NGHIÊN CỨU SỰ TƯƠNG TÁC CỦA ROMIDEPSIN VỚI ENZYME HDAC6 VÀ HDAC8 SỬ DỤNG CÔNG CỤ AUTODOCK

Đến tòa soạn 17-12-2020

Trần Quang Đệ, Nguyễn Cường Quốc, Đặng Thị Thu Thảo, Huỳnh Thanh Ngân, Nguyễn Thị Huỳnh Trang, Nguyễn Văn Ky, Trần Thanh Mến, Nguyễn Trọng Tuân, Bùi Thị Bửu Huê
Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ
Nguyễn Duy Tuấn
Trường Đại học Nam Cần Thơ

SUMMARY

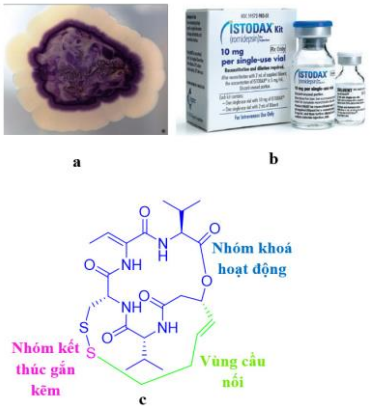
HDAC enzymes play important role in expression of many human diseases (including diseases can cause death), therefore it is necessary to profound study HDAC enzymes and their inhibitors. Nowadays, using in silico methods (method of using computer) in research and development medicines becomes common. So in this study, we apply AutoDock software to show interaction between romidepsin and HDAC6, HDAC8 enzymes. And the docking results based on theoretical calculations showed that romidepsin could not bind to Zn^{2+} ion, but it could bind to many major amino acids in the active region of HDAC.

Keywords: *Autodock, HDAC6, HDAC8, romidepsin.*
Title: *Interactive study of romidepsin with enzyme HDAC6 and HDAC8 by Autodock tool.*

1. GIỚI THIỆU

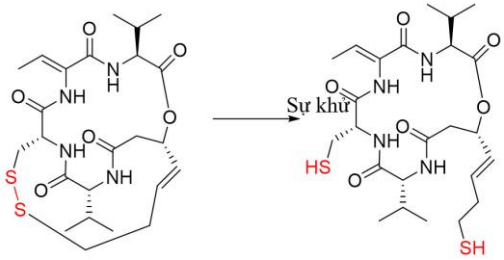
Histone deacetylase (HDAC) đóng vai trò quan trọng trong phiên mã gen và có nhiều chức năng trong các quá trình sinh học của sinh vật nhân thực liên quan đến nhiễm sắc thể. Hiện nay có 18 loại HDAC, chia thành 4 nhóm: nhóm I (gồm HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8); nhóm II (gồm HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10); nhóm III (gồm SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 và SIRT7) và nhóm IV (gồm HDAC 11) (Yoon and Eom, 2016). Nhóm HDAC cổ điển (nhóm I, II, IV) là những enzyme phụ thuộc Zn^{2+} chứa một túi xúc tác với ion Zn^{2+} ở đáy của nó mà có thể bị ức chế bởi các hợp chất liên kết được với Zn^{2+} như những acid hydroxamic (Ruijter *et al.*, 2003). Còn các enzyme thuộc nhóm III có một cơ chế hoạt động khác là phụ thuộc vào NAD^+ (Schemies *et al.*, 2010). Những enzyme HDAC bất thường là nguyên nhân của nhiều căn bệnh ở người như bệnh thần kinh, rối loạn chuyển hóa, bệnh viêm, bệnh tim và bệnh phổi (Seto and Yoshida, 2014), nổi bật nhất chính là biểu hiện của chúng trong hàng loạt các căn bệnh ung thư - một trong những bệnh có nguy cơ gây tử vong cao (Witt *et al.*, 2009). Trong số các enzyme của HDAC thì hai enzyme HDAC6, HDAC8 được tập trung nghiên cứu định hướng để trị bệnh (Falkenberg and Johnstone, 2014) (Mottamal *et al.*, 2015). Bằng công nghệ cDNA người ta phân tích được enzyme HDAC6 là gen điều hòa estrogen trong tế bào ung thư vú MCF-7 (Inoue *et al.*, 2002), thông qua cơ chế điều hòa estrogen của HDAC6 cho thấy sự ảnh hưởng nhất định của enzyme đến bệnh ung thư vú (Zhang *et al.*, 2004), HDAC6 còn được phát hiện là có liên quan đến bệnh ung thư đường mật hay còn gọi là ung thư ống mật (Gradilone *et al.*, 2013) và enzyme này cũng là mục tiêu để trị bệnh ung thư bàng quang vì khả năng làm di căn tế bào

ung thư bàng quang-đây cũng được xem là nguyên nhân chính gây nên sự tái phát lại của căn bệnh cũng như là gây nên tử vong cho những người mắc bệnh ung thư (Zuo *et al.*, 2012). HDAC6 là enzyme duy nhất trong HDAC có song song hai miền xúc tác là miền xúc tác 1 (CD1) và miền xúc tác 2 (CD2), tuy nhiên trong bài nghiên cứu ta chỉ tập trung vào CD2 bởi vì chỉ CD2 thể hiện tính đặc hiệu của chất nền rộng (Hai and Christianson, 2016). Giống như enzyme HDAC6 hay các enzyme HDAC khác, enzyme HDAC8 cũng biểu hiện trong nhiều căn bệnh ung thư khác nhau ở người như ung thư dạ dày, ung thư thực quản, ung thư đại tràng, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến giáp,…trừ ung thư tuyến tiền liệt thì HDAC8 ít biểu hiện hơn (Nakagawa *et al.*, 2007), ngoài ra sự biểu hiện cao hay thấp của enzym này sẽ ảnh hưởng đến mức độ bệnh nặng hay nhẹ của bệnh u nguyên tế bào thần kinh (Oehme *et al.*, 2009). HDAC8 còn được phát hiện là mục tiêu quan trọng để chống lại bệnh sán máng - một bệnh ký sinh trùng bị lãng quên do giun dẹp thuộc giống *Schistosoma* gây ra, là nguyên nhân gây ra hàng trăm nghìn ca tử vong hàng năm (Marek *et al.*, 2013). Romidepsin (FK228), một chất ức chế histone deacetylase mạnh được gọi là depsipeptide, là một polypeptide tự nhiên được phân lập từ *Chromobacterium violaceum* (Nakajima *et al.*, 1998) (Hình 1).



Hình 1. (a) Chromobacterium violaceum; (b) Romidepsin được bán trên thị trường với tên thương mại Istodax; (c) Cấu trúc của romidepsin

Romidepsin là chất ức chế HDAC được chấp thuận của FDA Hoa Kỳ để điều trị cả bệnh u tế bào lympho tế bào T ở da (CTCL) và u lympho tế bào T ngoại biên (PTCL). Tuy nhiên bản thân romidepsin chỉ mới là tiền chất, không có khả năng tương tác với túi hoạt động của HDAC mà nó phải chuyển thành dạng hoạt động nhờ hoạt động khử của tế bào trong cơ thể sống (Furumai *et al.*, 2002) (Hình 2).



Hình 2. Sự chuyển hoá thành dạng hoạt động thiol của romidepsin

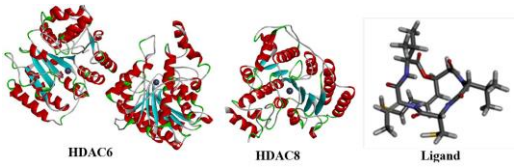
Mặc dù có nhiều bài viết về khả năng ức chế của romidepsin với HDAC nhưng chưa có nghiên cứu sâu nào của romidepsin về cơ chế ức chế ở hai enzyme HDAC6, HDAC8. Do đó phương pháp tính toán ảo có thể đóng vai trò quan trọng để biết cơ chế ức chế của romidepsin, từ đó có thêm thông tin để làm cơ sở cho nghiên cứu, phát triển thuốc ức chế HDAC, giúp chữa trị nhiều căn bệnh liên quan tới HDAC, đặc biệt nhất là các căn bệnh ung thư mà cho đến nay vẫn chưa có thuốc điều trị và đạt được nhu cầu hạn chế các tác dụng phụ khi sử dụng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

2.1. Chuẩn bị ligand và enzyme

Vẽ cấu trúc 2D của dạng hoạt động của romidepsin bằng phần mềm ChemDraw Professional 16.0, rồi chuyển đổi thành dạng 3D bằng phần mềm Chem3D 16.0, tiến hành tính toán năng lượng thấp nhất, động lực học phân tử. Sau đó, tối ưu công thức với phương pháp bán thực nghiệm PM6 bằng Gaussian. Phương pháp bán thực nghiệm PM6 vừa đem lại kết quả tốt nhất vừa có thể tiết kiệm thời gian thực hiện (Marković *et al.*, 2012), đồng thời góp phần nâng cao độ chính xác của việc docking bằng phần mềm AutoDock (Bikadi and Hazai, 2009). Cấu trúc tinh thể của HDAC6 (ID: 5EEI, độ phân giải: 1.32 Å) và cấu trúc tinh thể HDAC8 (ID: 1T67, độ phân

giải: 2.31 Å) được tải từ cơ sở dữ liệu protein data bank dưới dạng file .pdb. Sau đó các enzyme được xử lý loại bỏ nước, các ion kim loại không liên kết, ion tạo phức, ligand,… chỉ ngoại trừ Zn^{2+} bằng phần mềm Discovery Studio 2019 Client.



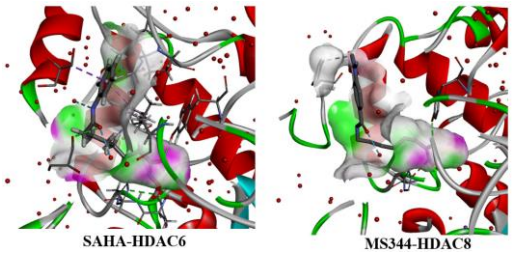
Hình 3. Cấu trúc 3D của enzyme HDAC6 (ID: 5EEI), HDAC8 (ID: 1T67), ion Zn^{2+} (quả cầu màu xám) và ligand romidepsin sau khi xử lý

2.2. Docking phân tử:

Docking phân tử giữa ligand và enzyme được thực hiện bằng phần mềm AutoDockTools ver 1.5.6 được tích hợp sẵn bộ phần mềm Autodock Vina và Autodock 4.2 (Trott and Olson, 2010). Kết quả chỉ ra sự tương tác của romidepsin với hai enzyme, biểu diễn tương tác được phân tích bằng phần mềm Discovery Studio Client 2019. Trước hết cần phải docking mù (blind docking) bằng Autodock Vina để xác định vị trí và và tư thế hoạt động tốt nhất của ligand đối với enzyme. Docking mù cho phép quét toàn bộ enzyme (protein) để tìm kiếm các điểm tương tác mới và chưa biết bằng cách thực hiện những mô phỏng docking riêng biệt xung quanh từng amino acid của enzyme (protein) (Pérez-Sánchez *et al.*, 2017). Autodock Vina sử dụng hộp giản đồ có kích thước ba chiều để bao trùm toàn bộ enzyme và khoảng cách giữa các điểm là 1,000 Å tính từ trung tâm của enzyme. Dựa vào kết quả đầu ra của Vina, tư thế ligand đầu có năng lượng thấp nhất được chọn làm re-docking ligand vì nó có ái lực ràng buộc hơn các ligand có tư thế khác và không có bất kỳ giá trị RMSD nào (Trott and Olson, 2010). Sau khi chọn được vị trí tương tác tốt, quá trình docking phân tử được tiến hành. Hộp giản đồ ba chiều 100×100×100 được cài đặt lại với khoảng cách giữa các điểm là 0.375 Å tính từ tâm của re-docking ligand đã chọn. Trong quá trình docking phân tử, thuật toán di duyền Lamarkian (LGA) được sử dụng để tìm kiếm các mảnh ghép. Các tham số được sử dụng bao gồm: i) số lần chạy GA (number of GA run): 100 lần; (ii) số cá thể trong nhóm (population size): 150; (iii) số đánh giá năng lượng cực đại (maximum number of energy evals): 250000. Các tham số còn lại được giữ nguyên giống tham số mặc định của chương trình.

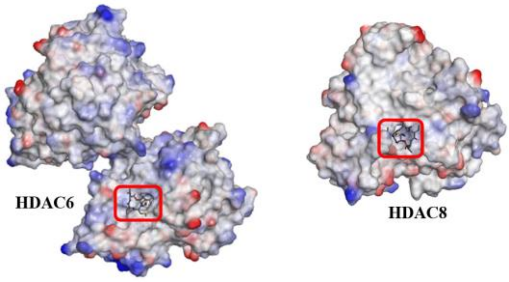
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

Kết quả docking phân tử được ưu tiên chọn sẽ dựa theo mức năng lượng thấp nhất kết hợp với giá trị độ lệch căn quân phương (RMSD) nhỏ hơn 2 Å. RMSD như một thước đo độ chính xác của các thuật toán gắn kết giữa protein và ligand (Kirchmair *et al.*, 2008), các kết quả docking có giá trị RMSD không lớn hơn 2 Å được chứng minh là dock tốt và thành công (Gohlke *et al.*, 2000). Do đó kết quả docking giữa romidepsin và hai enzyme HDAC6 và HDAC8 có mức năng lượng lần lượt là: -6.29 kcal/mol và -7.12 kcal/mol; giá trị RMSD lần lượt là: 0.89 Å và 1.04 Å. So sánh mức độ tương tác của romidepsin với kết quả tương tác của MS-344 trên HDAC8 và SAHA với HDAC6 đã được công bố trên Protein data bank (Hình 4).

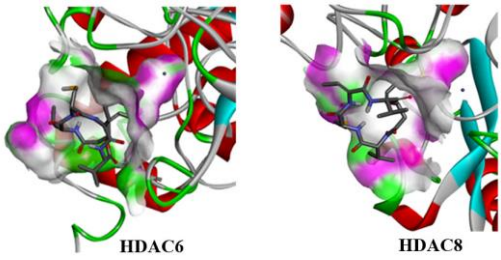


Hình 4. Tương tác của SAHA và MS344 lần lượt enzyme HDAC6 và HDAC8

Nhận thấy rằng, romidepsin tương tác yếu với cả hai enzyme tại trung tâm hoạt động, tuy nhiên, nó không chui sâu vào trong túi hoạt động của HDAC để tạo liên kết với coenzyme là ion Zn^{2+} (đối với các HDAC nhóm I, II, IV) (Hình 6) do cấu trúc cổng kênh của nhóm khoá hoạt động (phần nằm ở miệng túi).

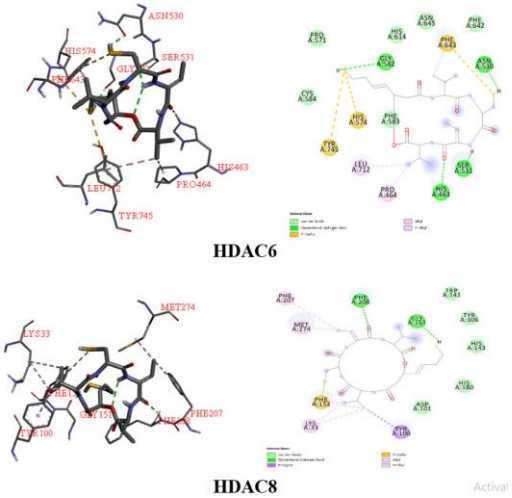


Hình 5. Bề mặt tương tác của romidepsin với vị trí hoạt động trên HDAC6 và HDAC8



Hình 6. Túi liên kết của romidepsin với enzyme HDAC, ion Zn^{2+} nằm riêng lẻ phía ngoài (cầu màu xám)

Nhưng romidepsin tạo được liên kết với nhiều amino acid quan trọng trong túi hoạt động của cả hai enzyme (Hình 7). Cụ thể trong enzyme HDAC6, romidepsin tạo nhiều liên kết van der Waals với Asn645, Cys584, His614, Phe583, Phe642, Pro571. Nhiều liên kết mạnh với các amino acid như tạo các liên kết hydro với Asn530, Gly582, His463; liên kết pi-alkyl với Leu712, Pro464 và liên kết với His574, Phe643, Tyr745 bằng liên kết pi-sulfur. Các amino acid trên đóng vai trò nhất định trong vùng hoạt động của miền xúc tác 2 ở HDAC6, đặc biệt là Tyr745, đây là gốc Tyr nằm kế cận ion Zn^{2+} và được cho là có vai trò ổn định chất trung gian phản ứng (Miyake *et al.*, 2016). Còn trong tương tác với enzyme HDAC8, romidepsin tạo liên kết pi-alkyl với Met274 và Phe207. Trong đó, Phe207 được nghiên cứu là có vai trò đặc biệt quan trọng trong việc giảm hoạt động của đột biến CYP2E1 (Wang *et al.*, 2015). Bên cạnh đó, romidepsin còn tương tác mạnh với các amino acid thân dầu như liên kết với Gly151, Phe208 bằng liên kết hydro; liên kết pi-sigma với Tyr100; liên kết alkyl với Lys33 và tạo liên kết với Phe152 bằng liên kết alkyl và liên kết pi-sulfur. Trong số các amino acid thân dầu thì Phe152 và Phe208 có tầm quan trọng trong việc ổn định phần liên kết của chất ức chế (Estiu *et al.*, 2010).



Hình 7. Các tương tác giữa romidepsin và HDAC6 và HDAC8 được biểu diễn dưới dạng 3D (trái) và 2D (phải)

4. KẾT LUẬN:

Kết quả docking của romidepsin với hai enzyme HDAC6 và HDAC8 không liên kết được với ion Zn^{2+} do romidepsin mang nhóm khoá hoạt động quá cồng kềnh để chui sâu vào trong túi hoạt động. Tuy nhiên romidepsin cũng có tiềm năng ức chế enzyme khi nó tương tác với các amino acid chính, các amino acid này có vai trò nhất định trong khu vực hoạt động của hai enzyme như trong các bài nghiên cứu đã được công bố trước bằng nhiều liên kết như van der Waals, liên kết hydro, pi-sulfur, alkyl, pi-alkyl, pi-sigma. Ngoài ra, nghiên cứu này là cơ sở cho các nghiên cứu khác nhằm phát triển các hoạt chất có khả năng ức chế chọn lọc HDAC6 và HDAC8 không gắn kẽm. Tiền đề cho các phương pháp sàng lọc ảo *in silico* kết hợp với các phương pháp thử hoạt tính sinh học *in vitro*, *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự tài trợ quý báu của Bộ Giáo Dục và Đào Tạo dành cho nghiên cứu này (Mã số: B2019-TCT-37).

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bikadi, Z. and Hazai, E., 2009. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *Journal of cheminformatics*. 1(*1*): 15.

2. Estiu, G., West, N., Mazitschek, R., *et al.*, 2010. On the inhibition of histone deacetylase 8. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 18(*11*): 4103-4110.

3. Falkenberg, K. J. and Johnstone, R. W., 2014. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune

disorders. *Nature reviews Drug discovery*. 13(*9*): 673-691.
4. Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., *et al.*, 2002. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer research*. 62(*17*): 4916-4921.
5. Gohlke, H., Hendlich, M. and Klebe, G., 2000. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *Journal of molecular biology*. 295(*2*): 337-356.
6. Gradilone, S. A., Radtke, B. N., Bogert, P. S., *et al.*, 2013. HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth. *Cancer research*. 73(*7*): 2259-2270.
7. Hai, Y. and Christianson, D. W., 2016. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nature chemical biology*. 12(*9*): 741-747.
8. Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., *et al.*, 2002. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen responsive genes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 29(*2*): 175-192.
9. Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Wolber, G. and Langer, T., 2008. Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—What can we learn from earlier mistakes? *Journal of computer-aided molecular design*. 22(*3-4*): 213-228.
10. Marek, M., Kannan, S., Hauser, A.-T., *et al.*, 2013. Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke Schistosoma mansoni. *PLoS Pathog*. 9(*9*): e1003645.
11. Marković, Z., Milenković, D., Đorović, J., *et al.*, 2012. PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin. *Food chemistry*. 134(*4*): 1754-1760.
12. Miyake, Y., Keusch, J. J., Wang, L., *et al.*, 2016. Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nature chemical biology*. 12(*9*): 748-754.
13. Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L. and Wang, G., 2015. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules*. 20(*3*): 3898-3941.
14. Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., *et al.*, 2007. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncology reports*. 18(*4*): 769-774.
15. Nakajima, H., Kim, Y. B., Terano, H., Yoshida, M. and Horinouchi, S., 1998. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Experimental cell research*. 241(*1*): 126-133.
16. Oehme, I., Deubzer, H. E., Wegener, D., *et al.*, 2009. Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*. 15(*1*): 91-99.
17. Pérez-Sánchez, H., Cerón-Carrasco, J. P. and Cecilia, J. M., 2017. Implementation of an efficient Blind Docking technique on HPC architectures for the discovery of allosteric inhibitors. *In*: *2017 46th International Conference on Parallel Processing Workshops (ICPPW)*. IEEE, 33-38.
18. Ruijter, A. J. d., GENNIP, A. H. v., Caron, H. N., Kemp, S. and KUILENBURG, A. B. v., 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*. 370(*3*): 737-749.
19. Schemies, J., Uciechowska, U., Sippl, W. and Jung, M., 2010. NAD+-dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets. *Medicinal research reviews*. 30(*6*): 861-889.
20. Seto, E. and Yoshida, M., 2014. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6(*4*): a018713.
21. Trott, O. and Olson, A. J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*. 31(*2*): 455-461.
22. Wang, Y., Zheng, Q., Zhang, J., *et al.*, 2015. How mutations affecting the ligand-receptor interactions: a combined MD and QM/MM calculation on CYP2E1 and its two mutants. *Chemical Research in Chinese Universities*. 31(*6*): 1029-1038.
23. Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T. and Oehme, I., 2009. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer letters*. 277(*1*): 8-21.
24. Yoon, S. and Eom, G. H., 2016. HDAC and HDAC inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases. *Chonnam medical journal*. 52(*1*): 1-11.
25. Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., *et al.*, 2004. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 10(*20*): 6962-6968.
26. Zuo, Q., Wu, W., Li, X., Zhao, L. and Chen, W., 2012. HDAC6 and SIRT2 promote bladder cancer cell migration and invasion by targeting cortactin. *Oncology reports*. 27(*3*): 819-824.