

А.А. Баньковский

**МОДЕЛЬ ГИДРОФОБНОГО АМФИТЕАТРА КАК СТРУКТУРНОЕ
ОБОСНОВАНИЕ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТЕРАТОГЕННОГО
ДЕЙСТВИЯ ТАЛИДОМИДА**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. О.Н. Ринейская

Кафедра биоорганической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A.A. Bankovskiy

**MODEL OF HYDROPHOBIC AMPHITHEATER AS A STRUCTURAL
JUSTIFICATION FOR THE SPECIES-SPECIFIC TERATOGENIC EFFECT
OF THALIDOMIDE**

Tutor: PhD, associate professor O.N. Ryneiskaya

Bioorganic Chemistry Department

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Феномен видоспецифической тератогенности талидомида известен уже давно. Однако точного структурного обоснования этого явления пока нет. В этой работе предлагается модель гидрофобного амфитеатра, как возможное объяснение представленного феномена.

Ключевые слова: тератогенность, талидомид, цереблон, неосубстраты.

Resume. The phenomenon of species-specific teratogenicity of thalidomide has been known for a long time. However, there is no exact structural justification for this phenomenon yet. This work proposes a hydrophobic amphitheater model as a possible explanation for the presented phenomenon.

Keywords: teratogenicity, thalidomide, cereblon, neosubstrates.

Актуальность. В 1961 году стало известно, что именно прием талидомида беременными женщинами стал причиной рождения в западной Европе порядка 10000 детей с различными аномалиями развития. При этом тератогенные действия этого препарата на этапе экспериментов *in vivo* с крысами и мышами не были установлены. Вероятно, это явление послужило выходу на рынок талидомида как снотворного средства, в том числе и для беременных женщин. В мировом научном обществе заговорили про видоспецифическое тератогенное действие этого препарата.

Уже гораздо позже был установлен целевой белок талидомида – CRBN (cereblon). Цереблон (CRBN) – талидомид-связывающий белок, являющийся рецептором убиквитин-лигазного комплекса CRL4CRBN, который в свою очередь ответственен за протеасомную деградацию белков. Такие белки являются субстратами этого комплекса.

В свою очередь талидомид и его производные, называемыми модуляторами лигазы цереблону E3 (CELMoDs) обладают свойством изменять субстратную специфичность цереблону. Меняя конформацию поверхности этого белка, этот класс препаратов как бы «привлекает к себе» нетипичные субстраты, которые при обычных обстоятельствах с CRBN не связываются. Такие типичные субстраты называют неосубстратами.

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. 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 [1]. Это согласуется с наблюдениями еще 60-х годов прошлого века, которые указывали на отсутствие тератогенного действия талидомида у мышей и крыс, но не людей.

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: предложить структурное объяснение феномена видоспецифической тератогенности талидомида.

Задачи:

1. Выявить отличия в структуре целевого белка CRBN животных видов, для которых талидомид не тератогенен и животных видов, для которых талидомид тератогенен (включая *Homo sapiens*).

2. На основании полученных данных о структурных различиях цереблona мышцы и человека предложить модель, объясняющую феномен видоспецифического тератогенного действия талидомида.

Материалы и методы. Сиквенсы цереблona, целевого белка талидомида, разных животных и человека получены из библиотеки NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Для выравнивания аминокислотных последовательностей применялась программа BLAST. Трехмерные структуры цереблona человека и мышцы 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 мышцы [2]. Для графической 2D визуализации гипотезы «гидрофобного амфитеатра» использован редактор химической графики ChemDraw.

Результаты и их обсуждение. Основываясь на экспериментальных данных [3] было выбрано 8 видов животных, которые были разделены на две группы. Для животных (включая человека) группы 1 талидомид тератогенен, для животных группы 2 - нет (таблица 1).

Сравнивая сиквенсы цереблona представленных видов, была выявлена аминокислотная замена: у видов, на которые талидомид не оказывает тератогенного действия в положении 391 находится Ile, в то время как у остальных видов этой аминокислоте соответствует Val387 (рисунок 1).

Табл. 1. Группы животных (включая Homo sapiens), структура цереблona которых сравнивалась в настоящем исследовании

Группа 1 (талидомид тератогенен)	Группа 2 (талидомид не тератогенен)
1. Homo sapiens	1. Mus musculus
2. Chlorocebus sabaenus	2. Rattus norvegicus
3. Pongo pygmaeus	3. Felis catus
4. Oryctolagus cuniculus	4. Sus scrofa

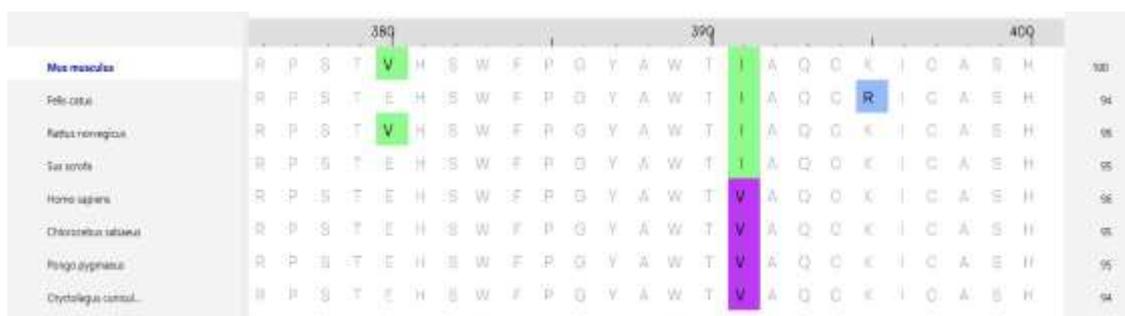


Рис. 1 – Аминокислотные замены в талидомид-связывающем домене цереблona

Молекулярный докинг талидомида и цереблona не показал значимых различий в характере связывания этого препарата. Это, вероятнее всего, говорит об иных причинах феномена видоспецифического действия талидомида.

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 пир-рольным атомом триптофана 403 и карбонильным кислородом цистеина 7 соответственно (рисунок 2).

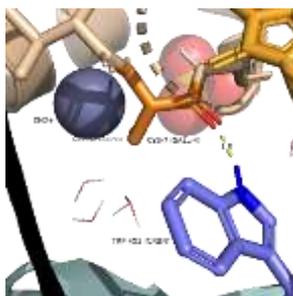


Рис. 2 – Водородная связь между Trp403 CRBN и Cys7 SALL4

В цереблоне человека Val387 своей боковой цепью не заслоняет атом азота Trp403. В случае же с цереблоном мыши, боковая цепь Ile391 создает на поверхности белка заметную гидрофобную шпильку

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, что, несмотря на то, что замена Val на Ile является консервативной, а боковая цепь изолейцина в мышинном 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 3) цереблона мыши.

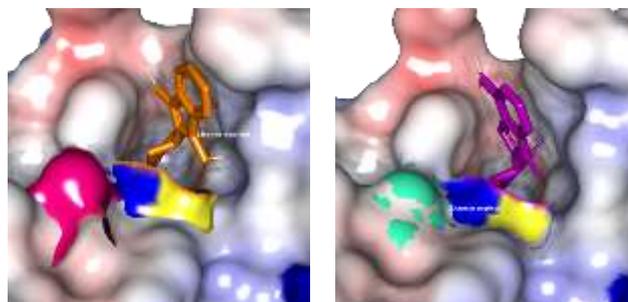


Рис. 3 – Сайт связывания талидомида и CRBN мыши (слева) и человека (справа)

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 3). Среди них розовым цветом выделена боковая цепь Ile391, которая располагается рядом с атомом азота триптофана, находясь несколько выше плоскости ядра индола (рисунок 6, слева). В молекуле цереблона человека боковая цепь Val387 находится приблизительно в одной плоскости с азотом Trp403 (рисунок 6, справа). 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» мышинного 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 церебллоном (рисунок 4, слева). В итоге SALL4 не подвергается протеасомному разрушению и тератогенные свойства талидомида у животных группы 2 не проявляются.

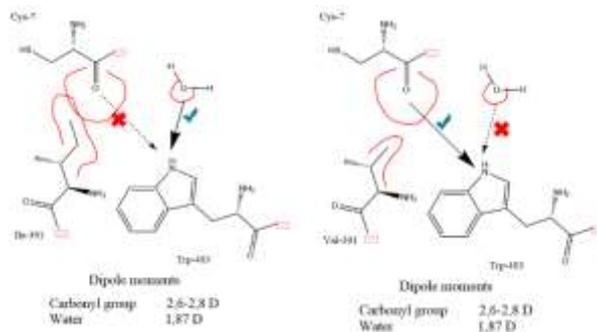


Рис. 4 – Схема возможного взаимодействия Cys7 SALL4 и Trp403 CRBN мыши (слева) и человека (справа)

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 взаимодействовать и молекула воды, и кислород Cys7 SALL4 (рисунок 4, справа). 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.

Выводы: 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 про-ангиогенных факторов некоторых опухолей и рассмотрение их с точки зрения концепции молекулярных клеев для приближения к более фундаментальному объяснению патогенеза.

Литература

1. Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane Radial Ray syndrome/ K. A. Donovan [et al.] // *Elife*. – 2018. – Vol. 7. – P.345–358.
2. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pymol.org/pym/> (дата обращения: 02.09.2023).
3. 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.