterapią lub inhibitorami HDAC np. AzaC i inhibitor HDAC (romidepsyna) w leczeniu zaawansowanych guzów litych (Martinet i in., 2012).

Druga grupa inhibitorów DNMT1 obejmuje związki blokujące centrum aktywne enzymu, które nie są pochodnymi nukleozasad (Ryc. 7 i 8). Jej przedstawicielem jest RG-108. Związek ten znacząco obniża poziom metylacji genomu i nie wykazuje aktywności cytotoksycznej. Jego zastosowanie jest jednak ograniczone ze względu na wysoką hydrofobowość (Brueckner i in., 2005; Stresemann i in., 2006).

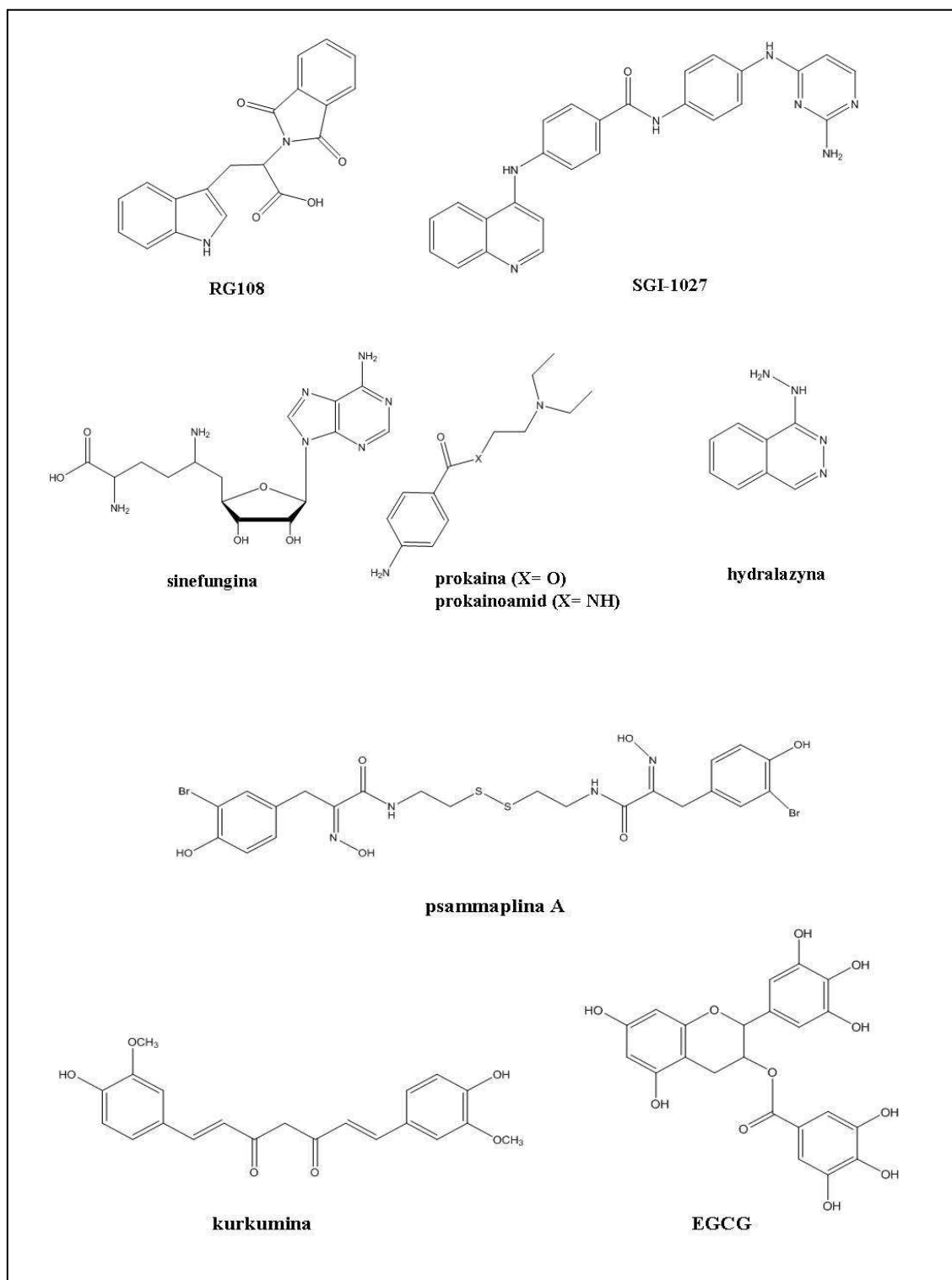
Pod kątem inhibicji kompetycyjnej DNMT1 badano także stabilną w roztworach wodnych hydralazyne, która charakteryzuje się niską cytotoksycznością. Hamuje ona wzrost komórek nowotworowych *in vivo* powodując aktywację ekspresji genu APC poprzez jego demetylację. W badaniach *in vitro* pokazano jednak różną wrażliwość nowotworowych linii komórkowych na ten związek (Song i Zhang, 2009). Hydralazyne przeszła pozytywnie I etap badań klinicznych. W II etapie testowana jest aktywność tego związku w połączeniu z standardową chemioterapią cytotoksycznymi (Cai i in., 2011).

Poszukując efektywnych terapeutyków analizowano także analogi SAM pozbawione grupy metylowej. Przykładem jest sinefungina, której stała inhibicji ( $K_i$ ) dla metylotransferazy EcoRI wynosi 10nM. Mechanizm działania tego związku polega na trwałym wiązaniu enzymu z DNA (Reich i Mashhoon, 1990). Efektem działania tego typu związków są mutacje wywołane deaminacją  $m^5C$  do T (Zingg i in., 1996).

Podejmowane są również próby blokowania dostępu metylotransferazy do sekwencji docelowej na DNA. W tym celu wykorzystuje się związki wiążące się do dinukleotydów CpG. Właściwości takie wykazują pochodne kwasu 4-aminobenzoowego: prokaina, stosowana jako środek miejscowo znieczulający i prokainoamid, lek antyarytmiczny (Villar-Garea i in., 2003; Stresemann i in., 2006). Prokaina powodowała obniżenie poziomu metylacji DNA w ludzkich komórkach nowotworowych (linia nowotworu piersi MCF-7). Stosowana w stężeniu 2mM wykazywała średnią indukcję apoptozy. Była jednak dobrze tolerowana przez komórki (Stresemann i in., 2006).

Przykładem inhibitora niekompetycyjnego jest pochodna chinoliny (SGI-1027). Związek ten charakteryzuje się wysoką liofilowością. W analizie jego wpływu na komórki H4IIE i HCT116 wykazano demetylację genów supresji nowotworowej p16, MLH1 i TIMP3, a także kierowanie DNMT1 do degradacji w proteasomach. Obserwowano także inhibicję wzrostu przy braku cytotoksyczności i aktywacji apoptozy, a także nieznaczny tylko wzrost stężenia białka GSH – markera stresu oksydacyjnego (Datta i in., 2009; Ferguson i in., 2011).

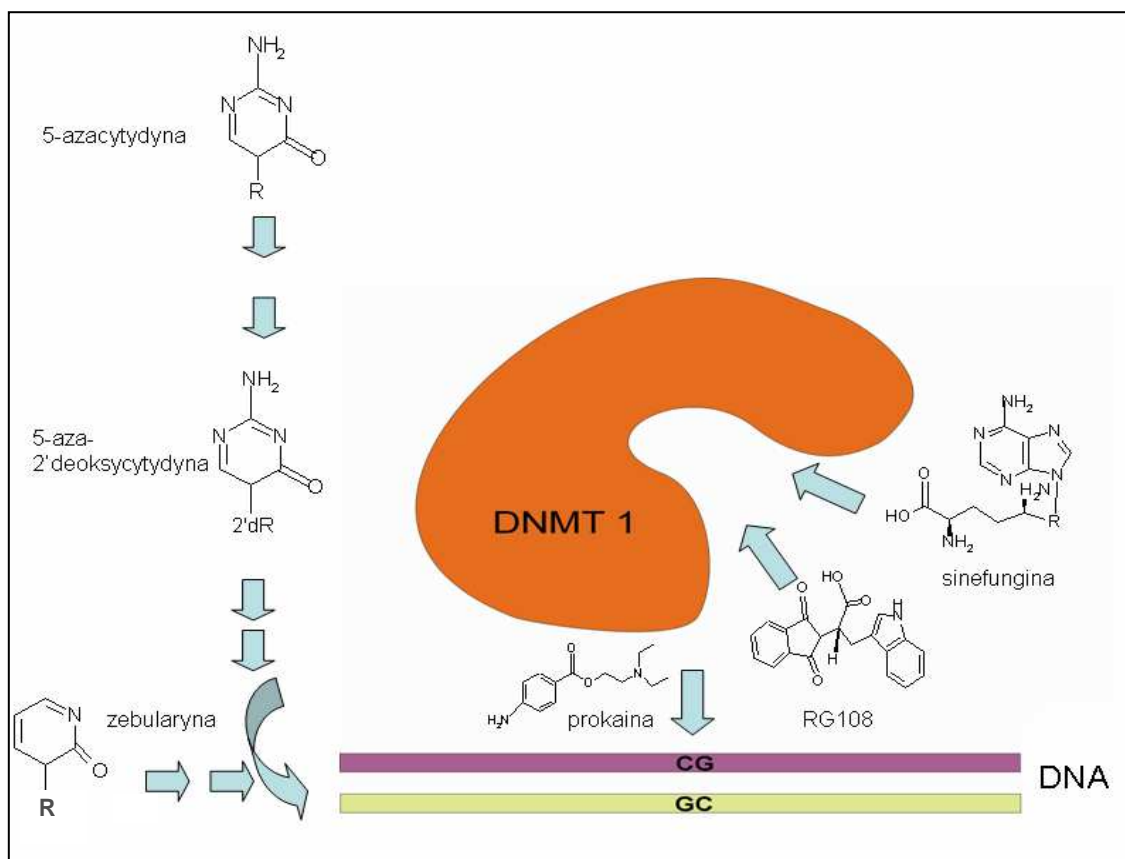
Ze względu na spodziewaną niską cytotoksyczność, inhibitorów DNMT1 poszukuje się także wśród związków pochodzenia naturalnego (Liu i in., 2009). Przykładem jest psammaplina, pochodna bromotyrozyny uzyskiwana z gąbki *P. purpurea*, która inhibuje aktywność DNMT1 *in vitro* (Piña i in., 2003). Wydaje się, że elementem niezbędnym w procesie inhibicji DNMT1 jest bisulfidowy łącznik przyłączony do grupy hydroksyiminoamidowej. Psammaplina A inhibuje wszystkie DNMT i deacetylazy histonów, natomiast psammaplina G wykazuje specyficzną aktywność tylko w stosunku do DNMT1 (Piña i in., 2003). Negatywnym aspektem działania psammapliny A jest ograniczanie aktywności także innych enzymów na przykład topoizomerazy II (Kim i in., 1999).



**Rycina 7.** Inhibitory nienukleozydowe DNMT1. Mechanizm ich działania polega na bezpośrednim, odwracalnym wiązaniu do enzymu. Nie wymagają wbudowania do DNA (Martinet i in., 2012).

Jednym z najszerzej badanych związków naturalnych jest galusan epigalokatechiny (EGCG) będący głównym polifenolem zielonej herbaty (Fang i in., 2003). Pokazano, że powoduje on spadek metylacji DNA w komórkach nowotworowych i wzrost transkrypcji genów supresji nowotworowej (Fang i in., 2003). Za pomocą modelowania komputerowego wykazano, że EGCG potencjalnie może oddziaływać z ważnymi katalitycznie resztami DNMT1, których zadaniem jest stabilizacja struktury helisy DNA w czasie reakcji metylacji poprzez oddziaływanie z cytozyną (Fang i in., 2003). Inne badania nie potwierdzają wpływu EGCG na metylację DNA w komórkach (Stresemann i in., 2006). Wysunięto natomiast hipotezę, że inhibicja DNMT1 w liniach komórkowych jest skutkiem stresu oksydacyjnego wywołanego przez EGCG. Wykazano bowiem, że EGCG ulega deprotonacji w środowisku obojętnym i zasadowym (pH 6,8-7,8), czego efektem jest powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), który następnie uczestniczy w reakcji Fentona. W jej wyniku tworzą się toksyczne rodniki hydroksylowe  $\bullet\text{OH}$ . Oznacza to, że wpływ EGCG na metylację jest pośredni (Nakagawa i in., 2004; Elbling i in., 2005; Stresemann i in., 2006).

Innym przykładem aktywnego związku pochodzenia roślinnego jest kurkumina, polifenol występujący w ostryżu (*Curcuma longa*). Związek ten charakteryzuje się niską wartością IC<sub>50</sub> (30nM) dla prokariotycznego enzymu SssI, a modelowanie komputerowe wskazuje, że potencjalnie może on oddziaływać w obrębie miejsca katalitycznego DNMT1. Kurkumina wiąże się do ponad 30 różnych białek, przez co blokuje wiele szlaków przekazywania sygnałów, proliferację komórek, inwazyjność oraz zdolność do metastazy i angiogenezy komórek nowotworowych. Wykazuje także właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Niska biodostępność spowodowana jej słabą absorpcją w jelitach oraz krótkim czasem połowicznej eliminacji z organizmu (1,45h) nie pozwala na bezpośrednie wykorzystanie w terapii nowotworów (Kunnumakkara i Aggarwal, 2008; Liu i in., 2009).



**Rycina 8.** Inhibicja DNMT1. 5-azacytydina, 5-aza-2'-deoksytydina, zebularyna ulegają wbudowaniu w łańcuch DNA, a następnie hamują działanie DNMT1 poprzez tworzenie trwałych kompleksów z tym enzymem. Prokaina wiążąc się z sekwencjami CpG blokuje dostęp DNMT1 do tych sekwencji. RG108 i sinefungina blokują centrum aktywne hamując katalizowaną przez niego reakcję. 2'dR – 2-deoksyrzyboza, R- ryboza (Brueckner i in., 2007).

### 3.7. Inhibitory UHRF1

Odkrycie udziału białka UHRF1 w procesie metylacji rozszerza potencjalne cele dla poszukiwań nowych terapeutyków przeciwnowotworowych. Określenie struktury krystalicznej domeny SRA białka UHRF1 stwarza możliwość modelowania inhibitorów tego białka blokujących kieszeń wiążącą  $m^5C$ . Jednakże celem dla terapeutyków mogą być także domeny PHD i RING wiążące się do metylowanej H3K9 i E3 ligazy ubikwitynowej. Kombinacja inhibitorów daje większe szanse na zahamowanie funkcji UHRF1 (Unoki i in., 2009).

### **3.8. Analiza zależności pomiędzy strukturą i właściwościami fizyko-chemicznymi a aktywnością związków**

Współczesne metody poszukiwania specyficznych inhibitorów w dużej mierze wspomagane są analizą właściwości fizykochemicznych związków, które wpływają na siłę wiązania do enzymu (Copeland, 2000). Oddziaływanie pomiędzy ligandem a enzymem wymaga odpowiedniego dopasowania przestrzennego cząsteczki do miejsca wiązania, przy czym oba składniki powinny przyjmować struktury o niskiej energii konformacji. Ważną rolę odgrywają wiązania wodorowe tworzące się pomiędzy białkiem a inhibitorem. Konsekwencją wzrostu ich ilości jest silniejsze oddziaływanie między nimi. Istotne są także oddziaływania przeciwnie naładowanych grup funkcyjnych czy też grup lipofilowych inhibitorów w obrębie kieszeni hydrofobowej enzymu (Bohm i Klebe, 1996). Tworzenie się kompleksu enzym-inhibitor związane jest także z lipofilowością związków i resztami hydrofobowymi w centrum aktywnym. Oddziaływania hydrofobowe są wynikiem uwolnienia cząsteczek wody znajdujących się w centrum aktywnym (nie tworzą z nim wiązań wodorowych) w wyniku wiązania inhibitora. Obserwuje się zależność liniową pomiędzy ilością oddziaływań hydrofobowych oraz wiązań wodorowych a stałą wiązania inhibitora (Bohm i Klebe, 1996).

Właściwości fizykochemiczne związków odgrywają istotną rolę w procesach absorpcji i dystrybucji leku w organizmie. Badanie zależności pomiędzy strukturą a funkcją doprowadziły do sformułowania kryteriów, których spełnienie uprawdopodobnia zastosowanie związku w leczeniu. Tworzą one regułę Lipińskiego tzw. reguła 5-ciu, a związek, który ją spełni, powinien cechować się  $MW < 500$  Da,  $\log P < 5$ ,  $H_d < 5$ ,  $H_a < 10$  (Lipiński i in. 1997). Pozwalają ona na wyselekcjonowanie związków biodostępnych, cechujących się wysokim poziomem przenikalności przez błony oraz odpowiednią absorpcją, dystrybucją, metabolizmem, wydalaniem z organizmu i niską toksycznością (ADMET). Należy jednak pamiętać, że reguła ta stanowi tylko wskazówkę i około 20% wszystkich leków nie spełnia co najmniej 1 z tych zasad (Lipiński i in., 1997).

Lipofilowość związków, wynikająca z hydrofilowości/hydrofobowości i polarności, określana jest za pomocą współczynnika ich rozdziału pomiędzy układem rozpuszczalników: polarnym-niepolarnym (woda-octanol). LogP (logarytm z wartości

rozdziálu pomiędzy obie fazy) jest jednym z najczęściej analizowanych parametrów SAR i wydaje się być najważniejszym, gdyż nawet jeśli lek nie spełnia pozostałych zasad, najczęściej wartość LogP jest niższa niż 5. Średnią wartością tego parametru wśród leków jest 0 (Ganesan, 2008; Grabowski i in., 2008). LogP określa zdolność związków do przenikania przez błony biologiczne, a jego wysokie wartości (leki wysoce lipofilowe) oznaczają najczęściej niską biodostępność. Powodem jest wiązanie się do błon komórkowych i utrudniona dystrybucja w środowisku hydrofilowym (Grabowski i in., 2008). Ponadto wysoka lipofilowość wiąże się z niską polarnością, co wydłuża ich okres półtrwania i wymaga transformacji przez odpowiednie enzymy do form bardziej polarnych, aby lek mógł być usunięty do moczu w czasie filtracji krwi w nerkach (Grabowski in., 2008).

Polarne pole powierzchni (PSA ang. *polar surface area*) wydaje się być drugim najistotniejszym parametrem wpływającym na biodostępność cząsteczek. Na podstawie analizy SAR związków znajdujących się w Światowym Indeksie Leków (ang. *Word Drug Index*), potwierdzono, że znacząca większość z nich cechowała się wartością PSA <140Å, co korelowało z wysoką biodostępnością. Powyżej 250Å związki cechują się niską biodostępnością związaną z niską dystrybucją i możliwością przenikania przez błony komórkowe. tPSA (ang. *topological polar surface area*) jest pochodną PSA, otrzymywaną na podstawie analizy głównych podstawników związków (Ertl i in., 2000; Grabowski i in., 2008). Parametr tPSA liczony jest jako suma powierzchni molekularnych (van der Waals'a) atomów polarnych, takich jak np. tlen, azot i związanych z nimi atomów wodoru. Wskazuje on powierzchnię, którą związek będzie się wiązał z danym białkiem. Uznawany jest również za dobry wskaźnik absorpcji jelitowej, przenikalności przez błony, w tym także przez barierę krew-mózg (Kumar i in., 2010).

Obecność atomów będących donorami lub akceptorami wiązań wodorowych wpływa na rozpuszczalność związków w wodzie, transport przez błony i dystrybucję w organizmie. Aby związek cechował się odpowiednią biodostępnością powinien posiadać nie więcej niż 5 donorów wiązań (Hd) (atomów tlenu lub azotu) oraz nie więcej niż 10 akceptorów (Ha) tych wiązań (Kumar i in., 2010).

Wpływ na biodostępność związków ma także ich masa cząsteczkowa, która nie powinna przekraczać 500Da. Istotna jest również ilość wiązań rotujących, których obecność ułatwia zmianę konformacji i dopasowanie związku do kieszeni wiążącej.

Są one definiowane jako każde wiązanie pojedyncze (nie w pierścieniu), z wyjątkiem wiązań z atomami ciężkimi oraz wiązania amidowego C-N, które ma charakter wiązania podwójnego. Większość leków ma od 0 do 12 wiązań rotujących (Kumar i in., 2010).



## 4. Materiały i metody

### 4.1. Wykaz materiałów stosowanych w pracy

#### 4.1.1. Ważniejsze odczynniki, enzymy oraz zestawy gotowych odczynników

*Tabela 1. Zestawienie odczynników chemicznych i biochemicznych wykorzystywanych w pracy.*

Odczynnik	Producent
Zestaw do izolacji plazmidowego i genomowego DNA, zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych	A&A Biot
Kolumnienki NucAway Spin ze złożem typu Sephadex	Ambion
Kinaza polinukleotydomowa z faga T4	Amersham Pharmacia
Pożywka DMEM	ATCC
Bacto-Agar, Bacto-Trypton, ekstrakt drożdżowy	Disco
Enzymy restrykcyjne: MspI, HpaII, standard (marker) wielkości DNA (1 kpz)	Fermentas
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	Hartmann Analytic
Pożywka OPTIMEM, FBS	Invitrogen
$[\text{}^3\text{H}]\text{SAM}$	PerkinElmer
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA, agarozą wzbogaconą niklem	Qiagen
Kwas borowy, bursztynian sodu, chlorek magnezu, chlorek potasu, chlorek wapnia, chlorek sodu, cytrynian sodu, EDTA, wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu, glukoza, DMSO, ATP, pożywki RPMI-1640 Medium i DMEM, MTT	Sigma
PMSF (fluorek fenylometylosulfonowy)	Serva

*Tabela 2. Enzymy stosowane w pracy.*

Enzym	Producent
DNA metylotransferaza CpG (SssI)	NEB
Kinaza polinukleotydomowa z faga T4	Amersham Pharmacia
Nukleaza mikrokokalna	Sigma
Fosfodiesteraza II ze śledziona	Sigma
Apyraza	Sigma
Enzymy restrykcyjne NruI, HpaII, MspI	Fermentas
Nukleaza P1	Sigma
Ulp1 (proteaza SUMO)	Sigma
Glikozylaza foramidopirymidynowa (FPG)	Sigma

#### 4.1.2. Związki niskocząsteczkowe

Związki pochodziły z:

- Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN:

Pracowni Chemii Biookoniugatów (związki nr 1-27, 32, 35, 37, 39)

Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów (związki nr 41, 43, 44, 45, 46, 48)

Pracowni Chemii Nukleozydów (40)

- Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, Wydział Chemii:

Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów (związek nr 49)

- związki dostępne komercyjnie (związki nr 28, 29, 30, 31, 33, 34, 36, 38, 42, 47, 50, 51, 52 (Sigma, Olchemim))

#### 4.1.3. Oligodeoksyrybonukleotydy

Jednoniciowe oligodeoksynukleotydy (Tab. 3) syntetyzowane były w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie i Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

*Tabela 3. Zestawienie oligodeoksyrybonukleotydów stosowanych w pracy.*

Nazwa	Sekwencja zapisana od końca 5' do 3'
T7 start	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 stop	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
34A	G <sup>m5</sup> CGCC <sup>m5</sup> CGCATGGG <sup>m5</sup> CGAT <sup>m5</sup> CGATGGGCC <sup>m5</sup> CGCAT <sup>m5</sup> CGG
34B	CCGATGCGGGCCCATCGATCGCCCATGCGGGCGC

#### 4.1.4. Plazmidy

W badaniach wykorzystano 2 typy plazmidów:

- pUC18 - plazmid wysokokopijny, przystosowany do powielania w szczepie *E. coli* NovaBlue w obecności ampicyliny (50µg/ml). Plazmid zawiera 156 potencjalnych miejsc metylacji CpG,
- pET28a - plazmid ekspresyjny, zawierający promotor dla T7 polimerazy RNA przystosowany do ekspresji w obecności kanamycyny (60µg/ml) w szczepie *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

#### 4.1.5. Materiał biologiczny

- Szczepy *E. coli*:

*Escherichia coli* NovaBlue (Novagen) – szczep bakteryjny zapewniający wysoką wydajność transformacji metodą szoku cieplnego.

*Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) – szczep bakteryjny zapewniający wysoką ekspresję białek heterologicznych, dzięki obecności dodatkowych genów dla tRNA: argU (tRNA<sup>Arg</sup> rozpoznające kodony AGA, AGG), ileY (tRNA<sup>Ile</sup>, AUA), leuW (tRNA<sup>Leu</sup>, CUA) kodowanych na plazmidzie pACYC zawierającym gen oporności na chloramfenikol.

- Eukariotyczne linie komórkowe:

W badaniach wykorzystano: linie komórek nowotworowych z raka szyjki macicy (HeLa), glejaka wielopostaciowego (U118), linię komórkową wyprowadzoną z ludzkich komórek śródbłonkowych nerki (HEK293) oraz komórki nowotworów jelita grubego: HCT116 p53 +/+ i p53 -/- i CaCo-2. Eksperymenty z wykorzystaniem linii HCT116 i CaCo-2 przeprowadzone zostały w Molecular and Environmental Biology Centre, Biology Department, Minho University, Braga, Portugalia.

#### 4.1.6. Pożywki, bufory i roztwory

- Pożywki:

Pożywka LB płynna

1% Bakto-Trypton

0,5% ekstrakt drożdżowy

1% NaCl

Pożywka LB stała

1% Bakto-Trypton

0,5% ekstrakt drożdżowy

1% NaCl

1,5% agar

Pożywka SOC

2% Bakto-Trypton

0,5% ekstrakt drożdżowy

0,5% NaCl

2,5mM KCl

20mM glukoza

Pożywkę sterylizowano przez autoklawowanie. Glukozę dodawano po schłodzeniu do temperatury 50°C.

50xM

1,25M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,25M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2,5M NH<sub>4</sub>Cl

0,25M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Pożywka MDG

400μl 1M MgSO<sub>4</sub>

100μl zestaw soli

2,5ml 40% glukoza

10ml 5% asparaginian

4ml 50xM

183ml H<sub>2</sub>O

Pożywka ZY

10g Bakto-Trypton  
5g ekstrakt drożdżowy  
1000ml H<sub>2</sub>O

50x5052

25g glicerol  
2,5g glukoza  
10g α-laktoza  
75ml H<sub>2</sub>O

Zestaw soli

50μM FeCl<sub>3</sub> (rozpuszczone w 0,1M HCl)  
20μM CaCl<sub>2</sub>  
10μM MnCl<sub>3</sub>  
2μM ZnSO<sub>4</sub>  
2μM CoCl<sub>2</sub>  
2μM CuCl<sub>2</sub>  
2μM NiCl<sub>2</sub>  
2μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>  
2μM Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>  
2μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Pożywka autoindukcyjna ZYM-5052

479ml pożywka ZY  
1ml 1M MgSO<sub>4</sub>  
100μl zestaw soli  
10ml 50x5052  
10ml 50xM

Pożywki do hodowli linii komórkowych

RPMI-1640 Medium (Sigma)  
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma)  
DMEM (Dulbecco's Midified Eagle Medium) (ATCC)  
OpitMEM (Invitrogen)

Pożywki uzupełnione były 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), 1% roztworem antybiotyków oraz 1% mieszaniną witamin.

- Bufory:

Bufor 10x TBE pH 8,3

0,5mM Tris-HCl pH 8,3

0,5mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

10mM EDTA pH 8,0

Bufor obciążający 2x stężony do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych

2mM Tris-HCl pH 7,5

4% glicerol

0,2% bromofenol

0,2% ksylencjanol

Bufor obciążający 6x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

30% glicerol

0,25% bromofenol

0,25% ksylencjanol

1x TBE pH 8,3

Bufor obciążający do elektroforezy białek

25mM Tris-HCl pH 6,8

0,8% SDS

2mM DTT

0,1% błękit bromofenolowy

20% glicerol

Bufor bursztynianowy 2x stężony

1M bursztynian sodu pH 6,3

20mM CaCl<sub>2</sub>

Bufor bicynowy 10x stężony

100mM bicyna-NaOH pH 9,7

100mM MgCl<sub>2</sub>

100mM DTT

10mM spermina

Bufor lizujący pH 10

2,5M NaCl

100mM Na<sub>2</sub>EDTA

10mM Tris-HCl

NaOH do osiągnięcia pH roztworu 10 (ok. 8g/1l)

1% Triton-X100 (dodawany tuż przed użyciem buforu)

Bufor przechowywany w temp. 4°C

Bufor do elektroforezy białek na żelu PAA 1x stężony

25mM Tris-HCl pH 8,3

0,1% SDS

0,2M glicyna

Bufor hybrydyzacyjny 5x stężony

250mM Tris-HCl pH 8

5mM EDTA

Bufor do rozcieńczenia FPG

50mM HEPES pH 7,6

10% glicerol

250mM NaCl

1mM EDTA

1mM DTT

Bufor do reakcji z FPG 10x stężony

0,5M Tris-HCl pH 7,5

0,5M KCl

20mM EDTA

Bufor do sonikacji bakterii

100mM bufor fosforanowy pH 7,4

0,6 M NaCl

0,2%  $\beta$ -merkaptoetanol

1% glicerol

PMSF 40mg/ml

Bufor A1

0,02M imidazol

0,1M Tris-HCl pH 7

0,05M NaCl

Bufor A2

0,1M imidazol

0,1M Tris-HCl pH 7

0,05M NaCl

Bufor A3

0,2M imidazol

0,1M Tris-HCl pH 7

0,05M NaCl

Bufory dostępne komercyjnie:

Bufor do DNA metylotransferazy SssI NEBuffer 2 10x stężony (NEB)

Bufor do kinazy polinukleotydowej faga T4 10x stężony (Amersham Pharmacia)

Bufor PBS pH 7,4 1x stężony

Bufor do hydrolizy proteazą Ulp1 10x stężony

Bufor Tango do hydrolizy enzymem HpaII 10x stężony

- Roztwory:

Roztwór do elektroforezy w teście kometkowym pH 13

300mM NaOH

1mM Na<sub>2</sub>EDTA



Roztwór do barwienia żeli białkowych

50% metanol

10% kwas octowy

1,25% błękit Coomassie Brilliant Blue

Roztwór do odbarwiania żeli białkowych

10% kwas octowy

40% metanol

Faza ruchoma izomasłowa

kwas izomasłowy/amoniak/H<sub>2</sub>O (66/1/17)

Faza ruchoma fosforanowa

0,1M fosforan sodowy pH 6,8/siarczan amonu/ alkohol n-propylowy (100ml/60g/1,5ml)

Roztwór scyntylacyjny

1l toluen

4g 2,5-difenylookszazol (POP)

0,2g 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)benzene (POPOP)

#### **4.1.7. Ważniejsza aparatura stosowana w pracy**

Aparaty do elektroforezy (Kucharczyk, BioRad)

Czytnik mikropłytek Synergy2 (Biotek)

Kasety do autoradiografii z ekranem wzmacniającym (FujiFilm)

Komora z przepływem laminarnym Biohazard II – model Bioban (Sterile)

Inkubator CO<sub>2</sub> (New Brunswick, model Galaxy 170S)

Licznik scyntylacyjny (Beckman  $\gamma$ -mate II)

Sonikator Vibra-cell (Sonics)

Spektrofotometr NanoDrop

Suszarka do żeli (Biometra)

System dokumentacji żeli GelDoc (UVP)

pH-metr pH213 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments)

Urządzenie odwzorowujące FLA-5100 (FujiFilm)

Wytrząsarka orbitalna IKA KS 130 Basic

Wytrząsarka powietrzna do hodowli bakteryjnych (New Brunswick)

## 4.2. Metody rozdziálu i analizy oligodeoksyrybonukleotydów

### 4.2.1. Elektroforetyczny rozdział kwasów nukleinowych w natywnym żelu poliakrylamidowym

Oligodeoksyrybonukleotydy i produkty ich hybrydyzacji (dsDNA) analizowano w 20% żelu poliakrylamidowym o wymiarach 10x10cm i grubości 0,4mm przy natężeniu 30mA w temperaturze pokojowej. Elektroforezę prowadzono w buforze 1xTBE. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym do kwasów nukleinowych w stosunku 1:1 (Ausubel i in., 1994).

*Tabela 4. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego do analizy kwasów nukleinowych.*

<b>Składniki</b>	<b>20%</b>
30% akrylamid/bisakrylamid (19:1)	67 ml
10 x TBE	10 ml
H <sub>2</sub> O	Do 100 ml
10% APS	700 µl
100% TEMED	35 µl

### 4.2.2. Elektroforetyczny rozdział kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Plazmidowy lub genomowy DNA (500-1000ng) izolowany z hodowli bakteryjnych lub linii komórkowych oraz kompleksy białkowo-oligodeoksyrybonukleotydowe analizowano w 0,5 – 2% żelach agarozowych o wymiarach 10cm x 10cm i 15x13cm grubości 0,5 lub 1cm w obecności BrEt. Przed rozdziałem elektroforetycznym preparaty obciążano 1/6 objętości buforu do elektroforezy agarozowej. Rozdział prowadzono w buforze 1x TBE przy natężeniu prądu 25-50mA w temperaturze pokojowej lub chłodni (4°C) w obecności markerów wielkości DNA 1kpz (Fermentas) (Ausubel i in., 1994).

*Tabela 5. Skład żeli agarozowych.*

<b>Składniki</b>	<b>0,5% żel agarozowy</b>	<b>2% żel agarozowy</b>
Agaroza	0,25 g	1 g
1x bufor TBE	50 ml	50 ml
Bromek etydyny	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml

### 4.2.3. Identyfikacja kwasów nukleinowych w żelach i roztworze

Oligodeoksyrybonukleotydy i dsDNA identyfikowano na żelu PAA wykorzystując roztwór błękitu toluidyny.

Znakowane radioaktywnie 5' monofosforany deoksyrybonukleozydów oraz dsDNA analizowano za pomocą autoradiografii. Ekspozycję żeli lub płytek chromatograficznych prowadzono w temperaturze pokojowej stosując ekrany odwzorowujące (ang. *storage phosphore screen*). Optymalny czas ekspozycji ustalano na podstawie pomiaru radioaktywności próbek poddawanych elektroforezie. Pomiaru densytometrycznego dokonywano przy użyciu urządzenia odwzorowującego FLA-5100 (FujiFilm) i oprogramowania Multi GaugeV3.0 (Ausubel i in., 1994).

Plazmidowe i genomowe DNA w żelach agarozowych wybarwionych BrEt wizualizowano wzbudzając fluorescencję światłem UV przy pomocy systemu do dokumentacji żeli GelDoc- Imaging System (UVP) (Ausubel i in., 1994)..

Stężenie kwasów nukleinowych w próbkach oznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali  $\lambda 260$  nm.

Przeliczniki stosowane do obliczenia stężenia kwasów nukleinowych w roztworach:

ssDNA: 1 OD/ml = 33  $\mu$ g/ml

dsDNA: 1 OD/ml = 50  $\mu$ g/ml

### 4.3. Znakowanie [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP przy końcu 5' DNA

Radioizotopowe znakowanie [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP polegało na fosforylacji końcowej grupy 5'OH substratowych cząsteczek.

**Tabela 6.** Reakcja znakowania dsDNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilość
dsDNA (hybrydyzowane oligodeoksynukleotydy )	1 $\mu$ g
Kinaza polinukleotydowa T4- 5U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Bufor do kinazy 10x	1 $\mu$ l
[ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (6000Ci/mmol, 80mCi/ml)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	do 10 $\mu$ l

Otrzymany znakowany produkt (oligoDNA34AB) oczyszczano przy zastosowaniu kolumnienek wypełnionych złożem typu Sephadex wchodzących w skład zestawu NucAway Spin Columns (Ambion) według protokołu udostępnionego przez producenta. Pomiar stężenia oraz analizę jakości prowadzono jak w pkt. 4.2. (Ausubel i in., 1994).

**Tabela 7.** Reakcja znakowania deoksyrybonykleozydów.

<b>Skład mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Ilość</b>
Deoksyrybonukleozydy	300ng
Kinaza polinukleotydowa T4- 30U/μl	0,08μl
Bufor bicynowy 10x	0,3μl
1mM ATP	0,45μl
[γ- <sup>32</sup> P] ATP	0,02μl
H <sub>2</sub> O	2,15 μl

#### 4.4. Hodowle bakteryjne

##### 4.4.1. Przygotowanie komórek kompetentnych *Escherichia coli*

Szczep bakterii *E. coli* Nova Blue lub BL21-CodonPlus(DE3)-RIL przygotowano do transformacji plazmidami pUC18 lub pET28-6xHisSUMO-SRA stosując metodę z wykorzystaniem chlorku wapnia. 100ml płynnej pożywki LB inokulowano 1ml nocnej hodowli. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 200rpm do wczesnej fazy logarytmicznego wzrostu bakterii OD<sub>600</sub> = 0,5 - 0,6. Kulturę wirowano 5 minut w 4°C z prędkością 4000rpm, osad zawieszano w 4ml schłodzonego w lodzie 100mM chlorku wapnia, a następnie inkubowano w lodzie przez 25 minut, po czym wirowano 5 minut w 4°C, 4000rpm. Komórki kompetentne zawieszano w 2ml 75mM roztworu chlorku wapnia zawierającego 25% glicerolu, rozdzielono na 100μl frakcje i zamrożono w ciekłym azocie. Tak przygotowane bakterie przechowywano w temperaturze -70°C.

##### 4.4.2. Transformacja bakterii plazmidowym DNA metodą szoku cieplnego

Do 100μl zawiesiny zawierającej komórki kompetentne dodawano plazmid w stężeniu 10-20ng/μl. Komórki inkubowano 30 minut w lodzie, a następnie 90 sekund w 42°C i ponownie w lodzie przez 2 minuty. Do transformowanych komórek dodano

800µl pożywki SOC i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 350rpm. Bakterie wirowano 2 minuty z prędkością 4000rpm, osad zawieszano w 200µl pożywki LB. 50µl zawiesiny bakteryjnej наносono na szalki Petriego z pożywką stałą LB zawierającą antybiotyk selekcyjny\* i inkubowano 16 godzin w temperaturze 37°C. Następnego dnia otrzymywano pojedyncze kolonie transformowanych bakterii.

\* kanamycyna (60µg/ml) i chloramfenikol (50µg/ml) w przypadku plazmidu pET28-6xHisSUMO-SRA i szczepu BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, kanamycyna (60µg/ml) dla plazmidu pET28-6xHisSUMO-SRA i szczepu NovaBlue lub ampicylina (100µg/ml) dla plazmidu pUC18 i szczepu NovaBlue

## **4.5. Izolacja plazmidowego DNA z hodowli bakteryjnych**

### **4.5.1. Otrzymywanie plazmidu w małej skali**

Pojedyncze kolonie transformowanych plazmidem bakterii przenoszono do 10ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym (kanamycyna – 30µg/ml dla *E. coli* NovaBlue transformowanych pET28-6xHisSUMO-SRA) i wytrząsano 14-16h w temperaturze 37°C z prędkością 250rpm. 3ml zawiesiny bakterii wirowano 1minutę, 10 000rpm. Z uzyskanego osadu izolowano plazmidowy DNA z wykorzystaniem zestawu odczynników Plasmid Mini AX (A&A Biot) zgodnie z opisem producenta. Wydajność izolacji wynosiła około 5-10µg. Stężenie otrzymanego DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ260 nm.

### **4.5.2. Izolacja plazmidu w dużej skali**

10ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym (ampicylina – 50µg/ml) inokulowano transformowanymi bakteriami z pojedynczych kolonii i wytrząsano 14-16 godzin w temperaturze 37°C, 250rpm. 100ml pożywki LB z antybiotykiem (ampicylina – 50µg/ml) inokulowano 1ml nocnej hodowli bakterii i inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 250rpm przez noc. Następnie kulturę wirowano 15 minut w 4°C przy 4000rpm. Izolację plazmidowego DNA przeprowadzono wykorzystując zestaw odczynników Plasmid Maxi Kit (Qiagen) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. Wydajność izolacji wynosiła około

500-600 $\mu$ g. Stężenie otrzymanego DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda$ 260nm. Czystość otrzymanego plazmidu analizowano na podstawie stosunku wartości absorbancji  $A = \lambda$ 260/280.

#### 4.6. Hydroliza plazmidu enzymami restrykcyjnymi

Reakcję hydrolizy enzymami restrykcyjnymi prowadzono w objętości 20 $\mu$ l przez 0,5–3 godziny. Produkt analizowano w 1% żelu agarozowym.

*Tabela 8. Hydroliza DNA enzymami restrykcyjnymi.*

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilości
Plazmidowy DNA	1 $\mu$ g
Bufor do trawienia restrykcyjnego 10x	2 $\mu$ l
Enzym restrykcyjny	2 $\mu$ l (10U/ $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	do 20 $\mu$ l

Analiza restrykcyjna z wykorzystaniem enzymów MspI/HpaII przeprowadzona została po metylacji plazmidu (1 $\mu$ g) za pomocą enzymu SssI (4U) i dostępnego w zestawie donora grupy metylowej S-adenozylu-L-metioniny (160 $\mu$ M) w czasie 1 godziny w temperaturze 37°C. Produkt metylacji został oczyszczony za pomocą gotowego zestawu do oczyszczenia DNA po reakcjach enzymatycznych Clean Up Kit (A&A Biot). Przygotowany plazmid poddano hydrolizie enzymatycznej.

#### 4.7. Reakcja metylacji plazmidowego DNA katalizowana przez prokariotyczną metylotransferazę SssI

##### 4.7.1. Przygotowanie substratu reakcji

Plazmid pUC18 będący substratem reakcji był przygotowywany według procedury izolacji plazmidu w dużej skali (pkt. 4.5.2.). Stężenie plazmidu było oznaczane poprzez pomiar absorbancji przy  $\lambda$  260nm, a czystość oceniona na podstawie wartości stosunku  $\lambda$  260nm/280nm. Do eksperymentów wykorzystywane były plazmidy, których A260/A280 wynosiła 1,8. Jakość DNA analizowana była na 1% żelu agarozowym.

#### 4.7.2. Optymalizacja warunków reakcji metylacji cytozyny *in vitro*

W celu wyznaczenia optymalnych warunków reakcji metylacji wyznaczone zostały wartości następujących parametrów: ilość substratu (DNA), stężenie kofaktora ( $[^3\text{H}]\text{SAM}$ ), ilość jednostek enzymu U (SssI) oraz optymalny czas reakcji. Reakcja metylacji prowadzona była w objętości 20  $\mu\text{l}$  w temperaturze 37°C w buforze NEB zawierającym 10mM Tris-HCl pH 7,9, 50mM NaCl, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM DTT. Ilość substratu w reakcjach wynosiło 0,1-1  $\mu\text{g}$ , stężenie  $[^3\text{H}]\text{SAM}$  - 0,1-25  $\mu\text{M}$ , ilość jednostek SssI - 0,5 - 4U, czas reakcji 5 – 180 minut. Reakcja była hamowana poprzez nakładanie mieszaniny na filtr szklany GF/C (Whatman), a następnie przepłukiwanie 3ml 10% i 2x3ml 5% zimnego TCA i 3ml 95% etanolu. Filtry suszono w temperaturze pokojowej i umieszczano w szklanych fiolkach z 5ml roztworu scyntylicyjnego. Pomiaru radioaktywnego produktu dokonywano w liczniku scyntylicyjnym Beckman  $\gamma$ -mateII. Ilość zmierzonych cpm przeliczona została na nmole wprowadzonych grup  $\text{CH}_3$  zgodnie z wcześniej wyznaczoną eksperymentalnie zależnością:

$$1\text{pmol } [^3\text{H}]\text{CH}_3 = 10\text{nCi} = 5000\text{cpm}$$

**Tabela 9.** Reakcja metylacji *in vitro*.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilość
DNA (pUC18)	0,1-1 $\mu\text{g}$
$[^3\text{H}]\text{SAM}$ (10Ci/mmol)	0,1-25 $\mu\text{M}$
SssI	0,5-4U
Bufor NEB 1x	2 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$	Do 20 $\mu\text{l}$

#### 4.7.3. Wyznaczenie wartości $K_m$ i $V_{\max}$ dla DNA i SAM metodą Lineweavera-Burka

W celu wyznaczenia wartości parametrów kinetycznych  $K_m$  i  $V_{\max}$  w układach enzym – substrat i enzym - kofaktor przeprowadzono szereg reakcji dla uzyskania wartości  $V_0$  (szybkość początkowa) poszczególnych stężeń substratu i kofaktora. Reakcje prowadzone były w czasie 0, 3, 5, 10 minut (DNA) lub 0, 3, 6, 9, 12 minut ( $[^3\text{H}]\text{SAM}$ ). Wartość  $V_0$  [nM/min] wyznaczono jako wartość kąta  $\text{tg}\alpha$  [ $\text{tg}\alpha = y$  (nM) / x (min.)] tj. wartość nachylenia prostej przechodzącej w punkcie  $t=0\text{min}$ . i stycznej do

krzywej powstałej w wyniku graficznego przedstawienia zależności między stężeniem produktu P (grupy [<sup>3</sup>H]CH<sub>3</sub>, nM) a czasem reakcji (min.). Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej do pomiaru oraz obliczenie stężenia grup [<sup>3</sup>H]CH<sub>3</sub> w metylovanym produkcie przebiegało jak w pkt. 4.7.2.

Wartości  $K_m$  i  $V_{max}$  wyznaczono zgodnie z metodą Lineweavera-Burka (Lineweaver i Burk, 1934). Na osi odciętych (x) oznaczono odwrotność stężenia substratu lub kofaktora ( $1/S$ ;  $1/[\mu\text{M}]$ ), natomiast na osi rzędnych (y) odwrotność szybkości początkowej reakcji ( $1/V_0$ ;  $1/[\text{nM}/\text{min}]$ ). Miejsca przecięcia wyznaczonej prostej z osią x i y wskazują odpowiednio wartości  $-1/K_m$  i  $-1/V_{max}$ .

**Tabela 10.** Reakcja metylacji *in vitro*. Wyznaczanie parametru  $V_0$ .

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilość	
	Układ enzym-substrat	Układ enzym-kofaktor
DNA (pUC18) *stężenie CpG w substracie	50ng (220nM*), 100ng (440nM*), 500ng (2200nM*), 1000ng (4400nM*)	1000ng (4400nM*)
[ <sup>3</sup> H]SAM (10Ci/mmol)	160μM	0,1, 1, 10, 25μM
SssI	1U	
Bufor NEB 1x	2μl	
H <sub>2</sub> O	do 20 μl	

#### 4.7.4. Wyznaczenie typu inhibicji oraz wartości parametru stałej inhibicji ( $K_i$ ) metodą Dixona

Metoda graficznego wyznaczenia  $K_i$  opracowana przez Lineweavera i Burka (Lineweaver i Burk, 1934) umożliwia obliczenie wartości  $K_m$  oraz  $K_i$ , dzięki graficznemu przestawieniu zależności pomiędzy  $1/V_0$  i  $1/S$ , a następnie obliczeniu wartości  $K_i$  inhibitora kompetycyjnego według równania Michaelisa:

$$v = \frac{V_{max} S}{K_m (1 + I/K_i) + S}$$

$$v = \frac{V_{max} S}{K_{mi} + S}$$



gdzie  $K_{mi} = K_m(1+[I]/K_i)$  i jest pozorną stałą Michaelisa wyznaczoną w obecności inhibitora, odczytaną w przecięciu linii z osią x. Z równania wynika, że szybkość reakcji enzymatycznej zależy od stężenia substratu (S) i inhibitora (I). Metoda Dixona upraszcza znacząco wyznaczenia wartości stałej inhibicji. Na osi x oznaczono stężenia inhibitora, natomiast na osi y odwrotność szybkości reakcji ( $1/V$  [nM/min.]) przy stałym stężeniu (S) dla każdej z rysowanych prostych. Wartość parametru  $-K_i$  wyznacza punkt przecięcia prostych. Graficzne przedstawienie wyników pozwala nie tylko na odczytanie wartości parametru  $-K_i$  bezpośrednio z wykresu, ale także na określenie typu inhibicji badanego inhibitora. Jeśli do przecięcia się prostych dochodzi w polu między osiami współrzędnych wskazuje to na kompetycyjny typ inhibicji enzymu. Jeśli natomiast proste przecinają się na osi y, to sugeruje to, że badany związek jest inhibitorem niekompetycyjnym. Metoda Dixona pozwala także na zaobserwowanie inhibicji akompetycyjnej. W takiej sytuacji wyznaczone na wykresie proste przebiegają w sposób równoległy. Aby wyznaczyć parametr  $K_i'$ , będący stałą inhibicji kompleksu enzym-substrat-inhibitor, należy przedstawić graficznie zależność pomiędzy ilorazem stężenia substratu i prędkości reakcji ( $S/V$ ) a badanym stężeniem inhibitora. Interpolacja punktu przecięcia wyznaczonych prostych na oś x wyznacza wartość  $K_i'$  (Cornish-Bowden i Eisenthal, 1974).

Test inhibicji metylacji *in vitro* prowadzony był w temperaturze 37°C w czasie  $t = 10$  minut. Następnie reakcja była zatrzymywana, ilość radioaktywności w produkcie mierzona i przeliczana zgodnie z opisem podanym w punkcie 4.7.2. Dla pochodnych cytozyny i związków nienukleozydowych test prowadzony był w układzie enzym - substrat, dla pochodnych adeniny enzym - kofaktor. Wartość  $V$  wyznaczana była według sposobu opisanego w punkcie 4.7.3. (wartość  $t g\alpha$  między prostą przechodzącą w punkcie  $t = 0$  minut styczną do krzywej zależności  $P/t$ ). Typ inhibicji oraz wartość parametru  $-K_i$  odczytywana była z wykresu zależności między wartościami odwrotności prędkości reakcji  $1/V$  [ $\mu$ M/min.] a stężeniem inhibitora (I) podawanym w  $\mu$ M lub mM.

**Tabela 11.** Reakcja inhibicji metylacji *in vitro*. Wyznaczanie parametru  $K_i$ .

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilość	
	Układ enzym-substrat (pochodne cytozyny)	Układ enzym-kofaktor (pochodne adeniny)
DNA (pUC18)	100, 500, 1000ng	1000ng
[ <sup>3</sup> H]SAM (10Ci/mmol)	2μM	0,1, 1, 10μM
SAM*		do 10μM
Testowany związek	14μl	10μl
SssI	1U	
Bufor NEB 1x	2μl	
H <sub>2</sub> O	do 20 μl	

\*SAM nieradioaktywny dodawany był w celu uzyskania stężenia końcowego 10μM.

#### 4.7.5. Analiza restrykcyjna produktu reakcji metylacji *in vitro*

Reakcję metylacji prowadzono w 37°C w czasie 1 godziny. Następnie produkt oczyszczano w wykorzystaniem kolumnienek ze złożem krzemionkowym pochodzących z gotowego zestawu do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych Clean Up (A&A Biot). Procedura oczyszczania prowadzona była według protokołu udostępnionego przez producenta. Oczyszczony produkt (650ng) poddawany był hydrolizie enzymatycznej enzymem HpaII hydrolizującego zniemetylowane sekwencje:

5'C↓CGG3'

3'GGC↑C5'

↓miejsce hydrolizy

Reakcja prowadzona była w temp. 37°C w czasie 0,5 godziny. Wpływ testowanego związku w wybranych stężeniach analizowano w 2% żelu agarozowym barwionym BrEt.

*Tabela 12. Reakcji metylacji analizowana na żelu agarozowym.*

<b>Skład mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Ilość</b>
DNA (pUC18)	2µg
SAM	160µM
SssI	4U
Bufor NEB 10x	2 µl
Testowany związek	15µl
H <sub>2</sub> O	do 20 µl

*Tabela 13. Analiza restrykcyjna zmetylowanego plazmidu pUC18.*

<b>Skład mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Ilość</b>
DNA (pUC18)	650ng
MspI/HpaII (10u/µl)	2U
Bufor Tango 10x	1
H <sub>2</sub> O	do 10µl

#### **4.8. Analiza inhibicji ludzkiej DNMT1**

##### **4.8.1. Przygotowanie ekstraktu jądrowego**

Ekstrakt jądrowy zawierający ludzką DNMT1 przygotowano wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw odczynników EpiQuik Nuclear Extraction Kit I (Epigentek). Wszystkie etapy procedury przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

Komórki linii nowotworowej HeLa hodowano do osiągnięcia 80% konfluencji w butelkach hodowlanych 72mm<sup>2</sup>. Ilość białka w uzyskanym ekstrakcie oznaczono metodą Bradford (Bradford, 1976).

##### **4.8.2. Analizy aktywności inhibitorowej wybranych związków. Test ELISA z wykorzystaniem ludzkiej DNMT1**

Inhibicję ludzkiej DNMT1 przez wybrane związki niskocząsteczkowe mierzono stosując zestaw odczynników EpiQuik DNMT1 Activity/Inhibitor Screening Assay Core Kit (Epigentek). Analiza polega na wykorzystaniu testu ELISA i przeciwciała wiążącego 5-metylocytozynę. Substratem reakcji jest hemimetylowany DNA immobilizowanym na płytce 96-dołkowej. Zgodnie z zaleceniami producenta, ekstrakt jądrowy zawierający 5µg całkowitego białka inkubowano na płytce w obecności 3

stężen inhibitora (10, 100, 500 $\mu$ M) lub jego braku przez 1 godzinę. Następnie dodawano przeciwciała, po czym ilość produktu reakcji mierzono kolorymetrycznie.

## 4.9. Hodowle komórkowe

### 4.9.1. Warunki hodowli komórkowych

*Tabela 14. Warunki hodowli komórkowych.*

Linia komórkowa	Pożywka hodowlana	Suplementy pożywki	Naczynia hodowlane*
HeLa	RPMI-1640 (Sigma)	10% FBS, 1x stężone antybiotyki/antymykotyki, 1x stężone witaminy	T25, T75, płytki 6-,96-dołkowe
U118	DMEM (ATCC)	10% FBS, 1x stężona streptomycyna	T25, T75, płytki 6-,96-dołkowe
HEK293	DMEM (Sigma)	10% FBS, 1x stężone antybiotyki/antymykotyki, 1x stężone witaminy	T25, T75, płytki 6-,96-dołkowe
HCT116 p53+/, p53-/-	RPMI-1640 (Sigma)	6% FBS, 1x stężone antybiotyki/antymykotyki, 1x stężone witaminy	T25, T75, płytki 6-,96-dołkowe
CaCo-2	DMEM (Sigma)	10% FBS, DMEM, 1x stężone antybiotyki/antymykotyki, 1x stężone witaminy	T25*, T75*, płytki 6-,96-dołkowe

\*Do hodowli były wykorzystywane butelki hodowlane o powierzchni wzrostowej 25 (T25) lub 75cm<sup>2</sup> (T75).

### 4.9.2. Przechowywanie linii komórek eukariotycznych

W celu przygotowania odpowiedniej ilości materiału do przechowywania, komórki HeLa, HEK293, U118, HCT116 i CaCo-2 hodowano w butelkach do hodowli linii komórkowych (75cm<sup>3</sup>, Nunc). Komórki wysiewano w ilości 1,5x10<sup>7</sup>. Hodowle prowadzono w 10ml uzupełnionej pożywki RPMI-1640 (komórki HeLa i HCT116) lub DMEM (HEK293 i U118, CaCo-2) w temperaturze 37<sup>0</sup>C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> do osiągnięcia 80% konfluencji, wymieniając pożywkę na świeżą co 48h. W celu odklejenia komórek od dna butelki hodowle przemywano dwukrotnie buforem PBS, a następnie dodawano 2ml roztworu trypsyny-EDTA i inkubowano 2min. w temperaturze pokojowej lub w 37<sup>0</sup>C. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 8ml odpowiedniej pożywki i całość wirowano 2min. z prędkością 1500rpm. w temperaturze 22-25<sup>0</sup>C. Supernatant

usuwano, a osad zawieszano w 500µl pożywki uzupełnionej 40% FBS i 500µl pożywki z dodatkiem 20% DMSO. Całość przenoszono do probówki przystosowanej do przechowywania w ciekłym azocie i poddawano powolnemu zamrażaniu w temperaturze -70°C. Po upływie 24h probówki przenoszono do ciekłego azotu w celu dalszego przechowywania.

#### **4.9.3. Hodowla linii komórek eukariotycznych**

Komórki HeLa, HEK293, HCT116 p53+/+ wysiewano na 6-dołkowe płytki do hodowli komórkowych (Nunc) w ilości  $1,25 \times 10^5$  komórek/dołek. Hodowlę prowadzono w 1ml odpowiedniej pożywki w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po 24 godzinach pożywkę usunięto, a komórki przemyto dwukrotnie 1x stężonym buforem PBS i umieszczono w świeżym medium hodowlanym. Tak przygotowane hodowle komórek wykorzystywane były do inkubacji z wybranymi stężeniami inhibitorów w celu późniejszej analizy statusu ich globalnej metylacji DNA lub przeprowadzenia testu kometkowego. Hodowle wszystkich linii prowadzono na 96-dołkowych płytkach ( $5 \times 10^3$  komórek/dołek) w objętości pożywki 100µl w celu analizy cytotoksyczności badanych związków (test MTT) oraz w butelkach do hodowli komórkowych (25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>).

#### **4.10. Analiza poziomu globalnej metylacji**

##### **4.10.1. Izolacje genomowego DNA**

Komórki HeLa i HEK293 hodowane w 6-dołkowych płytkach inkubowane były przez 72h z testowanymi związkami w trzech wybranych stężeniach: 1, 10 i 100µM. Następnie dodawano 0,5ml roztworu trypsyny-EDTA i inkubowano 2 minuty w temperaturze pokojowej lub w 37°C. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 0,5ml odpowiedniej pożywki, a całość przenoszono do probówki typu Eppendorf i wirowano 2 minuty z prędkością 1500rpm. Uzyskany osad przemywano dwukrotnie 1ml 1x stężonego buforu PBS i wirowano. Genomowy DNA izolowano z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników Genomie Mini (A&A Biot) zgodnie z protokołem producenta. Ilość uzyskanego DNA mierzono spektrofotometrycznie i oceniano jego jakość i czystość zgodnie z procedurami opisanymi w pkt. 4.2. Wydajność izolacji DNA wynosiła od 5-10µg.

#### 4.10.2. Badanie zawartości $m^5C$ w DNA

Określenie poziomu globalnej metylacji DNA za pomocą metody chromatografii cienkowarstwowej (TLC, ang. *Thin Layer Chromatography*) polegało na rozdziale nukleotydów otrzymanych po enzymatycznej hydrolizie DNA, a następnie znakowaniu radioaktywnym fosforem [ $\gamma$ - $^{32}P$ ], na płytkach z celulozą (Merck) w dwóch kierunkach. W odpowiednio dobranych warunkach chromatograficznych cztery podstawowe fosforany 2'deoksyrybonukleozydów (G, A, C, T) ulegały wyraźnemu rozdzielaniu. Widoczny był także sygnał odpowiadający fosforanowi 5-metylo-2'deoksycytydyny ( $m^5C$ ), którą po odpowiedniej lokalizacji na płycie chromatograficznej poddano analizie ilościowej. Intensywność radioaktywnych sygnałów oceniono ilościowo przy pomocy aparatu do odwzorowania obrazów FLA-5100 (FujiFilm).

Określenie poziomu zmetylowanej cytozyny przebiegało według następującego schematu: wysuszony DNA (1 $\mu$ g) hydrolizowano przez 6h w temperaturze 37°C w 50mM buforze bursztynianowym o pH 6 zawierającym 10mM CaCl<sub>2</sub>. Powstałe 3'fosfo-2'deoksyrybonukleozydy fosforylowano przy końcu 5' za pomocą T4 kinazy polinukleotydowej i 1,6 $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP (6000Ci/ mmol) przez 30 minut w 37°C w 10mM buforze bicyna-NaOH pH 9,7 zawierającym 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM ditiotretitol (DTT) i 1mM spermidynę. W celu usunięcia nadmiaru [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP zastosowano apyrazę w 10mM buforze bicyna-NaOH pH 9,7 i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Następnie usuwano fosforan znajdujący się przy końcu 3' stosując RNazę P1 w 500mM buforze octanu amonu pH 4,5 (Barciszewska i in., 2007). Rozdział znakowanych radioaktywnie nukleotydów przeprowadzono na płytkach pokrytych celulozą (Merck) z wykorzystaniem dwóch faz ruchomych. Fazą pierwszego kierunku chromatografii była mieszanina: kwas izomasłowy/amoniak/woda, a drugiego: fosforan sodowy pH= 6,8/siarczan amonu/alkohol *n*-propylowy. W pierwszym kierunku droga migracji fazy ruchomej wynosiła 20cm, natomiast w drugim 10cm. Na płytkę nakładano 2 $\mu$ l hydrolizatu. Po zakończeniu rozdzielania płytki suszono w 65°C i dokonywano pomiaru intensywności sygnałów odpowiadających poszczególnym 5' monofosforanom 2'deoksynukleozydów przy pomocy aparatu FLA-5100 i programu MultiGauge V3.0. Do ilościowej oceny  $m^5C$  wykorzystano produkty rozpadu  $m^5C$ , dlatego w analizach uwzględniono też ilościową zawartość C i T, a zawartość  $m^5C$  obliczono według wzoru:

$$R = \frac{m^5C}{m^5C + C + T} \times 100\%$$

gdzie  $m^5C$ , C, T oznacza intensywność poszczególnych sygnałów odpowiadających analizowanym 2' deoksyrybonukleotydom.

**Tabela 15.** Enzymy wykorzystywane do analizy poziomu globalnej metylacji DNA z linii komórkowych.

Enzym	Funkcja	Ilość w reakcji
<b>Hydroliza</b>		
Nukleaza z <i>Micrococcus</i>	Hydroliza wiązania 5' fosforanowego	0,02U
Fosfodiesteraza II ze śledziona	Hydroliza wiązania 5' fosforanowego	0,001U
<b>Znakowanie hydrolizatu</b>		
Kinaza polinukleotydowa T4	Fosforylacja grup 5'OH	1,5U
<b>Usuwanie nadmiaru [<math>\gamma</math>-<math>^{32}</math>P]ATP</b>		
Apyraza	Hydroliza [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP do ADP i Pi a następnie do AMP i Pii	0,01U
<b>Usuwanie 5'3'difosforanów nukleozydów</b>		
Nukleaza P1	Hydroliza wiązania 3' fosforanowego	0,2 $\mu$ g

#### 4.11. Analiza cytotoksyczności i hamowania proliferacji linii komórkowych przez badane związki niskocząsteczkowe (test MTT)

Do przeprowadzenia testu MTT przygotowano 10x stężony roztwór wodny MTT (5mg/ml) oraz 1x stężony rozcieńczony w pożywce OptiMEM. Analizowano komórki Hela, HEK293, U118, HCT116, CaCo-2 hodowane w 96-dołkowych płytkach hodowlanych poddawane inkubacji z wybranymi stężeniami badanych związków. Po 72h inkubacji z badanym związkiem, komórki były przemywane 1x stężonym buforem PBS, a następnie umieszczane z pożywce z 1x stężonym MTT (100 $\mu$ l/1dołek). Komórki inkubowano 2h w inkubatorze CO<sub>2</sub>, po czym usuwano roztwór MTT. Powstałe kryształki formazanu rozpuszczano poprzez dodanie 100 $\mu$ l DMSO i wytrząsanie płytki na wytrząsarce orbitalnej przez 10 min. w temperaturze pokojowej w zaciemnieniu. Następnie odczytywano absorbancję przy długości fali  $\lambda$ 590nm oraz referencyjnej  $\lambda$ 620nm za pomocą czytnika mikropłytek (Synergy2, Biotek).

Każdorazowo mierzono absorbancję dla kontroli DMSO.

Wartość poziomu redukcji MTT na początku czasu inkubacji ( $t=0$ ) jest odejmowana od kontroli i wyników uzyskanych po inkubacji komórek eukariotycznych z badanym związkiem przez 72h. Pozwala to na rozróżnienie śmierci komórek wywołanej przez badany związek od zahamowania proliferacji. Wartości negatywne wskazują na śmierć nekrotyczną komórek wywołaną cytotoksycznością związków. Wartości pomiędzy 0-100% odnoszą się do zahamowania ich proliferacji (Xavier i in., 2011).

#### 4.12. Test kometkowy

W celu przeprowadzenia testu kometkowego (elektroforeza DNA pojedynczych komórek) komórki linii HCT116 p53+/+ inkubowano przez 1 i 72h w obecności równocytotoksycznych stężeń badanych związków na 6-dołkowych płytkach hodowlanych. Komórki przemywano 1x stężonym buforem PBS, po czym dodawano 0,5ml roztworu trypsyny-EDTA i inkubowano 2 minuty w temperaturze pokojowej lub w 37°C. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 0,5 ml odpowiedniej pożywki i całość wirowano 2 minuty z prędkością 1500 rpm. W kolejnym etapie komórki zawieszano w 1ml pożywki, a następnie pobierano 10 $\mu$ l i umieszczano w komorze Neubauera i zliczano komórki w wszystkich ćwiartek. Ilość komórek w 1ml obliczano według wzoru:

$$\text{Liczba komórek w 1ml} = \frac{K^*}{4} \times 1 \times 10^4$$

K\* - liczba zliczonych komórek

Komórki w ilości 1,5x10<sup>5</sup> wirowano 1 minutę z prędkością 5000rpm. Do próby kontrolnej nietraktowanej badanym związkiem dodawano 1ml 75 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i inkubowano w lodzie 5 minut. Następnie komórki wirowano 1 minutę z prędkością 5000rpm, po czym zawieszano w 1x stężonym PBS i wirowano po raz drugi w tych samych warunkach.

0,5% roztwór niskotopliwej agarozy w 1x stężonym buforze PBS rozpuszczano



w temp. 37°C w łaźni wodnej. Komórki zawieszano w 250µl tej agarozy i nakładano na szkiełka podstawowe pokryte 1% agarozą i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Całość schładzano na lodzie przez 5min., po czym umieszczano w buforze lizującym o pH 10 i inkubowano w zaciemnieniu 2h w temp. 4°C. Część prób przeznaczonych do analizy poziomu 8-okso-dG została przepłukana dwukrotnie 1x stężonym buforem PBS i umieszczona na 15 min. w buforze do reakcji z FPG o pH 7,5. Następnie dodawano 30µl enzymu FPG (3mg/ml) w rozcieńczeniu 1:3000 i inkubowano w łaźni wodnej przez 20 minut w temp. 37°C. Wszystkie próby przepłukano wodą destylowaną, po czym umieszczono w aparacie do elektroforezy wypełnionym roztworem o pH 13 i pozostawiano w temp. 4°C na 40 minut. Elektroforezę prowadzono przez 20 minut stosując napięcie elektryczne 1V/cm. Po jej zakończeniu próby płukano trzykrotnie przez 5 min. w buforze Tris-HCl pH 7,5 i pozostawiano do wyschnięcia przez 12 godzin. Do wybarwienia stosowano roztwór 0,5µg/ml BrEt. Zniszczenia DNA obserwowano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego i mierzono ich poziom z wykorzystaniem programu CometAssay IV. Dla każdej z prób mierzono 50 komet, a każdy eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Jako kontrolę wykorzystano komórki traktowane 75µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, który powoduje pojawianie się pęknięć nici i utlenianie zasad.

#### **4.13. Hybrydyzacja oligodeoksyrybonukleotydów**

dsDNA<sub>34AB</sub> otrzymywano poprzez hybrydyzację równomolowych ilości oligodeoksyrybonukleotydów 34A i 34B w 50µM Tris-HCl pH 8. Reakcję prowadzono 5 minut w 95°C, a następnie schładzano do temperatury pokojowej w tempie 1°C/5min. Powstałe dwuniciowe oligodeoksynukleotydy analizowano na 20% żelu PAA, a następnie poddawano znakowaniu przy końcu 5' za pomocą [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP.

#### **4.14. Przygotowanie testu inhibicji kompleksu SRA-dsDNA34AB przez związki niskocząsteczkowe**

##### **4.14.1. Nadprodukcja domeny SRA białka UHRF1 myszy**

Plazmid pET28-6xHisSUMO-SRA zawierający insert kodujący domenę SRA mysiego białka UHRF1 pochodził od dr H. Hashimoto (Biochemistry, Cell & Developmental Biology Emory University, Atlanta, GA).

Przeprowadzono transfekcję kompetentnych bakterii *E. coli* NovaBlue i prowadzono ich hodowlę na pożywce stałej LB (kanamycyna 50µg/ml) w temp. 37°C przez 14-16 godzin. Pojedynczą kolonią inokulowano 10 ml pożywki LB (kanamycyna 30µg/ml) i hodowano 14-16h w temp. 37°C w inkubatorze z wytrząsaniem 250rpm. 3 ml zawiesiny bakterii wirowano 1 min. z prędkością 10 000 rpm. Z uzyskanego osadu izolowano plazmidowy DNA z wykorzystaniem zestawu odczynników Plazmid Mini AX (A&A Biot) zgodnie z opisem producenta. Tak przygotowany plazmid został poddany analizie w 1% żelu agarozowym. Prawidłowa długość konstruktu została potwierdzona przez hydrolizę za pomocą enzymu restrykcyjnego NruI (opis w pkt. 4.6).

Po pozytywnej weryfikacji sekwencji wektora (sekwencjonowanie wykonane na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu) transformowano nim bakterie *E. coli* BL21-(DE3)-RIL i hodowano przez 14-16 godzin na pożywce stałej zawierającej 50µg/ml kanamycyny i 30µg/ml chloramfenikolu w temp. 37°C. Pojedynczą kolonią inokulowano 50ml pożywki MDG (30µg/ml kanamycyna, 30µg/ml chloramfenikol) i hodowano 14-16h w temp. 37°C wytrząsając z prędkością 200rpm. 2ml hodowli przenoszono do 2l pożywki indukcyjnej ZYM-5052, którą wytrząsano (200rpm) w temp. 37°C przez 5h, a następnie obniżano temp. do 16°C i inkubowano przez kolejne 12-14h. Hodowlę wirowano 4000rpm, 5min. w temp. 4°C. Otrzymany osad zawieszono w 1x stężonym buforze do sonikacji. Zawiesinę lizowano przez sonikację 6x15sek. Lizat wirowano 27 000rpm 30min. w 4°C w pojemnikach typu Quick-Seal (Beckman) w objętości 10ml.

##### **4.14.2. Oczyszczenie białka na złożu agarozowym wzbogaconym niklem**

W celu oczyszczenia białka fuzyjnego posiadającego przy końcu N ogon polihistydynowy wykorzystano metodę chromatografii powinowactwa. Złoże

agarozowe wzbogacone niklem (agarozą Ni-NTA, Qiagen) umieszczono w szklanej kolumnie o wysokości 15cm i średnicy 1,5cm. Całkowita objętość złoża wynosiła 17,7cm<sup>3</sup>. Pierścienie imidazolowe histydyny białka fuzyjnego są w pH fizjologicznym donorami elektronów i tworzą koordynacyjne wiązania z unieruchomionymi na agarozie jonami niklu Ni<sup>2+</sup>. Związane w ten sposób ze złożem białko zostaje odseparowane od pozostałych białek znajdujących się w lizacie komórkowym.

Kolumnę przemyto 5ml buforu A1 i nałożono 1,5ml supernatantu pochodzącego z ultrawierwienia lizatu. Kolejno przemyto kolumnę 5ml buforu A1 zawierającego 0,02M imidazol, 5ml buforu A2 (0,1M imidazol) i 5ml buforu A3 (0,2M imidazol). Ilość otrzymanego białka wynosiła ok. 2,0-2,5mg/ml. Następnie uzyskany eluat wirowano z prędkością 4000 x g w rotorze wychyłowym w temp. 4°C w probówce typu amicon (zawierającej błonę celulozową) z punktem odcięcia 30kDa. Celem wirowania było usunięcie buforu A3 i zastąpienie go buforem Tris-HCl pH 8. Uzyskane białko fuzyjne His-SUMO-SRA hydrolizowano za pomocą proteazy ULP1 w 16°C przez 12-16h w celu usunięcia części znacznika His-SUMO (Tab. 16). Mieszaninę reakcyjną nakładano ponownie na zregenerowaną, zgodnie w procedurą opisaną przez producenta kolumnę wypełnioną złożem agarozowym Ni-NTA i przemyto 5ml buforu A2. Etap ten pozwolił na oddzielenie białka SRA od znacznika His-SUMO, który związał się do kolumny. Eluat wirowano w próbkach typu amicon z punktem odcięcia 10kDa w rotorze wychyłowym z prędkością 4000 x g w temp. 4°C. Białko SRA umieszczono w buforze do przechowywania 0,1M Tris-HCl pH 7, 1% β-merkaptioetanol. Końcowe stężenie białka wynosiło ok. 0,5-0,7 mg/ml. Wszystkie etapy oczyszczania białka (oprócz hydrolizy proteazą ULP1) prowadzono w 4°C.

**Tabela 16.** Hydroliza enzymatyczna za pomocą proteazy Ulp.

<b>Skład mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Ilość</b>
Ulp1 (1U/μl)	10U
Bufor reakcyjny x10	20μl
His-SUMO-SRA (2,2mg/ml)	150μl
H <sub>2</sub> O	do 200μl

#### 4.14.3. Elektroforetyczny rozdział białek

Analizę białka fuzyjnego His-SUMO-SRA oraz powstałej po usunięciu znacznika histydynowego domeny SRA prowadzono na żelu PAA przeznaczonym do rozdziału białek. Próby zawieszono w buforze obciążającym zawierającym SDS w stosunku 1:1 i denaturowano w temp. 95°C przez 5 minut, a następnie nakładano na żel o wymiarach 15cm x 15cm i grubości 0,4mm w objętości 10µl. Rozdział prowadzono w temp. pokojowej stosując natężenie 25mA w buforze do elektroforezy białek.

Białka identyfikowano na żelu poprzez wybarwienie za pomocą roztworu Coomassie Brilliant Blue R-250 (Ausubel i in., 1994). Stężenie białka w roztworze oznaczono metodą Bradford (Bradford, 1976).

**Tabela 17.** Skład żeli poliakrylamidowych do elektroforezy białek.

<b>Składniki żelu zagęszczającego</b>	<b>4%</b>
30% akrylamid/bisakrylamid (19:1)	6,7 ml
1M Tris-HCl pH 6,7	6,25ml
10% SDS	0,5ml
H <sub>2</sub> O	do 50ml
10% APS	100 µl
100% TEMED	10µl

<b>Składniki żelu rozdzielającego</b>	<b>12%</b>
30% akrylamid/bisakrylamid (19:1)	80 ml
1M Tris-HCl pH 8,7	75ml
10% SDS	2ml
H <sub>2</sub> O	do 200ml
10% APS	250 µl
100% TEMED	25 µl

#### 4.14.4. Kompleks domeny SRA białka UHRF1 z dsDNA34AB. Analiza wpływu związków niskocząsteczkowych.

SRA i dsDNA34AB inkubowano (Tab. 18) w 1x stężonym buforze reakcyjnym pH 7 przez 1 godzinę w temperaturze 4°C, a następnie analizowano formowanie się kompleksów techniką retardacji w 0,5% żelu agarozowym o wymiarach 10x10 cm w temp. 4°C i natężeniu 25mA.

**Tabela 18.** Reakcji tworzenia kompleksu SRA-dsDNA34AB.

<b>Skład mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Ilość</b>
SRA (23ng-1pmol)	50-250pmol
Bufor reakcyjny: Hepes 10mM pH 7 NaCl 150mM DTT 10mM EDTA 10mM Triton X100 1%	1x
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]dsDNA34AB (1 $\mu$ g-48pmol)	4,8pmol
kompetytor (związek niskocząsteczkowy)*	150 -1500pmol
H <sub>2</sub> O	Do 10 $\mu$ L

\*dodawany w celu hamowania tworzenia kompleksu

## 5. Wyniki i dyskusja

Jedną z cech komórek nowotworowych jest wyciszenie epigenetyczne, wpływające na zaburzenie ekspresji regulatorów cyklu komórkowego. Ponieważ epimutacje są odwracalne, poszukuje się związków, które mogłyby odtworzyć prawidłowy wzór metylacji, hamując aktywność enzymów związanych z regulacją epigenetyczną. Tym samym związki te mogłyby się stać terapeutykami mającymi zastosowanie w leczeniu nowotworów (Rodriguez-Paredes i Esteller, 2011; Sandoval i Esteller, 2012).

Hormony roślinne i ich pochodne są intensywnie badane ze względu na ich wpływ na aktywność proliferacyjną komórek ludzkich (Skoog i in., 1965). Są to pochodne adeniny, modyfikowane w pozycji N6 podstawnikami izoprenoidowymi bądź aromatycznymi (Voller i in., 2010). Najczęściej występującą w roślinach cytokininą jest *trans*-zeatyna, natomiast poziom innych izoprenoidowych pochodnych cytokinin (N<sup>6</sup>-izopentyloadenina, *cis*-zeatyna) oraz pochodnych z nasyconym łańcuchem bocznym (dihydrozeatyna) wykazuje różnicowanie międzygatunkowe. Cytokinyne aromatyczne (N<sup>6</sup>-benzyloadenina) i ich hydroksylowane pochodne (topoliny) zostały zidentyfikowane tylko w nielicznych gatunkach roślin (Volley i in., 2010). Aromatyczną cytokininą jest kinetyna (N<sup>6</sup>-furfuryloadenina), której naturalne pochodzenie zostało wielokrotnie udowodnione (Miller i in., 1955; Barciszewski i in., 2007). Obie grupy cytokinin (z podstawnikiem izoprenoidowym i aromatycznym) występują w postaci zasady, rybozydu, 5'-fosforanu rybozydu, 3-, 7-, 9- i O-glukozydów oraz w połączeniu z aminokwasami (Voller i in., 2010).

Rolą cytokinin u roślin jest regulowanie wzrostu i różnicowania komórek oraz indukowanie apoptozy (Mlejnek i Prochazka, 2002). Analizowane jest czy mogą one pełnić podobne funkcje w komórkach zwierzęcych i czy ich aktywność może zostać wykorzystana w leczeniu chorób związanych z zaburzeniami w proliferacji i/lub różnicowaniu komórek. Zdolność cytokinin do indukowania różnicowania komórek ludzkich demonstrowano z wykorzystaniem keratynocytów i linii komórkowych białaczki (HL-60 i K-562) (Voller i in., 2010). Podczas gdy cytokinyne wpływają na różnicowanie komórek w zakresie 25-100μM, ich rybozydy wywołują apoptozę w niskich stężeniach poprzez obniżenie poziomu trifosforanów adenozyne, aktywację kaspaz i depolaryzację błony mitochondrialnej (Mlejnek, 2001; Voller i in., 2010).

Badano wpływ N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyny (rybozydu kinetyny) na komórki białaczki (Tiedemann i in., 2008) oraz obserwowano efekt cytotoksyczny N<sup>6</sup>-izopentenyloadenozyny, rybozydu kinetyny, N<sup>6</sup>-benzyladenozyny w guzach nowotworowych (Voller i in., 2010). N<sup>6</sup>-izopentenyloadenozyna została zidentyfikowana w tRNA<sup>Ser/Sec</sup> w komórkach wielu organizmów. Odgrywa ona rolę w kontrolowaniu syntezy białka, a enzym tRNA-izopentenylotransferaza jest białkiem supresji nowotworowej (Spinola i in., 2005). Uważa się, że ze względu na właściwości biologiczne cytokininy i ich pochodnych, związki te mogą być rozważane jako potencjalne terapeutyki w leczeniu chorób związanych z zaburzeniami w proliferacji (Voller i in., 2010).

Najlepiej poznanym hormonem roślinnym (cytokininą) jest N<sup>6</sup>-furfuryloadenina (kinetyna). Jej obecność stwierdzono także u zwierząt m.in. w autoklawowanym DNA z nasienia śledzia. Następnie zidentyfikowano ją w DNA wyizolowanym z ludzkich komórek oraz w ludzkim moczu (Barciszewski i in., 2007). Mechanizm powstawania N<sup>6</sup>-furfuryloadeniny związany jest z oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA. Rodnik hydroksylowy powoduje utlenianie węgla C5 deoksyrybozy, w wyniku czego tworzy się furfural. Nowopowstały aldehyd reaguje z grupą aminową adeniny powodując powstanie zasady Schiffa, a następnie N<sup>6</sup>-furfuryloadeniny w wyniku rearanżacji wewnątrzcząsteczkowej (Barciszewski i in., 2007). Uważa się, że proces ten stanowi odpowiedź komórki na czynniki indukujące stres oksydacyjny takie jak rodniki hydroksylowe.

W DNA pochodzącym z grasicy cielęcej oprócz N<sup>6</sup>-furfuryloadeniny zidentyfikowano także po raz pierwszy N<sup>4</sup>-furfurylocytozynę. Prawdopodobnie związek ten jest produktem uszkodzeń DNA, a mechanizm jego powstawania przebiega w sposób analogiczny do mechanizmu opisanego dla N<sup>6</sup>-furfuryloadeniny (J. Barciszewski, praca niepublikowana). Ze względu na właściwości antynowotworowe N<sup>6</sup>-furfuryloadeniny i jej rybozydu oraz fakt, że są one razem z nowo zidentyfikowaną N<sup>4</sup>-furfurylocytozyną, pochodnymi naturalnych składników DNA i substratów reakcji metylacji (cytozyny i adenozyne), związki te zostały wybrane do badań. Miały one na celu określenie ich aktywności biologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na proces metylacji w kontekście ich przydatności, jako potencjalnych terapeutyków w epigenetycznej terapii przeciwnowotworowej.

## 5.1. Reakcja metylacji *in vitro*

W celu przeprowadzenia analizy aktywności inhibitorowej związków niskocząsteczkowych, zaprojektowano test metylacji *in vitro* z wykorzystaniem modelowej prokariotycznej metylotransferazy SssI. Enzym ten jest analogiem ludzkiej DNMT1. SssI cechuje podobieństwo strukturalne do domeny katalitycznej enzymu eukariotycznego. SssI rozpoznaje i metyluje C5 cytozyny w obrębie sekwencji palindromowych CpG obu nici DNA (Koudan i in., 2004; Liu i in., 2009, Darii i in., 2009). Enzym ten był wykorzystywany w innych badaniach nad inhibitorami procesu metylacji (RG108, kurkumina) (Brueckner i in., 2005; Kunnumakkara i Aggarwal, 2008).

Jako substrat reakcji metylacji wybrany został wysokokopijny plazmid pUC18, posiadający 156 potencjalnych miejsc metylacji CpG.

### 5.1.1. Analiza metylacji plazmidowego DNA za pomocą enzymów restrykcyjnych MspI/HpaII

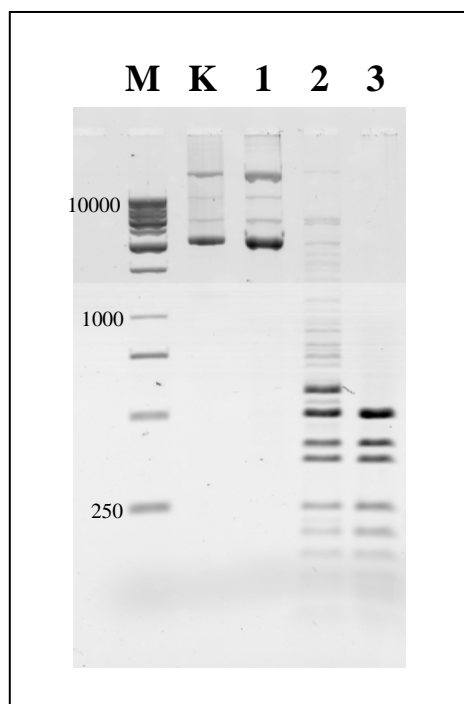
W celu potwierdzenia przydatności wybranego substratu przeprowadzono analizę metylacji plazmidu za pomocą pary enzymów restrykcyjnych MspI/HpaII (pkt. 4.6. rozdziału Materiały i metody). Enzymy te są izoschizomerami katalizującymi reakcję hydrolizy DNA w obrębie tej samej sekwencji:



MspI w przeciwieństwie do HpaII katalizuje hydrolizę substratu zawierającego zmetylowaną wewnętrzną cytozynę. W obrębie plazmidu pUC18 znajduje się 13 miejsc hydrolizy dla MspI/HpaII.

Analiza restrykcyjna zmetylowanego plazmidu wykazała, że metylacji ulegają wszystkie miejsca rozpoznawane przez enzym HpaII (Ryc. 9). Brak prążków w ścieżce 1 spowodowany jest zablokowaniem hydrolizy przez obecność m<sup>5</sup>C w obrębie rozpoznawanej sekwencji. W przypadku hydrolizy enzymem HpaII plazmidu niezmetylowanego widoczne są prążki w ścieżce 3. Ponieważ substratem dla enzymu MspI mogą być sekwencje zmetylowane, obserwuje się prążki w ścieżce 2.





**Rycina 9.** Analiza restrykcyjna zmetylowanego plazmidu pUC18 z wykorzystaniem izoschizomerów *MspI/HpaII*. Produkty hydrolizy analizowane w 1% żelu agarozowym. *M*-marker wielkości (*pz*), *K*-kontrola pUC18, *1*-zmetylowany pUC18 poddany hydrolizie *HpaII*, *2*-zmetylowany pUC18 poddany hydrolizie *MspI*, *3*-niezmetylowany pUC18 poddany hydrolizie *HpaII*.

### 5.1.2. Optymalizacja warunków reakcji metylacji cytozyny *in vitro*

W celu optymalizacji warunków reakcji metylacji wyznaczone zostały wartości następujących parametrów: ilość substratu (DNA), stężenie kofaktora ( $[^3\text{H}]\text{SAM}$ ), ilość jednostek (U) enzymu (*SssI*) oraz optymalny czas reakcji (pkt. 4.7.2). W pierwszym etapie przeanalizowano wpływ wzrastającej ilości DNA na wydajność reakcji metylacji mierzoną stężeniem wprowadzonych grup  $\text{CH}_3$  (Ryc. 10A). W składzie mieszaniny reakcyjnej znajdowało się od 0,1 do 3,2  $\mu\text{g}$  pUC18 oraz 160  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{SAM}$ . Reakcję prowadzono w obecności 1U *SssI* w czasie 30 minut. Proporcjonalny wzrost stężenia grup metylowych  $[^3\text{H}]\text{CH}_3$  w produkcie następuje w zakresie 0,1-1  $\mu\text{g}$  DNA. Powyżej tej ilości reakcja jest hamowana i nie obserwuje się zwiększenia stężenia produktu (Ryc. 10A). Hamowanie to może być wynikiem niedoboru substratów bądź też inhibicją enzymu przez powstający produkt (Kuhl, 1994).

W kolejnym etapie analizowano zależność pomiędzy ilością enzymu a stężeniem wprowadzonych grup metylowych (Ryc. 10B). Reakcję prowadzono w obecności 1  $\mu\text{g}$  DNA, 160  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{SAM}$  oraz 0,5-4U enzymu w czasie 30 minut.

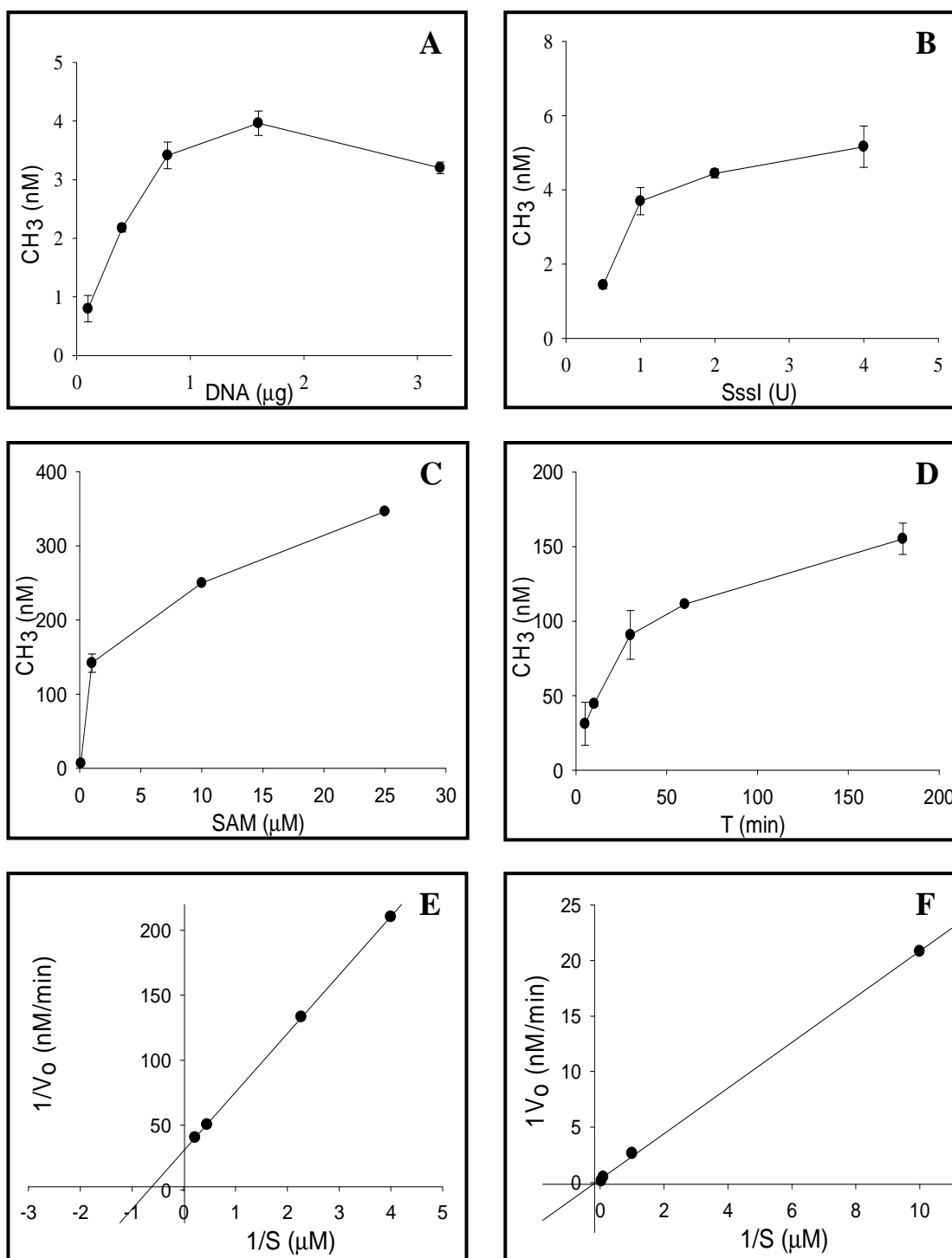
Zauważono, że stężenie produktu wzrasta wraz ze zwiększającą się ilością jednostek enzymu, przy czym do 1U obserwowany największy przyrost stężenia produktu ( $\Delta P=2,26\text{nM}$ ) (Ryc. 10B).

Wyznaczono także optymalne stężenie donora grup metylowych [ $^3\text{H}$ ]SAM (Ryc. 10C). Mieszanina reakcyjna zawierała  $1\mu\text{g}$  DNA i 1U SssI. Czas reakcji wynosił 30 minut. Wzrost stężenia powstającego produktu był zależny od stężenia donora grup metylowych ( $0,1\text{-}25\mu\text{M}$ ).

W ostatnim etapie wyznaczono optymalny czas reakcji metylacji. Reakcja katalizowana była przez 1U SssI w czasie 5-180 minut w obecności  $1\mu\text{g}$  DNA i  $2\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]SAM. Liniowy przyrost produktu (szybkość początkowa reakcji  $V_0$ ) obserwowano do 30 minuty trwania reakcji (Ryc. 10D).

### **5.1.3. Wyznaczenie wartości $K_m$ i $V_{\max}$ dla substratu i kofaktora reakcji metylacji**

W celu wyznaczenia parametrów  $K_m$  i  $V_{\max}$  (Ryc. 10E i F) w układzie enzym-substrat i enzym-kofaktor zmierzono szybkość początkową reakcji  $V_0$  (pkt. 4.7.3). W kolejnym etapie wykorzystując wartości  $V_0$  wyznaczono wartości parametrów  $K_m$  i  $V_{\max}$  dla substratu i kofaktora reakcji metodą Lineweavera-Burka (Lineweaver i Burk, 1934). Wartość  $K_m$  i  $V_{\max}$  dla substratu wynoszą  $1,52\mu\text{M}$  i  $32,6\text{nM}/\text{min}$ , a dla kofaktora  $7,14\mu\text{M}$  i  $3,47\text{ nM}/\text{min}$ .



**Rycina 10.** Optymalizacja reakcji metylacji *in vitro* z wykorzystaniem prokariotycznej metylotransferazy *SssI*. **A-** pUC18 inkubowano z 160 $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]SAM przez 30min. Na wykresie przedstawiono zależność pomiędzy stężeniem wprowadzonych do DNA grup metylowych a ilością DNA; **B-** pUC18 inkubowano w obecności 160 $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]SAM i zmiennej ilości jednostek enzymu *SssI* (0,5-4U); **C-** zależność pomiędzy zmieniającym się stężeniem donora grupy metylowej a stężeniem powstającego w produkcie w reakcji z 1 $\mu\text{g}$  pUC18 i 1U *SssI*; **D-** reakcja metylacji analizowana w czasie 5-180 minut; **E-** wyznaczenie wartości parametru  $K_m$  i  $V_{max}$  dla substratu (pUC18); **F-** wyznaczenie wartości parametru  $K_m$  i  $V_{max}$  dla kofaktora (SAM).

#### 5.1.4. Analiza aktywności inhibitorowej oraz zależność między strukturą a funkcją badanych związków

W pierwszym etapie badań mających na celu znalezienie inhibitora procesu metylacji określano tzw. związek wiodący (ang. *lead compound*). Jest to związek, który wykazuje, przynajmniej minimalną, aktywność inhibitorową w stosunku do wybranego enzymu. W mojej pracy związkami wyjściowymi w poszukiwaniu skutecznego inhibitora procesu metylacji były furfurylowe analogi zasad nukleinowych - N<sup>4</sup>-furfurylocytozyna i N<sup>6</sup>-furfuryloadenina. Przebadano szereg pochodnych tych związków oraz określono ich właściwości fizykochemiczne. Pozwala to na wskazanie modyfikacji, które wpływają pozytywnie na zwiększenie aktywności związków, co w efekcie prowadzi do uzyskania coraz skuteczniejszych inhibitorów.

Analizę inhibicji prowadzono metodą Dixona (Dixon, 1953). Badane związki można podzielić na 3 grupy:

- pochodne pirymidyn (cytozyny i uracylu)
- pochodne puryny (adeniny)
- oraz inne związki nie zaliczające się do żadnej z powyższych grup.

Wzory strukturalne związków umieszczono w tabelach 19-26 oraz w Załączniku 1.

W celu wyznaczenia wartości szybkości reakcji (V) w obecności inhibitora, reakcje prowadzono przez 10 minut dla 3 różnych stężeń substratu (0,44, 2,2, 4,4 μM odpowiednio 100, 500, 1000 ng pUC18) lub kofaktora SAM (0,1, 1, 10 μM) w obecności 3 różnych stężeń inhibitora (Tab. 11). Stężenia substratu i kofaktora zostały dobrane tak, aby nie przekraczały wartości 3xK<sub>m</sub>. Umożliwia to określenie typu inhibicji, zapobiegając wykluczeniu inhibitorów typu kompetycyjnego. Jednocześnie pozwala uzyskać odpowiednią szybkość reakcji i detekcję radioaktywnego sygnału (Ramakrishna i Prabhavathi, 2005).

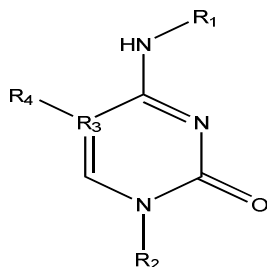
Dla każdego ze związków wyznaczono wartość stałej inhibicji oraz określono typ inhibicji (Tab. 19-26).

Pierwszą analizowanym związkiem była N<sup>4</sup>-furfurylocytozyna (1), której K<sub>i</sub> wynosi 70 μM (Tab. 19). Następnie sprawdzono aktywność jej pochodnych zawierających modyfikacje w pozycjach N1, N4, C5. Zmodyfikowanie grupy furfuralowej przez dodanie grupy hydroksymetylowej (CH<sub>2</sub>OH) (2) zmniejszyło

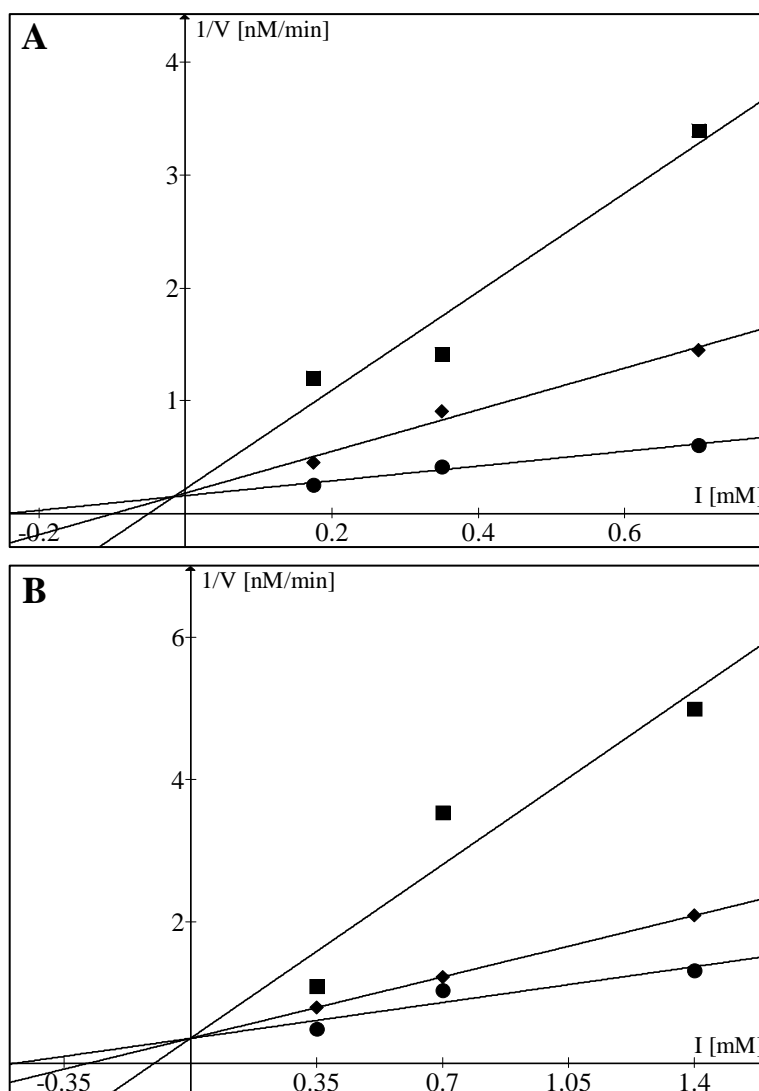
aktywność pochodnej (100-krotnie) w porównaniu z N<sup>4</sup>-furfurylocytozną. Wprowadzenie grupy metylowej w pozycję C5 (**5**) obniżyło wartość K<sub>i</sub> (Ryc. 11), jednakże zastąpienie jej grupą hydroksymetylową (**6**) lub formylową (**7**) podnosi wartość stałej inhibicji. Zastąpienie grupy hydroksymetylowej przez acetyloksymetylową (**8**) nieznacznie obniża K<sub>i</sub> (50μM) w porównaniu ze związkiem wyjściowym. Może być to spowodowane obniżeniem wartości cLogP i zwiększeniem hydrofobowości związku przez obecność grupy metylowej na końcu podstawnika. Odwrotny efekt miały modyfikacje związków **9** i **10** (N<sup>4</sup>-furfurylo-5-n-butyloaminometylocytozyna). W przypadku kwasu 5-sulfonylometylo-N<sup>4</sup>-furfurylocytozynowego (**9**) może wiązać się to ze zwiększeniem hydrofilowości w porównaniu do związku **1** (z 0,2 do -2,67) oraz tPSA (z 70,9 do 125,2). Przyłączenie 2'-deoksyrybozy do zasady spowodowało wzrost wartości K<sub>i</sub> (**3** i **4**). Oznacza to, że rozbudowywanie związków przez wprowadzanie w pozycję N1 dużych podstawników cukrowych zawierających grupy hydroksylowe osłabia aktywność inhibitorową związków.

Najskuteczniejszym inhibitorem okazała się N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna (**11**) (Ryc.11), której K<sub>i</sub> było niższe od związku wyjściowego 100- krotnie (Tab. 19).

**Tabela 19.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji pochodnych furfurylowych cytozyny. Wszystkie pochodne są inhibitorami kompetycyjnymi. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) i wiązań rotujących (WR) obliczono z wykorzystaniem programu Molinspiration Cheminformatics. Związki, których  $K_i \leq 100\mu\text{M}$  zostały oznaczone wersami w kolorze szarym. Kolorem czerwonym oznaczono najbardziej aktywną pochodną.



Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	K <sub>i</sub> [μM]	M.W [Da]	Ha/ Hd	cLogP	tPSA (Å <sup>2</sup> )	WR
1		H	C	H	70	191	5/2	0,29	70,9	3
2		H	C	H	700	221	6/3	-0,13	91,1	4
3			C	H	170	307	8/3	-0,94	109,7	5
4			C	CH <sub>3</sub>	250	321	8/3	-0,24	109,7	5
5		H	C	CH <sub>3</sub>	15	205	5/2	0,72	70,9	3
6		H	C	H <sub>2</sub> C—OH	440	199	6/3	-1,06	87,2	5
7		H	C		83	219	6/2	0,06	87,9	4
8		H	C		50	263	7/2	0,31	97,2	6
9		H	C		117	285	8/3	-2,67	125,2	5
10		H	C		960	276	6/3	1,27	82,9	8
11		H	N	H	0,7	194	6/3	-0,05	78,6	3



**Rycina 11.** Analiza inhibicji *SssI* metodą Dixona ( $1/V$  vs.  $I$ ). Reakcje były prowadzone w obecności różnych ilości DNA ■- 0,1  $\mu\text{g}$ , ◆- 0,5  $\mu\text{g}$ , ●- 1  $\mu\text{g}$ .  $I$ - stężenie inhibitora,  $V$ -szybkość reakcji. **A-**  $N^4$ -furfurylo-5-metylocytozyna (**5**), **B-**  $N^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna (**11**).

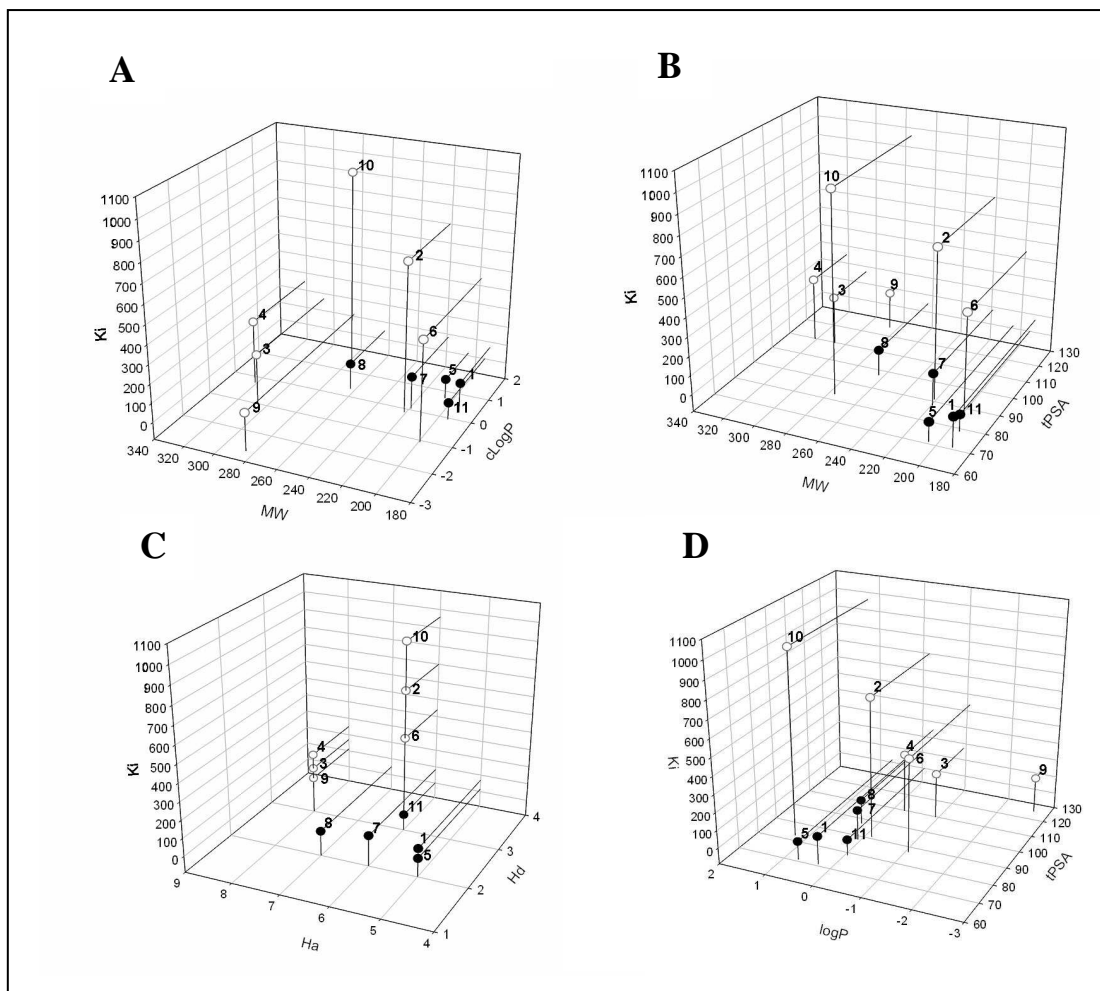
Analizując zależność pomiędzy wartościami  $c\text{LogP}$ ,  $K_i$  i masą cząsteczkową związków (Ryc. 12), można zauważyć, że te, których  $K_i$  jest mniejsze niż  $100\mu\text{M}$  (**1**, **5**, **7**, **8**, **11**) cechują się wartościami  $c\text{LogP}$  w zakresie od -0,05 do 0,72 (Tab. 19). Nie są to związki silnie lipofilowe, a przypadku **11** wartość tego parametru świadczy o słabej hydrofilowości. Wydaje się, że utrzymanie zbliżonych wartości  $c\text{LogP}$  ma większe znaczenie niż masy cząsteczkowej. Analizując dodatkowo parametr  $t\text{PSA}$  należy zaznaczyć, że inhibitory o  $K_i \leq 100\mu\text{M}$ , oprócz wyżej podanego zakresu  $c\text{LogP}$ , mieszczą się w zakresie 70,9 a 97,2 Å. Masa cząsteczkowa wszystkich związków z tej grupy jest niższa niż 500Da. Spełniają one także kryterium ilości akceptorów i donorów

wiązań wodorowych (Ha i Hd). W tej grupie inhibitorów, te których  $K_i$  nie przekracza  $100\mu\text{M}$  (oprócz **11**) mają 2 donory wiązań wodorowych. Natomiast ilość wiązań rotujących wynosi 3, z wyjątkiem związku **7**, gdzie jest ich 4 i **8** - 6. Wydaje się zatem, że decydującym parametrem jest tu Hd, które powinno wynosić 2 dla związków bez modyfikacji w pierścieniu cytozyny.

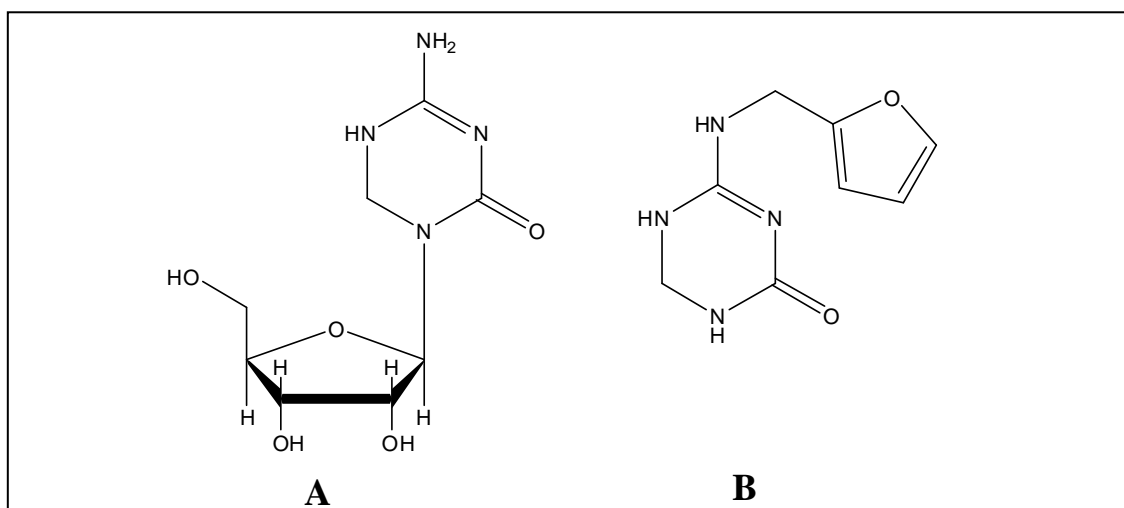
Wszystkie związki z tej grupy okazały się być inhibitorami kompetycyjnymi, co oznacza, że wiążą się tylko do wolnego enzymu (niezwiązanego z substratem). Najczęściej ten typ inhibicji obserwuje się w przypadku wiązania inhibitora w centrum aktywnym enzymu. Związek taki cechuje podobieństwo do substratu lub jego formy przejściowej (forma między substratem a produktem reakcji), dzięki czemu inhibitor może tworzyć podobne wiązania z grupami aktywnymi centrum. Istnieje także możliwość ograniczania dostępu substratu do miejsca aktywnego nie poprzez bezpośrednie jego blokowanie albo zmianę jego konformacji poprzez wiązanie się inhibitora w innym miejscu. Zatem obserwowany kompetycyjny typ inhibicji badanych pochodnych, wskazuje *de facto* tylko na współzawodniczenie substratu i inhibitora o wiązanie do tej samej, wolnej formy enzymu (Copeland, 2000).

Związek **11** jest furfurylową pochodną 5,6-dihydro-5-azacytydyny (Ryc. 13). Oba związki cechuje obecność zredukowanego wiązania podwójnego pomiędzy atomami N5 i C6. Wiązanie pojedyncze zapobiega tworzeniu się oddziaływań kowalencyjnych pomiędzy enzymem a inhibitorem, co potencjalnie może oznaczać niższą cytotoksyczność związku (Christman, 2002).



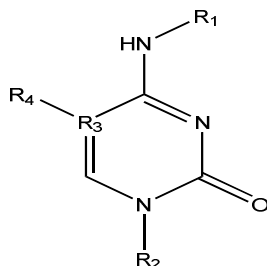


**Rycina 12.** Zależności pomiędzy wartościami parametrów fizykochemicznych a stałą inhibicji: **A-**  $c\text{LogP}/M\text{W}/K_i$ , **B-**  $t\text{PSA}/M\text{W}/K_i$ , **C-**  $H_d/H_a/K_i$ , **D-**  $t\text{PSA}/c\text{LogP}/K_i$ . Czarnymi punktami oznaczone zostały związki, których  $K_i \leq 100 \mu\text{M}$ .



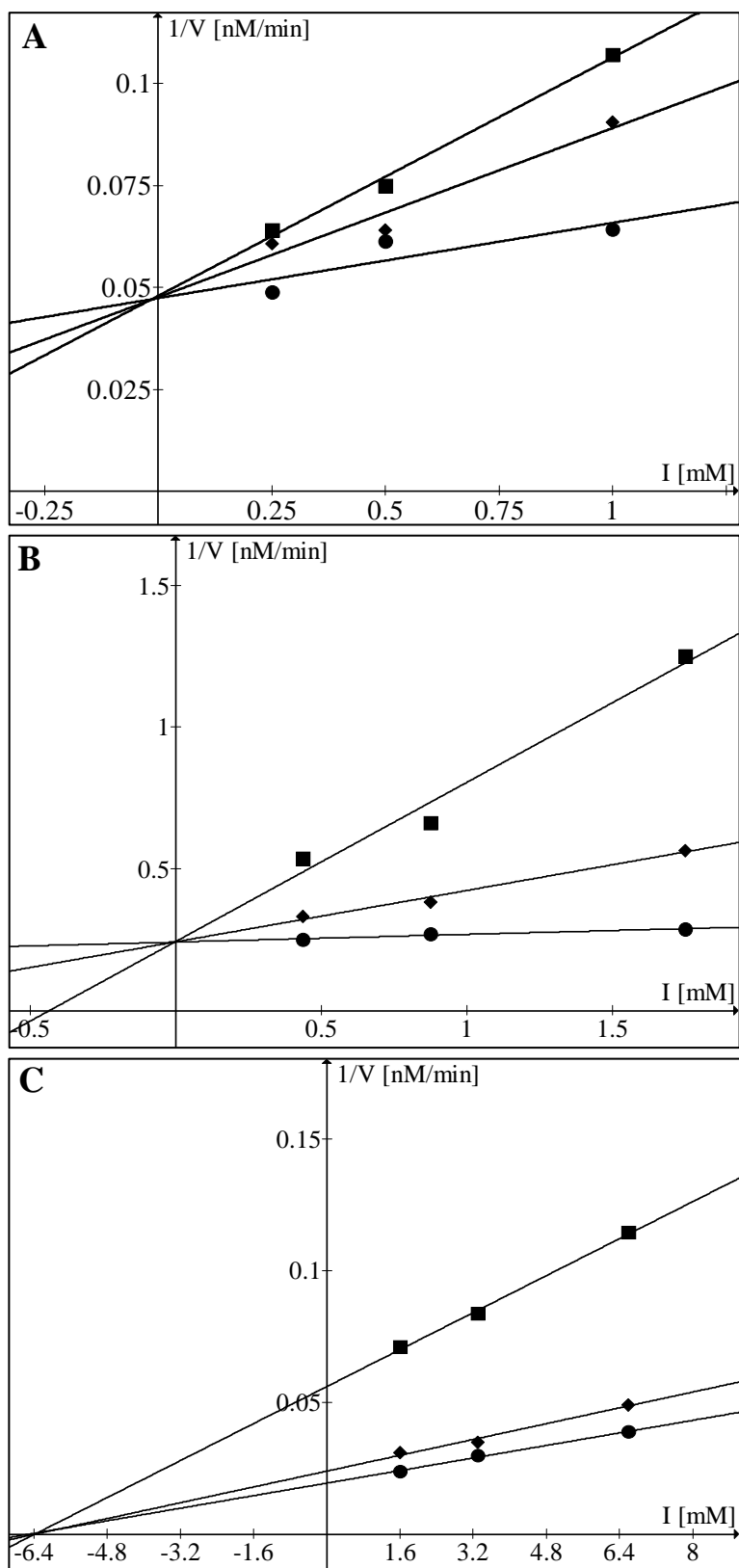
**Rycina 13.** **A** – 5,6-dihydro-5-azacytydina, **B-**  $N^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna.

**Tabela 20.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji pochodnych benzytowych cytozyny. Większość pochodnych to inhibitory kompetycyjne, dla których wyznaczono wartość  $K_i$  metodą Dixona. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) i wiązań rotujących (WR) wyznaczono jak wyżej. Związki, których  $K_i \leq 100\mu\text{M}$  zostały oznaczone wersami w kolorze szarym, \* inhibicja niekompetycyjna.

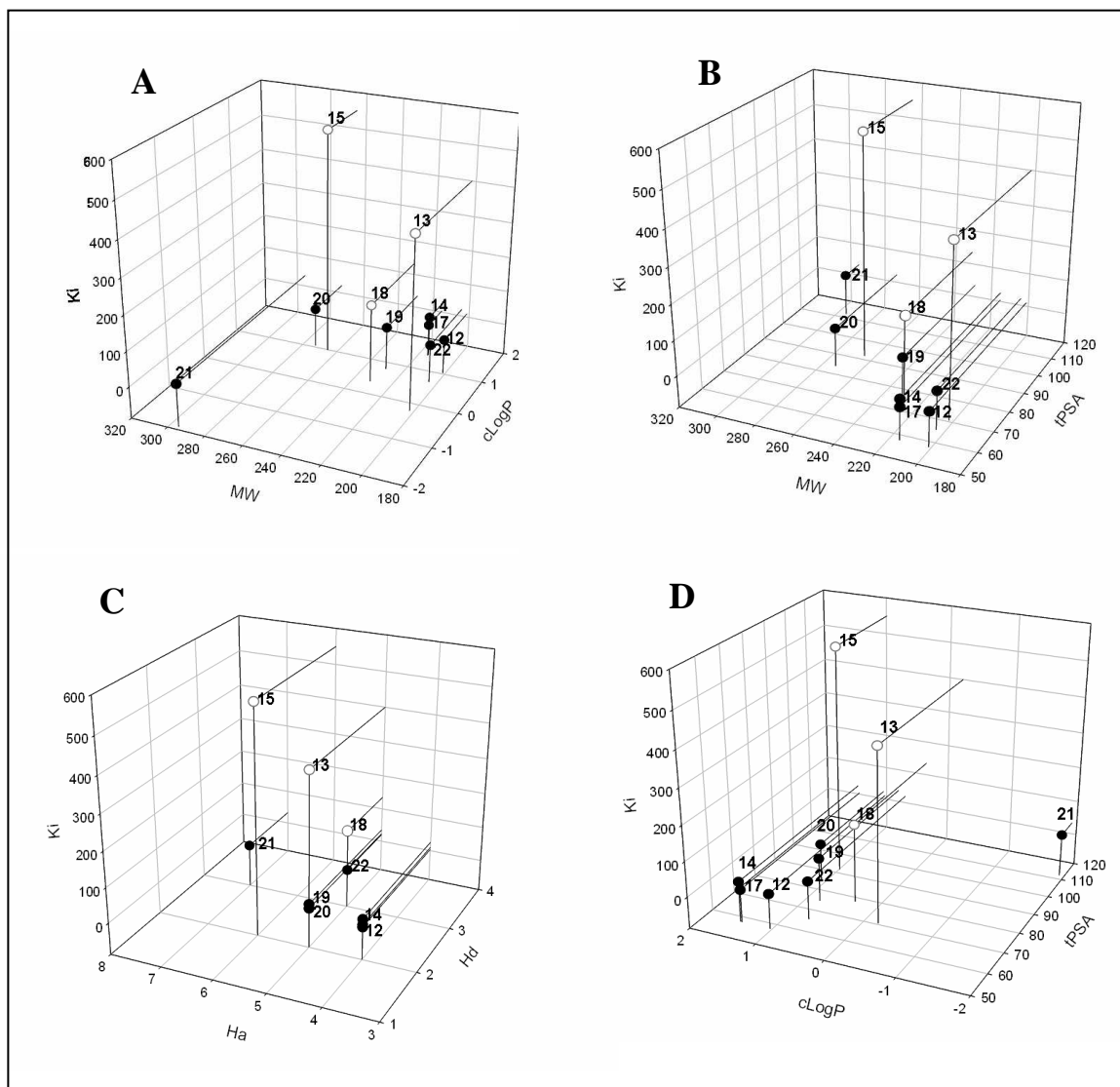


Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	K <sub>i</sub> [μM]	M.W. [Da]	Ha/Hd	cLogP	tPSA [Å]	WR
12		H	C	H	10	201	4/2	1,03	57,7	3
13		H	C	H	400	202	5/2	-0,2	70,6	3
14		H	C	H	26	215	4/2	1,48	57,7	3
15		H	C	H	550	265	6/2	0,99	91,9	3
16		H	C	H	6400 (*NK)	246	7/2	0,94	103,6	4
17		H	C	CH <sub>3</sub>	3,6	215	4/2	1,46	57,7	3
18		H	H	H <sub>2</sub> C-OH	135	231	5/3	0,35	78	4
19		H	C		35	229	5/2	0,8	74,8	4
20		H	C		23	273	6/2	1,05	84	6
21		H	C		33	295	7/3	-1,93	112,1	5
22		H	N	H	20	204,2	5/3	0,69	65,5	3

Drugą badaną grupą są pochodne cytozyny zawierające modyfikację przy egzoaminowym atomie azotu N<sup>4</sup> w postaci pierścienia benzyłowego (Tab. 20). Zwiększenie wielkości i hydrofobowości podstawnika (z cLogP 1,17 do 2,38) w tej pozycji spowodowało obniżenie K<sub>i</sub> do 10 μM (**12**) (Ryc. 14). Jego modyfikacje podnosiły wartość stałej inhibicji, co może wiązać się z obniżeniem lipofilowości pierścienia benzyłowego, jak w przypadku podstawnika 4-metylopirydynowego, zawierającego elektroujemny atom azotu z wolną parą elektronową (**13**), bądź też objętości molekularnej cząsteczki (**14**, **15**, **16**). Dodatkowo **16** posiada grupę NO<sub>2</sub> będącą akceptorem elektronów. Również wprowadzenie podstawników w pozycję C5 (**18**, **19**, **20**, **21**) oraz zastąpienie węgla C5 atomem azotu (**22**) obniżyło aktywność inhibitorową związków. Jedynym wyjątkiem była N<sup>4</sup>-benzylo-5-metylocytozyna (**17**), której K<sub>i</sub> wynosi 3,6 μM. Porównując związki **18-21** z ich furfuryłowymi odpowiednikami, można zauważyć, że są one skuteczniejszymi inhibitorami, jednak ich wartości K<sub>i</sub> są wyższe w porównaniu do związku **11** (Tab. 19 i 20). Wyjątkiem od tej zależności jest pochodna **22** (N<sup>4</sup>-benzylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna), która wbrew tej zasadzie charakteryzuje się wyższą (prawie 30-krotnie) stałą K<sub>i</sub> (20 μM), niż jej furfuryłowy odpowiednik (N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna, K<sub>i</sub> = 0,7 μM). Prawie wszystkie związki z tej grupy okazały się być inhibitorami kompetycyjnymi. Wyjątkiem jest związek nr **16**, który jest inhibitorem niekompetycyjnym. Oznacz to, że może on wiązać się do enzymu w formie wolnej bądź też związanego z substratem i nie konkuruje z substratem o miejsce wiązania do centrum aktywnego (Copeland, 2000).



**Rycina. 14.** Analiza inhibicji SssI metodą Dixona ( $1/V$  vs  $I$ ). **A-**  $N^4$ -benzylcytozyna (**12**), **B-**  $N^4$ -benzyl-5-metylocytozyna (**17**), **C-**  $N^4$ -(o)nitrocytozyna (**16**). Reakcje były prowadzone w obecności różnych ilości DNA ■-0,1  $\mu$ g, ◆- 0,5 $\mu$ g, ●- 1 $\mu$ g.  $I$ - stężenie inhibitora,  $V$ -szybkość reakcji. Związek **16** jest inhibitorem niekompetycyjnym.



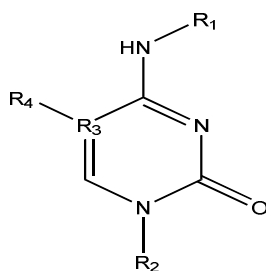
**Rycina 15.** Zależności pomiędzy wartościami parametrów fizykochemicznych a stałą inhibicji: **A-** cLogP/MW/ $K_i$ , **B-** tPSA/MW/ $K_i$ , **C-** Hd/Ha/ $K_i$ , **D-** tPSA/cLogP/ $K_i$ . Czarnymi punktami oznaczone zostały związki, których  $K_i \leq 100 \mu\text{M}$ . W analizach nie był brany pod uwagę związek 16 ze względu na inny typ inhibicji (niekompetycyjny), który go cechuje.

Z grupy 11 pochodnych benzytowych cytozyny (Tab. 20), aż 7 związków cechuje się wartościami  $K_i$  niższymi niż  $100 \mu\text{M}$  ( $3,6$  do  $35 \mu\text{M}$ ). Dla 5 z nich są one bardzo zbliżone ( $20$ - $35 \mu\text{M}$ ). Analizując parametry fizykochemiczne (Ryc. 15) można zauważyć, że wartość cLogP tych związków wynosi od  $0,69$  do  $1,48$ . Oznacza to, że inhibitory te ( $K_i \leq 100 \mu\text{M}$ ), w porównaniu z pochodnymi furfuryłowymi, cechują się wyższą lipofilowością, jednak nie można stwierdzić, że aktywność rośnie wraz z jej spadkiem lub wzrostem w podanym wyżej zakresie. Dodatkowo inhibitorem z porównywalną wartością stałej inhibicji ( $K_i 33 \mu\text{M}$ ) jest pochodna **21** będąca związkiem

hydrofilowych (cLogP -1,93). Grupa sulfonylometylowa zwiększa ilość akceptorów wiązań wodorowych o 3 i donorów o 1. **21** jest jedynym związkiem w tej grupie z taką liczbą atomów uczestniczących w tworzeniu wiązań wodorowych. W przypadku pochodnych furfurylowych obecność grupy OH obniżała aktywność inhibitorową. Tę samą zależność można zauważyć w przypadku związku **18**, natomiast związek **21** nie wpisuje się w tę regułę.

Nie można także stwierdzić, w przeciwieństwie do pochodnych furfurylowych, że inhibitory o  $K_i \leq 100 \mu\text{M}$  cechuje określona ilość Hd, Ha lub WR czy też znajdują się one w określonym zakresie tPSA, ponieważ wartości tych parametrów dla tej grupy inhibitorów są przyjmowane także przez pozostałe związki.

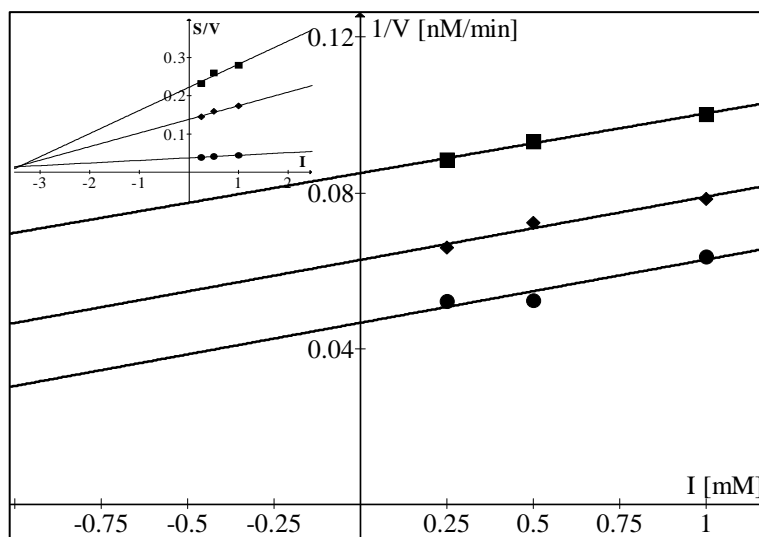
**Tabela 21.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji pochodnych cytozyny z łańcuchami alifatycznymi wyznaczone w teście inhibicji metylacji *in vitro*. Wszystkie pochodne są inhibitorami akompetycyjnymi, dla których wyznaczono wartość  $K_i$  metodą Dixona i Cornisha-Bowdena. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) i wiązań rotujących (WR) wyznaczono jak wyżej.



Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	K <sub>i</sub> [μM]	M.W. [Da]	Ha/Hd	cLogP	tPSA [Å]	WR
23	HC—	H	C	H	5600	137	4/1	0,09	58,1	1
24	HC—	H	C	H	3400	151	4/1	0,59	58,1	2
25	HC—	H	C	H	800	165	4/1	1,15	58,1	3
26	H <sub>2</sub> C—	H	C	H	6000	139	4/2	0,1	57,7	2
27	H <sub>2</sub> C—	H	C	H	1000	167	4/2	1,07	57,7	4

Trzecią grupą pochodnych cytozyny były związki posiadające modyfikacje w postaci łańcuchów alifatycznych w pozycji N4 (Tab. 21). Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, spermidyna i putrescyna (poliaminy, będące długimi łańcuchami alifatycznymi z grupami NH) są niekompetycyjnymi inhibitorami DNA metylotransferaz (Ruiz-Herrera i in., 1995). W związku z tym zaprojektowane zostały pochodne posiadające łańcuchy alifatyczne w pozycji C5 (**10**) oraz N4 (**23-27**). W porównaniu ze związkami z pierścieniami aromatycznymi (furfural, benzyl) w pozycji

N4, okazały się być znacząco słabszymi inhibitorami ( $K_i > 800 \mu\text{M}$ ). Dodatkowo cechują się akompetycyjnym typem inhibicji (Ryc. 16), co oznacza, że związki te wiążą się wyłącznie do enzymu związanego z substratem (Copeland, 2000). Ze względu na niską aktywność w teście metylacji *in vitro* nie były brane pod uwagę w dalszych badaniach.



**Rycina 16.** Analiza inhibicji *SssI* metodą Dixon'a ( $1/V$  vs.  $I$ ) i Cornisha-Bowdena ( $S/V$ ). Związek **24** jest inhibitorem akompetycyjnym. Reakcje były prowadzone w obecności różnych ilości DNA ■-0,1  $\mu\text{g}$ , ◆- 0,5 $\mu\text{g}$ , ●- 1 $\mu\text{g}$ .  $I$ - stężenie inhibitora,  $V$ -szybkość reakcji,  $S$ -stężenie substratu.

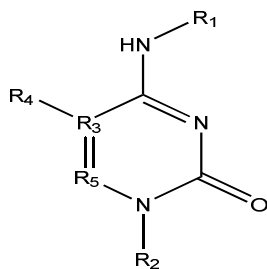
Sprawdzono także aktywność inhibitorową związków będących pochodnymi zasad azotowych, które nie posiadają modyfikacji w postaci pierścienia aromatycznego (Tab. 21).

Kwas orotowy (kwas uracylokarboksylowy) posiada grupę karboksylową w pozycji C6. Związek ten znany jest również pod nazwą witamina B13 i produkowany jest przez florę bakteryjną jelit. Stanowi prekursor w syntezie pochodnych pirymidynowych. Uważa się także, że pełni rolę antyoksydanta poprzez wpływ na aktywację ekspresji genów, kodujących enzymy biorące udział w usuwaniu wolnych rodników. Związek ten cechował się wysoką wartością  $K_i$  (1mM).

5-azacytozyna jest pochodną stosowanej w leczeniu 5-azacytydyny pozbawioną pierścienia rybozy. Mechanizm działania 5-azacytydyny *in vivo* polega na fosforylacji związku i wbudowaniu do DNA, a następnie kowalencyjnym wiązaniu DNMT1. W teście metylacji *in vitro* sprawdzono czy 5-azacytozyna w formie wolnej (nie wbudowanej w oligonukleotyd) będzie hamowała aktywność metylotransferazy *SssI*. Związek cechuje się bardzo wysoką stałą inhibicji ( $K_i = 5,5\text{mM}$ ) (Tab. 22).

Wyniki te są zgodne z opublikowanymi danymi uzyskanymi w innym bezkomórkowym teście inhibicji metylacji, w którym badana była 5-azacytozyna i 5-azacytydyna w formie wolnej. Obie nie wykazywały żadnych aktywności w hamowaniu metylotransferaz w stężeniach niższych niż 1,28mM (Hemeon i in., 2011).

**Tabela 22.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji pochodnych cytozyny wyznaczone w teście inhibicji metylacji *in vitro*. Oba związki są bardzo słabymi inhibitorami kompetycyjnymi. Parametry *cLogP* i *tPSA* oraz liczbę akceptorów i donatorów wiązań wodorowych (*Ha/Hd*) i wiązań rotujących (*WR*) wyznaczono jak wyżej.



Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	K <sub>i</sub> [μM]	MW [Da]	Ha/Hd	cLogP	tPSA [Å <sup>2</sup> ]	WR
28	H	H	C	H		1000	155	6/4	-0,7	109	1
29	H	H	N	H	H	5500	112	5/3	-1,24	84,6	0

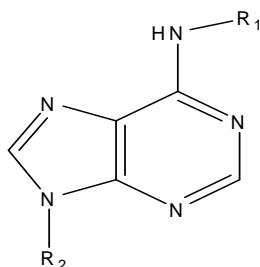
Badane były pochodne adenozyliny posiadające modyfikacje w pozycjach N6 i N9. W celu sprawdzenia ich aktywności, przeprowadzono testy inhibicji metodą Dixona, gdzie zmienną było stężenie S-adenozylu-L-metioniny, która jest kofaktorem reakcji. W ten sposób sprawdzono czy analogi SAM konkurują z tą cząsteczką o miejsce wiązania do enzymu. W literaturze opisane jest hamowanie DNMT1 przez SAH (S-adenozylu-L-homocysteinę) oraz pochodne - sinefunginę i inne z modyfikacjami w pozycjach C2, N6 i w obrębie fragmentu homocysteinowego (Isakovic i in., 2009). Testowane związki pozbawione są fragmentu homocysteinowego.

Pierwsza grupa to pochodne furfurylowe (Tab. 23). Związkiem wyjściowym była N<sup>6</sup>-furfuryloadenina (**30**). Wartość K<sub>i</sub> mierzona w teście inhibicji wynosiła 6000μM. Zatem związek ten wykazuje niewielką aktywność. Modyfikacja kinetyny polegała na przyłączeniu rybozy w pozycji N9 pierścienia purynowego (**31**), co nieznacznie obniżyło wartość K<sub>i</sub> (3,3mM). Usunięcie grupy hydroksylowej z pozycji C2' i zastąpienie rybozy przez 2'-deoksyrybozę (**32**) (Ryc. 17) zmniejszyła wartość K<sub>i</sub>

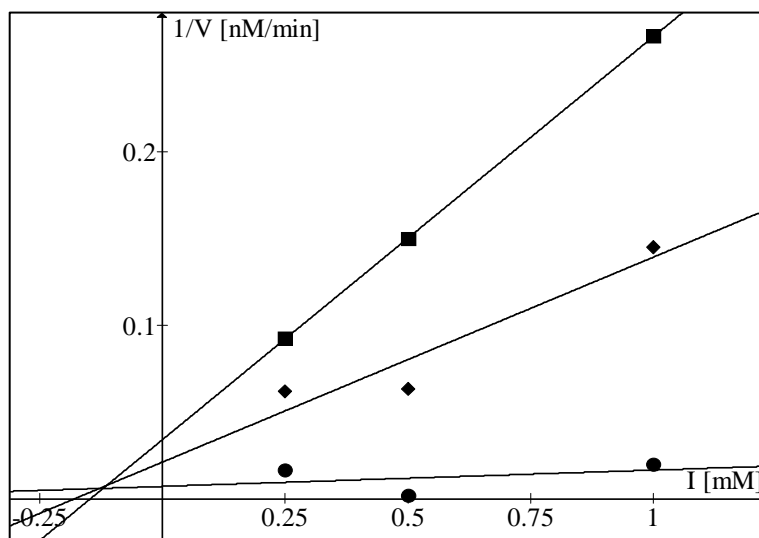


33-krotnie ( $110\mu\text{M}$ ). Związek ten, jako najlepsza pochodna adenozy, został wykorzystany w kolejnych badaniach. W porównaniu ze związkiem **32**, zastąpienie pierścienia rybozy pierścieniem pyranowym (**33**) pogorszyło aktywność inhibitorową ponad 7-krotnie.

**Tabela 23.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji furfurylowych pochodnych adenozy. Parametry *cLogP* i *tPSA* oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (*Ha/Hd*) i wiązań rotujących (*WR*) wyznaczono jak wyżej.

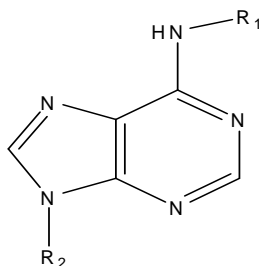


Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	K <sub>i</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	M.W. [Da]	Ha/Hd	cLogP	tPSA [ $\text{\AA}$ ]	WR
30		H	6000	215	2/6	1,26	79,63	3
31			3300	347	4/10	0,17	138,69	5
32			110	331	3/9	0,13	118,46	5
33			810	299	1/7	1,7	78,01	4



**Rycina 17.** Analiza inhibicji *SssI* metodą Dixona ( $1/V$  vs.  $I$ ).  $N^6$ -furfurylo-2'-deoksyadenozyna (**32**) jest inhibitorem kompetycyjnym. Reakcje były prowadzone w obecności różnych stężeń SAM ■- $0,1\mu\text{M}$ , ◆-  $1\mu\text{M}$ , ●-  $10\mu\text{M}$ .  $I$ - stężenie inhibitora,  $V$ -szybkość reakcji.

**Tabela 24.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji pochodnych benzytowych adenozyne Parametry  $c\text{LogP}$  i  $t\text{PSA}$  oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych ( $H_a/H_d$ ) oraz wiązań rotujących ( $WR$ ) wyznaczono jak wyżej.

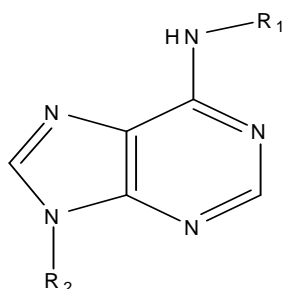


Nr	$R_1$	$R_2$	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	MW [Da]	$H_a/H_d$	$c\text{LogP}$	$t\text{PSA}$ [ $\text{\AA}$ ]	WR
34		H	290	225	5/2	2	66,4	3
35		H	440	347	5/2	2,45	66,4	3
36			350	299	6/1	2,45	64,8	4

W Tab. 24 zestawiono benzytowe pochodne adenozyne. Wyjściowym związkiem była  $N^6$ -benzyloadnozyne (**34**), której wartość  $K_i$  wynosi  $290\mu\text{M}$ . Podstawienie pierścienia benzykowego grupą metylową w pozycji *para* (**35**) obniżyła

aktywność inhibitorową tego związku ( $K_i = 440\mu\text{M}$ ). Analogiczną sytuację można zauważyć modyfikując N<sup>6</sup>-benzyladenozynę pierścieniem piranylowym w pozycji N9 (**36**). Jednakże tak jak w przypadku pochodnych cytozynowych, w parze związków pochodna furfurylowa - benzykowa ta druga okazuje się być skuteczniejszym inhibitorem.

**Tabela 25.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji pochodnych adenozyny. Parametry *cLogP* i *tPSA* oraz liczbę akceptorów i donatorów wiązań wodorowych (*Ha/Hd*) oraz wiązań rotujących (*WR*) wyznaczono jak wyżej. Związki, których  $K_i \leq 100\mu\text{M}$  zostały oznaczone wersami w kolorze szarym.



Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	K <sub>i</sub> [μM]	MW [Da]	Ha/Hd	cLogP	tPSA [Å]	WR
37		H	1550	177	5/2	1,48	66,4	3
38		H	1200	335	9/4	1,19	125,5	5
39		H	750	205	5/2	2,55	66,4	5
40	H		5500	209	7/3	-0,45	99	4
41	H		77	567	17/5	-1,31	228,1	6

Trzecia grupa to pochodne adeniny posiadające łańcuch alifatyczny w pozycji N6 lub inne modyfikacje w pozycji N9 (Tab. 25). Wyjściowym związkiem była N<sup>6</sup>-izopentenyloadenozyna (**38**). Pochodna ta badana była pod kątem właściwości antyproliferacyjnych z wykorzystaniem linii nowotworu pęcherza oraz nabłonka (Colombo i in., 2009; Ottiria i in., 2010). Związek ten okazał się być słabym

inhibitorem reakcji metylacji ( $K_i = 1550\mu\text{M}$ ). Jeszcze niższą aktywnością cechuje się pochodna pozbawiona rybozy z grupą propylową w pozycji  $R_1$  (**37**). Natomiast wprowadzenie grupy pentenyłowej obniżyło o 62% wartość  $K_i$  ( $750\mu\text{M}$ ), jednakże związek ten nadal jest bardzo słabym inhibitorem.

Badano także aktywność adenozyiny, której pierścień rybozy zastąpiono grupą 2-hydroksyetyksymetylową, będącą fragmentem tego pierścienia odpowiadającemu atomom  $C1'$ ,  $O4'$ ,  $C4'$ ,  $C5'$  i  $O5'$  (**40**). Związek ten jest analogiem acyklowiru, pochodnej guanozyiny stosowanej w leczeniu chorób wirusowych, która hamuje syntezę DNA poprzez terminację łańcucha. Przeprowadzona na liniach komórkowych wyprowadzonych z glejaka - T98G, SNB-19 i U-373 analiza właściwości antyproliferacyjnych acyklowiru wykazała, że związek hamował proliferację komórek, ponieważ 7 krotnie częściej dochodziło w nich do jego fosforylacji w porównaniu z prawidłowymi komórkami (astrocyty) (Kominsky i in., 2000). Związek **40** jest jednak słabym inhibitorem niekompetycyjnym procesu metylacji.

Sprawdzono także aktywność cyklicznego fosforanotriestru 2',3'-dideoksyadenozyno-5'-ylo tymidyn-3'5'-ylowego (**41**).  $K_i$  tego związku wynosi  $77\mu\text{M}$ , jest więc on inhibitorem o umiarkowanej aktywności. Stanowi jednak dobry punkt wyjścia do zaplanowania syntez kolejnych podobnych pochodnych zbudowanych z dwóch połączonych nukleozydów.

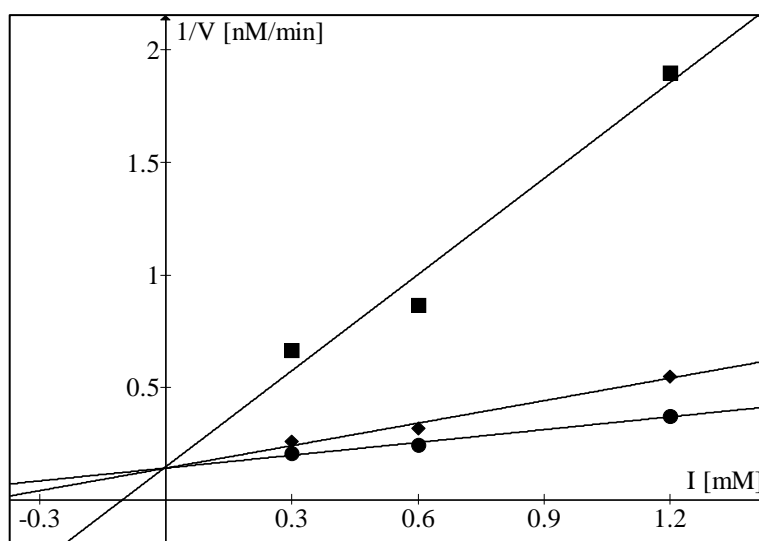
Badano wpływ 5-fluorouracydiny (**42**) i jej 5' fosforan (**43**) oraz jej 3 pochodnych modyfikowanych w obrębie reszty fosforanowej (**44**, **45**, **46**) na reakcję metylacji *in vitro* (Tab. 26).

5-fluorouracydyna (FU), jest szeroko stosowanym w leczeniu guzów nowotworowych antymetabolitem pirymidynowym. Mechanizm jej działania polega na przekształceniu FU w formę aktywną- monofosforan 5-fluoro-2' deoksyurydiny przez fosforylaze tymidynową i kinaze tymidynową, a następnie na blokowaniu syntezy DNA (hamowanie aktywności syntetazy tymidyłowej) w fazie S cyklu komórkowego.

Aktywności FU w komórce związana jest także z wbudowywaniem metabolitów tego związku do RNA. W konsekwencji prowadzi to do hamowania syntezy białek czy też powstawania nadmiernej ilości reaktywnych form tlenu (Pinedo i Peters, 1988). Badano także inne pochodne fluorowe, w tym 5-fluorocytozynę. Związek ten hamował DNMT1. Mechanizm jego działania, tak jak pochodnych 5-azanukleozydowych, polega na tworzeniu trwałych kowalencyjnych

wiązań z enzymem (Gowher i Jeltsch, 2004).

Celem analizy tej grupy pochodnych było sprawdzenie czy 5-fluorourydyna (**42**) oraz jej fosforan (**43**) w formie wolnej, będą hamowały aktywność metylotransferazy poprzez inhibicję kompetycyjną i jaki wpływ na aktywność tego enzymu będą miały modyfikacje polegające na wprowadzeniu podstawnika aromatycznego. Podstawnik ten został przyłączony nie bezpośrednio do zasady (jak w przydatku wcześniej badanych pochodnych), ale połączony rybozą poprzez resztę kwasu fosforanowego (**44-46**).

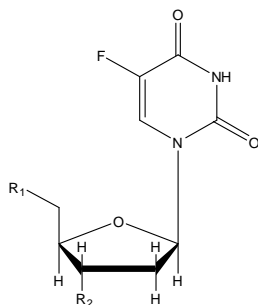


**Rycina 18.** Analiza inhibicji SssI metodą Dixona ( $1/V$  vs.  $I$ ). Związek (**45**) jest najskuteczniejszym inhibitorem w grupie testowanych pochodnych 5-fluorourydyny. Reakcje były prowadzone w obecności różnych ilości DNA ■- 0.1 µg, ◆- 0,5µg, ●- 1µg.  $I$ - stężenie inhibitora,  $V$ -szybkość reakcji.

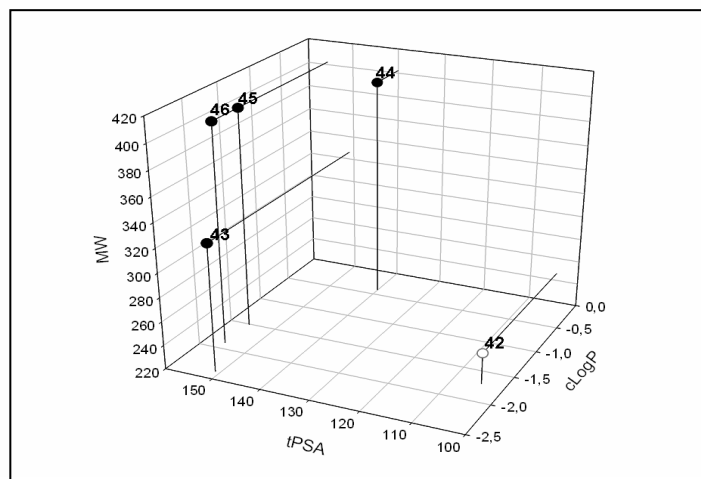
Tak jak 5-azacytozyna ( $K_i$  5,5mM) i 5-azacytydina (Hemeon i in., 2011) oraz obie furfurylowe pochodne cytydyny (**3**, **4**), 5-fluorourydyna (**42**) wykazuje niewielki wpływ na aktywność SssI. Jednakże dodanie reszty fosforanowej obniża wartość stałej inhibicji 14-krotnie. Może to wynikać ze zwiększenia liczby akceptorów i donorów wiązań wodorowych i wartości parametru tPSA, wskazującego powierzchnie polarną, która niezbędna jest do oddziaływania z enzymem (Kumar i in., 2010). Wyższa aktywność pochodnej **43** może być także wiązana z faktem, że w mechanizm reakcji metylacji zaangażowana jest grupa fosforanowa DNA, której zadaniem jest deprotonacja grupy -SH katalitycznej cysteiny (Zangi i in., 2010). Wymaga dalszej analizy czy fosforan pochodnej **43** spełnią podobną funkcję, aktywując tym samym nukleofil, który atakuje atom C6 cytozyny.

Aktywność związków zwiększyły przyłączone do grupy fosforanowej podstawniki aromatyczne (**44-46**), przy czym można zauważyć różnicę w wartościach  $K_i$  związków **45** i **46** (5,5 i 9 $\mu$ M), różniących się pozycją atomu azotu w pierścieniu benzylowych (*orto* i *para*). Obecność tego azotu wpływa na lipofilowość tych pochodnych (cLogP), obniżając ją w stosunku do **44** (Tab. 26, Ryc. 18). Oba związki przekraczają liczbę dozwolonych regułą Lipińskiego akceptorów wiązań wodorowych, co może wpłynąć na parametry ADMET.

**Tabela 26.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji pochodnych 5-fluorouracydyny wyznaczone w teście inhibicji metylacji *in vitro*. Parametry cLogP i tPSA oraz liczbę akceptorów i donatorów wiązań wodorowych (Ha/Hd) oraz wiązań rotujących (WR) wyznaczono jak wyżej. Związki, których  $K_i \leq 100\mu$ M zostały oznaczone wersami w kolorze szarym.



Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	K <sub>i</sub> [ $\mu$ M]	MW [Da]	A/D	cLogP	tPSA [ $\text{\AA}$ ]	WR
<b>42</b>	OH	OH	1100	246	7/3	-1,71	104,5	2
<b>43</b>		OH	80	326	10/4	-2,38	151	4
<b>44</b>		OH	31	402	10/3	-0,41	140	6
<b>45</b>		OH	5,5	402	11/4	-1,51	155,7	6
<b>46</b>		OH	9	402	11/4	-1,9	155,7	6



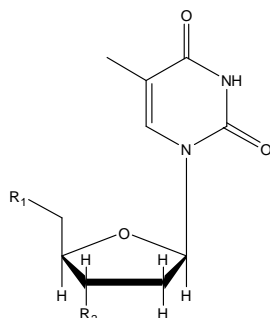
**Rycina 19.** Zależności pomiędzy wartościami parametrów  $cLogP/tPSA/MW$ . Czarnymi punktami oznaczone zostały związki, których  $K_i \leq 100 \mu M$ .

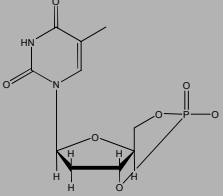
Właściwości fizykochemiczne ( $cLogP/tPSA/MW$ ) (Ryc. 19) wskazują, że masa cząsteczkowa i wartości  $tPSA$  dla inhibitorów o najniższych wartościach  $K_i$  (**45**, **46**) są identyczne. Związki różnią się wartością parametru  $cLogP$ . Pozostałe 3 związki, nawet jeśli posiadają wartość jednego z parametrów zbliżoną do **45** lub **46**, charakteryzują się wyższymi wartościami  $K_i$ .

W teście inhibicji metylacji *in vitro* zbadana została także AZT (azydotymidyna) oraz cyklicznego fosforanotriestru 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo tymidyn-3',5'-ylowego (**48**). AZT została zaprojektowana jako związek mający mieć zastosowanie w leczeniu nowotworów (Wagner i in., 1997). W porównaniu z takimi chemoterapeutykami jak 5-fluorouracyl, 5-fluoro-2'-deoksyurydyna, taksol czy doksorubicyna wykazywała tylko nieznaczną aktywność. Ze względu na wydajniejszą aktywację poprzez fosforylację, AZT cechuje się selektywnym działaniem w liniach komórkowych raka piersi i gruczołu piersiowego. Dodatkowo wykazano, że terapia łączona metotreksat/cisplatyna i AZT daje pozytywny wynik (Wagner i in., 1997).

Obecnie AZT jest przede wszystkim lekiem stosowanym w leczeniu osób zarażonych HIV. Związek ten jest antymetabolitem, którego mechanizm działania polega na terminacji syntezy łańcucha wirusowego DNA powstającego w wyniku odwrotnej transkrypcji (Wagner i in., 1997).

**Tabela 27.** Właściwości fizykochemiczne oraz wartości stałej inhibicji AZT i jej pochodnej. Parametry *cLogP* i *tPSA* oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (*Ha/Hd*) i wiązań rotujących (*WR*) wyznaczono jak wyżej. Związki, których  $K_i \leq 100\mu\text{M}$  zostały oznaczone wersami w kolorze szarym.



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>K<sub>i</sub></b> [ $\mu\text{M}$ ]	<b>M.W.</b> [Da]	<b>A/D</b>	<b>cLogP</b>	<b>tPSA</b> [ $\text{\AA}$ ]	<b>WR</b>
<b>47</b>	OH	$\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$	11500	267,2	9/2	-0,099	134	3
<b>48</b>		$\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$	32	553,4	17/2	-0,834	222,7	6

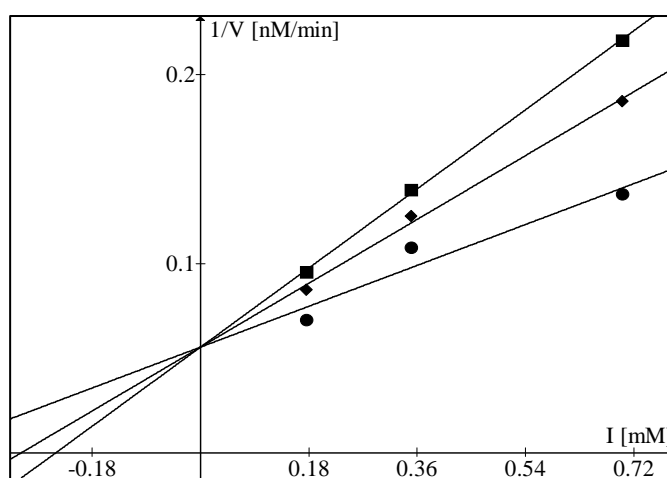
W grupie badanych związków nie należących do pochodnych zasad nukleinowych (Tab. 28) znalazł się floretamid, związek obecny w jabłkach *Malus domestica* (**49**). Wykazano, że działa on pro-proliferacyjnie na komórki fibroblastów (Patent No US 7,923,578 B2). Aktywność tego związku analizowano ze względu na obecność podstawnika aromatycznego, który był czynnikiem wpływającym na wartość parametru  $K_i$  oraz fakt, że ekstrakt z jabłka odmiany *Annurca* posiada właściwości antynowotworowe, dzięki obniżaniu poziomu metylacji regulatorów cyklu komórkowego (Fini i in., 2007). Floretamid nie wykazywał aktywności w teście *in vitro*, nawet w wysokich stężeniach (ok. 10mM).

Kolejnym związkiem był furosemid, diuretyk stosowany w leczeniu, posiadający w swojej strukturze grupę furfurylową. Związek ten jest inhibitorem metylotransferazy tiopurynowej, której substratem jest  $\text{N}^6$ -merkaptopuryna będąca analogiem adenozyiny. Wartość parametru  $\text{IC}_{50}$  wyznaczona dla tego związku wynosiła  $170\mu\text{M}$  i charakteryzował się on niekompetycyjnym typem hamowania reakcji (Lysaa i in., 1996). Furosemid okazał się być inhibitorem cechującym się wysoką wartością  $K_i$ ,



w teście inhibicji SssI.

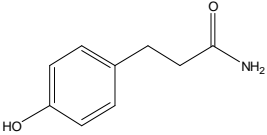
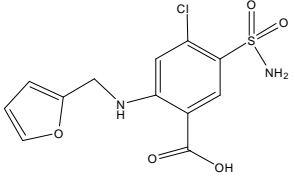
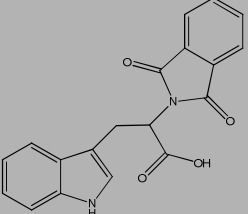
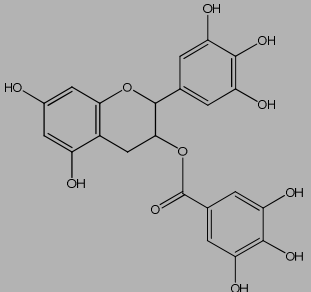
W celu porównania badanych związków z komercyjnie dostępnym kompetycyjnym inhibitorem metylotransferazy, analizie poddano RG108, będący pochodną L-tryptofanu. Wykazano, że związek ten hamuje metylotransferazę SssI ( $IC_{50}$   $0,115\mu M$ ) (Brueckner i in., 2005). W opracowanym przez mnie teście wyznaczona wartość  $K_i$  RG108 wynosi  $0,23\mu M$  (Ryc. 20) i jest ona 3 krotnie niższa od najlepszego inhibitora z grupy pochodnych zasad nukleinowych – 4N-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyny (**11**) ( $K_i$   $0,7\mu M$ ). Należy jednak zauważyć, że wartości  $K_i$  obu związków charakteryzują się tym samym rzędem wielkości.



**Rycina 20.** Analiza inhibicji SssI metodą Dixona ( $1/V$  vs.  $I$ ). RG108 (**51**) jest dostępnym komercyjnie inhibitorem kompetycyjnym DNMT1. Reakcje były prowadzone w obecności różnych ilości DNA ■-  $0,1\mu g$ , ◆-  $0,5\mu g$ , ●-  $1\mu g$ .  $I$ - stężenie inhibitora,  $V$ -szybkość reakcji.

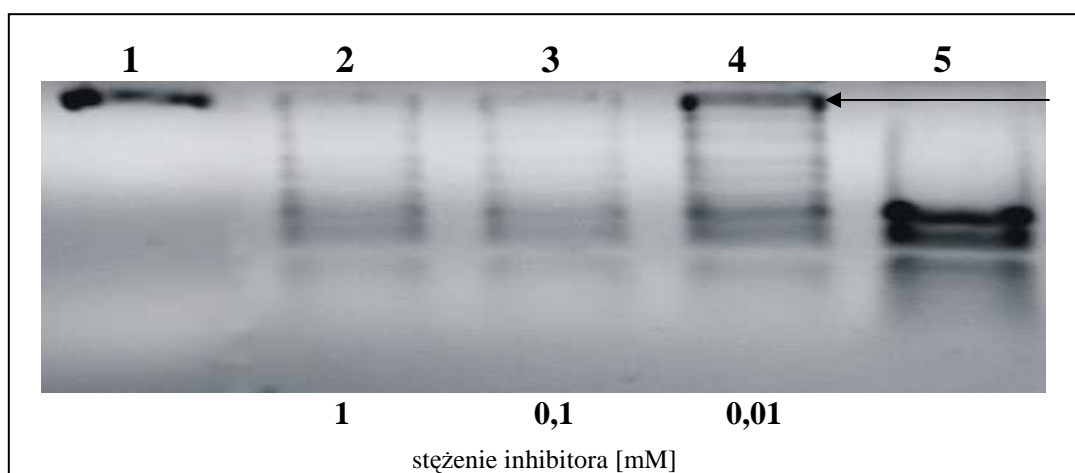
Inhibitorem o najwyższej aktywności w teście inhibicji SssI jest EGCG ( $K_i$   $28nM$ ). Jednakże rozpad tego związku generuje powstawanie  $H_2O_2$ , co może być przyczyną spadku aktywności enzymu związaną z jego utlenieniem a nie wiązaniem EGCG (Fang i in., 2003).

**Tabela 28.** Właściwości fizyko-chemiczne oraz wartości stałej inhibicji związków nienukleozydowych wyznaczone w teście inhibicji metylacji *in vitro*. Parametry *cLogP* i *tPSA* oraz liczbę akceptorów i donorów wiązań wodorowych (*Ha/Hd*) i wiązań rotujących (*WR*) wyznaczono jak wyżej. Związki, których  $K_i \leq 100\mu\text{M}$  zostały oznaczone wersami w kolorze szarym.

Nr	Struktura związku	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	MW [Da]	Ha/Hd	LogP	tPSA [ $\text{\AA}$ ]	WR
49		brak	165	3/3	0,88	63,3	3
50		280	314	6/4	2,33	105,5	5
51		0,23	334	6/2	2,7	92,1	4
52		0,028	458	11/8	2,2	197,3	4

## 5.2. Analiza restrykcyjna DNA zmetylowanego w obecności inhibitora

Wpływ związku nr **11** ( $\text{N}^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna) na metylację sekwencji CpG potwierdzono z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego HpaII (pkt. 4.7.5.). Reakcje metylacji plazmidu pUC18 w formie liniowej (trawienie enzymem restrykcyjnym XbaI) prowadzone były przez 3 godziny w obecności inhibitora (1, 0,1 i 0,001mM) lub jego braku. Następnie plazmid był oczyszczany i poddawany hydrolizie katalizowanej przez enzym HpaII przez 0,5h. Wykonano dodatkową kontrolę z niezmetylowanym plazmidem.



**Rycina 21.** Analiza inhibicji metylacji na 2% żelu agarozowym. Ścieżka nr 1– zmetylowany plazmid pUC18 w formie liniowej hydrolizowany HpaII, 2,3,4– zmetylowany plazmid pUC18 w obecności inhibitora (11) hydrolizowany HpaII, 5- plazmid pUC18 niezmetylowany hydrolizowany HpaII. Strzałką wskazano zmetylowany DNA nieulegający hydrolizie.

Analiza elektroforetyczna potwierdziła brak hydrolizy przez HpaII zmetylowanego plazmidu pUC18 (ścieżka 1) (Ryc. 21). Dodatkowo widoczny jest spadek wydajności tej reakcji wraz ze wzrostem stężenia N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyny. Przy stężeniu 0,01mM widoczny jest górny prążek (wskazany strzałką) odpowiadający zmetylowanemu plazmidowi. Prążek ten nie jest obecny w ścieżkach 2 i 3, gdzie analizowane są wyniki hydrolizy plazmidu zmetylowanego w obecności wyższych stężeń inhibitora

### 5.3. Analiza inhibicji ludzkiej DNMT1 w teście kolorymetrycznym ELISA

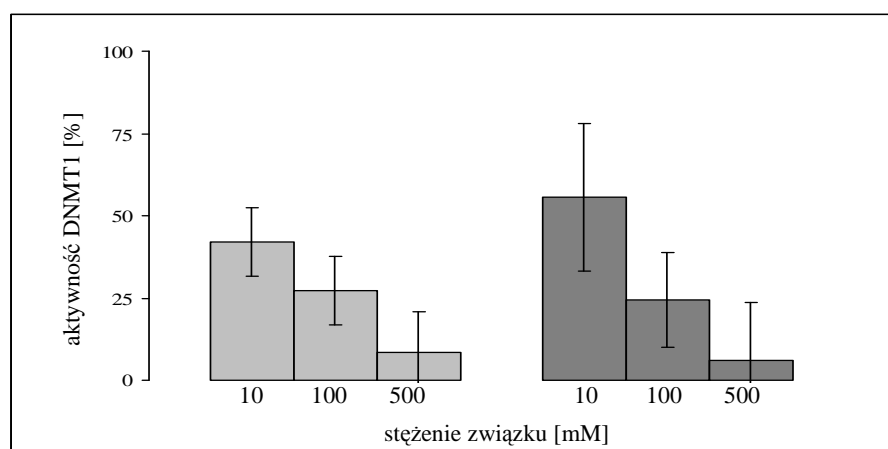
N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna cechowała się najwyższą aktywnością w reakcji inhibicji modelowej metylotransferazy SssI ( $K_i$  0,7 $\mu$ M) wśród pochodnych zasad nukleinowych. Potwierdzono, że związek ten hamuje także ludzką DNMT1. Wyznaczona w oparciu o komercyjnie dostępny test wykorzystujący metodę ELISA wartość IC<sub>50</sub> dla tego związku wynosi 22 $\mu$ M (pkt. 4.8). Ponieważ dostępne dane pokazują, że w analogicznym eksperymencie RG108 wykazywał tylko 11% aktywność w stężeniu 100 $\mu$ M (Yoo i in., 2012), dla porównania tę samą analizę wykonano dla EGCG, którego wartość stałej inhibicji wynosiła 0,028 $\mu$ M (Tab. 27). W najniższym zastosowanym stężeniu (10 $\mu$ M) EGCG hamowało reakcję metylacji do poziomu 42% w porównaniu w próbą kontrolą (Ryc. 22). Wartość IC<sub>50</sub> jest zatem niższa niż 10 $\mu$ M. Oba

związki (EGCG i **11**) hamują aktywność DNMT1 w sposób zależny od stężenia. Porównując wyznaczoną metodą ELISA wartość  $IC_{50}$  związku **11** ( $22\mu\text{M}$ ) i obliczoną według równania Cheng'a-Prusoff'a\* (1973) -  $2,73\mu\text{M}$  (na podstawie wartości  $K_i$  uzyskanej w reakcji z SssI), widać niższą aktywność związku w hamowaniu DNMT1 niż prokariotycznej metylotransferazy. Ponieważ jednak wartość  $IC_{50}$  zależy m.in. od stężenia dostępnych w reakcji substratów, a stężenie hemimetylowanego DNA w teście typu ELISA nie jest znane, trudno porównać obie wartości.

\* równanie Cheng'a-Prusoff'a (Cheng i Prusoff, 1973)

$$IC_{50} = K_i \times \left[ 1 + \frac{S}{K_m} \right]$$

S- stężenie substratu ( $4,4\mu\text{M}$ ),  $K_m$ - stała Michelisa ( $1,52\mu\text{M}$ ),  $K_i$ - stała inhibicji ( $0,7\mu\text{M}$ ).



**Rycina 22.** Wpływ związków niskocząsteczkowych na aktywność ludzkiej DNMT1. Wartości podane w stosunku do kontroli (100%) nietrakowanej badanym inhibitorem.

■ EGCG

■ N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna (**11**)

#### 5.4. Analizy cytotoksyczności wybranych pochodnych zasad azotowych

Cytotoksyczność badanych związków i ich wpływ na proliferację komórek eukariotycznych oceniono stosując metodę polegającą na kolorymetrycznym

oznaczeniu barwnego produktu (formazanu) powstającego po podaniu MTT do hodowli komórkowej. Tetrazol jest redukowany w żywych komórkach przez mitochondrialną dehydrogenazę bursztynianową. Wyniki wyrażone są w procentach w odniesieniu do kontroli pozytywnej (komórki nie traktowane badanym związkiem) i odzwierciedlają aktywność metaboliczną i żywotność komórek (pkt. 4.11.).

Linia komórkowa HeLa, jest najstarszą i najbardziej rozpowszechnioną linią, wyprowadzoną z nowotworu szyjki macicy (Rahbari i in., 2009). Od lat 50-tych XX wieku opublikowano około 65 000 prac, opisujących eksperymenty z wykorzystaniem tej linii. Stanowi ona wzorzec w badaniach komórkowych (Hyman i Simons, 2011).

Linia U118 wyprowadzona została z komórek glejaka, nowotworu wywodzącego się z komórek glejowych. Glejaki należą do grupy najczęstszych śmiertelnych nowotworów pierwotnych występujących u osób dorosłych. Zalicza się je także do grupy nowotworów opornych na leczenie radiologiczne i chemioterapię (Akhavan i in., 2010). Stopień złośliwości nowotworów mózgu został skorelowany z obniżającym się poziomem metylacji w genomowym DNA. Najniższy poziom m<sup>5</sup>C obserwuje się w glejakach (Żukiel i in., 2004).

W testach MTT wykorzystywane były także dwie izogeniczne linie HCT116: p53+/+ i p53-/-, wywodzące się z nowotworu okrężnicy. W pierwszej aktywny jest gen p53, w drugiej oba jego allele są wyłączone. Białko p53, jako supresor nowotworowy, zapewnia komórkom stabilność genomową poprzez kontrolę cyklu komórkowego. p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym wpływającym na transkrypcje białka p21, którego zadaniem jest m.in. hamowanie cyklin zależnych od kinaz (E/cdk2 i A/cdk2), co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, takie jak pęknięcie nici, dochodzi do potranslacyjnej modyfikacji tego białka (bez zmian w poziomie mRNA), która powoduje wydłużenie okresu jego półtrwania. Fosforylacja powoduje zaburzenie oddziaływań pomiędzy p53 i jego regulatorem – białkiem MDM2, którego zadaniem jest ubikwitynacja i kierowanie p53 na szlak degradacji w proteasomach. Efektem jest zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub>, co umożliwia naprawę DNA (Lakin i Jackson, 1999; Meek, 2004).

Piątą wykorzystaną linią nowotworową była ustalona linia gruczolakoraka jelitowego CaCo-2. Są to komórki enterocytopodobne, tworzące w hodowli spolaryzowaną monowarstwę, na powierzchni której tworzy się rąbek szczoteczkowy. Linia ta wykorzystywana jest powszechnie do badań nad transportem

transbłonowym. CaCo-2, tak jak komórki absorbujące nabłonka, wytwarzają enzymy: disacharydazy, peptydazy, izoenzymy CYP450, transferazę-S-glutationową, sulfotransferazę i glukuronidazę oraz białka transbłonowe, P-glikoproteinę i białka oporności wielolekowej, związane z transportem leków (Grajek i in., 2006).

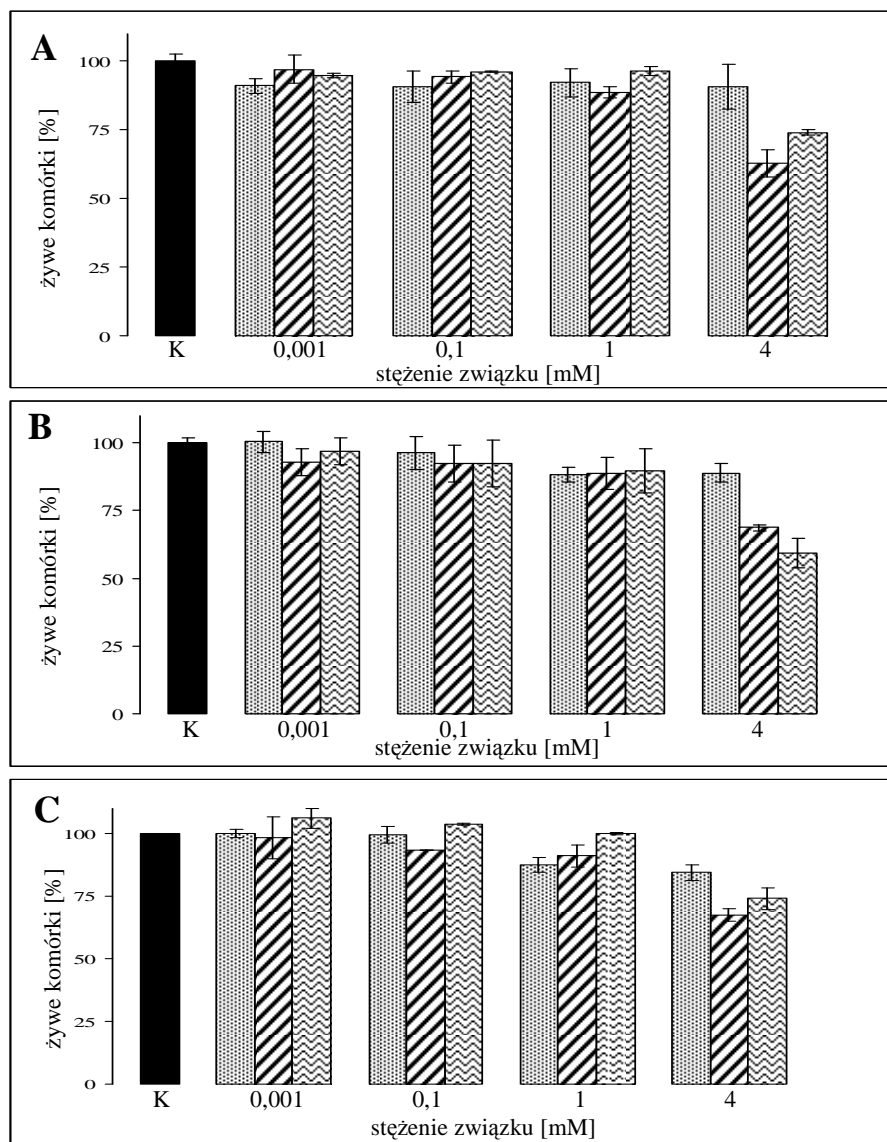
Linia HEK293 wyprowadzona została ze zdrowych ludzkich embrionalnych komórek nerkowych, które transformowane zostały ludzkim adenowirusem typu 5 (Ad5). Są to komórki nieśmiertelne, których czas cyklu wynosi 24-36h i trwa dłużej niż HeLa, U118 czy HCT116.

#### **5.4.1. Wpływ pochodnych cytozyny na komórki linii HeLa, U118, HEK293**

W Załączniku 1 umieszczone zostały tabele zawierające wzory badanych związków.

Pierwszą grupą badanych związków były pochodne zasad azotowych. Sprawdzony został wpływ związku wyjściowego N<sup>4</sup>-furfurylocytozyny (**1**) oraz jej pochodnej N<sup>4</sup>-furfurylo-5-metylocytozyny (**5**) i bardziej hydrofobowej N<sup>4</sup>-benzylo-5-metylocytozyny (**17**) na komórki nowotworowe HeLa i U118 oraz HEK293 (Ryc. 23A, B, C). Stosując metodę redukcji MTT można wyznaczyć wartość IC<sub>50</sub>, wskazującą takie stężenie, które spowoduje 50% zmniejszenie ilości żywych komórek. Analiza wykazała, że testowane związki cechują się minimalną cytotoksycznością, a ich wpływ na proliferację komórek widoczny jest dopiero w stężeniu 4mM. W tych warunkach związki **5** i **17** powodowały zmniejszenie ilości żywych komórek HeLa, U118 i HEK293 o 30-40%. Inkubacja z N<sup>4</sup>-furfurylocytozyną także wpłynęła na proliferację, jednak w mniejszym stopniu. Obserwowany był 10-15% spadek ilości komórek proliferujących inkubowanych w obecności tego związku. Analizując wyniki eksperymentów, nie można wyznaczyć wartości parametru IC<sub>50</sub>, gdyż będzie on wyższy niż maksymalne stężenie zastosowane w eksperymencie (Ryc. 23A, B, C).

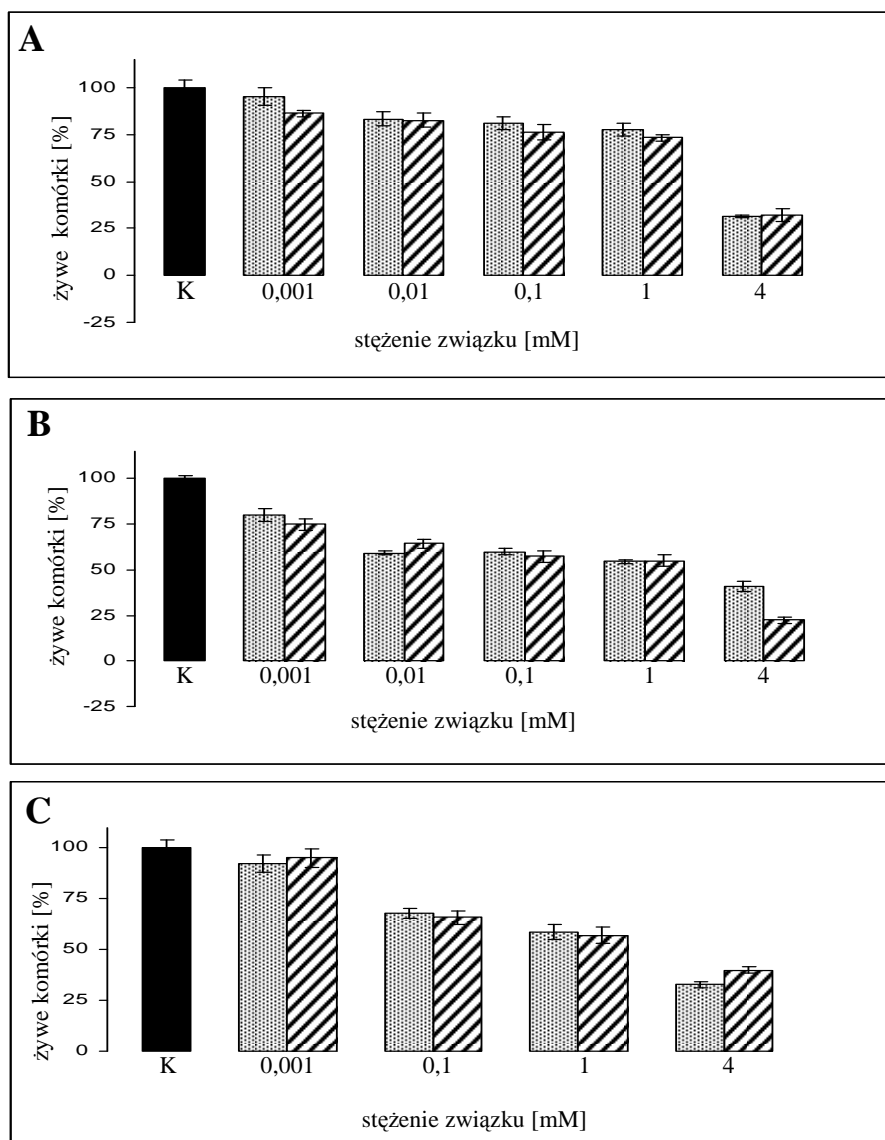
Słabą aktywnością w hamowaniu proliferacji i niską cytotoksycznością w stosunku do komórek eukariotycznych cechują się również N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna (**11**) i N<sup>4</sup>-benzylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna (**22**) (Ryc. 24A, B, C). Wyznaczone wartości IC<sub>50</sub> przyjmują bardzo wysokie stężenia [mM] (Tab. 29).



**Rycina 23.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych ze związkami:

- (1)
- ▨ (5)
- ▩ (17)

K- kontrola, A –HeLa, B-U118, C-HEK293.



**Rycina 24.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych ze związkami:

▨ (11)

▩ (22)

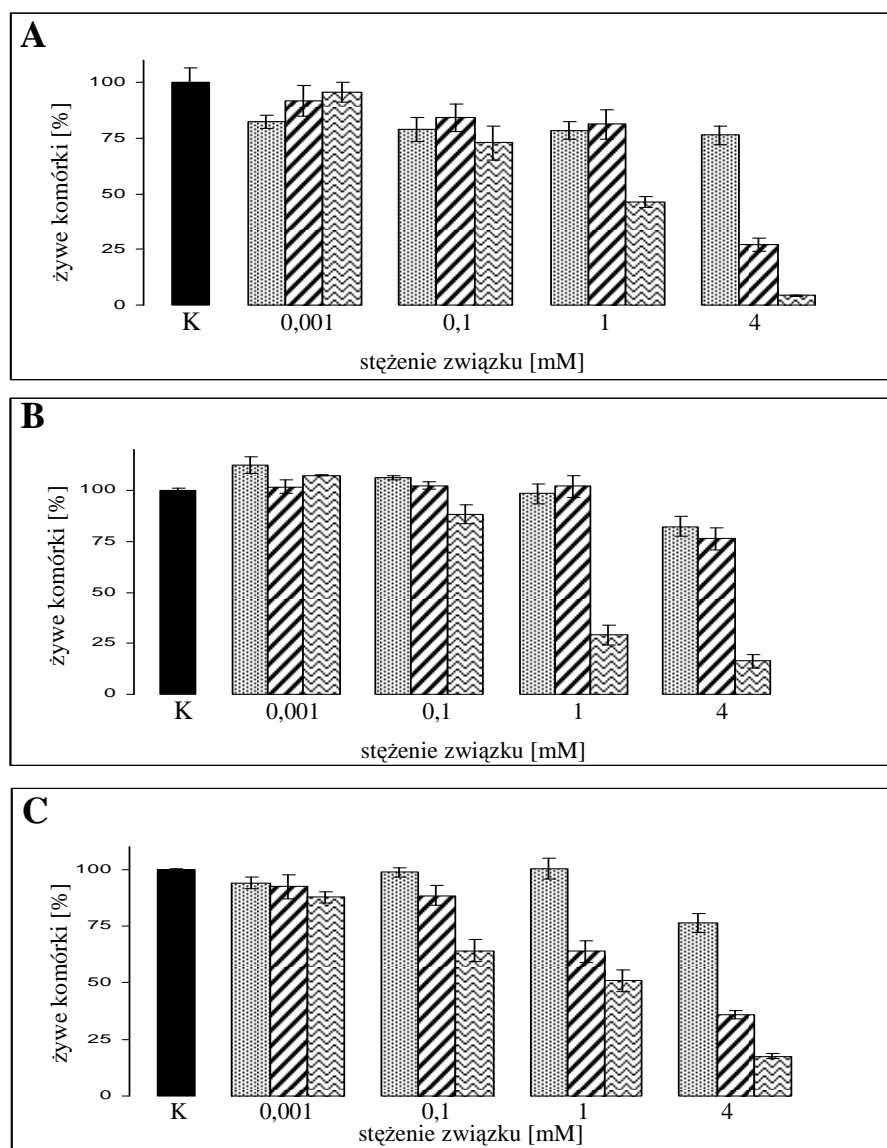
K- kontrola, A –HeLa, B-U118, C-HEK293.

#### 5.4.2. Wpływ pochodnych cytydyny i adenozyiny na komórki linii HeLa, U118, HEK293

Sprawdzono także wpływ pochodnych nukleozydów. W tym celu inkubowano komórki HeLa, U118 i HEK293 w obecności wybranych stężeń dwóch pochodnych cytydyny: **3**- N<sup>4</sup>-furfurylo-2’deoksycytydyny i N<sup>4</sup>-benzylo-2’deoksycytydyny (**dCBz**) oraz pochodnej adenozyiny: **32**- N<sup>6</sup>-furfurylo-2’deoksyadenozyiny (Ryc. 25A, B, C). N<sup>4</sup>-



benzylo-2'deoksycytydyna nie była analizowana w teście *in vitro*. Porównując te trzy pochodne można zauważyć, że najbardziej aktywna jest N<sup>6</sup>-furfurylo-2'deoksyadenozyna (**32**). Wartości IC<sub>50</sub> wyznaczone po inkubacji z HeLa, U118, HEK298 wynoszą 0,8, 0,45 i 0,02mM. Natomiast porównując obie pochodne cytydyny, większy wpływ na aktywność proliferacyjną ma pochodna benzylowa (Tab. 29).



**Rycina 25.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych ze związkami:

- (3)
- ▨ (dCBz)
- ▩ (32)

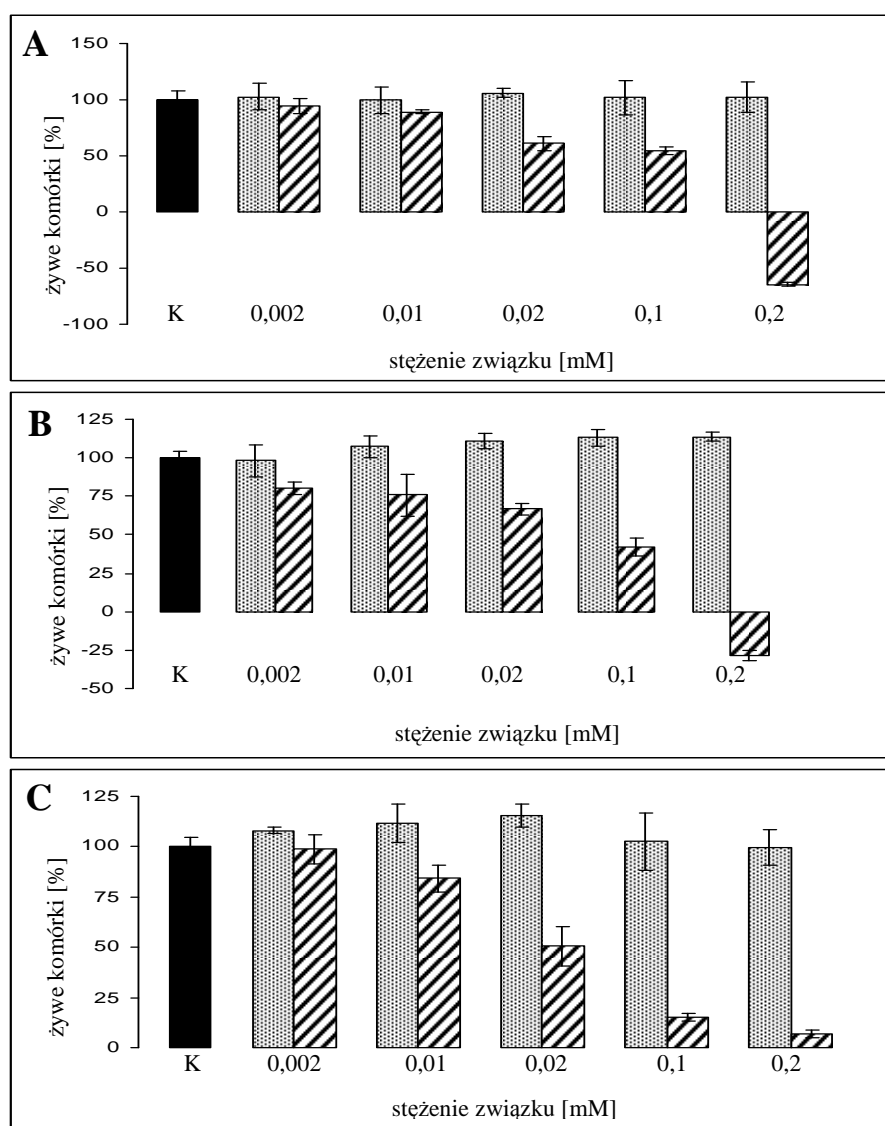
K- kontrola, A –HeLa, B-U118, C-HEK293.

Wykazano, że N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyna i inne rybozydy cytokinin hamują proliferację i indukują apoptozę w komórkach ludzkiej białaczki szpikowej oraz w innych typach nowotworowych linii komórkowych (Ishii i in., 2002; Cabello i in., 2009). Pochodne adenozyne charakteryzowały się wyższą aktywnością biologiczną niż odpowiadające im pochodne adeniny, których właściwości antyproliferacyjne były słabsze lub nie obserwowano ich wcale (Ishii i in., 2002; Cabello i in., 2009). Jednakże w obu przypadkach efekty wywoływane przez te związki związane były z metabolizmem adenozyne i enzymem fosforylującym adenozynę – kinazą adenozynową. Zaangażowanie tego enzymu w bioaktywację N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyne poprzez fosforylację powoduje obniżenie stężenia ATP w komórce, co prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego i spadku ilości żywych komórek (Cabello i in., 2009). Za przyczynę cytotoksyczności rybozydu uznaje się także indukowanie przez ten związek stresu genotoksycznego w postaci uszkodzeń DNA (Cabello i in., 2009).

N<sup>6</sup>-furfurylo-2'-deoksyadenozyna (**32**) jest najskuteczniejszym inhibitorem procesu metylacji wśród pochodnych adeniny (Tab. 23). W porównaniu z N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyną (**31**), której aktywność w wielu liniach komórkowych obserwowana jest w stężeniach mikromolowych, jej wpływ na proliferację jest umiarkowany (Ryc. 25 i 26, Tab. 29). Wartość IC<sub>50</sub> wyznaczona dla N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyne testowanej w wykorzystaniu linii HeLa wynosi 100 μM i jest 8-krotnie niższa w porównaniu z wartością uzyskaną dla **32**. Silniejszy wpływ na żywotność komórek jest jeszcze bardziej widoczny w przypadku linii U118 i HEK293 (IC<sub>50</sub> = 80 i 20 μM). Niższa aktywność pochodnej **32** wynika prawdopodobnie z faktu, że związek ten jest mniej wydajnym substratem kinazy adenozynowej, ponieważ grupa 2'-OH rybozy jest niezbędna do aktywności tego enzymu. Zatem ograniczona fosforylacja **32** nie powoduje spadku puli ATP w komórce (Miller i in., 1979).

Niższą cytotoksyczność N<sup>4</sup>-furfurylo-2'-deoksycytydyny można powiązać ze zjawiskiem kompartmentacji puli dCTP w komórkach. Trójfosforan-2'-deoksycytydyny (dCTP) powstający *de novo* uczestniczy w replikacji DNA. Natomiast dCTP, które wykorzystywane są w naprawie uszkodzeń DNA pochodzą z tzw. szlaku odzysku i syntetyzowane są z 2'-deoksycytydyny, także tej pochodzenia egzogenne. W przypadku stosowanej w leczeniu 5-aza-2'-deoksycytydyny (AzadC) jej inkorporacja do DNA wynika z powodowanego przez nią stresu genotoksycznego prowadzącego do uszkodzeń DNA lub/i nadmiaru tego nukleozydu w stosunku do naturalnie

występującego (Xu i in., 1995). Dostarczane analogi 2’deoksycytydyny wykazują cytotoksyczność w wysokich stężeniach milimolowych. Oznacza to, że prawdopodobnie nie powodują uszkodzeń DNA i nie są elementami wykorzystywanymi do jego naprawy lub po inkorporacji do DNA są efektywnie usuwane przez systemy naprawcze, jako naturalne produkty metabolizmu DNA.



**Rycina 26.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych ze związkami:

▨ (30)

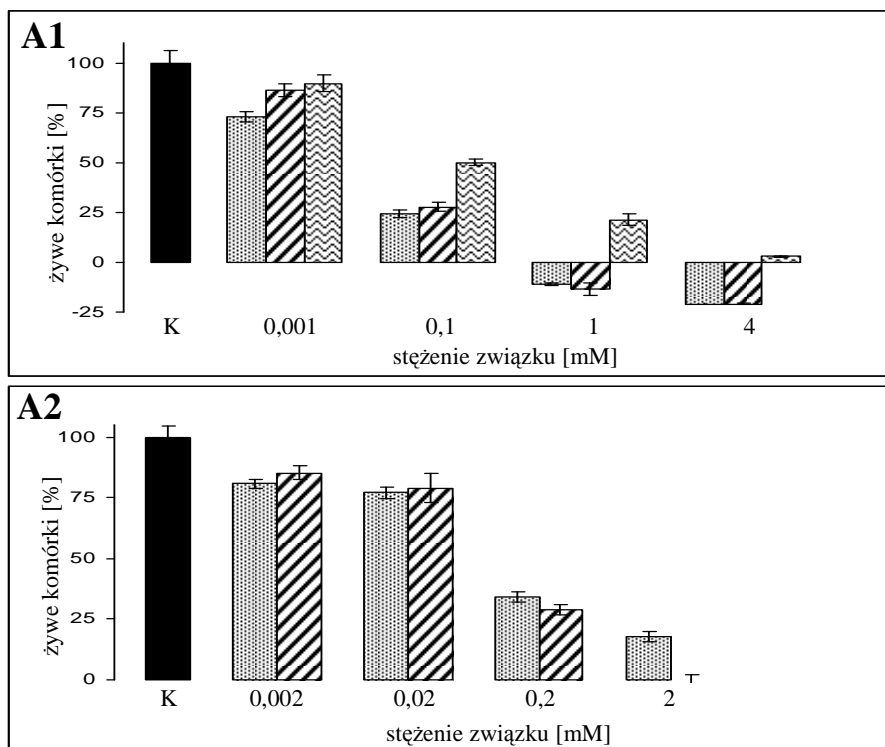
▩ (31)

**K**- kontrola, **A** –HeLa, **B**-U118, **C**-HEK293.

### 5.4.3. Wpływ 5-fluorourydyny i jej pochodnych na komórki linii HeLa, U118 i HEK293

Sprawdzono także wpływ podstawników w postaci grup aromatycznych związanych z resztą kwasu fosforanowego na cytotoksyczność 5-fluorourydyny i 5'-monofosforanu-5-fluorourydyny. Otrzymane wyniki wskazują, że 5-fluorourydyna (**42**) i jej pochodna **45**, wywierają porównywalny efekt powodujący ograniczenie proliferacji komórek HeLa, U118 i HEK293 i jest on silniejszy niż w przypadku pozostałych 3 pochodnych (Ryc. 27, 28, 29, Tab. 29). Widoczną zmianę w aktywności obserwuje się w przypadku związków **45** i **46**, które różnią się pozycją atomu azotu w pierścieniu aromatycznym (*orto* – *para*). Procentowa różnica pomiędzy wartościami  $IC_{50}$  **45** i **46** wynosi 65% i 94% dla linii HeLa i U118. Związek **45** jest bardziej aktywny nie tylko w teście MTT (co może być związane z łatwiejszą hydrolizą pierścienia z azotem z pozycji *orto*), ale także w teście metylacji *in vitro* (azot posiadający niesparowaną parę elektronów będzie akceptorem wiązania wodorowego, od jego umiejscowienia może zależeć czy powstają oddziaływania z grupami funkcyjnymi aminokwasów). Odstępstwem jest wynik uzyskany dla linii HEK, który jest porównywalny dla obu związków.

Ujemne wartości na wykresach (Ryc. 27, 28, 29) wskazują, że w danym stężeniu związek nie hamuje proliferacji, ale jest przyczyną śmierci komórki.



**Rycina 27.** Wyniki testu MTT prowadzonego po 72h inkubacji komórek linii HeLa ze związkami:

**A1**

▣ (42)

▤ (45)

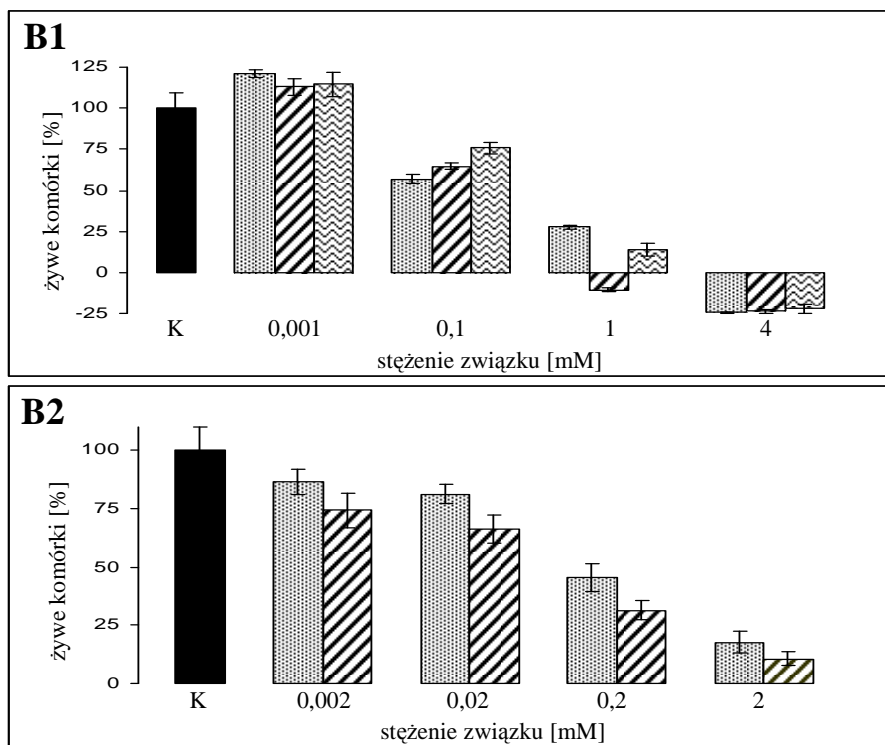
▥ (46)

**A2**

▣ (43)

▤ (44)

**K**- kontrola



**Rycina 28.** Wyniki testu MTT prowadzonego po 72h inkubacji komórek linii U118 ze związkami:

**B1**

▨ (42)

▧ (45)

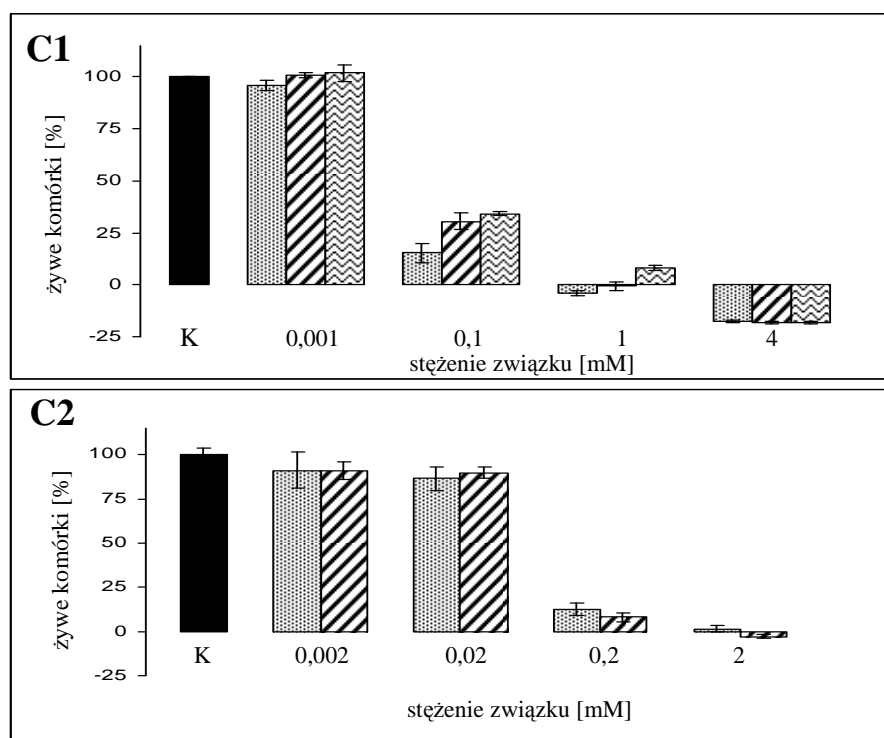
▩ (46)

**B2**

▨ (43)

▧ (44)

K- kontrola



**Rycina 28.** Wyniki testu MTT prowadzonego po 72h inkubacji komórek linii U118 ze związkami:

**C1**

▨ (42)

▩ (45)

▧ (46)

**C2**

▨ (43)

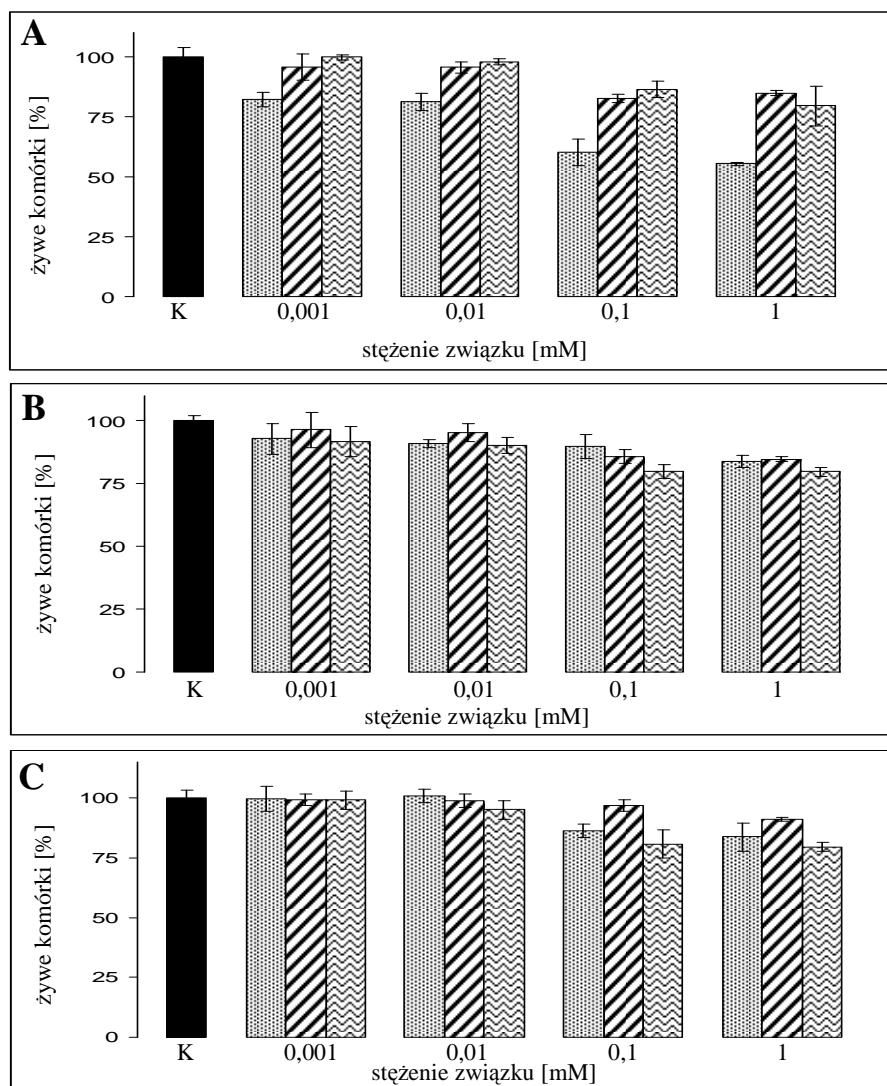
▩ (44)

K- kontrola

#### 5.4.4. Wpływ dinukleotydów na komórki linii HeLa, U118 i HEK293

Sprawdzono także wpływ dinukleotydów posiadających wiązanie 5'-3'5' fosfortriestrowe na żywotność linii komórkowych. Związki te były inhibitorami SssI o średniej aktywności. Sprawdzono także cytotoksyczność azydetymidyny, która wchodzi w skład dinukleotydu **48** (Ryc. 30).

W przypadku linii komórkowej HeLa dinukleotydy cechowały się niższą aktywnością w porównaniu z azydetymidyną. Natomiast wyniki uzyskane z wykorzystaniem linii U118 i HEK293 pokazują, że różnice w ich aktywności są kilku procentowe. Żaden z badanych związków w stosowanych stężeniach (maks. 1mM) nie powodował 50% inhibicji proliferacji komórek. Zatem wyniki eksperymentów potwierdziły niską aktywności AZT w stosunku do komórek innych niż nowotworu piersi i gruczołu piersiowego.



**Rycina 30.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych ze związkami:

▣ (48)

▤ (41)

▥ (47)

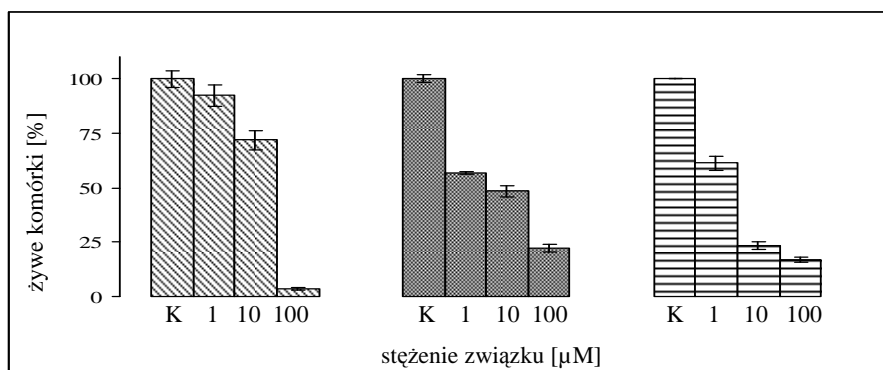
K- kontrola, A –HeLa, B-U118, C-HEK293.

#### 5.4.5. Wpływ 5-azacydyny na komórki linii HeLa, U118 i HEK293

Analizowano także cytotoksyczność 5-azacydyny (Ryc. 31), inhibitora DNMT1 stosowanego w leczeniu białaczek. W porównaniu ze wszystkimi testowanymi związkami, AzaC cechuje się wysoką cytotoksycznością w stosunku do komórek linii HeLa, U118 i HEK293, hamując proliferację w stężeniach mikromolarnych. Wartość  $IC_{50}$  wyznaczona dla 5-azacydyny jest ponad 75 000 razy niższa niż związku **11**



(najlepszego inhibitora spośród związków nowo zsyntetyzowanych).



**Rycina 31.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych z AzaC.

▨ HeLa  
▤ U118  
▧ HEK293  
K- kontrola.

#### 5.4.5. Wpływ 5-azacytydyny i N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyny na komórki linii HeLa

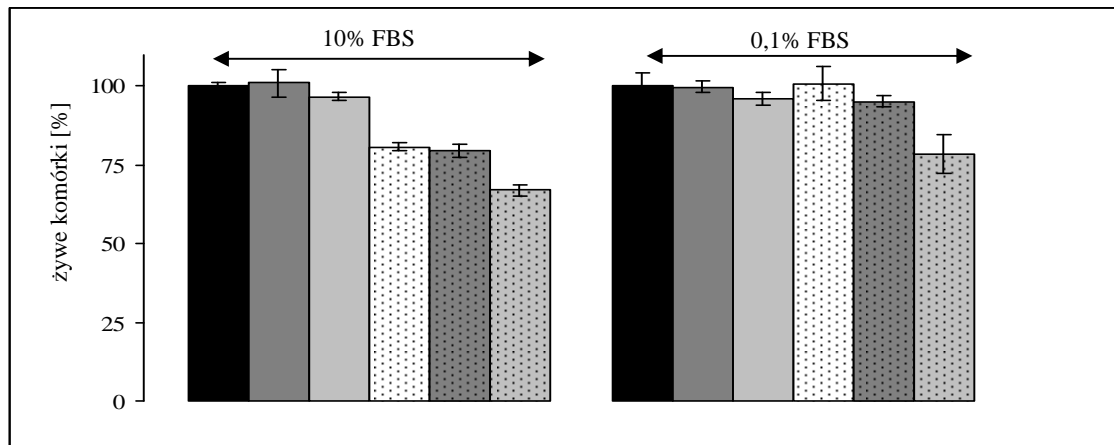
Inkubowano komórki HeLa w warunkach jednoczesnej obecności dwóch badanych związków: 5-azacytydyny (AzaC) i N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyny (**11**) (Ryc. 32). Test prowadzono w dwóch rodzajach pożywki RPMI 1640: - suplementowanej FBS do stężenia końcowego 10% i 0,1%. Zmniejszone stężenie FBS powodowało ok. 30% spadek tempa proliferacji komórek.

W pożywce zawierającej 10% FBS 5-azacytydyna w stężeniach 0,1 i 0,5μM nie powodowała znaczącego obniżenia aktywności proliferacyjnej komórek (Ryc. 32). Natomiast inkubacja z 100μM stężeniem związku **11** spowodowała jej 20% spadek. Jednoczesne traktowanie komórek HeLa 0,1μM AzaC i 100μM **11** nie wpływa na proliferację w porównaniu do próby traktowanej tylko związkiem **11**, natomiast 5-krotny wzrost stężenia AzaC hamuje podziały komórek o 14% w stosunku do hodowli traktowanej tylko **11** i 33% w stosunku komórek inkubowanych z 0,5μM AzaC. Widoczny jest zatem synergizm działania obu związków, a efekt ich współdziałania jest większy niż suma oddzielnych aktywności. Może wynikać z odmiennych mechanizmów działania. Podobny efekt obserwowano dla zabularyny i RG108 (Kassler in., 2012).

Ten sam schemat eksperymentu zastosowano dla komórek hodowanych w pożywce z obniżonym stężeniem FBS. Zmniejszona ilość składników zawartych w serum, takich jak albuminy, czynniki wzrostu czy hormony, spowodowała zwolnienie

podziałów komórkowych. Inkubacja z 0,1μM AzaC lub 100μM **11** nie wpływa na żywotność komórek. 0,5μM AzaC zmniejsza ich ilość tylko o 4% (identycznie z wynikiem uzyskanym dla hodowli w pożywce z 10% FBS). Mniejszy spadek proliferacji niż w analogicznej próbie (z 10% FBS) obserwuje się w przypadku jednoczesnej inkubacji z 0,1μM AzaC i 100μM **11** ( $\Delta\%=5\%$  w porównaniu do kontroli). Natomiast 0,5μM 5-azacytydyna i 100μM **11** powodują 17% zahamowanie proliferacji w stosunku do warunków z mniejszym stężeniem AzaC i 22% w stosunku do kontroli. Porównując wynik tego eksperymentu do uzyskanego dla hodowli prowadzonej w warunkach z 10% FBS, efekt aktywności związków jest mniejszy.

Aktywność inhibitorów DNMT1, w tym AzaC, związana jest z procesem replikacji DNA, po którym następuje podział komórki. Uważa się, że w komórkach nowotworowych, w których dojdzie do wywołanej demetylacją aktywacji regulatorów cyklu komórkowego i zahamowania podziałów, efekt działania tych związków będzie słabszy. Mniejsza zawartość FBS w pożywce zmniejsza tempo podziału komórek. W takich warunkach hodowlanych zaobserwowano obniżenie wpływu badanych związków (AzaC i **11**) na żywotność komórek. Oznacza to, że ich aktywność jest związana z cyklem komórkowym.



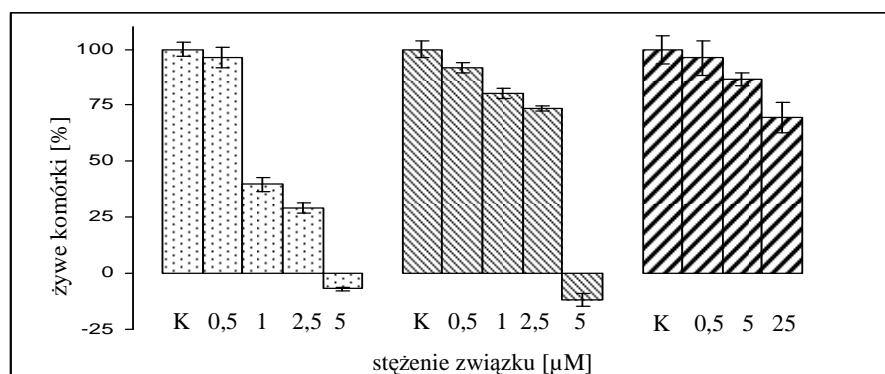
**Rycina 32.** Ocena cytotoksyczności za pomocą testu MTT prowadzony po 72h inkubacji komórek linii HeLa ze związkami – AzaC i **11** (*N*<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna).

- Kontrola
- 0,1μM AzaC
- 0,5μM AzaC
- 100μM **11**
- 0,1μM AzaC + 100μM **11**
- 0,1μM AzaC + 100μM **11**

#### 5.4.5. Wpływ wybranych związków na komórki linii HCT116 i CaCo-2

Białko p53 hamuje cykl komórkowy i aktywuje szlak apoptozy w odpowiedzi na zniszczenia DNA wywoływane przez chemioterapeutyki, w tym AzaC (Lakin i Jackson, 1999; Schneider-Stock i in., 2005). Linia HCT116  $-/-$ , w której wyłączono aktywność genu dla tego białka, jest mniej wrażliwa na działanie 5-azacytydyny. Zatem jeśli AzaC wpływa na aktywację p53, stosując obie linie HCT116 zauważyć można różnice w ilości komórek proliferujących (Lakin i Jackson, 1999; Schneider-Stock i in., 2005).

Na podstawie wyników otrzymanych po inkubacji komórek obu linii HCT116 z AzaC zauważono, że związek jest 3,75x bardziej aktywny w linii HCT116 p53 $+/+$ . Wartość  $IC_{50}$  AzaC dla linii CaCo-2 jest wyższa niż  $25\mu\text{M}$  (Ryc. 33, Tab. 29). Przeprowadzone eksperymenty są zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na zależność pomiędzy aktywacją białka p53 a indukcją apoptozy w komórkach linii HCT116 p53  $+/+$  inkubowanych w obecności AzaC (Schneider-Stock i in., 2005).



**Rycina 33.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek HCT116 i CaCo-2 w obecności 5-azacytydyny (AzaC). **K**- kontrola.

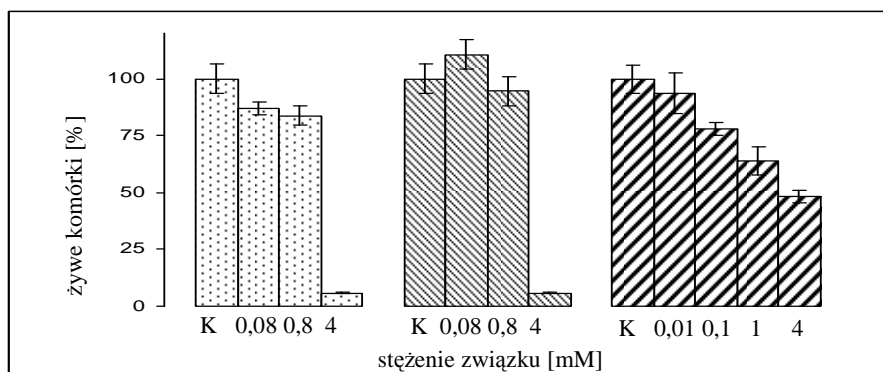
- ▤ HCT 116 p53 $+/+$
- ▨ HCT 116 p53 $-/-$
- ▩ CaCo-2

5-fluorouracyl stosowany w leczeniu m.in. nowotworów okrężnicy indukuje apoptozę poprzez aktywację szlaku związanego z białkiem p53. Obie linie HCT116 wykazywały różną wrażliwość na działanie tego związku, przy czym w linii z aktywnym p53 obserwowany był silniejszy efekt cytotoksyczności (Xavier i in., 2011).

Analizowano także wpływ pochodnych furfurylowych adeniny i cytozyny na izogeniczne linie HCT116. W tym celu do badań wybrano  $\text{N}^4$ -furfurylocytozynę (**1**) i

najbardziej aktywne w teście *in vitro* pochodne- cytozynową: N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydroazacytozynę (**11**) oraz adeninową: N<sup>6</sup>-furfurylo-2' deoksyadenozynę (**32**).

N<sup>4</sup>-furfurylocytozyna jest związkiem, który nie wpływa znacząco na żywotność komórek linii HCT116 nawet w bardzo wysokich stężeniach, przy czym komórki HCT116 p53<sup>-/-</sup> są nieco bardziej wrażliwe na działanie związku (Ryc. 34). Wartości IC<sub>50</sub> dla tego związku wynoszą 2,25 i 2,4 mM dla linii p53<sup>+/+</sup> i p53<sup>-/-</sup> (Tab. 29). Oznacza to, że spadek żywotności komórek prawdopodobnie związany jest z innymi mechanizmami. Wysokie milimolarne wartości parametru IC<sub>50</sub> wskazują, że związki te nie są cytotoksyczne dla komórek. Wskazuje na to także wynik uzyskany linii dla CaCo-2.

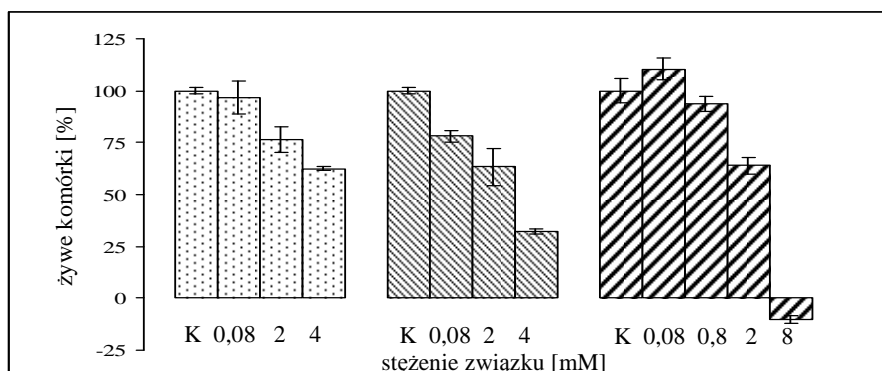


**Rycina 34.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych z N<sup>4</sup>-furfurylocytozyną (**1**). K- kontrola.

- ▤ HCT116 +/+
- ▨ HCT116 -/-
- ▩ CaCo-2

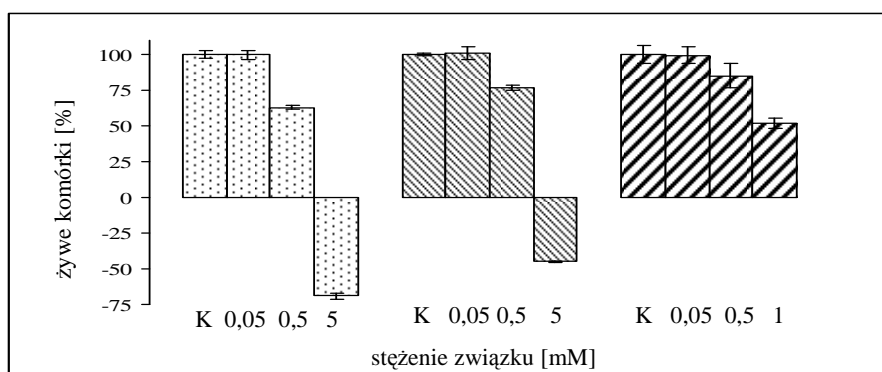
Analogiczny wynik otrzymano w przypadku wydłużenia czasu inkubacji komórek HCT116 i CaCo-2 ze związkiem **1** z 72h do 144h (Ryc. 35). Uzyskana wartość IC<sub>50</sub> wynosi 2,9mM (HCT116p53<sup>-/-</sup>), podczas gdy w przypadku drugiej linii wartość IC<sub>50</sub> jest wyższa niż zastosowane najwyższe stężenie związku (4mM). Widoczny jest zatem wzrost obu wartości wraz z wydłużeniem czasu inkubacji, co sugeruje, że związek wykazuje działanie pro-proliferacyjne.

Wydłużenie czasu inkubacji komórek CaCo-2 z N<sup>4</sup>-furfurylocytozyną (Ryc. 35) nieznacznie obniża ich żywotność, jednakże efekt 50% spadku aktywności proliferacyjnej widoczny jest w stężeniu 3,1mM. Śmierć nekrotyczną wynikającą z toksyczności związku obserwuje się dopiero w obecności 8mM stężenia związku **1**.



**Rycina 35.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 144h inkubacji komórek eukariotycznych z *N*<sup>4</sup>-furfurylocytozyną (**1**). **K**- kontrola.

- ▤ HCT116 +/+
- ▨ HCT116 -/-
- ▩ CaCo-2



**Rycina 36.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych z *N*<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyną (**11**) **K**- kontrola.

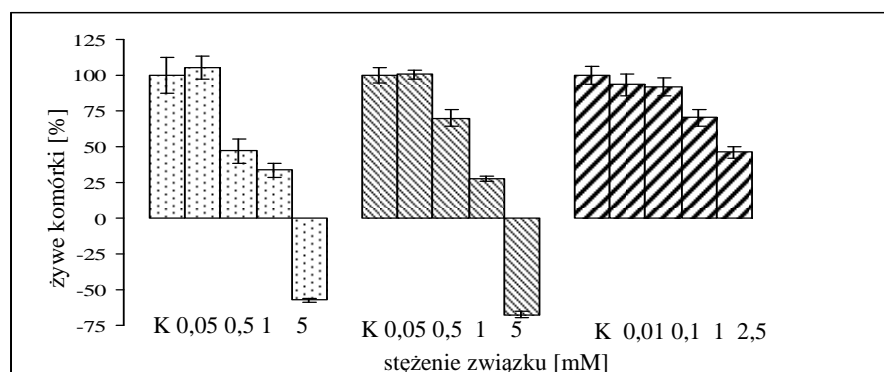
- ▤ HCT116 +/+
- ▨ HCT116 -/-
- ▩ CaCo-2

Drugą badaną pochodną cytozyny był związek **11** (Ryc. 36). Uzyskane wyniki wskazują, że wprowadzenie azotu w pozycję 5 pierścienia pirymidyny oraz redukcja wiązania N-5-C-6 wpływa na obniżenie wartości parametru IC<sub>50</sub>. Jednakże wartości te są nadal wysokie, co wskazuje na niską cytotoksyczność furfurylowych pochodnych cytozyny. Śmierć nekrotyczną spowodowaną toksycznością związku obserwuje się w stężeniu 5mM. Dodatkowo widoczna jest różnica w aktywności związku w obu izogenicznych liniach. Niższa wartość IC<sub>50</sub> uzyskana dla HCT116 p53+/+ może oznaczać, że związek wpływa na wzrost aktywność p53 i aktywację szlaku apoptozy.

Testy z wykorzystaniem linii komórkowej CaCo-2 wskazują także na niską cytotoksyczność związku mierzoną w stężeniach milimolowych (IC<sub>50</sub> powyżej 1mM).

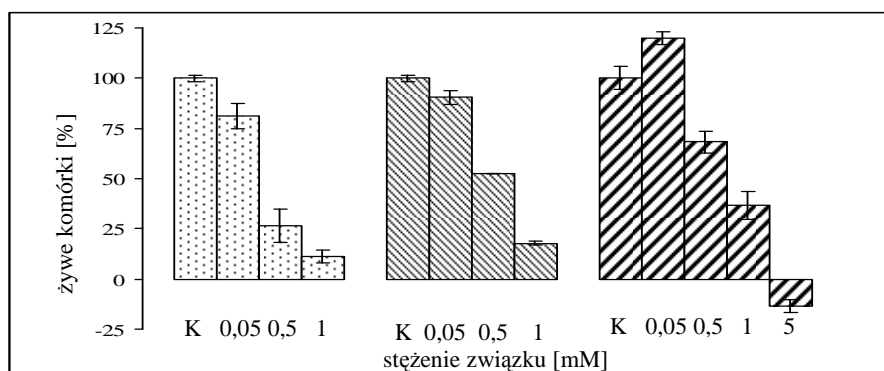
Sprawdzono także wpływ pochodnej adenozyiny. Widoczna jest

różnica pomiędzy obiema izogenicznymi liniami HCT116.  $IC_{50}$  wyznaczone po 72h (Ryc. 37) inkubacji komórek z  $N^6$ -furfurylo-2'-deoksyadenozyną wynosi 0,48mM (p53+/+) i 0,65mM (p53-/-) (Tab. 29). Wartości te są niższe w porównaniu z uzyskanymi dla pochodnych cytozyny. Tę samą zależność obserwuje się w przypadku linii CaCo-2. Wydłużenie czasu inkubacji z testowanym związkiem do 144 godzin (Ryc. 38), odwrotnie niż w przypadku związku **1**, obniża wartość  $IC_{50}$ .



**Rycina 37.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 72h inkubacji komórek eukariotycznych z  $N^6$ -furfurylo-2'-deoksyadenozyną (**32**) K- kontrola.

- ▨ HCT116 +/+
- ▩ HCT116 -/-
- ▧ CaCo-2



**Rycina 38.** Wyniki testu MTT przeprowadzonego po 144h inkubacji komórek eukariotycznych z  $N^6$ -furfurylo-2'-deoksyadenozyną (**32**) K- kontrola.

- ▨ HCT116 +/+
- ▩ HCT116 -/-
- ▧ CaCo-2

#### 5.4.6. Podsumowanie wyników uzyskanych w testach MTT

Zebrane w Tab. 29 wyniki pozwalają stwierdzić, że pochodne furfurylowe oraz benzyłowe w niewielkim stopniu wpływają na żywotność komórek i ich potencjał proliferacyjny, a ich wartości  $IC_{50}$  są bardzo wysokie (stężenia milimolowe). Oznacza

to, że związki nie są cytotoksyczne.

Wartości  $IC_{50}$  5-fluorourydyny i jej pochodnych mieszczą się z zakresie od 0,021 do 0,147mM. 5-fluorourydyna (**42**) i jej pochodna **45** cechują się zbliżonymi wartościami tego parametru. W przypadku **45** zależy on prawdopodobnie od wpływu wprowadzonej modyfikacji na transport związku przez błony komórkowe oraz od tempa, w jakim ta pochodna ulega bioaktywacji w następstwie jej usunięcia.

Aktywność biologiczna 5-azacytydyny w linii HeLa jest porównywalna z pochodnymi urydynowymi. Jednak związek ten cechował się niższymi wartościami  $IC_{50}$  wyznaczonymi z wykorzystaniem linii U118 i HEK293. W porównaniu z pochodnymi furfurylowymi związek ten jest bardziej cytotoksyczny i skutecznie hamuje proliferację komórek. Wartość  $IC_{50}$  pochodnych furfurylowej wyrażone są w milimolach, podczas gdy AzaC powoduje 50% zahamowanie proliferacji komórek w znacznie niższych stężeniach [ $\mu$ M].

Wyższa aktywność biologiczna (cytotoksyczność) pochodnych 5-fluorourydyny i AzaC wynika z faktu, że związki te są antymetabolitami, które są wbudowywane do DNA i RNA. Pomimo dobrych aktywności pochodnych 5-fluorourydyny w bezkomórkowym teście metylacji ( $K_i$  5,5 i 9 $\mu$ M), ich wykorzystanie jako modulatorów epigenetycznych stosowanych w terapii wydaje się być utrudnione ze względu na ich cytotoksyczność.

**Tabela 29.** Wartości  $IC_{50}$  [mM] wyznaczone w teście MTT.

				72h	144h	72h	144h	72h	144h
	HeLa	U118	HEK293	HCT116+/+		HCT116-/-		CaCo-2	
<b>1</b>	>4	>4	>4	2,25	>4	2,45	2,9	3,75	3,1
<b>3</b>	>4	>4	>4						
<b>5</b>	>4	>4	>4						
<b>11</b>	2,8	2	1,95	0,9		1,5		>1	
<b>17</b>	>4	>4	>4						
<b>22</b>	2,7	1,5	2,1						
<b>30</b>	>0,2	>0,2	>0,2						
<b>31</b>	0,1	0,08	0,02						
<b>32</b>	0,8	0,45	0,1	0,48	0,26	0,65	0,54	2,3	0,64
<b>42</b>	0,031	0,021	0,028						
<b>43</b>	0,099	0,147	0,079						
<b>44</b>	0,092	0,077	0,078						
<b>45</b>	0,035	0,021	0,051						
<b>46</b>	0,1	0,36	0,048						
<b>dCBz</b>	2,75	>4	2,35						
<b>AzaC</b>	0,037	0,0086	0,0025	0,0008		0,003		>0,025	

## 5.5. Analiza genotoksyczności wybranych związków za pomocą testu kometkowego

Stres oksydacyjny, powodowany przez czynniki zewnętrzne, takie jak promieniowanie jonizujące i związki aktywne oksydoredukcyjne, może być przyczyną hipometylacji DNA. Stosowane w leczeniu nowotworów 5-fluorouracyl, oksaliplatyna czy taksol zwiększają ilość reaktywnych formy tlenu (RFT) w komórce (Alexandre i in., 2006). Można także zaobserwować wzrost ich ilości w komórkach nowotworowych. RFT powodują uszkodzenia DNA i są przyczyną pojawiania się nowych pochodnych nukleozasad takich jak 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna i 5-hydroksymetylo-2'-deoksycytidyna (Alexandre i in., 2006; Barciszewska i in., 2007). W celu zbadania czy analizowane związki są genotoksyczne i powodują uszkodzenia DNA wykonano test kometkowy (pkt. 4.12.). Jest to prosta i czuła (detekcja 0,1-10 8-okso-dG na  $10^6$  zasad) technika polegająca na analizie obrazu elektroforetycznego całkowitego DNA pochodzącego z pojedynczej komórki (Ryc. 39). Nazwa metody pochodzi od obrazu jaki obserwuje się na żelu. Nieuszkodzony DNA, tworzy tzw. głowę komety, natomiast uszkodzony migruje w żelu w postaci tzw. ogona komety. Metoda ta nie wymaga etapu izolacji DNA, co ogranicza możliwość powstawania 8-okso-dG w czasie procedury przygotowywania materiału do analizy. W wersji alkalicznej testu (pH >13) analizie podlegały jedno- i dwuniciowe pęknięcia nici DNA, natomiast w zmodyfikowanej wykorzystana została glikozylaza foramidopirymidynowa DNA (FPG) do analizy obecności 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksy guanozyny.

Obecność 8-okso-dG, najczęściej występującego w DNA produktu utleniania zasad, jest markerem stresu oksydacyjnego. Ponieważ 8-okso-dG tworzy parę z adenozyną, powoduje występowanie transwersji G-T indukującej systemu naprawy BER. W jej wyniku dochodzi do usuwania modyfikowanych zasad przez glikozylazy. Powstaje miejsce apirymidynowe (AP), a następnie usuwana jest reszta szkieletu fosfocukrowego przez liazy i endonukleazy. Brakujący nukleotyd uzupełniany jest przez polimerazę (Ramos i in., 2010). Zastosowana w teście kometkowym FPG działa jednocześnie jako N-glikozylaza i AP-liaza, usuwając z nici DNA utlenioną zasadę i w konsekwencji pozostawiając 1 nukleotydową przerwę w nici.

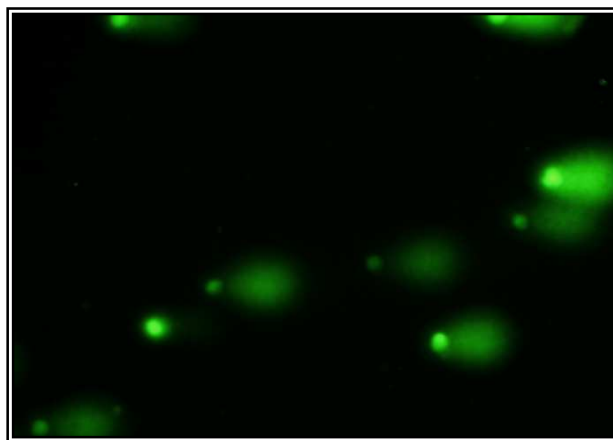
Test kometkowy wykonywano po 1h i 72h inkubacji komórek z badanymi związkami w stężeniach równocytotoksycznych (stężenia równe wartości  $IC_{50}$  wyznaczonej w teście na linii HCT116 p53+/+), co pozwala na sprawdzenie czy ilość



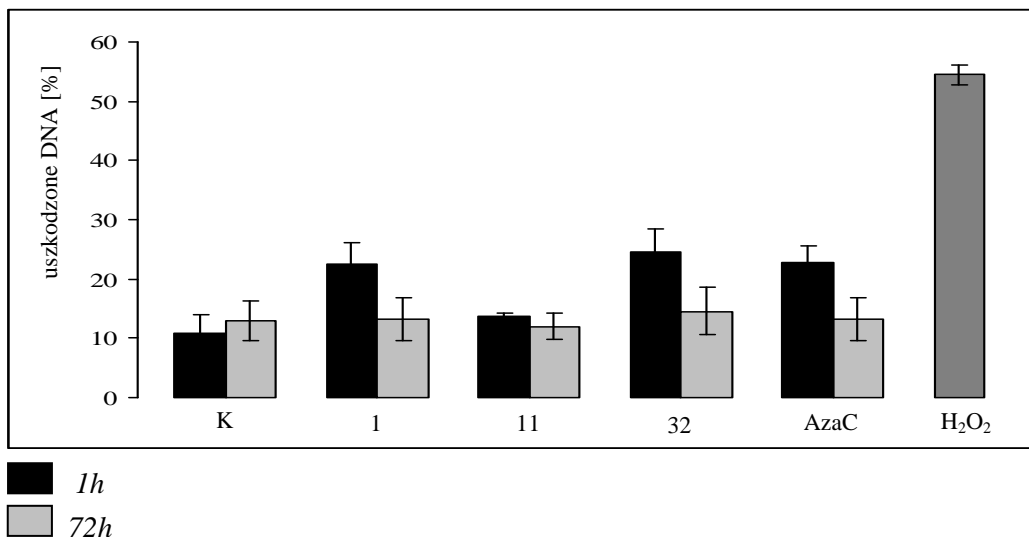
uszkodzeń w DNA będzie zwiększała się w czasie wydłużonej inkubacji i czy ulegną one naprawie przez komórkowe systemy.

Wyniki wskazują (Ryc. 40), że po 1 godzinie inkubacji komórek poziom uszkodzeń DNA (pęknięcia nici) wzrasta o około 12% w porównaniu z próbą kontrolną (oprócz związku **11**). Po 72h wszystkie badane próby osiągają poziom kontroli. Może to oznaczać to, że są one skutecznie naprawiane przez systemy komórkowe. Wyniki te, ze szczególnym uwzględnieniem AzaC, są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których pokazano, że traktowanie komórek linii MM (ang. *multiple myeloma*) AzaC, tak jak innymi związkami blokującymi syntezę DNA i powodującymi rozpad kompleksu replikacyjnego, ma wpływ na powstawanie dwuniciowych pęknięć nici oraz indukowanie systemów naprawczych (Kiziltepe i in., 2007).

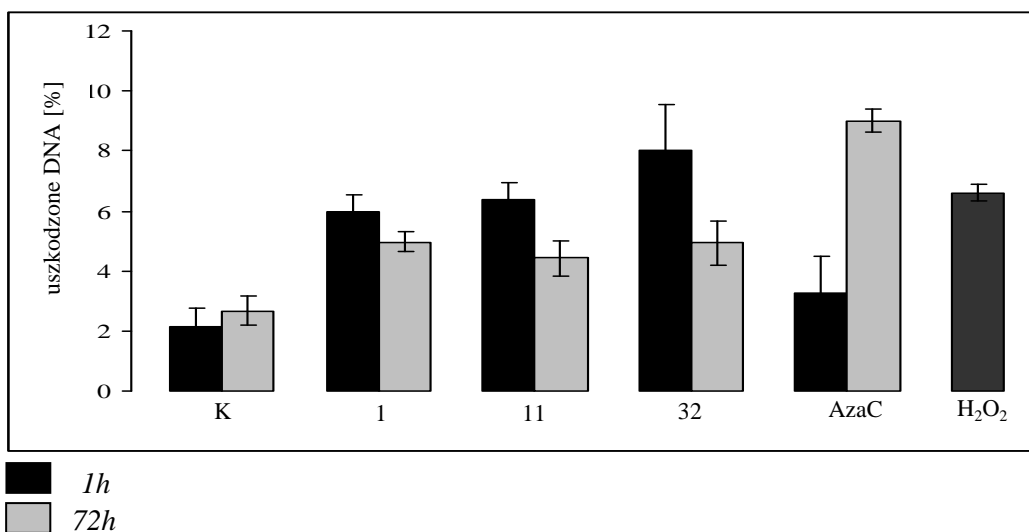
W przypadku analizy ilość 8-okso-dG w DNA (miejsc wrażliwych na hydrolizę enzymem FPG) (Ryc.41) po 1 h inkubacji komórek z badanymi związkami ilość modyfikowanej zasady wzrasta w przypadku pochodnych furfurylowych o około 4-6%. Wyjątkiem jest AzaC, która nie powoduje w tym czasie uszkodzeń DNA. W przypadku pochodnych **1**, **11** i **32** po 72 h traktowania komórek badanymi związkami poziom uszkodzeń maleje, jednakże nadal jest o około 2,5% wyższy niż w kontroli. Odmienna sytuacja obserwowana jest w przypadku AzaC, powodującej wzrost ilości 8-okso-dG do 9%. Wykazano wzrost ilości RTF pochodzących z mitochondriów w wyniku traktowania AzaC linii komórkowej nerki TKPTS. Prowadziło to do depolaryzacji błony mitochondrialnej, otworenia kanałów w niej obecnych, a w efekcie do śmierci komórki. Stres oksydacyjny powodowany przez AzaC może być jedną z przyczyn (obok wbudowywania do DNA) cytotoksyczności tego związku (Nadasi i in., 2009).



**Rycina 39.** Obraz komet uzyskanych w wyniku elektroforezy pojedynczych komórek traktowanych 75 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez 5 min. w 4°C.



**Rycina 40.** Analiza wpływu testowanych związków na poziom obserwowanych uszkodzeń DNA w postaci pęknięć nici metodą testu kometkowego. Komórki linii HCT116 p53+/+ inkubowane były z równocytotoksycznymi stężeniami związków ( $IC_{50}$ ) przez 1 lub 72h. **I** -  $N^4$ -furfurylocytozyna, **II** -  $N^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna, **32** -  $N^6$ -furfurylo-2'deoksyadenozyna, AzaC – 5-azacytydyna. Próby kontrolne stanowiły komórki nie traktowane związkiem oraz komórki traktowane  $75\mu M$   $H_2O_2$  przez 5 min. w  $4^\circ C$ .

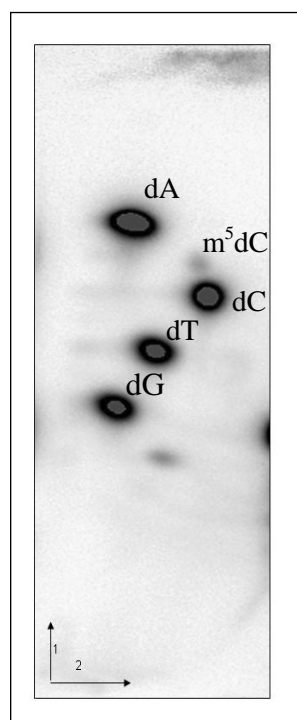


**Rycina 41.** Analiza wpływu testowanych związków na poziom obserwowanych uszkodzeń DNA w postaci 8-okso-dG w metodą testu kometkowego. Komórki linii HCT116 p53+/+ inkubowane były z równocytotoksycznymi stężeniami związków ( $IC_{50}$ ) przez 1 lub 72h. **I** -  $N^4$ -furfurylocytozyna, **II** -  $N^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna, **32** -  $N^6$ -furfurylo-2'deoksyadenozyna, AzaC – 5-azacytydyna. Próby kontrolne stanowiły komórki nie traktowane związkiem oraz komórki traktowane  $75\mu M$   $H_2O_2$  przez 5 min. w  $4^\circ C$ .

## 5.6. Analiza wpływu związków niskocząsteczkowych na poziom metylacji genomowego DNA

Do analizy wpływu badanych związków na poziom metylacji genomowego DNA wybrano 3 pochodne. Pierwszą była najbardziej aktywna w reakcji inhibicji metylacji *in vitro* N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna (**11**). Dla porównania wykonano identyczną analizę dla drugiej pod względem aktywności, ale będącej ponad 20-krotnie słabszym inhibitorem N<sup>4</sup>-furfurylo-5-metylocytozyny (**5**). Analizowano także wpływ N<sup>4</sup>-benzylocytozyny (**12**), której wartość K<sub>i</sub> jest porównywalne do **5**, jednak jest pochodną bardziej lipofilową.

Stosując metodę chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na celulozie rozdzielono fosforany 5-metylo-2'-deoksycytydyny i innych 2'-deoksynukleozydów znakowanych [<sup>32</sup>P]ATP, a następnie obliczono ilość m<sup>5</sup>dC na podstawie intensywności plam obserwowanych na chromatogramie (pkt.4.10., Ryc. 42).

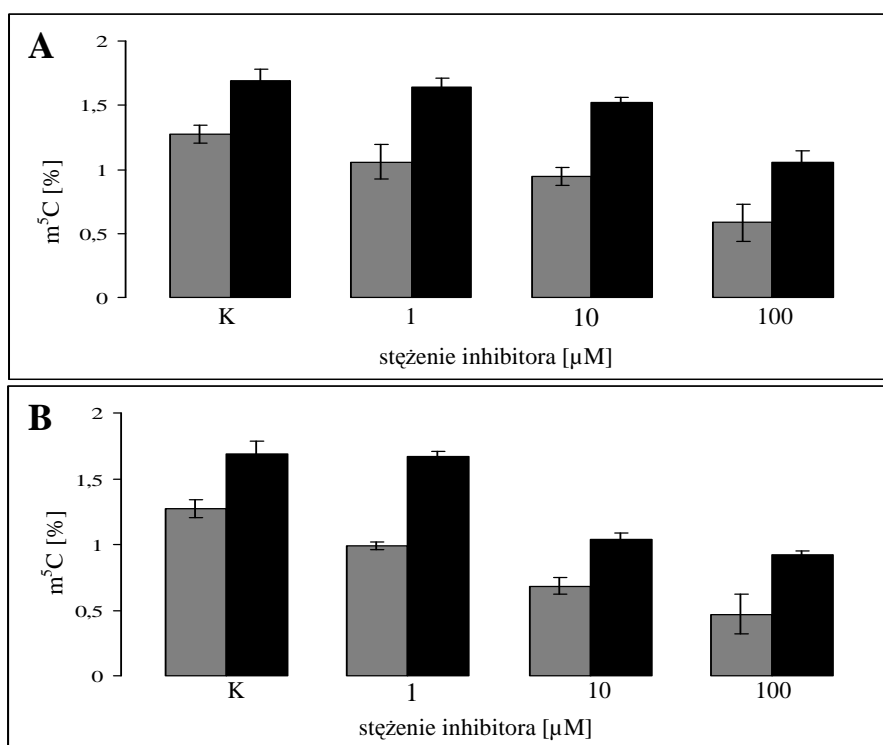


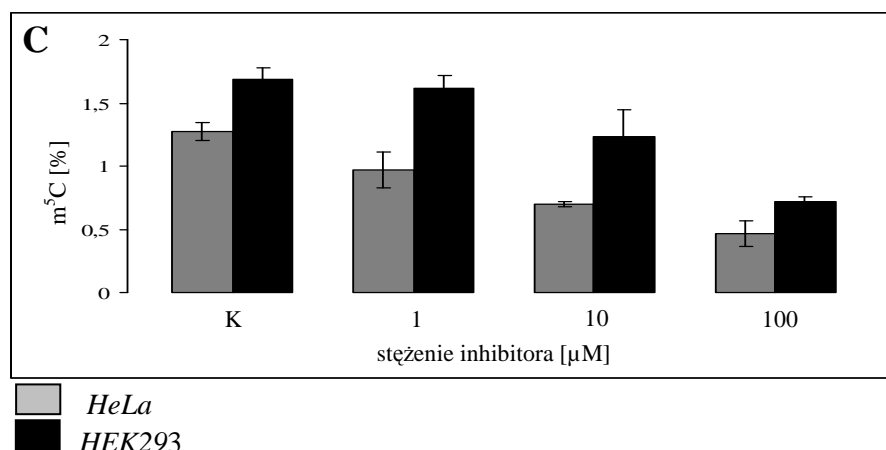
**Rycina 42.** Analiza metodą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej [<sup>32</sup>P] deoksynukleotydów uzyskanych w wyniku hydrolizy DNA z linii HeLa, **dA** – 2-deoksyadenozyna, **m<sup>5</sup>dC** – 2'-metylo-2'-deoksycytydyna, **dC** – 2'-deoksycytydyna, **dT** – 2'-deoksytymidyna, **dG** – 2'-deoksyguanozyna.

W komórkach eukariotycznych hodowanych przez 72h w obecności wybranych związków obserwowano zależne od stężenia badanej pochodnej obniżenie poziomu metylacji cytozyny w DNA. Dla każdego ze związków wyznaczono wartość  $IC_{50}$ , oznaczającą 50% spadek poziomu metylacji DNA w stosunku do kontroli (Tab. 30). Widoczna jest różnica pomiędzy aktywnością związków w linii HeLa i HEK293. Wartości  $IC_{50}$  uzyskane z eksperymentów z wykorzystaniem komórek HeLa są niższe, przy czym dla związków **11** i **12** są one zbliżone, natomiast  $N^4$ -furfurylo-5-metylocytozyna (**5**) jest ok. 3-krotnie mniej aktywna. Uzyskane w testach z linią HEK293 wartości  $IC_{50}$  badanych związków są wyższe w porównaniu z HeLa i dla **5** i **11** przekraczają wartość maksymalnego użytego w eksperymencie stężenia (Ryc. 43).

**Tabela 30.** Wpływ badanych pochodnych cytozynowych na poziom 5-metylocytozyny w DNA.

	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	
	HeLa	HEK293
$N^4$ -furfurylo-5-metylocytozyna ( <b>5</b> )	88	>100
$N^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna ( <b>11</b> )	26	75
$N^4$ -benzylocytozyna ( <b>12</b> )	31	>100





**Rycina 43.** Pomiar ilości  $m^5C$  w DNA. Komórki eukariotyczne inkubowano przez 72h ze związkami **A**-  $N^4$ -furfurylo-5-metylocytozyna (**5**), **B**-  $N^4$ -benzylcytozyna (**12**), **C**-  $N^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna (**11**) w stężeniach 1, 10 i 100 $\mu M$ . K- kontrola

### 5.7. Nadprodukcja domeny SRA i analiza wydajności powstawania kompleksów SRA-dsDNA34AB

UHRF1 oddziałuje z DNMT i definiuje miejsce mające ulec metylacji poprzez oddziaływanie z  $m^5C$  znajdującą się na drugiej nici. Białko to wydaje się być dobrym celem dla terapii przeciwnowotworowych, ponieważ ulega nadekspresji w wielu nowotworach, natomiast w tkankach zdrowych występuje na niskim poziomie (około 5 do 70-cio krotnie niższa ekspresja niż *DNMT1*). Wyłączenie genu *UHRF1* wiąże się z zahamowaniem wzrostu komórek nowotworowych oraz uwrażliwieniem ich na chemoterapię i promieniowanie. Do tej pory nie ma doniesień na temat związków niskocząsteczkowych, które hamowałyby proces wiązania się UHRF1 do hemimetylowanego DNA. W porównaniu z innymi domenami białka UHRF1 (domena Tudor, PHD, RING), które występują w wielu białkach, domena SRA jest unikalna dla UHRF1. Oznacza to, że inhibitor będzie cechował się unikalnością i specyficznością w stosunku do tej domeny (Unoki, 2011).

W czasie procesu metylacji, cytozyna będąca substratem reakcji ulega przemieszczeniu na zewnątrz helisy DNA i zostaje umieszczona w centrum katalitycznym enzymu. UHRF1 wspomaga ten proces wiążąc przeciwległą metylowaną cytozyną za pomocą domeny SRA, wskazując tym samym cytozynę, mającą ulec metylacji. Ponieważ wiązanie to polega na wysunięciu  $m^5C$  poza helisę, zatem oba białka (UHRF1 i DNMT1) oddziałują ze swoimi substratami w podobny sposób.

W celu sprawdzenia czy wybrane związki, analizowane pod kątem hamowania procesu metylacji, będą wykazywały aktywność w stosunku do domeny SRA białka UHRF1 przeprowadzono nadprodukcję tej domeny w systemie prokariotycznym. Następnie analizowano wpływ związków na tworzenie się kompleksów SRA-dsDNA34AB techniką retardacji, wykorzystującą fakt, że w żelach PAA kompleksy białko-DNA migrują z mniejszą szybkością niż same cząsteczki DNA.

Konstrukt pET28-6xHisSUMO-SRA zawierał sekwencję kodującą domenę SRA mysiego białka UHRF1 połączoną z peptydem fuzyjnym, który składał się z ogona histydynowego i białka SUMO znajdującego się przy końcu N domeny SRA. W celu potwierdzenia prawidłowej sekwencji insertu, plazmid poddano sekwencjonowaniu z wykorzystaniem starterów T7 start i stop (pkt. 4.1.3). Przeprowadzono także analizę długości całego wektora z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego NruI. Powstały produkt hydrolizy w postaci plazmidu w formie liniowej analizowano w 1% żelu agarozowym. Całkowita wielkość wektora wynosi około 6kbp (Ryc. 44).

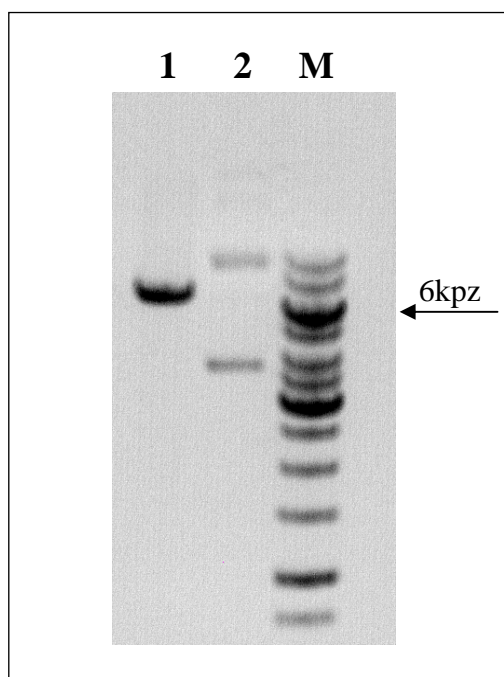
## A

```

1 gcganattccctctgaatatattttgtttactttaagaaggagatataaccATGGGTCATCACCATCATCATCACGGGTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAG 100
                                     M G H H H H H H G S D S E V N Q E A
      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
101 CTAAGCCAGAGGTCAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCGGATGGATCTTCAGAGATCTTCTCAAGATCAAAAAGACCAC 200
      K P E V K P E V K P E T H I N L K V S D G S S E I F F K I K K T T
      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
201 TCCTTTAAGAAGGTCATGGAAGCGTTTCGCTAAaAGACAGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCCTGTACGACGGTATTAGAATTCAGACTGATCAG 300
      P L R R L M E A F A K R Q G K E M D S L R F L Y D G I R I Q A D Q
      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
301 ACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACCGCGAACAGATTTGGTGGTCATATGCCCGCCAACCACTTCGGGCCCATCCCTG 400
      T P E D L D M E D N D I I E A H R E Q I G G H M P A N H F G P I P G
      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
401 GTGTCCCTGTGGCCACCATGTGGCCGCTTCAGAGTCCAGTGCAGTGCAGTCCGGTGTGCATCGGCCTCATGTGGCAGGCATCCATGGCCGGAGCAACGACGG 500
      V P V G T M W R F R V Q V S E S G V H R P H V A G I H G R S N D G
      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
501 TGCCTACTCATTGGTCTCGGCTGGTGGCTATGAGGATGATGTGGACAATGGCAATTACTTCACATACACAGGGAGTGGTGGCCGAGACCTCTCTGGCAAC 600
      A Y S L V L A G G Y E D D V D N G N Y F T Y T G S G G R D L S G N
      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
601 AAGCGTACAGCAGGCCAGTCCTCTGACCAGAAGCTCACTAATAACAAATAGGGCTCTGGCACTCAATTGCCACTCCCAATCAATGAGAAGGTCGGGAGG 700
      K R T A G Q S S D Q K L T N N N R A L A L N C H S P I N E K G A E A
      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
701 CTGAAGACTGGCGCCAAGGGAAGCCAGTGCCTGGTCCGGAACATGAAGGGCGGGAACACAGCAAGTACGCTCCTGCAGAGGGCAACCGCTATGATGG 800
      E D W R Q G K P V R V V R N M K G G K H S K Y A P A E G N R Y D G
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
801 CATCTACAAGGTGGTGAAGTACTGGCCAGAGAGAGGAAATCTGGCTTCTCGTGTGGCGTTATCTCTTCGACGAGATGACACAGAGCCTGAGCCCTGG 900
      I Y K V V K Y W P E R G K S G F L V W R Y L L R R D D T E P E P W
      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
901 ACCCGGAGGGCAAGGACCCGACTCGACAGCTGGGGCTCCTATGCAGTACCCTGAAGGCTACTTGGAGGCCTTGGCTAACAGGAGAAGAGCAGGAAGC 1000
      T R E G K D R T R Q L G L T M Q Y P E G Y L E A L A N K E K S R K R
      1010      1020      1030
1001 GCTGACTcgagcaccaccaccaccactga 1032

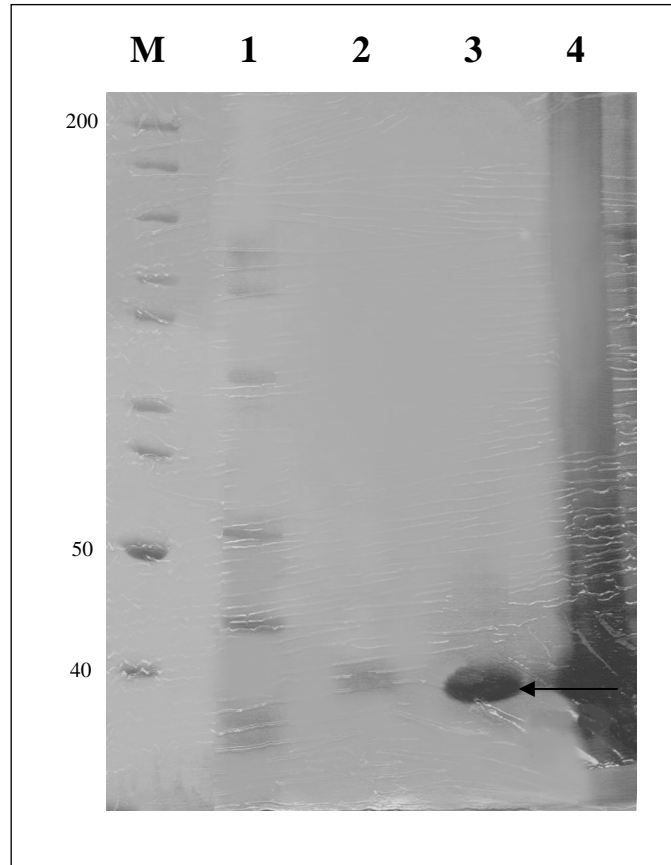
```

**B**



**Rycina 44.** *A- Sekwencja białka fuzyjnego 6xHisSUMO-SRA. Szarym tłem oznaczono sekwencje inicjacji (ATG) i termiacji translacji (TGA) oraz sekwencję CATATG wyznaczającą początek sekwencji kodującej domen SRA. H – ogon histydynowy znajdujący się przy końcu N białka fuzyjnego. B- Analiza wielkości plazmidu pET28-6xHisSUMO-SRA za pomocą enzymu restrykcyjnego NruI. Ścieżka nr 1– plazmid w formie liniowej; ścieżka nr 2– kontrola w postaci nie hydrolizowanego plazmidu; M-marker wielkości.*

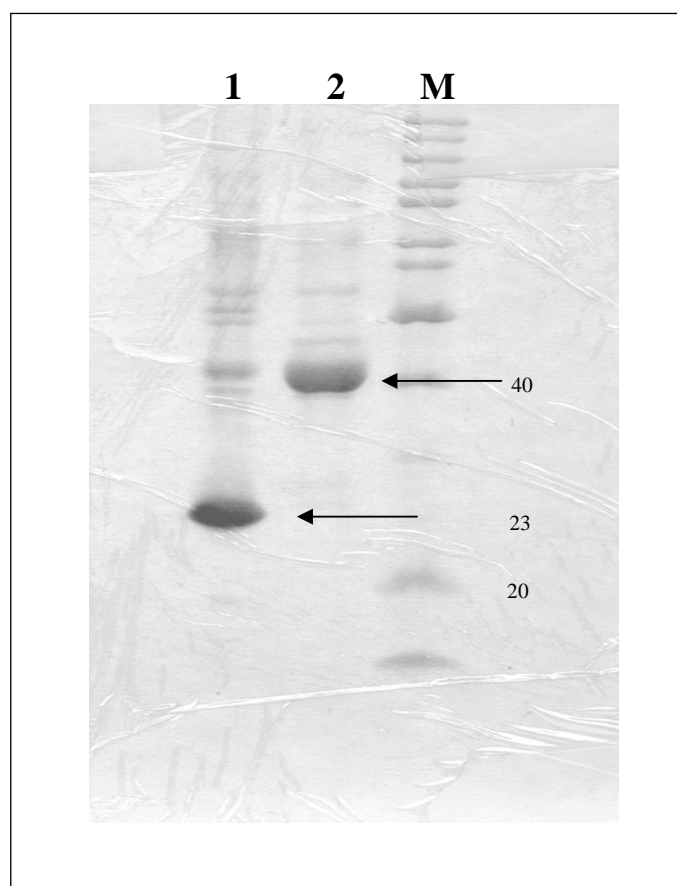
Plazmid pET28-6xHisSUMO-SRA zawierający prawidłową sekwencję insertu wykorzystano do przeprowadzenia transformacji bakterii BL21-(DE3)-RIL. Warunki hodowli bakteryjnej opisano w pkt. 4.14.1. Następnie w celu separacji białka rekombinowanego 6xHisSUMO-SRA otrzymany sonikowany i ultrawirowany lizat białkowy poddano oczyszczaniu metodą chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem złoża agarozowego Ni-NTA (pkt. 4.14.2). Otrzymano oczyszczoną frakcję domeny białkowej SRA w postaci białka fuzyjnego (Ryc. 45).



**Rycina 45.** Oczyszczanie 6xHisSUMO-SRA na złożu agarozowym wzbogaconym niklem związanym do podłoża za pomocą kwasu nitrylotriooctowego (Ni-NTA). M- marker wielkości [kDa], ścieżka nr 1- eluat uzyskany po nałożeniu na kolumnę lizatu białkowego, ścieżka nr 2- eluat uzyskany po przemyciu kolumny buforem zawierającym 0,02M imidazol, ścieżka nr 3- przemycie buforem zawierającym 0,1M imidazol, prążek na wysokości 40 kDa odpowiada białku 6xHisSUMO-SRA (wskazane strzałką), ścieżka nr 4- przemycie kolumny buforem zawierającym 0,2M imidazol.

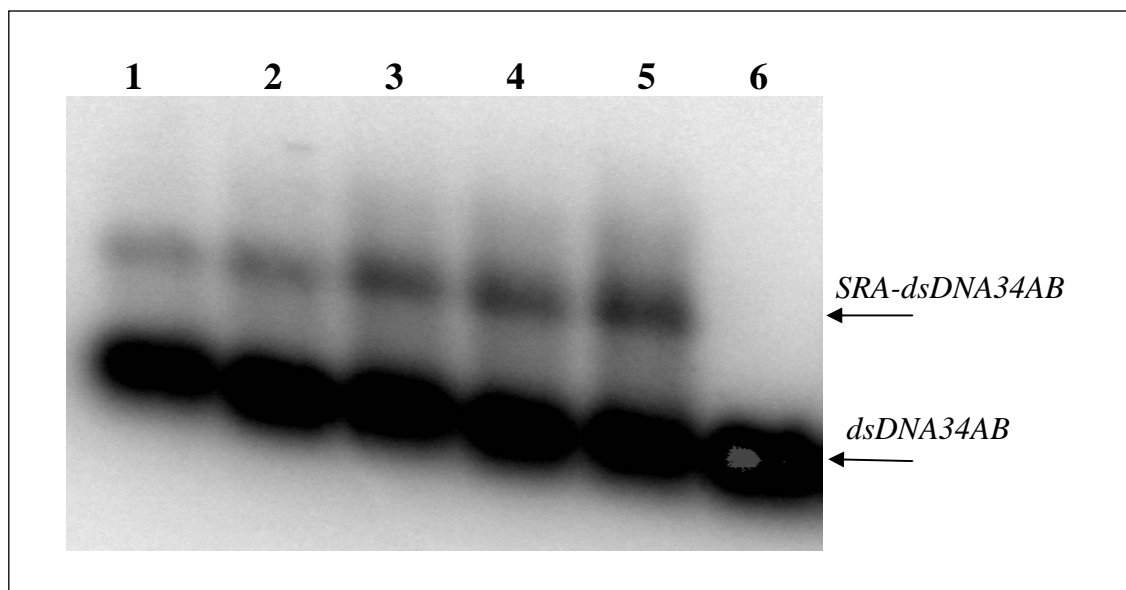
W celu usunięcia peptydu fuzyjnego 6xHisSUMO zastosowano proteazę Ulp1 (ang. *ubiquitin-like specific protease 1*). SUMO podnosi wydajność ekspresji białek w systemie bakteryjnym. Ulp1 w specyficzny sposób odcina 6xHisSUMO rozpoznając trzeciorzędową strukturę SUMO (Mossessova i Lima, 2000). Następnie oczyszczono natywną domeną SRA z wykorzystaniem agarozy Ni-NTA. Peptyd fuzyjny został związany na złożu kolumny i w ten sposób oddzielony od natywnego białka. W celu analizy czystości i wielkości powstałego produktu przeprowadzono elektroforezę na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Ryc. 46).





**Rycina 46.** Analiza produktu hydrolizy białka fuzyjnego 6xHisSUMO-SRA za pomocą proteazy Ulp1. Ścieżka nr 1- natywna domena SRA wielkości 23 kDa (wskazana strzałką), ścieżka nr 2- białko fuzyjne(wskazane strzałką) M- marker wielkości białek [kDa].

Wydajność tworzenia kompleksu otrzymanej domeny SRA z substratem dsDNA34AB (w sekwencji którego znajduje się 6 reszt  $m^5C$ ) poddano analizie (Ryc. 47). Wartości procentowe uzyskano mierząc intensywność zaciemnienia prążka (analiza densytometryczna) odpowiadającego powstałym kompleksom i odnosząc je do sumy sygnału pochodzącego od niezwiązanego DNA i powstałego kompleksu (Tab. 30)



**Rycina 47.** Analiza intensywności tworzenia się kompleksów SRA-dsDNA34AB z wykorzystaniem żelu agarozowego. Mieszanka reakcyjna zawierała 100ng-4,8pmol [ $^{32}\gamma$ -P]dsDNA34AB oraz odpowiednio: ścieżka 1- 50, ścieżka 2- 100, ścieżka 3- 150, ścieżka 4- 200, ścieżka 5- 250 pmol SRA (1pmol=23ng).

**Tabela 31.** Wydajność tworzenia kompleksów SRA-dsDNA34AB

Ilość SRA [pmol]	50	100	150	200	250
Wydajność [%]	11,28	15,39	24,54	29,31	29,66

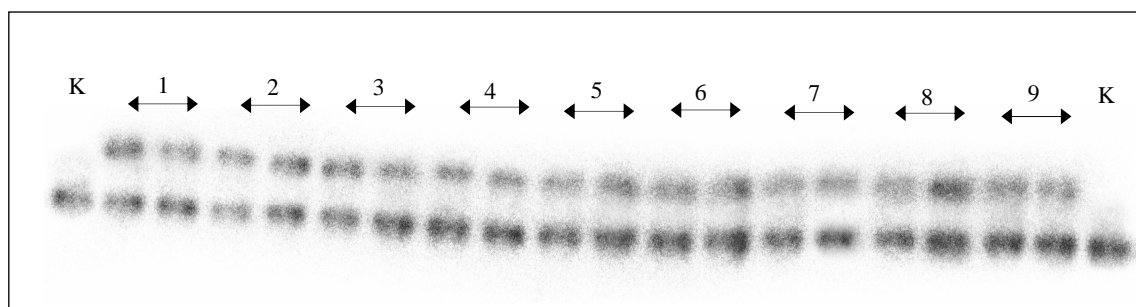
Nadprodukowana domena SRA białka UHRF1 oddziałuje z hemimetylowanym dsDNA34AB. W obecności 200 pmol SRA i 4,8 pmol dsDNA kompleksy białko-DNA tworzyły się z wydajnością ok. 29%. Wzrost ilości białka nie powoduje wzrostu wydajności reakcji (Ryc. 47, Tab. 31).

Celem badania było sprawdzenie czy furfurylowe pochodne cytozyny będą konkurować z DNA ( $m^5C$ ) wiążąc się z domeną SRA. Analizowano wpływ 3 związków: **1** ( $N^4$ -furfurylocytozyna), **3** ( $N^4$ -furfurylocytydyna) i **4** ( $N^4$ -furfurylo-5-metylocytydyna) na tworzenie się kompleksów SRA-dsDNA34AB. Wszystkie związki są pochodnymi substratu reakcji.

W mieszaninie reakcyjnej znajdowało się 150 pmol SRA, 4,8 pmol dsDNA oraz odpowiednio 150, 450 lub 1500 pmol badanego inhibitora. Każdy eksperyment został wykonany w dwukrotnym powtórzeniu (Ryc. 48).

Porównując wydajność tworzenia się kompleksów w obecności wzrastających ilości każdego z badanych związków, widoczny jest brak ich wpływu. Efektu działania

kompetytora nie obserwuje się w obecności 10-krotnego nadmiaru związków w stosunku do SRA i ok. 300-ktrotnego nadmiaru w stosunku do potencjalnych miejsc wiązania białka z DNA (Ryc. 49)



**Rycina 48.** Analiza wydajności tworzenia kompleksów SRA-dsDNA34AB w obecności wybranych związków niskocząsteczkowych. K- kontrola.

(1)  $N^4$ -furfurylocytozyna,

1- 150,

2- 450,

3- 1500 pmoli;

(3)  $N^4$ -furfurylo-2'-deoksycytydina

4- 150,

5- 450,

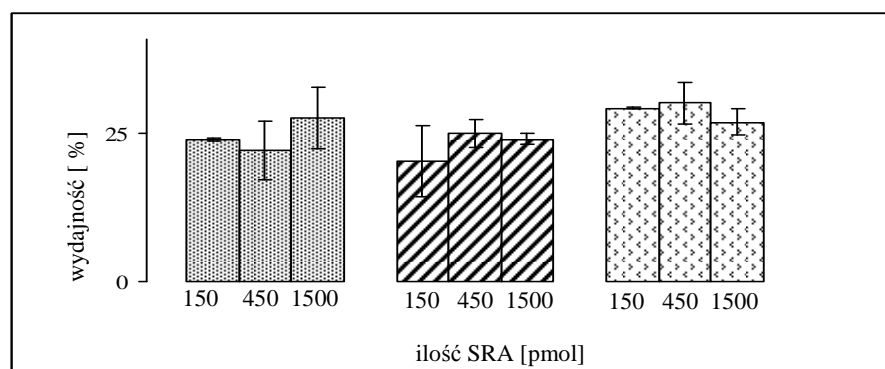
6- 1500 pmoli;

(4)  $N^4$ -furfurylo-5-metylo-2'deoksycytydina

7- 150,

8- 450,

9- 1500 pmoli



**Rycina 49.** Wydajność tworzenia kompleksów SRA-dsDNA34AB w obecności 150, 450 lub 1500 pmoli związku:

■ 1-  $N^4$ -furfurylocytozyna,

▨ 3-  $N^4$ -furfurylo-2'-deoksycytydina,

▩ 4-  $N^4$ -furfurylo-5-metylo-2'deoksycytydina.

Otrzymane wyniki świadczą, że pomimo podobieństwa pomiędzy wiązanymi przez DNMT1 i SRA substratami (C i m<sup>5</sup>C) nie dochodzi do hamowania reakcji tworzenia kompleksu białko-DNA przez pochodne furfurylowe. Może to świadczyć o specyficzności badanych pochodnych w stosunku do DNMT1.

## 6. Podsumowanie

Celem niniejszej pracy było wyselekcjonowanie inhibitorów procesu metylacji o potencjalnym znaczeniu w terapii epigenetycznej. Znacząca większość badanych pochodnych to związki nowo zsyntetyzowane o nieanalizowanych wcześniej właściwościach biologicznych.

W ramach realizowanej pracy badawczej:

1. Opracowano test inhibicji metylacji *in vitro* pozwalający na selekcję związków pod względem ich aktywności inhibitorowej względem modelowej prokariotycznej DNA metylotransferazy SssI.

2. Wykonano analizy kinetyczne określające wartość stałej inhibicji ( $K_i$ ) i typ inhibicji dla 52 pochodnych cytozyny, adeniny, uracylu oraz związków nienukleozydowych.

3. Wynikiem tych eksperymentów jest wskazanie inhibitora kompetycyjnego o najwyższej aktywności ( $N^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna), którego  $K_i$  wynosi  $0,7\mu\text{M}$ .

4. Potwierdzono inhibicję ludzkiej DNMT1 przez  $N^4$ -furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozynę.

5. Oceniono cytotoksyczność badanych związków z wykorzystaniem linii komórkowych nowotworowych (Hela, U118, HCT166 i CaCo-2) i nienowotworowych nieśmiertelnionych (HEK293). Wykazano, że pochodne furfurylowe i benzylowe są nietoksyczne, a linie komórkowe tolerują ich wysokie, milimolarne stężenia. Wysoką cytotoksycznością cechowały się natomiast pochodne 5-fluorourydyny.

6. Wykazano, że analizowane pochodne furfurylowe nie powodują trwałych uszkodzeń nici DNA w postaci pęknięć czy utleniania zasad (8-okso-dG) w traktowanych nimi komórkach,

7. Określono wpływ wybranych związków na poziom globalnej metylacji DNA w liniach komórkowych. Wyniki wskazują, że badane związki obniżają poziom metylacji w sposób zależny od stężenia.

8. Sprawdzone czy badane pochodne furfurylowe są kompetytorami w teście wiązania oligoDNA-domena SRA. W tym celu nadprodukowano domeną SRA białka UHRF1. Mimo podobieństw między substratami DNMT1 i SRA nie obserwowano

inhibicji tworzenia się kompleksów.

Wydaje się, że N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozyna stanowi dobry punkt wyjścia do planowania i syntezy kolejnych pochodnych. Związek ten cechuje się wysoką aktywnością w teście inhibicji metylacji *in vitro*, a dodatkowo wykazuje bardzo niską cytotoksyczność. Jest to pożądaną cechą inhibitorów epigenetycznych, które aby uzyskać oczekiwany efekt muszą być stosowane długoterminowo. Uzyskane wyniki wskazują, że dzięki podstawnikom: furfurylowemu i benzyłowemu, związki są inhibitorami kompetycyjnymi. Natomiast aktywność pochodnych urydynowych poprawiały modyfikacje w obrębie węgla C'-5 i reszty fosforanowej. Możliwe, że wprowadzenie tych dwóch modyfikacji do 5,6-dihydro-5-azacytozyny zwiększy aktywność tego związku. Wydaje się, że w podobny sposób wpłynąć mogłoby podstawienie w pozycji C5 N<sup>4</sup>-furfurylocytozyny atomu fluoru. Analizy właściwości fizykochemicznych badanych związków wykazały, że konieczne jest utrzymanie umiarkowanej lipofilowości inhibitorów.

## 7. Literatura

- Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, Shintani A, Kawasaki K, Minoshima S, Krohn K, Antonarakis SE, Shimizu N, Kudoh J, Peterson P (2000) Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics* 65, 293-298
- Achour M, Jacq X, Rondé P, Alhosin M, Charlot C, Chataigneau T, Jeanblanc M, Macaluso M, Giordano A, Hughes AD, Schini-Kerth VB, Bronner C (2008) The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene* 27, 2187–2197
- Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS (2010) mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro Oncol* 12, 882-889
- Alexandre J, Nicco C, Chéreau C, Laurent A, Weill B, Goldwasser F, Batteux F (2006) Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J Natl Cancer Inst* 15, 236-244
- Aravin AA, Sachidanandam R, Bourchis D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ (2008) A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* 31, 785-799
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York. 1, 471-476
- Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S (2008) Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* 455, 822-826
- Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM (2009) Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol* 27, 361-368
- Barciszewska MZ, Barciszewska AM Rattan SIS (2007) TLC-based detection of methylated cytosine: application to aging epigenetics. *Biogerontology* 8, 673–678
- Barciszewski J, Massino F, Clark BFC (2007) Kinetin - A multiactive molecule. *Int J Biol Macromol* 40, 182-192
- Beisler JA, Abbasi MM, Driscoll JS (1976) Dihydro-5-azacytidine hydrochloride, a biologically active and chemically stable analog of 5-azacytidine. *Cancer Treat Rep* 60, 1671-1674
- Beisler JA, Abbasi MM, Kelley JA, Driscoll JS (1977) Synthesis and antitumor activity of dihydro-5-azacytidine, a hydrolytically stable analogue of 5-azacytidine. *J Med Chem* 20, 806-812
- Bestor TH, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V (1988) Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203, 971-983
- Bestor TH (1988) Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* 74, 9-12
- Bestor TH (1992) Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J* 11, 2611-2617
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397, 579-583
- Bird A (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21
- Bogdanović O, Veenstra GJ (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function *Chromosoma*. 118, 549-565
- Bohm HJ, Klebe G (1996) What can we learn from molecular recognition in protein–

- ligand complexes for the design of new drugs? *Angew Chem Int Ed Engl* 35, 2588–2614
- Bonfils C, Beaulieu N, Chan E, Cotton-Montpetit J, MacLeod AR (2000) Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b. *J Biol Chem* 275, 10754-10760
  - Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317, 1760–1764
  - Bradford MM (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
  - Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, Scandura JM (2011) DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One* 6, e14524
  - Brown KD, Robertson KD (2007) DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. *Nat Genet* 3, 289-290
  - Brueckner B, Boy RG, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F (2005) Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res* 65, 6305-6311
  - Brueckner B, Kuck D, Lyko F (2007) DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 13,17-22
  - Cabello CM, Bair WB 3rd, Ley S, Lamore SD, Azimian S, Wondrak GT (2009) The experimental chemotherapeutic N6-furfuryladenine (kinetin-riboside) induces rapid ATP depletion, genotoxic stress, and CDKN1A(p21) upregulation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 77, 1125-1138
  - Cai FF, Kohler C, Zhang B, Wang MH, Chen WJ, Zhong XY (2011) Epigenetic therapy for breast cancer. *Int J Mol Sci* 12, 4465-87
  - Casillas MA Jr, Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO (2003) Transcriptional control of the DNA methyltransferase is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 252, 33-43
  - Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E (2003) Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 23, 5594-5605
  - Chen ZX, Riggs AD (2011) DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem* 286, 18347-18353
  - Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU (2003) Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 95, 399-409
  - Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA (2004) Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 6, 151-158
  - Cheng X (1995) Structure and function of DNA methyltransferases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24: 293-318
  - Cheng X, Blumenthal RM (2008) Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 16, 341-350
  - Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099–3108
  - Chik F, Szyf M, Rabbani SA (2011) Role of epigenetics in cancer initiation and progression. *Adv Exp Med Biol* 720, 91-104
  - Christman JK (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*



21, 5483-5495

- Colombo F, Falvella FS, De Cecco L, Tortoreto M, Pratesi G, Ciuffreda P, Ottria R, Santaniello E, Cicatiello L, Weisz A, Dragani TA (2009) Pharmacogenomics and analogues of the antitumour agent N6-isopentenyladenosine. *Int J Cancer* 1, 2179-2185
- Constantinides PG, Jones PA, Gevers W (1977) Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 267, 364-366
- Copeland RA (2000) *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. 2nd edition, Wiley-VCH
- Cornish-Bowden A, Eisenthal R (1974) Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. *Biochem J* 139
- Curt GA, Kelley JA, Fine RL, Huguenin PN, Roth JS, Batist G, Jenkins J, Collins JM (1985) A phase I and pharmacokinetic study of dihydro-5-azacytidine (NSC 264880). *Cancer Res* 45, 3359-3363
- Darii MV, Cherepanova NA, Subach OM, Kirsanova OV, Raskó T, Slaska-Kiss K, Kiss A, Deville-Bonne D, Reboud-Ravaux M, Gromova ES (2009) Mutational analysis of the CG recognizing DNA methyltransferase SssI: insight into enzyme-DNA interactions. *Biochim Biophys Acta* 1794, 1654-1662
- Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, Redkar S, Jacob ST (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* 15, 4277-4285
- Deng J, Szyf M (1998) Multiple isoforms of DNA methyltransferase are encoded by the vertebrate cytosine DNA methyltransferase gene. *J Biol Chem* 273, 22869-22872
- Denis H, Ndlovu MN, Fuks F (2011) Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanism. *EMBO* 12, 647-656
- Dhayalan A, Rajavelu A, Rathert P, Tamas R, Jurkowska RZ, Ragozin S, Jeltsch A (2010) The Dnmt3a PWWP Domain Reads Histone 3 Lysine 36 Trimethylation and Guides DNA Methylation. *J Biol Chem* 285, 26114-26120
- Dixon M (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55, 170-175
- Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP (2009) Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41, 1350-1353
- Donkena KV, Young CY, Tindall DJ (2010) Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. *Obstet Gynecol Int*, 302051
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003a) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300: 455
- Eden A, Gaudet F, Jaenisch R (2003b) Response to comment on chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. And induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 302, 1153
- Eidinoff ML, Rich MA, Perez AG (1959) Growth inhibition of a human tumor cell strain by 5-fluorocytidine and 5-fluoro-2'-deoxycytidine: reversal studies. *Cancer Res.* 19, 638-642
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-634
- Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M (2005) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J* 19, 807-809
- Enlago N, Yi SV (2008) DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters. *Mol Biol* 25,1602-1608

- Ertl P, Rhonde B, Selzer P (2000) Fast calculation of molecular polar surface area as sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* 43, 3714-3717
- Esteller M (2003) Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4, 351-358
- Estève PO, Chang Y, Samaranayake M, Upadhyay AK, Horton JR, Feehery GR, Cheng X, Pradhan S (2011) A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nat Struct Mol Biol* 18, 42-48
- Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 63, 7563-7570
- Ferguson LR, Tatham AL, Lin Z, Denny WA (2011) Epigenetic regulation of gene expression as an anticancer drug target. *Curr Cancer Targets* 11, 199-212
- Fini L, Selgrad M, Fogliano V, Graziani G, Romano M, Hotchikss E, Daoud YA, De Vol EB, Boland R, Ricciardieloo L (2007) Annurca apple polyphenols havee potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells. *J Nutr* 137, 2662-2628
- Fraga MF, Esteller M (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 23, 413-418
- Fujita N, Takebayashi S, Okumura K, Kudo S, Chiba T, Saya H, Nakao M (1999) Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG binding protein MBD1 isoforms. *Mol Cell Biol* 19, 6415-6426
- Ganesan A (2008) The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 12, 306-317
- Gaudet F, Talbot D, Leonhardt H, Jaenisch R (1998) A short DNA methyltransferase isoform restores methylation in vivo. *J Biol Chem* 273, 32725-32729
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 25, 4727-4741
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eucaryotic cytosine methyltransferases. *Ann Rev Biochem* 74, 481-514
- Gort EH, Suijkerbuijk KPM, Roothaan SM, Raman V, Vooijs M, van der Wall E, van Diest PJ (2008) Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 3325-3330
- Goyal R, Rathert P, Laser H, Gowher H, Jeltsch A (2007) Phosphorylation of serine-515 activates the mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1. *Epigenetics* 2, 155-160
- Gowher H, Jeltsch A (2002) Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *J Biol Chem* 277, 20409-20414
- Gowher H, Jeltsch A (2004) Mechanism of inhibition of DNA methyltransferases by cytidine analogs in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 3, 1062-1068
- Grabowski T, Gumułka SW, Borucka B, Raszewski W (2008) Analysis relationship between pharmacokinetic parameters in in silico/ in vivo of selected antiviral drugs based on sdstructural analysis. *Adv Clin Exp Med*, 17, 285-292
- Grajek W, Olejnik A, Staniaszek K (2006) Kultury komórkowe nabłonka jelitowego jako model do badania transportu transbłonowego. *Biotechnologia* 2, 148-165
- Gravina S, Vijg J (2010) Epigenetics factors in aging and longevity. *Eur J Physiol* 459, 247-258
- Hajkova P, Jeffries SJ, Lee C, Miller N, Jackson SP, Surani MA (2010) Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway.

- Science 329, 78-82
- Hashimoto H, Horton JR, Zhang X, Bostick M, . Jacobsen SE, Cheng X, (2008) The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* 455, 826-830
  - He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL (2011a) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303-1307
  - He XJ, Chen T, Zhu JK (2011b) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res* 21, 442-465
  - Hellman A, Chess A (2007) Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *PLoS Biol* 5, 1141-1143
  - Hemeon I, Gutierrez JA, Ho MC, Schramm VL (2011) Characterizing DNA methyltransferases with an ultrasensitive luciferase-linked continuous assay. *Anal Chem* 83, 4996-5004
  - Hendrich B, Abbott C, McQueen H, Chambers D, Cross S, Bird A (1999) Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3, and Mbd4 genes. *Mamm Genome* 10, 906-912
  - Hermann A, Gowher H, and Jeltsch A (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61, 2571-2587
  - Holleran JL, Parise RA, Joseph E, Eiseman JL, Covey JM, Glaze ER, Lyubimov AV, Chen YF, D'Argenio DZ, Egorin MJ (2005) Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine. *Clin Cancer Res* 11, 3862-3868
  - Holliday R, Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* , 187, 226-232
  - Hopfner R, Mousli M, Jeltsch JM, Voulgaris A, Lutz Y, Marin C, Bellocq J.P, Oudet P, Bronner C (2000) ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase II alpha expression. *Cancer Res*, 60, 121-128
  - Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104, 829-838
  - Hsu DW, Lin MJ, Lee TL, Wen SC, Chen X, Shen CKJ (1999) Two major forms of DNA(cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9751-9756
  - Hyman AH, Simons K (2011) The new cell biology: beyond HeLa cells. *Nature* 480, 34
  - Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash J, Sabunciyan S, Feinberg AP (2009) Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41, 178-186
  - Isakovic L, Saavedra OM, Llewellyn DB, Claridge S, Zhan L, Bernstein N, Vaisburg A, Elowe N, Petschner AJ, Rahil J, Beaulieu N, Gauthier F, A. MacLeod R, Delorme D, Besterman JM, Wahhab A (2009) Constrained (L)-S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) analogues as DNA methyltransferase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 2742-2746
  - Ishii Y, Hori Y, Sakai S, Honma Y (2002) Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinin sans cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differen* 13, 19-23
  - Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300-103

- Ji H, Lauren I, Ehrlich R, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, Lee H, Aryee MJ, Irizarry RA, Kim K, Rossi DJ, Inlay MA, Serwold T, Karsunky H, Ho L, Daley GQ, Weissman IL, Feinberg AP (2010) A comprehensive methylome map of lineage commitment from hematopoietic progenitors. *Nature* 467, 338–342
- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Xiaodong Cheng X (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 449, 248-251
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3,415-428
- Jones PA, Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10, 805-811
- Jost JP (1993) Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4684–4688
- Kaiser J (2010) Epigenetics drugs take on cancer. *Science* 330, 576578
- Kameshita I, Sekiguchi M, Hamasaki D, Sugiyama Y, Hatano N, Suetake I, Tajima S, Sueyoshi N (2008) Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 377,1162-1167
- Kaminskis E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, Leighton JK, Patel H, Rahman A, Sridhara R, Wang YC, Pazdur R (2005) FDA Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 11, 3604-3608
- Kangaspeska S, Stride B, Métivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452, 112-115
- Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, Klimek V, Slack J, de Castro C, Ravandi F, Helmer R 3rd, Shen L, Nimer SD, Leavitt R, Raza A, Saba H (2006) Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 106, 1794-1803
- Kassler S, Donniger H, Birrer MJ, Clark GJ (2012) RASSF1A and the taxol response in ovarian cancer. *Mol Biol Int* 2012:263267
- Kim D, Lee IS, Jung JH, Lee CO, Choi SU (1999) Psammaphin A, a natural phenolic compound, has inhibitory effect on human topoisomerase II and is cytotoxic to cancer cells. *Anticancer Res* 19, 4085-4090
- Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N, Okawa Y, Ikeda H, Vallet S, Pozzi S, Ishitsuka K, Ocio EM, Chauhan D, Anderson KC (2007) 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells *Mol Cancer Ther* 6, 1718-1727
- Knudson AG (2000) Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 34, 1-19
- Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, Lahesmaa R, Orkin SH, Rodig SJ, Daley GQ, Rao A. (2011) Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 200-213
- Komashko VM, Farnham PJ (2010) 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. *Epigenetics* 5, 229-240
- Kominsky SL, Subramaniam PS, Johnson HM, Torres BA (2000) Inhibitory Effects of IFN- $\gamma$  and Acyclovir on the Glioblastoma Cell Cycle. *J Interferon Cytokine Res* 20, 463-469
- Koudan EV, Bujnicki JM, Gromova ES (2004) Homology modeling of the CG-specific DNA methyltransferase SssI and its complexes with DNA and AdoHcy. *J Biomol Struct Dyn* 22, 339-345

- Kuch D, Schermelleh L, Manetto S, Leonhardt H, Carell T (2008) Synthesis of DNA dumbbell based inhibitors for the human DNA methyltransferase Dnmt1. *Angew Chem Int Ed Engl* 47, 1515-1518
- Kuhl PW (1994) Excess-substrate inhibition in enzymology and high dose inhibition in pharmacology: a re-interpretation. *Biochem J* 298, 171-180
- Kumar S, Cheng X, Klimasauskas S, Mi S, Posfai J, Roberts RJ, Wilson GG (1994) The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 22, 1-10
- Kumar BRP, Soni M, Bhikhalal UB, Kakkot IR, Jagadeesh M, Bommu P, Nanjan MJ (2010) Analysis of physicochemical properties for drugs from nature. *Med Chem Res* 19, 984-992
- Kunnumakkara AB, Aggarwal PA (2008) Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 269, 199-225
- Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung E, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R (1995) Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81, 197-205
- Laird CD, Pleasant ND, Clark AD, Sneed JL, Hassan KMA, Manley NC Vary Jr. JC, Morgan T, Hansen RS, Stöger R (2004) Hairpin-bisulfite PCR: Assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *PNAS* 101, 204-209
- Lakin ND, Jackson SP (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18, 7644-7655
- Lan J, Hua S, He X, Zhang Yong (2010) DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. *Acta Biochim Biophys Sin* 42, 243-252
- Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsirigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* 20, 320-331
- Lauster R, Trautner TA, Noyer-Weidner M (1989) Cytosine-specific type II DNA methyltransferases. A conserved enzyme core with variable target-recognizing domains. *J Mol Biol* 206, 305-312
- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11, 204-220
- Lee G, Wolff E, Miller JH (2004) Mutagenicity of the cytidine analog zebularine in *Escherichia coli*. *DNA Repair* 3, 155-161
- Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865-873
- Li BZ, Huang Z, Cui QY, Song XH, Du L, Jeltsch A, Chen P, Li G, Li E, Xu GL (2011) Histone tails regulate DNA methylation by allosterically activating de novo methyltransferase. *Cell Res* 21, 1172-1181
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 22, 480-491
- Lin KT, Momparler RL, Rivard GE (1981) High-performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Pharm Sci* 70, 1228-1232
- Lineweaver H, Burk D (1934) The determination of enzyme dissociation constant. *J Amer Chem Soc* 56, 658-666
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Rev* 23, 3-25
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH,

- Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462, 315-322
- Liu Z, Xie Z, Jones W, Pavlovicz RE, Liu S, Yu J, Li PK, Lin J, Fuchs JR, Marcucci G, Li C, Chan KK (2009) Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 706-709
  - Lutsenko E, Bhagwat AS (1999) Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. A model, its experimental support and implications. *Mutat Res* 437, 11-20
  - Lyko F, Brown R (2005) DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst* 97,1498-1506
  - Lysaa RA, Giverhaug T, Wold HL, Aarbakke J (1996) Inhibition of human thiopterine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. *Eur J Clin Pharmacol* 49, 393-396
  - Margot JB, Aquiree-Arteta AM, Di Giacco BV, Pradhan S, Roberts RJ, Cardo MC, Leonhardt H (2000) Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure. *J Mol Biol* 297, 293-300
  - Martinet N, Michel BY, Bertrand P, Benhida R (2012) Small molecules DNA methyltransferase inhibitors. *Med Chem Comm* 3, 263-273
  - Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJ, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466, 253-257
  - Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000) Embryogenesis: Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501-502
  - Meek DW (2004) The p53 response to DNA damage. *DNA Repair* 3, 1049-1056
  - Migicovsky Z, Kovalchuk I (2011) Epigenetic memory in mammals. *Front Genet*, 2, 28
  - Miller RL, Adamczyk DL, Miller WH, Koszalka GW, Rideout JL, Beacham LM, Chao EY, Haggerty JJ, Krenitsky TA, Elion GB (1979) Adenosine kinase from rabbit liver. II Substrate and inhibitor specificity. *J Biol Chem* 254, 2346-2355
  - Miller CO, Skoog F, Okumura FS, Von Saltza MH, Strong FM (1955) Structure and synthesis of kinetin. *J Am Chem Soc* 77, 2662-2663
  - Mirza S, Sharma G, Pandya P, Ralhan R (2010) Demethylating agent 5-aza-2-deoxycytidine enhances susceptibility of breast cancer cells to anticancer agents. *Mol Cell Biochem* 342, 101-109
  - Mitchell MD, Ponnampalam AP, Peiris H, Peiris R, Gregory E (2011) Effect of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on cytokine production in the human placenta. Abstracts of the 58th Annual Scientific Meeting of the Society for Gynecologic Investigation. 58th Annual Scientific Meeting of the Society for Gynecologic Investigation.
  - Mlejnek P (2001) Caspase inhibition and N6-benzyladenosine-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Cell Biochem* 83, 678-689
  - Mlejnek P, Prochazka S (2002) Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215, 158-166
  - Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. *J Biol Chem* (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. 279, 52353-52360
  - Mossessova E., Lima C.D. (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol. Cell* 5:865-876
  - Muto M, Utsuyama M, Horiguchi T, Kubo E, Sado T, Hirokawa K (1995) The

- characterization of the monoclonal antibody Th-10a, specific for a nuclear protein appearing in the S phase of the cell cycle in normal thymocytes and its unregulated expression in lymphoma cell lines. *Cell Prolif* 28, 645–657
- Nabel CS, Kohli RM (2011) Demystifying DNA demethylation. *Science* 333, 1229-1230
  - Nadasi E, Clark JS, Szanyi I, Varjas T, Ember I, Baliga R, Arany I (2009) Epigenetic modifiers exacerbate oxidative stress in renal proximal tubule cells. *Anticancer Res* 29, 2295-2299
  - Nakagawa H, Hasumi K, Woo J.T, Nagai K, Wachi M. (2004) Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis* 25, 1567-1574
  - Notari RE, DeYoung JL (1975) Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions. *J Pharm Sci* 64, 1148-1157
  - Okada Y, Yamagata K, Hong K, Wakayama T, Zhang Y (2010) A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature*, 463, 554-558
  - Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257
  - O'Hagan HM, Wang W, Sen S, Destefano Shields C, Lee SS, Zhang YW, Clements EG, Cai Y, Van Neste L, Easwaran H, Casero RA, Sears CL, Baylin SB (2011) Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG islands. *Cancer Cell* 15, 606-619
  - Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M (2009) Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep* 10, 1235-1241
  - Ottria R, Casati S, Manzocchi A, Baldoli E, Mariotti M, Maier JA, Ciuffreda P (2010) Synthesis and evaluation of in vitro anticancer activity of some novel isopentenyladenosine derivatives. *Bioorg Med Chem* 15, 4249-4254
  - Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322
  - Pelizzola M, Ecker JR (2011) The DNA methylome. *FEBS Lett* 585, 1995-2000
  - Piña IC, Gautschi JT, Wang GY, Sanders ML, Schmitz FJ, France D, Cornell-Kennon S, Sambucetti LC, Remiszewski SW, Perez LB, Bair KW, Crews P (2003) Psammaplins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase. *J Org Chem* 68, 3866-7383
  - Pinedo HM, Peters GF (1988) Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6, 1653-1664
  - Pradhan S, Talbot D, Sha M, Benner J, Hornstra L, Li E, Jaenisch R, Roberts RJ (1997) Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 25, 4666-4673
  - Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274, 33002-33010
  - Pradhan S, Esteve PO (2003a) Allosteric activator domain of maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and its role in methylation spreading. *Biochemistry* 42, 5321-5332
  - Pradhan S, Esteve PO (2003b) Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immun* 109, 6-16
  - Presant CA, Coulter D, Valeriote F, Vietti TJ (1981) Contrasting cytotoxicity kinetics of 5-azacytidine and dihydro-5-azacytidine hydrochloride in L1210 leukemia in mice. *J*

- Natl Cancer Inst 66, 1151-1154
- Qu Z, Fu J, Yan P, Hu J, Cheng SY, Xiao G (2010) Epigenetic repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2: implications for the biology and treatment of breast cancer. *J Biol Chem* 285, 11786-11792
  - Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM (2009) A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques* 46, 277-284
  - Ramakrishna S, Prabhavathi BF (2005) Taylor & Francis e-Library. Handbook of drug screening. *Enzyme Screens*. 296-311
  - Ramchandani S, Bigey P, Szyf M (1998) Genomic structure of the human DNA methyltransferase gene. *Biol Chem* 379, 535-540
  - Ramos AA, Azqueta A, Pereira-Wilson C, Collins AR (2010) Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *J Agric Food Chem* 58, 7465-7471
  - Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR, Trasler JM (2002) Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 245, 304-314
  - Raynal NJM, Si J, Taby RF, Gharibyan V, Ahmed S, Jelinek J, Estecio MRH, Issa JPJ (2012) DNA Methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. *Cancer Res* 72, 11701181
  - Reich NO, Mashhoon N (1990) Inhibition of EcoRI DNA methylase with cofactor analogs. *J Biol Chem* 265, 8966-8970
  - Richardson B (2003) Impact of aging on DNA methylation *Ageing Res Rev* 2, 245-261
  - Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14, 9-25
  - Riggs AD, Xiong Z (2004) Methylation and epigenetic fidelity. *PNAS* 101, 4-5
  - Robertson KD (2002) DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 21, 5361-5379
  - Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 17, 330-339
  - Ruiz-Herrera J, Ruiz-Medrano R, Dominguez A (1995) Selective inhibition of cytosine-DNA methylases by polyamines. *FEBS Lett*. 357, 192-196
  - Sancar A, Lindsey-Boltz LA Ünsal-Kaçmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanism of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoint. *Ann Rev Biochem* 73, 39-85
  - Sandoval J, Esteller M (2012) Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev* 22, 50-55
  - Santini V, Kantarjian HM, Issa JP (2001) Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Annu Intern Med* 13, 573-86
  - Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1412-1417
  - Scaglioni PP, Cai LF, Majid SM, Yung TM, Socci ND, Kogan SC, Kopelovich L, Pandolfi PP (2011) Treatment with 5-azacytidine accelerates acute promyelocytic leukemia leukemogenesis in a transgenic mouse model. *Genes Cancer* 2, 160-165
  - Schaefer M, Hagemann S, Hanna K, Lyko F (2009) Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines. *Cancer Res* 69, 8127-8132
  - Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M, Lyko F (2010) RNA Methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev* 24, 1590-1595
  - Schmitz KM, Mayer C, Postepska A, Grumot I (2010) Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA



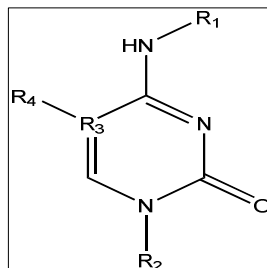
- genes. *Genes Dev* 24, 2264-2269
- Schneider-Stock R, Diab-Assef M, Rohrbeck As, Foltzer-Jourdainne C, Boltze C, Hartig R, Schönfeld P, Roessner A, Gali-Muhtasib H (2005) 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 525-536
  - Sen GL, Reuter JA, Webster DE, Zhu L, Khavari PA (2010) DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature* 463, 563-567
  - Shann YJ, Cheng C, Chiao CH, Chen DT, Li PH, Hsu MT (2008) Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. *Genome Res* 18, 791-801
  - Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450, 908-912
  - Sharma S, De Carvalho DD, Jeong S, Jones PA, Liang G. (2011) Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance. *PLoS Genet* 7, e1001286
  - Siedlecki P, Zielenkiewicz P (2006) Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Bioch Pol* 53, 245-256
  - Silverman LR, Holland JF, Weinberg RS, Alter BP, Davis RB, Ellison RR, Demakos EP, Cornell CJ Jr, Carey RW, Schiffer C (1993) Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 7 (suppl 1), 21-29
  - Skoog F, Strong FM, Miller CO (1965) Cytokinins. *Science* 148, 532-533
  - Song Y, Zhang C (2009) Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression. *Cancer Chem Pharm* 63, 605-613
  - Song J, Rechkoblit O, Bestor TH, Patel DJ (2011) Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science* 331, 1036-1040
  - Spada F, Haemmer A, Kuch D, Rothbauer U, Schermelleh L, Kremmer E, Carell T, Längst G, Leonhardt H (2007) DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol* 176, 565-571
  - Spinola M, Galvan A, Pignatiello C, Conti B, Pastorino U, Nicander B, Paroni R, Dragani TA (2005) Identification and functional characterization of the candidate tumor suppressor gene TRIT1 in human lung cancer. *Oncogene* 18, 5502-5509.
  - Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F (2006) Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 66, 2794-2800
  - Stopper H, Körber C, Gibis P, Spencer DL, Caspary WJ (1995) Micronuclei induced by modulators of methylation: analogs of 5-azacytidine. *Carcinogenesis* 16, 1647-1650
  - Sugiyama Y, Hatano N, Sueyoshi N, Suetake I, Tajima S, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Kameshita I (2010) The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase 1delta/epsilon. *Biochem J* 427, 489-497
  - Szyf M (2000) The DNA methylation machinery as a therapeutic target. *Curr Drug Targets* 1, 101-118
  - Takeshita K, Suetake I, Yamashita E, Suga M, Narita H, Nakagawa A, Tajima S (2011) Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9055-9059

- Teperek-Tkacz M, Pasque V, Gentsch G, Ferguson-Smith A (2011) Epigenetic reprogramming - is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* 142, 621-632
- Tiedemann RE, Mao X, Shi CX, Zhu YX, Palmer SE, Sebag M, Marler R, Chesi M, Fonseca R, Bergsagel PL, Schimmer AD, Stewart AK (2008) Identification of kinetin riboside as a repressor of CCND1 and CCND2 with preclinical antimyeloma activity. *J Clin Invest* 118, 1750–1764
- Trasler JM, Trasler DG, Bestor TH, Li E, Ghibu F (1996) DNA methyltransferase in normal and Dnmtn/Dnmtn mouse embryos. *Dev Dyn* 206, 239-247
- Tsai HC, Li H, Van Neste L, Cai Y, Robert C, Rassool FV, Shin JJ, Harbom KM, Beaty R, Pappou E, Harris J, Yen RW, Ahuja N, Brock MV, Stearns V, Feller-Kopman D, Yarmus LB, Lin YC, Welm AL, Issa JP, Minn I, Matsui W, Jang YY, Sharkis SJ, Baylin SB, Zahnow CA (2012) Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* 21, 430-446
- Unoki M, Brunet J, Mousli M. (2009) Drug discovery targeting epigenetic codes: the great potential of UHRF1, which links DNA methylation and histone modifications, as a drug target in cancers and toxoplasmosis. *Biochem Pharmacol* 78, 1279-1288
- Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, Esteller M (2003) Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res* 63, 4984-4989
- Vives M, Eritja R, Tauler R, Marquez VE, Gargallo R (2004) Synthesis, stability, and protonation studies of a self-complementary dodecamer containing the modified nucleoside 2'-deoxyzebularine. *Biopolymers* 73, 27-43
- Voller J, Zatloukal M, Lenobel R, Dolezal K, Béres T, Krystof V, Spíchal L, Niemann P, Dzubák P, Hajdúch M, Strnad M (2010) Anticancer activity of natural cytokinins: a structure-activity relationship study. *Phytochem* 71, 1350-1359
- Wagner CR, Ballato G, Akanni AO, McIntee EJ, Larson RS, Chang S, Abul-Hajj YJ (1997) Potent Growth Inhibitory Activity of Zidovudine on Cultured Human Breast Cancer Cells and Rat Mammary Tumors. *Cancer Res.* 57, 2341-2345
- Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T (2009) The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet* 41, 125-129
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39, 457-466
- Weinberg MS, Villeneuve LM, Ehsani A, Amarzguioui M, Aagaard L, Chen ZX, Riggs AD, Rossi JJ, Morris KV (2006) The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *RNA* 12, 256-262
- Weiss AJ, Metter GE, Nealon TF, Keanan JP, Ramirez G, Swaiminathan A, Fletcher WS, Moss SE, Manthei RW (1977) Phase II study of 5-azacytidine in solid tumors. *Cancer Treat Rep* 61, 55-58
- Wu JC, Santi DV (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J Biol Chem* 262, 4778-4786
- Wu SC, Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev* 11, 607-620
- Xavier CPR, Lima CF, Rohde M, Pereira-Wilson C (2011) Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 68, 1449-1457
- Xu YZ, Huang P, Plunkett W (1995) Functional compartmentation of dCTP pools. Preferential utilization of salvaged deoxycytidine for DNA repair in human lymphoblasts. *J Biol Chem* 270, 631-637

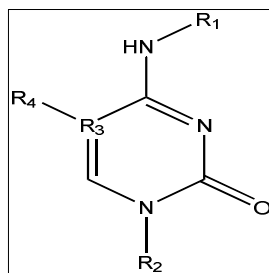
- Xu J, Zhou JY, Tainsky MA, Wu GS (2007) Evidence that tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induction by 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes human breast cancer cells to adriamycin. *Cancer Res* 67, 1203-1211
- Xu F, Mao C, Ding Y, Rui C, Wu L, Shi A, Zhang H, Zhang L, Xu Z (2010) Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr Med Chem* 17, 4052-4071
- Yang AS, Estecio MR, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Issa JP (2003) Comment on Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation and Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 302, 1153
- Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el-Deiry W, Cumaraswamy A, Lennon GG, Trask BJ, Celano P, Baylin SB (1992) Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 20, 2287-2291
- Yoo CB, Jones PA (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 5, 37-50
- Yoo J, Kim JH, Robertson KD, Medina-Franco JL (2012) Molecular modeling of human DNA methyltransferase with a crystal structure: discovery of novel DNMT1 inhibitor. *Adv Protein Chem Struct Biol* 87, 219-247
- Zangi R, Arieta A, Cossio FP (2010) Mechanism of DNA Methylation: the double role of DNA as a substrate and as cofactor. *J Mol Biol* 400, 632-644
- Zhang Y, Jurkowska R, Soeroes S, Rajavelu A, Dhayalan A, Bock I, Rathert P, Brandt O, Reinhardt R, Fischle W, Jeltsch A (2010) Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Res* 38, 4246-4253
- Ziemia A, Hayes E, Freeman BB, Ye T, Pizzorno (2011) Development of an oral form of azacytidine: 2'3'5'triacetyl-5-azacytidine. *Chemother Reseach Pract* 965826
- Zilberman D (2007) The human promoter methylome. *Nat Genet* 39:442-443
- Zimmermann C, Guhl E, Graessmann A (1997) Mouse DNA methyltransferase (MTase) deletion mutants that retain the catalytic domain display neither de novo nor maintenance methylation activity in vivo. *Biol Chem* 378, 393-405
- Zingg JM, Shen JC, Yang AS, Rapoport H, Jones PA (1996) Methylation inhibitors can increase the rate of cytosine deamination by (cytosine-5)-DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 24, 3267-3275
- Żukiel R, Nowak S, Barciszewska AM, Gawronska I, Keith G, Barciszewska MZ (2004) A simple epigenetic method for the diagnosis and classification of brain tumors. *Mol Cancer Res* 2, 196-202

## Załącznik 1

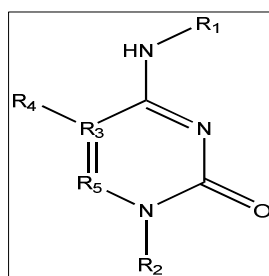
Wzory strukturalne badanych związków. Kolorem szarym oznaczono pochodne, których  $K_i > 100 \mu\text{M}$ , kolorem czerwonym wyróżniono N<sup>4</sup>-furfurylo-5,6-dihydro-5-azacytozynę.







Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1		H	C	H
2		H	C	H
3			C	H
4			C	CH <sub>3</sub>
5		H	C	CH <sub>3</sub>
6		H	C	H <sub>2</sub> C—OH
7		H	C	
8		H	C	
9		H	C	
10		H	C	
11		H	N	H

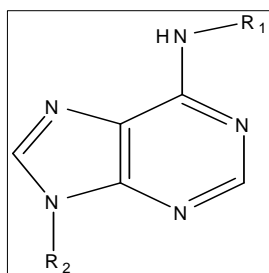


Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
12		H	C	H
13		H	C	H
14		H	C	H
15		H	C	H
16		H	C	H
17		H	C	CH <sub>3</sub>
18		H	H	H <sub>2</sub> C—OH
19		H	C	
20		H	C	
21		H	C	
22		H	N	H



Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
23	HC—	H	C	H
24	HC— 	H	C	H
25	HC— 	H	C	H
26	H <sub>2</sub> C—	H	C	H
27	H <sub>2</sub> C— 	H	C	H

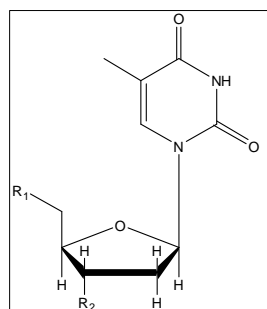
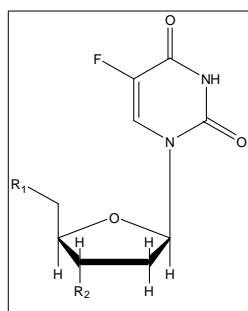
Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
28	H	H	C	H	
29	H	H	N	H	H



Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
30		H
31		
32		
33		

Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
34		H
35		H
36		

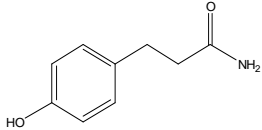
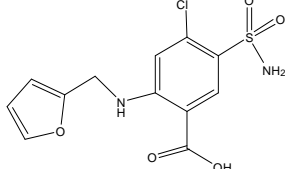
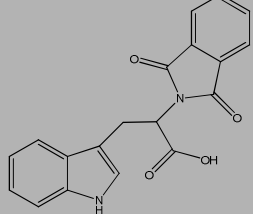
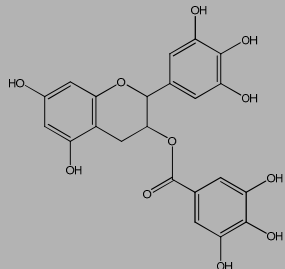
Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
37		H
38		H
39		H
40	H	
41	H	

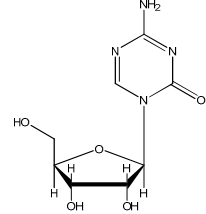
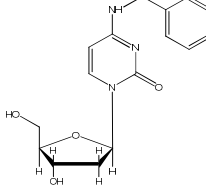


Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
42	OH	OH
43		OH
44		OH
45		OH
46		OH

Nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
47	OH	$N=N^+=N^-$
48		$N=N^+=N^-$



Nr	Struktura związku
49	
50	
51	
52	

Skrót	Struktura związku
AzaC	
dCBz	



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Samorząd Województwa Wielkopolskiego  
Wojewódzki Urząd Pracy  
w Poznaniu

**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Oświadczam, że jestem stypendystką w ramach projektu pt.: „Wparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.