

УДК 547.857.7; 577.151.042; 577.152.2

## ИНГИБИТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ 7-МЕТИЛГУАНИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА 8-ГИДРОКСИ-7-МЕТИЛГУАНИНА НА ПОЛИ(ADP-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗУ 1 ЧЕЛОВЕКА

© 2022 Т.А. Кургина<sup>1#</sup>, С.И. Шрам<sup>2#</sup>, М.М. Кутузов<sup>1</sup>, Т.В. Абрамова<sup>1</sup>, Т.А. Щербакова<sup>3</sup>, Е.А. Мальцева<sup>1</sup>, В.В. Поройков<sup>4</sup>, О.И. Лаврик<sup>1,5</sup>, В.К. Швядас<sup>6,7</sup>, Д.К. Нилов<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения РАН, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт молекулярной генетики  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: nilovdm@gmail.com

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121 Москва, Россия

<sup>5</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>6</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

<sup>7</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Научно-исследовательский вычислительный центр, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.04.2022

После доработки 23.05.2022

Принята к публикации 23.05.2022

Ранее нами было обнаружено, что образующийся в организме метаболит нуклеиновых кислот 7-метилгуанин (7mGua) способен оказывать ингибиторное действие на фермент поли(ADP-рибозо)-полимеразу I (PARP1) – важную фармакологическую мишень в противораковой терапии. В данной работе с использованием оригинального метода анализа активности PARP1, основанного на измерении анизотропии флуоресценции, исследованы ингибиторные свойства 7mGua, а также его метаболита – 8-гидрокси-7-метилгуанина (8h7mGua). Показано, что оба соединения дозозависимо подавляют ферментативную активность PARP1, однако 8h7mGua является более сильным ингибитором. Значения IC<sub>50</sub> для 8h7mGua при разных концентрациях субстрата NAD<sup>+</sup> оказались в среднем в 4 раза ниже, чем для 7mGua. Более эффективное связывание 8h7mGua в активном центре PARP1 объясняется наличием дополнительной водородной связи с каталитическим остатком Glu988. Экспериментальные и вычислительные исследования не выявили влияния 7mGua и 8h7mGua на активность других ферментов репарации ДНК, что говорит о селективности их ингибиторного действия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** поли(ADP-рибозо)полимераза 1, репарация ДНК, ингибитор, 7-метилгуанин, 8-гидрокси-7-метилгуанин.

**DOI:** 10.31857/S0320972522060070, **EDN:** AULCZP

### ВВЕДЕНИЕ

7-Метилгуанин (7mGua) и 8-гидрокси-7-метилгуанин (8h7mGua, рис. 1) являются метаболитами нуклеиновых кислот и в малом

количестве содержатся в моче человека [1–6]. В матричной РНК метилированию подвержен гуанозин в составе 5'-концевой кэп-структуры. Данная модификация РНК важна для регуляции экспрессии генов и осуществляется

Принятые сокращения: 7mGua – 7-метилгуанин; 8h7mGua – 8-гидрокси-7-метилгуанин; АП-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; АРЕ1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1; PAR – поли(ADP-рибоза); PARP1 – поли(ADP-рибозо)полимераза 1; Polβ – ДНК-полимераза β; TDP1 – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1; TGT – тРНК-гуанин-транскриптаза.

\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

ферментативно [7–9]. В ДНК гуанозин модифицируется под воздействием различных экзогенных и эндогенных метилирующих агентов, и с возрастом число таких аддуктов увеличивается [10–12]. При этом следует отметить, что свободное основание 7mGua не вовлечено в синтез нуклеотидов и не способно встраиваться в ДНК [13–15]. Некоторое количество 7mGua превращается в 8h7mGua под действием ксантиноксидазы или деметилируется [3, 16, 17]. Так, после внутривенного введения здоровому добровольцу 5 мг 7mGua, меченного изотопом  $^{15}\text{N}$ , содержание [ $^{15}\text{N}$ ]7mGua и [ $^{15}\text{N}$ ]8h7mGua в суточной моче составило 48% и 16% от количества введенного вещества соответственно [16].

В процессе компьютерного скрининга ингибиторов поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 (PARP1), предпринятого нашей группой, была обнаружена потенциальная способность 7mGua связываться с ферментом и взаимодействовать с ключевыми остатками активного центра Gly863 и Tyr907 [18]. Предварительное исследование подтвердило ингибиторное действие 7mGua в отношении рекомбинантной PARP1 человека [19]. PARP1 активируется в клетке под воздействием различных стрессовых факторов и осуществляет синтез поли(ADP-рибозы) (PAR), используя в качестве субстрата  $\text{NAD}^+$  [20–22]. Химиотерапия онкологических заболеваний зачастую основана на применении ДНК-повреждающих агентов. Активация фермента PARP1 на образовавшихся разрывах ДНК и синтезируемый им сигнальный полимер PAR привлекает белки репарации ДНК в область повреждения, что приводит к снижению эффективности действия препаратов [23–26]. В случае патологий сердечно-сосудистой, нервной, иммунной и дыхательной систем также наблюдается активация PARP1, приводящая к истощению запаса  $\text{NAD}^+$  и запуску механизмов клеточной гибели [27–29].

Разработка ингибиторов PARP1 является приоритетным направлением в медицинской химии и фармакологии. В последнее время для лечения онкологических заболеваний были одобрены синтетические ингибиторы олапариб, рупапариб и нирапариб [30–32]. К сожалению, широкое использование данных соединений затруднено ввиду вызываемых ими серьезных побочных эффектов, в частности, развития у некоторых пациентов миелодиспластического синдрома [33–35]. Природные соединения, такие как 7mGua и его производные, могут иметь более благоприятный токсикологический профиль по сравнению с синтетическими ингибиторами PARP1, что подтверждается данными QSAR-моделирования свойств 7mGua [18]. Следует отметить, что 7mGua является также известным ингибитором тРНК-гуанинтрансгликозилазы (TGT), катализирующей замену гуанина на кьюин в тРНК [36, 37]. Недавно было показано, что при недостатке TGT существенно снижается пролиферация и миграция опухолевых клеток [38]. Ингибиторное действие 7mGua в отношении нескольких молекулярных мишеней, PARP1 и TGT, может представлять интерес с точки зрения полифармакологии [39, 40].

В представленной работе проведен подробный анализ ингибиторного действия 7mGua и его метаболита 8h7mGua в отношении PARP1 с использованием разработанного ранее метода определения ферментативной активности, основанного на детекции анизотропии флуоресценции [41]. Для доказательства селективности 7mGua и 8h7mGua по отношению к PARP1 было также исследовано их влияние на ферментативную активность ряда других белков репарации ДНК – апуриновую/апириминовую эндонуклеазу 1 (APE1), ДНК-полимеразу  $\beta$  (Pol $\beta$ ) и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу 1 (TDP1).

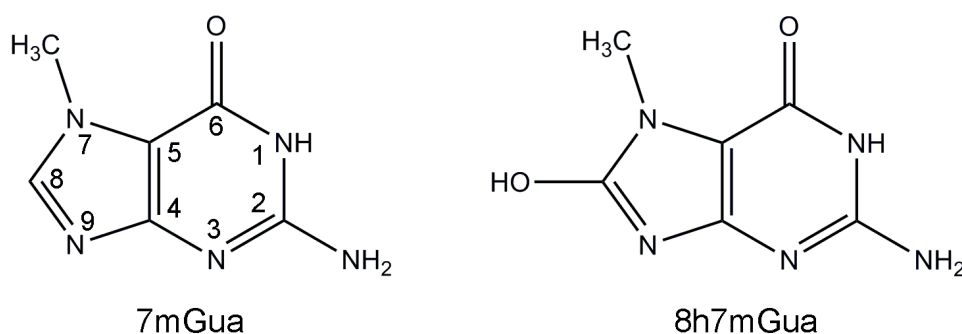


Рис. 1. Химические структуры природных азотистых оснований 7mGua и 8h7mGua

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 7mGua, приобретенный в «Sigma-Aldrich» (США, каталожный номер 67073). Синтез 8h7mGua осуществили согласно схеме, представленной на рис. 2, с использованием ранее опубликованных методик [42, 43]. Более подробное описание дано в Приложении.

Бакуловирус, несущий кДНК PARP1 человека, был любезно предоставлен д-ром В. Шрайбер (École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Франция). Рекомбинантный белок PARP1 экспрессировали в суспензионной культуре клеток насекомых Sf9 и выделяли согласно ранее описанной методике [44]. Для активации PARP1 использовали ДНК-дуплекс, образованный олигонуклеотидами 5'-GGAA-GACCCTGACGTTCCCAACTTTATCGCC-FAM-3' (содержит флуорофор FAM на 3'-конце), 5'-GGCGATAAAGTTGGG-3' и 5'-р- AACGTCAGGGTCTTCC-3' (содержит 5'-концевой фосфат). Данный ДНК-дуплекс представляет собой модель поврежденной ДНК.

Для оценки активности PARP1 использовали методику, основанную на измерении анизотропии флуоресценции ДНК [41]. Реакционная смесь содержала буфер (50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ DTT, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 100 нМ меченый ДНК-дуплекс, 200 нМ PARP1, а также исследуемое вещество в определенной концентрации. Реакцию иници-

ировали добавлением раствора NAD<sup>+</sup>. Измерение флуоресценции проводили при 25 °С в режиме кинетического анализа на планшетном флуориметре CLARIOstar («BMG Labtech», Германия), длина волны возбуждения составляла 482 нм, эмиссии – 530 нм. Длительность и число циклов определяли индивидуально в зависимости от количества сканируемых лунок. В типичном эксперименте длительность измерения флуоресценции составляла 30–40 мин, интервалы между двумя последовательными измерениями – 30–40 с. Анизотропию рассчитывали по формуле:

$$A = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}), \quad (1)$$

где  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  – интенсивность флуоресцентного света, поляризованного в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

Изучение влияния 7mGua и 8h7mGua на активность ферментов репарации APE1, Polβ и TDP1 проводили с использованием ранее опубликованных методик [45–47], более подробное описание дано в Приложении.

Докинг молекул 7mGua и 8h7mGua в активный центр модели PARP1, полученной в предыдущей работе [18], осуществляли с помощью программы Lead Finder 1708 в режиме «extra precision» [48, 49]. Для визуализации полученных структур использовали программу VMD 1.9 [50]. Прогнозирование спектра биологической активности 7mGua и 8h7mGua выполнили с помощью компьютерной про-

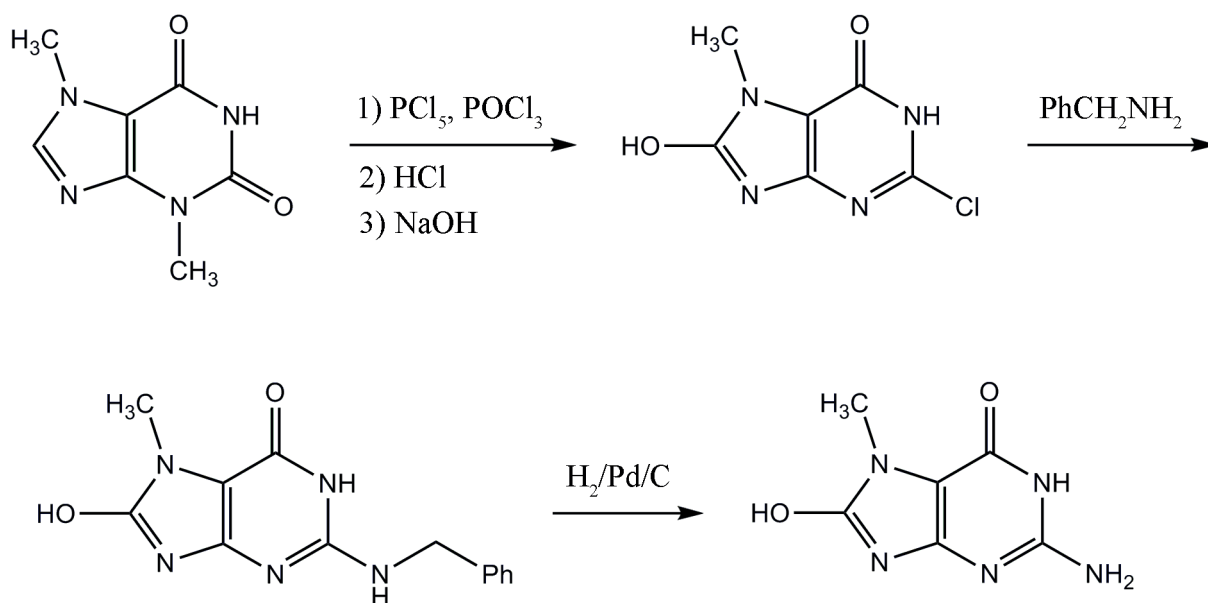


Рис. 2. Схема синтеза 8h7mGua. В качестве исходного соединения использовали теобромин

граммы PASS 2020 [51]. Данная программа способна предсказывать механизм действия органических соединений на основе анализа взаимосвязей «структура-активность» для обучающей выборки, содержащей информацию о структуре и активности более 1,3 млн биологически активных соединений, со средней точностью около 97%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования влияния 7mGua и 8h7mGua на активность PARP1 использовали ранее разработанную тест-систему, в основе которой лежит измерение анизотропии флуоресценции меченого ДНК-дуплекса, с которым связывается PARP1 [41]; при этом в методику были внесены некоторые дополнения, касающиеся алгоритма расчета начальной скорости реакции. Уровень анизотропии отражает размер комплекса, в состав которого включён флуорофор. Анизотропия свободного ДНК-дуплекса минимальна, так как он является небольшой легко вращающейся молекулой. При образовании комплекса PARP1–ДНК наблюдается существенное повышение анизотропии флуоресценции вследствие ограничения подвижности флуорофора. При внесении в реакционную смесь  $\text{NAD}^+$  происходит запуск реакции автомодификации PARP1. Наращивание отрицательно заряженного полимера PAR, присоединенного к PARP1, приводит к снижению степени ассоциации PARP1 с ДНК-дуплексом, и следовательно – к постепенному снижению анизотропии (рис. 3).

При расчете начальной скорости реакции делали допущение, что, по крайней мере в начальный период времени, изменение анизотропии линейно зависит от концентрации каталитически активного комплекса PARP1–ДНК, и что диссоциированная форма PARP1 каталитически неактивна. Кинетические данные анизотропия-время аппроксимировались уравнением биэкспоненциально убывающей зависимости:

$$A = A_{\infty} + a \cdot e^{-bt} + c \cdot e^{-dt}, \quad (2)$$

где  $t$  – время;  $a, b, c, d$  – коэффициенты уравнения;  $A_{\infty}$  – расчетное значение анизотропии при  $t \rightarrow \infty$ . Применение более простого уравнения экспоненциально убывающей зависимости давало худший результат (таблица S1 в Приложении).

Полученные коэффициенты  $a, b, c$  и  $d$  использовали для расчета начальной скорости реакции по формуле:

$$V = R \cdot (a \cdot b + c \cdot d) / (A_0 - A_{\infty}), \quad (3)$$

где  $A_0$  – расчетное значение анизотропии при  $t = 0$ .

Поскольку  $A_0 = A_{\infty} + a + c$ , уравнение скорости реакции приобретает вид:

$$V = R \cdot (a \cdot b + c \cdot d) / (a + c), \quad (4)$$

где  $R$  – коэффициент для получения значений скорости с классической размерностью М/мин:

$$R = [\text{NAD}^+]_0 \text{ при } [\text{NAD}^+]_0 / [\text{E}] \leq n, \quad (5)$$

$$R = n \cdot [\text{E}] \text{ при } [\text{NAD}^+]_0 / [\text{E}] > n, \quad (6)$$

где  $[\text{NAD}^+]_0$  – начальная концентрация  $\text{NAD}^+$ ,  $[\text{E}]$  – концентрация PARP1,  $n$  – экспериментально установленное минимальное значение соотношения  $[\text{NAD}^+]_0 / [\text{E}]$ , при котором достигается полная диссоциация комплекса PARP1–ДНК, что выражается в увеличении  $A_0 - A_{\infty}$  (или  $a + c$ ) до максимального значения. Анализ зависимости  $(a + c)$  от концентрации  $\text{NAD}^+$  при постоянной концентрации PARP1 позволил установить, что среднее значение  $n$  равняется 210. По-видимому, это значение соответствует критическому числу остатков ADP-рибозы в молекуле автомодифицированной PARP1, которая полностью утрачивает способность связываться с ДНК-дуплексом.

Для расчета  $\text{IC}_{50}$  (концентрация ингибитора, при которой начальная скорость реакции снижается на 50%) определяли значения скорости реакции при разных концентрациях потенциального ингибитора, а затем полученные экспериментальные данные аппроксимировали двухпараметрическим уравнением логистической кривой:

$$V_i / V = 1 / (1 + ([I] / \text{IC}_{50})^h), \quad (7)$$

где  $V_i$  – начальная скорость реакции в присутствии тестируемого ингибитора,  $V$  – скорость реакции без ингибитора;  $[I]$  – концентрация ингибитора;  $h$  – коэффициент кооперативности.

Оказалось, что 8h7mGua, подобно метаболитическому предшественнику 7mGua, оказывает выраженное ингибиторное действие на ферментативную активность PARP1 (рис. 4). Оба соединения дозозависимым образом подавляют активность PARP1 при концентрациях  $\text{NAD}^+$  10–100 мкМ, но при этом 8h7mGua является бо-

лее сильным ингибитором (рис. 4 и рис. S1, S2 в Приложении). Об этом свидетельствуют более низкие значения  $IC_{50}$  при всех рассмотренных концентрациях  $NAD^+$  (таблица). Величина  $IC_{50}$  7mGua и 8h7mGua прямо пропорционально

зависит от концентрации субстрата  $NAD^+$ , что указывает на конкурентный характер их действия. Приблизительная концентрация  $NAD^+$  в ядре клетки составляет 100 мкМ [52]. При такой концентрации субстрата полученные нами зна-

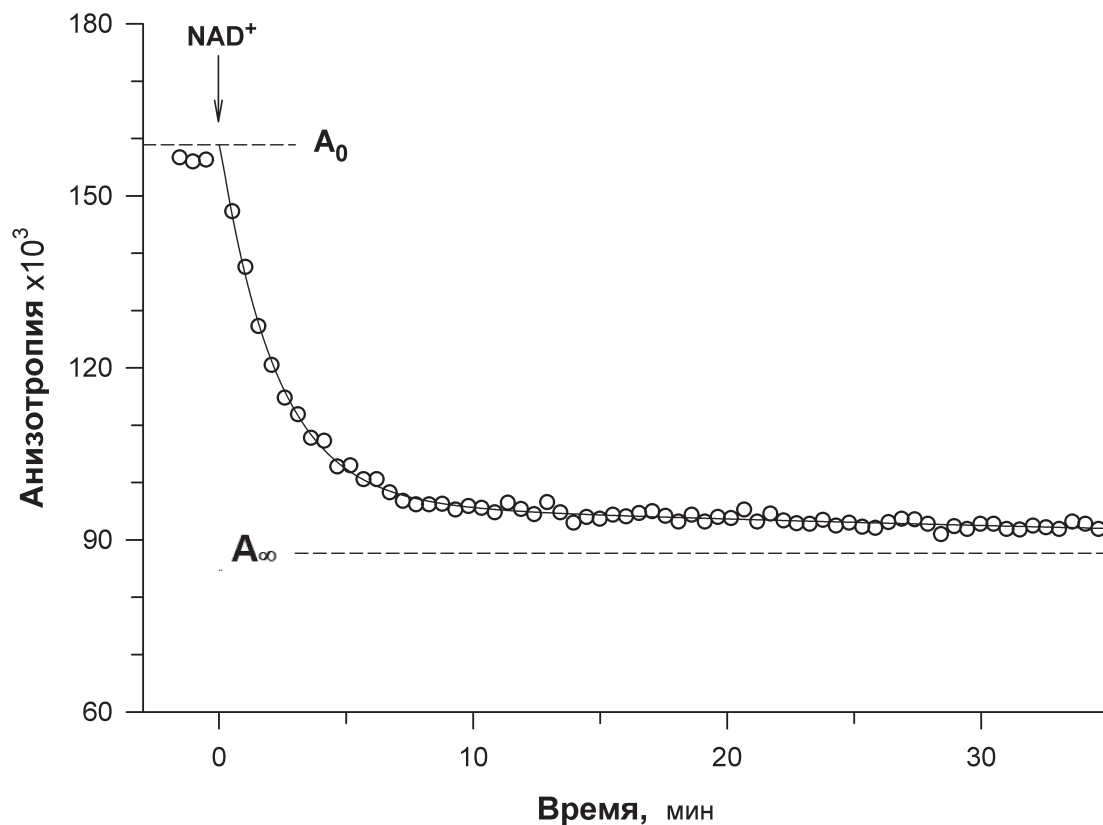


Рис. 3. Анализ скорости реакции, катализируемой PARP1, путем измерения анизотропии флуоресценции

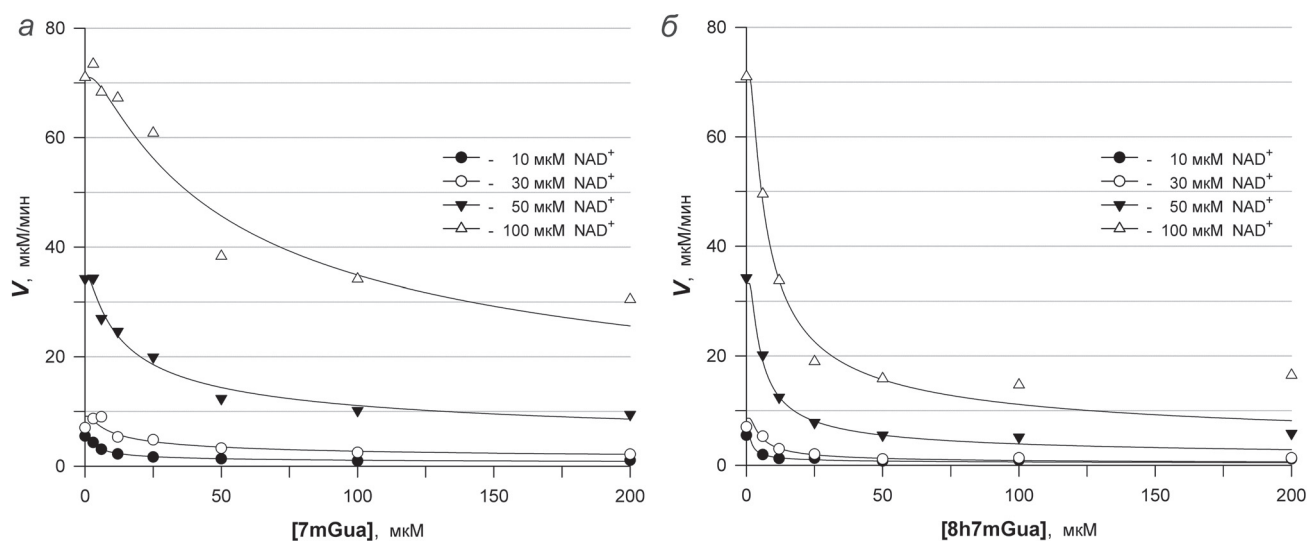


Рис. 4. Влияние 7mGua (а) и 8h7mGua (б) на начальную скорость реакции, катализируемой PARP1, при разных концентрациях субстрата  $NAD^+$



Расчетные значения  $IC_{50}$  для ингибиторного действия 7mGua и 8h7mGua в отношении PARP1 при разных концентрациях  $NAD^+$

$[NAD^+]_0$ , мкМ	$IC_{50}$ , мкМ	
	7mGua	8h7mGua
10	$8,0 \pm 0,3^*$	$3,6 \pm 0,3$
30	$23,1 \pm 3,1$	$7,3 \pm 0,6$
50	$29,4 \pm 4,2$	$7,6 \pm 0,5$
100	$78,1 \pm 14,1$	$11,0 \pm 1,1$

Примечание. \* Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибки среднего.

чения  $IC_{50}$  для 7mGua и 8h7mGua составили 78 и 11 мкМ соответственно.

Для выяснения молекулярного механизма действия 7mGua и 8h7mGua были сконструированы модели комплексов с PARP1. В случае 7mGua наблюдали ранее охарактеризованные взаимодействия с остатками активного центра: водородные связи с Gly863 и Ser904, гидрофобный контакт с Ala898 и  $\pi$ -стэкинг с Tyr907 (рис. 5, а) [18, 19]. В случае 8h7mGua наблюдали вышеперечисленные взаимодействия, а также дополнительный контакт с каталитиче-

ским остатком Glu988. Гидроксильная группа 8h7mGua ориентируется в сторону боковой цепи Glu988 и способна формировать водородную связь (рис. 5, б), что может обуславливать более эффективное ингибирование по сравнению с 7mGua.

Способность 7mGua и 8h7mGua ингибировать другие белки репарации ДНК была исследована на примерах APE1, Pol $\beta$  (ферменты эксцизионной репарации оснований) и TDP1 (фермент, отщепляющий от ДНК 3'-аддукты). APE1 расщепляет сахарофосфатный остов апуринового/апириμιдинового (АП) сайта [53, 54]. В качестве субстрата APE1 использовали радиоактивно меченый ДНК-дуплекс длиной 31 н.о., содержащий АП-сайт в положении 12. Продукт расщепления данного субстрата длиной 11 н.о. можно детектировать на электрофореграмме (рис. 6, а). Pol $\beta$  катализирует удаление 5'-концевого dRP-фрагмента, возникающего в результате расщепления АП-сайта ферментом APE1, и дальнейшее встраивание комплементарного матрице остатка для заполнения образовавшейся брешы [55, 56]. В качестве субстрата Pol $\beta$  использовали ДНК-дуплекс с расщепленным АП-сайтом, продуктом ре-

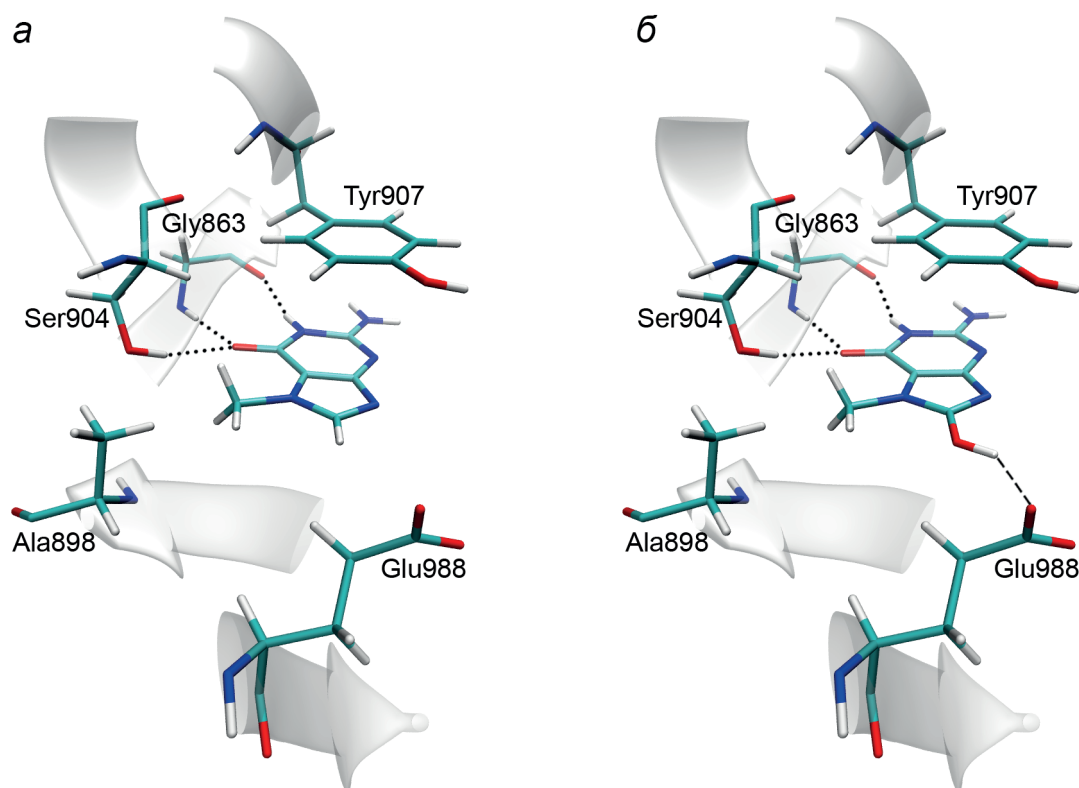
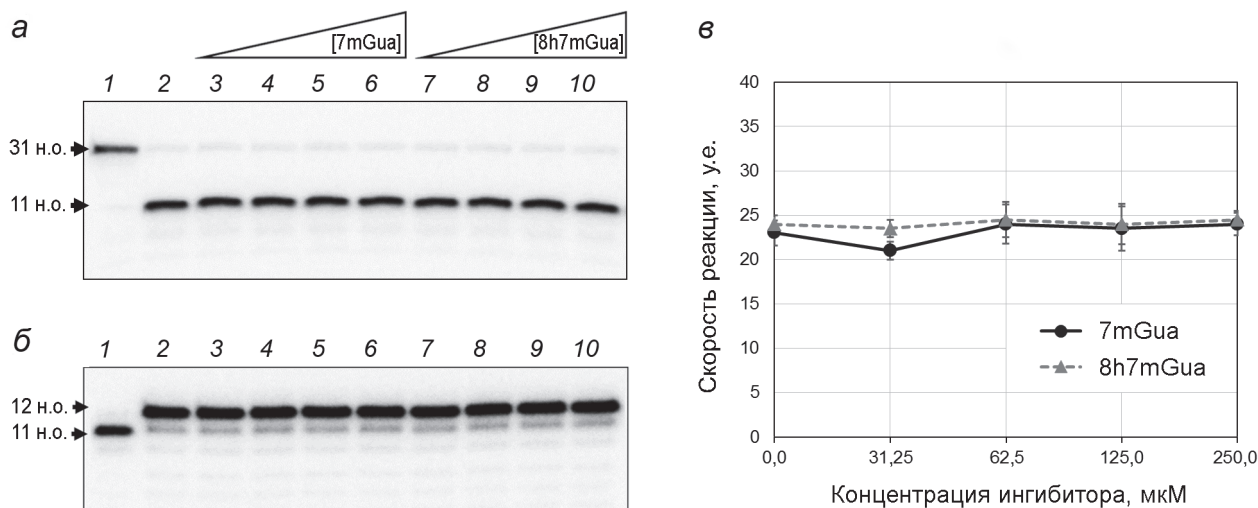


Рис. 5. Позиции ингибиторов 7mGua (а) и 8h7mGua (б) в активном центре PARP1, полученные методом молекулярного докинга. Гидроксильная группа 8h7mGua направлена в сторону боковой цепи Glu988, что делает возможным формирование дополнительной водородной связи



**Рис. 6.** Проверка влияния 7mGua и 8h7mGua на активность ряда ферментов репарации ДНК. *а* – Электрофореграмма, отражающая активность APE1; 1: ДНК-субстрат (31 н.о.), 2: ДНК+APE1, 3–6: ДНК+APE1+7mGua (33, 75, 150, 300 мкМ), 7–10: ДНК+APE1+8h7mGua (33, 75, 150, 300 мкМ). *б* – Электрофореграмма, отражающая активность Polβ; 1: ДНК-субстрат (11 н.о.), 2: ДНК+Polβ, 3–6: ДНК+Polβ+7mGua (33, 75, 150, 300 мкМ), 7–10: ДНК+Polβ+8h7mGua (3, 75, 150, 300 мкМ). *в* – Активность TDP1 при возрастающей концентрации исследуемых соединений

акции являлся олигонуклеотид длиной 12 н.о. (рис. 6, б). TDP1 отщепляет 3'-аддукты различного происхождения, восстанавливая таким образом структуру ДНК [57, 58]. В качестве субстрата TDP1 использовали олигонуклеотид, содержащий флуорофор на 5'-конце и тушитель флуоресценции на 3'-конце [47]. Отщепление тушителя с помощью TDP1 приводит к возгоранию флуоресценции, которое можно регистрировать в реальном времени (рис. 6, в). В результате было показано отсутствие ингибиторного эффекта 7mGua и 8h7mGua в отношении APE1, Polβ и TDP1 в широком интервале концентраций.

Согласно полученным результатам, 7mGua и 8h7mGua ингибируют PARP1 и не влияют на активность ряда других белков репарации ДНК, что указывает на селективность их действия. Для подкрепления данного вывода было осуществлено предсказание возможной активности 7mGua и 8h7mGua в отношении более широкого набора молекулярных мишеней с помощью программы PASS. В результате анализа списка видов активности, для которых оценка вероятности  $P_a$  составила более 0,6, не было обнаружено APE1, Polβ, TDP1 и других белков репарации ДНК. В то же время предсказывается наличие активности в отношении TGT – известной дополнительной мишени 7mGua ( $P_a = 0,685$ ; вопрос ингибирования TGT более подробно рассмотрен во Введении), а также некоторых ферментов метаболизма бактерий.

Таким образом, использование методики, основанной на измерении анизотропии флуоресценции, позволило охарактеризовать и сравнить ингибиторные свойства 7mGua и его метаболита 8h7mGua в отношении рекомбинантной PARP1 человека. Показано, что оба соединения подавляют активность PARP1, но при этом 8h7mGua обладает более выраженным ингибиторным эффектом. Это обусловлено дополнительным взаимодействием 8h7mGua с каталитическим остатком Glu988. Также показано отсутствие влияния 7mGua и 8h7mGua на активность других ферментов системы репарации ДНК (APE1, Polβ, TDP1), что свидетельствует о селективности их действия. Поскольку PARP1 является доказанной терапевтической мишенью для лечения различных заболеваний, подавление ее активности с помощью природных соединений 7mGua и 8h7mGua может представлять значительный интерес. В дальнейших экспериментах *in vitro* и *in vivo* следует учитывать, что молекула 7mGua обладает свойствами пролекарства, превращаясь в организме в более активный метаболит – 8h7mGua.

**Вклад авторов.** Д.К. Нилов – концепция и руководство работой; Т.А. Кургина, С.И. Шрам, М.М. Кутузов, Т.В. Абрамова, Т.А. Щербакова, Е.А. Мальцева, В.В. Поройков и Д.К. Нилов – проведение экспери-

ментов; Т.А. Кургина, С.И. Шрам, Т.В. Абрамова и Д.К. Нилов – написание текста; О.И. Лаврик и В.К. Швядас – обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-74-10072) за исключением указанных далее работ. Выделение и очистка ферментов APE1 и Pol $\beta$  выполнены при поддержке РФФИ (грант № 20-34-90095). Компьютерное прогнозирование биологической активности выполнено в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100170-5).

**Конфликт интересов.** Д.К. Нилов и В.К. Швядас являются авторами патента на использование 7mGua для подавления ферментативной активности PARP1. Д.К. Нилов, С.И. Шрам, Т.А. Щербакова и В.К. Швядас являются авторами патентной заявки на использование 8h7mGua для подавления ферментативной активности PARP1.

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

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weissmann, B., Bromberg, P. A., and Gutman, A. B. (1957) The purine bases of human urine. I. Separation and identification, *J. Biol. Chem.*, **224**, 407-422.
- Weissmann, B., Bromberg, P. A., and Gutman, A. B. (1957) The purine bases of human urine. II. Semiquantitative estimation and isotope incorporation, *J. Biol. Chem.*, **224**, 423-434.
- Weissmann, B., and Gutman, A. B. (1957) The identification of 6-succinoaminopurine and of 8-hydroxy-7-methylguanine as normal human urinary constituents, *J. Biol. Chem.*, **229**, 239-250.
- Svoboda, P., and Kasai, H. (2004) Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents, *Anal. Biochem.*, **334**, 239-250.
- Rodríguez-Gonzalo, E., Hernández-Prieto, R., García-Gómez, D., and Carabias-Martínez, R. (2013) Capillary electrophoresis-mass spectrometry for direct determination of urinary modified nucleosides. Evaluation of synthetic urine as a surrogate matrix for quantitative analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **942-943**, 21-30.
- Račkowska, E., Bobrowska-Korczak, B., and Giebułtowicz, J. (2019) Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for determination of methylated nucleosides and nucleobases in urine, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1128**, 121775.
- Shuman, S. (2002) What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 619-625.
- Shafer, B., Chu, C., and Shatkin, A. J. (2005) Human mRNA cap methyltransferase: Alternative nuclear localization signal motifs ensure nuclear localization required for viability, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 2644-2649.
- Topisirovic, I., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., and Shatkin, A. J. (2011) Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **2**, 277-298.
- Park, J. W., and Ames, B. N. (1988) 7-Methylguanine adducts in DNA are normally present at high levels and increase on aging: Analysis by HPLC with electrochemical detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7467-7470.
- Mustonen, R., and Hemminki, K. (1992) 7-Methylguanine levels in DNA of smokers' and non-smokers' total white blood cells, granulocytes and lymphocytes, *Carcinogenesis*, **13**, 1951-1955.
- Tamae, K., Kawai, K., Yamasaki, S., Kawanami, K., Ikeda, M., et al. (2009) Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine, *Cancer Sci.*, **100**, 715-721.
- Craddock, V. M., Mattocks, A. R., and Magee, P. N. (1968) The fate of 7[<sup>14</sup>C]-methylguanine after administration to the rat, *Biochem. J.*, **109**, 75-78.
- Kaina, B., Heindorff, K., and Aurich, O. (1983) O<sup>6</sup>-methylguanine, but not N7-methylguanine or N3-methyladenine, induces gene mutations, sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, **108**, 279-292.
- Kerr, S. J. (1990) Methylated oxypurines and induction of differentiation of murine erythroleukemia cells, *Mol. Cell. Biochem.*, **92**, 37-44.
- Litwack, M. D., and Weissmann, B. (1966) Source of urinary 8-hydroxy-7-methylguanine in man, *Biochemistry*, **5**, 3007-3012.
- Skupp, S., and Ayzavian, J. H. (1969) Oxidation of 7-methylguanine by human xanthine oxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, **73**, 909-916.
- Нилов Д.К., Тараров В.И., Куликова А.В., Захаренко А.Л., Гущина И.В., и др. (2016) Ингибирование поли(ADP-рибозо)полимеразы метаболитом



- нуклеиновых кислот 7-метилгуанином, *Acta Naturae*, **8**, 120-128.
19. Nilov, D., Maluchenko, N., Kurgina, T., Pushkarev, S., Lys, A., et al. (2020) Molecular mechanisms of PARP-1 inhibitor 7-methylguanine, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2159.
  20. Шиловский Г. А., Хохлов А. Н., Шрам С. И. (2013) Система поли(ADP-рибозил)ирования белков: роль в поддержании стабильности генома и детерминации продолжительности жизни, *Биохимия*, **78**, 473-487.
  21. 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.
  22. Нилов Д. К., Пушкарев С. В., Гущина И. В., Манасарян Г. А., Кирсанов К. И., и др. (2020) Моделирование фермент-субстратных комплексов поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 человека, *Биохимия*, **85**, 116-125.
  23. Cepeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., et al. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **1**, 39-53.
  24. 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.
  25. Efremova, A. S., Zakharenko, A. L., Shram, S. I., Kulikova, I. V., Drenichev, M. S., et al. (2013) Disaccharide pyrimidine nucleosides and their derivatives: a novel group of cell-penetrating inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase 1, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **32**, 510-528.
  26. Lord, C. J., Tutt, A. N., and Ashworth, A. (2015) Synthetic lethality and cancer therapy: Lessons learned from the development of PARP inhibitors, *Annu. Rev. Med.*, **66**, 455-470.
  27. Curtin, N. J., and Szabo, C. (2013) Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1217-1256.
  28. Henning, R. J., Bourgeois, M., and Harbison, R. D. (2018) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: Mechanisms of action and role in cardiovascular disorders, *Cardiovasc. Toxicol.*, **18**, 493-506.
  29. Berger, N. A., Besson, V. C., Boulares, A. H., Bürkle, A., Chiarugi, A., et al. (2018) Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 192-222.
  30. Frampton, J. E. (2015) Olaparib: A review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer, *BioDrugs*, **29**, 143-150.
  31. Mittica, G., Ghisoni, E., Giannone, G., Genta, S., Aglietta, M., et al. (2018) PARP inhibitors in ovarian cancer, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **13**, 392-410.
  32. 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.
  33. Ohmoto, A., and Yachida, S. (2017) Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions, *Onco Targets Ther.*, **10**, 5195-5208.
  34. Walsh, C. (2018) Targeted therapy for ovarian cancer: the rapidly evolving landscape of PARP inhibitor use, *Minerva Ginecol.*, **70**, 150-170.
  35. 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.
  36. Farkas, W. R., Jacobson, K. B., and Katzev, J. R. (1984) Substrate and inhibitor specificity of tRNA-guanine ribosyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta*, **781**, 64-75.
  37. Johannsson, S., Neumann, P., and Ficner, R. (2018) Crystal structure of the human tRNA guanine transglycosylase catalytic subunit QTRT1, *Biomolecules*, **8**, 81.
  38. Zhang, J., Lu, R., Zhang, Y., Matuszek, Z., Zhang, W., et al. (2020) tRNA Queuosine modification enzyme modulates the growth and microbiome recruitment to breast tumors, *Cancers (Basel)*, **12**, 628.
  39. Bolognesi, M. L. (2013) Polypharmacology in a single drug: multitarget drugs, *Curr. Med. Chem.*, **20**, 1639-1645.
  40. Medina-Franco, J. L., Giulianotti, M. A., Welmaker, G. S., and Houghten, R. A. (2013) Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery, *Drug Discov. Today*, **18**, 495-501.
  41. Kurgina, T. A., Anarbaev, R. O., Sukhanova, M. V., and Lavrik, O. I. (2018) A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity, *Anal. Biochem.*, **545**, 91-97.
  42. Borowitz, I. J., Bloom, S. M., Rothschild, J., and Sprinson, D. B. (1965) Methylated purines and pyrimidines. I. Syntheses of 8-hydroxy-7-methylguanine and methylation of a 5-(benzylideneamino) pyrimidine, *Biochemistry*, **4**, 650-655.
  43. Fischer, E. (1895) Verwandlung des Theobromins in Methylirte Harnsäuren, *Chem. Ber.*, **28**, 2480-2495.
  44. Amé, J. C., Kalisch, T., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2011) Purification of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases, *Methods Mol. Biol.*, **780**, 135-152.
  45. Iliina, E. S., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2018) Unusual interaction of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) with abasic sites via the Schiff-base-dependent mechanism, *Biochimie*, **150**, 88-99.
  46. Belousova, E. A., Vasil'eva, I. A., Moor, N. A., Zatsepin, T. S., Oretskaya, T. S., et al. (2013) Clustered DNA lesions containing 5-formyluracil and AP site: Repair via the BER system, *PLoS One*, **8**, e68576.
  47. Zakharenko, A., Khomenko, T., Zhukova, S., Koval, O., Zakharova, O., et al. (2015) Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 2044-2052.
  48. Stroganov, O. V., Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Kulkov, V., et al. (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.
  49. Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Zeifman, A. A., Stroganov, O. V., Kulkov, V., et al. (2012) Lead Finder docking and virtual screening evaluation with Astex and DUD test sets, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **26**, 725-735.

50. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38.
51. Филимонов Д. А., Дружиловский Д. С., Лагунин А. А., Глориозова Т. А., Рудик А. В., и др. (2018) Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения, *Biomed. Chem. Res. Methods*, **1**, e00004.
52. Koch-Nolte, F., Fischer, S., Haag, F., and Ziegler, M. (2011) Compartmentation of NAD<sup>+</sup>-dependent signaling, *FEBS Lett.*, **585**, 1651-1656.
53. Demple, B., Herman, T., and Chen, D. S. (1991) Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: Definition of a family of DNA repair enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11450-11454.
54. Халиуллин И. Г., Нилов Д. К., Шаповалова И. В., Шведас В. К. (2012) Построение механистической полноатомной модели апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека APE1 для виртуального скрининга новых ингибиторов, *Acta Naturae*, **4**, 83-89.
55. Matsumoto, Y., and Kim, K. (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair, *Science*, **269**, 699-702.
56. Beard, W. A., and Wilson, S. H. (2006) Structure and mechanism of DNA polymerase Beta, *Chem. Rev.*, **106**, 361-382.
57. Pouliot, J. J., Robertson, C. A., and Nash, H. A. (2001) Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Cells*, **6**, 677-687.
58. Гушина И. В., Нилов Д. К., Захаренко А. Л., Лаврик О. И., Шведас В. К. (2017) Моделирование структуры и скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека, *Acta Naturae*, **9**, 62-69.

## INHIBITORY EFFECTS OF 7-METHYLGUANINE AND ITS METABOLITE 8-HYDROXY-7-METHYLGUANINE ON HUMAN POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1

T. A. Kurgina<sup>1#</sup>, S. I. Shram<sup>2#</sup>, M. M. Kutuzov<sup>1</sup>, T. V. Abramova<sup>1</sup>, T. A. Shcherbakova<sup>3</sup>, E. A. Maltseva<sup>1</sup>, V. V. Poroikov<sup>4</sup>, O. I. Lavrik<sup>1,5</sup>, V. K. Švedas<sup>6,7</sup>, and D. K. Nilov<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Molecular Genetics, National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology, 119991 Moscow, Russia; e-mail: nilovdm@gmail.com

<sup>4</sup> Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>6</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia

<sup>7</sup> Lomonosov Moscow State University, Research Computing Center, 119991 Moscow, Russia

Previously, we have found that a nucleic acid metabolite 7-methylguanine (7mGua) produced in the body can have an inhibitory effect on the poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) enzyme, an important pharmacological target in anticancer therapy. In this work, using an original method of analysis of PARP1 activity based on the measurement of fluorescence anisotropy, we studied the inhibitory properties of 7mGua and its metabolite, 8-hydroxy-7-methylguanine (8h7mGua). Both compounds dose-dependently inhibited the PARP1 enzymatic activity, however, 8h7mGua was shown to be a stronger inhibitor. The IC<sub>50</sub> values for 8h7mGua at different concentrations of the NAD<sup>+</sup> substrate were found to be 4 times lower, on average, than those for 7mGua. The more efficient binding of 8h7mGua in the PARP1 active site is explained by the presence of an additional hydrogen bond with the Glu988 catalytic residue. Experimental and computational studies did not reveal the effect of 7mGua and 8h7mGua on the activity of other DNA repair enzymes, indicating the selectivity of their inhibitory action.

**Keywords:** poly(ADP-ribose) polymerase, DNA repair, inhibitor, 7-methylguanine, 8-hydroxy-7-methylguanine