

## КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 577.29:616-006.6

doi: 10.17223/19988591/29/10

**В.В. Кузнецов, А.А. Евдокимов, Н.А. Нетесова**

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия*

### **Олигонуклеотидные ингибиторы Dnmt1: Проникновение и ингибирование роста клеток HeLa и CaSki**

Современные противораковые препараты класса ингибиторов ДНК-метилтрансфераз наряду с терапевтическим эффектом обладают сильными мутагенными свойствами. Поиск новых нетоксичных ингибиторов является актуальной проблемой. Изучено влияние конкурентных ингибиторов метилтрансфераз, аналогов природного субстрата ферментов, на рост клеток карцином шейки матки HeLa и CaSki. Показано, что проникая в клетки, они преимущественно накапливаются в ядре, при этом максимальное насыщение ядер сохраняется минимум в течение 48 часов. При изучении токсического эффекта выявлены различия в восприимчивости разных линий карцином к ингибиторам. Так, для клеток линии HeLa (ассоциирована с ВПЧ-18) половинная токсическая концентрация составляла 236–408 нМ, тогда как для клеток линии CaSki (ассоциирована с ВПЧ-16)  $TC_{50} = 118–170$  нМ. Установлено, что изученные ингибиторы ДНК-метилтрансферазы 1 обладают низким токсическим эффектом на здоровые фибробласты ( $TC_{50} > 10^4$  нМ), что делает перспективным их дальнейшее исследование в качестве противоопухолевых препаратов.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК; ингибиторы ДНК-метилтрансфераз; карцинома шейки матки.

### **Введение**

Метилирование цитозина в составе CpG островков генома является необходимым инструментом регулирования активности генов, родительского импринтинга, инактивации X-хромосомы, поддержания целостности генома клетки и его защиты от встраивания ретровирусов и транспозонов [1]. В клетках млекопитающих важную роль в этом процессе играют ДНК-метилтрансферазы (ДНК МТазы) Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b. При этом Dnmt3a и Dnmt3b отвечают за метилирование *denovo*, а Dnmt1 – за восстановление профиля метилирования в дочерней цепи во время репликации ДНК [2].

Известно, что одним из ключевых факторов запуска и развития процесса канцерогенеза является локальное гиперметилирование CpG-островков в регуляторных областях (район промотора и первого экзона) генов-онко-

супрессоров [3]. Аберрантное метилирование регуляторных областей генов-онкосупрессоров показано для подавляющего большинства известных спорадических онкопатологий и происходит на самых ранних стадиях заболевания до проявления клинических признаков [4]. Кроме того, показано, что набор метилированных CpG-островков (профиль метилирования ряда генов-онкосупрессоров) может специфически характеризовать определенный тип опухоли и различается для разных онкопатологий [5].

Поскольку присоединение метильной группы к цитозину в составе ДНК не приводит к изменению генетического кода, использование ингибиторов МТаз позволяет добиться реактивации генов-онкосупрессоров, приводящей к обратному развитию опухоли [2]. В настоящее время допущены к применению аналоги цитидина (Vidaza<sup>®</sup>, Dacogen<sup>®</sup>) для терапии острого миелоидного лейкоза и миелодиспластического синдрома [6]. Однако помимо высокой эффективности данные препараты обладают сильным токсическим и мутагенным эффектом. Таким образом, остается актуальным поиск прямых ингибиторов МТаз, обладающих наряду с противоопухолевой активностью умеренным воздействием на нормальные клетки.

Ранее нами сконструированы и синтезированы конкурентные олигодезоксирибонуклеотидные ингибиторы (ОДН) Dnmt1 человека как наиболее близкие к природному субстрату фермента – клеточной ДНК – и продемонстрирована их способность ингибировать реакцию метилирования ДНК *in vitro* [7]. Таким образом, цель данной работы – изучение влияния лучших олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 на рост клеток карциномы шейки матки Hela и Caski.

### Материалы и методики исследования

**Клеточные линии.** Для экспериментов использовали клеточные линии HeLa (карцинома шейки матки, ассоциированная с ВПЧ-18), CaSki (карцинома шейки матки, ассоциированная с ВПЧ-16) и L-68 (легочные фибробласты эмбриона человека) из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия), посевная концентрация  $10^5$  клеток/мл. Использовалась среда Игла МЕМ производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия) с добавлением 5%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

**Изучение внутриклеточной локализации ОДН в клетках.** Для изучения внутриклеточной локализации ОДН в клетках HeLa и CaSki использовали флуоресцентно меченные структуры. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах на покровных стеклах в 2 мл среды с сывороткой без антибиотиков (18 ч, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), затем ее заменяли на среду без сыворотки и антибиотиков. Доставку ОДН в клетки осуществляли с помощью трансфекционного агента Липофектамин 2000 «Invitrogen» (США) согласно инструкции производителя. Для этого преинкубированные смеси липофектамина и ОДН разводили средой Игла МЕМ, вносили по 100 мкл в лунки планшета и культивировали клетки в течение 4 ч. Количество ОДН подбирали согласно условиям экспе-

римента. Затем среду заменяли обычной ростовой с ампициллином и культивировали еще 24–72 ч, после чего стекла с клетками помещали на 10 мин в 4%-ный раствор формалина для фиксации, трижды отмывали в однократном фосфатном буфере (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4). Далее вносили по 1 мкл 1000-кратного раствора DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) «Invitrogen» (США) на 15 мин для окрашивания ядер и вновь трижды отмывали в фосфатном буфере. После этого проводили микроскопию образцов на люминесцентно-инверсионном микроскопе СКХ41 «Olympus» (Япония). При микроскопии делали отдельно снимки ядер клеток (DAPI, синее свечение) и метки на олигонуклеотидах (FAM, зеленое свечение), затем при помощи компьютерной обработки фотографии совмещали и оценивали распределение меченых ОДН в клетке.

**Исследование цитотоксичности и ингибирующей активности ОДН.** Монослой культуры клеток L-68, HeLa и CaSki выращивали в лунках плоскодонных 96-луночных планшетов. Экспозиция ингибиторов составляла 4 ч, после чего клетки культивировали в течение 24 ч. Затем среду удаляли, а монослой прокрашивали витальным красителем нейтральным красным. После удаления красителя и отмывки лунок добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированного живыми клетками монослоя, измеряли на планшетном спектрофотометре Emax «MolecularDevices» (США) на длине волны 540 нм. В качестве контролей использовали лунки планшета, в которые препараты не вносили, а также лунки без ингибиторов, но с добавлением липофектамина. Зависимости количества живых клеток (А) от концентрации ингибиторов (I) анализировали с помощью программы для нелинейного регрессионного анализа Origin 8.0 «OriginLab» (США), значения 50%-ных цитотоксических концентраций (TC<sub>50</sub>) препаратов рассчитывали по формуле

$$A = \frac{A_{\max}}{1 + \left( \frac{[I]}{TC_{50}} \right)^n},$$

где n – коэффициент Хилла. Статистическую обработку полученных результатов проводили по U-критерию Манна–Уитни.

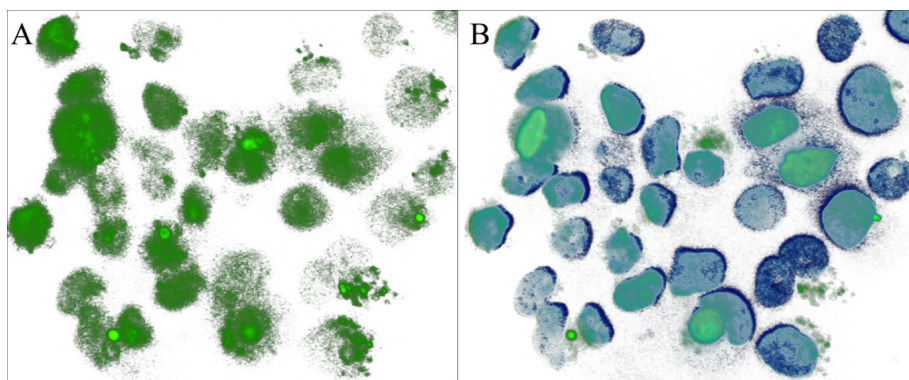
**Олигодезоксирибонуклеотидные ингибиторы.** ОДН синтезированы ЗАО «Биосан» (Новосибирск). При получении фосфотиоатов на стадии окисления использовали реактив Beaucage «GlenResearch» (США) как сульфорирующий агент. Шпильчатые ДНК-структуры получали отжигом олигонуклеотидов – нагревом до 85°C с последующим плавным охлаждением до комнатной температуры.

### Результаты исследования и обсуждение

**Локализация ОДН в клетках карцином шейки матки.** Для исследования способности ОДН проникать в клетки HeLa и CaSki и сохраняться в них длительное время синтезированы меченные FAM олигонуклеотиды ОДН-1F

(FAM-GAAATGGATCCGCTCTAAACTGCCCCGCC) и ОДН-2F (FAM-GAAA TGGATCCGCTCTAAACTGCCCCCCCAGTTTAGAGCGGATCCATTTC), в которых все фосфаты заменены фосфотиоатами.

На рис. 1 приведены фотографии флуоресценции ОДН-1F в клетках HeLa после экспозиции 100 нМ олигонуклеотида. Использование ОДН-2F вместо ОДН-1F, а также снижение концентрации препарата в среде, вплоть до 10 нМ, не приводило к значительному изменению картины флуоресценции. Аналогичная картина наблюдалась и на клетках CaSki для обеих исследованных структур.



**Рис. 1.** Оценка проникновения и преимущественной локализации олигонуклеотида ОДН-1F в клетках HeLa: *A* – флуоресценция ОДН; *B* – то же, но с наложением свечения ядер клеток, окрашенных DAPI

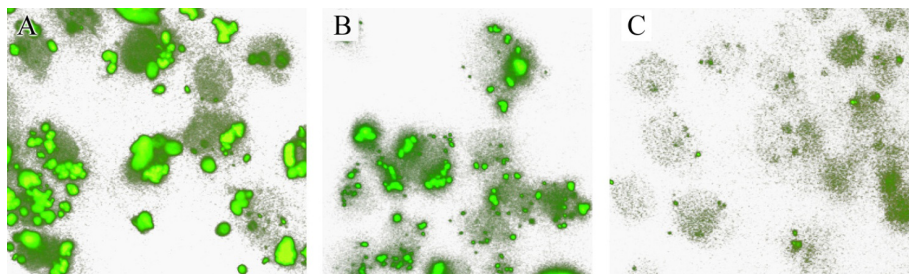
[Fig. 1. The oligonucleotide localization in HeLa cells.

*A* - fluorescence of oligonucleotide, *B* - the same with DAPI stained nuclei fluorescence overlay]

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что условия эксперимента обеспечивают эффективную доставку синтетических структур в клетки. При этом интенсивность флуоресценции (а следовательно, и концентрация ОДН) в подавляющем большинстве (до 90–100%) клеточных ядер практически одинакова. Следовательно, трансфецированные ОДН локализуются непосредственно там, где происходит реакция метилирования ДНК.

При изучении деградации олигонуклеотида ОДН-1F в клетках HeLa в течение 72 ч выявлено постепенное снижение интенсивности свечения в цитоплазме с первого дня эксперимента, тогда как флуоресценция в клеточных ядрах начинала снижаться только после трех дней культивации (рис. 2; для ОДН-2F получены аналогичные результаты). В клетках CaSki оба олигонуклеотида продемонстрировали схожие результаты, однако окрашивание ядер на третий день интенсивнее, чем в клетках HeLa. Это можно объяснить расходом ОДН в результате деления клеток, а различия во флуоресценции на третий день являются следствием неодинакового темпа клеточных делений, что подтверждается литературными данными [8]. Таким образом,

можно предполагать, что в суточных экспериментах с немечеными ОДН не происходит значимой деградации ингибитора в клетках.



**Рис. 2.** Устойчивость ОДН-1F в клетках HeLa (*A* – 24 ч, *B* – 48 ч, *C* – 72 ч)  
[Fig. 2. The oligonucleotide stability in HeLa cells over time. *A* - 24 hours, *B* - 48 hours, *C* - 72 hours]

**Оценка цитотоксичности олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1.**  
Проведены эксперименты по изучению влияния различных концентраций ОДН в среде (от 1,25 до 1280 нМ) на жизнеспособность клеток HeLa, CaSki и L-68. Значения 50%-ных токсических концентраций ( $TC_{50}$ ) приведены в таблице.

**Оценка цитотоксического действия олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 в отношении клеточных линий HeLa, CaSki и L-68**  
[Cytotoxicity of the oligonucleotide Dnmt1 inhibitors measured on HeLa, CaSki and L-68 cells]

Лиганд [Ligand]	Структура (5'→3') [Structure (5'→3')]	$TC_{50}$ , нМ		
		HeLa	CaSki	L-68
ОДН-К	GAAATGGATCATCTCTAAACTG	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>
ОДН-1	GAAATGGATC <b>MG</b> CTCTAAACTGCC <b>MG</b> CC	285±15*	147±5*	>10 <sup>4</sup>
ОДН-2	GAATGGATC <b>MG</b> CTCTAACTG <sup>C</sup> <sub>C</sub> CTTACCTAG <b>GC</b> GAGATTGAC <sup>C</sup> <sub>C</sub>	408±9*	170±5*	>10 <sup>4</sup>
ОДН-3	GAATGGATC <sup>C</sup> <b>G</b> CTCTAACTG <sup>C</sup> <sub>C</sub> CTTACCTAG <sup>A</sup> <b>M</b> GAGATTGAC <sup>C</sup> <sub>C</sub>	236±10*	118±3*	>10 <sup>4</sup>
ОДН-4	GAATGGATC <b>MA</b> CTCTAACTG <sup>C</sup> <sub>C</sub> CTTACCTAG <b>GC</b> GAGATTGAC <sup>C</sup> <sub>C</sub>	290±18*	136±5*	>10 <sup>4</sup>

*Примечание.* М – 5-метилцитозин. Жирным шрифтом выделены нативные либо модифицированные участки 5'-CG. \*  $p < 0,01$ .

[Note. M - 5-methylcytosine. Native or modified Dnmt1 sites 5'-CG are in bold. \*  $p < 0.01$ ].

Для исследованных синтетических ингибиторов получены весьма низкие значения  $TC_{50}$  в отношении раковых клеток (118–408 нМ, см. таблицу), в то время как для здоровых фибробластов  $TC_{50}$  оказалась на уровне контроля (>10<sup>4</sup> нМ). Различие с контролем более чем в 100 раз указывает на неплохой

терапевтический потенциал сконструированных олигонуклеотидов. Наиболее эффективным оказался ОДН-3 ( $TC_{50, HeLa} = 236$  нМ,  $TC_{50, CaSki} = 118$  нМ, см. таблицу), содержащий полуметилированный сайт с С:А некомплементарностью. Максимальная ингибирующая активность ОДН-3 может быть обусловлена наиболее выгодным пространственным расположением шпильки структуры относительно фермента. Dnmt1 является высокопроцессивным ферментом и характеризуется строгой направленностью перемещения ( $3' \rightarrow 5'$ ) по неметилированной цепи ДНК [9–11], а в случае с ОДН-2 и ОДН-4 шпилька располагается по ходу движения Dnmt1 (см. таблицу), что, видимо, снижает эффективность взаимодействия олигонуклеотида с аллостерическим сайтом в регуляторном домене белка.

Сравнивая эффективность ингибирования роста клеток HeLa ( $TC_{50} = 236\text{--}408$  нМ) и CaSki ( $TC_{50} = 118\text{--}170$  нМ), можно предположить, что выявленное различие в чувствительности клеточных линий к ОДН обусловлено неодинаковым функциональным значением aberrантного гиперметилирования ДНК для прогрессии различных типов рака шейки матки.

Для исследования влияния Липофектамина 2000 на жизнеспособность клеток в ростовую среду вносили липофектамин в количествах, необходимых для транспортировки ингибиторов ОДН-1–ОДН-4, взятых в аналогичных опыту концентрациях. Полученные значения  $TC_{50}$  для липофектамина более чем на порядок отличались от  $TC_{50}$  ингибиторов, что позволило считать его вклад в цитотоксический эффект ОДН незначительным.

### Заключение

В настоящем исследовании проведена работа по изучению влияния олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 на рост клеток карциномы шейки матки HeLa и CaSki. Исследована их способность проникать в раковые клетки и сохраняться в них с течением времени. Оценен также токсический эффект влияния ингибиторов на здоровые фибробласты и клетки карцином HeLa и CaSki. Нами показано, что замена фосфатов на фосфотиоаты способствовала длительному нахождению ингибитора в ядре клеток, а сочетание структурных особенностей, таких как С : А некомплементарность и «шпилька», имели кумулятивный эффект. Так, наилучшие показатели  $IC_{50}$  получены у соединений ОДН-3 и ОДН-4, которые обладают всеми перечисленными модификациями. Стоит отметить, что наличие неспаренных нуклеотидов в сайте узнавания двуцепочечной ДНК значительно усиливает способность ингибировать реакцию метилирования. В подтверждение: одноцепочечная структура ОДН-1 с двумя сайтами **MG** проявляет лучшую активность по сравнению со шпильчатой структурой ОДН-2, содержащей сайт  $5'\text{-MG-}3'/3'\text{-GC-}5'$ . Несмотря на то, что обе исследуемые карциномы шейки матки ассоциированы с вирусом папилломы человека (HeLa с ВПЧ-18, CaSki с ВПЧ-16), влияние ингибиторов происходит с разной эффективностью: зна-



чения  $TC_{50}$  для исследуемых ОДН варьировали в диапазоне 236–408 нМ – для клеточной линии HeLa и 118–170 нМ для клеточной линии CaSki. В то же время показатель  $TC_{50}$  для фибробластов линии L-68 превысил значение 10 мкМ для всех испытуемых ингибиторов. Подобное отличие в половинных токсических концентрациях, вкупе с преимущественным накоплением ингибитора в ядре клетки и долгим временем жизни, дает возможность (при потенциальном клиническом применении) существенно повысить дозу препарата, не опасаясь сильных токсических эффектов. Дальнейшее изучение подобного рода структур является привлекательным и перспективным с точки зрения терапии раковых заболеваний, ассоциированных aberrантным метилированием генома.

### Литература

1. Jurkowska R.Z., Jurkowski T.P., Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases // *Chembiochem*. 2011. Vol. 12, № 2. P. 206–222.
2. Delpu Y., Cordelier P., Cho W.C., Torrisani J. DNA methylation and cancer diagnosis // *Int. J. Mol. Sci*. 2013. Vol. 14, № 7. P. 15029–15058.
3. Moore L.D., Le T., Fan G. DNA methylation and its basic function // *Neuropsychopharmacology*. 2013. Vol. 38, № 1. P. 23–38.
4. Jones P.A., Baylin S.B. The epigenomics of cancer // *Cell*. 2007. Vol. 128, № 4. P. 683–692.
5. Акишев А.Г., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью BIs- и Glai-ПЦР анализа // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2011. Т. 5, № 7. P. 5–12.
6. Singh V., Sharma P., Capalash N. DNA methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2013. Vol. 13, № 4. P. 379–399.
7. Евдокимов А.А., Зиновьев В.В., Кузнецов В.В., Нетесова Н.А., Малыгин Э.Г. Конструирование олигонуклеотидных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы 1 человека // *Молекулярная биология*. 2009. Т. 43, № 3. С. 455–463.
8. Радаева И.Ф., Нечаева Е.А., Дроздов И.Г. Коллекция культур клеток ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Новосибирск : ЦЭРИС, 2009. 251 с.
9. Goyal R., Reinhardt R., Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase // *Nucleic Acids Res*. 2006. Vol. 34, № 4. P. 1182–1188.
10. Hermann A., Goyal R., Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites // *J. Biol. Chem*. 2004. Vol. 279, № 46. P. 48350–48359.
11. Vilkaitis G., Suetake I., Klimasauskas S., Tajima S. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase // *J. Biol. Chem*. 2005. Vol. 280, № 1. P. 64–72.

Поступила в редакцию 13.01.2015 г.; принята 17.02.2015 г.

#### Авторский коллектив:

**Кузнецов Виталий Викторович** – н.с. отдела разработки средств ПЦР-диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия). E-mail: kuznetsov\_vv@vector.nsc.ru

**Евдокимов Алексей Альбертович** – канд. биол. наук, с.н.с. отдела разработки средств ПЦР-диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия).

E-mail: evdokimov@vector.nsc.ru

**Нетесова Нина Александровна** – д-р биол. наук, зав. отделом разработки средств ПЦР-диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р. п. Кольцово, Новосибирская обл.).

E-mail: [ninanet@vector.nsc.ru](mailto:ninanet@vector.nsc.ru)

Kuznetsov VV, Evdokimov AA, Netesova NA. Oligonucleotide inhibitors of Dnmt1: penetration and HeLa and Caski cells growth inhibition. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2015;1(29):155-163. doi: 10.17223/19988591/29/10. In Russian, English summary

**Vitaliy V. Kuznetsov, Alexey A. Evdokimov, Nina A. Netesova**

*State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Koltsovo, Novosibirsk Oblast, Russian Federation.*

### **Oligonucleotide inhibitors of Dnmt1: penetration and HeLa and Caski cells growth inhibition**

The use of Dnmt1 inhibitors allows reactivation of tumor suppressor genes which leads to tumor regression. Currently used drugs have potent toxic and mutagenic effect despite their high effectiveness. Thus, the development of Dnmt1 direct inhibitors with antitumor activity and moderate effect on normal cells remains relevant. Recently we have designed and synthesized competitive oligodeoxyribonucleotide inhibitors of human Dnmt1 demonstrating their ability to inhibit DNA methylation reaction *in vitro*. The aim of our work was to study the influence of the best of Dnmt1 inhibitors on the cervix carcinoma cells growth.

We used cell lines HeLa, CaSki and L-68 from SRC VB “Vector” (Russia) collection. Oligonucleotides were transfected using Lipofectamine 2000 “Invitrogen” (USA) according to the manufacturer’s instructions. The localization of fluorescent labeled oligonucleotides in the cells was evaluated by fluorescence microscopy. Toxic effect was evaluated by spectrophotometry.  $TC_{50}$  values (50% cytotoxic concentration) were calculated from the number of living cells depending on the inhibitor concentration in the medium.

We studied fluorescent labeled oligonucleotides localization with oligonucleotides which are similar to inhibitors but have no Dnmt1 inhibition properties. After transfection the oligonucleotides are localized in cell nuclei, and there is no apparent luminescence reduction within 48 hours. This was achieved due to phosphates tophosphothioates replacement that allows a long-term presence of the inhibitor in the cell nucleus. The combination of structural features, such as C: A non-complementary and “pin” had a cumulative effect. Thus, the best  $TC_{50}$  values were obtained from inhibitors that possess all of these modifications. The presence of unpaired nucleotides in the double-stranded DNA recognition site greatly enhances the ability to inhibit the methylation reaction. Despite the fact that both investigated cervical carcinomas are associated with human papillomavirus (HeLa with HPV-18, Caski with HPV-16), the effect of inhibitors occurs with different efficiency:  $TC_{50}$  values ranged 236-408 nM for HeLa cell line and 118-170 nM for CaSki cell line. At the same time,  $TC_{50}$  value for fibroblast cell line L-68 exceeded 10  $\mu$ M for all tested inhibitors which makes them promising for a further study as antitumor drugs.

*The article contains 1 Table, 2 Figures, 11 References*

**Key words:** DNA methylation; DNA methyltransferases inhibitors; cervical cancer.



## References

1. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBiochem*. 2011;12(2):206-222. doi: [10.1002/cbic.201000195](https://doi.org/10.1002/cbic.201000195)
2. Delpu Y, Cordelier P, Cho WC, Torrisani J. DNA methylation and cancer diagnosis. *Int. J. Mol. Sci*. 2013;14(7):15029-15058. doi: [10.3390/ijms140715029](https://doi.org/10.3390/ijms140715029)
3. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-38. doi: [10.1038/npp.2012.112](https://doi.org/10.1038/npp.2012.112)
4. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683-692. doi: [10.1016/j.cell.2007.01.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029)
5. Akishev AG, Gonchar DA, Abdurashitov MA, Degtyarev SKh. Epigeneticheskoe tipirovanie malignantlykh kletochnykh liniy cheloveka s pomoshch'yu Bls- i Glai-PTsR analiza [Epigenetic typing of human cancer cell lines by BlsI- and GlaiI-PCR assays]. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni Yu. A. Ovchinnikova – Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. 2011;7(3):5-12. doi: [10.1134/S0026893309030108](https://doi.org/10.1134/S0026893309030108) In Russian. English version available at: <http://science.sibenzyme.com/papers/epigenetics/epigenetic-typing-of-human-cancer-cell-lines-by-blsi-and-glai-PCR-assays>
6. Singh V, Sharma P, Capalash N. DNA methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*. 2013;13(4):379-399. PMID: [23517596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23517596/)
7. Evdokimov AA, Zinoviev VV, Kuznetsov VV, Netesova NA, Malygin EG. Design of oligonucleotide inhibitors for human DNA methyltransferase 1. *Molecular Biology*. 2009;43(3):418-425. doi: [10.1134/S0026893309030108](https://doi.org/10.1134/S0026893309030108)
8. Radaeva IF, Nechaeva EA, Drozdov IG. Kolleksiya kul'tur kletok FGUN GNTs VB “Vektor” Rospotrebnadzora [Cell lines collection of SRC VB Vector]. Novosibirsk: TsERIS Publ.; 2009. 251 p. In Russian
9. Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(4):1182-1188. doi: [10.1093/nar/gkl002](https://doi.org/10.1093/nar/gkl002)
10. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem*. 2004;279(46):48350-48359. doi: [10.1074/jbc.M403427200](https://doi.org/10.1074/jbc.M403427200)
11. Vilkaitis G, Suetake I, Klimasauskas S, Tajima S. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem*. 2005;280(1):64-72. doi: [10.1074/jbc.M411126200](https://doi.org/10.1074/jbc.M411126200)

Received 13 January 2015;

Accepted 17 February 2015

### Authors info:

**Kuznetsov Vitaliy V**, research associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russian Federation.

E-mail: [kuznetsov\\_vv@vector.nsc.ru](mailto:kuznetsov_vv@vector.nsc.ru)

**Evdokimov Alexey A**, Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russian Federation.

E-mail: [evdokimov@vector.nsc.ru](mailto:evdokimov@vector.nsc.ru)

**Netesova Nina A**, Dr. Sci. (Biol.), Head of department, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russian Federation.

E-mail: [ninanet@vector.nsc.ru](mailto:ninanet@vector.nsc.ru)