

УДК 577.1:615.214.24-092.9:611.012

## СТРУКТУРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОТСУТСТВИЯ ТЕРАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ТАЛИДОМИДА У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

*Ринейская О. Н., Баньковский А. А.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В работе проанализированы аминокислотные последовательности целевого белка талидомида цереблон ряда животных и человека, демонстрирующих наличие или отсутствие тератогенного эффекта талидомида. Выявлена ключевая аминокислотная замена, которая, вероятно, приводит к отсутствию токсичного влияния на плод грызунов, являющихся основными экспериментальными видами. Основываясь на свойстве талидомида как молекулярном клее, предлагается в качестве объяснения феномена отсутствия тератогенности модель так называемого гидрофобного амфитеатра.

**Ключевые слова:** талидомид, цереблон, молекулярный клей, тератогенность.

**Введение.** Впервые талидомид был синтезирован исследовательским отделом немецкой фармацевтической компании «Хеми Грюненталь» (нем. Chemie Grünenthal) в 1954 г. Первые клинические данные свидетельствовали о том, что препарат обладал мягким снотворным и расслабляющим действием. Сон по ощущениям пациентов был максимально глубоким и естественным [1]. При этом было отмечено, что лекарство имело крайне низкую токсичность и в сравнении с распространенными барбитуратами было намного более безопасным. Этот факт способствовал огромной популярности талидомида на фармацевтическом рынке. Исследования на мышах и других животных показали, что талидомид безопасен, и побудили некоторые страны разрешить использование этого препарата для лечения пациентов. Лекарственное средство стало успешно применяться для устранения неприятных симптомов, связанных с беременностью, таких как бессонница, беспокойство и утренняя тошнота. Однако препарат оказался тератогенным [2]. Таким образом, в результате приема талидомида беременными женщинами в период с 1956 по 1962 г. в ряде стран мира родилось по разным подсчетам от 8000 до 12 000 детей с врожденными уродствами и/или аномалиями умственного развития [3]. Впоследствии испытания соединения на беременных мышах и крысах не

продемонстрировали тератогенный эффект, что надолго поставило в тупик исследователей того времени.

Талидомид оказывает тератогенное действие на эмбриональное развитие и вызывает широкий спектр врожденных дефектов, включая поражение конечностей, лица, глаз, ушей, гениталий и внутренних органов. До открытия основной мишени талидомида предполагалось, что его тератогенность опосредована ингибированием ангиогенеза или повреждением ДНК, вызванным активными формами кислорода [4].

В 2010 г. была установлена мишень талидомида — белок цереблон (CRBN). Он является рецептором убиквитин-лигазного комплекса CRL4CRBN, т. е. ответствен за работу убиквитин-протеасомной системы (UPS). В настоящее время идентифицирован ряд субстратов, которые распознаются CRL4CRBN только в присутствии талидомида или его производных. В их отношении используется термин неосубстраты. Другими словами, талидомид и его производные действуют как молекулярные клеи [5] между CRBN и неосубстратами (рисунок 1). Молекулярный клей — это небольшая молекула (на рисунке 1 обозначена желтым), которая «прилипает» к ферменту (Белок А) и, изменяя конформацию его поверхности, «приклеивает» к нему целевой нетипичный белок — неосубстрат (Белок С).

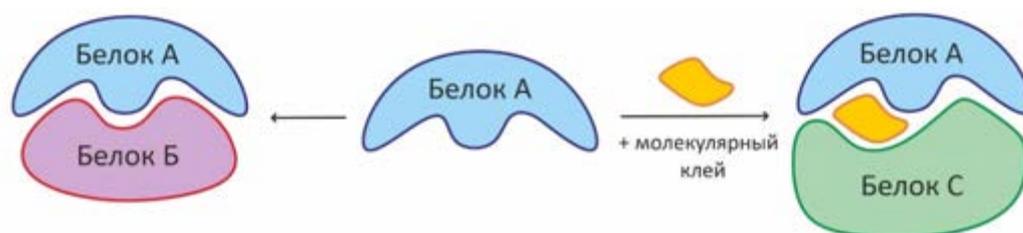


Рисунок 1 — Механизм действия молекулярных клеев

К неосубстратам в основном относятся факторы транскрипции класса цинковых пальцев. Одним из таких неосубстратов является белок Spalt-подобный белок 4 (SALL4). SALL4 представляет собой транскрипционный фактор, кодируемый геном семейства Spalt-подобных (SALL) генов. Для выяснения того, как талидомид вызывает врожденные дефекты, группа исследователей воздействовала на эмбриональные стволовые и злокачественные клетки человека талидомидом и родственными препаратами [6]. Анализ внутриклеточных белков показал, что указанные лекарственные средства вызывают резкое снижение количества SALL4, необходимого для развития конечностей. Уже было известно, что дисфункция протеина SALL4 фигурирует в патогенезе лучевого синдрома Дуэйна и синдрома Холта — Орама. Оба состояния могут привести к врожденным дефектам, подобным тем, которые наблюдаются у детей, подвергшихся воздействию талидомида. Талидомид как раз опосредует взаимодействие между CRBN и фактором транскрипции SALL4, действуя как молекулярный клей. В результате этого взаимодействия SALL4 помечается убиквитином и далее деградирует в протеасоме. Также было показано, что талидомид индуцирует деградацию SALL4 у людей и кроликов, но не у грызунов. Это согласуется с наблюдениями еще 60-х гг. прошлого века, которые указывали на отсутствие тератогенного действия талидомида у мышей и крыс, но не людей. Вероятнее всего, выходу на рынок талидомида поспособствовал именно факт такого видоспецифического действия препарата, который не мог быть учтен компанией.

Подобные феномены биологического действия различных соединений на организмы разных видов вызывают большой интерес. До настоящего времени неясно, почему

талидомид не вызывает тератогенный эффект у грызунов. В особенности интересны исследования структурной протеомики в этой области.

**Цель работы** — установить возможную причину видоспецифического действия талидомида *in silico* в отношении некоторых видов животных.

**Материалы и методы.** В рамках данного исследования необходимо было сравнить последовательности аминокислот молекулы цереблona человека и нескольких видов животных, выявить ключевые различия в первичной структуре белка, найти закономерности и проанализировать полученные данные, основываясь на концепции молекулярных клеев, попытаться построить гипотезу молекулярного взаимодействия, объясняющую феномен отсутствия тератогенности у грызунов и некоторых других видов экспериментальных животных.

Сиквенсы цереблona, целевого белка талидомида, разных животных и человека получены из библиотеки NCBI Gene (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Для выравнивания аминокислотных последовательностей применялась программа BLAST. Трехмерные структуры цереблona человека и мыши были получены из базы данных Protein Data Bank (7bqu — Homo sapiens, 4tzc — Mus musculus). Для молекулярного докинга *in silico* использовался плагин Glide (Schrodinger). При помощи программы PyMOL (Schrodinger) произведен анализ структуры полученных белок-лиганд комплексов, а также сравнение пространственных особенностей CRBN человека и мыши. Для графической 2D-визуализации гипотезы «гидрофобного амфитеатра» использован редактор химической графики ChemDraw.

**Результаты и их обсуждение.** Для исследования было выбрано 8 видов животных,

которые были разделены на две группы в зависимости от наличия или отсутствия тератогенного действия талидомида (таблица 1). Влияние на плод представленных видов было показано эмпирически в ранних исследованиях [7].

Таблица — Группы животных (включая *Homo sapiens*), структура cerebrona которых сравнивалась в настоящем исследовании

| Группа 1 (талидомид тератогенен) | Группа 2 (талидомид не тератогенен) |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| 1. <i>Homo sapiens</i>           | 1. <i>Mus musculus</i>              |
| 2. <i>Chlorocebus sabaeus</i>    | 2. <i>Rattus norvegicus</i>         |
| 3. <i>Pongo pygmaeus</i>         | 3. <i>Felis catus</i>               |
| 4. <i>Oryctolagus cuniculus</i>  | 4. <i>Sus scrofa</i>                |

Нами была выдвинута гипотеза о том, что целевой белок талидомида cerebrон

имеет отличия (аминокислотные замены) у представителей двух групп, что вероятнее всего сказывается на эффективности взаимодействия протеина и талидомида. Для этого из базы данных NCBI Gene были взяты сиквенсы CRBN указанных видов и выравнены в программе BLAST. Одновременно анализируя пространственную структуру cerebrона, была выявлена аминокислотная замена: у всех животных группы 2 в талидомид-связывающем домене CRBN в положении 391 находится изолейцин, в то время как у представителей группы 1 этому положению соответствует аминокислота Val387. Это единственная замена на протяжении всего талидомид-связывающего домена с такой выраженной закономерностью. Результаты выравнивания представлены на рисунке 2.

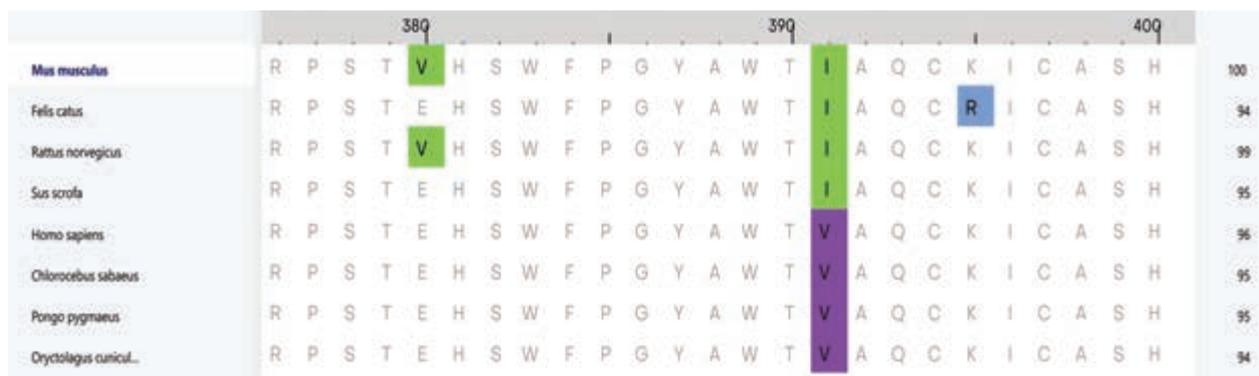


Рисунок 2 — Аминокислотные замены в талидомид-связывающем домене cerebrона

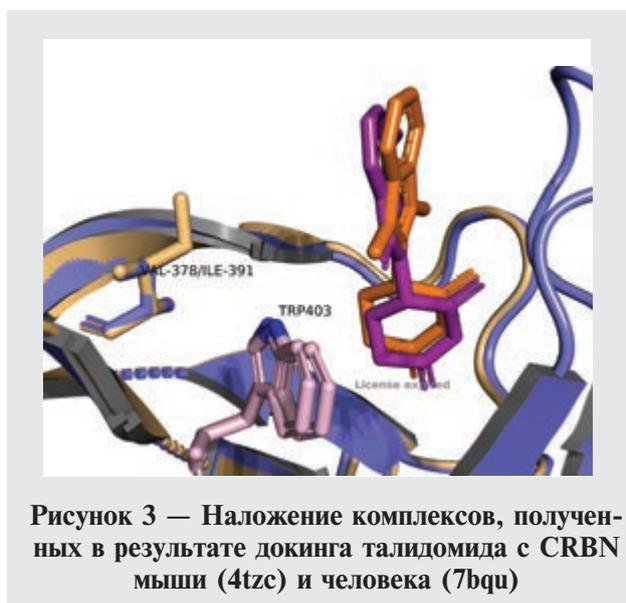


Рисунок 3 — Наложение комплексов, полученных в результате докинга талидомида с CRBN мыши (4tzc) и человека (7bqu)

Чтобы проверить влияние аминокислотной замены на связывание талидомида с CRBN было решено провести молекулярный докинг. Для этого в базе данных RCSB PDB были взяты 3D-структуры cerebrона человека как представителя группы 1 и мыши — представителя группы 2. Однако никаких значимых различий в энергии и характере связывания выявлено не было. Более того, ни Ile391, ни Val387 не взаимодействовали с молекулой талидомида (рисунок 3).

Исходя из этого факта, можно заключить, что, вероятнее всего, отсутствие тератогенного действия талидомида по отношению к животным группы 2 не обусловлено низкой аффинностью соединения к CRBN. Следовательно, стоит рассмотреть данный

феномен в контексте механизма молекулярных клеев. Для этого анализировалась структура комплекса CRBN-талидомид-неосубстрат (SALL4) человека. Было установлено, что одно из ключевых взаимодействий, которое возникает между CRBN и SALL4 — это водородная связь между пиррольным атомом триптофана 403 и карбонильным кислородом цистеина 7 соответственно (рисунок 4).

В цереблоне человека Val387 своей боковой цепью не заслоняет атом азота Trp403 (рисунок 5, б).

В случае же с цереблоном мыши, боковая цепь Ile391 создает на поверхности белка заметную гидрофобную шпильку (рисунок 5, а).

Однако, рассматривая только структуру CRBN, нельзя утверждать, что Ile391 существенно закрывает доступ к триптофану, блокируя тем самым взаимодействие цереблона и неосубстрата. Полученные нами в PDB кристаллографические структуры CRBN мыши демонстрируют следующую картину: Trp403 всегда ассоциирован с водой, в то время как Trp403 CRBN человека всегда взаимодействует с каким-либо неосубстратом, образуя водородную связь (в случае цинковых пальцев — с цистеином). Возникает вопрос, почему триптофан цереблона человека в клетке не образует устойчивое соединение с водой, а «предпочитает» взаимодействие с неосубстратом SALL4. Можно предположить, несмотря на то, что замена Val на Ile является консервативной, а боковая цепь изолейцина в мышечном цереблоне не создает существенного экранирования ключевого пиррольного атома триптофана, взаимодействие с SALL4 является затруднительным и образование водородной связи с водой куда более предпочтительно. Мы попытались объяснить данный феномен с помощью модели «гидрофобного амфитеатра». Под «гидрофобным амфитеатром» мы подразумеваем то аминокислотное окружение, в котором находится пиррольный атом Trp403 (показан синим цветом на рисунке б) цереблона мыши.

Атом азота индольного ядра триптофана располагается как бы на «сцене» амфитеатра, «трибуны» которого в основном состоят из гидрофобных боковых цепей аминокислот (показаны белым цветом на электростатической поверхности CRBN на рисунке б).

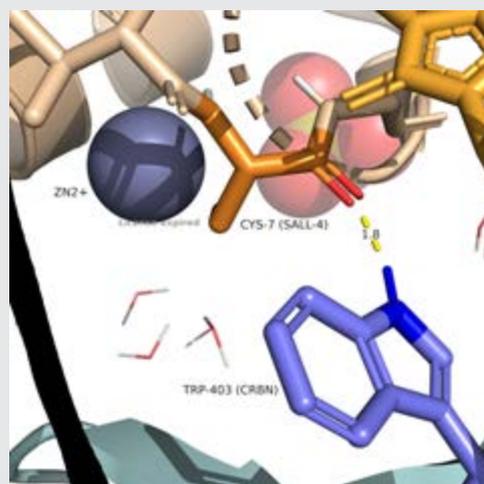


Рисунок 4 — Водородная связь между Trp403 CRBN и Cys7 SALL4

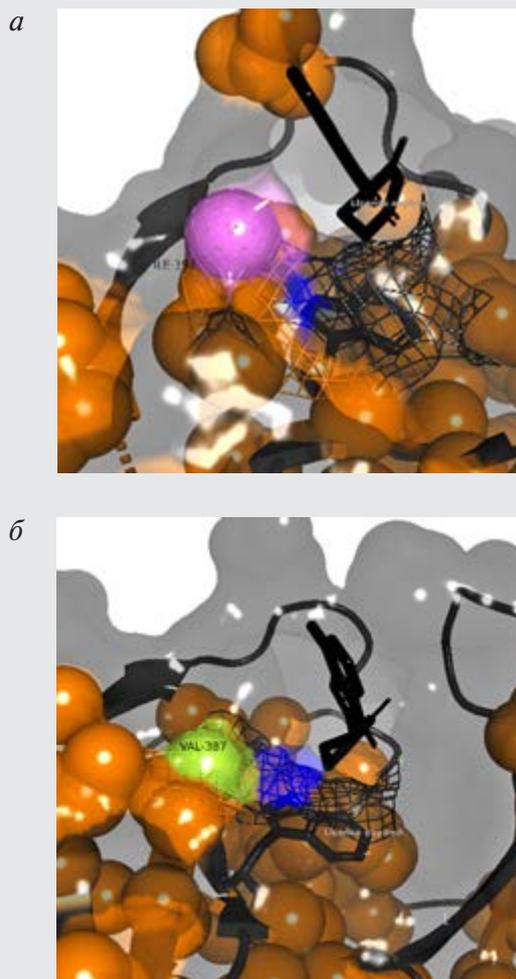


Рисунок 5 — Сайт связывания талидомида и CRBN мыши (а) и человека (б)

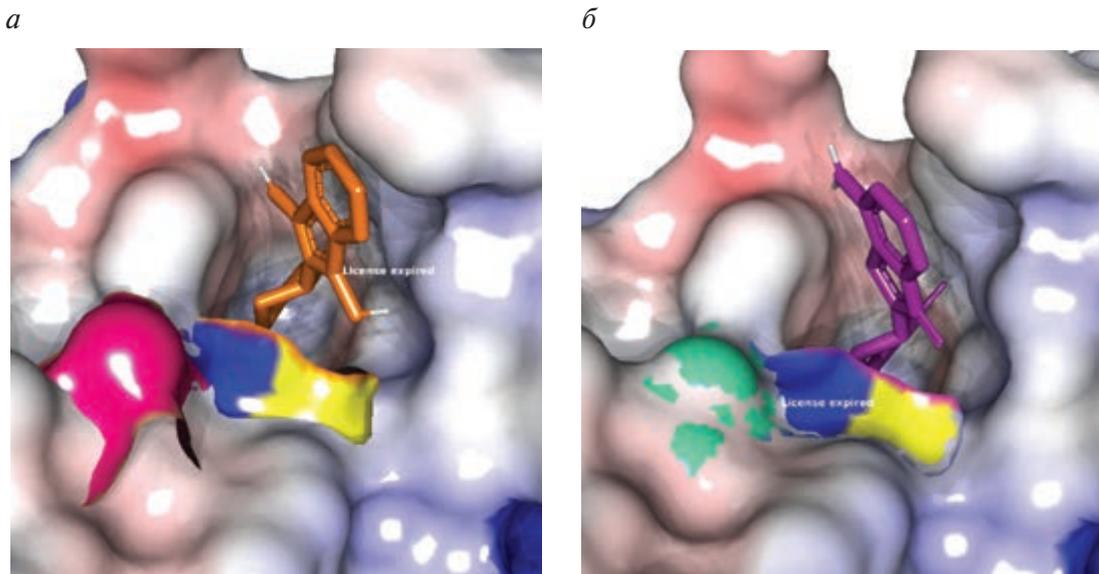


Рисунок 6 — Сайт связывания талидомида и CRBN мыши (а) и человека (б)

Среди них розовым цветом выделена боковая цепь Ile391, которая располагается рядом с атомом азота триптофана, находясь несколько выше плоскости ядра индола (рисунок 6, а). В молекуле cereblona человека боковая цепь Val387 находится приблизительно в одной плоскости с азотом Trp403 (рисунок 6, б). Физически этот феномен можно объяснить следующим образом: карбонильная группа Cys7 неосубстрата SALL4 обладает большим дипольным моментом, чем вода (2,7 D и 1,87 D соответственно). Соответственно, электронная плотность у карбонильного атома кислорода цистеина будет повышена и приблизится к азоту триптофана, находящемуся на «сцене» узкого и глубокого (из-за выступающего Ile391) «гидрофобного амфитеатра» мышинового CRBN, будет стерически затруднительно. Молекула воды, обладая небольшими размерами, и с меньшей электронной плотностью на кислороде будет свободно помещаться в карман и образовывать водородную связь с пиррольным атомом азота Trp403, что исключает связывание SALL4 с cereblonom (см. рисунок 7, а). В итоге SALL4 не подвергается протеасомному разрушению и тератогенные свойства талидомида у животных группы 2 не проявляются.

В CRBN человека Val387 не выступает выше плоскости атома азота индольного ядра и создается своего рода «окно» доступа. В этом случае с азотом Trp403 могут взаимо-

действовать и молекула воды, и кислород Cys7 SALL4 (см. рисунок 7, б). Однако, возможно, термодинамически более выгодным будет взаимодействие CRBN с SALL4, и это событие будет происходить статистически чаще при наличии последнего в окружении CRBN. Разрушение SALL4 будет провоцировать развитие большинства аномалий плода, вызываемых приемом талидомида и его производных.

**Закключение.** Полученные результаты позволяют с помощью модели «гидрофобного амфитеатра» предположить на структурном уровне вероятный механизм отсутствия тератогенного действия талидомида и его аналогов на плод некоторых видов экспериментальных животных. Рассмотренный феномен также демонстрирует критическую важность даже консервативных аминокислотных замен при определенных обстоятельствах. Для улучшения понимания механизма молекулярных клеев и UPS как в процессах эмбриогенеза, так и в процессах канцерогенеза имеет смысл выравнивание последовательностей разных неосубстратов на основе экспериментальных данных с целью уточнения особенностей процесса неангиогенеза, а также выявление мутаций в структурах проангиогенных факторов некоторых опухолей и рассмотрение их с точки зрения концепции молекулярных клеев для приближения к более фундаментальному объяснению патогенеза.

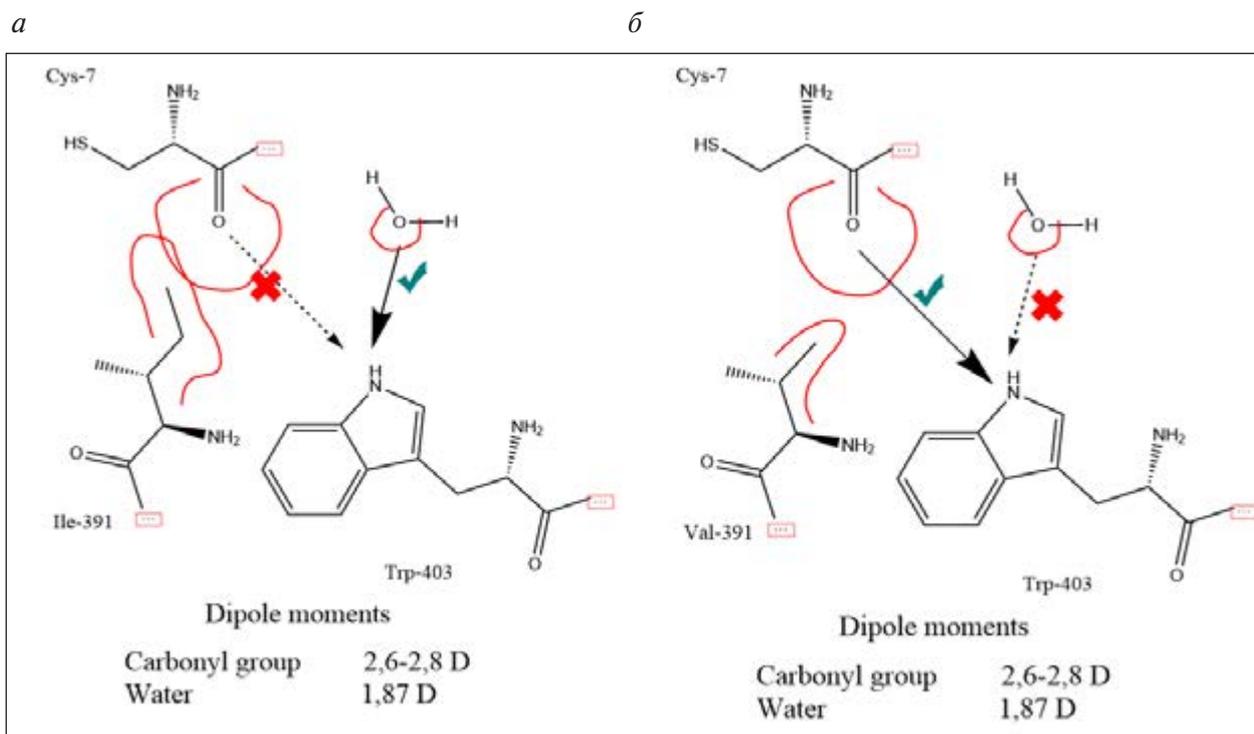


Рисунок 7 — Схема возможного взаимодействия Cys7 SALL4 и Trp403 CRBN мыши (а) и человека (б)

#### Список цитированных источников

1. Silverman, W. The Schizophrenic Career of a «Monster Drug» / W. Silverman // Pediatrics. — 2002. — Vol. 110, № 2. — P. 404–406.
2. McBride, W. Thalidomide and congenital abnormalities / W. McBride // Lancet. — 1961. — № 1. — P. 1358.
3. Thalidomide Monograph for Professionals [Electronic resource]. — Mode of access: <https://www.drugs.com/monograph/thalidomide/>. — Date of access: 12.04.2023.
4. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity / T. Parman [et al.] // Nat. Med. — 1999. — Vol. 5. — P. 582–585. DOI: 10.1038/8466. PMID: 10229238.
5. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity / T. Ito [et al.] // Science. — 2010. — Vol. 327, № 5971. — P. 1345–1350.
6. Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane Radial Ray syndrome/ K. A. Donovan [et al.]// Elife. — 2018. — Vol. 7 — P. e38430. DOI: 10.7554/eLife.38430.
7. Fratta, I. D. Teratogenic effects of thalidomide in rabbits, rats, hamsters, and mice/ I. D. Fratta, E. B. Sigg, K. Maiorana // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 1965. — Vol. 7. — P. 268–286. DOI: 10.1016/0041-008x(65)90095-5.

## Structural justification of the absence of teratogenic effect of thalidomide in some species of experimental animals

*Rineyskaya O. N., Bankovsky A. A.*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

In this work, sequences of the target protein thalidomide (CRBN) from a number of animals (including humans) demonstrating the presence or absence of the teratogenic effect of thalidomide were analyzed. A key amino acid substitution has been identified, which probably leads to the absence



of a toxic effect on the fetus of rodents, which are the main experimental species. Based on the property of thalidomide as a molecular glue, a model of the so-called “hydrophobic amphitheater” is proposed for an explanation of the phenomenon of loss of the teratogenicity.

**Keywords:** thalidomide, cereblon, molecular glue, teratogenicity.

*Поступила 08.06.2023*