

ПРИЛОЖЕНИЕ

Синтез метильных производных гуанина. В работе использовали реактивы «Sigma-Aldrich» (США). Анализ реакционных смесей осуществляли на приборе Милихром А-02 («Эконова», Россия) методом обращённо-фазовой ВЭЖХ (колонка 2×75 мм, сорбент ProntoSIL 120-5-C18), в градиенте концентрации буфера Б (0,1М ТЕА-АсОН, рН 7,0, 80%-ный водный ацетонитрил) в буфере А (0,1 М ТЕА-АсОН, рН 7,0, вода), с регистрацией УФ-поглощения при 250, 260, 280 и 300 нм. ТСХ проводили на пластинках с силикагелем Kieselgel 60 F₂₅₄ («Merck», ФРГ), продукты визуализировали с помощью УФ-облучения ($\lambda = 254$ нм). Для хроматографии на силикагеле использовали MN Kieselgel 60 (40–63 мкм, «Macherey-Nagel», ФРГ). Обращённо-фазовую колоночную хроматографию (ОФХ) проводили с использованием Preparative Porasil C-18 (55–105 мкм, 125А, «Waters», США). Состав элюентов указан в объёмных процентах. Упаривание растворов проводили при пониженном давлении и температуре 40 °С на роторном испарителе RE-51 («Yamato», Япония). Спектры ЯМР (δ , м.д.) записывали на спектрометрах AV300 и AV400 («Bruker», ФРГ) в подходящих дейтерированных растворителях. В качестве внутреннего стандарта для ЯМР-спектров использовали остаточные протоны растворителя.

7,8-Диметилгуанин. Синтез проводили по схеме, представленной на рис. S1, используя методики ранее опубликованных работ [1–4]. Натрий (1,38 г, 0,06 моль) растворяли в метаноле (20 мл), к раствору добавляли 2-амино-4,6-дихлорпиримидин (5 г, 0,03 моль). Реакционную смесь перемешивали сутки, осадок отделяли фильтрованием, промывали метанолом и водой, сушили при 60 °С. Полученный осадок суспендировали в концентрированной HCl (30 мл) и кипятили с обратным холодильником 30 мин. Суспензию выливали в холодную воду (150 мл), охлаждали (4 °С), осадок отделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали. К раствору анилина (1,86 г, 0,02 моль) в 6 N HCl (10 мл) добавляли раствор NaNO₂ (1,38 г, 0,02 моль) в воде (7 мл). 2-Амино-4-хлор-6-гидрокси-пиримидин (2,9 г, 0,02 моль) и Na₂CO₃ (4,24 г, 0,04 моль) растворяли в 0,2 N NaOH (120 мл). К раствору добавляли раствор соли диазония, полученный при диазотировании анилина, в течение 1 ч при охлаждении. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Осадок отделяли фильтрованием, промывали водой, этанолом, диэтиловым эфиром и высушивали на воздухе. Полученное фенилазосоединение (3,7 г, 0,015 моль) растворяли в этаноле (20 мл), добавляли бензиламин (3 мл), раствор нагревали с обратным холодильником до кипения 2 ч. Суспензию охлаждали, осадок отделяли фильтрованием, промывали этанолом,

диэтиловым эфиром и высушивали на воздухе. Азосоединение (2,4 г, 7,5 ммоль) растворяли в 2 N NaOH (50 мл), к раствору добавляли дитионит натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (7,2 г, 40 ммоль) при температуре 60–70 °С в течение 1 ч. По окончании восстановления реакционную смесь охлаждали и нейтрализовали 6 N HCl. Выпавший осадок отделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали. Получившееся производное 2,4-диамино-6-гидроксипиримидина растворяли в формамиде (20 мл) и нагревали при температуре 200 °С в течение 1 ч. Реакционную смесь упаривали, продукт циклизации очищали с помощью ОФХ в градиенте этанола в воде (0 → 50%). После упаривания фракций, содержащих нужный продукт, получили 1,0 г (4,3 ммоль) 9-бензилгуанина. Полученный 9-бензилгуанин смешивали с 12 мл метилтозилата и нагревали в течение 1 ч при температуре 130 °С. Реакционную смесь охлаждали, добавляли диэтиловый эфир (200 мл) и выдерживали 12 ч при 4 °С. Диэтиловый эфир декантировали, продукт метилирования очищали с помощью ОФХ в градиенте этанола в воде (0 → 30%). Тозилат 7-метил-9-бензилгуанина (1,8 г, 4,2 ммоль) растворяли в 1 N NaOH (20 мл), нагревали при 100 °С 30 мин, охлаждали, добавляли AcOH (1,2 мл, 20 ммоль). Продукт выделяли с помощью ОФХ в градиенте концентрации этанола в воде (0 → 30%). Полученное соединение (1 г, 3,7 ммоль) растворяли в 3%-ной водной AcOH, добавляли 10% Pd/C (0,4 г) и восстанавливали в атмосфере H_2 в течение 2 суток. По окончании реакции смесь фильтровали, осадок промывали водой и метанолом, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в метаноле (30 мл), добавляли концентрированную HCl (3 мл), смесь перемешивали при 60 °С в течение 1 ч, затем упаривали, остаток сушили в вакууме. К остатку добавляли уксусный ангидрид (16 мл), смесь нагревали с обратным холодильником до кипения в течение 4 суток, затем упаривали. Продукт циклизации выделяли ОФХ в градиенте концентрации этанола в воде (0 → 30%). Остаток после упаривания фракций ОФХ, содержащих N^2 -ацетил-7,8-диметилгуанин, растворяли в 1 N NaOH (10 мл) и нагревали до кипения с обратным холодильником 30 мин. После охлаждения реакционную смесь нейтрализовали AcOH (0,8 мл). Выпавший осадок отделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали в вакууме. Получили 0,4 г 7,8-диметилгуанина (2,3 ммоль, выход 7,7%).

$^1\text{H-NMR}$ (δ , DCOOD): 3,75 (с, 3H, CH_3), 2,46 (с, 3H, CH_3).

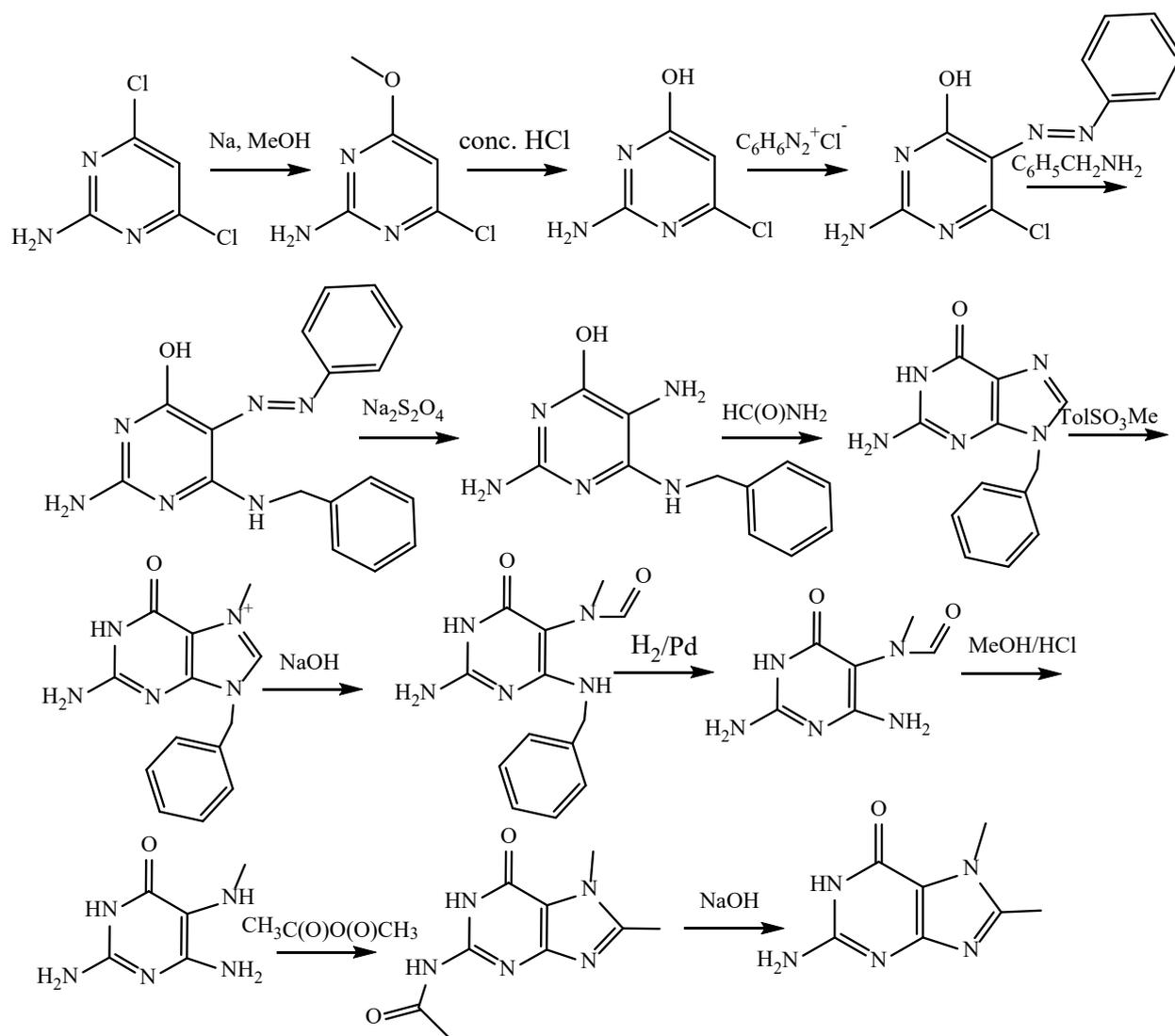


Рис. S1. Схема синтеза 7,8-диметилгуанина.

7,9-Диметилгуанин. Синтез проводили по схеме, представленной на рис. S2, используя методику из ранее опубликованной работы [5] с некоторыми изменениями. Гуанин (2 г, 13,3 ммоль) суспендировали в 20 мл диметилацетамида, затем добавляли 3 мл диметилсульфата в течение 30 мин. Реакционную смесь нагревали при перемешивании в течение 1,5 ч при 140 °С, затем охлаждали до комнатной температуры, добавляли 40 мл этанола, нейтрализовали раствором аммиака. Выпавший осадок отделяли центрифугированием и промывали этанолом, сырой продукт перекристаллизовывали из воды. После сушки при 50 °С получили 1,5 г 7,9-диметилгуанина (6,8 ммоль, выход 51%).

^1H -ЯМР (δ , DMSO- d_6 + 50 мкл ТФУ): 11.79 (с, 1H, NH1), 9.15 (с, 1H, H8), 7.28 (уш. с, 3H, NH $_3^+$), 3.98 (с, 3H, CH $_3$), 3.69 (с, 3H, CH $_3$); ^{13}C -ЯМР (δ , DMSO- d_6 + 50 мкл ТФУ): 155.89, 155.60, 149.97, 138.58, 107.07, 35.31, 31.20.

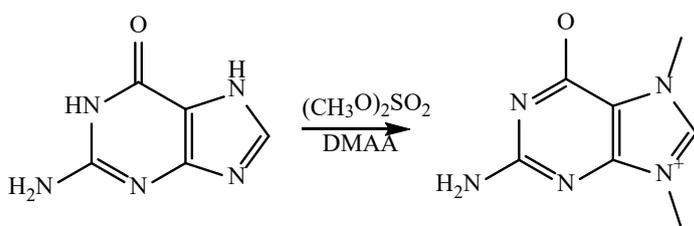


Рис. S2. Схема синтеза 7,9-диметилгуанина.

3,7-Диметилгуанин. Синтез проводили по схеме, представленной на рис. S3, используя ранее опубликованную методику [6]. К теобромину (1 г, 5,5 ммоль) добавляли 8 мл хлорокси фосфора. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч. После этого реакционную смесь упаривали, к остатку приливали хлористый метилен (5 мл). Раствор аккуратно выливали в смесь льда (50 г) и NaHCO_3 (2 г). Осадок отделяли центрифугированием, промывали водой и ацетоном, высушивали. Остаток обрабатывали кипящим 1,2-дихлорэтаном (20×3 мл). Раствор в дихлорэтано упаривали, остаток помещали в герметичный стальной сосуд и нагревали в течение 1,5 ч при 100°C с 20 мл концентрированного водного раствора аммиака. По окончании реакции смесь упаривали, остаток перекристаллизовывали из 70%-ного водного этанола. Получали 0,4 г 3,7-диметилгуанина (2,22 ммоль, выход 40%).

^1H -ЯМР (δ , DCOOD): 8.12 (с, 1H, H8), 4.02 (с, 3H, CH_3), 3.80 (с, 3H, CH_3); ^{13}C -ЯМР (δ , DCOOD): 154.49, 153.40, 150.12, 146.68, 111.80, 36.06, 34.04.

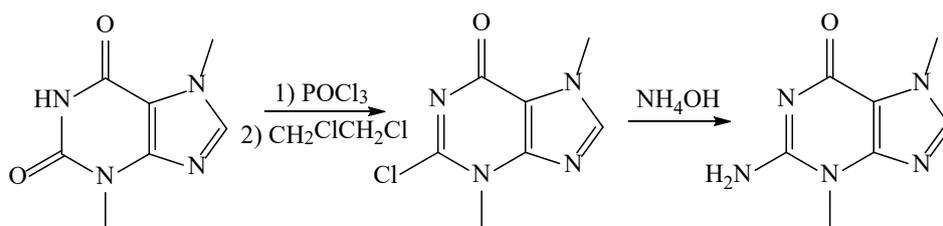


Рис. S3. Схема синтеза 3,7-диметилгуанина.

$N^2,7$ -Диметилгуанин и $N^2,N^2,7$ -триметилгуанин. Синтез данных производных проводили по схеме, представленной на рис. S4. Для этого использовали ранее опубликованные методики получения 2,6-дихлор-7-метилпурина и 2-хлор-6-оксо-7-бензилпурина [7, 8]. Теобромин (1,5 г, 8,3 ммоль) и POCl_3 (15 мл) нагревали до кипения с обратным холодильником в течение 5 ч, затем охлаждали до комнатной температуры. В реакционную смесь добавляли PCl_5 , суспензию нагревали до кипения с обратным холодильником 3 ч, охлаждали при 4°C . Осадок отделяли фильтрованием, промывали

диэтиловым эфиром, высушивали на воздухе и далее помещали на лёд. Получившуюся при перемешивании суспензию нейтрализовали 1 N NaOH. Выпавший осадок отделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали в вакууме. Полученный 2,6-дихлор-7-метилпурин нагревали до кипения с обратными холодильником в 1 N NaOH (15 мл) в течение 20 мин, охлаждали и нейтрализовали. Полученный осадок отделяли фильтрованием, промывали водой, ацетоном и высушивали. 2-Хлор-6-оксо-7-метилпурин (0,2 г, 1,08 ммоль) и 40%-ный водный раствор метиламина (20 мл) помещали в герметичный стальной сосуд и нагревали при 130 °С в течение 24 ч. После охлаждения раствор упаривали. Продукты реакции разделяли с помощью хроматографии на силикагеле в градиенте концентрации этанола (0 → 20%) в хлористом метиле. Целевые фракции упаривали, остаток сушили на воздухе и в вакууме масляного насоса до постоянного веса. Получили 0,05 г *N*²,7-диметилгуанина (0,28 ммоль, выход 26%) и 0,04 г *N*²,*N*²,7-триметилгуанина (0,21 ммоль, выход 19%).

*N*²,7-диметилгуанин: *R*_f 0.20 (этанол : CH₂Cl₂, 1 : 7); ¹H-ЯМР (δ, DMSO-*d*₆): 10.79 (с, 1H, NH), 7.84 (с, 1H, H8), 5.95 (к, 1H, *J* 4.5, NHCH₃), 3.82 (с, 3H, CH₃), 2.76 (д, 3H, *J* 4.5, NHCH₃); ¹³C-ЯМР (δ, DMSO-*d*₆): 159.55, 154.88, 152.44, 143.45, 108.85, 33.02, 27.87.

*N*²,*N*²,7-триметилгуанин: *R*_f 0.45 (этанол : CH₂Cl₂, 1 : 7); ¹H-ЯМР (δ, DMSO-*d*₆): 10.81 (с, 1H, NH), 7.88 (с, 1H, H8), 3.84 (с, 3H, CH₃), 3.01 (с, 6H, N(CH₃)₂); ¹³C-ЯМР (δ, DMSO-*d*₆): 159.35, 155.52, 152.58, 143.97, 108.18, 37.90, 33.05.

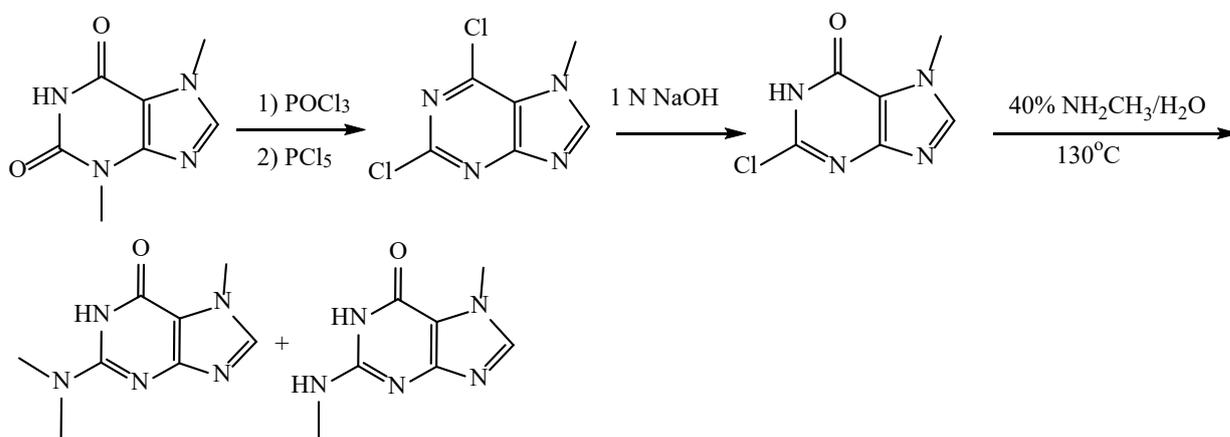


Рис. S4. Схема синтеза *N*²,7-диметилгуанина и *N*²,*N*²,7-триметилгуанина.

Влияние пермеабилзации клеток H9c2 на клеточную адгезию. Клетки H9c2 растили в течение 48 ч в 4-луночных планшетах на пластиковой поверхности, покрытой желатином, проводили микроскопический анализ 5 выбранных полей в режиме фазового

контраста с помощью автоматизированного микроскопа LionHeart FX («Biotek», США), после чего ростовую среду удаляли и в лунки с опытными культурами вносили охлаждённый гипотонический раствор (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ Na₂ЭДТА, 4 мМ MgCl₂, 30 мМ β-меркаптоэтанол, рН 7,8) с дигитонином (35 мкМ), а в контрольные – без дигитонина. После 5 мин инкубации при 0 °С лунки дважды промывали охлаждённым гипотоническим раствором, затем раствором Хэнкса, и проводили окрашивание гомодимером этидия III. После этого проводили повторный микроскопический анализ в режимах флуоресценции (RFP-канал) и фазового контраста.

Типичные снимки, представленные на рис. S5, показывают, что после пермеабиллизации дигитонином большинство клеток остаётся прикреплённым к подложке. При этом на фазово-контрастных снимках вид клеток, обработанных дигитонином, отличается от контрольных (рис. S5, б и д): после пермеабиллизации клетки становятся менее объёмными, их ядра четко очерчены.

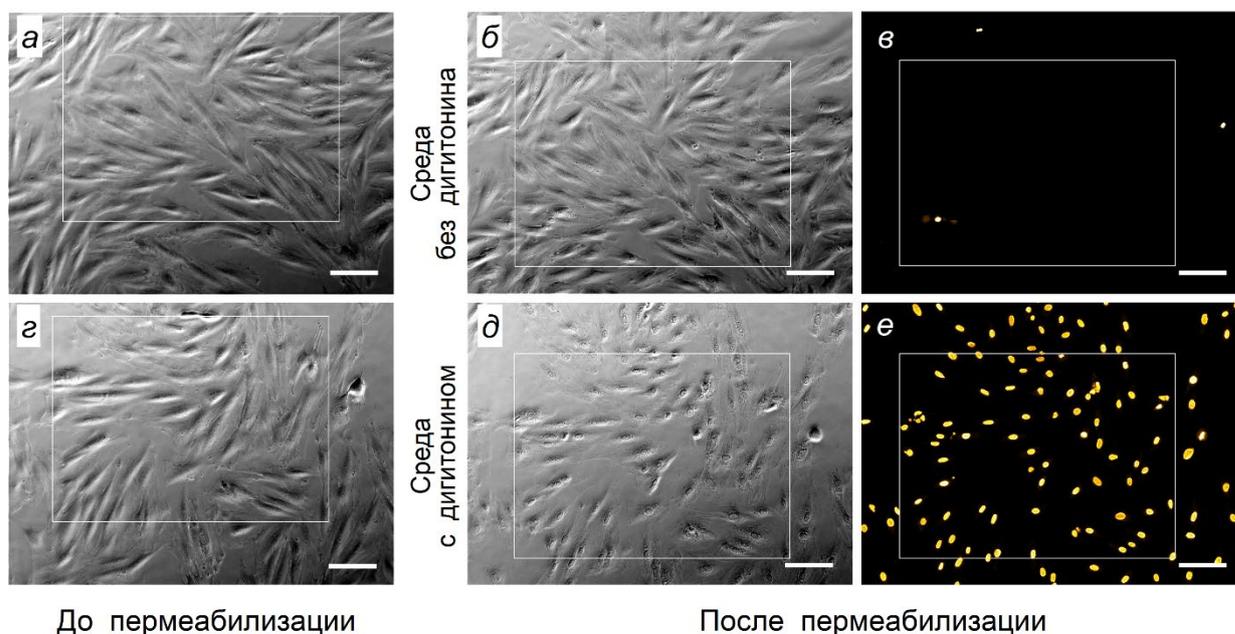


Рис. S5. Влияние пермеабиллизации клеток H9c2 дигитонином на конfluence культуры. Прижизненная микроскопия препаратов клеток, окрашенных гомодимером этидия III в режиме фазового контраста (а, б, г, д) и флуоресценции (в, е). Ядра пермеабиллизованных клеток окрашены гомодимером этидия III (в, е). Одни и те же поля выделены прямоугольниками (а–в и г–е соответственно). Длина масштабной планки соответствует 100 мкм. Объектив 10×

Сравнение уровней PAR в пермеабиллизованных и живых клетках H9c2 после активации PARP с помощью олиго-ДНК или H₂O₂. Сестринские культуры клеток H9c2

растили в 48-луночных пластиковых планшетах, покрытых желатином в течение 48 ч, после чего подвергали определённым процедурам для анализа уровней PAR в пермеабелизованных и живых клетках после активации PARP с помощью олиго-ДНК или H₂O₂ (рис. S6, а). Преинкубацию клеток с PJ34 (5 мкМ, 1 ч) проводили при 37 °С в ростовой среде в атмосфере 5%-ного CO₂, инкубацию с H₂O₂ (1 мМ, 5 мин) – при 25 °С в ростовой среде, пермеабелизацию дигитонином (35 мкМ) – при 0 °С в гипотоническом растворе. Олиго-ДНК использовали в конечной концентрации 50 мкг/мл.

Пермеабелизованные клетки фиксировали *para*-формальдегидом (10 мин, комнатная температура), а живые – метанолом (20 мин, 0 °С). Микрофлуоресцентный анализ проводили с помощью автоматизированного микроскопа LionHeart FX («Biotek»).

Результаты анализа PAR в отдельных ядрах представлены на рис. S6, б.

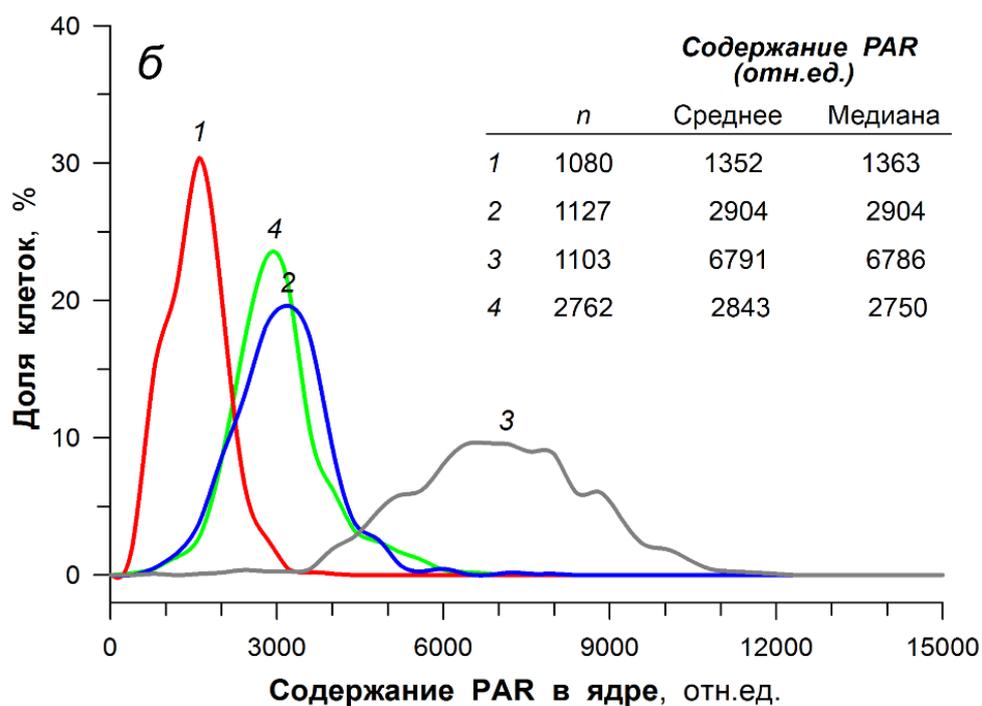
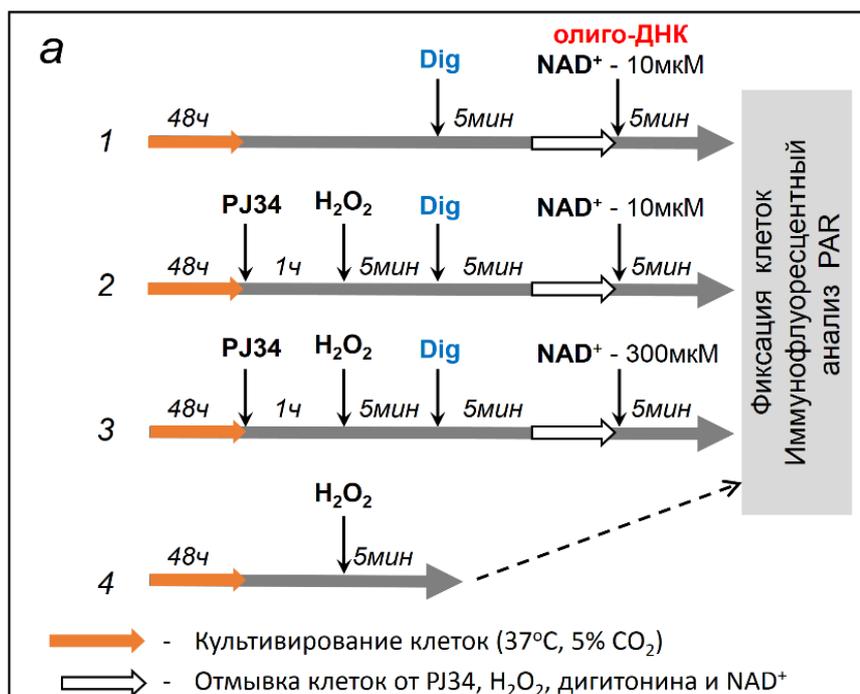


Рис. S6. Сравнение уровней PAR в пермеабелизованных и живых клетках H9c2 после активации PARP олиго-ДНК или H₂O₂. *а* – схема получения препаратов пермеабелизованных (1 – 3) и живых (4) клеток и анализа в них уровня PAR; Dig - дигитонин. *б* – Результаты количественного анализа содержания PAR в индивидуальных ядрах; *n* – число ядер.

Кинетика реакции PARилирования в пермеабилizованных клетках H9c2.

Кинетические зависимости реакции PARилирования, полученные при использовании оптимизированного метода анализа активности PARP в пермеабилizованных клетках H9c2, хорошо описываются уравнением экспоненты (Рис. S7). Уровень PAR достигает максимальных значений при инкубации клеток в течение 15 мин. Внесение референсного ингибитора 3-аминобензамида в концентрации 5 мкМ приводит к значительному снижению как начальной скорости реакции, так и уровня PAR в исследуемом диапазоне времен инкубации.

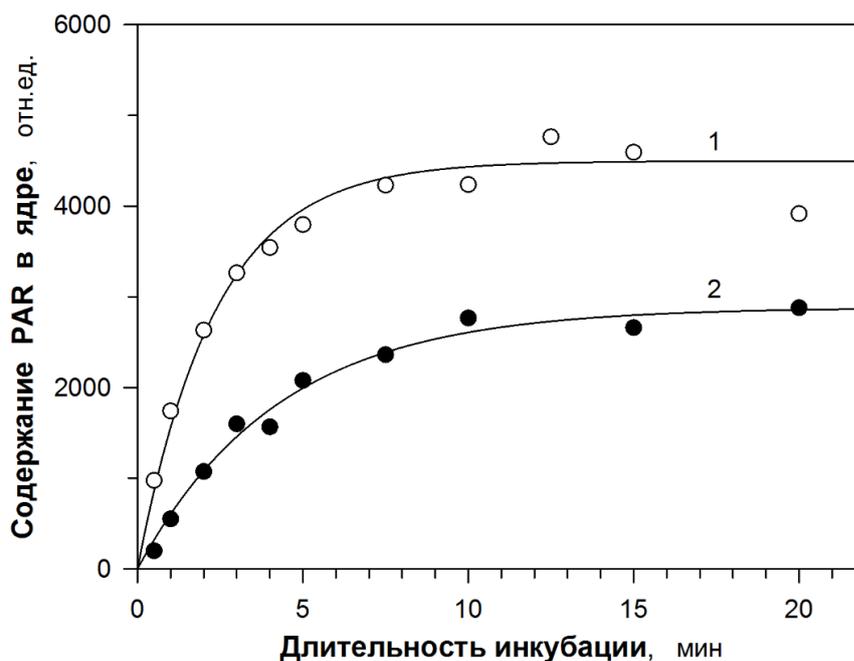


Рис. S7. Кинетика реакции PARилирования в пермеабилizованных клетках H9c2. Обозначения: 1 – кинетика без ингибитора; 2 – кинетика в присутствии ингибитора 3-аминобензамида (5 мкМ). Концентрация NAD⁺ – 10 мкМ.

Возможные ионизационные состояния 7,9-диметилгуанина и 3,7-диметилгуанина. Депротонирование N1-атома амидной группы (Рис. S8) приводит к потере эффективного взаимодействия с остатком Gly863.

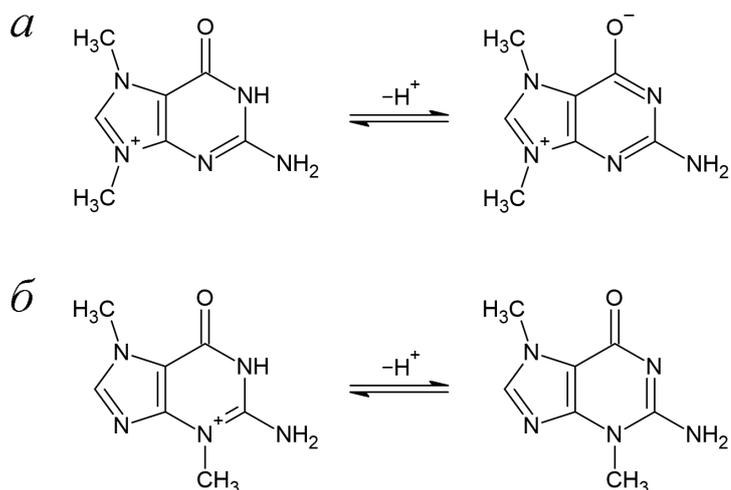


Рис. S8. Возможные ионизационные состояния 7,9-диметилгуанина (*a*) и 3,7-диметилгуанина (*б*).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rose, F. L., and Tuley, G. A. (1946) *p*-Aminobenzenesulphonamide derivatives of pyrimidine as antibacterial agents, *J. Chem. Soc.*, 81-85.
2. Koppel, H. C., O'Brien, D. E., and Robins, R. K. (1959) Potential purine antagonists. XIX. Synthesis of some 9-alkyl(aryl)-2-amino-6-substituted purines and related ν -triazolo [d]pyrimidines, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3046–3051.
3. von Pfeleiderer, W., and Sági, F. (1964) Untersuchungen in der pyrimidinreihe, XIII. 4-Amino-5-alkylamino-pyrimidine, *Liebigs Ann. Chem.*, **673**, 78-82.
4. von Pfeleiderer, W., and Shanshal, M. (1969) Purine VII. Synthese und eigenschaften von 8-methyl- und 8-trifluormethyl-guaninen, *Liebigs Ann. Chem.*, **726**, 201-215.
5. Jones, J. W., and Robins, R.K. (1962) Potential purine antagonists. XXX. Purine betaines and related derivatives prepared by direct methylation of the simple purines, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1914-1919.
6. Головчинская Е.С., Николаева Л.А., Овчарова И.М. (1967) Способ получения производных теобромину, замещенных в положении 2, *Авторское свидетельство SU 202153*.
7. Гуторов Л.А. (1967) Способ получения 2,6-дихлор-7-метилпурина, *Авторское свидетельство SU 207918*.

8. Гуторов Л.А., Персанова Л.В., Корсунский В.С., Кочергин П.М. (1978) Способ получения гуанина, *Авторское свидетельство SU 615078*.