

УДК 577.152.161; 576.08

Ингибирование поли(ADP-рибозо)-полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином

Д. К. Нилов^{1,2}, В. И. Тараров³, А. В. Куликов⁴, А. Л. Захаренко⁵, И. В. Гущина²,
С. Н. Михайлов³, О. И. Лаврик⁵, В. К. Швядас^{1,2*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

⁵Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 01.12.2015

Принята к печати 01.02.2016

РЕФЕРАТ Способность метаболита нуклеиновых кислот 7-метилгуанина ингибировать поли(ADP-рибозо)-полимеразу 1 (ПАРП-1) и поли(ADP-рибозо)полимеразу 2 (ПАРП-2) выявлена *in silico* и изучена экспериментально. Показано, что для эффективного связывания пуриновых производных с ПАРП важна аминогруппа в положении 2 и метильная группа в положении 7. Активность ПАРП-1 и ПАРП-2 подавляется 7-метилгуанином со значениями IC_{50} 150 и 50 мкМ соответственно. В ПАРП-ингибирующей концентрации 7-метилгуанин не токсичен, но способен усиливать апоптотическую гибель BRCA1-дефицитных клеток рака молочной железы под воздействием цисплатина и доксорубина – широко используемых ДНК-повреждающих химиотерапевтических препаратов. 7-Метилгуанин имеет привлекательный предсказанный профиль фармакокинетики и токсичности и может рассматриваться в качестве дополнительного компонента химиотерапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА докинг, ингибиторы ПАРП, молекулярное моделирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПАРП – поли(ADP-рибозо)полимераза; МД – молекулярная динамика.

ВВЕДЕНИЕ

Под действием различных факторов стресса в ДНК человека возникают генотоксичные повреждения, которые должны устраняться для обеспечения правильной репликации ДНК, транскрипции и предотвращения канцерогенеза. В клеточные пути репарации вовлечены многие белки, которые распознают и устраняют модификации азотистых оснований и разрывы цепи ДНК [1]. Поли(ADP-рибозо)полимеразы (ПАРП; [КФ. 2.4.2.30]) представляют группу эукариотических белков с разнообразными функциями, связанными в основном с репарацией ДНК и клеточной гибелью. Наиболее изученные представители семейства ПАРП-1 и ПАРП-2 обладают

ДНК-зависимой активностью и катализируют синтез поли(ADP-рибозы) [2]. Донором остатка ADP-рибозы для синтеза полимера служат молекулы NAD^+ , в ходе реакции высвобождается никотинамид и образуется гликозидная связь между остатками. Связывание белков ПАРП-1 и ПАРП-2 с поврежденной ДНК приводит к поли(ADP-рибозил)ированию как самих ферментов, так и других белков, вовлеченных в метаболизм ДНК [3–6]. Результатом данной посттрансляционной модификации являются активация и сборка систем репарации в поврежденном локусе ДНК. Так, аутомодифицированная ПАРП-1 мобилизует белок эксцизионной репарации XRCC1, ассоциированный с ДНК-полимеразой β и ДНК-

лигазой III [7–9]. Важная роль ПАРП-1 и ПАРП-2 подтверждается тем фактом, что *parp-1^{-/-}* и *parp-2^{-/-}* мыши более чувствительны к ионизирующей радиации, а двойные мутанты *parp-1^{-/-}parp-2^{-/-}* погибают на ранней стадии развития в начале гастрюляции [10].

ДНК-связывающий домен ПАРП-1 построен из специализированных цинковых пальцев, в то время как его структура в ПАРП-2 неизвестна, а соответствующий участок последовательности не обладает гомологией с описанными ДНК-связывающими мотивами. Напротив, каталитические домены и активные центры ПАРП-1 и ПАРП-2 характеризуются высоким структурным сходством как в апоформе, так и в комплексе с ингибиторами [11, 12]. Связанный в активном центре субстрат NAD^+ взаимодействует с остатками Gly863 и Tyr907 (нумерация для ПАРП-1) схожим образом с ингибиторами – миметиками никотинамидного фрагмента. Остов Gly863 образует две водородные связи с амидной группой никотинамида, а боковая цепь Tyr907 – стэкинг с никотинамидным кольцом [13]. Несколько описанных классов ингибиторов ПАРП содержат карбоксамидную группу, присоединенную к ароматическому кольцу, или лактамную группу, встроенную в систему ароматических колец [14–19], что обеспечивает образование упомянутых взаимодействий с остатками Gly863 и Tyr907. Помимо соединений, конкурирующих с NAD^+ за активный центр, лиганды малой бороздки, затрагивающие ДНК-зависимый путь регуляции ПАРП-1, также могут рассматриваться в качестве ингибиторов [20].

Вовлеченность ПАРП в системы репарации ДНК делает этот фермент привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии. Ингибиторы ПАРП-1 и ПАРП-2 могут усиливать эффект различных ДНК-повреждающих противоопухолевых средств, таких, как цисплатин или доксорубин. При умеренном повреждении ДНК ПАРП принимает участие в репарации, что позволяет опухолевым клеткам выжить. Комбинирование ДНК-повреждающего агента и ингибитора ПАРП-1 или ПАРП-2 может способствовать преодолению лекарственной устойчивости и апоптотической гибели клеток, представляя, таким образом, многообещающую стратегию терапии опухолей [15, 21–23]. Кроме того, ингибиторы могут найти применение и при дефектах репарации ДНК в определенных опухолевых клетках. Так, отсутствие гомологичной рекомбинации в клетках с дефицитом BRCA1/2 делает их высокочувствительными к ингибированию ПАРП [24–26]. Несколько ингибиторов ПАРП, обладающих противоопухолевой активностью, не прошли доклинические или клинические испытания по причине токсичности и недостаточной эффективности [27–29]. В частности, хорошо из-

вестный ингибитор ПАРП-1 3-аминобензамид плохо проникает в клетку и влияет на другие метаболические процессы. В декабре 2014 года в США было одобрено использование олапариба, первого в своем классе ингибитора ПАРП-1, при прогрессирующем раке яичников [30]. Это соединение является производным фталазина с лактамной группой и в наномолярной концентрации подавляет ферментативную активность ПАРП. Тем не менее разработка эффективных и нетоксичных соединений, воздействующих на ПАРП и способных подавлять развитие различных типов рака, по-прежнему представляет важную и сложную проблему.

Один из перспективных классов ингибиторов ПАРП – природные азотистые основания и их производные, содержащие лактамную группу [31, 32]. Однако идентифицированные соединения (например, тимин, гипоксантин) обладают относительно слабым ингибирующим эффектом. В данной работе представлены результаты компьютерного скрининга ингибиторов ПАРП среди производных азотистых оснований и *in vitro* исследования отобранных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка модели белка

Стартовая модель ПАРП-1 построена на основе кристаллической структуры комплекса ПАРП с ингибитором 1efy [33] с помощью пакета программ AmberTools 1.2 (<http://ambermd.org>). К структуре белка добавляли атомы водорода, после чего помещали ее в ячейку воды типа TIP3P (минимальная толщина слоя молекул воды – 12 Å). Для нейтрализации заряда системы добавляли ионы хлора. Для минимизации энергии полученной модели молекулу белка описывали силовым полем *ff99SB* [34], а ингибитор – автоматически рассчитанными параметрами *GAFF* [35]. Минимизацию энергии (2500 шагов по методу наискорейшего спуска, затем 2500 шагов по методу сопряженных градиентов) проводили с помощью пакета программ Amber 10 [36] для оптимизации позиции атомов водорода. В ходе минимизации тяжелые атомы белка и ингибитора фиксировали позиционными ограничениями $k(\Delta x)^2$, где силовая постоянная k была равна 2 ккал/(моль × Å²). Ингибитор, молекулы воды и ионы хлора удаляли из оптимизированной системы, чтобы получить модель для проведения молекулярного докинга.

Молекулярный докинг

Компьютерную библиотеку производных природных азотистых оснований подготовили с использованием программы ACD/ChemSketch [37].

Молекулярный докинг проводили с помощью программы Lead Finder 1.1.14 [38]. Рассчитывали карту потенциала взаимодействия в активном центре модели ПАРП-1 (потенциальную решетку) и осуществляли скрининг библиотеки при помощи генетического алгоритма поиска. Проводили 20 независимых запусков докинга для каждого соединения, после чего вероятность успешного докирования P_{dock} определяли как отношение числа запусков с успешным результатом (удовлетворяющим заданному структурному критерию) к общему числу запусков, т.е. $P_{\text{dock}} = N_{\text{усп}}/20$. Структурным критерием было наличие двух водородных связей между лактамной группой докированного соединения и остатком Gly863. Соединения с $P_{\text{dock}} \leq 0.8$ автоматически исключали с помощью Perl-скрипта.

Молекулярно-динамическая симуляция

Чтобы включить молекулу отобранного ингибитора в систему для симуляции, его параметры, за исключением частичных зарядов, брали из силового поля *ff99SB*. С целью определения зарядов рассчитывали молекулярный электростатический потенциал ингибитора на HF/6-31G* уровне теории с помощью программы PC GAMESS/Firefly [39]. Подбор частичных атомных зарядов осуществляли с помощью метода RESP [40]. Уравновешивание и последующую симуляцию молекулярной динамики (МД) ПАРП-1 в комплексе с ингибитором проводили с использованием AmberTools 1.2 и Amber 10. Модель комплекса, полученную молекулярным докингом, окружали 12 Å-слоем воды TIP3P и описывали силовым полем *ff99SB*. Для релаксации сольватированной системы проводили минимизацию энергии методами наискорейшего спуска и сопряженных градиентов. Затем систему разогревали от 0 до 300 К в течение 50 пс и уравновешивали при 300 К в течение 500 пс. Наконец, рассчитывали траекторию равновесной симуляции (10 нс) при постоянном давлении. Все симуляции осуществляли с использованием периодических граничных условий и метода PME (Particle Mesh Ewald) для учета дальнедействующих электростатических взаимодействий.

Программу VMD 1.8.6 [41] использовали для визуализации структур. Параллельные вычисления МД-траектории проводили на суперкомпьютере МГУ [42].

Синтез соединений

7-Метилгуанин, 7-метилксантин, 7-метилгипоксантин, 7-этилгуанин получали путем алкилирования соответствующих нуклеозидов с последующим расщеплением N-гликозидной связи согласно ранее описанным методикам [43, 44].

7-Метилгуанин. 400 МГц ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6): $\delta = 3.82$ (s, 3H, Me), 6.03 (brs, 2H, NH_2), 7.81 (s, 1H, H-8), 10.66 (brs, 1H, NH).

7-Метилксантин. 400 МГц ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6): $\delta = 3.81$ (s, 3H, Me), 7.85 (s, 1H, H-8), 10.79 (brs, 1H, NH), 11.48 (brs, 1H, NH).

7-Метилгипоксантин. 400 МГц ^1H -ЯМР ($\text{CDCl}_3 - \text{CD}_3\text{OD}$): $\delta = 3.94$ (s, 3H, Me), 7.80 (s, 1H, H-2), 7.84 (s, 1H, H-8).

7-Этилгуанин. 400 МГц ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6): $\delta = 1.36$ (t, 3H, J = 7.2 Гц, CH_3), 4.19 (q, 2H, Me, J = 7.2 Гц, CH_2), 6.09 (brs, 2H, NH_2), 7.90 (s, 1H, H-8), 10.26 (brs, 1H, NH).

Измерение ферментативной активности

Рекомбинантные белки ПАРП-1 человека и ПАРП-2 мыши очищали по описанной ранее методике [45, 46]. Реакцию поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемую ПАРП-1 и ПАРП-2, проводили в оптимальных для каждого фермента условиях [47, 48]. Кратко, для ПАРП-1: 50 мМ трис-НСl pH 8.0, 20 мМ MgCl_2 , 150 мМ NaCl, 7 мМ β -меркаптоэтанол, активированная ДНК (2 о.е. $_{280}$ /мл, степень активации 25%), 300 мкМ NAD^+ (0.18 мкКи [^3H] NAD^+), 37°C. Реакцию запускали добавлением ПАРП-1 до конечной концентрации 0.2 мкМ и останавливали через 1 мин, нанося реакционную смесь на бумажные фильтры (Whatman-1), пропитанные 5% раствором трихлоруксусной кислоты. Для ПАРП-2: 50 мМ трис-НСl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 0.1 мг/мл БСА, 8 мМ MgCl_2 , 1 мМ ДТТ, активированная ДНК (2 о.е. $_{280}$ /мл, степень активации 25%), 400 мкМ NAD^+ (0.4 мкКи [^3H] NAD^+), 37°C. Реакцию запускали добавлением ПАРП-2 до конечной концентрации 0.2 мкМ и останавливали через 5 мин, нанося реакционную смесь на бумажные фильтры. Фильтры отмывали 4 раза в 5% трихлоруксусной кислоте, затем в 90% этаноле (для удаления кислоты) и сушили на воздухе. Количество радиоактивной метки, включенной в кислотонерастворимый продукт, регистрировали на сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 2800 (Perkin Elmer) в толуоловом сцинтилляторе. Определение количества радиоактивно меченного продукта проводили на начальном участке зависимости скорости реакции от времени.

ПАРП-ингибирующую активность синтезированных соединений оценивали в реакции поли(ADP-рибозил)ирования при концентрации NAD^+ 0.3 мМ в случае ПАРП-1 и 0.4 мМ в случае ПАРП-2. Различные количества тестируемых соединений добавляли в реакционную смесь перед добавлением фермента. Реакцию и детекцию продуктов проводили как описано выше. Для определения значения IC_{50} (концентрация соединения, при которой активность фермента снижена на 50%) изучали влияние различ-

ных концентраций ингибитора на ферментативную активность. Измерения проводили по меньшей мере в двух независимых экспериментах. Значения IC_{50} рассчитывали методом нелинейного регрессионного анализа с помощью Origin Pro 8.0.

Измерение цитотоксичности

Цитотоксическую активность 7-метилгуанина, цисплатина, доксорубина и их комбинаций оценивали путем анализа клеточного цикла и измерения популяции Sub-G1 методом проточной цитометрии, а также измерения активности каспазы-3 как маркера активации апоптоза. BRCA1-дефицитную линию клеток рака молочной железы человека HCC1937 культивировали в DMEM с добавлением 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина/стрептомицина (100 ед./мл) и пирувата (0.11 мг/мл) при 37°C в увлажненной атмосфере O_2 (20%). Во всех опытах клетки находились в состоянии логарифмического роста. Через 24 ч после рассеивания клетки обрабатывали 7-метилгуанином (150 мкМ) с последующим добавлением цисплатина (70 мкМ) или доксорубина (1 мкМ) через 3 ч.

Для анализа клеточного цикла клетки собирали через 72 ч, фиксировали в 70% этаноле (конечная концентрация) в течение 60 мин на льду, промывали в фосфатном буфере и окрашивали в 500 мкл раствора, содержащего йодид пропидия (50 мкг/мл) и RNКазу А (25 мкг/мл) в течение 15 мин. Данные получали с помощью проточного цитометра BD FACS CantoII (BD Biosciences) и анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva. Расщепление флуорогенного пептидного субстрата Ac-DNLDAAC оценивали после 48 ч инкубации с цитотоксическими агентами. Клетки собирали, промывали фосфатным буфером, центрифугировали и ресуспендировали в фосфатном буфере в концентрации 2×10^6 клеток/100 мкл. Затем 35 мкл суспензии добавляли в ячейки 96-луночного планшета и смешивали с пептидным субстратом, растворенным в стандартном реакционном буфере (100 мМ HEPES, 10% сахарозы, 5 мМ ДТТ, 0.001% NP-40 и 0.1% CHAPS, pH 7.2). Расщепление субстрата измеряли по высвобождению кумаринового флуорофора на мультиридере VarioScan Flash (Thermo Scientific) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 460 нм. Измерения проводили по меньшей мере в двух независимых экспериментах.

Моделирование фармакокинетики и токсичности

Фармакокинетический и токсикологический профили 7-метилгуанина рассчитывали с помощью программы ACD/Percepta [49], которая позволяет предсказать *in silico* ADME-свойства (всасывание,

распределение, метаболизм, выведение) и токсичность с использованием QSAR-моделей, основанных на анализе похожих соединений из библиотеки экспериментальных данных. В случае 7-метилгуанина среди библиотечных соединений были ацикловир, кофеин, теобромин, теofilлин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Компьютерный скрининг

Модель ПАРП-1, наиболее изученного представителя семейства ПАРП, построили на основе кристаллографической структуры каталитического фрагмента в комплексе с ингибитором (PDB ID 1efy, разрешение 2.2 Å). Положение боковых цепей аминокислотных остатков оптимизировали, учитывая их ионизацию. Компьютерная библиотека производных природных азотистых оснований включала около 100 различных производных пурина и пиримидина, содержащих лактамную группу, с учетом возможности их препаративного синтеза. С помощью молекулярного докинга проведен компьютерный скрининг производных, способных связываться в активном центре ПАРП-1. Для более полного исследования конформационного пространства осуществляли серию независимых запусков докинга каждого соединения библиотеки и использовали процедуру структурной фильтрации, которая позволяет отсеивать ложноположительные результаты докинга [47]. Как отмечено ранее, субстрат и известные ингибиторы ПАРП имеют общую структурную особенность: их амидная (или лактамная) группа образует две водородные связи с остатком Gly863. Данное взаимодействие, необходимое для эффективного связывания в активном центре ПАРП, было учтено в качестве критерия для структурной фильтрации. Наряду с этим при отборе потенциальных ингибиторов учитывали формирование благоприятных гидрофобных контактов и электростатических взаимодействий ингибитора в активном центре ПАРП-1. Компьютерный скрининг показал, что наиболее перспективным ингибитором ПАРП среди исследованных производных пурина и пиримидина является 7-метилгуанин ($P_{\text{dock}} = 0.95$, $\Delta G^{\text{calc}} = -6.8$ ккал/моль).

Определение геометрических характеристик 7-метилгуанина в активном центре ПАРП-1 и проверку устойчивости фермент-ингибиторного комплекса проводили при помощи МД. Образование двух водородных связей между лактамной группой 7-метилгуанина и остатком Gly863, а также π -стэкинг пуриновых колец с боковой цепью Tyr907 и гидрофобное взаимодействие метильной группы в положении 7 с боковой цепью Ala898 наблюдали по всей МД-траектории (рис. 1). Обнаружено также

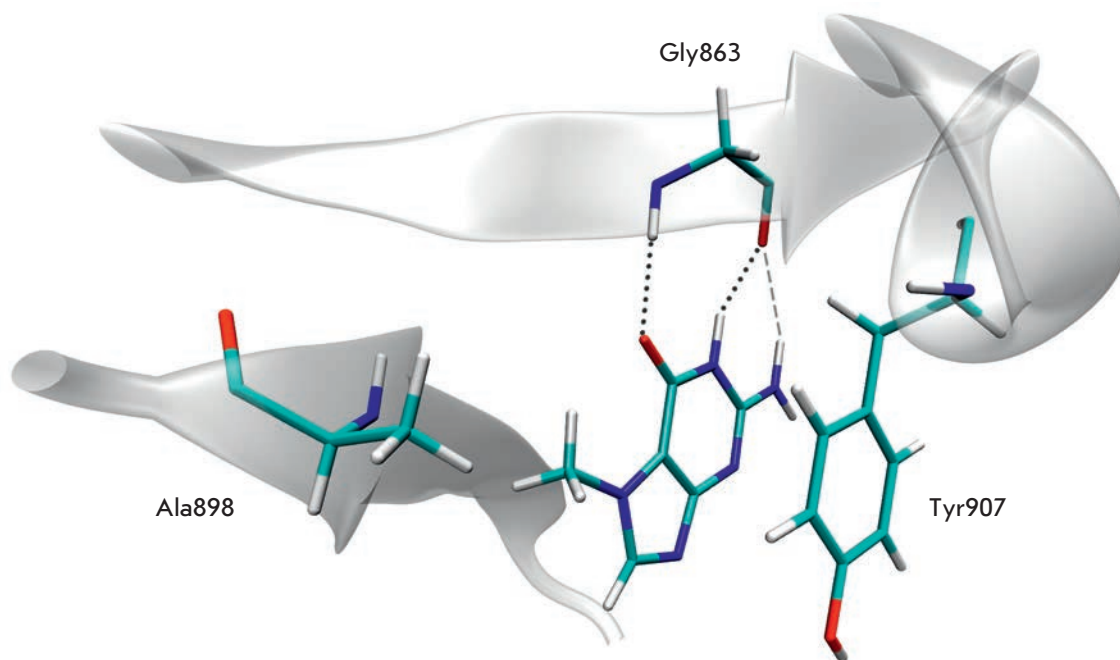


Рис. 1. Позиция молекулы 7-метилгуанина в активном центре ПАРП-1 и характерные взаимодействия, выявленные с помощью молекулярного моделирования: две водородные связи лактамной группы с Gly863 (показаны пунктирными линиями), электростатическое взаимодействие аминогруппы (показано штриховой линией), π -стэкинг пуриновых колец с Tyr907, гидрофобный контакт метильной группы с Ala898

электростатическое взаимодействие между аминогруппой 7-метилгуанина в положении 2 и кислородом остова Gly263, не являющееся обычной водородной связью. Среднее расстояние $\text{NH}_2:\text{H}\cdots\text{Gly863}:\text{O}$ было равно 2.42 Å, средний угол $\text{NH}_2:\text{N}\cdots\text{NH}_2:\text{H}\cdots\text{Gly863}:\text{O}$ – 137°, в то время как характерная длина водородной связи составляет 1.8–2.1 Å, а угол – не менее 150°. Характеристики положения 7-метилгуанина в активном центре ПАРП-1 представлены в табл. 1.

Интересно, что ранее была показана умеренная ингибирующая активность в отношении ПАРП-1 структурного аналога 7-метилксантина [32], который отличается от 7-метилгуанина оксогруппой в положении 2 (рис. 2). При проведении нами компьютерного скрининга 7-метилксантин был исключен на стадии структурной фильтрации ($P_{\text{dock}} = 0.45$), что указывало на его менее эффективное связывание. При моделировании взаимодействия фермента с 7-метилгипоксантином, структурным аналогом без заместителя в положении 2, предсказанные параметры связывания ($P_{\text{dock}} = 0.85$, $\Delta G^{\text{calc}} = -6.4$ ккал/моль) также были менее благоприятными. Анализ структуры комплексов ПАРП-1 с 7-метилгуанином и его структурными аналогами показал, что наличие аминогруппы в положении 2 существенно увеличивает эффективность связывания ингибитора в активном центре за счет электростатического вза-

Таблица 1. Дистанционные и угловые характеристики позиции 7-метилгуанина (7-MG) в активном центре ПАРП-1, определенные с помощью МД-симуляции. Средние значения приведены вместе со стандартным отклонением

Расстояние, Å	
7-MG:CO:O \cdots Gly863:H	2.0 \pm 0.2
7-MG:NH:H \cdots Gly863:O	1.9 \pm 0.1
7-MG:NH ₂ :H \cdots Gly863:O	2.4 \pm 0.4
7-MG:CH ₃ :C \cdots Ala898:CB	4.0 \pm 0.3
C(7-MG конд. кольца) \cdots C(Tyr907 бенз. кольцо)*	3.6 \pm 0.2
Угол, град	
7-MG:CO:O \cdots Gly863:H \cdots Gly863:N	160 \pm 11
7-MG:NH:N \cdots 7-MG:NH:H \cdots Gly863:O	159 \pm 9
7-MG:NH ₂ :N \cdots 7-MG:NH:H \cdots Gly863:O	137 \pm 10

*Расстояние между геометрическим центром конденсированных колец 7-метилгуанина и центром бензольного кольца Tyr907.

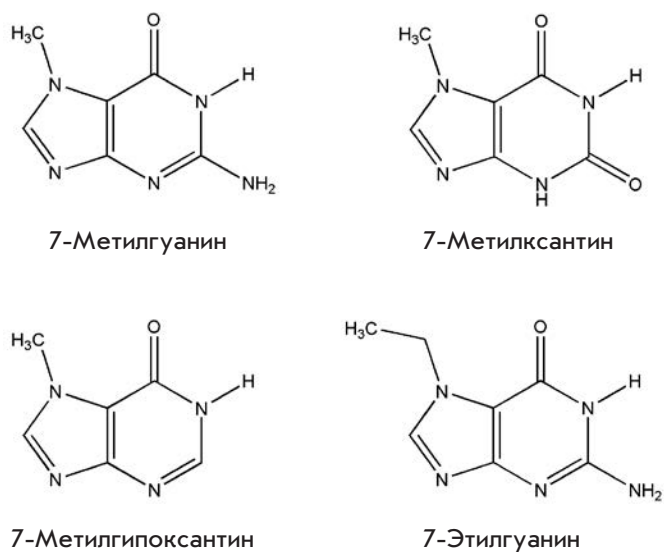


Рис. 2. Химические структуры синтезированных и протестированных соединений

Таблица 2. Ингибирующий эффект 7-метилгуанина и родственных соединений в отношении ПАРП-1 и ПАРП-2

Соединение	IC ₅₀ , мкМ	
	ПАРП-1	ПАРП-2
7-Метилгуанин	150	50
7-Метилксантин	800	160
7-Метилгипоксантин	780	620
7-Этилгуанин	230	90

имодействия с Glu863. Другим заместителем, обеспечивающим комплементарность к активному центру ПАРП-1, является метильная группа в положении 7, что подтверждает отсутствие ингибирующих свойств у немодифицированных ксантинов [32]. Следует отметить, что ингибирующий эффект не увеличивается при дальнейшем наращивании алкильной цепи в этом положении, о чем свидетельствуют расчетные параметры связывания 7-этилгуанина ($P_{dock} = 0.7$, $\Delta G^{calc} = -6.7$ ккал/моль).

Ингибирующие свойства пуриновых производных

Мы синтезировали 7-метилгуанин, 7-метилксантин, 7-метилгипоксантин и 7-этилгуанин, чтобы протестировать их способность подавлять ПАРП и оценить влияние заместителей на активность ингибитора. Ингибирующие свойства 7-метилгуанина и родственных соединений изучали с использованием двух очи-

щенных белков семейства ПАРП – ПАРП-1 человека и ПАРП-2 мыши. Представленные в табл. 2 экспериментальные данные показывают, что 7-метилгуанин действительно является наиболее эффективным ингибитором ПАРП-1 и ПАРП-2 со значениями IC₅₀ 150 и 50 мкМ. Замена 2-оксогруппы 7-метилксантина на аминогруппу приводит к пяти- и трехкратному увеличению способности ингибировать ПАРП-1 и ПАРП-2 соответственно. 7-Метилгуанин оказался эффективнее 7-этилгуанина, что свидетельствует об ограниченности участка связывания алкильного заместителя. Важно отметить, что все тестируемые пуриновые производные оказались более эффективными ингибиторами ПАРП-2, несмотря на очень похожую организацию участков связывания в ПАРП-1 и ПАРП-2. Можно предположить, что наблюдаемая селективность обусловлена различными траекториями доставки ингибитора в активный центр белков ПАРП.

Анализ цитотоксичности

Цитотоксичность традиционных противоопухолевых средств – цисплатина и доксорубина, а также 7-метилгуанина, анализировали на линии клеток рака молочной железы человека HCC1937, которая считается чувствительной к ингибированию ПАРП из-за дефекта гена репарации ДНК BRCA1 [22, 50, 51]. Индуцированную препаратами гибель клеток оценивали по популяции Sub-G1 (соответствует популяции апоптотических клеток с фрагментированной ДНК) на проточном цитометре (рис. 3). Обработка клеток 7-метилгуанином сама по себе не привела к увеличению числа клеток в фазе Sub-G1, которое составило около 2% (сопоставимо с контролем). Однако сравнение уровня клеточной гибели показало, что 7-метилгуанин сенсibiliзирует HCC1937 к действию цисплатина и доксорубина. При обработке клеток комбинацией 7-метилгуанина (150 мкМ) и цисплатина (70 мкМ) популяция клеток в фазе Sub-G1 увеличилась с 34 до 43%, а добавление 7-метилгуанина (150 мкМ) к доксорубину (1 мкМ) увеличило популяцию Sub-G1 с 32 до 42%. Таким образом, изменение уровня клеточной гибели при добавлении 7-метилгуанина происходит схожим образом в случае цисплатина и доксорубина.

Мы проанализировали также активацию каспазы-3 в клетках HCC1937, важного и обязательного события в программе апоптоза. Активная каспаза-3 расщепляет различные молекулы в клетке, что приводит к появлению апоптотической морфологии. Степень активации, измеренная по расщеплению специфического флуорогенного субстрата, коррелировала с уровнем клеточной гибели. Из рис. 4 видно, что активность каспазы-3 увеличивалась

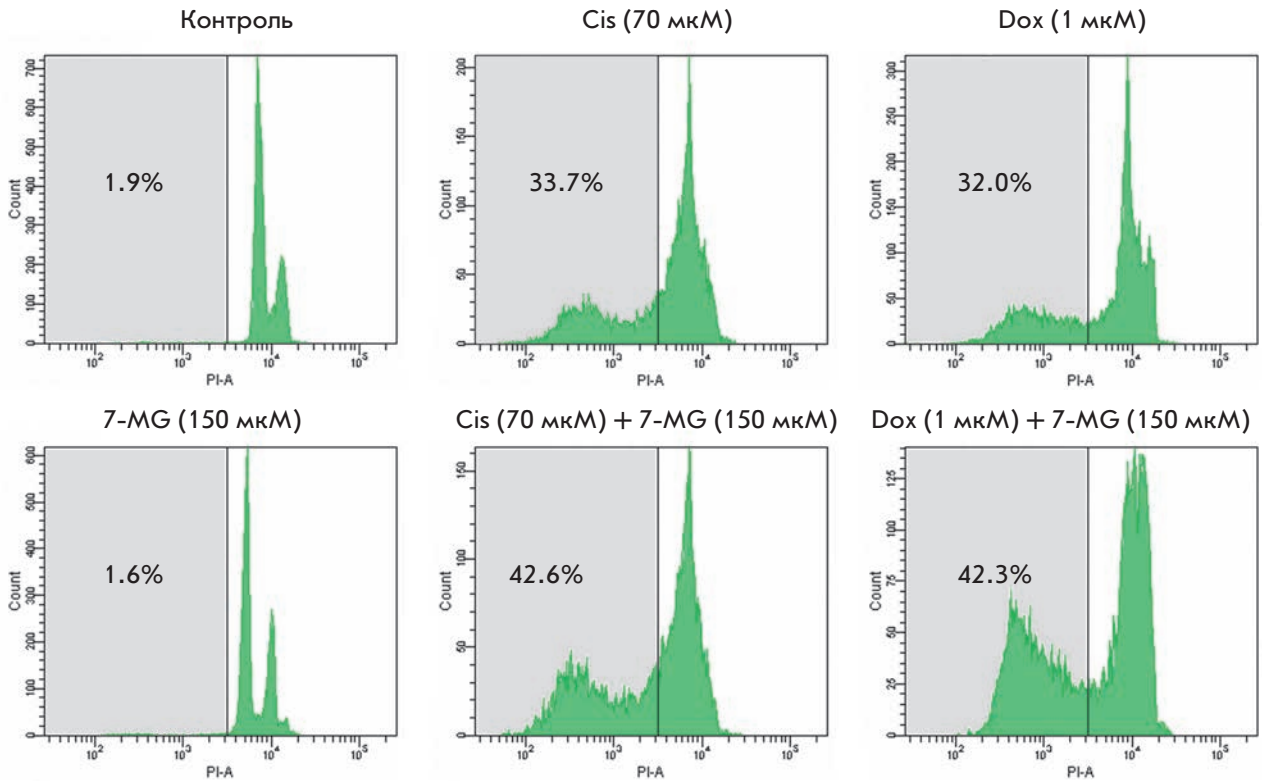


Рис. 3. Оценка популяции Sub-G1 клеток HCC1937, подвергнутых воздействию цисплатина (Cis), доксорубина (Dox) и 7-метилгуанина (7-MG) в виде монопрепарата и при их комбинации в течение 72 ч. Область популяции Sub-G1 показана серым цветом

при добавлении 7-метилгуанина к цисплатину и доксорубину на 27–39%, однако сам 7-метилгуанин не стимулировал каспазную активность. Эти данные согласуются с уровнем клеточной гибели, определенным методом проточной цитометрии.

Профиль фармакокинетики и токсичности

В заключение мы оценили фармакокинетические свойства и токсикологический профиль 7-метилгуанина при помощи QSAR-моделирования на основе опубликованных данных его структурных аналогов (ацикловир, кофеин, теобромин, теофиллин). Так, абсорбция в кишечнике человека оценивается как очень высокая, а биодоступность при пероральном введении – близка к оптимальной (83%). Расчетная доля 7-метилгуанина, связанного с белками плазмы, составляет 17%, что не должно существенно влиять на его эффективность. Маловероятно связывание 7-метилгуанина с рецептором эстрогена альфа (нет риска репродуктивной токсичности), калиевым каналом hERG (нет риска кардиотоксичности), обратным транспортером Р-гликопротеином и ферментами семейства цитохрома P450 (CYP3A4,

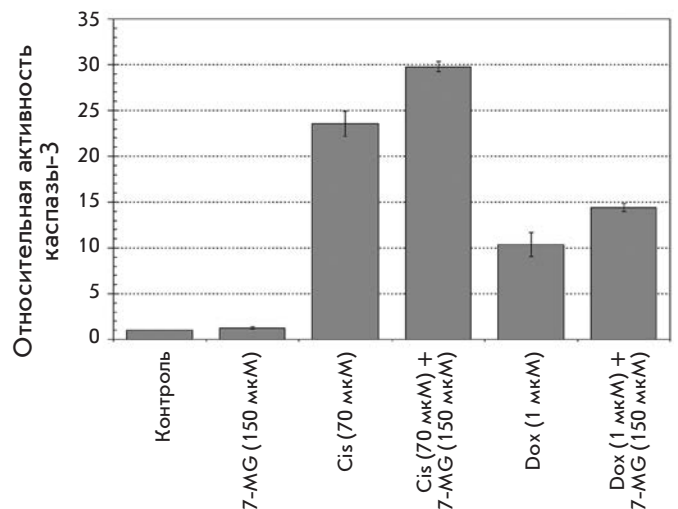


Рис. 4. Увеличение активности каспазы-3 (относительно контроля) в клетках HCC1937, подвергнутых действию цисплатина (Cis), доксорубина (Dox) и 7-метилгуанина (7-MG) в виде монопрепарата и при их комбинации в течение 48 ч

СУР2D6, СУР2С9, СУР2С19, СУР1А2). Таким образом, предсказанные свойства свидетельствуют об эффективности и безопасности 7-метилгуанина для человека.

ВЫВОДЫ

Несмотря на способность повреждающих ДНК лекарственных средств убивать опухолевые клетки, токсичность этих средств и устойчивость клеток к химиотерапии остаются серьезной проблемой. Системы репарации ДНК, включающие ПАРП-1 и ПАРП-2, важны для нормального развития организма, однако в случае использования ДНК-повреждающих средств эти белки могут уменьшать терапевтический эффект. Метаболит нуклеиновых кислот 7-метилгуанин выявлен *in silico* в качестве нового ингибитора каталитической активности ПАРП и исследован экспериментально. Показано, что важное условие эффективного связывания пуриновых производных – наличие аминогруппы в положении 2 и метильной группы в положении 7. В ПАРП-ингибирующей концентрации 7-метилгуанин не токсичен, однако способен увеличивать

чувствительность ВРСА1-дефицитных клеток рака молочной железы к распространенным химиотерапевтическим средствам (цисплатину и доксорубину). 7-Метилгуанин является метаболитом нуклеиновых кислот, содержится в плазме крови человека и выводится с мочой [52]. Хотя 7-метилгуанин уступает по ингибирующей активности олапарибу и некоторым другим известным ингибиторам ПАРП, можно ожидать, что это природное соединение будет иметь более выгодный фармакокинетический и токсикологический профили по сравнению с синтетическими ингибиторами и будет рассматриваться в качестве нового перспективного компонента противоопухолевой терапии. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки России (соглашение № 14.604.21.0018, ID RFMEFI60414X0018). Химический синтез пуринов выполнен при поддержке РФФИ (грант № 14-04-00835_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cline S.D., Hanawalt P.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. V. 4. P. 361–373.
- Drenichev M.S., Mikhailov S.N. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2015. V. 34. P. 258–276.
- Lautier D., Lagueux J., Thibodeau J., Ménard L., Poirier G.G. // *Mol. Cell. Biochem.* 1993. V. 122. P. 171–193.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.-C., de Murcia G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. P. 517–528.
- Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006. V. 70. P. 789–829.
- Hassler M., Ladurner A.G. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2012. V. 22. P. 721–729.
- Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 3563–3571.
- Ryu K.W., Kim D.-S., Kraus W.L. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. P. 2453–2481.
- Cazzalini O., Donà F., Savio M., Tillhon M., Maccario C., Perucca P., Stivala L.A., Scovassi A.I., Prosperi E. // *DNA Repair (Amst.)* 2010. V. 9. P. 627–635.
- Ménissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., et al. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 2255–2263.
- Ruf A., Menissier de Murcia J., de Murcia G., Schulz G.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 7481–7485.
- Karlberg T., Hammarström M., Schütz P., Svensson L., Schüler H. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 1056–1058.
- Ruf A., de Murcia G., Schulz G.E. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 3893–3900.
- Banasik M., Komura H., Shimoyama M., Ueda K. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 1569–1575.
- Jagtap P., Szabó C. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005. V. 4. P. 421–440.
- Ferraris D.V. // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. P. 4561–4584.
- Ekblad T., Camaioni E., Schüler H., Macchiarulo A. // *FEBS J.* 2013. V. 280. P. 3563–3575.
- Efremova A.S., Zakharenko A.L., Shram S.I., Kulikova I.V., Drenichev M.S., Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Myasoedov N.F., Lavrik O.I., Mikhailov S.N. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2013. V. 32. P. 510–528.
- Ekblad T., Lindgren A.E.G., Andersson C.D., Caraballo R., Thorsell A.-G., Karlberg T., Spjut S., Linusson A., Schüler H., Elofsson M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. V. 95. P. 546–551.
- Kirsanov K.I., Kotova E., Makhov P., Golovine K., Lesovaya E.A., Kolenko V.M., Yakubovskaya M.G., Tulin A.V. // *Oncotarget.* 2014. V. 5. P. 428–437.
- Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Soto M., Pérez J.M. // *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2006. V. 1. P. 39–53.
- Martin S.A., Lord C.J., Ashworth A. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2008. V. 18. P. 80–86.
- Brock W.A., Milas L., Bergh S., Lo R., Szabó C., Mason K.A. // *Cancer Lett.* 2004. V. 205. P. 155–160.
- Curtin N.J., Szabo C. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. P. 1217–1256.
- Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N.J., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., et al. // *Nature.* 2005. V. 434. P. 917–921.
- Boerner J.L., Nechiporchik N., Mueller K.L., Polin L., Heilbrun L., Boerner S.A., Zoratti G.L., Stark K., LoRusso P.M., Burger A. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0119614.
- Milam K.M., Cleaver J.E. // *Science.* 1984. V. 223. P. 589–591.
- Mateo J., Ong M., Tan D.S.P., Gonzalez M.A., de Bono J.S. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013. V. 10. P. 688–696.
- Madison D.L., Stauffer D., Lundblad J.R. // *DNA Repair (Amst.)* 2011. V. 10. P. 1003–1013.
- Frampton J.E. // *BioDrugs.* 2015. V. 29. P. 143–150.

31. Virág L., Szabó C. // *FASEB J.* 2001. V. 15. P. 99–107.
32. Geraets L., Moonen H.J.J., Wouters E.F.M., Bast A., Hageman G.J. // *Biochem. Pharmacol.* 2006. V. 72. P. 902–910.
33. White A.W., Almasy R., Calvert A.H., Curtin N.J., Griffin R.J., Hostomsky Z., Maegley K., Newell D.R., Srinivasan S., Golding B.T. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. P. 4084–4097.
34. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. // *Proteins.* 2006. V. 65. P. 712–725.
35. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. P. 1157–1174.
36. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., III, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Walker R.C., Zhang W., et al. // *AMBER 10.* University of California, San Francisco. 2008.
37. ACD/ChemSketch Freeware, version 8.17. Advanced Chemistry Development, Inc., <http://www.acdlabs.com>. 2005.
38. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Chem. Inf. Model.* 2008. V. 48. P. 2371–2385.
39. Granovsky A.A. Firefly, version 7.1.F, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>. 2009.
40. Bayly C.L., Cieplak P., Cornell W.D., Kollman P.A. // *J. Phys. Chem.* 1993. V. 97. P. 10269–10280.
41. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33–38.
42. Воеводин Вад.В., Жуматий С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин В.В. // *Открытые системы.* 2012. Т. 7. С. 36–39.
43. Jones J.W., Robins R.K. // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. V. 85. P. 193–201.
44. Vidal A., Giraud I., Madelmont J.-C. // *Synth. Commun.* 2004. V. 34. P. 3359–3365.
45. Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // *Биохимия.* 2004. Т. 69. С. 686–698.
46. Amé J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 17860–17868.
47. Захаренко А.Л., Суханова М.В., Ходырева С.Н., Новиков Ф.Н., Стройлов В.С., Нилов Д.К., Чилов Г.Г., Швядас В.К., Лаврик О.И. // *Молекуляр. биология.* 2011. Т. 45. С. 565–569.
48. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Amé J.-C., Ilna E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. // *Biochimie.* 2013. V. 95. P. 1208–1215.
49. ACD/Percepta. Advanced Chemistry Development, Inc., <http://www.acdlabs.com>. 2012.
50. Benafif S., Hall M. // *Onco Targets Ther.* 2015. V. 8. P. 519–528.
51. Helleday T. // *Mol. Oncol.* 2011. V. 5. P. 387–393.
52. Topp H., Sander G., Heller-Schöch G., Schöch G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 161. P. 49–56.