

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ НА АКТИВАЦИЮ БЕЛКА PARP1

¹Набережнов Д.С., ^{1,2}Глазунов В.Ю., ¹Лесовая Е.А., ¹Белицкий Г.А., ¹Якубовская М.Г.,
¹Кирсанов К.И.

¹Отдел химического канцерогенеза Института канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, e-mail: nds.xvii@gmail.com;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

Поли(АДФ-рибоза)-полимераза I (PARP1) является одним из наиболее экспрессируемых ядерных белков клетки, который распознает повреждения ДНК и активирует процессы их репарации. Ингибирование этого белка рассматривается как перспективный подход для таргетной терапии опухолей, дефектных по системе репарации ДНК, а также для повышения эффективности противоопухолевой терапии генотоксическими агентами. В то же время клинические данные свидетельствуют о наличии у ингибиторов PARP1 нежелательных побочных эффектов. Ранее нами была выявлена способность узкобороздочных лигандов ДНК (УБЛ) ингибировать ДНК-зависимый путь активации PARP1. Большинство этих соединений нековалентно связываются с ДНК за счет образования водородных и Ван-дер-Ваальсовых связей в узкой бороздке, влияя на функционирование соответствующих белков метаболизма ДНК. Изучение закономерностей ингибирования активации PARP1 с помощью УБЛ представляется актуальным вопросом современной экспериментальной онкологии. В представленном исследовании при использовании оптимизированного протокола проведения реакции поли-АДФ-рибозилирования было продемонстрировано, что среди исследованных УБЛ наибольшей способностью ингибировать ДНК-зависимую активацию PARP1 обладают DAPI, Diminazene и Hoechst 33258, а их концентрации полумаксимального ингибирования реакции (IC50) составили 0,062, 0,133 и 13,2 мкМ соответственно. Было установлено, что наличие одноцепочечного разрыва в гантелеобразном дуплексе ДНК увеличивает его способность активировать реакцию поли(АДФ)-рибозилирования более чем в 2 раза. При этом наличие АТ-богатого региона в последовательности гантелеобразного ДНК-дуплекса значительно увеличивает ингибирующую способность Diminazene. Данное исследование является экспериментальным обоснованием целесообразности проведения доклинических испытаний по использованию Diminazene в комбинированной химиотерапии опухолей.

Ключевые слова: узкобороздочные лиганды, поли(АДФ)-рибозилирование, активация PARP1, хехст, диминозен, одноцепочечные разрывы ДНК, гантелеобразные дуплексы ДНК, комбинированная противоопухолевая терапия.

INFLUENCE OF MINOR GROOVE BINDING LIGANDS ON PARP1 ACTIVATION: COMPARATIVE ANALYSIS

¹Naberezhnov D.S., ²Glazunov V.Ju., ¹Lesovaya E.A., ¹Belitsky G.A., ¹Yakubovskaya M.G.,
¹Kirsanov K.I.

¹Department of Chemical Carcinogenesis Institute of Carcinogenesis of Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, e-mail: nds.xvii@gmail.com;

²Moscow State University, Moscow

Poly[ADP-ribose]polymerase I is one of the most abundant nuclear proteins which recognize DNA damage and plays a pivotal role in its repair. Inhibition of PARP I is a promising strategy for targeting treatment of cancers with defective DNA-damage repair and in potentiating anticancer drug effectiveness. However, a number of clinical studies have reported side effects of PARP1 inhibitors. It is related to the fact that all of these drugs were designed to compete with NAD, one of the most common cofactors involved in many eukaryotic pathways. Previously we demonstrated that minor groove binding ligands (MGBLs) specifically target PARP-1 interaction with DNA, and, hence, the DNA-dependent pathway of PARP-1 activation. These small molecules non-covalent bind DNA via hydrogen and Van der Waals' bonds and can influence DNA-mediated enzymes. In this study by means of optimized protocol of in vitro PARP1 inhibitory assay among MGBLs the strongest inhibitory effect was observed for DAPI, Diminazene and Hoechst33358 (the half maximal inhibitory concentrations (IC50) were 0,062 mkM, 0,133 mkM и 13,2 mkM respectively). Moreover, we estimated that nick in double-hairpin DNA substrate enhanced PARP1 automodification activity more than twofold and demonstrated that the presence of AT-reach DNA region in double-hairpin intensify DNA-dependent PARP1 inhibition by Diminazene. This study

results lay the groundwork for the preclinical trials of Diminazene in combination with cytotoxic chemotherapies.

Keywords: Minor groove binding ligands, poly(ADP)ribosylation, PARP1 activation, Hoechst, Diminazene, DNA single-strand breaks, dumbbell shape DNA duplex, combine antitumor polychemotherapy.

Узкобороздочные лиганды (УБЛ) представляют собой довольно большой класс агентов различной химической природы, для которых общим свойством является способность формировать комплексы с ДНК по малой бороздке за счет водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий без образования ковалентной связи [6; 9; 10]. В результате выявления их способности флуоресцировать после образования комплекса с ДНК и РНК эти соединения получили широкое распространение в молекулярной клинической диагностике, экспериментальной онкологии, молекулярно-биологических и цитогенетических исследованиях в качестве реагента для визуализации нуклеиновых кислот [4; 12]. Ряд соединений этой группы используется в медицинской практике в качестве антипаразитарных и антисептических средств [7; 11]. Применительно к онкологической практике изучение УБЛ представляет как теоретический, так и практический интерес в связи с широким спектром их биологического действия, имеющего как про-, так и антиканцерогенную направленность [2; 8]. Эти соединения обладают широким спектром индивидуальной активности, по-разному влияя на функционирование ферментов метаболизма ДНК. Ранее нами было показано, что узкобороздочные лиганды (УБЛ) способны ингибировать активацию поли-(АФД)-рибозы полимеразы I [5]. Мы также продемонстрировали, что УБЛ специфически действуют на ДНК-зависимую активацию PARP1, разобщая связь фермента с ДНК-активатором по конкурентному механизму. Эти исследования свидетельствовали о необходимости дальнейшего исследования возможности использования УБЛ в качестве ингибиторов PARP1.

Цель исследования – проведение сравнительного анализа влияния ряда УБЛ по их способности ингибировать активацию PARP1 в модельной системе *in vitro*. Соответственно, конкретными задачами исследования явилась оптимизация реконструированной *in vitro* системы поли-(АДФ)-рибозилирования с использованием гантелеобразных дуплексов ДНК [1] различной структуры, замкнутых и имеющих одноцепочечные разрывы; выявление наиболее активных ингибиторов активации фермента PARP1 и определения для них концентрации полумаксимального ингибирования; оценка влияния введения в гантелеобразный дуплекс ДНК АТ-богатой восьмизвенной последовательности при ее различной локализации относительно одноцепочечного разрыва.

Материалы и методы. Для проведения реакции поли(АДФ)рибозилирования реакционную смесь, содержащую белок PARP1 (R&D Systems, Inc., США), PARP 1 buffer (R&D Systems, Inc., США), субстрат фермента – никотинамидадениндинуклеотид (NAD)

(Sigma-Aldrich, США) и ДНК-активатор инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. При оптимизации реакции поли(АДФ)рибозилирования в качестве ДНК-активатора использовали 44-звенный олигонуклеотида Bb (harpin formed by 44 bases, with the break), содержащий две взаимно комплементарных области, которые способны образовывать двухцепочечную молекулу ДНК, содержащую 18 пар оснований (рис. 1).

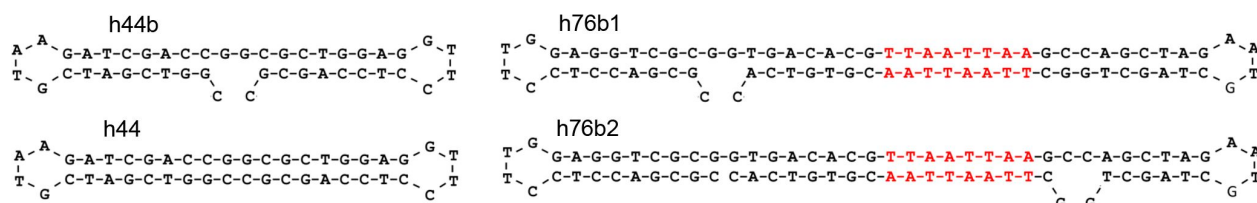


Рис. 1. Гантелеобразные дуплексы ДНК, использованные в качестве активатора PARP1

Конструкции такого дизайна уже применялись ранее при изучении особенностей связывания PARP1 с ДНК [3]. Для обеспечения максимального сходства предложенной модели с реальными интермедиатами, встречающимися при репарации повреждений ДНК, последовательность олигонуклеотида, используемого для формирования гантелеобразного дуплекса, содержала на 5'-конце фосфатную группу. Для получения замкнутого гантелеобразного дуплекса ДНК проводили лигирование концов олигонуклеотида с использованием лигазы фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США). Эксперименты по изучению влияния присутствия в ДНК-активаторе АТ-богатого участка, который был расположен на различном расстоянии от точки разрыва в гантелеобразном дуплексе.

При изучении влияния УБЛ на активацию PARP1 в реакционную смесь добавляли соединения в концентрации от 0, 64 до 64 мкМ. Реакцию останавливали добавлением 3-кратного буфера Loading Buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2.5%-ный ДСН, 0.002%-ный бромфеноловый синий, 0.7135 M (5%) β-меркаптоэтанол, 10%-ный глицерин в конечной концентрации) и инкубацией при 90 °С в течение 10 минут. Далее проводили гель-электрофорез продукта (реакции поли-АДФ-рибозы) по Лэммли в 10%-ном ДСН-ПААГ с 4%-ным концентрирующим слоем. Количество поли-АДФ-рибозы определяли методом вестерн-блоттинга.

Для иммуноблоттинга использовали антитела к поли-АДФ-рибозе (Anti-poly(ADP-ribose)antibody, Tulip Biolabs, США). Перенос проводили с использованием камеры Mini-Protein (Bioscad) при напряжении 2 В/см в течении 3-4 часов в буфере Tris-Glycine без додецилсульфата натрия. Гибридизацию с первичными антителами осуществляли в буфере TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,001% Tween 20) с добавлением 5-7% БСА, в соотношении 1:1000 при 4 °С в течение 2-3 часов. После инкубации мембрану промывали

буфером TBST (4 раза по 10 минут). Далее проводили гибридизацию со вторичными антителами (Anti-mouse, Abcam, США) в течение 1 часа, затем промывали буфером TBST (4 раза по 10 минут). Мембрану проявляли, используя набор реактивов Amersham (GE Healthcare). Визуализацию осуществляли при помощи прибора ImageQuant LAS 4000. Статистическая значимость полученных различий была проанализирована при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Оптимизацию реакции поли(АДФ)-рибозилирования проводили с использованием 44-звенного олигонуклеотида h44b (рис. 1). При определении оптимальной концентрации дуплекса h44b, необходимой для активации ферментативной функции PARP1, было установлено, что для запуска реакции необходимо не менее 0,64 нМ ДНК (рис. 1А). При концентрации активатора h44b, составляющей 11,7 нМ, прямо пропорциональное увеличение количества продукта реакции от количества добавленного в реакционную смесь PARP1 наблюдалось в диапазоне $1,2 \cdot 10^{-4}$ до 0,3 е.а. фермента на пробу. При этом активность PARP1, добавленного в пробу в количестве меньшем $1,2 \cdot 10^{-4}$ е.а., не выявлялась (рис. 1Б). Таким образом, в качестве оптимальных условий для проведения реакции поли(АДФ)-рибозилирования были выбраны: концентрация гантелеобразного дуплекса ДНК h44b – 11,7 нМ, а концентрация PARP1 – 0,1 ед. активности фермента на пробу.

На следующем этапе мы провели сравнительный анализ зависимости количества образующейся поли-(АДФ)-рибозы от наличия одноцепочечного разрыва в гантелеобразном дуплексе ДНК путем сравнения активирующей способности h44b и h44, в котором одноцепочечный разрыв был устранен путем лигирования концов олигонуклеотида (рис. 2В).

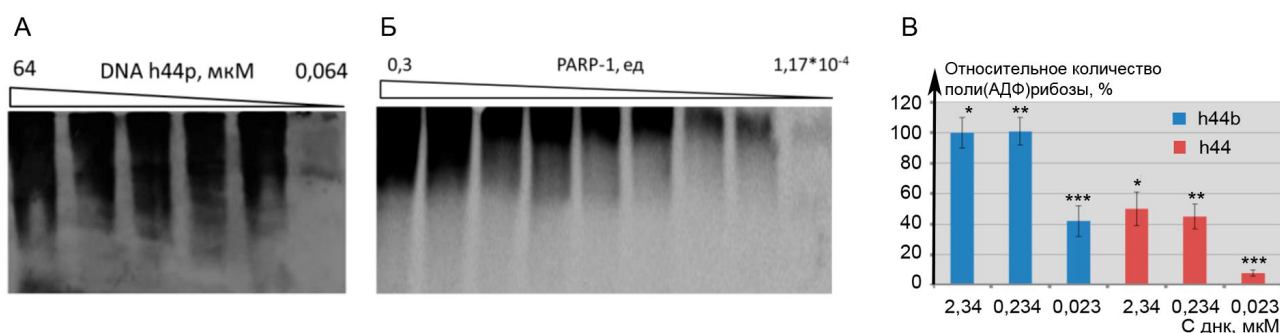


Рис. 2. Оптимизация условий проведения реакции поли (АДФ)-рибозилирования в системе *in vitro*

А - Влияние концентрации h44b на количество поли-АДФ-рибозы. Б - Зависимость количества поли-АДФ-рибозы от количества PARP1 (е.а.) в реакционной смеси. В - Влияние одноцепочечного разрыва на эффективность активации PARP1. Значения нормированы на количество поли-АДФ-рибозы при использовании в качестве активатора h44b в концентрации 2,34 мкМ (*, **, *** - различия статистически значимы по t-критерию Стьюдента, $p < 0,05$)

Было показано, что при эквимольных концентрациях ДНК-активатора с разрывом и без него реакция поли-АДФ-рибозилирования идет значительно (более чем вдвое) активнее при наличии разрыва в гантелеобразном дуплексе (рис. 2В).

Основной задачей представленного исследования являлось проведение сравнительного анализа влияния различных узкобороздочных лигандов на активацию белка PARP1. Определение влияния УБЛ на относительное количество образованной поли-АДФ-рибозы осуществляли при использовании в качестве активатора h44b в концентрации 11,7 нМ и добавлении в реакционную смесь 0,1 е.а. PARP1. В работе были исследованы ингибирующие эффекты описанных в литературе [5] классических УБЛ: DAPI, Diminazene, Hoechst 33258, Netropsin, Pentamidine. В качестве положительного контроля эффективного ингибирования реакции поли-АДФ-рибозилирования использовался 4ANI. По нашим данным, наибольшей ингибирующей способностью обладают DAPI и Diminazene. Промежуточное влияние оказывает Hoechst 33258. Для Netropsin показана слабая ингибирующая способность в сравнении с DAPI и Diminazene (рис. 3А).

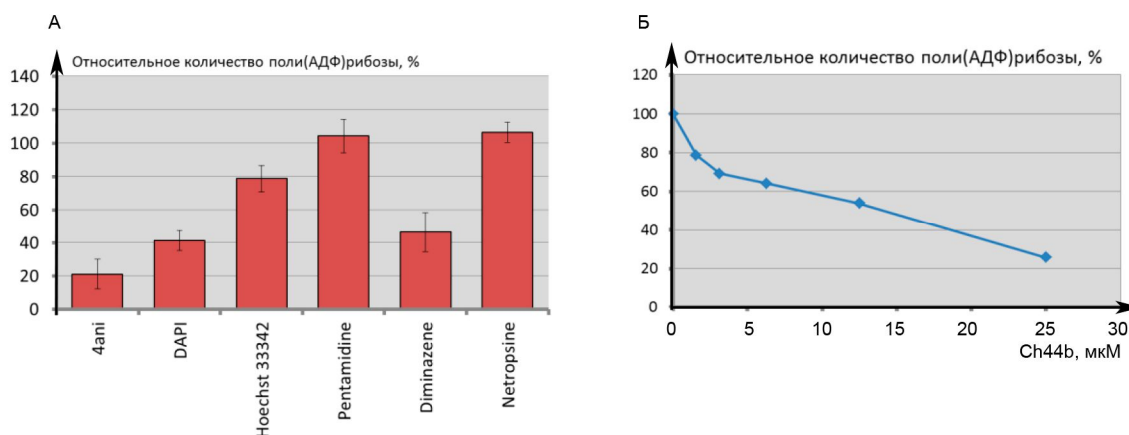


Рис. 3. Влияние УБЛ на эффективность реакции поли-АДФ-рибозилирования при активации белка PARP1 ДНК-дуплексом h44b

А - Относительное количество поли-АДФ-рибозы в присутствии различных УБЛ. Значения нормированы на количество поли-АДФ-рибозы в отсутствие УБЛ. Б - Зависимость относительного количества поли-АДФ-рибозы от концентрации Hoechst 33342

Для дальнейшего определения концентрации полумаксимального ингибирования IC50 была получена дозовая зависимость образующейся pADPr от концентрации УБЛ (рис. 3Б). Концентрация полумаксимального ингибирования ферментной реакции для DAPI составила 62,5 нМ. При данной концентрации на 1 молекулу УБЛ приходится 3,4 пары оснований, что соответствует 5,3 молекулы DAPI на молекулу h44b.

Из результатов аналогичного эксперимента с Diminazene было установлено, что IC50 для этого соединения составляет 0,132 мкМ, что соответствует 11,3 молекулы Diminazene на 1 молекулу h44b. Наконец, результаты эксперимента с Hoechst показывают, что IC50 для

данного соединения составляет 13,3 мкМ, что на 2 порядка выше при сравнении с Diminazene. Из этих УБЛ, влияющих на активацию PARP1, в настоящее время в медицинской практике в качестве лекарственного антипаразитарного препарата используется Diminazene. В соответствии с возможностью его более быстрого внедрения в медицинскую практику, в дальнейших исследованиях особенностей влияния УБЛ на реакцию поли-АДФ-рибозилирования был использован именно этот лекарственный препарат.

Задачей следующего раздела работы был анализ влияния на ингибирующий эффект Diminazene последовательности нуклеотидов в гантелеобразном дуплексе ДНК, а именно присутствие АТ-богатого участка (рис. 1). Для этого эксперимента использовались: гантелеобразные структуры ДНК h44b, h76b1 и h76b2. Два последних дуплекса содержали АТ-богатые регионы, находящиеся на разном удалении от места разрыва. Сначала был проведен анализ влияния на активацию белка PARP1 локализации разрыва в гантелеобразном дуплексе относительно АТ-богатого участка. Было показано, что активация ферментативной реакции дуплексом h76b2 происходит менее интенсивно в сравнении дуплексом h76b1 (рис. 4А).

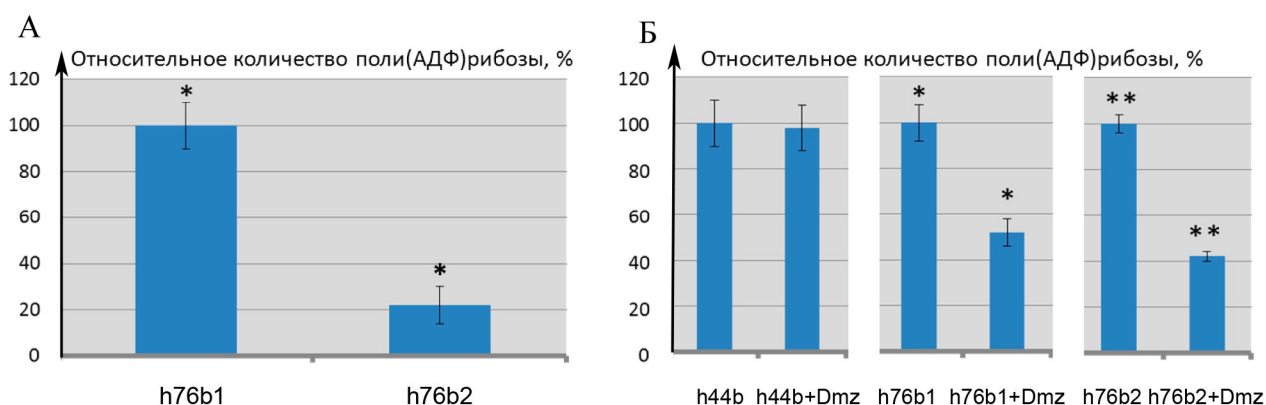


Рис. 4. Влияние АТ-богатого участка и его локализации на особенности реакции поли-АДФ-рибозилирования и ее ингибирования Diminazene

А – Относительные количества поли(АДФ)рибозы при использовании в качестве активаторов h76b1 и h76b2. Значения нормированы по h76b1. Б – Влияние диминазена на относительные количества поли(АДФ)рибозы при использовании в качестве активаторов h44b, h76b1 и h76b2 (*, ** - значения относительной интенсивности полос статистически значимо отличны от соответствующих контролей)

При фиксированной концентрации ДНК (0,1 мкМ) и отсутствии ингибитора мы получили различные количества рADPr, что указывает на различную аффинность PARP1 к данным олигонуклеотидам. В структуре обоих дуплексов h76b1 и h76b2 последовательность TCGATC находятся на различных расстояниях от разрыва цепи ДНК. Ранее было показано,

что PARP1 обладает высокой аффинностью к разрыву ДНК, но также способен связываться с АТ-богатыми последовательностями. В дуплексе h60b1 последовательность ААТТ и разрыв цепи удалены друг от друга на расстояние более 7 оснований, необходимых для посадки PARP1, что позволяет двум молекулам PARP1 связаться с ДНК. В гантелеобразном дуплексе h76b2 наблюдается обратная ситуация – последовательность ААТТ и одноцепочечный разрыв расположены всего в двух парах оснований друг от друга, вследствие чего активация двух молекул PARP1 становится невозможной. Это приводит к меньшему уровню активации фермента в случае активации дуплексом h76b2 в сравнении с дуплексом h76b1.

При исследовании влияния Diminazene на активацию реакции поли(АДФ)-рибозилирования при введении АТ-богатого региона в последовательности гантелеобразного ДНК-дуплекса было показано, что при эквимоллярных концентрациях ингибитора и активатора ингибирующая способность Diminazene значительно возрастает при наличии АТ-богатой последовательности в ДНК-активаторе. Это согласуется с данными наших экспериментов по изучению сиквенс-специфичности УБЛ и данными литературы о том, что Diminazene связывается с АТТ-богатой последовательностью.

Заключение

Полученные результаты о влиянии одноцепочечного разрыва в дуплексе ДНК на активность фермента согласуются с данными о том, что наличие одноцепочечного разрыва сильно увеличивает аффинность фермента к биополимеру. Среди изученных УБЛ высокой эффективностью ингибирования активации PARP1 обладают DAPI, Diminazene и Hoechst. Наибольший интерес среди этих соединений представляет Diminazene, который уже используется в медицине в качестве антипаразитарного препарата. Его ингибирующий эффект на активацию PARP1 повышается при наличии в последовательности ДНК-активатора АТ-богатых областей.

Таким образом, результаты экспериментов подтвердили влияние положения АТ-богатого региона относительно одноцепочечного разрыва на ингибирование активности PARP1 Diminazene. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности проведения доклинических испытаний по использованию Diminazene в комбинированной химиотерапии опухолей.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №15-04-09216А.

Список литературы

1. Козлов И.А. Применение синтетических олигонуклеотидов для ингибирования активности фактора транскрипции NF-κB / И.А. Козлов, Е.А. Кубарева, З.А. Шабарова //

Молекулярная биология. – 1998. – Т. 32. – № 3. – С. 389-400.

2. Albert F. Heterogeneity in the actions of drugs that bind in the DNA minor groove / F. Albert, T. Eckdahl, D. Fitzgerald, J. Anderson // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – N. 31. – P. 10135.
3. Eustermann S. The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger / S. Eustermann, H. Videler, J. Yang, P. Cole, D. Gruszka, D. Veprintsev, D. Neuhaus // *J Mol Biol*. – 2011. – Vol. 407. – P. 149-170.
4. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe // *Biotech Histochem*. – 1995. – Vol. 70. – N. 5. – P. 220.
5. Kirsanov K.I. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways / K.I. Kirsanov, E. Kotova, P. Makhov, K. Golovine, E.A. Lesovaya, V.M. Kolenko, M.G. Yakubovskaya, A.V. Tulin // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5. – P. 428-437.
6. Meghan S. Blackledge and Christian Melander Programmable DNA-binding Small Molecules // *Bioorg Med Chem*. – 2013. – Vol. 21. – N. 20. – P. 6101.
7. Michael P. Minor groove binders as anti-infective agents / P. Michael, M. Barrett, C. Gemmell, C. Suckling // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2013. – Vol. 39. – P. 12.
8. Mitrasinovic P. Sequence-dependent binding of flavonoids to duplex DNA // *J Chem Inf Model*. – 2015. – Vol. 55. – N. 2. – P. 421.
9. Nelson S. Non-covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding agents / S. Nelson, L. Ferguson, W. Denny // *Mutat Res*. – 2007. – Vol. 623. – P. 24.
10. Pindur U. Advances in DNA-Ligands with Groove Binding, Intercalating and/or Alkylating Activity: Chemistry, DNA-Binding and Biology / U. Pindur, M. Jansen, T. Lemster // *Curr Med Chem*. – 2005. – Vol. 12. – P. 2805.
11. Suckling C. From multiply active natural product to candidate drug? Antibacterial (and other) minor groove binders for DNA // *Future Med Chem*. – 2012. – Vol. 4. – N. 8. – P. 971.
12. Zimmer C. Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material / C. Zimmer, U. Wahnert // *Prog Biophys Mol Biol*. – 1986. – Vol. 47. – N. 1. – P. 31.