

Исследование ингибиторов Tdp1 на клетках нокаутных по генам белков системы репарации ДНК PARP1 и Tdp1

Чепанова А.А.^{1*}, Чернышова И.А.¹, Корниенко Т.Е.¹, Захаренко А.Л.¹,
Дырхеева Н.С.¹, Дреничев М.С.², Филимонов А.С.³, Лузина О.А.³,
Салахутдинов Н.Ф.³, Лаврик О.И.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН, Москва, Россия

³ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

* arinachepanova@mail.ru

Ключевые слова: система репарации ДНК; тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1; топоизомераза 1; противоопухолевые препараты; ингибиторы

Мотивация и цель: На сегодняшний день известно, что фермент репарации тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1) играет ключевую роль в удалении повреждений ДНК, образующихся при ингибировании топоизомеразы 1 (Top1) клинически используемыми противоопухолевыми препаратами (иринотекан, топотекан), а также участвует в репарации повреждений ДНК, вызванных другими противоопухолевыми препаратами [1, 2]. Также имеются данные о взаимодействии Tdp1 с другим ферментом системы репарации, а именно поли- (АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (PARP1). PAR-илирование (посттрансляционная модификация белков, катализируемая PARP1) регулирует ферментативную активность Tdp1, стабилизирует фермент и стимулирует рекрутирование Tdp1 в места повреждений ДНК, вызванные комплексами Top1cc [3, 4]. Основываясь на этих данных, мы считаем, что необходимо изучать действие ингибиторов Tdp1 на клетки с учетом роли PARP1. Для получения новой информации о работе ингибиторов Tdp1 мы использовали клеточные линии, нокаутные по генам Tdp1 (Tdp1^{-/-}) или PARP1 (PARP1^{-/-}) [5, 6]. Для изучения нами были выбраны два соединения различной природы из ранее найденных, оказавших выраженное сенсibiliзирующее действие на опухолевые клетки как *in vitro*, так и *in vivo*. Одно из соединений является бидериватизированным производным усниновой кислоты (лабораторный шифр AF-185, синтезировано в НИОХ СО РАН) [7], другое (лабораторный шифр 577, синтезировано в ИМБ РАН) [8] – липофильным производным пуринового нуклеозида.

Методы и алгоритмы: Влияние ингибиторов Tdp1 на выживаемость клеток и на цитотоксический эффект топотекана было изучено с помощью МТТ-теста путем колориметрического измерения количества формазана, конвертированного из 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) клетками, подвергшимися воздействию соединений (количество выживших клеток). Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % FBS и 1 % раствор антибиотиков и антимикотиков (100 ед./мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,25 мкг/мл амфотерицина), в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Клетки пересеивали раз в 3–4 дня для поддержания экспоненциального роста.

Результаты: Была изучена собственная цитотоксичность/антипролиферативная активность ингибиторов Tdp1 на контрольной клеточной линии НЕК293А

(получена из эмбриональных почек человека) дикого типа (WT), трех клонов Tdp1^{-/-} и клоне PARP1^{-/-} с использованием МТТ-теста. Показано, что соединение AF-185 малотоксично как для клеток HEK293A WT, так и для нокаутных по генам белков репарации ДНК PARP1 и Tdp1 (не менее 80 % живых клеток). Другой ингибитор Tdp1, соединение 577, оказывает более цитотоксичное/антипролиферативное действие на клетки, примерно сопоставимое для HEK293A WT и всех нокаутных клонов, что говорит об отсутствии связи токсического эффекта с наличием или отсутствием Tdp1 в клетках и о вероятных побочных мишенях этого соединения. Также изучено влияние ингибиторов Tdp1 на цитотоксический эффект топотекана на контрольных клетках HEK293A WT и клетках Tdp1^{-/-} и PARP1^{-/-}. Несмотря на высокую ингибирующую активность выбранных производных в отношении Tdp1 в экспериментах *in vitro*, на клетках неопухолевого происхождения эти соединения не продемонстрировали усиления цитотоксического эффекта топотекана.

В связи с отсутствием сенсibiliзирующего эффекта на клетках неракового типа, мы изучили влияние выбранных соединений на выживаемость контрольной клеточной линии аденокарциномы альвеолярных базальных эпителиальных клеток человека A549 и клеток A549 с нокаутом по гену *Tdp1* (клеточные клоны B5, B6, B10) в монорежиме и в комбинации с топотеканом. Соединение AF-185 оказалось малотоксичным как для A549 WT, так и для A549 Tdp1^{-/-}. Соединение 577 оказало более цитотоксичное/антипролиферативное действие на клетки, примерно сопоставимое для A549 WT и A549 Tdp1^{-/-}, как и в случае клеток неракового происхождения HEK293A.

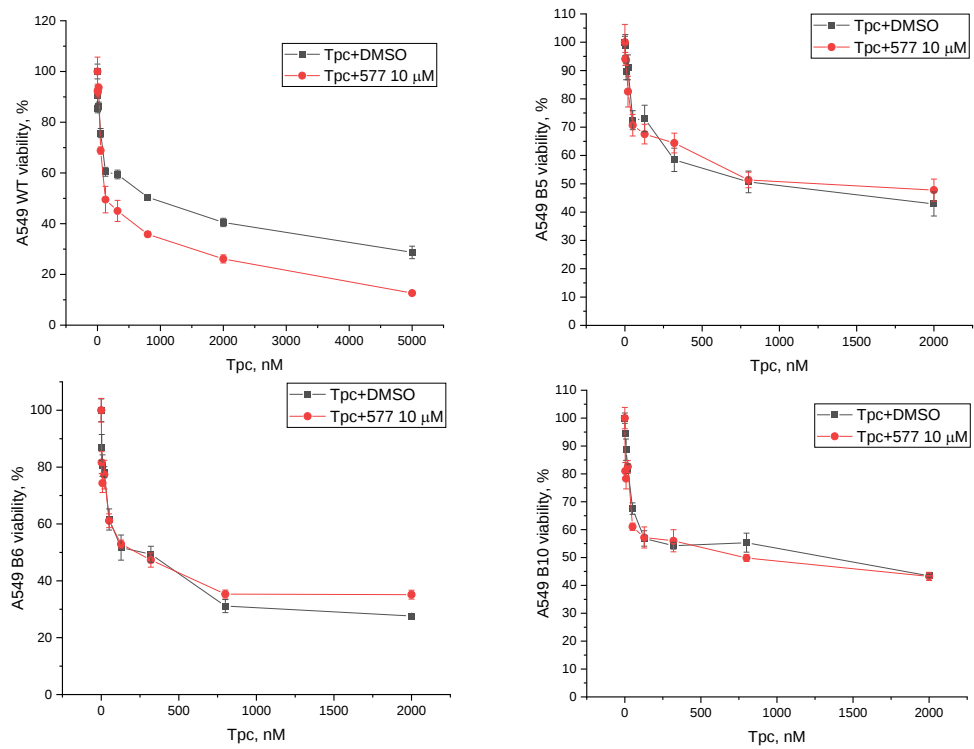


Рис. 1. Дозозависимое влияние топотекана в комбинации с липофильным производным пуринового нуклеозида 577 в концентрации 10 мкМ на выживаемость контрольной клеточной линии A549 WT и клонов Tdp1^{-/-}

Далее было изучено влияние топотекана на выживаемость контрольной клеточной линии и выживаемость клонов A549 Tdp1^{-/-}. Показано, что нокаутные по гену *Tdp1* раковые клеточные линии (B5, B6, B10) более чувствительны к топотекану, по сравнению с клетками дикого типа, как и в случае клеток неракового происхождения НЕК293А. Также изучено влияние ингибиторов Tdp1 на цитотоксический эффект топотекана на контрольных клетках A549 WT и на клетках Tdp1^{-/-} (рис. 1, графики приведены только для соединения 577). Показано, что усиление действия топотекана в присутствии ингибиторов Tdp1 наблюдалось только для клеточной линии дикого типа A549 WT и полностью отсутствовало для мутантных клеток.

Выводы: Усиление действия топотекана в присутствии ингибиторов Tdp1 наблюдалось только для клеточной линии дикого типа A549 WT и полностью отсутствовало для мутантных клеток. Это может говорить о том, что синергетическое действие топотекана совместно с ингибиторами Tdp1 обусловлено именно подавлением активности Tdp1 выбранными ингибиторами.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ № 23-74-01078.

Study of Tdp1 inhibitors on cells knockout for the genes of the DNA repair system proteins PARP1 and Tdp1

Chepanova A.A.^{1*}, Chernyshova I.A.¹, Kornienko T.E.¹, Zakharenko A.L.¹,

Dyrkheeva N.S.¹, Drenichev M.S.², Filimonov A.S.³, Luzina O.A.³,

Salakhutdinov N.F.³, Lavrik O.I.¹

¹ Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

³ N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* arinachepanova@mail.ru

Key words: DNA repair system; tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1; topoisomerase 1; antitumor drugs; inhibitors

Motivation and Aim: Today it is known that the repair enzyme tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) plays a key role in the removal of DNA damage formed when topoisomerase 1 (Top1) is inhibited by clinically used anticancer drugs (irinotecan, topotecan), and is also involved in the repair of DNA damage caused by other antitumor drugs [1, 2]. There is also evidence of the interaction of Tdp1 with another enzyme of the repair system, namely poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1). PARylation (post-translational modification of proteins catalyzed by PARP1) regulates the enzymatic activity of Tdp1, stabilizes the enzyme and stimulates the recruitment of Tdp1 to sites of DNA damage caused by Top1cc complexes [3, 4]. Based on these data, we believe that it is necessary to study the effect of Tdp1 inhibitors on cells, taking into account the role of PARP1. To obtain new information about the work of Tdp1 inhibitors, we used cell lines knockout for the Tdp1 (Tdp1^{-/-}) or PARP1 (PARP1^{-/-}) genes [5, 6]. For study, we selected two compounds of different nature from those previously found, which had a pronounced sensitizing effect on tumor cells both in vitro and in vivo. One of the compounds is a biderivatized derivative of usnic acid (laboratory code AF-185, synthesized at the Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of the Russian

Academy of Sciences) [7], the other compound (laboratory code 577, synthesized at the Institute of Biochemistry of the Russian Academy of Sciences) [8] is a lipophilic derivative of purine nucleoside.

Methods and Algorithms: The effect of Tdp1 inhibitors on cell survival and on the cytotoxic effect of topotecan was studied using the MTT test by colorimetric measurement of the amount of formazan converted from 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) cells exposed to compounds (number of surviving cells). Cells were cultured in DMEM/F12 medium containing 10 % FBS and 1 % solution of antibiotics and antimycotics (100 units/ml penicillin, 0.1 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin), in an atmosphere of 5 % CO₂ at 37 °C. Cells were subcultured every 3–4 days to maintain exponential growth.

Results: The intrinsic cytotoxicity/antiproliferative activity of Tdp1 inhibitors was studied in the wild-type (WT) control cell line HEK293A (derived from human embryonic kidney), three Tdp1^{-/-} clones, and a PARP1^{-/-} clone using the MTT assay. It has been shown that the AF-185 compound has low toxicity both for HEK293A WT cells and for DNA repair protein genes knockout PARP1 and Tdp1 (at least 80 % of living cells). Another Tdp1 inhibitor, compound 577, has a more cytotoxic/antiproliferative effect on cells, approximately comparable for HEK293A WT and all knockout clones, which indicates that the toxic effect is not related to the presence or absence of Tdp1 in cells and the likely side targets of this compound.

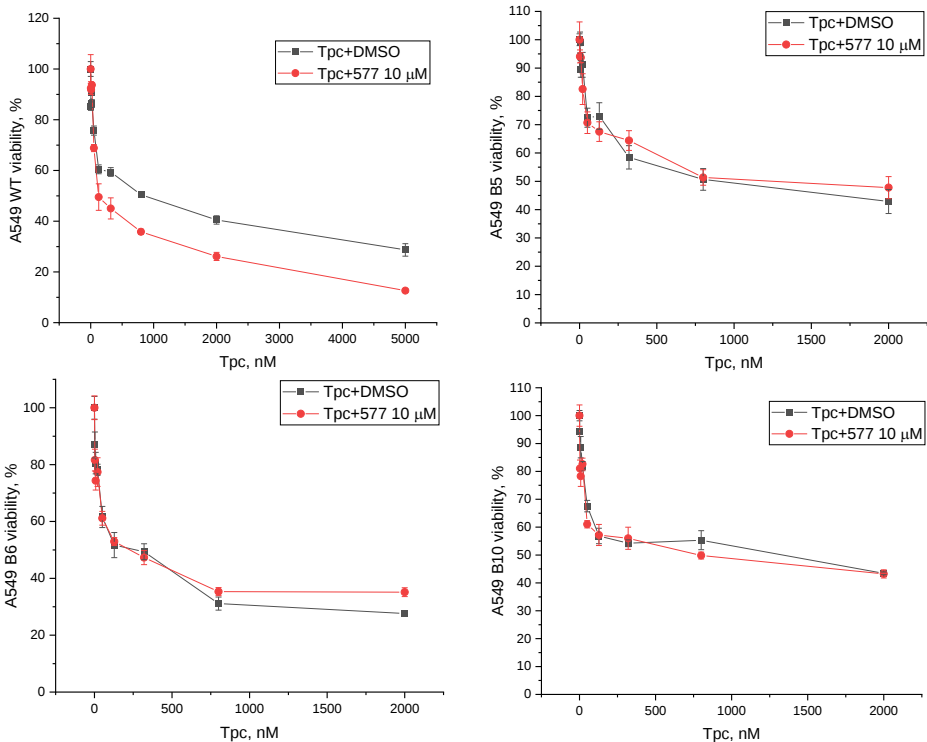


Fig. 1. Dose-dependent effect of topotecan in combination with the lipophilic derivative of purine nucleoside 577 at a concentration of 10 µM on the survival of the control cell line A549 WT and Tdp1^{-/-} clones

The effect of Tdp1 inhibitors on the cytotoxic effect of topotecan was also studied in control HEK293A WT cells and Tdp1^{-/-} and PARP1^{-/-} cells. Despite the high inhibitory activity of the selected derivatives against Tdp1 in in vitro experiments, in cells of non-tumor origin these compounds did not demonstrate an increase in the cytotoxic effect of topotecan. Due to the lack of a sensitizing effect on non-cancerous cells, we studied the effect of the selected compounds on the survival of the control cell line adenocarcinoma of human alveolar basal epithelial cells A549 and A549 cells with a knockout of the Tdp1 gene (cell clones B5, B6, B10) in mono mode and in combination with topotecan. Compound AF-185 was found to have low toxicity for both A549 WT and A549 Tdp1^{-/-}. Compound 577 had a more cytotoxic/antiproliferative effect on cells, approximately comparable for A549 WT and A549 Tdp1^{-/-}, as in the case of non-cancerous HEK293A cells.

Next, the effect of topotecan on the survival of the control cell line and the survival of A549 Tdp1^{-/-} clones was studied. It has been shown that cancer cell lines knockout for the Tdp1 gene (B5, B6, B10) are more sensitive to topotecan compared to wild-type cells, as is the case with non-cancerous HEK293A cells. The effect of Tdp1 inhibitors on the cytotoxic effect of topotecan was also studied on control A549 WT cells, as well as on Tdp1^{-/-} cells (Fig. 1, graphs are shown only for compound 577). It was shown that the enhanced effect of topotecan in the presence of Tdp1 inhibitors was observed only for the wild type A549 WT cell line and was completely absent for mutant cells.

Conclusion: An increase in the effect of topotecan in the presence of Tdp1 inhibitors was observed only for the wild-type cell line A549 WT and was completely absent for mutant cells, this may indicate that the synergistic effect of topotecan together with Tdp1 inhibitors is due precisely to the suppression of Tdp1 activity by the selected inhibitors.

Funding: The study is supported by the Russian Scientific Foundation grant No. 23-74-01078.

Список литературы/References

1. Brettrager E.J., van Waardenburg R.C.A.M. Targeting Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I to enhance toxicity of phosphodiester linked DNA-adducts. *Cancer Drug Resist.* 2019;2(4):1153-1163. doi 10.20517/cdr.2019.91
2. Pommier Y. et al. 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
3. Brettrager E.J. et al. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I N-Terminal Domain Modifications and Interactions Regulate Cellular Function. *Genes.* 2019;10(11):897. doi 10.3390/genes10110897
4. Sun Y. et al. Debulking of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC) by the proteasome, non-proteasomal and non-proteolytic pathways. *DNA Repair.* 2020;94:102926. doi 10.1016/j.dnarep.2020.102926
5. Dyrkheeva N.S. et al. 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
6. Dyrkheeva N.S. et al. New Hybrid Compounds Combining Fragments of Usnic Acid and Monoterpenoids for Effective Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibition. *Biomolecules.* 2021;11(7):973. doi 10.3390/biom11070973
7. Kornienko T.E. et al. 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
8. Chernyshova I.A. et al. The Lipophilic Purine Nucleoside-Tdp1 Inhibitor-Enhances DNA Damage Induced by Topotecan In Vitro and Potentiates the Antitumor Effect of Topotecan In Vivo. *Molecules.* 2022;28(1):323. doi 10.3390/molecules28010323