

УДК 577.151.02; 577.152.2

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИ(ADP-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗЫ 1 ЧЕЛОВЕКА*,**

© 2020 Д.К. Нилов^{1#}, С.В. Пушкарев^{2#}, И.В. Гущина², Г.А. Манасарян³,
К.И. Кирсанов⁴, В.К. Швядас^{1,2***}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия; электронная почта: vyta@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Научно-исследовательский институт канцерогенеза, 115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.08.2019

После доработки 16.10.2019

Принята к публикации 16.10.2019

Поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (ПАРП-1) является ключевым ферментом репарации ДНК и важной мишенью для терапии онкологических заболеваний. Сложное строение субстратов ПАРП-1 ограничивает возможности экспериментального изучения механизма реакции, однако необходимые данные могут быть получены путем молекулярного моделирования. В представленной работе впервые получена молекулярно-динамическая модель фермент-субстратного комплекса ПАРП-1, содержащего молекулу NAD⁺ и конец цепи поли(ADP-рибозы) в виде молекулы ADP. Охарактеризованы взаимодействия с остатками активного центра, среди которых определяющую роль играют Gly863, Lys903, Glu988, а также предложен S_N1-подобный механизм для катализируемой реакции ADP-рибозилирования. С помощью молекулярного докинга получены модели комплексов ПАРП-1 с более сложными двухзвенными фрагментами растущей цепи полимера и конкурентными ингибиторами 3-аминобензамидом и 7-метилгуанином.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: репарация ДНК, молекулярная динамика, докинг, субстраты, ингибиторы.

DOI: 10.31857/S0320972520010091

Поли(ADP-рибозо)полимераза 1 человека (ПАРП-1; КФ 2.4.2.30) является ферментом суперсемейства ADP-рибозилтрансфераз, который обладает ДНК-зависимой активностью и катализирует синтез поли(ADP-рибозы) (ПАР, рис. 1) из молекул NAD⁺ [1–5]. ПАРП-1 осуществляет перенос ADP-рибозы на белок-акцептор с высвобождением никотинамида (модификации могут подвергаться боковые цепи остат-

Принятые сокращения: ПАРП-1 – поли(ADP-рибозо)полимераза 1, ПАР – поли(ADP-рибоза), МД – молекулярная динамика.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-253, 16.12.2019.

** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 1, 2020.

*** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ков глутаминовой и аспарагиновой кислоты, а также лизина) [6, 7]. Далее происходит синтез полианиона ПАР путем последовательного присоединения новых звеньев ADP-рибозы с образованием гликозидных связей $\alpha(1\rightarrow2)$ [8, 9].

Связывание ПАРП-1 с разрывами ДНК приводит к модификации других белков, вовлеченных в метаболизм ДНК, а также к аутомодификации [11, 12]. Результатом поли(ADP-рибозил)ирования является реорганизация структуры хроматина и мобилизация белков репарации для устранения повреждения [13–16]. В частности, аутомодифицированная ПАРП-1 образует комплекс с белком эксцизионной репарации XRCC1, который, в свою очередь, взаимодействует с ДНК-полимеразой β и ДНК-лигазой III [17, 18]. Поскольку ПАРП-1 является ключевым ферментом репарации ДНК в опухолевых клетках, большое внимание уделяется поиску его ингибиторов, обладающих собственным антипролиферативным эффектом или действующих в сочетании с ДНК-повреждающими препара-

тами [19–22]. Недавно для лечения рака молочной железы и яичников были одобрены три синтетических ингибитора ПАРП-1: олапариб, рупапариб и нирапариб [23–25]. Клеточная функция ПАРП-1, а также способы ее подавления подробно рассмотрены в большом числе обзоров [26–31].

О молекулярном механизме реакции АДР-рибозилирования известно не так много. В активном центре каталитического домена ПАРП-1 можно выделить участок связывания донора (NAD^+) и участок связывания акцептора (ПАР) [32]. Молекула NAD^+ , по-видимому, образует водородные связи с Gly863 и гидрофобный контакт с Tyr907 подобно миметикам никотинамидного фрагмента, для которых установлена структура фермент-ингибиторных комплексов [33, 34]. Некоторые предположения относительно связывания субстрата-акцептора можно сделать на основе кристаллической структуры ПАРП-1 с неактивным структурным аналогом, аденозиндифосфатный фрагмент которого образует гидрофобный контакт с Met890 и водородные связи с Lys903 и Glu988 [35]. Карбоксильная группа остатка Glu988 находится вблизи расщепляемой *N*-гликозидной связи NAD^+ и, предположительно, может выступать в роли общего основания, активирующей нуклеофильную группу субстрата-акцептора, и/или участвовать в стабилизации переходного состояния [33, 35, 36].

На данный момент нет достоверной информации о взаимной ориентации субстратов ПАРП-1, необходимой для протекания реакции, и о структуре переходных состояний и ин-

термедиатов, поэтому актуальной задачей является моделирование фермент-субстратных комплексов на основе доступных кристаллографических данных. Детальное исследование молекулярных взаимодействий ПАРП-1 с субстратами представляет не только фундаментальный интерес, но и может создать основу для рационального дизайна эффективных конкурентных ингибиторов. Успешное решение данной задачи в настоящее время становится возможным благодаря следующим факторам: наличию многодоменной структуры апоформы 4dqu [37, 38], структуры каталитического домена со связанным аналогом субстрата-акцептора 1a26 [35] и недавнему появлению структуры каталитического домена ПАРП-1 со связанным аналогом субстрата-донора 6bhv [39].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярную модель ПАРП-1 человека конструировали на основе кристаллической структуры 4dqu (цепи А, В, С, М и N). Координаты неразрешенной петли 576–583 в домене WGR перенесли из структуры 2cr9. Координаты петли 645–661 между WGR и каталитическим доменом были предсказаны с помощью программы Modeller 9.20 (рис. 2) [40]. Координаты аналога NAD^+ перенесли из структуры 6bhv, после чего преобразовали бензамидный фрагмент в никотинамидный путем замены соответствующего атома углерода на азот. Координаты боковой цепи Arg878, взаимодействующей с адениновой группой NAD^+ и обладающей существенной

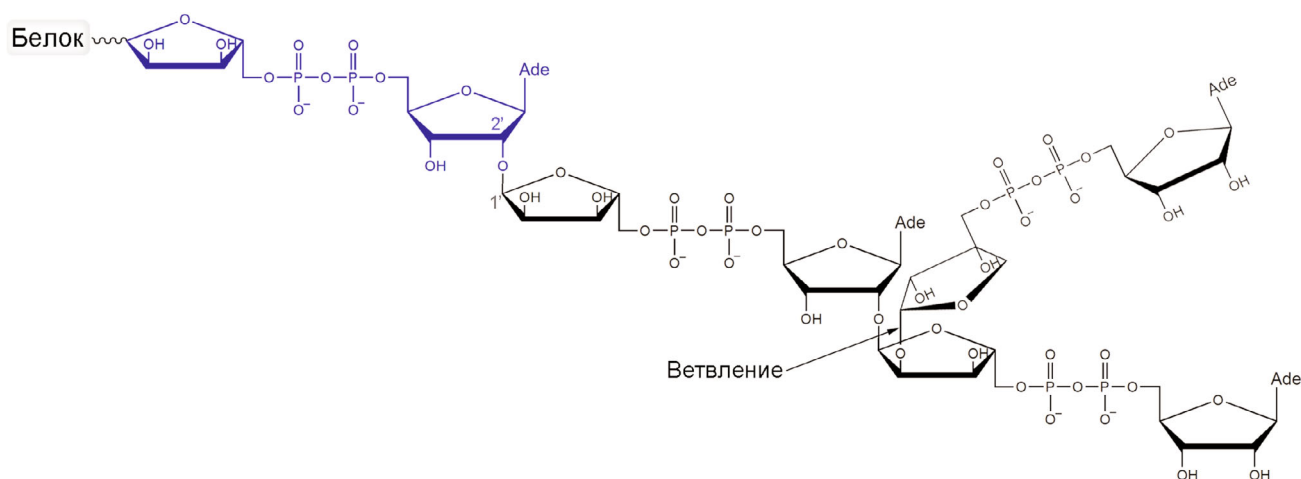


Рис. 1. Химическое строение ПАР. Синим цветом показано первое звено АДР-рибозы, присоединенное к белку-акцептору. Ветвление полимера происходит, когда в реакцию нуклеофильного замещения вовлекается «никотинамидная» рибоза ПАР. Присоединение АДР-рибозы в результате реакций элонгации и ветвления происходит в соотношении 41/1 [10]. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

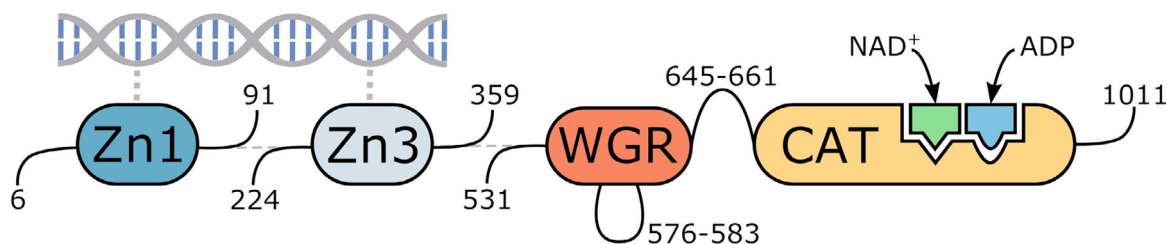


Рис. 2. Многодоменное строение полученной модели ПАРП-1 человека со связанными молекулами ДНК, NAD^+ и ADP. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

конформационной подвижностью, также взаимодействовали из $6\text{h}\nu$. Координаты ADP в качестве структурного аналога субстрата-акцептора перенесли из структуры 1a26. Для наложения структур использовали программу Matt 1.00 [41].

Далее структуру оптимизировали и исследовали методом молекулярной динамики (МД) с помощью AmberTools 15 и пакета Amber 14 [42, 43], установленного на суперкомпьютере МГУ [44]. Атомы водорода добавляли с учетом ионизационных свойств остатков, в частности в имидазольном кольце остатка активного центра His862 был протонирован $\text{N}^{\delta 1}$ -атом. Структуру окружали слоем (12 Å) воды TIP3P, для нейтрализации отрицательного суммарного заряда добавляли ионы натрия. На первой стадии минимизации энергии полученной системы (2500 шагов по методу наискорейшего спуска + 2500 шагов по методу сопряженных градиентов) координаты белка, ДНК и субстратов фиксировали позиционными ограничениями 2 ккал/(моль·Å²) на тяжелых атомах. Вторую стадию минимизации (5000 шагов наискорейшего спуска + 5000 шагов по методу сопряженных градиентов) проводили без каких-либо ограничений. Затем систему разогревали от 0 до 300 К с использованием позиционных ограничений 1 ккал/(моль·Å²) на атомах белка, ДНК и субстратов (250 пс, постоянный объем) и уравнивали при 300 К (500 пс, постоянное давление). Достижение равновесной конформации субстратов подтверждали путем анализа среднего квадратичного отклонения их атомов от начального положения. В дальнейшем с использованием подготовленной структуры рассчитывали и анализировали траекторию равновесной симуляции МД длиной 5000 пс. Шаг интегрирования составлял 0,002 пс с учетом использования алгоритма SHAKE. Радиус отсечения невалентных взаимодействий составлял 10 Å. Регуляцию температуры осуществляли по методу Ланжевена, давления – по методу Берендсена. Для молекулярно-механического описания белка и ДНК исполь-

зовали силовое поле *ff14SB* [45], для описания молекул NAD^+ и ADP – параметры из базы данных Amber Parameter Database [46–48].

Среди кадров траектории равновесной симуляции выбрали структуру, в которой взаимное расположение субстратов было близко к реакционноспособной конфигурации, и провели минимизацию ее энергии (5000 шагов наискорейшего спуска + 5000 шагов по методу сопряженных градиентов). Полученную структуру использовали для ковалентного докинга в программе Lead Finder 1.1.15 [49, 50]: молекула ADP была достроена до фрагментов ПАР, состоящих из двух звеньев ADP-рибозы. Недостающие группы атомов присоединяли к $\text{C}5'$ -атому (элонгация, ветвление) и $\text{C}1'$ -атому (ветвление). Кроме того, с помощью Lead Finder был осуществлен стандартный докинг ингибиторов 3-аминобензамида и 7-метилгуанина в активный центр (для этого из структуры ПАРП-1 были предварительно удалены молекулы субстратов). Для визуализации структур использовали VMD 1.9.2 [51].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе доступного набора кристаллических структур ПАРП-1 была впервые сконструирована МД-модель фермент-субстратного комплекса с NAD^+ и концевым фрагментом ПАР, представленным в виде молекулы ADP (рис. S1 в Приложении). Полученная сольватированная система помимо субстратов включала 703 аминокислотных остатка, 52 нуклеотида, 2 иона Zn^{2+} , 49 ионов Na^+ и 73281 молекулу воды. В результате анализа траектории равновесной симуляции ПАРП-1 были обнаружены следующие важные межмолекулярные взаимодействия. Никотинамидная группа NAD^+ образует две водородные связи с остатком Gly863 (таблица и рис. S2 в Приложении), а также π -стэкинг с боковой цепью Tyr907, что согласуется с резуль-

татами гомологичного моделирования, которые были получены с использованием структур других представителей суперсемейства (дифтерийного токсина и экзотоксина А) [34, 52]. Рибоза адениновой части NAD⁺ образует водородную связь с N^ε-атомом имидазольного кольца His862. Адениновый заместитель концевой рибозы ПАР формирует устойчивый гидрофобный контакт с боковой цепью Met890, а пирофосфатная группа образует водородную связь с аминогруппой Lys903, которая, в свою очередь, стабилизирует положение наиболее важного для катализа остатка Glu988. Карбоксильная группа Glu988 образует водородные связи с 2'-гидроксильной группой NAD⁺ и 3'-гидроксильной группой фрагмента ПАР, обеспечивая требуемое взаимное расположение субстрата-донора и субстрата-акцептора (рис. 3, а; нижние индексы «N» и «A» обозначают принадлежность к никотинамидной и адениновой рибозе).

Здесь следует вспомнить о поддерживаемом некоторыми авторами предположении о том, что Glu988 образует также водородную связь с 2'-гидроксильной группой ПАР и является акцептором протона при нуклеофильной атаке по механизму S_N2 [35, 36, 53, 54]. Однако в ходе симуляции мы не наблюдали ни образования упомянутой водородной связи, ни реакционноспособной линейной конфигурации атомов ADP:O2'_A, NAD⁺:C1'_N и NAD⁺:N1_N, характерной для механизма S_N2. Среднее значение расстояния O2'_A ... C1'_N составило 4,2 Å, угла O2'_A ... C1'_N ... N1_N – 135° (рис. 4), в то время как необходимое для нуклеофильной атаки расстояние составляет ~3 Å, а угол не должен сильно отклоняться от значения 180° [55]. Это дает основание предположить, что катализируемая ПАРП-1 реакция ADP-рибозилирования протекает по альтернативному, S_N1-подобному механизму (рис. 5). По-видимому, сначала происходит образование интермедиата – иона оксокарбения, который стабилизируется благодаря отрицательному заряду карбоксильной группы Glu988. Реакционный центр приобретает плоскую конфигурацию, что облегчает последующую атаку 2'-гидроксильной группой акцептора. Поскольку ПАР является отрицательно заряженным биополимером, его связывание в активном центре ПАРП-1 в качестве субстрата-акцептора может способствовать образованию иона оксокарбения. Интересно, что похожий механизм был установлен для других представителей суперсемейства ADP-рибозилтрансфераз: ПАРП-10 [56], дифтерийного токсина [57, 58], экзотоксина А [59, 60] и йота-токсина [61, 62].

Допуская возможность образования иона оксокарбения в активном центре ПАРП-1, мож-

но предложить механизм и для реакции инициации синтеза ПАР, когда акцептором ADP-рибозы служит остаток глутаминовой или аспарагиновой кислоты на поверхности модифицируемого белка. В этом случае один из атомов кислорода модифицируемой карбоксильной группы может занимать положение 2'-гидроксильной группы ПАР вблизи расщепляемой гликозидной связи. Отрицательный заряд карбоксильной группы белка-акцептора способствует расщеплению NAD⁺ с образованием иона оксокарбения, после чего происходит нуклеофильная атака. Данное предположение объясняет тот факт, что мутации E988Q и E988A существенно снижают способность ПАРП-1 катализировать реакцию элонгации, но мало влияют на стадию инициации [36]. Glu988 обеспечивает реакционноспособную ориентацию субстратов (NAD⁺ и ПАР) и стабилизирует интермедиат при наращивании цепи ПАР. Однако на стадии инициации этот остаток не столь важен, поскольку его стабилизирующую функцию выполняет карбоксильная группа белка-акцептора.

| Взаимодействие | Расстояние, Å |
|---|---------------|
| Glu988:OE1 ... NAD ⁺ :2' _N -OH:H | 1,7 ± 0,1 |
| Glu988:OE2 ... ADP:3' _A -OH:H | 1,7 ± 0,2 |
| Gly863:H ... NAD ⁺ :CONH ₂ :O | 2,0 ± 0,2 |
| Gly863:O ... NAD ⁺ :CONH ₂ :H | 2,4 ± 0,4 |
| Lys903:NH ₃ :H* ... ADP:P ₂ O ₇ :O | 1,9 ± 0,3 |
| Lys903:NH ₃ :H* ... Glu988:OE2 | 2,0 ± 0,2 |
| NAD ⁺ :CONH ₂ :H ... NAD ⁺ :P ₂ O ₇ :O** | 1,9 ± 0,2 |

* Для каждого кадра траектории в расчет принимали минимальное из расстояний до атомов водорода аминогруппы Lys903, поскольку данная группа способна претерпевать вращение.

** Внутримолекулярная водородная связь NAD⁺.

Полученная МД-структура ПАРП-1 характеризует взаимную ориентацию NAD⁺ и атакующей рибозы ПАР на примере модельной молекулы ADP, однако она не дает представления о положении растущей цепи полимера. Конструирование более сложных фрагментов ПАР, состоящих из двух звеньев ADP-рибозы, было осуществлено методом ковалентного докинга. Для этого был выбран кадр траектории МД-симуляции, в котором взаимное расположение субстратов близко к реакционноспособной конфигурации (рис. 4), а никотинамидная рибоза NAD⁺ представлена в конформации 3'-экзо. В данной кон-

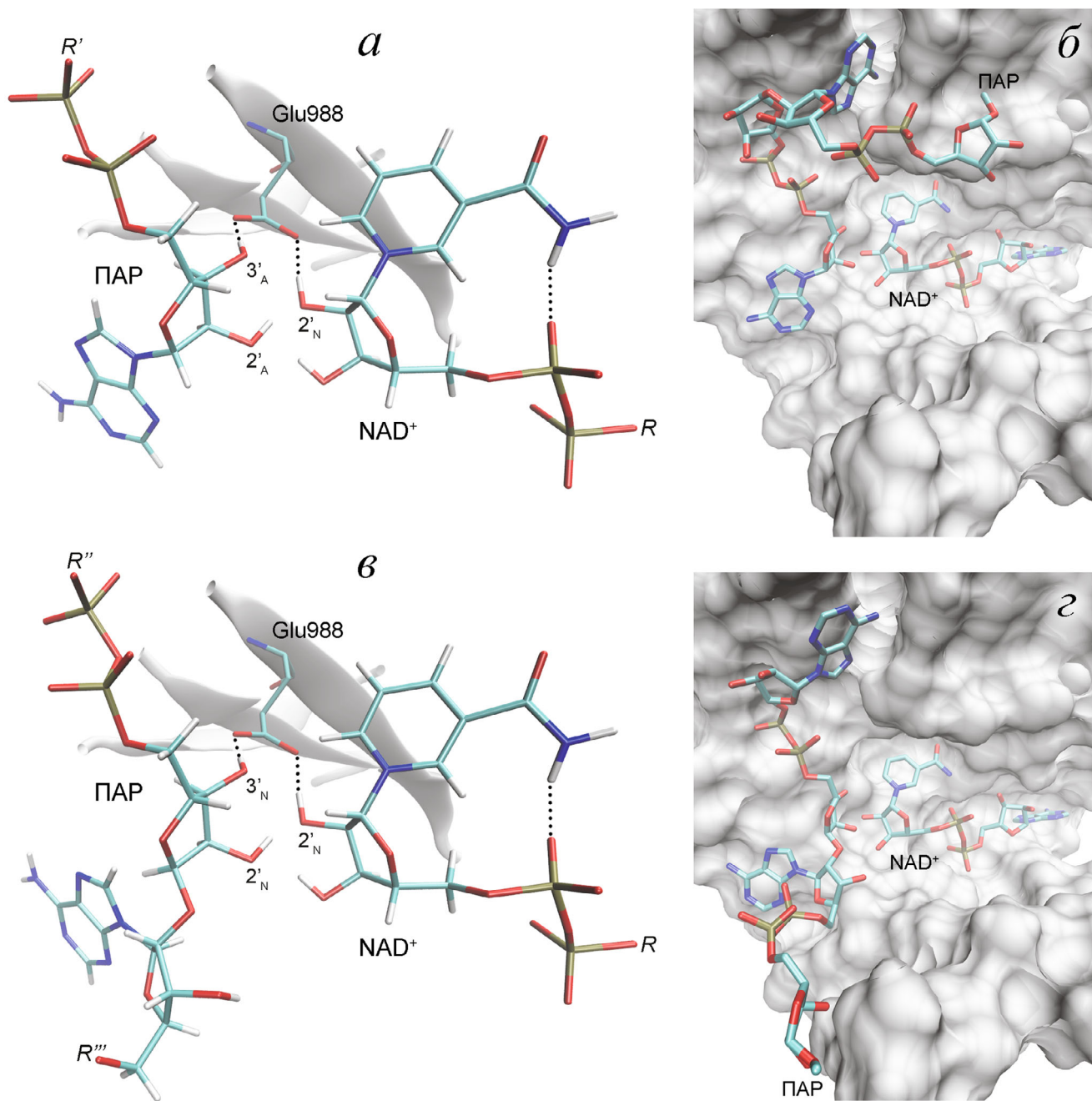


Рис. 3. Взаимное расположение NAD^+ и ПАР в моделях фермент-субстратных комплексов ПАРП-1, полученных методами МД и докинга. *a* и *б* – Элонгация; *в* и *г* – ветвление. Можно видеть, что положение пирофосфатной группы, присоединенной к атакующей рибозе ПАР, практически не отличается. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

формации атомы $\text{C}2'_\text{N}$, $\text{C}1'_\text{N}$, $\text{O}4'_\text{N}$ и $\text{C}4'_\text{N}$ находятся в одной плоскости (как в ионе оксокарбения), что должно облегчать образование интермедиата реакции. Далее к молекуле АДФ присоединили недостающие группы атомов, получив координаты субстрата-акцептора (ПАР) для реакций элонгации и ветвления. В случае элонгации но-

вое звено переносится на концевую адениновую рибозу ПАР; реакционноспособная ориентация субстратов представлена на рис. 3, *a* и *б*. С определенной периодичностью также происходит ветвление полимера, когда новое звено присоединяется к «никотинамидной» рибозе (рис. 1) [10, 63, 64]. Считается, что для осуществления

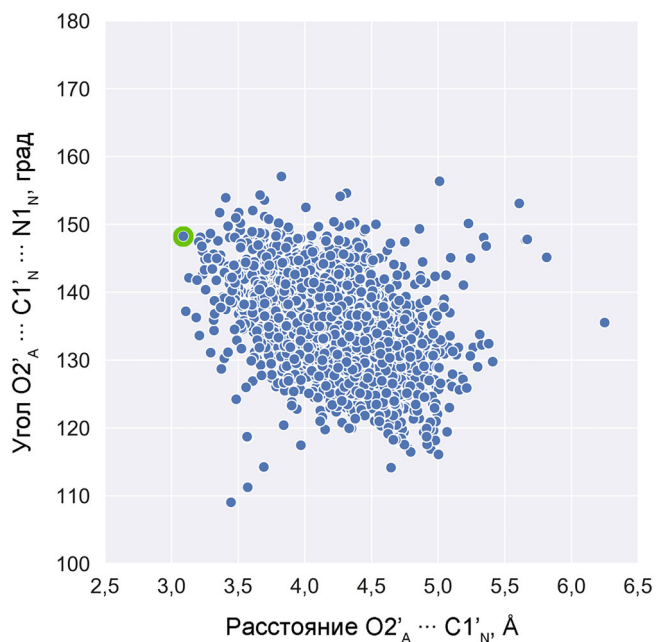


Рис. 4. Распределение пар значений расстояние–угол для атомов в реакционном центре ПАРП-1, полученное в результате равновесной МД-симуляции. Каждая точка соответствует определенному кадру траектории, зеленым цветом отмечена структура ($t = 3234$ пс), которую использовали для проведения докинга. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

данной реакции ПАР разворачивается на 180° , что позволяет группе $2'_N$ -ОН занять реакционноспособное положение $2'_A$ -ОН (рис. S3 в Приложении). Положение пиррофосфатной группы, присоединенной к атакующей рибозе, не претерпевает при этом существенных изменений [35]. Для моделирования положения ПАР, соответствующего реакции ветвления, адениновая группа ADP была заменена на остаток ADP-ри-

бозы с инвертированием конфигурации $C1'$ -атома (рис. 3, в и з). На рис. 3, б и з, можно сравнить ориентацию растущей цепи полимера в случае элонгации и ветвления.

Адекватность полученной модели фермент-субстратного комплекса и важность установленных взаимодействий в активном центре МД-структуры подтвердили результаты докинга двух известных ингибиторов ПАРП-1 с предполагаемым конкурентным механизмом действия. Первое соединение, 3-аминобензамид, является хорошо изученным структурным аналогом никотинамидной группы NAD^+ [65–67]. Второе соединение, 7-метилгуанин, представляет собой новый ингибитор ПАРП с перспективным профилем фармакокинетики и токсичности. Данный метаболит нуклеиновых кислот усиливает апоптотическую гибель раковых клеток в комбинации с цисплатином и доксорубицином *in vitro*, не оказывая при этом существенного побочного действия на организм в предварительных испытаниях *in vivo* [68–70]. Молекулярный докинг показал, что 3-аминобензамид и 7-метилгуанин занимают участок никотинамидной группы NAD^+ , образуя свойственные субстрату взаимодействия с остатками Gly863 и Tyr907 (рис. 6). В случае 7-метилгуанина функциональная амидная группа встроена в систему конденсированных колец, однако это не мешает формированию водородных связей с Gly863 (рис. 6, б).

В результате проведенных исследований создана модель фермент-субстратного комплекса ПАРП-1 человека. При анализе МД-траектории комплекса охарактеризованы взаимная ориентация субстрата-донора (молекула NAD^+) и субстрата-акцептора (фрагмент ПАР), а также их взаимодействия с остатками активного центра, среди которых определяющую роль играют Gly863, Lys903 и Glu988. Это позволило сделать предположение о том, что катализируемый

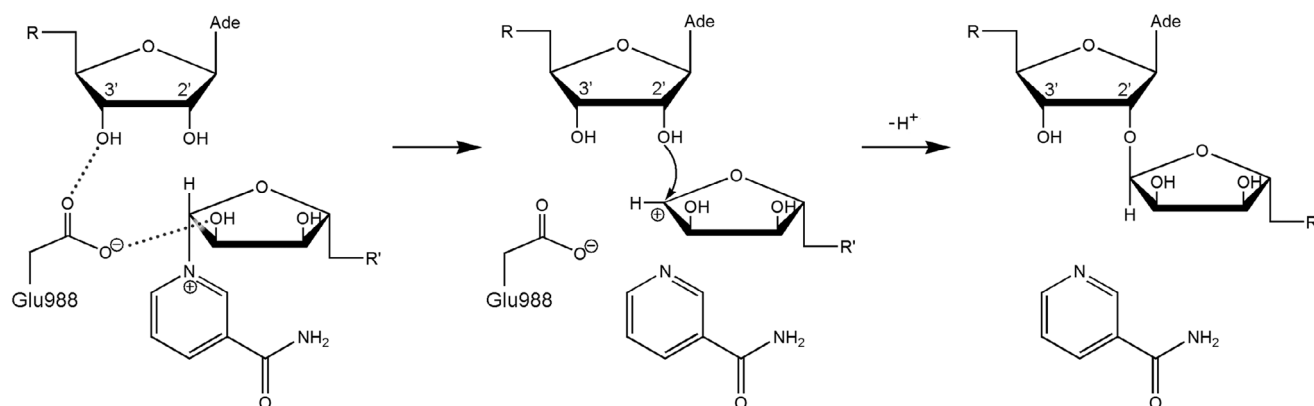


Рис. 5. Предполагаемый S_N1 -подобный механизм реакции ADP-рибозилирования, катализируемой ПАРП-1. Отрицательный заряд карбоксильной группы Glu988 стабилизирует интермедиат (ион оксокарбения)

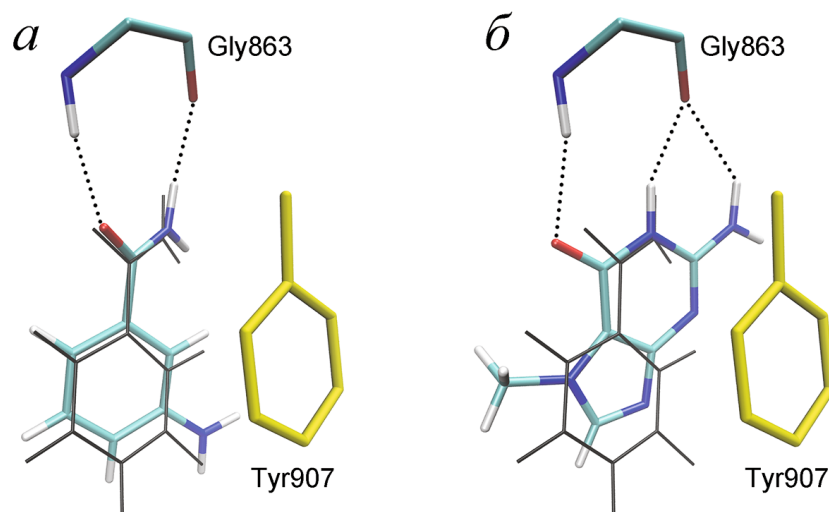


Рис. 6. Моделирование связывания 3-аминобензамида (а) и 7-метилгуанина (б) в активном центре ПАРП-1. Желтым цветом показана фенильная группа Tyr907, образующая с ингибитором π -стэкинг. Серым цветом показаны координаты никотинамидной группы NAD⁺ в МД-структуре ПАРП-1.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ПАРП-1 синтез ПАР происходит по S_N1-подобному механизму через образование ионов оксокарбения. Методом докинга показано, что участок связывания никотинамидной группы NAD⁺ является мишенью для ингибиторов 3-аминобензамида и 7-метилгуанина. В дальнейшем полученная модель фермент-субстратного комплекса может быть использована при рациональном дизайне ингибиторов ПАРП нового поколения. В частности, с помощью гибридных квантово-механических/молекулярно-механических методов на ее основе может быть получена структура интермедиата ПАРП-1 для скрининга молекул, комплементарных соответствующему конформационному состоянию активного центра.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-315-00389 мол_а, и № 17-08-01614 А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Благодарности. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cohen, M.S., and Chang, P. (2018) Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 236–243.
- Taniguchi, T. (1987) Reaction mechanism for automodification of poly(ADP-ribose) synthetase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1008–1012.
- Lin, H. (2007) Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2541–2554.
- Naegeli, H., Loetscher, P., and Althaus, F.R. (1989) Poly ADP-ribosylation of proteins. Processivity of a post-translational modification, *J. Biol. Chem.*, **264**, 14382–14385.
- Ménard, L., Thibault, L., and Poirier, G.G. (1990) Reconstitution of an *in vitro* poly(ADP-ribose) turnover system, *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**, 45–58.
- Tao, Z., Gao, P., and Liu, H.W. (2009) Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: analysis and implications, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 14258–14260.
- Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P.O., Fey, M., and Hottiger, M.O. (2009) Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3723–3738.
- Drenichev, M.S., and Mikhailov, S.N. (2015) Poly(ADP-ribose) – a unique natural polymer structural features, biological role and approaches to the chemical synthesis, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **34**, 258–276.
- Miwa, M., Ishihara, M., Takishima, S., Takasuka, N., Maeda, M., Yamaizumi, Z., Sugimura, T., Yokoyama, S.,

- and Miyazawa, T. (1981) The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1 → 2) ribose-ribose linkage, *J. Biol. Chem.*, **256**, 2916–2921.
10. Keith, G., Desgrès, J., and de Murcia, G. (1990) Use of two-dimensional thin-layer chromatography for the components study of poly(adenosine diphosphate ribose), *Anal. Biochem.*, **191**, 309–313.
 11. Mendoza-Alvarez, H., and Alvarez-Gonzalez, R. (1993) Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular, *J. Biol. Chem.*, **268**, 22575–22580.
 12. Mendoza-Alvarez, H., and Alvarez-Gonzalez, R. (1999) Biochemical characterization of mono(ADP-ribosylated) poly(ADP-ribose) polymerase, *Biochemistry*, **38**, 3948–3953.
 13. Hassler, M., and Ladurner, A.G. (2012) Towards a structural understanding of PARP1 activation and related signalling ADP-ribosyl-transferases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 721–729.
 14. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 517–528.
 15. Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 789–829.
 16. Jagtap, P., and Szabó, C. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 421–440.
 17. Brem, R., and Hall, J. (2005) XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2512–2520.
 18. Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3563–3571.
 19. Jain, P.G., and Patel, B.D. (2019) Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents – a recent update, *Eur. J. Med. Chem.*, **165**, 198–215.
 20. Martin, S.A., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2008) DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **18**, 80–86.
 21. Cepeda, V., Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Soto, M., and Pérez, J.M. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **1**, 39–53.
 22. Nilov, D.K., Yashina, K.I., Gushchina, I.V., Zakharenko, A.L., Sukhanova, M.V., Lavrik, O.I., and Švedas, V.K. (2018) 2,5-Diketopiperazines: a new class of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 152–158.
 23. Frampton, J.E. (2015) Olaparib: a review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer, *BioDrugs*, **29**, 143–150.
 24. Mittica, G., Ghisoni, E., Giannone, G., Genta, S., Aglietta, M., Sapino, A., and Valabrega, G. (2018) PARP inhibitors in ovarian cancer, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **13**, 392–410.
 25. Zimmer, A.S., Gillard, M., Lipkowitz, S., and Lee, J.M. (2018) Update on PARP inhibitors in breast cancer, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **19**, 21.
 26. Ray Chaudhuri, A., and Nussenzweig, A. (2017) The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 610–621.
 27. Ryu, K.W., Kim, D.S., and Kraus, W.L. (2015) New facets in the regulation of gene expression by ADP-ribosylation and poly(ADP-ribose) polymerases, *Chem. Rev.*, **115**, 2453–2481.
 28. Curtin, N.J., and Szabo, C. (2013) Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1217–1256.
 29. Ferraris, D.V. (2010) Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic, *J. Med. Chem.*, **53**, 4561–4584.
 30. Virág, L., and Szabó, C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, *Pharmacol. Rev.*, **54**, 375–429.
 31. Малоченко Н.В., Котова Е.Ю., Кулаева О.И., Кирпичников М.П., Студитский В.М. (2015) Ингибиторы PARP1: разработка противоопухолевых препаратов, *Acta Naturae*, **7**, 30–41.
 32. Barkauskaite, E., Jankevicius, G., and Ahel, I. (2015) Structures and mechanisms of enzymes employed in the synthesis and degradation of PARP-dependent protein ADP-ribosylation, *Mol. Cell*, **58**, 935–946.
 33. Ruf, A., Menissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1996) Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7481–7485.
 34. Ruf, A., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998) Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling, *Biochemistry*, **37**, 3893–3900.
 35. Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998) The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis, *J. Mol. Biol.*, **278**, 57–65.
 36. Marsischky, G.T., Wilson, B.A., and Collier, R.J. (1995) Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins, *J. Biol. Chem.*, **270**, 3247–3254.
 37. Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2012) Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1, *Science*, **336**, 728–732.
 38. Langelier, M.F., Eisemann, T., Riccio, A.A., and Pascal, J.M. (2018) PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **53**, 187–198.
 39. Langelier, M.F., Zandarashvili, L., Aguiar, P.M., Black, B.E., and Pascal, J.M. (2018) NAD⁺ analog reveals PARP-1 substrate-blocking mechanism and allosteric communication from catalytic center to DNA-binding domains, *Nat. Commun.*, **9**, 844.
 40. Sali, A., and Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.*, **234**, 779–815.
 41. Menke, M., Berger, B., and Cowen, L. (2008) Matt: local flexibility aids protein multiple structure alignment, *PLoS Comput. Biol.*, **4**, e10.

42. Case, D.A., Berryman, J.T., Betz, R.M., Cerutti, D.S., Cheatham, T.E. 3rd, et al. (2015) *AMBER 2015*. University of California, San Francisco.
43. Salomon-Ferrer, R., Case, D.A., and Walker, R.C. (2013) An overview of the Amber biomolecular simulation package, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **3**, 198–210.
44. Воеводин В.В., Жуматий С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин В.В. (2012) Практика суперкомпьютера «Ломоносов», *Открытые системы*, **7**, 36–39.
45. Maier, J.A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K.E., and Simmerling, C. (2015) ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3696–3713.
46. Walker, R.C., de Souza, M.M., Mercer, I.P., Gould, I.R., and Klug, D.R. (2002) Large and fast relaxations inside a protein: calculation and measurement of reorganization energies in alcohol dehydrogenase, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 11658–11665.
47. Pavelites, J.J., Gao, J., Bash, P.A., and MacKerell, A.D. Jr. (1997) A molecular mechanics force field for NAD⁺, NADH, and the pyrophosphate groups of nucleotides, *J. Comput. Chem.*, **18**, 221–239.
48. Meagher, K.L., Redman, L.T., and Carlson, H.A. (2003) Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field, *J. Comput. Chem.*, **24**, 1016–1025.
49. Stroganov, O.V., Novikov, F.N., Stroylov, V.S., Kulkov, V., and Chilov, G.G. (2008) Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening, *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 2371–2385.
50. Захаренко А.Л., Суханова М.В., Ходырева С.Н., Новиков Ф.Н., Стройлов В.С., Нилов Д.К., Чиллов Г.Г., Швядас В.К., Лаврик О.И. (2011) Усовершенствованная процедура поиска потенциальных ингибиторов поли(АДФ-рибозо)-полимеразы-1 с использованием молекулярного докинга, *Мол. биология*, **45**, 565–569.
51. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33–38.
52. Иванисенко Н.В., Жечев Д.А., Иванисенко В.А. (2016) Структурное моделирование мод связывания НАД⁺ с ПАРП-1, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **20**, 857–862.
53. Bellocchi, D., Costantino, G., Pellicciari, R., Re, N., Marrone, A., and Coletti, C. (2006) Poly(ADP-ribose)-polymerase-catalyzed hydrolysis of NAD⁺: QM/MM simulation of the enzyme reaction, *ChemMedChem*, **1**, 533–539.
54. Alemasova, E.E., and Lavrik, O.I. (2019) Poly(ADP-ribose)ylation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811–3827.
55. Yang, S.-Y., Fleurat-Lessard, P., Hristov, I., and Ziegler, T. (2004) Free energy profiles for the identity S_N2 reactions Cl⁻ + CH₃Cl and NH₃ + H₃BNH₃: a constraint *ab initio* molecular dynamics study, *J. Phys. Chem. A*, **108**, 9461–9468.
56. Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Litchfield, D.W., Shilton, B.H., and Lüscher, B. (2008) Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation, *Mol. Cell*, **32**, 57–69.
57. Bell, C.E., and Eisenberg, D. (1996) Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide, *Biochemistry*, **35**, 1137–1149.
58. Parikh, S.L., and Schramm, V.L. (2004) Transition state structure for ADP-ribosylation of eukaryotic elongation factor 2 catalyzed by diphtheria toxin, *Biochemistry*, **43**, 1204–1212.
59. Jørgensen, R., Merrill, A.R., Yates, S.P., Marquez, V.E., Schwan, A.L., Boesen, T., and Andersen, G.R. (2005) Exotoxin A-eEF2 complex structure indicates ADP-ribosylation by ribosome mimicry, *Nature*, **436**, 979–984.
60. Jørgensen, R., Wang, Y., Visschedyk, D., and Merrill, A.R. (2008) The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction, *EMBO Rep.*, **9**, 802–809.
61. Tsuge, H., Nagahama, M., Oda, M., Iwamoto, S., Utsunomiya, H., Marquez, V.E., Katunuma, N., Nishizawa, M., and Sakurai, J. (2008) Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota-toxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7399–7404.
62. Tsurumura, T., Tsumori, Y., Qiu, H., Oda, M., Sakurai, J., Nagahama, M., and Tsuge, H. (2013) Arginine ADP-ribosylation mechanism based on structural snapshots of iota-toxin and actin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4267–4272.
63. Rolli, V., O'Farrell, M., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1997) Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching, *Biochemistry*, **36**, 12147–12154.
64. Kistemaker, H.A., Overkleeft, H.S., van der Marel, G.A., and Filippov, D.V. (2015) Branching of poly(ADP-ribose): synthesis of the core motif, *Org. Lett.*, **17**, 4328–4331.
65. Banasik, M., and Ueda, K. (1994) Inhibitors and activators of ADP-ribosylation reactions, *Mol. Cell. Biochem.*, **138**, 185–197.
66. Nguewa, P.A., Fuertes, M.A., Cepeda, V., Alonso, C., Quevedo, C., Soto, M., and Pérez, J.M. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3-aminobenzamide enhances apoptosis induction by platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells, *Med. Chem.*, **2**, 47–53.
67. Zheng, Y.D., Xu, X.Q., Peng, F., Yu, J.Z., and Wu, H. (2011) The poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3-aminobenzamide suppresses cell growth and migration, enhancing suppressive effects of cisplatin in osteosarcoma cells, *Oncol. Rep.*, **25**, 1399–1405.
68. Нилов Д.К., Тараров В.И., Куликов А.В., Захаренко А.Л., Гущина И.В., Михайлов С.Н., Лаврик О.И., Швядас В.К. (2016) Ингибирование поли(АДФ-рибозо)полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином, *Acta Naturae*, **8**, 120–128.
69. Nilov, D., Kirsanov, K., Antoshina, E., Maluchenko, N., Feofanov, A., Kurgina, T., Zakharenko, A., Khodyreva, S., Gerasimova, N., Studitsky, V., Lavrik, O., and Švedas, V. (2018) 7-Methylguanine: a natural DNA repair inhibitor and a promising anticancer compound, *FEBS Open Bio*, **8**, P.09-198-W.
70. Maluchenko, N., Nilov, D., Feofanov, A., Lys, A., Kutuzov, M., Gerasimova, N., and Studitsky, V. (2019) 7-Methylguanine traps PARP-1 on nucleosomes: spFRET microscopy study, *Microsc. Microanal.*, **25**(S2), 1282–1283.

**MODELING OF THE ENZYME–SUBSTRATE COMPLEXES
OF HUMAN POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1^{*,**}****D. K. Nilov^{1#}, S. V. Pushkarev^{2#}, I. V. Gushchina²,
G. A. Manasaryan³, K. I. Kirsanov⁴, and V. K. Švedas^{1,2*}**¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: vyta@belozersky.msu.ru*² *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia*³ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991 Moscow, Russia*⁴ *Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Institute of Carcinogenesis, 115478 Moscow, Russia*

Received August 19, 2019

Revised October 16, 2019

Accepted October 16, 2019

Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) is a key DNA repair enzyme and an important target for cancer treatment. Conventional methods of studying the PARP-1 reaction mechanism have limitations because of the complex structure of PARP-1 substrates, however, the necessary data can be obtained by molecular modeling. In the present work, a molecular-dynamics model for the PARP-1 enzyme–substrate complex containing NAD⁺ molecule, and the end of poly(ADP-ribose) chain in the form of ADP molecule was obtained for the first time. Interactions with the active site residues have been characterized where Gly863, Lys903, Glu988 play a crucial role, and an S_N1-like mechanism for the enzymatic ADP-ribosylation reaction has been proposed. Models of PARP-1 complexes with more sophisticated two-unit fragments of the growing polymer chain as well as with competitive inhibitors 3-aminobenzamide and 7-methylguanine have been obtained by molecular docking.

Keywords: DNA repair, molecular dynamics, docking, substrates, inhibitors