

УДК 577.151

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК БЕНЗО[*a*]ПИРЕНОМ УХУДШАЕТ ЕЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗой МЫШИ DNMT3A2

О.В. Лукашевич¹, Н.А. Черепанова¹, А. Колбановский², Н.Э. Гиацинтов²,
Е.С. Громова¹

(¹кафедра химии природных соединений химического факультета МГУ; ²химический факультет Нью-Йоркского университета, США; email: gromova@genebee.msu.ru)

Изучено влияние повреждения ДНК бензо[*a*]пиреном (одним из самых распространенных канцерогенов) на функционирование укороченной изоформы метилтрансферазы Dnmt3a (Dnmt3a2). При помощи модельных 30-звенных субстратов выявлено, что повреждения, нарушающие структуру сайта узнавания Dnmt3a или мешающие контактам каталитической петли фермента с малой бороздкой ДНК, резко снижают скорости метилирования. Показано, что в выбранных условиях PWWP-домен метилтрансферазы Dnmt3a2, средство которого к ДНК меньше, чем у каталитического домена, не влияет на катализ.

Ключевые слова: метилирование, ДНК-метилтрансфераза, бензо[*a*]пирен, повреждение ДНК, интеркалирование, малая бороздка.

Классификация фермента: EC 2.1.1.37

Метилирование ДНК по пятому положению цитозина в CpG-последовательностях – важная эпигенетическая модификация, от которой зависят стабильность хроматина, импринтинг генов, дифференциация клеток и регуляция экспрессии генов [1–3]. Нарушение распределения метилированных CpG-последовательностей в клетке (рисунка метилирования) напрямую связывают с развитием онкологических заболеваний [4]. Рисунок метилирования устанавливает *de novo* ДНК-метилтрансфераза (МТазы) Dnmt3a, которая переносит метильные группы с кофактора, S-аденозил-L-метионина (AdoMet), на остатки цитозина-мишени в обеих цепях ДНК и превращает AdoMet в S-аденозил-L-гомоцистеин (AdoHcy). В настоящее время неизвестен точный механизм действия МТазы Dnmt3a, однако выявлены некоторые особенности этого фермента: склонность к олигомеризации [5, 6], кооперативный характер связывания с ДНК [7], низкая скорость реакции по сравнению с прокариотическими МТазами [8, 9], способность метилировать и другие динуклеотидные CpX-последовательности помимо CpG [10] и др.

МТазы Dnmt3a, как и другие МТазы млекопитающих, имеет две области: С-концевой каталитический домен (Dnmt3a-CD) и N-концевую регуляторную часть, отвечающую за ядерную локализацию фермента (в том числе за взаимодействие с хроматином) и взаимодействие с другими белками в клетке [11]. Dnmt3a-CD обеспечивает узнавание CpG-последовательностей (связывание ДНК) и перенос метильной группы с ко-

фактора AdoMet на ДНК. В состав Dnmt3a-CD входят 10 аминокислотных мотивов, являющихся консервативными для всех МТаз. Важно, что изолированный Dnmt3a-CD способен метилировать ДНК, что позволяет использовать его как более простую модель для изучения механизма этой МТазы [12]. В N-концевую часть Dnmt3a входят ADD- и PWWP-домены. ADD-домен, известный также как PHD, имеет структуру «цинковые пальцы» и отвечает за взаимодействие со многими белками, например, с транскрипционными факторами, ферментами, модифицирующими гистоны, и др [13–20]. PWWP-домен длиной 100–150 аминокислотных остатков отвечает за взаимодействие с хроматином и распознавание разных его модификаций [21]. Недавно показано, что изолированный PWWP-домен кооперативно и неспецифически связывается с ДНК [22]. Связывание ДНК PWWP-доменом в составе полноразмерной Dnmt3a приводит к субстратному ингибированию, хотя его физиологическая роль не определена.

Функционирование Dnmt3a могут нарушать разные повреждения ДНК, образующиеся в результате неблагоприятных внешних воздействий. Бензо[*a*]пирен (Б[*a*]П) – самый распространенный канцероген, попадающий в окружающую среду разными путями, например, из выхлопных газов автомобилей, табачного дыма и при сгорании органических веществ [23, 24]. В организме он окисляется до реакционноспособного бензо[*a*]пирендиолэпоксида (Б[*a*]ПДЭ), который присоединяется к ДНК по экзоциклическим аминокруп-

пам остатков гуанина и аденина, образуя стереохимически различные B[a]ПДЭ- N^2 -dG- и B[a]ПДЭ- N^6 -dA-аддукты [24]. Ранее нами показано, что такое повреждение остатков гуанина в CpG-последовательности или остатков аденина, прилегающих к CpG, резко ухудшает метилирование ДНК-субстратов каталитическим доменом Dnmt3a [9, 25].

Цель настоящей работы – исследование влияния повреждения ДНК B[a]ПДЭ на функционирование одной из природных изоформ Dnmt3a – МТазы мыши Dnmt3a2. У этого фермента отсутствуют аминокислотные остатки 1–219 (у Dnmt3a2 человека отсутствуют остатки 1–223), но при этом сохранены важные для межбелковых взаимодействий и возможных взаимодействий с ДНК N-концевые ADD- и PWWP-домены [26]. Dnmt3a и Dnmt3a2 обладают схожей метилтрансферазной активностью [27], но по-разному экспрессируются в клетке [26]. Полноразмерная МТазы Dnmt3a экспрессируется повсеместно. Она была обнаружена во многих тканях организма, в то время как экспрессия изоформы Dnmt3a2 характерна только для тканей, в которых наблюдается выраженное метилирование *de novo* в процессе клеточной дифференциации [26].

Экспериментальная часть

Использованы буферы: А – 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl; Б – 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7,5), 0,5 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Triton X-100, 5% (v/v) глицерин, 20 мМ имидазол; В и Г – буфер Б с 30 и 500 мМ имидазолом соответственно; Д – 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 М NaCl, 0,1%-й 2-меркаптоэтанол и Е – 25 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1%-й 2-меркаптоэтанол.

Синтез 30-звенных олигонуклеотидов, поврежденных B[a]ПДЭ (табл. 1), описан в [9]. Олигонуклеотиды, не содержащие B[a]ПДЭ-модификацию, были синтезированы фирмами «Синтол» (Россия) и «IDT» (США). Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически [8]. Отжиг олигонуклеотидных дуплексов проводили нагреванием до 95°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры в буфере А.

МТазы Dnmt3a2, содержащая кластер His₆ на N-конце, была выделена с помощью афинной хроматографии. За основу взята методика выделения Dnmt3a-CD [25]. Клетки BL21 (DE3) Codon Plus RP (Stratagene) трансформировали плазмидой pET-28a, несущей в себе ген гексагистидинового производного фермента Dnmt3a2. Дневную культуру выращивали при 37°C и интенсивной аэрации до $\text{OD}_{600} \approx 0,6$, после чего проводили индукцию экспрессии белка 0,4 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом и растили клетки в течение одной ночи при 22°C в среде LB с

50 мкМ ZnSO_4 . Клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин, разрушали ультразвуком, суспензировали в буфере Б, надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 13400 об/мин и наносили ее на колонку с Ni-NTA-агарозой (Superflow). Далее колонку промывали буферами Б и В, белок с колонки смывали буфером Г. После этого ставили на ночь диализ против буфера Д, затем в препарат добавляли глицерин до 40% (по объему) и хранили при –20°C. Чистота препарата, определенная с помощью электрофореза в 12,5%-м ПААГ, содержащем додецилсульфат натрия, составила >90%. Концентрация фермента, определенная по методу Брэдфорд, рассматривалась как концентрация мономеров.

За метилированием ДНК следили по включению тритиевой метки при переносе метильной группы с кофактора на ДНК. Использовался $[\text{CH}_3\text{-}^3\text{H}]\text{-AdoMet}$ (15 Ки/ммоль, 66,7 мкМ) фирмы «Amersham Biosciences», UK). Реакционные смеси, содержащие 1,5 мкМ ДНК, 0,88 мкМ Dnmt3a2 и 2 мкМ $[\text{CH}_3\text{-}^3\text{H}]\text{AdoMet}$, инкубировали при 37°C в буфере Е, отбирали аликвоты через 5, 10, 15 и 20 мин. и наносили на ионообменные фильтры DE81 (Whatman). Дальнейшую обработку фильтров проводили, как описано в [25]. Начальную скорость реакции определяли по тангенсу угла наклона кривой зависимости степени метилирования от времени проведения реакции.

Результаты и обсуждение

Для изучения взаимодействия Dnmt3a2 с ДНК, поврежденной B[a]ПДЭ, использовали модельные 30-звенные ДНК-дуплексы (B[a]ПДЭ-ДНК), в которых к экзоциклической аминогруппе одного из пуриновых оснований ковалентно присоединен определенный стереоизомер B[a]ПДЭ (табл. 2). Исследуемые поврежденные ДНК-дуплексы можно разделить на три группы: малобороздочные, когда B[a]П-радикал (+)- и (–)-*транс*-B[a]ПДЭ- N^2 -dG-аддуктов располагается в малой бороздке двойной спирали по направлению к 5'- или 3'-концу соответственно [28] и два вида интеркалирующих. В интеркалирующих (+)- и (–)-*цис*-B[a]ПДЭ- N^2 -dG-аддуктах B[a]П-радикал выталкивает поврежденный остаток гуанина в малую или большую бороздку соответственно, а цитозин в обоих случаях вытеснен в большую бороздку [28]; в (+)-*транс*-B[a]ПДЭ- N^6 -dA-аддукте остаток бензо[a]пирена интеркалирует с 3'-стороны от модифицированной А•Т-пары оснований без ее разрушения, однако с нарушением геометрии двойной спирали в этом участке [29]. Такое разнообразие субстратов позволяет не только оценить метилтрансферазную активность Dnmt3a2 по отношению к поврежденной ДНК, но и использовать B[a]ПДЭ-ДНК для выявления некоторых особенностей

Т а б л и ц а 1

Олигонуклеотидные последовательности*

Олигонуклеотид	Обозначение
5'-CTGAATACTACTTGGCGCTCTCTAACCTGAT-3'	GCGC
5'-CTGAATACTACTT ^{G⁺} CGCTCTCTAACCTGAT-3'	G ⁺ CGC
5'-CTGAATACTACTT ^{G^c} CGCTCTCTAACCTGAT-3'	G ^c CGC
3'-GACTTATGATGAACGMGAGAGATTGGACTA-5'	CGMG
5'-CTGAATACTACTTACGCTCTCTAACCTGAT-3'	ACGC
5'-CTGAATACTACTTACG ⁺ CTCTCTAACCTGAT-3'	ACG ⁺ C
5'-CTGAATACTACTTACG ^t CTCTCTAACCTGAT-3'	ACG ^t C
5'-CTGAATACTACTTACG ⁺ CTCTCTAACCTGAT-3'	ACG ⁺ C
5'-CTGAATACTACTTACG ^c CTCTCTAACCTGAT-3'	ACG ^c C
5'-CTGAATACTACTTA ⁺ CGCTCTCTAACCTGAT-3'	A ⁺ CGC
3'-GACTTATGATGAATGMGAGAGATTGGACTA-5'	TGMG

* (M, 5-метилцитозин; G⁺ и G^t, (+)- и (-)-*транс*-Б[а]ПДЭ-N²-dG; G^{c+} и G^{c-}, (+)- и (-)-*цис*-Б[а]ПДЭ-N²-dG; A⁺, (+)-*транс*-Б[а]ПДЭ-N⁶-dA).

фермент-субстратного взаимодействия.

Начальные скорости метилирования Б[а]ПДЭ-ДНК были определены в условиях избытка субстрата (табл. 2). Временные зависимости были линейными на протяжении всего времени проведения реакции (20 мин). В условиях проведения реакции суммарная концентрация солей составляла 45–50 мМ, что лежит в пределах диапазона суммарной концентрации солей в буфере, при которых Dnmt3a2 может эффективно осуществлять каталитический акт [27]. Скорость метилирования немодифицированного субстрата АСГС/ТГМГ* была в 1,6 раза выше по сравнению с GCGC/CGMG (другое нуклеотидное окружение CpG-сайта), что согласуется с полученными нами ранее результатами [9] и выводами авторов работы [30] о том, что АСГС/ТГМГ является более предпочтительным субстратом для Dnmt3a.

Метилирование Б[а]ПДЭ-ДНК зависит от положения аддукта и его конформации. Наличие остатка Б[а]П вызывает значительное уменьшение скорости метилирования (табл. 2). Введение (+)- или (-)-*транс*-Б[а]ПДЭ-N²-dG-аддукта в CpG-сайт (АСГ⁺С/ТГМГ и АСГ^tС/ТГМГ) или с 5'-стороны от него (G⁺СГС/СГМС) приводит к падению скорости метилирования от 10 до 30 раз. Наблюдаемые эффекты можно объяснить тем, что Б[а]П-радикал, расположенный в малой бороздке, мешает «выпетливанию» цитозина-мишени из состава двойной спирали через ее малую бороздку, что обычно происходит при метилировании немодифицированных ДНК МТазы [31, 32]. Этот процесс нарушает и взаимодействие каталитической петли

МТазы с CpG-сайтом. При этом можно допустить, что конформация Б[а]ПДЭ-ДНК в комплексе с белком не отличается значительно от конформации свободной Б[а]ПДЭ-ДНК [9].

Далее мы исследовали влияние интеркалирующих аддуктов, приводящих к нарушению структуры ДНК (табл. 2). Сначала мы изучили влияние (+)- и (-)-*цис*-Б[а]ПДЭ-N²-dG-аддуктов в составе сайта узнавания (АСГ⁺С/ТГМГ и АСГ^{c-}С/ТГМГ). Они разрушают С•G-пару оснований, к которой принадлежит поврежденный остаток гуанина. Как и в случае с малобороздочными аддуктами, введение повреждения в сайт узнавания приводит к уменьшению начальных скоростей метилирования в 13–15 раз. В отличие от них (-)-*цис*-Б[а]ПДЭ-N²-dG-аддукт, примыкающий к сайту с 5'-стороны (G^{c-}СГС/СГМС), не влияет на скорость метилирования. Это показывает, как важна целостная структура CpG-сайта для правильного функционирования Dnmt3a2. В подтверждение данного тезиса в А•Т-пару с 5'-стороны от CpG-сайта был введен (+)-*транс*-Б[а]ПДЭ-N⁶-dA (A⁺СГС/ТГМГ). Он нарушает геометрию как А•Т-пары, так и соседней с ней С•G-пары CpG-сайта. В этом случае мы зафиксировали уменьшение скорости метилирования в 4,9 раза (табл. 2). Падение скорости метилирования при введении интеркалирующих аддуктов оказалось меньше по сравнению с малобороздочными аддуктами.

При изучении влияния окислительного повреждения на метилирование ДНК в случае с 8-оксогуанином наибольшее снижение скорости метилирования было зафиксировано при локализации этого

Т а б л и ц а 2

Начальные скорости метилирования Б[а]ПДЭ-ДНК МТазой Dnmt3a2

Б[а]ПДЭ-ДНК	Схематическое изображение	Краткое описание конформации аддукта	Б[а]ПДЭ-ДНК + Dnmt3a2		Б[а]ПДЭ-ДНК + Dnmt3a-CD*	
			v , нМ/мин	$v_{отн}$, %	v , нМ/мин	$v_{отн}$, %
GCGC CGMC	—	—	1,37 ± 0,18	100	1,5 ± 0,2	100
ACGC TGMG	—	—	2,22 ± 0,12	100	2,5 ± 0,1	100
G⁺C⁻GCGC CGMC		локализация Б[а]П в малой бороздке ДНК по направлению к 5'- или 3'-концу	0,133 ± 0,015	9,7	0,16 ± 0,05	11
ACG⁺C⁻ TGMG			0,095 ± 0,012	4,3	0,13 ± 0,03	5
ACG⁺C⁻ TGMG			0,160 ± 0,041	7,2	0,21 ± 0,05	8
G⁻C⁻GCGC CGMC		интеркаляция Б[а]П внутрь двойной спирали ДНК с вытеснением остатков гуанина и его цитозина-партнера в большую или малую бороздку	1,28 ± 0,14	93,4	1,5 ± 0,1	100
ACG⁺C⁻ TGMG			0,168 ± 0,014	7,6	0,31 ± 0,07	12
ACG⁻C⁻ TGMG			0,15 ± 0,013	6,8	0,34 ± 0,15	14
A⁺C⁻GCGC TGMG		интеркаляция с нарушением геометрии двойной спирали ДНК	0,456 ± 0,056	20,5	0,69 ± 0,11	27

П р и м е ч а н и я. Обозначения отдельных цепей Б[а]ПДЭ-ДНК даны в табл. 1; сайт узнавания Dnmt3a2 выделен жирным шрифтом, цитозин-мишень подчеркнут; $v_{отн}$ представляет собой отношение скорости метилирования модифицированного субстрата к скорости метилирования соответствующего канонического субстрата (GCGC/CGMC или ACGC/TGMG); *данные из работы [9].

повреждения в CpG-сайте [33]. Это подтверждает вывод о том, что изменения в структуре CpG-сайта оказывают наибольшее влияние на эффективность метилирования. Противоположный эффект наблюдается для прокариотической МТазы M.SssI, также узнающей CpG-сайт. Для этого фермента наибольшее падение скорости метилирования 18- и 30-звенных Б[а]ПДЭ-ДНК наблюдается при введении повреждения с 5'-стороны от CpG-сайта [8, 9]. Как отмечалось во введении, в состав N-концевого участка Dnmt3a2

входит PWWP-домен. Показано, что сродство к ДНК изолированного PWWP-домена на 1–2 порядка ниже по сравнению с каталитическим доменом [22, 25]. В составе PWWP-домена есть гидрофобный карман, который отвечает за связывание Dnmt3a с триметилированным остатком лизина гистона H3 при взаимодействии фермента с хроматином [34]. Наличие легко доступной гидрофобной области в PWWP-доме делает его потенциально способным к взаимодействию с остатком Б[а]П. Представилось важным выяснить,

будет ли наличие PWWP-домена оказывать влияние на взаимодействие Dnmt3a2 с поврежденными субстратами. Ранее мы уже исследовали влияние повреждения Б[а]П на метилирование субстратов разной длины каталитическим доменом МТазы Dnmt3a [9, 25]. Выявленные при взаимодействии Dnmt3a2 с 30-звенными субстратами закономерности характерны также для Dnmt3a-CD (табл. 2). Это следует из сравнения относительных скоростей метилирования в случае Dnmt3a2 и Dnmt3a-CD. Все это согласуется с фактом, что С-концевой домен МТазы отвечает за катализ, а N-концевой в катализе не участвует и отвечает в основном за взаимодействие с другими белками в клетке [11, 12]. Следует отметить, что абсолютные значения начальных скоростей метилирования одинаковых субстратов МТазой Dnmt3a2 были меньше, чем в случае Dnmt3a-CD (табл. 2).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-00727).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reik W., Dean W., Walter J. // *Science*. 2001. **293**. N 5532. P. 1089.
2. Bird A. // *Genes Dev*. 2002. **16**. N 1. P. 6.
3. Wu H., Coskun V., Tao J., Xie W., Ge W., Yoshikawa K., Li E., Zhang Y., Sun Y.E. // *Science*. 2010. **329**. N 5990. P. 444.
4. Robertson K.D. // *Nat. Rev. Genet*. 2005. **6**. N 8. P. 597.
5. Jia D., Jurkowska R.Z., Zhang X., Jeltsch A., Cheng X. // *Nature*. 2007. **449**. N 7159. P. 248.
6. Cheng X., Blumenthal R.M. // *Structure*. 2008. **16**. N 3. P. 341.
7. Robertson A.K., Geiman T.M., Sankpal U.T., Hager G.L., Robertson K.D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. **322**. N 1. P. 110.
8. Subach O.M., Baskunov V.B., Darii M.V., Maltseva D.V., Alexandrov D.A., Kirsanova O.V., Kolbanovskiy A., Kolbanovskiy M., Johnson F., Bonala R., Geacintov N.E., Gromova E.S. // *Biochemistry*. 2006. **45**. N 19. P. 6142.
9. Minero A.S., Lukashovich O.V., Cherepanova N.A., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Gromova E.S. // *FEBS J*. 2012. **279**. N 20. P. 3965.
10. Gowher H., Liebert K., Hermann A., Xu G., Jeltsch A. // *J. Biol. Chem*. 2005. **280**. N 14. P. 13341.
11. Jurkowska R.Z., Jurkowski T.P., Jeltsch A. // *Chembiochem*. 2011. **12**. N 2. P. 206.
12. Gowher H., Jeltsch A. // *J. Biol. Chem*. 2002. **277**. N 23. P. 20409.
13. Datta J., Ghoshal K., Sharma S.M., Tajima S., Jacob S.T. // *J. Cell. Biochem*. 2003. **88**. N 5. P. 855.
14. Ling Y., Sankpal U.T., Robertson A.K., McNally J.G., Karpova T., Robertson K.D. // *Nucleic Acids Res*. 2004. **32**. N 2. P. 598.
15. Li H., Rauch T., Chen Z.X., Szabó P.E., Riggs A.D., Pfeifer G.P. // *J. Biol. Chem*. 2006. **281**. N 28. P. 19489.
16. Meilinger D., Fellingner K., Bultmann S., Rothbauer U., Bonapace I.M., Klinkert W.E., Spada F., Leonhardt H. // *EMBO Rep*. 2009. **10**. N 11. P. 1259.
17. Otani J., Nankumo T., Arita K., Inamoto S., Ariyoshi M., Shirakawa M. // *EMBO Rep*. 2009. **10**. N 11. P. 1235.
18. Rush M., Appanah R., Lee S., Lam L.L., Goyal P., Lorincz M.C. // *Epigenetics*. 2009. **4**. N 6. P. 404.
19. Cheng X., Blumenthal R.M. // *Biochemistry*. 2010. **49**. N 14. P. 2999.
20. Chang Y., Sun L., Kokura K., Horton J.R., Fukuda M., Espejo A., Izumi V., Koomen J.M., Bedford M.T., Zhang X., Shinkai Y., Fang J., Cheng X. // *Nat. Commun*. 2011. **2**. P. 533.
21. Chen T., Tsujimoto N., Li E. // *Mol. Cell. Biol*. 2004. **24**. N 20. P. 9048.
22. Purdy M.M., Holz-Schietinger C., Reich N.O. // *Arch. Biochem. Biophys*. 2010. **498**. N 1. P. 13.
23. Yang S.C., Jenq S.N., Kang Z.C., Lee H. // *Chem. Res. Toxicol*. 2000. **13**. N 10. P. 1046.
24. Xue W., Warshawsky D. // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2005. **206**. N 1. P. 73.
25. Lukashovich O.V., Baskunov V.B., Darii M.V., Kolbanovskiy A., Baykov A.A., Gromova E.S. // *Biochemistry*. 2011. **50**. N 5. P. 875.
26. Chen T., Ueda Y., Xie S., Li E. // *J. Biol. Chem*. 2002. **277**. N 41. P. 38746.
27. Suetake I., Morimoto Y., Fuchikami T., Abe K., Tajima S. // *J. Biochem*. 2006. **140**. N 4. P. 553.
28. Geacintov N.E., Cosman M., Hingerty B.E., Amin S., Broyde S., Patel D.J. // *Chem. Res. Toxicol*. 1997. **10**. N 2. P. 111.
29. Pradhan P., Tirumala S., Liu X., Sayer J.M., Jerina D.M., Yeh H.J. // *Biochemistry*. 2001. **40**. N 20. P. 5870.
30. Handa V., Jeltsch A. // *J. Mol. Biol*. 2005. **348**. N 5. P. 1103.
31. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X. // *Cell*. 1994. **76**. N 2. P. 357.
32. Gerasimaite R., Merkiene E., Klimasauskas S. // *Nucleic Acids Res*. 2011. **39**. N 9. P. 3771.
33. Maltseva D.V., Baykov A.A., Jeltsch A., Gromova E.S. // *Biochemistry*. 2009. **48**. N 6. P. 1361.
34. Dhayalan A., Rajavelu A., Rathert P., Tamas R., Jurkowska R.Z., Ragozin S., Jeltsch A. // *J. Biol. Chem*. 2010. **285**. N 34. P. 26114.

Поступила в редакцию 11.11.13

BENZO[*a*]PYRENE-DERIVED DNA LESIONS DECREASE DNA METHYLATION BY MURINE METHYLTRANSFERASE DNMT3A2**O.V. Lukashovich¹, N.A. Cherepanova¹, A. Kolbanovsky², N.E. Geacintov², E.S. Gromova¹***(¹Division of Natural Compounds, Moscow State University; ²Department of Chemistry, New York University, USA; e-mail: gromova@genebee.msu.ru)*

We have studied the impact of DNA damage by one of the most common carcinogens, benzo[*a*]pyrene, on the functioning of the truncated isoform of DNA methyltransferase Dnmt3a (Dnmt3a2). It is revealed with the 30-mer model DNA substrates that DNA methylation rates are drastically reduced when the lesions disturb the structure of the Dnmt3a recognition site or hinder the interaction of the enzyme catalytic loop with the DNA minor groove. Under chosen conditions the PWWP domain of Dnmt3a possessing lower affinity to DNA in comparison with the catalytic domain does not influence on catalysis.

Keywords: *methylation, DNA methyltransferase, benzo[*a*]pyrene, DNA damage, intercalation, minor groove.*

Enzymes: EC 2.1.1.37

Сведения об авторах: *Лукашевич Ольга Владимировна* – аспирант кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ (o.lukashevich@gmail.com), *Черепанова Наталья Александровна* – аспирант кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ (cherepanova@genebee.msu.ru); *Колбановский Александр* – сотрудник химического факультета Нью-Йоркского университета (ak19@nyu.edu); *Гиацинтов Николай Эрастович* – профессор химического факультета Нью-Йоркского университета (ng1@nyu.edu); *Громова Елизавета Сергеевна* – профессор химического факультета МГУ, докт. хим. наук (gromova@genebee.msu.ru).