













doi 10.18699/vjgb-25-114

Влияние димерных бисбензимидазолов на активность ферментов репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстераз 1 и 2 и поли(АДФ-рибоза)полимераз 1 и 2

Н.С. Дырхеева ¹, И.А. Чернышова ¹, А.Ф. Арутюнян ², А.А. Захаренко ¹, М.М. Кутузов ¹, К.Н. Науменко ¹,
А.С. Вензель ³, В.А. Иванисенко ³, С.М. Деев ⁴, А.А. Жузе ², О.И. Лаврик ¹ 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

 lavrik@1bio.ru

Аннотация. Онкологические заболевания остаются одной из главных причин патологической смертности в мире, что определяет дизайн противораковых препаратов как ключевое направление медицинской химии. Комбинация ингибиторов ферментов репарации ДНК с ингибиторами топоизомераз – перспективный подход для усиления противоракового действия и снижения токсичности химиотерапии. Особый интерес представляют узкобороздочные ДНК-лиганды, способные эффективно ингибировать ДНК-зависимые ферменты, обладая при этом низкой токсичностью и мутагенностью. Ряд исследовательских групп, включая нашу, разрабатывает ингибиторы ферментов репарации ДНК, действующие одновременно на несколько взаимосвязанных мишеней {тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1/2 (TDP1/TDP2), поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 (PARP1)/TDP1, топоизомеразы 1 (TOP1)/TDP1}. Такие бифункциональные ингибиторы призваны решить проблему резистентности опухолевых клеток к известным химиопрепаратам и повысить эффективность последних. В настоящем исследовании представлены данные скрининга ингибирующей активности 22 узкобороздочных лигандов, взаимодействующих с ДНК, – бис- и трисбензимидазолов – в отношении четырех ферментов репарации: TDP1, TDP2, PARP1 и PARP2. Изучены четыре серии димерных соединений и их мономерных единиц. Показана разница в ингибирующей активности димерных бисбензимидазолов в зависимости от структуры соединения и фермента. Мономерные и димерные бисбензимидазолы эффективно ингибируют активность TDP1 в микромолярном и субмикромолярном диапазоне IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования). Димерные соединения групп $DB_2Py(n)$ и $DB_3P(n)$ проявили более значительную ингибирующую активность в отношении ферментативной реакции с участием TDP1 по сравнению с мономерами, входящими в их состав. Для всех исследованных соединений была показана низкая ингибирующая способность в отношении остальных трех ферментов репарации ДНК, т. е. наблюдается их специфическое воздействие именно на TDP1. Следует отметить, что в данной работе в экспериментах с TDP1 и TDP2 было исключено действие исследуемых соединений как узкобороздочных лигандов, связывающихся с ДНК, и исследовано их непосредственное воздействие на фермент. По результатам молекулярного докинга можно предположить возможность прямого взаимодействия изучаемых соединений с активным центром TDP1. Согласно результатам моделирования, ингибиторы располагаются в области связывания 3'-конца ДНК с активным центром TDP1 и могут образовывать устойчивые связи с каталитически значимыми остатками активного центра His263 и His493. Эти взаимодействия, вероятно, обеспечивают высокую ингибирующую активность соединений, наблюдаемую в биохимических экспериментах.

Ключевые слова: тирозил-ДНК фосфодиэстераза 1 (TDP1); ингибитор TDP1; ингибирующая активность; TDP2; PARP1; PARP2; ДНК-лиганды; производные бисбензимидазола

Для цитирования: Дырхеева Н.С., Чернышова И.А., Арутюнян А.Ф., Захаренко А.А., Кутузов М.М., Науменко К.Н., Вензель А.С., Иванисенко В.А., Деев С.М., Жузе А.А., Лаврик О.И. Влияние димерных бисбензимидазолов на активность ферментов репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстераз 1 и 2 и поли(АДФ-рибоза)полимераз 1 и 2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(7):1097-1108. doi 10.18699/vjgb-25-114

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта № 25-74-30006 Российского научного фонда (получение ферментов и определение уровня их активности) и в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300658-9 (олигонуклеотидный синтез, использование оборудования общего пользования).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Биоинформатика» за предоставленные вычислительные ресурсы и программное обеспечение. Авторы благодарят Рашида Октамовича Анарбаева (ИХБФМ СО РАН) за предоставленный препарат фермента TDP2.

The effect of dimeric bisbenzimidazoles on the activity of DNA repair enzymes TDP1, TDP2, PARP1 and PARP2

N.S. Dyrkheeva ¹, I.A. Chernyshova ¹, A.F. Arutyunyan ², A.L. Zakharenko ¹, M.M. Kutuzov ¹, K.N. Naumenko ¹,
A.S. Venzel ³, V.A. Ivanisenko ³, S.M. Deyev ⁴, A.L. Zhuze ², O.I. Lavrik ¹ 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² The Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

 lavrik@1bio.ru

Abstract. Oncological diseases remain a leading cause of pathological mortality worldwide, making the development of anticancer drugs a critical focus in medicinal chemistry. A promising strategy to enhance therapeutic efficacy and reduce chemotherapy-induced toxicity involves the combined inhibition of DNA repair enzymes and topoisomerases. Of particular interest are minor-groove DNA ligands, which exhibit potent inhibition of DNA-dependent enzymes while having low toxicity and mutagenicity. A number of research groups, including ours, are developing inhibitors of DNA repair enzymes that act simultaneously on several targets: tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1/2 (TDP1/TDP2), poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)/TDP1, topoisomerase 1 (TOP1)/TDP1. Such bifunctional inhibitors are designed to resolve the problem of tumor cell resistance to known chemotherapy drugs and increase the effectiveness of the latter. In this study, we evaluated the inhibitory activity of 22 minor-groove DNA ligands – bis- and trisbenzimidazoles against four key repair enzymes: TDP1, TDP2, PARP1, and PARP2. Four series of dimeric compounds and their monomeric units were studied. The difference in inhibitory activity of dimeric bisbenzimidazoles depending on the structure of the compound and the enzyme is shown. Our findings reveal distinct structure-activity relationships, with monomeric and dimeric ligands exhibiting potent TDP1 inhibition at micromolar to submicromolar IC_{50} values (half-maximal inhibitory concentration). Notably, dimeric compounds from the $DB_2Py(n)$ and $DB_3P(n)$ series demonstrated superior TDP1 inhibition compared to their monomers. In contrast, all tested compounds showed negligible activity against the other three repair enzymes; so, the compounds demonstrate specificity to TDP1. It should be noted that in this work, in the experiments with TDP1 and TDP2, the effect of the tested compounds as narrow-groove ligands binding to DNA was excluded, and their direct effect on the enzyme was investigated. The results of molecular docking suggest the possibility of direct interaction of active compounds with the active center of TDP1. According to the results of modeling, the inhibitors are located in the binding region of the 3'-end of DNA in the active site of TDP1 and could form stable bonds with the catalytically significant TDP1 residues His263 and His493. These interactions probably provide the high inhibitory activity of the compounds observed in biochemical experiments.

Key words: tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1); TDP1 inhibitor; inhibitory activity; TDP2; PARP1; PARP2; DNA-ligands; bisbenzimidazole derivatives

For citation: Dyrkheeva N.S., Chernyshova I.A., Arutyunyan A.F., Zakharenko A.L., Kutuzov M.M., Naumenko K.N., Venzel A.S., Ivanisenko V.A., Deyev S.M., Zhuze A.L., Lavrik O.I. The effect of dimeric bisbenzimidazoles on the activity of DNA repair enzymes TDP1, TDP2, PARP1 and PARP2. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(7):1097-1108. doi 10.18699/vjgb-25-114

Введение

Для понимания механизмов поддержания генетической стабильности и предотвращения развития различных заболеваний ведутся активные исследования ферментов репарации ДНК. Нарушения в работе систем репарации ДНК приводят к накоплению модифицированных оснований, разрывов и других повреждений, что увеличивает риск развития онкологических и других заболеваний. Изучение функционирования систем репарации помогает выявить причины наследственных заболеваний, нейродегенеративных дисфункций, связанных с нарушениями репарации, а также разработать новые методы терапии и профилактики онкологических заболеваний.

В последние годы большое внимание исследователи уделяют ферментам репарации ДНК как мишеням для разработки лекарственных средств. Ведется поиск новых соединений, подавляющих активность ферментов репарации ДНК, для повышения эффективности противораковой терапии. Ингибирование ферментов, участвующих в репарации, приводит к гибели раковых клеток за счет

накопления повреждений ДНК, вызванных химиотерапией или лучевой терапией. В качестве перспективных мишеней для создания лекарственных препаратов рассматриваются такие ферменты репарации, как тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 и 2 (TDP1 и TDP2) и поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 и 2 (PARP1 и PARP2) (Pommier et al., 2014; Curtin, Szabo, 2020; Zakharenko et al., 2023).

TDP1 – фермент репарации ДНК, который участвует в удалении ковалентных аддуктов топоизомеразы 1 (TOP1) с ДНК, катализируя гидролиз фосфодиэфирной связи между остатком тирозина-723 TOP1 и 3'-фосфатной группой в одноцепочечном разрыве ДНК, генерируемом TOP1. TDP1 способна также удалять другие аддукты ДНК-белков, расположенные на 3'-конце ДНК, и различные другие повреждения на 3'-конце ДНК (Comeaux, van Waardenburg, 2014; Kawale, Povirk, 2018). TDP2 катализирует гидролиз ковалентных аддуктов между ДНК и остатком тирозина-804 активного центра топоизомеразы 2 (TOP2) (Pommier et al., 2010). TDP2 удаляет ковалентные аддукты из ДНК, расположенные на 5'-конце ДНК, путем

гидролиза 5' фосфодиэфирной связи, что приводит к образованию ДНК со свободным 5' фосфатом (Pommier et al., 2014). TDP1 и TDP2 способны в некоторой степени брать на себя функции друг друга, поскольку TDP1 обладает низкой активностью в реакции расщепления 5'-фосфотирозильных связей, а TDP2 – в реакции расщепления 3'-фосфотирозильных связей (Zeng et al., 2012; Pommier et al., 2014).

В настоящее время ингибиторы топоизомераз широко применяются в клинической практике в качестве противоопухолевых препаратов. Из них наиболее часто используют топотекан и иринотекан, подавляющие активность топоизомеразы 1, а также этопозид, направленный на топоизомеразу 2 (Pommier et al., 2010). Механизм их действия заключается в образовании ковалентных аддуктов топоизомераз с ДНК, остановке репликации, что в итоге приводит к подавлению клеточной пролиферации. Различными исследователями высказывалось мнение (Pommier et al., 2014; Zakharenko et al., 2015) о том, что применение ингибиторов TDP1 и TDP2, повышающих эффективность ингибиторов топоизомераз, может позволить снизить дозу этих достаточно токсичных лекарств и, как следствие, токсичность терапии. На сегодняшний день идет активный поиск ингибиторов TDP1 (Zakharenko et al., 2023; Zhang M. et al., 2025). Особо выделяются производные природных соединений, таких как усниновая кислота, берберины, кумарины, нуклеозиды и стероиды (Zakharenko et al., 2023), которые эффективно подавляют активность очищенного фермента TDP1 и являются сенситизаторами топотекана в экспериментах, проведенных на клеточных и мышиных моделях рака (Zakharenko et al., 2023; Kornienko et al., 2024). Среди ингибиторов TDP2 следует отметить деазафлавины, считающиеся одними из самых активных для этого фермента (Marchand et al., 2016).

Ферменты PARP1 и PARP2 служат ключевыми регуляторами репарации ДНК и других клеточных процессов. Они катализируют ДНК-зависимый синтез разветвленного полимера поли(АДФ-рибозы) (PAR) и последующее АДФ-рибозилирование белков. АДФ-рибозилирование белков – это посттрансляционная модификация, которая индуцируется в ответ на повреждение ДНК. PARP1 участвует в различных путях репарации ДНК (Ray Chaudhuri, Nussenzweig, 2017; Lavrik, 2020). PARP2 также является ДНК-зависимым PAR-илирующим агентом и способна частично заменить PARP1 (Lavrik, 2020; Szanto et al., 2024), поэтому поиск ингибиторов PARP1 и PARP2 считается актуальной задачей современной медицинской химии. В клинической практике для лечения рака яичников, фаллопиевых труб, молочной железы и брюшины одобрены такие ингибиторы PARP1 и PARP2, как олапариб, рупапариб, нирапариб, велипариб и талазопариб (Kim D.-S. et al., 2021). Используемые ингибиторы работают по принципу синтетической летальности для уничтожения раковых клеток с дефектами в системе гомологичной рекомбинации (например, при мутациях BRCA1/2), превращая одноцепочечные разрывы ДНК в двуцепочечные, которые не могут быть эффективно восстановлены, что приводит к гибели раковой клетки. Активные центры PARP1 и PARP2 очень похожи (Schreiber et al., 2006; Hoch, Polo, 2019), поэтому известные на сегодняшний день ингибиторы чаще

всего действуют на оба фермента, а также на другие ферменты семейства PARP. Проводится поиск селективных ингибиторов каждого из этих ферментов (Johannes et al., 2024). Одобренные для клинического применения ингибиторы PARP весьма токсичны и вызывают тяжелые побочные эффекты, поэтому поиск новых ингибиторов активно продолжается (Murai et al., 2014; Kim D.-S. et al., 2021; Johannes et al., 2024).

Один из перспективных классов соединений для поиска новых ингибиторов ферментов репарации – низкомолекулярные ДНК-связывающие агенты. Особый интерес представляют узкобороздочные ДНК-лиганды, которые способны ингибировать ДНК-зависимые ферменты, не обладают при этом высокой токсичностью и мутагенностью, а также хорошо растворимы в воде. Такие ДНК-лиганды характеризуются низким уровнем изменения геометрии ДНК и отсутствием образования ковалентных сшивок при формировании комплекса с ДНК (Arutyunyan et al., 2023a).

Наша научная группа имеет значительный опыт как экспериментального исследования потенциальных ингибиторов на уровне индивидуальных белковых мишеней, клеток и животных моделей (Zakharenko et al., 2023), так и применения методов молекулярного докинга и моделирования для изучения механизмов взаимодействия малых молекул с белками-мишенями. Были найдены эффективные ингибиторы TDP1, подавляющие активность рекомбинантного фермента TDP1 в субмикромольном диапазоне концентраций. Соединения-лидеры являлись сенситизаторами топотекана в экспериментах, проведенных на клеточных культурах и на мышиных моделях опухолей (Zakharenko et al., 2023; Kornienko et al., 2024). Нами разработаны и исследованы ингибиторы PARP1, PARP2 и PARP3 на основе конъюгатов АДФ и морфолинонуклеозидов с использованием структурного моделирования активных сайтов этих ферментов (Sherstyuk et al., 2019; Chernyshova et al., 2024).

В настоящей работе приводятся данные скрининга 22 узкобороздочных лигандов в качестве ингибиторов TDP1, TDP2, PARP1 и PARP2. Исследуемые соединения являются производными бис- и трисбензимидазола. Изучены четыре мономерных соединения – MB₂, MB₂(Ac), MB₂Py(Ac), MB₃, а также четыре серии димерных производных. Димерные производные были получены путем конденсации мономерных субъединиц дикарбоновыми кислотами – DB₂P(n), DB₂Py(n) и DB₃P(n), где n – количество метиленовых звеньев в линкере (рис. 1).

Показано, что активность соединений варьирует в зависимости от их структуры и типа ферментативной мишени. Выявлена выраженная ингибирующая активность соединений в отношении TDP1, причем наблюдаемая корреляция говорит об увеличении активности ингибитора при введении в его структуру дополнительных связывающих блоков, таких как пирролкарбоксамидный фрагмент для серии DB₂Py(n), или при использовании комбинации из трех бензимидазольных блоков в мономерной субъединице. Несмотря на то что для серии DB₃(n) наблюдались высокие значения IC₅₀, это явление может быть объяснено высокой склонностью членов данного ряда соединений к агрегации, поскольку введение пиперазинового фрагмента в линкер в серии DB₃P(n) привело к получению

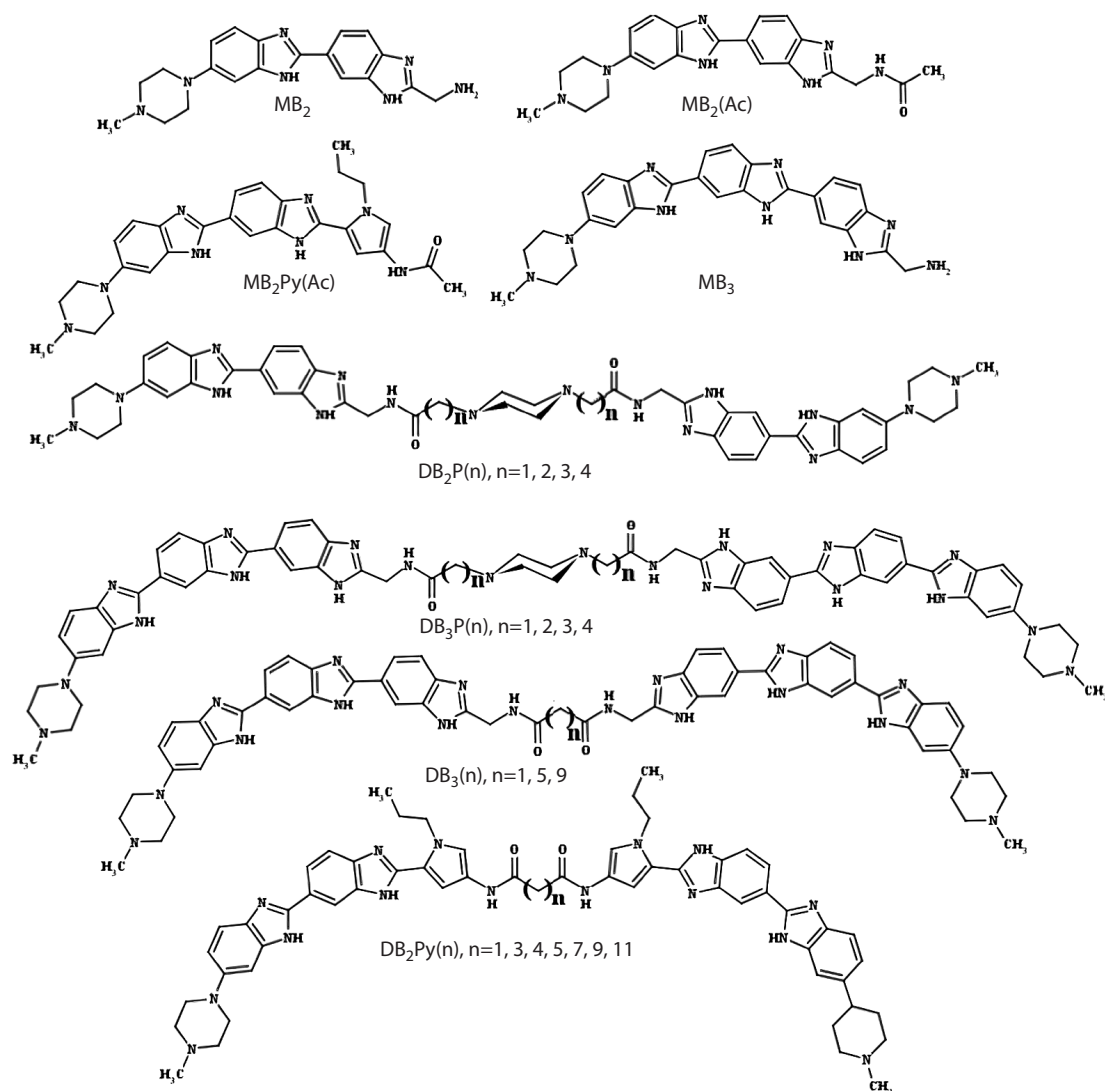


Рис. 1. Структуры исследованных производных бисбензимидазола.

ингибиторов с самыми низкими значениями IC_{50} , что косвенно подтверждает наше предположение. С целью выяснения возможного механизма их ингибирующего действия для этого фермента был проведен молекулярный докинг, результаты которого позволяют предположить наличие прямого взаимодействия между активными соединениями и ферментом TDP1. Согласно построенной модели связывания, ингибиторы располагаются в области ДНК-связывающего кармана TDP1 и способны образовывать устойчивые контакты с каталитически важными аминокислотными остатками His263 и His493. Эффективность действия этих соединений как ингибиторов TDP1 подтверждена экспериментальными данными. Результаты работы могут быть использованы для рационального дизайна новых, еще более эффективных ингибиторов TDP1.

Материалы и методы

Используемые материалы. Исследуемые соединения были синтезированы в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН в лаборатории ДНК-белковых взаимодействий согласно ранее разработанным методикам

(Ivanov et al., 2015; Arutyunyan et al., 2023a, b; Susova et al., 2024). Список названий соединений по IUPAC приведен в Приложении¹.

Рекомбинантные белки человека тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) и тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 2 (TDP2) были экспрессированы в системе *E. coli*, поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1) и поли(АДФ-рибоза)полимераза 2 (PARP2) – в клетках насекомых с использованием бакуловирусной системы экспрессии и очищены, как описано в работах (Sukhanova et al., 2004; Sherstyuk et al., 2019; Dyrkheeva et al., 2020, 2021).

Олигонуклеотид 5'-FAM-AAC GTC AGG GTC TTC C-BHQ1-3' синтезирован в лаборатории химии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия) согласно (Zakharenko et al., 2015).

Определение активности фермента TDP1. Реакционная смесь (200 мкл) для флуоресцентной детекции активности фермента TDP1 в реальном времени (Zakharenko

¹ Табл. S1, S2 и рис. S1–S4 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx40.pdf>

et al., 2015) содержала реакционный буферный раствор TDP1 (50 mM Трис-НCl, pH 8.0, 50 mM NaCl и 7 mM β -меркаптоэтанола), 50 nM олигонуклеотида 5'-FAM-AAC GTC AGG GTC TTC C-BHQ1-3', тестируемое в качестве ингибитора соединения в различных концентрациях и TDP1 в конечной концентрации 1.5 nM. Реакционные смеси инкубировали при постоянной температуре 26 °C в планшетном флуориметре POLARstar OPTIMA (BMG LABTECH, GmbH, Ортенберг, Германия). Интенсивность флуоресценции (Ex485/Em520 nm) измеряли каждую минуту в течение 10 мин. Средние значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50} – концентрация соединения, которая ингибировала 50 % активности фермента по сравнению с необработанной контрольной лункой, содержащей только фермент и субстрат) определяли с помощью кривой зависимости уровня флуоресцентного сигнала от концентрации ингибитора и рассчитывали с использованием MARS Data Analysis 2.0 (BMG LABTECH). Кинетические кривые были получены минимум в трех независимых экспериментах и статистически обработаны в OriginPro 8.6.0 (OriginLab, Нортгемптон, Массачусетс, США).

Определение активности фермента TDP2. Для определения активности фермента TDP2 в качестве субстрата были использованы олигонуклеотид 5'-тирозин-AAC GTC AGG GTC TTC C-FAM-3', содержащий метку 6-FAM на 3'-конце, и остаток L-тирозина, присоединенный через фенольную OH-группу к 5'-концевому фосфату, синтезирован в российско-франко-японской лаборатории бионанотехнологии НГУ, как описано в работе (Dyrkheeva et al., 2021). Субстрат в концентрации 100 nM инкубировали с TDP2 в концентрации 200 nM в отсутствие или в присутствии ингибитора (500 мкМ) в течение 10 мин при 37 °C в буфере, содержащем 50 mM Трис-НCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 7 mM β -меркаптоэтанола (Dyrkheeva et al., 2021). Реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения в ПААГ (ТВЕ, 10 % формамид, 7 М мочевины, 20 mM ЭДТА, 0.1 % ксиленилалкоголь и 0.1 % бромфеноловый синий). Далее образцы нагревали при 90 °C в течение 5 мин. Продукты ферментативной реакции разделяли электрофорезом в 20 % денатурирующем ПААГ с 7 М мочевиной при соотношении акриламида к бисакриламиду 19:1. Для сканирования геля и визуализации использовали высокоразрешающий лазерный сканер Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения QuantityOne 4.6.7 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). Было проведено минимум три независимых эксперимента, статистическую обработку выполняли в программе OriginPro 8.6.0 (OriginLab, Нортгемптон, Массачусетс, США).

Для определения активности ферментов PARP1 и PARP2 в присутствии и в отсутствие тестируемых соединений радиоактивно меченный [32 P]-NAD⁺ синтезировали из α -[32 P]-АТФ согласно протоколу (Sherstyuk et al., 2019). Реакцию автополи(АДФ-рибозил)ирования проводили в буфере для PARP1: 50 mM Трис-НCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl и 7 mM β -меркаптоэтанола, а также 2 ое/мл активированной ДНК, 0.3 mM [32 P]-NAD⁺

при 37 °C. Инициировали реакцию добавлением PARP1 до 200 nM и проводили в течение 2 мин.

Буфер для PARP2 содержал: 50 mM Трис-НCl, pH 8.0, 3 mM спермина, 150 mM NaCl и 7 mM β -меркаптоэтанола, 2 ое/мл активированной ДНК, 0.6 mM [32 P]-NAD⁺ при 37 °C. Реакцию инициировали добавлением PARP2 до 600 nM, реакционные смеси инкубировали в течение 5 мин. Останавливали реакцию помещением аликвот по 5 мкл на бумажные фильтры Whatman 1, пропитанные 5 % трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Фильтры промывали 5 % ТХУ четыре раза и высушивали на воздухе после удаления ТХУ с 90 % этанолом. Включение радиоактивной метки в продукт реакции рассчитывали с помощью сканера Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США). Проводили минимум три независимых эксперимента.

Молекулярное моделирование. Для оценки взаимодействия исследуемых соединений с ферментом TDP1 нами был проведен молекулярный докинг с последующим анализом полученных комплексов. Исследование включало подготовку структур белка и лигандов, молекулярный докинг, минимизацию энергии соединений в сайте связывания и оценку аффинности ингибиторов с использованием Vinardo, X-Score и REF2015.

В качестве структуры белка-мишени была выбрана кристаллическая структура TDP1 (PDB ID: 8V0B). Отсутствующие в модели петли были восстановлены на основании предсказания AlphaFold2 (Jumper et al., 2021), выполненного в ColabFold (Mirdita et al., 2022) без множественного выравнивания (MSA) и со структуры 8V0B в качестве шаблона.

Далее к полученной модели были добавлены атомы водорода и рассчитаны заряды с применением утилиты DockPrep в UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Структуры ингибиторов были подготовлены в OpenBabel (O'Boyle et al., 2011): добавлены водороды, рассчитаны частичные заряды и проведена геометрическая минимизация.

Для молекулярного докинга была привлечена программа UCSF DOCK 6.11 (Allen et al., 2015). Использовался полноатомный гибкий докинг по всей поверхности белка. На первом этапе докинга осуществлялось позиционирование базовых фрагментов ингибиторов (MB₂(Ac), MB₂Ry(Ac)), после чего проводился докинг полноразмерных молекул с последующей минимизацией их энергии в сайте связывания. Для каждого соединения было запрошено до девяти лучших по GridScore конформаций. Из полученных девяти конформаций для каждого лиганда отбиралась та структура, которая имела минимальный RMSD относительно оптимальной конформации базового фрагмента. В случаях, когда DOCK6 вернул менее девяти уникальных конформаций (вследствие кластеризации, фильтрации по энергии или неудачи генерации дополнительных конформеров), отбор выполнялся из всех доступных конформаций (табл. S1).

Финальную оценку способности связывания ингибиторов с белком проводили с использованием нескольких независимых скоринг-функций: ContinuousScore из DOCK 6, Vinardo (Quiroga, Villarreal, 2016), X-Score (Wang R. et al., 2002), а также REF2015 в среде PyRosetta4 (Chaudhury et

al., 2010; Alford et al., 2017) в соответствии с протоколом (Moretti et al., 2016). ContinuousScore – скоринг-функция в DOCK 6, учитывающая ван-дер-ваальсовы взаимодействия, электростатические взаимодействия, внутреннюю энергию лиганда и штрафы за стерические конфликты при прямом расчете межатомных расстояний. Vinardo – скоринг-функция для докинга, учитывающая вклад водородных связей, гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, а также поправки на неоптимальное позиционирование лигандов. Скоринг-функция X-Score состоит из трех составляющих: HPScore, HMScore и HSScore, основанных на различных эмпирических принципах для оценки сродства лиганд–белок. В данном исследовании использовалась усредненная X-Score, отражающая влияние гидрофобных, полярных и электростатических контактов. Полноатомная скоринг-функция REF2015, реализованная в PyRosetta, включает вклад ван-дер-ваальсовых, электростатических, водородных, сольватных и дополнительных атомных парных взаимодействий и позволяет корректно ранжировать близкие по энергии позиции ингибиторов.

Для валидации результатов молекулярного докинга и оценки стабильности предсказанного комплекса во времени было проведено молекулярно-динамическое моделирование комплекса TDP1 с соединением-лидером DB₂Py(1),

показавшим наилучшую ингибирующую активность. Моделирование выполнялось с использованием пакета OpenMM 8 (Eastman et al., 2024). Подробный протокол молекулярно-динамического моделирования представлен в Приложении.

Результаты

В настоящей работе была впервые изучена способность четырех серий димерных ДНК-лигандов DB₂P(n), DB₂Py(n), DB₃(n), DB₃P(n), а также их мономерных единиц MB₂, MB₂(Ac), MB₂Py(Ac) и MB₃ (см. рис. 1) ингибировать активность рекомбинантных ферментов репарации ДНК TDP1 и TDP2, PARP1 и PARP2 (см. таблицу).

Первая группа исследуемых соединений представляет собой димерные производные мономерного бисбензимидазольного лиганда MB₂, производного широко изученного узкобороздочного ДНК-лиганда Hoechst 33258, в котором гидроксифенильная группа заменена на более гидрофильный аминотиленовый фрагмент – DB₂P(n). В качестве линкера для соединений этой группы были использованы 1,4-пиперазиндиалкилдикарбоновые кислоты, содержащие метиленовый, этиленовый, пропиленовый или бутиленовый спейсер (см. рис. 1). Также данная серия была дополнена мономерным производным MB₂(Ac), ацилированным по аминотиленовому фрагменту, что

Способность тестируемых соединений ингибировать активность ферментов TDP1, TDP2, PARP1 и PARP2

№ п/п	Соединение	IC ₅₀ TDP1, мкМ	TDP2	PARP1	PARP2
			Остаточная активность (%) при 500 мкМ соединения		
1	MB ₂	2 ± 1	~100	~100	~100
2	MB ₂ (Ac)	1.5 ± 0.5	~100	~100	~100
3	DB ₂ P(1)	6 ± 4	66 ± 7	57 ± 16	~100
4	DB ₂ P(2)	9 ± 3	44 ± 11	51 ± 15	80 ± 20
5	DB ₂ P(3)	4.1 ± 0.6	36 ± 7	37 ± 10	64 ± 16
6	DB ₂ P(4)	2.3 ± 0.3	44 ± 11	33 ± 13	85 ± 13
7	MB ₂ Py(Ac)	5 ± 2	~100	~100	~100
8	DB ₂ Py(1)	0.25 ± 0.05	55 ± 3	~100	~100
9	DB ₂ Py(3)	0.41 ± 0.09	70 ± 11	~100	~100
10	DB ₂ Py(4)	0.4 ± 0.15	~100	~100	~100
11	DB ₂ Py(5)	0.35 ± 0.13	~100	~100	~100
12	DB ₂ Py(7)	0.28 ± 0.01	~100	~100	~100
13	DB ₂ Py(9)	0.30 ± 0.08	~100	~100	~100
14	DB ₂ Py(11)	0.9 ± 0.1	~100	~100	~100
15	MB ₃	0.70 ± 0.05	~100	65 ± 15	~100
16	DB ₃ (1)	>50	70 ± 6	55 ± 13	~100
17	DB ₃ (5)	>50	65 ± 10	62 ± 16	~100
18	DB ₃ (9)	>50	~100	~100	~100
19	DB ₃ P(1)	0.10 ± 0.05	~100	70 ± 12	~100
20	DB ₃ P(2)	0.11 ± 0.01	~100	40 ± 5	~100
21	DB ₃ P(3)	0.20 ± 0.05	~100	47 ± 14	~100
22	DB ₃ P(4)	0.15 ± 0.03	~100	48 ± 15	~100

Примечание. Для значений величин IC₅₀ и остаточной активности фермента (%) в присутствии ингибитора приведено среднее значение ± стандартное отклонение (не менее трех повторов).

структурно приближает это соединение, по сравнению с MB₂, к половине димерного соединения DB₂P(n) и делает его более корректным препаратом для сравнения. Серия DB₂P(n) отличается от других серий лигандов наличием в структуре линкера положительно заряженного 1,4-пиперазина, что улучшает растворимость лиганда и может увеличивать сродство лиганда к ферменту.

Следующая группа соединений – производные мономерного трисбензимидазольного соединения MB₃, которое можно рассматривать как производное MB₂, содержащее на один бензимидазольный фрагмент больше, что увеличивает количество потенциально возможных водородных связей в комплексе ингибитор–TDP1. Димерные производные MB₃ представлены двумя сериями соединений – DB₃P(n), тоже димеризованных 1,4-пиперазиндиалкилдикарбоновыми кислотами, и DB₃(n), где в качестве линкеров были использованы n-алкилдикарбоновые кислоты. Серии DB₃(n) и DB₃P(n) характеризуются наличием в структуре трисбензимидазолов, а DB₃P(n) – наличием также в линкере 1,4-пиперазина.

К третьей группе соединений относятся производные мономерного соединения MB₂Py(As), являющегося изостерным аналогом MB₃, ввиду того, что содержащийся в его структуре пирролкарбоксамидный фрагмент способен выступать донором атома водорода при карбоксамидном азоте для образования водородной связи в аналогичном бензимидазолу положении. Димерные производные представлены серией DB₂Py(n), содержащей в качестве линкера n-алкилдикарбоновые кислоты. Данная серия включает набор соединений, содержащих 1, 3, 4, 5, 7, 9 и 11 метиленовых звеньев, что позволило точнее оценить зависимость ингибирующей активности соединений от длины спейсера. Серия DB₂Py(n) отличается от серии DB₃(n) наличием, помимо бисбензимидазольной структуры, пирролкарбоксамидной структуры, являющейся фрагментом АТ-специфичного антибиотика нетропсина.

Методом флуоресцентного анализа в реальном времени были получены значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) исследуемых соединений (см. таблицу) в реакции отщепления BHQ1 от 3'-конца олигонуклеотида с помощью TDP1, что приводило к разгоранию флуоресценции FAM на 5'-конце цепи (Zakharenko et al., 2015). Следует также отметить, что в качестве субстрата был использован одноцепочечный олигонуклеотид, чтобы исключить связывание димерных бисбензимидазолов как узкобороздочных лигандов с ДНК-субстратом и направить их воздействие на ферментативную мишень.

Из полученных данных для мономерных соединений MB₂ и MB₂(As) и их димерных производных DB₂P(n) при n = 1, 2, 3, 4 значения IC₅₀ лежат в микромолярном диапазоне, причем димеризация не привела к повышению ингибиторной активности исследуемых соединений. В то же время для димеров мономерного MB₂Py(As), имеющего значение IC₅₀ 5 ± 2 мкМ, величина параметра полунгибирующей концентрации значительно снизилась, находясь в диапазоне от 0.25 до 0.90 мкМ. Аналогично переход от мономерного MB₃ к серии димерных DB₃P(n) приводил к повышению ингибиторной активности соединений, хотя и не столь ярко выраженному, однако димерные производные MB₃, не содержащие пиперазинового фрагмента

в линкере, – соединения DB₃(n) – показали самый низкий уровень активности среди всех испытанных в работе ингибиторов. Тот факт, что значения IC₅₀ для этих соединений (см. таблицу) настолько сильно выбиваются из общего массива данных, по всей видимости, связан с тем, что соединения DB₃(n) обладают протяженной и плоской геометрией, а также жестким линкером, что мешает оптимальному позиционированию соединений этого типа в активном центре фермента (см. рис. 1).

Таким образом, согласно экспериментальным данным, все изученные соединения, кроме группы DB₃(n), эффективно ингибируют активность TDP1 в микромолярных и субмикромолярных концентрациях. Наблюдается корреляция структура–активность, заключающаяся в снижении концентрации для достижения эффекта полумаксимального ингибирования при увеличении в соединении числа блоков, содержащих доноры водородной связи. В частности, димеризация является одним из простых подходов к увеличению таких структур в одной молекуле, что приводит к нелинейному росту константы комплексообразования (Неудачина, Лакиза, 2014). Также наблюдается снижение IC₅₀ при введении пиперазинового фрагмента в структуру линкера, что может быть обусловлено увеличением гидрофильности молекул. Полученные результаты позволили построить корреляцию структура–активность и оценить вклад димеризации в увеличение ингибирующей способности исследуемых соединений.

Для изучения влияния рассматриваемых соединений на активность TDP2 мы проверили способность этого фермента удалять остаток тирозина с 5'-конца олигонуклеотидного субстрата в отсутствие и в присутствии ингибиторов, как описано в (Dyrkheeva et al., 2021). Все соединения группы DB₂P(n), а также DB₂Py(n) при n = 1, 3 и DB₃(n) при n = 1, 5 в концентрации 500 мкМ ингибировали активность фермента примерно на 50 %; остальные соединения не проявили ингибирующей активности (см. таблицу). Таким образом, все протестированные соединения показали значительно более низкую склонность ингибировать TDP2 по сравнению с TDP1. Интересно, что группа DB₂P(n) менее эффективно ингибировала TDP1 и более эффективно TDP2, чем соединения других групп.

Следующим этапом нашей работы было тестирование способности исследуемых соединений ингибировать PARP1 и PARP2, т.е. их ферментативной активности в реакции синтеза поли(АДФ-рибозы) (PAR), в довольно высоком диапазоне концентрации соединений. Все соединения показали низкую эффективность ингибирования этих двух ферментов. Наиболее активными оказались соединения группы DB₂P(n), представители которой с n = 2, 3, 4 снижали активность PARP1 и PARP2 в концентрации 500 мкМ. Ингибирующее действие наблюдалось также для соединений серий DB₃(n) и DB₃P(n) в концентрации 500 мкМ, в то же время данные соединения проявили ингибирующую активность только в реакции синтеза PAR, катализируемой PARP1, но не PARP2 (см. таблицу).

Поскольку, согласно экспериментальным данным, все изученные соединения, за исключением группы DB₃(n), эффективно ингибируют активность TDP1, далее нами была оценена *in silico* способность соединений групп DB₂P(n) и DB₂Py(n) связываться с ферментом TDP1 для

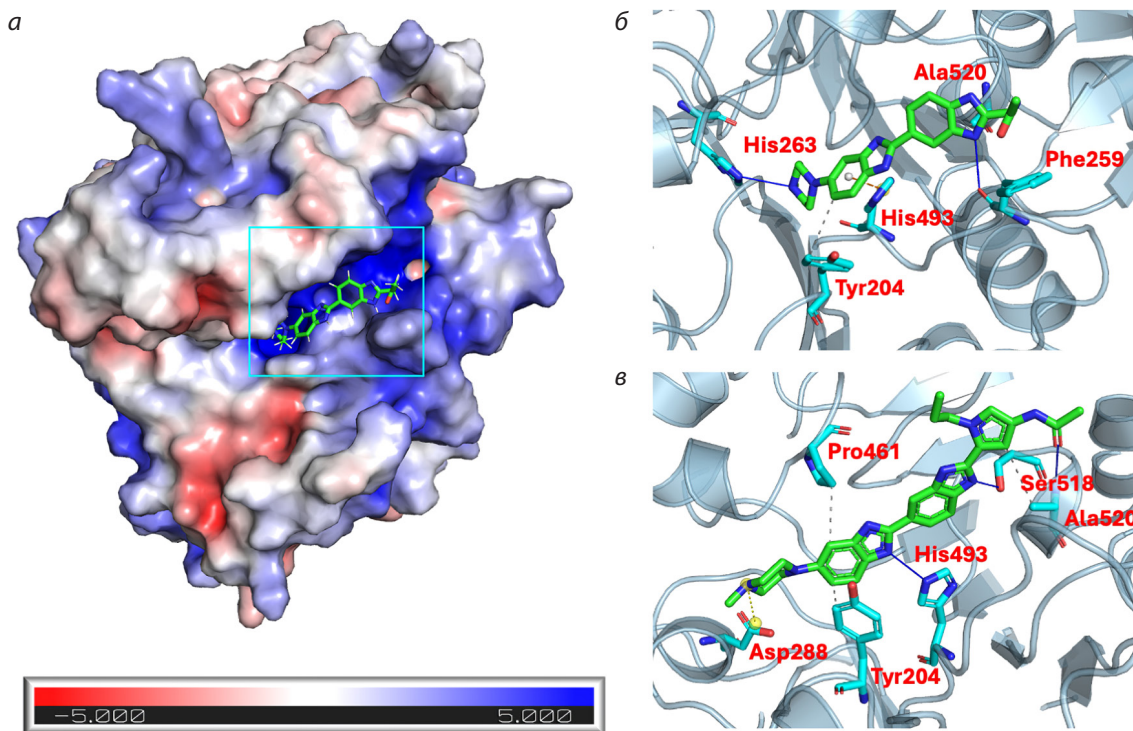


Рис. 2. а – структура TDP1 (PDB ID: 8V0B) с ингибитором MB₂(Ac), расположенным в положительно заряженном участке активного центра TDP1. Поверхность белка окрашена в соответствии с распределением электростатического потенциала, рассчитанного с помощью APBS (Jurrus et al., 2018). Прямоугольной рамкой выделен ДНК-связывающий участок TDP1. Ниже расположена шкала значений электростатического потенциала поверхности (в единицах кТ/е, где кТ/е ≈ 25.7 мВ при 298 К). Цветовая шкала: красный цвет обозначает отрицательный потенциал (–5 кТ/е), белый – нейтральный (0 кТ/е), синий – положительный потенциал (+5 кТ/е). б, в – предсказанные конформации ингибиторов MB₂(Ac) и MB₂Py(Ac) (зеленый цвет) в комплексе с TDP1 с контактирующими остатками (голубой цвет).

выяснения возможного молекулярного механизма их ингибирующего действия. С этой целью был выполнен полноатомный гибкий молекулярный докинг по всей поверхности белка TDP1 (PDB ID: 8V0B) соединений DB₂P(n) и DB₂Py(n).

Согласно результатам докинга, можно предположить, что конформации с минимальной расчетной энергией для каждого ингибитора формируют взаимодействия в активном центре TDP1, вблизи остатков His263 и His493 (рис. 2, а), аналогично соединению MB₂(Ac) (рис. S1). Кроме того, был проведен дополнительный анализ способности связывания димерных соединений с TDP1 с использованием скоринг-функций Vinardo, X-Score и REF2015 в среде PyRosetta (табл. S2). Значения скоринг-функций позволяют предположить высокую аффинность исследованных ингибиторов групп DB₂P(n) и DB₂Py(n) к TDP1. Следует отметить, что полной корреляции параметров, полученных с помощью докинга (см. табл. S2), с величинами IC₅₀, найденными в эксперименте (см. таблицу), не наблюдается, что можно объяснить вкладом гидрофобных линкеров, которые сложно учесть в расчете энергий.

По данным молекулярного моделирования, соединение MB₂(Ac) (см. рис. 2, б), являющееся мономерным звеном для димерных производных DB₂P(n), образует водородную связь с His263 и π-катионное взаимодействие с His493, что, вероятно, может приводить к блокировке каталитического акта TDP1. Помимо взаимодействий с

каталитически активными остатками, для MB₂(Ac) возможно формирование гидрофобных контактов с Tyr204 и Ala520, а также водородной связи с Phe259, что может усиливать ингибирующее действие этого соединения. В отличие от MB₂(Ac), соединение MB₂Py(Ac) (см. рис. 2, в) потенциально может взаимодействовать только с одним каталитическим остатком – His493 – через образование водородной связи. Такая разница во взаимодействиях может быть причиной более высокой ингибирующей активности MB₂(Ac) по сравнению с MB₂Py(Ac), что подтверждается экспериментальными данными (см. таблицу).

Анализ взаимодействий с помощью PLIP (protein–ligand interaction profiler) (Salentin et al., 2015) для комплексов TDP1 с димерными соединениями группы DB₂Py(n) (рис. S2) показал, что эти соединения формируют большее количество контактов белок-лиганд (водородных связей и гидрофобных взаимодействий) по сравнению с мономером MB₂Py(Ac). В частности, соединение DB₂Py(1) образует водородные связи с Ser400 и Ser403, а также гидрофобные взаимодействия с Pro463 – остатки этих аминокислот расположены в сайте связывания лигандов с активным центром TDP1, что, вероятно, способствует стабилизации взаимодействующего фрагмента димера в активном центре фермента. Найденные с помощью анализа результатов докинга данные, характеризующие большую площадь поверхности контакта димерных соединений DB₂Py(n) с TDP1 по сравнению с мономером MB₂Py(Ac), коррелируют с понижением значений IC₅₀ для

димеров, что свидетельствует о возрастании сродства этих соединений к активному центру фермента (см. таблицу). Согласно полученным данным, гидрофобные взаимодействия с остатками Pro461 и/или Tyr204, локализованными в активном центре TDP1, также могут вносить вклад в повышение ингибирующей активности соединений группы DB₂Pu(n).

Анализ взаимодействий соединений из группы DB₂P(n) с TDP1 показал, что в образовании комплекса участвуют аналогичные аминокислотные остатки, за исключением Tyr204, с остатком которого соединения DB₂P(n), в отличие от DB₂Pu(n), по-видимому, не взаимодействуют (рис. S3). Кроме того, отмечены возможные различия в характере взаимодействий с одними и теми же аминокислотами. Например, для остатка Lys519 в случае соединений DB₂P(n) можно предположить образование водородных связей с атомами азота пиперазинового фрагмента через атом N1 боковой цепи. В то же время в соединениях DB₂Pu(n) предсказаны два типа взаимодействий с Lys519: водородная связь между атомом азота основной цепи Lys519 и атомом кислорода в пирролкарбоксамидной группе (в DB₂Pu(1), DB₂Pu(4), DB₂Pu(7), DB₂Pu(9)), а также π-катионное взаимодействие между пирролом и боковой цепью Lys519 (в DB₂Pu(3) и DB₂Pu(5)) (см. рис. S2).

Для соединения DB₂Pu(1), продемонстрировавшего наибольшую ингибирующую активность (наименьшее значение IC₅₀) среди исследованных производных, было проведено дополнительное моделирование молекулярной динамики в предсказанном комплексе с TDP1. Анализ траектории МД показал, что комплекс TDP1-DB₂Pu(1) сохраняет стабильность на протяжении всего времени моделирования. Значения RMSD лиганда находились в диапазоне 1.5–3.0 Å (рис. S4), что говорит об устойчивом связывании DB₂Pu(1) в активном центре белка без признаков диссоциации или значительных конформационных перестроек. Полученные данные подтверждают прочность образованного комплекса и согласуются с высокой биологической активностью этого соединения.

Следует отметить, что выполненный нами анализ молекулярных контактов, а также значения скоринг-функций, полученные по результатам молекулярного докинга, свидетельствуют в пользу способности соединений обеих проанализированных групп – DB₂P(n) с алифатическим линкером и DB₂Pu(n) с пиперазиновым фрагментом в линкере – формировать прочный комплекс с TDP1. Тем не менее экспериментальные данные выявляют различия в их ингибирующей активности: соединения с алифатическим линкером демонстрируют более высокую эффективность ингибирования по сравнению с соединениями, содержащими пиперазиновое кольцо. Это различие не может быть полностью объяснено на основании контактного анализа, что указывает на возможную разницу в конформационной подвижности рассматриваемых групп соединений. В частности, включение пиперазинового фрагмента в центральную часть линкера, по-видимому, ограничивает его гибкость, что влияет на динамику взаимодействия ингибитора с активным центром, препятствует оптимальному позиционированию ингибитора в активном центре фермента и, как следствие, снижает его ингибирующую активность.

Обсуждение

TDP1 играет ключевую роль в устранении повреждений ДНК, расположенных на 3'-конце ДНК, стабилизированных противораковыми препаратами, применяемыми в клинической практике, такими как топотекан и иринотекан, которые являются производными природного соединения камптотецина (Comeaux, van Waardenburg, 2014; Kawale, Povirk, 2018). Следовательно, активность TDP1 может быть возможной причиной резистентности опухолей к используемым в клинике ингибиторам TOP1. В настоящее время активно ведутся поиски совместных ингибиторов TOP1 и TDP1 (Conda-Sheridan et al., 2013; Nguyen et al., 2015; Zhang X.-R. et al., 2018; Hu et al., 2021; Yang et al., 2023).

Кроме того, поскольку известно, что активности TDP1 и TDP2 перекрываются, хотя и в незначительной степени (Pommier et al., 2014), их способность выполнять функции друг друга делает весьма перспективным совокупное использование ингибиторов этих двух ферментов или создание агентов, способных одновременно ингибировать как TDP1, так и TDP2. Одновременное подавление активности данных ферментов может быть использовано для повышения эффективности большого набора клинически важных противораковых препаратов, ингибиторов TOP1 и TOP2. Были также обнаружены тройные ингибиторы TOP1/TDP1/TDP2, которые проявляют умеренную активность против TDP1 и слабую активность против TDP2 (Wang P. et al., 2017). Наиболее эффективными ингибиторами TDP2 на сегодняшний день считаются деазафлавины, которые *in vitro* показывают синергию с этопозидом в нетоксичных концентрациях (Marchand et al., 2016). Также были найдены некоторые эффективные ингибиторы TDP2 из других классов соединений (Yang et al., 2021; Zhang Y. et al., 2021).

Известно, что N-концевой домен TDP1 напрямую связывается с C-концевым доменом PARP1, а TDP1 подвергается PARилированию с помощью PARP1 для того, чтобы быть привлеченной к аддукту TOP1-ДНК (Das et al., 2014; Lebedeva et al., 2015). PARилирование TDP1 стимулирует ее посадку на участки с поврежденной ДНК, не влияя на каталитическую активность этого фермента (Chowdhuri, Das, 2021). Показано также, что PARP1 может взаимодействовать с TDP1, формируя белок-белковые контакты (Moor et al., 2015). Установлено, что сочетание нокдауна TDP1 и ингибирования активности PARP1 с помощью рукапароба снижает пролиферацию клеток значительнее, чем те же методы подавления функции ферментов по отдельности (Fam et al., 2013). В литературе встречается предположение, что противораковый эффект ингибиторов TOP1 может быть значительно усилен одновременным ингибированием PARP1 и TDP1 (Smith et al., 2005; Alagoz et al., 2014; Das et al., 2014; Muray et al., 2014; Elsayed et al., 2016; Matsuno et al., 2018; Jing et al., 2020; Kim J.W. et al., 2020; Chowdhuri, Das, 2021; Flörkemeier et al., 2022). Взаимодействие ферментов PARP1 и TDP1 между собой было описано в ряде публикаций (Das et al., 2014; Moor et al., 2015), что делает актуальным поиск двойных ингибиторов TDP1 и PARP1.

Ранее нами были обнаружены двойные ингибиторы TDP1 и TDP2, а также тройные ингибиторы TDP1, TDP2

и PARP1 (Dyrkheeva et al., 2021) – тиоэфиры усниновой кислоты, слабо ингибирующие TDP2 и PARP1, поэтому актуален поиск новых соединений, способных воздействовать сразу на две или три взаимодействующие функционально мишени. В данной работе была проверена способность серии узкобороздочных ДНК-лигандов ингибировать ферменты TDP1, TDP2, PARP1 и PARP2. Эффективных ингибиторов, действующих сразу на четыре фермента, обнаружить не удалось, но было показано, что эти соединения ингибируют TDP1. Исследованные в работе ДНК-лиганды способны ингибировать ДНК-зависимые ферменты за счет связывания с двуцепочечной ДНК. Однако в настоящей работе мы показали, что они способны селективно ингибировать TDP1, поскольку эксперименты проводили в отсутствие двуцепочечной ДНК как альтернативной мишени.

Результаты молекулярного докинга и анализа межмолекулярных взаимодействий говорят в пользу того, что большинство исследованных соединений групп DB₂P(n) и DB₂Py(n) могут обладать высоким сродством к ферменту TDP1 и формировать устойчивые комплексы с его каталитическим центром. Для всех соединений предсказаны взаимодействия с ключевыми каталитическими остатками активного центра белка TDP1.

Закключение

Изучено влияние димерных бис- и трисбензимидазолов на активность ферментов репарации ДНК – TDP1, TDP2, PARP1 и PARP2. Основные результаты показали, что все ингибиторы, кроме соединений серии DB₃(n), эффективно ингибируют TDP1. Наиболее активными оказались соединения DB₂Py(n) и DB₂P(n), способные ингибировать TDP1 в субмикромольном диапазоне концентраций. Исследуемые соединения демонстрируют высокую селективность, слабо влияя на активность других тестируемых ферментов.

Основываясь на результатах молекулярного докинга, мы сделали предположение, что активные ингибиторы локализуются в области ДНК-связывающего кармана TDP1 и могут формировать стабильные взаимодействия с каталитически важными остатками His263 и His493. Эти взаимодействия, вероятно, лежат в основе наблюдаемой высокой ингибирующей активности.

Важным результатом является также установление зависимости активности от структуры соединений. Димеризация оказала неоднозначное влияние на ингибирующий эффект: соединения серий DB₂Py(n) и DB₃P(n) были существенно (на порядок) более активны, чем соответствующие мономеры; в серии DB₂P(n) на ингибирующую активность повлияла не только димеризация, но и длина линкера и введение 1,4-пиперазина, несущего два положительных заряда в линкер. Серия DB₃(n) оказалась неактивна, в отличие от мономера. Введение пиперазинового фрагмента в линкер в серии DB₃P(n) привело к выраженной ингибирующей активности по сравнению с DB₃(n) без такого фрагмента. Мы предполагаем, что усиление ингибирующего эффекта связано с введением двух положительных зарядов в линкер и увеличением числа возможных контактов лигандов с активным центром фермента.

В целом на основании результатов настоящей работы могут быть предложены новые стратегии для разработки терапии онкологических заболеваний. Полученные данные также подчеркивают потенциал димерных ДНК-лигандов как безопасных и эффективных инструментов для таргетной регуляции ферментов репарации ДНК.

Список литературы / References

- Неудачина Л., Лакиза Н. Физико-химические основы применения координационных соединений. Екатеринбург, 2014 [Neudachina L., Lakiza N. Physico-Chemical Principles of the Use of Coordination Compounds. Ekaterinburg, 2014 (in Russian)]
- Alagoz M., Wells O.S., El-Khamisy S.F. TDP1 deficiency sensitizes human cells to base damage via distinct topoisomerase I and PARP mechanisms with potential applications for cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(5):3089-3103. doi 10.1093/nar/gkt1260
- Alford R.F., Leaver-Fay A., Jeliazkov J.R., O'Meara M.J., DiMaio F.P., Park H., Shapovalov M.V., ... Das R., Baker D., Kuhlman B., Kortemme T., Gray J.J. The Rosetta all-atom energy function for macromolecular modeling and design. *J Chem Theory Comput.* 2017; 13(6):3031-3048. doi 10.1021/acs.jctc.7b00125
- Allen W.J., Balius T.E., Mukherjee S., Brozell S.R., Moustakas D.T., Lang P.T., Case D.A., Kuntz I.D., Rizzo R.C. DOCK 6: impact of new features and current docking performance. *J Comput Chem.* 2015;36(15):1132-1156. doi 10.1002/jcc.23905
- Arutyunyan A.F., Kostyukov A.A., Korolev S.P., Gottikh M.B., Kaluzhny D.N., Susova O.Yu., Zhuze A.L. DNA sequence-specific ligands. 19. Synthesis, spectral properties, virological and biochemical studies of DB₃(n) fluorescent dimeric trisbenzimidazoles. *Mol Biol.* 2023a;57(3):512-521. doi 10.1134/s0026893323030020
- Arutyunyan A.F., Kostyukov A.A., Lushpa V.A., Mineev K.S., Korolev S.P., Gottikh M.B., Klimova R.R., Kushch A.A., Kalabina K.V., Susova O.Yu., Zhuze A.L. DNA sequence-specific ligands. XX. Synthesis, spectral properties, virological and biochemical studies of fluorescent dimeric trisbenzimidazoles DB₃P(n). *Med Chem Res.* 2023b;32(3):587-599. doi 10.1007/s00044-023-03017-x
- Chaudhury S., Lyskov S., Gray J.J. PyRosetta: a script-based interface for implementing molecular modeling algorithms using Rosetta. *Bioinformatics.* 2010;26(5):689-691. doi 10.1093/bioinformatics/btq007
- Chernyshova I., Vasil'eva I., Moor N., Ivanisenko N., Kutuzov M., Abramova T., Zakharenko A., Lavrik O. Aminomethylmorpholino nucleosides as novel inhibitors of PARP1 and PARP2: experimental and molecular modeling analyses of their selectivity and mechanism of action. *Int J Mol Sci.* 2024;25(23):12526. doi 10.3390/ijms252312526
- Chowdhuri S.P., Das B.B. Top1-PARP1 association and beyond: from DNA topology to break repair. *NAR Cancer.* 2021;3(1):zcab003. doi 10.1093/narcan/zcab003
- Comeaux E.Q., van Waardenburg R.C. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target. *Drug Metab Rev.* 2014;46(4):494-507. doi 10.3109/03602532.2014.971957
- Conda-Sheridan M., Reddy P.V.N., Morrell A., Cobb B.T., Marchand C., Agama K., Chergui A., Renaud A., Stephen A.G., Bindu L.K., Pommier Y., Cushman M. Synthesis and biological evaluation of indenoisquinolines that inhibit both tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1) and topoisomerase I (Top1). *J Med Chem.* 2013;56(1):182-200. doi 10.1021/jm3014458
- Curtin N.J., Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(10):711-736. doi 10.1038/s41573-020-0076-6
- Das B.B., Huang S.N., Murai J., Rehman I., Amé J.-C., Sengupta S., Das S.K., Majumdar P., Zhang H., Biard D., Majumder H.K., Schreiber V., Pommier Y. PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(7):4435-4449. doi 10.1093/nar/gku088

- Dyrkheeva N., Anarbaev R., Lebedeva N., Kuprushkin M., Kuznetsova A., Kuznetsov N., Rechkunova N., Lavrik O. Human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 possesses transphosphooligonucleotidation activity with primary alcohols. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8: 604732. doi 10.3389/fcell.2020.604732
- Dyrkheeva N.S., Filimonov A.S., Luzina O.A., Orlova K.A., Chernyshova I.A., Kornienko T.E., Malakhova A.A., ... Burakova E.A., Stetsenko D.A., Zakian S.M., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. New hybrid compounds combining fragments of usnic acid and thioether are inhibitors of human enzymes TDP1, TDP2 and PARP1. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11336. doi 10.3390/ijms222111336
- Eastman P., Galvelis R., Peláez R.P., Abreu C.R.A., Farr S.E., Gallicchio E., Gorenko A., ... Wang Y., Zhang I., Chodera J.D., De Fabritiis G., Markland T.E. OpenMM 8: molecular dynamics simulation with machine learning potentials. *J Phys Chem B.* 2024;128(1):109-116. doi 10.1021/acs.jpcc.3c06662
- Elsayed W., El-Shafie L., Hassan M.K., Farag M.A., El-Khamisy S.F. Isoeugenol is a selective potentiator of camptothecin cytotoxicity in vertebrate cells lacking TDP1. *Sci Rep.* 2016;6(1):26626. doi 10.1038/srep26626
- Fam H.K., Walton C., Mitra S.A., Chowdhury M., Osborne N., Choi K., Sun G., ... Aparicio S., Triche T.J., Bond M., Pallen C.J., Boerkoel C.F. TDP1 and PARP1 deficiency are cytotoxic to rhabdomyosarcoma cells. *Mol Cancer Res.* 2013;11(10):1179-1192. doi 10.1158/1541-7786.mcr-12-0575
- Flörkemeier I., Hillmann J.S., Weimer J.P., Hildebrandt J., Hede-mann N., Rogmans C., Dempfle A., Arnold N., Clement B., Bauerschlag D.O. Combined PARP and dual topoisomerase inhibition potentiates genome instability and cell death in ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10503. doi 10.3390/ijms231810503
- Hoch N.C., Polo L.M. ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease. *Genet Mol Biol.* 2019;43(Suppl.1):e20190075. doi 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0075
- Hu D.-X., Tang W.-L., Zhang Y., Yang H., Wang W., Agama K., Pommier Y., An L.-K. Synthesis of methoxy-, methylenedioxy-, hydroxy-, and halo-substituted benzophenanthridinone derivatives as DNA topoisomerase IB (TOP1) and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) inhibitors and their biological activity for drug-resistant cancer. *J Med Chem.* 2021;64(11):7617-7629. doi 10.1021/acs.jmedchem.1c00318
- Ivanov A.A., Koval V.S., Susova O.Yu., Salyanov V.I., Oleinikov V.A., Stomakhin A.A., Shalginskikh N.A., Kvasha M.A., Kirsanova O.V., Gromova E.S., Zhuze A.L. DNA specific fluorescent symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP(n): the synthesis, spectral properties, and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25(13):2634-2638. doi 10.1016/j.bmcl.2015.04.087
- Jing C.-B., Fu C., Prutsch N., Wang M., He S., Look A.T. Synthetic lethal targeting of TET2-mutant hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) with TOP1-targeted drugs and PARP1 inhibitors. *Leukemia.* 2020;34(11):2992-3006. doi 10.1038/s41375-020-0927-5
- Johannes J.W., Balazs A.Y.S., Barratt D., Bista M., Chuba M.D., Co-sulich S., Critchlow S.E., ... Xue L., Yao T., Zhang K., Zhang A.X., Zheng X. Discovery of 6-Fluoro-5-{4-[(5-fluoro-2-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalin-6-yl)methyl]piperazin-1-yl}-N-methylpyridine-2-carboxamide (AZD9574): a CNS-penetrant, PARP1-selective inhibitor. *J Med Chem.* 2024;67(24):21717-21728. doi 10.1021/acs.jmedchem.4c01725
- Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., ... Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021;596(7873):583-589. doi 10.1038/s41586-021-03819-2
- Jurru E., Engel D., Star K., Monson K., Brandi J., Felberg L.E., Brookes D.H., ... Krasny R., Wei G., Holst M.J., McCammon J.A., Baker N.A. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.* 2018;27(1):112-128. doi 10.1002/pro.3280
- Kawale A.S., Povirk L.F. Tyrosyl-DNA phosphodiesterases: rescuing the genome from the risks of relaxation. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(2):520-537. doi 10.1093/nar/gkx1219
- Kim D.-S., Camacho C.V., Kraus W.L. Alternate therapeutic pathways for PARP inhibitors and potential mechanisms of resistance. *Exp Mol Med.* 2021;53(1):42-51. doi 10.1038/s12276-021-00557-3
- Kim J.W., Min A., Im S.-A., Jang H., Kim Y.J., Kim H.-J., Lee K.-H., Kim T.-Y., Lee K.W., Oh D.-Y., Kim J.-H., Bang Y.-J. TDP1 and TOP1 modulation in olaparib-resistant cancer determines the efficacy of subsequent chemotherapy. *Cancers.* 2020;12(2):334. doi 10.3390/cancers12020334
- Kornienko T.E., Chepanova A.A., Zakharenko A.L., Filimonov A.S., Luzina O.A., Dyrkheeva N.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. Enhancement of the antitumor and antimetastatic effect of topotecan and normalization of blood counts in mice with Lewis carcinoma by Tdp1 inhibitors – new usnic acid derivatives. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):1210. doi 10.3390/ijms25021210
- Lavrik O.I. PARPs' impact on base excision DNA repair. *DNA Repair.* 2020;93:102911. doi 10.1016/j.dnarep.2020.102911
- Lebedeva N.A., Anarbaev R.O., Sukhanova M., Vasil'eva I.A., Rech-kunova N.I., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose)polymerase 1 stimulates the AP-site cleavage activity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Biosci Rep.* 2015;35(4):e00230. doi 10.1042/BSR20140192
- Marchand C., Abdelmalak M., Kankanala J., Huang S.-Y., Kiselev E., Fesen K., Kurahashi K., Sasanuma H., Takeda S., Aihara H., Wang Z., Pommier Y. Deazaflavin inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) specific for the human enzyme and active against cellular TDP2. *ACS Chem Biol.* 2016;11(7):1925-1933. doi 10.1021/acscchembio.5b01047
- Matsuno Y., Hyodo M., Fujimori H., Shimizu A., Yoshioka K. Sensitization of cancer cells to radiation and topoisomerase I inhibitor camptothecin using inhibitors of PARP and other signaling molecules. *Cancers.* 2018;10(10):364. doi 10.3390/cancers10100364
- Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 2022;19(6):679-682. doi 10.1038/s41592-022-01488-1
- Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(12):6009-6022. doi 10.1093/nar/gkv569
- Moretti R., Bender B.J., Allison B., Meiler J. Rosetta and the design of ligand binding sites. In: Stoddard B. (Ed.) Computational Design of Ligand Binding Proteins. Methods in Molecular Biology. Vol. 1414. New York: Humana Press, 2016;47-62. doi 10.1007/978-1-4939-3569-7_4
- Murai J., Marchand C., Shahane S.A., Sun H., Huang R., Zhang Y., Chergui A., Ji J., Doroshov J.H., Jadhav A., Takeda S., Xia M., Pommier Y. Identification of novel PARP inhibitors using a cell-based TDP1 inhibitory assay in a quantitative high-throughput screening platform. *DNA Repair.* 2014;21:177-182. doi 10.1016/j.dnarep.2014.03.006
- Nguyen T.X., Abdelmalak M., Marchand C., Agama K., Pommier Y., Cushman M. Synthesis and biological evaluation of nitrated 7-, 8-, 9-, and 10-hydroxyindenoisoquinolines as potential dual topoisomerase I (Top1)-tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (TDP1) inhibitors. *J Med Chem.* 2015;58(7):3188-3208. doi 10.1021/acs.jmedchem.5b00136
- O'Boyle N.M., Banck M., James C.A., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G.R. Open Babel: an open chemical toolbox. *J Chem-inform.* 2011;3(1):33. doi 10.1186/1758-2946-3-33
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612. doi 10.1002/jcc.20084
- Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 2010;17(5):421-433. doi 10.1016/j.chembiol.2010.04.012

- Pommier Y., Huang S.N., Gao R., Das B.B., Murai J., Marchand C. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair*. 2014;19:114-129. doi 10.1016/j.dnarep.2014.03.020
- Quiroga R., Villarreal M.A. Vinardo: a scoring function based on autodock vina improves scoring, docking, and virtual screening. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155183. doi 10.1371/journal.pone.0155183
- Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(10):610-621. doi 10.1038/nrm.2017.53
- Salentin S., Schreiber S., Haupt V.J., Adasme M.F., Schroeder M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W443-W447. doi 10.1093/nar/gkv315
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.-C., de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(7):517-528. doi 10.1038/nrm1963
- Sherstyuk Y.V., Ivanisenko N.V., Zakharenko A.L., Sukhanova M.V., Peshkov R.Y., Eltsov I.V., Kutuzov M.M., Kurgina T.A., Belousova E.A., Ivanisenko V.A., Lavrik O.I., Silnikov V.N., Abramova T.V. Design, synthesis and molecular modeling study of conjugates of ADP and morpholino nucleosides as a novel class of inhibitors of PARP-1, PARP-2 and PARP-3. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1):214. doi 10.3390/ijms21010214
- Smith L.M., Willmore E., Austin C.A., Curtin N.J. The novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks. *Clin Cancer Res*. 2005;11(23):8449-8457. doi 10.1158/1078-0432.ccr-05-1224
- Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits strand-displacement synthesis of DNA catalyzed by DNA polymerase β . *Biochemistry (Moscow)*. 2004;69(5):558-568. doi 10.1023/b:biry.0000029855.68502.fa
- Susova O.Y., Karshieva S.S., Kostyukov A.A., Moiseeva N.I., Zaytseva E.A., Kalabina K.V., Zusinaite E., Gildemann K., Smirnov N.M., Arutyunyan A.F., Zhuze A.L. Dimeric bis-benzimidazole-pyrroles DB₂Py(n) – AT-site-specific ligands: synthesis, physicochemical analysis, and biological activity. *Acta Naturae*. 2024;16(1):86-100. doi 10.32607/actanaturae.27327
- Szanto M., Yelamos J., Bai P. Specific and shared biological functions of PARP2 – is PARP2 really a lil' brother of PARP1? *Expert Rev Mol Med*. 2024;26:e13. doi 10.1017/erm.2024.14
- Wang P., Elsayed M.S.A., Plescia C.B., Ravji A., Redon C.E., Kiselev E., Marchand C., Zeleznik O., Agama K., Pommier Y., Cushman M. Synthesis and biological evaluation of the first triple inhibitors of human topoisomerase 1, tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1), and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (Tdp2). *J Med Chem*. 2017;60(8):3275-3288. doi 10.1021/acs.jmedchem.6b01565
- Wang R., Lai L., Wang S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des*. 2002;16(1):11-26. doi 10.1023/a:1016357811882
- Yang H., Zhu X.-Q., Wang W., Chen Y., Hu Z., Zhang Y., Hu D.-X., Yu L.-M., Agama K., Pommier Y., An L.-K. The synthesis of furoquinolinedione and isoxazoloquinolinedione derivatives as selective Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) inhibitors. *Bioorg Chem*. 2021;111:104881. doi 10.1016/j.bioorg.2021.104881
- Yang H., Qin C., Wu M., Wang F., Wang W., Agama K., Pommier Y., Hu D., An L. Synthesis and biological activities of 11- and 12-substituted benzophenanthridinone derivatives as DNA topoisomerase IB and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors. *ChemMedChem*. 2023;18(10):e202200593. doi 10.1002/cmdc.202200593
- Zakharenko A., Khomenko T., Zhukova S., Koval O., Zakharova O., Anarbaev R., Lebedeva N., Korchagina D., Komarova N., Vasiliev V., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(9):2044-2052. doi 10.1016/j.bmc.2015.03.020
- Zakharenko A.L., Luzina O.A., Chepanova A.A., Dyrkheeva N.S., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. Natural products and their derivatives as inhibitors of the DNA repair enzyme tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5781. doi 10.3390/ijms24065781
- Zeng Z., Sharma A., Ju L., Murai J., Umans L., Vermeire L., Pommier Y., Takeda S., Huylebroeck D., Caldecott K.W., El-Khamisy S.F. TDP2 promotes repair of topoisomerase I-mediated DNA damage in the absence of TDP1. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(17):8371-8380. doi 10.1093/nar/gks622
- Zhang M., Wang Z., Su Y., Yan W., Ouyang Y., Fan Y., Huang Y., Yang H. TDP1 represents a promising therapeutic target for overcoming tumor resistance to chemotherapeutic agents: progress and potential. *Bioorg Chem*. 2025;154:108072. doi 10.1016/j.bioorg.2024.108072
- Zhang X.-R., Wang H.-W., Tang W.-L., Zhang Y., Yang H., Hu D.-X., Ravji A., Marchand C., Kiselev E., Ofori-Atta K., Agama K., Pommier Y., An L.-K. Discovery, synthesis, and evaluation of oxynitidine derivatives as dual inhibitors of DNA topoisomerase IB (TOP1) and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1), and potential anti-tumor agents. *J Med Chem*. 2018;61(22):9908-9930. doi 10.1021/acs.jmedchem.8b00639
- Zhang Y., He X., Yang H., Liu H., An L. Robustadiol A and B from *Eucalyptus globulus* Labill. and their anticancer activity as selective tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 inhibitors. *Phytotherapy Res*. 2021;35(9):5282-5289. doi 10.1002/ptr.7207

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.08.2025. После доработки 30.09.2025. Принята к публикации 30.09.2025.