

**РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК ТИРОЗИЛ-ДНК-  
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ И ЕГО ПРИРОДНОГО МУТАНТА SCAN1 В КАЧЕСТВЕ  
ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Е.М. Мамонтова<sup>1,2</sup>

Научный руководитель: к.х.н. А.Л. Захаренко

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, 630090

E-mail: [evgeniya.mm.94@gmail.com](mailto:evgeniya.mm.94@gmail.com)

**TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1 (TDP1) AND ITS NATURAL MUTANT SCAN1  
INHIBITORS DEVELOPMENT AS PROTOTYPES OF DRUGS**

Е.М. Mamontova<sup>1,2</sup>

Scientific Supervisor: PhD A.L. Zakharenko

<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova 2, 630090

<sup>2</sup>Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,

Russia, Novosibirsk, Akademika Lavrentieva Ave. 8, 630090

E-mail: [evgeniya.mm.94@gmail.com](mailto:evgeniya.mm.94@gmail.com)

***Abstract.** In the present study, we performed screening of 21 compounds – derivatives of coumarin as inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) and its mutant SCAN1. The ability of these compounds to inhibit Tdp1, important target for anti-cancer therapy, was studied. The most active derivatives have IC<sub>50</sub> value of 0,1-1 mkM. SCAN1 inhibitors were found first in the world. They can likely underlie the development of drugs preventing or slowing the progressive cerebellar atrophy to improve quality of life of SCAN patients.*

**Введение.** Цитотоксический эффект двух основных клинически одобренных методов лечения злокачественной опухоли (химиотерапия или радиация) напрямую связан с их способностью вызывать повреждения ДНК. В то же время способность раковых клеток распознавать повреждения ДНК и инициировать репарацию ДНК является ключевым механизмом терапевтической резистентности к химиотерапии. А потому поиск мишеней для ферментов репарации ДНК, используемый для противоракового терапевтического воздействия, может быть использован в качестве стратегии потенцирования цитотоксичности имеющихся ДНК-разрушающих агентов.

Одним из перспективных ферментов-мишеней для создания лекарственных препаратов является тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 [1].

Tdp1 относится к классу фосфодиэстераз – ферментов, расщепляющих фосфодиэфирные связи. Tdp1 играет важную роль в удалении повреждений ДНК, создаваемых топоизомеразой 1 (Top1), ее ингибитором камптотецином и антираковыми препаратами. Таким образом, Tdp1 противостоит ингибиторам Top1, которые являются достаточно эффективными антираковыми препаратами.

В активном центре Tdp1 находится два консервативных каталитических остатка гистидина: нуклеофильный гистидин, атакующий субстрат с формированием ковалентного 3'-фосфогистидинового интермедиата, и гистидин-общее основание/кислота, который разрывает связь Tdp1-ДНК [2].

Природный мутант Tdp1 с заменой His-493 на Arg-493 вызывает тяжелое нейродегенеративное заболевание – синдром спинocerebellарной атаксии с аксональной нейропатией (SCAN1). Точные молекулярные механизмы, приводящие к заболеванию SCAN1, до сих пор непонятны. У пациентов со SCAN1 этот фенотип не проявляется до второй декады жизни и не связан с повышенным риском онкологических заболеваний или иммунодефицитных состояний. Вероятно, патологию вызывает накопление образующихся в ходе реакции ковалентных интермедиатов SCAN1-ДНК [3]. Это позволяет предполагать, что подавление активности SCAN1 улучшит состояние этих пациентов и/или предотвратит прогрессирование болезни. В настоящее время данные об ингибиторах SCAN1 отсутствуют. Таким образом, целью работы является разработка ингибиторов ферментов Tdp1 и SCAN1 в качестве прототипов лекарственных препаратов.

**Материалы и методы исследования.** В ходе исследуемой реакции происходит отщепление тушителя флуоресценции, катализируемой ферментами Tdp1 и SCAN1 с использованием биосенсора олигонуклеотида New7FAM/BHQ (5'-FAM-ggaagaccctgacgt-BHQ1-3'). Данный биосенсор представляет собой 16-мерный одноцепочечный олигонуклеотид, несущий FAM – флуорофор на 5'-конце и тушитель флуоресценции Black Hole Quencher 1 (BHQ1) на 3'-конце. Интенсивность флуоресценции флуорофора возрастает при удалении тушителя. В качестве потенциальных ингибиторов ферментов Tdp1 и SCAN1 были использованы соединения, представляющие собой производные природного биологически активного вещества кумарина. Для измерения флуоресценции использовался флуориметр POLARstar OPTIMA производства BMG LABTECH.

Реакционные смеси объемом 200 мкл содержали буфер (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 50 мМ NaCl; 7 мМ меркаптоэтанол), 50 нМ олигонуклеотид и различные концентрации ингибиторов. Реакция запускалась добавлением одного из ферментов: Tdp1 до конечной концентрации 1,5 нМ или SCAN1 до конечной концентрации 150 нМ. Измерения проводились в линейном диапазоне зависимости скорости реакции от времени (до 8 минут) через каждые 55 секунд. Влияние предлагаемых соединений оценивали по величине IC<sub>50</sub> (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижена наполовину). Обсчет значений IC<sub>50</sub> проводился с помощью программы MARS Data Analysis 2.0 (BMG LABTECH).

Определение цитотоксичности производных кумарина проводили с помощью стандартного МТТ-теста на клеточных линиях HeLa (клетки рака шейки матки человека) и HEK 293 (клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека) [4].

**Результаты.** В ходе работы было проверено действие 21 вещества на скорость реакции отщепления тушителя флуоресценции. Обнаружено 6 соединений, обладающих ингибирующей активностью по отношению к SCAN1, 14 – по отношению к Tdp1. Для данных ингибиторов были определены значения IC<sub>50</sub> (Табл. 1). Ингибирующая способность некоторых веществ как по отношению к Tdp1, так и по отношению к SCAN1 говорит о действии данных ингибиторов на стадию связывания фермента с субстратом, либо на первую стадию ферментативной реакции (образование ковалентного комплекса с ДНК). Тогда как вещества, ингибирующие только Tdp1, влияют на вторую стадию ферментативного катализа, которая отсутствует в случае SCAN1.

Цитотоксичность соединений определить не удалось, т.к. значения CC<sub>50</sub> оказались выше 100 мкМ и не могут быть определены в связи с ограниченной растворимостью веществ. Единственным исключением оказалось соединение 52984 при воздействии на клетки HeLa, величина CC<sub>50</sub> 11 мкМ.

Таблица 1

Значения  $IC_{50}$  для исследуемых ингибиторов

Ингибитор	$IC_{50}$ (SCAN1)	$IC_{50}$ (Tdp1)	Ингибитор	$IC_{50}$ (SCAN1)	$IC_{50}$ (Tdp1)
45744	-	15,4±4,5 мкМ	52646	-	7,6±1,3 мкМ
49689	3,5±2,3 мкМ	(9,9±4,4)*10 <sup>-8</sup> М	52984	6,0±1,5 мкМ	(3,6±1,9)*10 <sup>-7</sup> М
50227	-	12,9±3,0 мкМ	54924	-	3,1±0,8 мкМ
51792	13,9±5,6 мкМ	0,25 мкМ	55562	-	(2,7±1,9)*10 <sup>-7</sup> М
51918	25,1±13,7 мкМ	0,5 мкМ	56104	-	5,6±1,9 мкМ
52144	-	3,5±0,3 мкМ	56301	17,6±6,1 мкМ	(9,8±6,0)*10 <sup>-7</sup> М
52466	-	0,85±0,5 мкМ	56709	14,1±1,9 мкМ	1,3±0,1 мкМ

**Вывод.** Проведен скрининг 21 соединения – производных камптотецина как ингибиторов Tdp1 и SCAN1. Для данных ингибиторов были определены ингибиторные характеристики в отношении Tdp1 и SCAN1, цитотоксичность для перевиваемых опухолевых клеток, а также предположительный механизм ингибирования реакции.

Обнаружены ингибиторы Tdp1 со значением  $IC_{50} \sim 10^{-7}$  М, что на сегодняшний день является результатом мирового уровня. Данные соединения показали низкую цитотоксичность по отношению к клеткам НЕК 293 и HeLa. Низкая цитотоксичность ингибиторов ( $CC_{50} > 100$  мкМ) имеет большое значение для дальнейшего применения данных веществ в комбинации с противораковыми препаратами, используемыми в настоящее время. Ожидается, что ингибиторы Tdp1 усилят чувствительность раковых клеток к ингибиторам Top1, применяемым в клинической практике. Таким образом, производные кумарина являются ингибиторами Tdp1, перспективными для дальнейшей разработки сенсibilizаторов опухолевых клеток к действию традиционных химиопрепаратов.

Ингибиторы мутантной формы SCAN1 обнаружены впервые в мире. Полученные результаты могут быть применены для дальнейшей разработки препаратов на основе изученных ингибиторов для подавления активности фермента у пациентов, страдающих от заболевания SCAN, и как следствие улучшения их состояния и предотвращения прогрессирования болезни.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dexheimer TS., Antony S., Marchand C., Pommier Y. (2008) Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase as a Target for Anticancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, V. 8, no 4, pp. 381–389.
2. Kuznetsov N.A., Lebedeva N.A., Kuznetsova A.A., Rechkunova N.I., Dyrkheeva N.S., Kupryushkin MS<sup>1</sup>, Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S., Lavrik O.I. (2016) Pre-steady state kinetics of DNA binding and abasic site hydrolysis tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *J Biomol Struct Dyn*, V. 16, pp. 1-14.
3. Interthal H., Chen H.J., Kehl-Fie T.E., Zotzmann J., Leppard J.B., Champoux J.J. (2005) SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme-DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity. *EMBO J*, V. 24, no 12, pp. 2224–2233.
4. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth*, V. 65, pp. 55–63.