NGHIÊN CỨU TƯƠNG TÁC CỦA PANOBINOSTAT VỚI ENZYME HDAC2 VÀ HDAC8 BẰNG AUTODOCK

Đến tòa soạn 7-7-2020

Nguyễn Hữu Toàn, Nguyễn Cường Quốc, Huỳnh Như Thảo, Phạm Thị Kim Huê, Nguyễn Trọng Tuân, Bùi Thị Bửu Huê, Trần Quang Đệ
Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

SUMMARY

In this study, docking panobinostat into the active zone of the HDAC2 (pdb: 4LXZ) and HDAC8 (pdb: 1W22) using AutoDock Tools. The calculations were conducted on AutoDock Vina and AutoDock4 and used automatic docking method of Lamarckian genetic algorithm. According to the pharmacophore model, panobinostat structure was established typically consisting of a zinc binding group (ZBG), a linker and a capping group, which interact with the active sites of HDAC2 (pdb: 4LXZ) and HDAC8 (pdb: 1W22). Panobinostat interacts with HDAC2 more strongly than HDAC8 which may contribute to slightly better binding affinity of phenyl rings parallel displaced pi-pi stacking interaction at linker. The interaction between panobinostat and the active sites of two enzymes closely resembles the vorinostat HDAC2 (pdb: 4LXZ) and MS27-275-HDAC8 complex (pdb: 1W22) published in the Protein Data Bank database. This molecular docking model, can be used to compare the inhibitory potential of panobinostat with HDACs, assist future design of more potent and selective inhibitors for HDAC2 and HDAC8.

Keywords: *AutoDock, docking, enzyme HDAC, anti-cancer, panobinostat*
Title: *Interactive study of panobinostat with enzymes HDAC2 (pdb: 4LXZ) and HDAC8 (pdb: 1W22) using AutoDock*

1. GIỚI THIỆU

Histone deacetylase (HDAC) là một họ gồm 18 loại isozyme khác nhau liên quan đến phản ứng căng thẳng, sửa chữa DNA và quy định biểu hiện gen (Dokmanovic *et al.,* 2007). Hiện nay, HDAC đang được theo đuổi làm mục tiêu cho một số ung thư biểu mô. HDAC2 và HDAC8 (hai isozyme thuộc loại I) có biểu hiện ở các loại ung thư khác nhau và do đó cả hai là mục tiêu quan trọng trong nhiều mô hình ung thư. HDAC2 biểu hiện quá mức dẫn đến ung thư dạ dày, tuyến tiền liệt, đại trực tràng và ung thư thận (Weichert *et al.,* 2008). HDAC8 hiện diện cao gây ra u nguyên bào thần kinh (neuroblastoma hay NB) là dạng phổ biến nhất trong khối u rắn ngoại bào (Vannini *et al.,* 2004). Ức chế HDAC8 đã được chứng minh là làm giảm sự tăng trưởng của NB (Rettig *et al.,* 2015). Vì vậy, lựa chọn điều trị mới trong đó có việc khám phá thuốc ức chế HDAC là rất cần thiết đối với bệnh ung thư.

Các chất ức chế HDAC (HDACi) hạn chế sự phát triển của tế bào ung thư, dẫn đến sự biệt hóa và chết rụng (apoptosis) trong các tế bào khối u (Kapustin *et al.,* 2003, Kilgore *et al.,* 2010). Hầu hết HDACi được thiết kết dựa vào mô hình dược điển đã được chấp nhận rộng rãi gồm một nhóm nhận diện bề mặt (capping group) có thể tương tác với vành của hốc xúc tác trong enzyme, nhóm đối diện liên kết với kẽm (ZBG) có thể tạo phức với ion Zn^{2+} ở đáy của khoang xúc tác và một cầu nối (linker) với

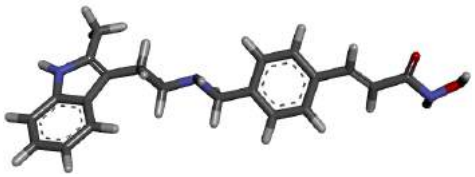
hai phần hình thành các tương tác kị nước (Giannini *et al.,* 2012). Những nghiên cứu mô hình phân tử HDAC giúp phát triển các cấu trúc mới và các phân tử thuốc mạnh được sử dụng cho các liệu pháp thuốc ngăn cản sự phát triển của các khối u (Melagraki *et al.,* 2009). Để đạt được hiệu lực và tính chọn lọc của HDACi, các nghiên cứu đã thay đổi đặc điểm cấu trúc phân tử liên quan đến mô hình dược điển. Cùng với hỗ trợ đắc lực của máy tính, các tính toán được thiết lập khi một phần của phân tử được thay thế hoặc một nhóm được thêm vào để đánh giá sự phân cực đặc thù hoặc tương tác không gian làm tăng ái lực liên kết (Langdon *et al.,* 2010).

Một số HDACi như vorinostat (SAHA), belinostat (PXD101) và panobinostat (LBH589) đã được mô hình hóa trên mẫu dược điển và được phê duyệt để điều trị ung thư hạch và u tủy. Những phương pháp tính toán cũng được sử dụng để dự đoán và giải thích các dạng liên kết và ái lực của các hợp chất này. Trong đó, panobinostat là một chất ức chế mạnh enzyme HDAC có cấu trúc thuộc loại hydroxamic acid, được công nhận bởi FDA (Food and Drug Administration) cho điều trị các bệnh đa u tủy (Moore, 2016). Cấu trúc của hợp chất này đang là mục tiêu để khám phá khả năng ức chế các loại HDAC và ứng dụng mô phỏng làm nền tảng cho nghiên cứu các hợp chất khác. Năm 2019, Stoddard và cộng sự đã nghiên cứu tương tác của panobinostat trên enzyme HDAC2 và HDAC8 bằng phần mềm Surflex-Dock Geom (SFXC) cho thấy nhiều kết quả khả quan đáng quan tâm về hoạt tính sinh học của panobinostat trên cả hai enzyme (Stoddard *et al.,* 2019). Kế thừa thành quả nghiên cứu trên, nhằm góp phần làm phong phú thêm nguồn cơ sở dữ liệu về docking liên quan đến HDAC, vì vậy nghiên cứu này cung cấp thêm một hướng mới về docking phân tử, với mục đích đánh giá các tương tác, vùng hoạt động, khả năng ức chế góp phần làm tiền đề cho các nghiên cứu phát triển các chất ức chế HDAC, một trong các nguyên nhân quan trọng liên quan đến ngăn chặn các căn bệnh ung thư hiện nay.

2. PHƯƠNG PHÁP DOCKING

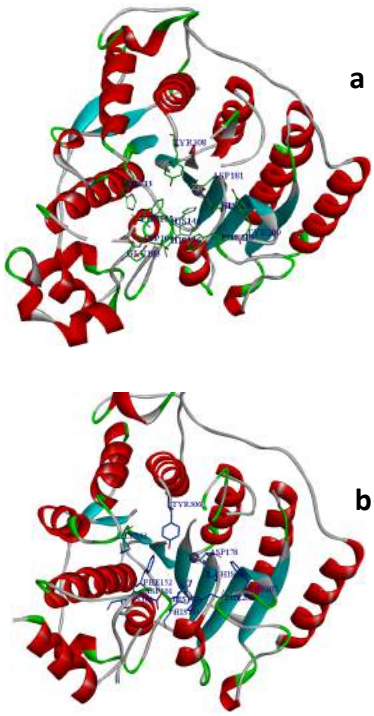
2.1. Cấu trúc ligand và vị trí hoạt động của protein mục tiêu

Cấu trúc hình học của panobinostat (Hình 1) được tối ưu hóa bằng phương pháp bán thực nghiệm (semi-empirical) PM6 bằng Gaussian 09W. PM6 được xem là phương pháp tối ưu cấu trúc tốt để thực hiện quá trình docking phân tử (Araújo *et al.,* 2015).



Hình 1. Cấu trúc tối ưu của panobinostat

Cấu trúc tinh thể X-ray của HDAC2 (pdb: 4LXZ) và HDAC8 (pdb: 1W22) ở người được sử dụng làm thụ thể (receptor) của panobinostat lấy từ Protein Data Bank *(https://www.rcsb.org/structure/4LXZ và 1W22)* có độ phân giải lần lượt là 1.85Å và 2.50Å (Vannini *et al.,* 2004; Lauffer *et al.,* 2013) **(Hình 2)**.



Hình 2. (a) Cấu trúc và vị trí hoạt động của HDAC2 (pdb: 4LXZ); (b) Cấu trúc và vị trí hoạt động của HDAC8 (pdb: 1W22)

2.2. Quy trình docking phân tử

Docking phân tử giữa ligand và enzyme được thực hiện bằng bộ công cụ AutoDockTools (ADT) 1.5.6 có tích hợp sẵn bộ phần mềm AutoDock Vina và AutoDock 4.2.6 (Morris *et al.,* 2008; Trott and Olson, 2010). Dự đoán các hốc liên kết của ligand lên enzyme mục tiêu bằng AutoDock Vina, docking trên toàn bộ enzyme và xác định vị trí liên kết tối ưu. Re-docking ligand được chọn có năng lượng thấp nhất từ quá trình docking điểm mù bằng AutoDock. Các tham số hộp lưới được cài đặt lại chứa tất cả các phần dư xung quanh hốc liên kết **(Bảng 1)**. Sử dụng phương pháp thuật toán di truyền Lamarckian để phát hiện không gian hình thành tốt nhất với 20 lần chạy docking cho mỗi ligand. Số tối đa đánh giá sự hình thành là 27000 và 2500000 được cài mặc định trên phần mềm.

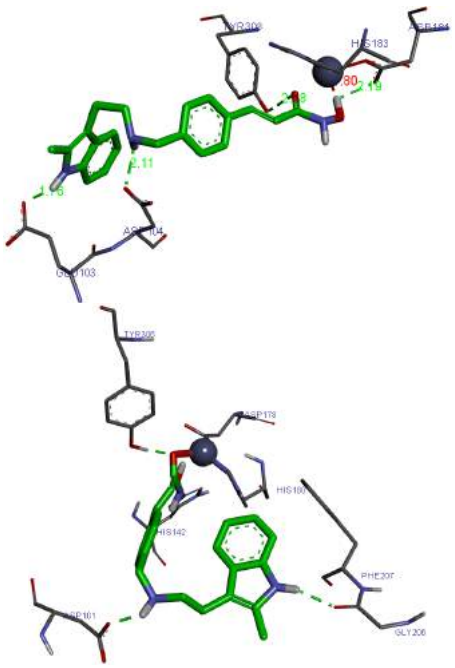
Bảng 1. Tham số hộp lưới bao quanh vùng tương tác giữa ligand và HDAC trên AutoDock 4.2.6 khi Re-docking

Trung tâm	HDAC2 (pdb: 4LXZ)			HDAC8 (pdb: 1W22)		
Tọa độ	x	y	z	x	y	z
Kích thước	126	126	126	126	126	126
Spacing = 0.15Å						

Phân tích kết quả docking giữa panobinostat và HDAC qua liên kết hydrogen, tương tác vùng kị nước, tương tác với ion Zn^{2+} với hướng hoạt động HDAC và các tương tác khác bằng mô hình 2D, 3D bằng phần mềm AutoDock và Discovery Studio Visualizer.

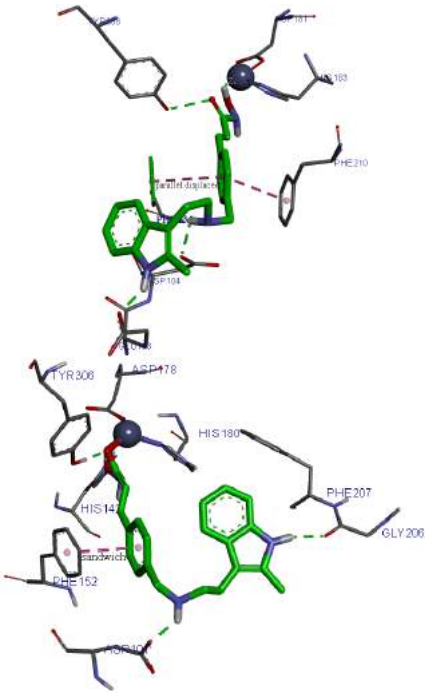
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Panobinostat tương tác với HDAC2 (pdb: 4LXZ) và HDAC8 (pdb: 1W22) có sự tương đồng về vị trí gắn kết, nhóm hydroxamate hình thành liên kết hydrogen với Tyr308 (HDAC2) và Tyr306 (HDAC8) đồng thời tương tác tạo phức với ion Zn^{2+} ở đáy túi liên kết. Vòng indole trong cả hai thụ thể đều nằm phía ngoài của rãnh tròn, Glu103 trong HDAC2 và backbone của Gly206 trong HDAC8 tạo liên kết hydrogen với nửa vòng indole. Một liên kết hydrogen khác xảy ra giữa các liên kết amine với Asp104 (HDAC2) và Asp101 (HDAC8). Sự hình thành mạng lưới liên kết hydrogen có thể là yếu tố quan trọng giúp ổn định trạng thái gắn kết giữa panobinostat với cả hai HDAC **(Hình 3)**. Kết quả docking khá phù hợp với mô hình tương tác của Stoddard và cộng sự đã công bố trước đó (Stoddard *et al.,* 2019).



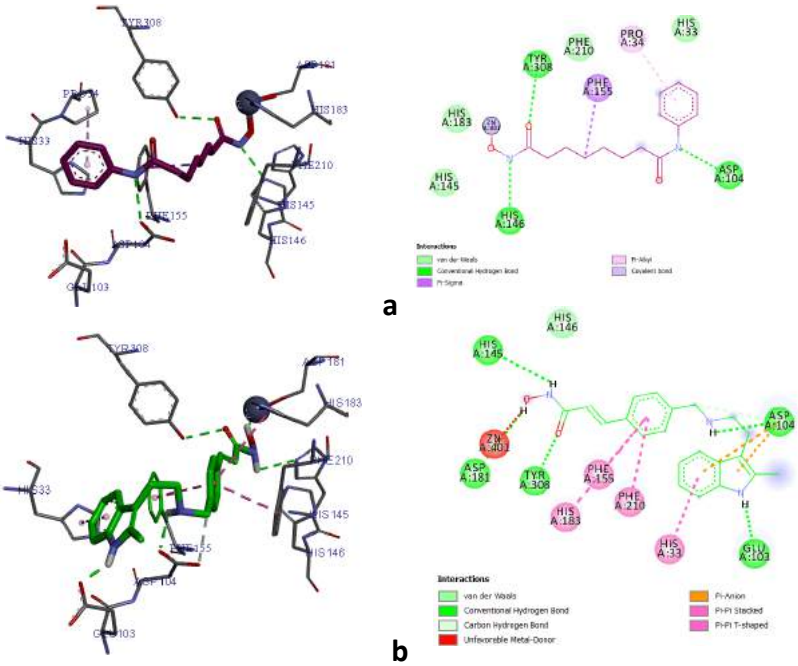
Hình 3. Sự hình thành liên kết hydrogen (đường đứt nét màu xanh lá) giữa panobinostat với HDAC2 (pdb: 4LXZ, trái) và HDAC8 (pdb: 1W22, phải)

Vị trí trung tâm trong vùng hoạt động của HDAC2 hình thành tương tác pi-pi giữa Phe155 và Phe210 với vòng phenyl của panobinostat, tương tác pi-pi cũng được nhìn thấy với Phe152 trên HDAC8. Sự hình thành tương tác pi-pi ở vùng kị nước trên hai enzyme có sự khác nhau, vòng Phe155 (HDAC2) tạo cấu hình dịch chuyển song song (parallel displaced) thuận lợi hơn cấu hình sandwich Phe152 (HDAC8) (Sinnokrot and Sherrill, 2006), điều này dẫn đến đóng góp một phần ái lực liên kết giúp ổn định phức hợp giữa thuốc lên HDAC2 tốt hơn so với HDAC8. Như vậy, có thể dự đoán khả năng ức chế giữa panobinostat trên HDAC2 tốt hơn HDAC8 (Hình 4).

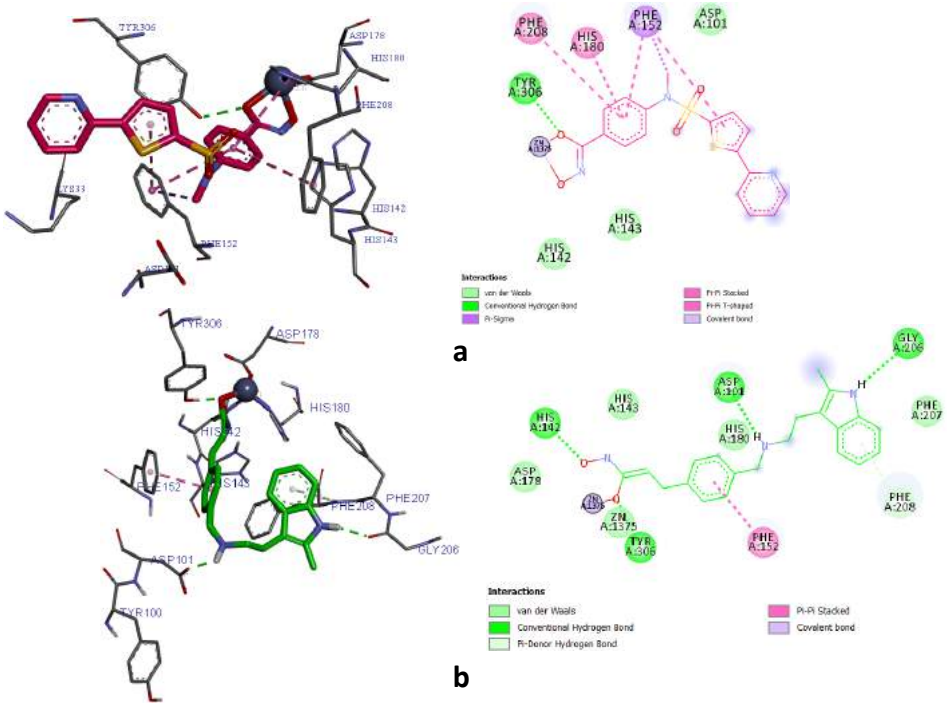


Hình 4. Tương tác pi-pi ở vùng kị nước cho thấy cấu hình vòng phenyl dịch chuyển song song trên HDAC2 (pdb: 4LXZ, trái) thuận lợi hơn sandwich trên HDAC8 (pdb: 1W22, phải)

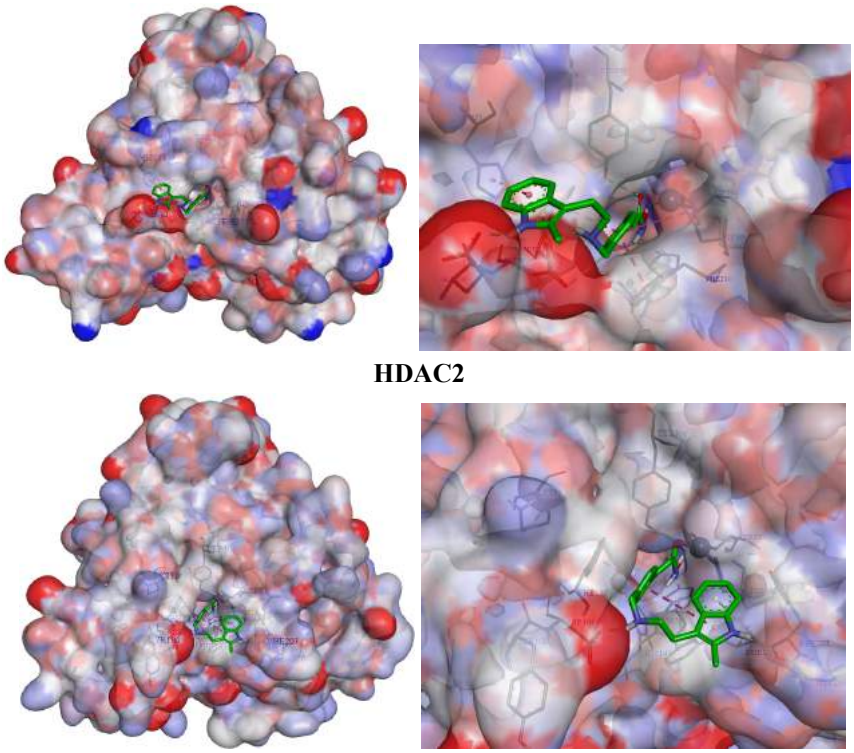
So sánh với mô hình cấu trúc tinh thể phức hợp panopinostat-HDAC2 (pdb: 4LXZ) docking bằng AutoDock với mô hình đã công bố vorinostat-HDAC2 (pdb: 4LXZ) của Lauffer và cộng sự (Lauffer *et al.,* 2013), thấy được vị trí tương tác, túi liên kết, tạo phức với Zn^{2+} và hình dạng giữa hai ligand tương tự nhau **(Hình 5)**. Mô hình docking cũng cho thấy panopinostat đã hình thành nhiều tương tác với tâm hoạt động trên HDAC2 so với vorinostat, chứng tỏ panopinostat có khả năng ức chế enzyme này tốt hơn. Tương tự mô hình docking panopinostat-HDAC8 (pdb: 1W22) cũng tạo tương tác gần giống với MS27-275-HDAC8 (pdb: 1W22) trong nghiên cứu Vannini và cộng sự (Vannini *et al.,* 2004) **(Hình 6)**. Kết quả phân tích bề mặt tương tác, phân tử panopinostat chứa đuôi hydroxamate, một linker và một nửa phần bao phủ nằm trên vành ở rãnh hoạt động của enzyme theo mô hình dược điển (Su *et al.,* 2009) đã tương tác đúng vị trí hoạt động với HDAC2 (pdb: 4LXZ) và HDAC8 (pdb: 1W22) **(Hình 7)**.



Hình 5. (a) Mô hình tương tác giữa vorinostat-HDAC2 (pdb: 4LXZ) (Nguồn: https://www.rcsb.org/structure/4LXZ); (b) Mô hình tương tác giữa panopinostat-HDAC2 (pdb: 4LXZ) docking bằng AutoDock



Hình 6. (a) Mô hình tương tác giữa MS27-275-HDAC8 (pdb: 1W22) (Nguồn: https://www.rcsb.org/structure/1W22); (b) Mô hình tương tác giữa panopinostat-HDAC8 (pdb: 1W22) docking bằng AutoDock



Hình 7. Bề mặt tương tác giữa panobinostat với HDAC2 (pdb: 4LXZ) và HDAC8 (pdb: 1W22) cho thấy cấu trúc thuốc đã tương tác với các vị trí hoạt động trên enzyme

Năng lượng liên kết (điểm số docking) hình thành giữa panobinostat với HDAC2 và HDAC8 lần lượt là 10.03 kcal/mol, 9.88 kcal/mol mức chênh lệch này nhỏ. Thông thường các hợp chất được xem là ức chế chọn lọc nếu khác nhau 2-3 độ lớn về sự tương thích ức chế với các thụ thể (Yurek-George *et al.,* 2007; Jia *et al.,* 2012). Kết quả điểm số docking bằng AutoDock của panobinostat lên hai enzyme HDAC độ lệch 0.52 kcal/mol gần nhau cho thấy hợp chất này thuộc dạng ức chế không chọn lọc, phù hợp với nghiên cứu thực nghiệm của Atadija về khả năng ức chế các HDAC (Atadja, 2009). Tuy panobinostat là chất ức chế HDAC không chọn lọc, có thể nhắm mục tiêu là các loại HDAC khác nhau dẫn đến giảm hiệu lực nhưng trong nghiên cứu của Singh và cộng sự năm 2016 cho thấy khi điều trị ung thư tuyến tụy các chất ức chế không chọn lọc có thể mạnh hơn các chất ức chế chọn lọc (Singh *et al.,* 2016). Mô hình docking phân tử panobinostat với HDAC2 và HDAC8 đã khám phá khả năng tương tác ở vùng hoạt động và tính chọn lọc lên enzyme. Qua đó, nghiên cứu tương tác của panobinostat với HDAC2 và HDAC8 bằng AutoDock là cơ sở tiền đề, cho thấy sự hứa hẹn trong việc khám phá tác động chức chế, sàng lọc và thiết kế các chất ức chế HDAC.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã docking thành công panobinostat vào vùng hoạt động của HDAC2 (pdb: 4LXZ) và HDAC8 (pdb: 1W22) bằng bộ công cụ AutoDock. Mô hình phân tử cho thấy cấu trúc thuốc đã tương tác vào các vị trí ức chế quan trọng trên hai enzyme HDAC. Kết quả docking có sự tương đồng về sự hình thành liên kết hydrogen, pi-pi stacked, tạo phức với ion Zn^{2+} và phù hợp với các công bố trước đây. Qua đó, mô hình docking phân tử sẽ được ứng dụng rộng rãi hơn nhằm khảo sát khả năng ức chế của thuốc lên các HDAC và làm tiền đề cho phương pháp sàng lọc ảo *in silico* dựa trên sự chọn lọc ức chế của cấu trúc thuốc lên enzyme và kết hợp các phương pháp thử hoạt tính sinh học *in vitro*, *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hoàn thành với sự tài trợ của đề tài B2019-TCT-37, Bộ Giáo Dục và Đào Tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dokmanovic, M., Clarke, C. and Marks, P.A., 2007. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. Molecular Cancer Research, 5 (10): 981-989.

2. Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V.*, et al.* 2008. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. British Journal of Cancer, 98 (3): 604-610.

3. Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G.*, et al.* 2004. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101 (42): 15064-15069.

4. Rettig, I., Koeneke, E., Trippel, F.*, et al.* 2015. Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation. Cell Death & Disease, 6 (2): 1657-1671.

5. Kapustin, G.V., Fejér, G., Gronlund, J.L., McCafferty, D.G., Seto, E. and Etzkorn, F.A., 2003. Phosphorus-based SAHA analogues as histone deacetylase inhibitors. Organic Letters, 5 (17): 3053-3056.

6. Kilgore, M., Miller, C.A., Fass, D.M., Hennig, K.M., Haggarty, S.J., Sweatt, J.D. and Rumbaugh, G., 2010. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.
Neuropsychopharmacology, 35 (4): 870-880.

7. Giannini, G., Cabri, W., Fattorusso, C. and Rodriquez, M., 2012. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. Future Medicinal Chemistry, 4 (11): 1439-1460.

8. Melagraki, G., Afantitis, A., Sarimveis, H., Koutentis, P.A., Kollias, G. and Igglessi-Markopoulou, O., 2009. Predictive QSAR workflow for the in silico identification and screening of novel HDAC inhibitors. Molecular Diversity, 13 (3): 301-311.

9. Langdon, S.R., Ertl, P. and Brown, N., 2010. Bioisosteric replacement and scaffold hopping in lead generation and optimization. Molecular Informatics, 29 (5): 366-385.
10. Moore, D., 2016. Panobinostat (Farydak): a novel option for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. Pharmacy and Therapeutics, 41 (5): 296.
11. Stoddard, S.V., May, X.A., Rivas, F., *et al.* 2019. Design of Potent Panobinostat Histone Deacetylase Inhibitor Derivatives: Molecular Considerations for Enhanced Isozyme Selectivity between HDAC2 and HDAC8. Molecular Informatics, 38 (3): 1800080.
12. Araújo, P., da Silva, L.P. and Esteves da Silva, J., 2015. Theoretical Analysis of the Binding of Potential Inhibitors to Protein Kinases MK2 and MK3. Medicinal Chemistry, 11(6) 573-579.
13. Lauffer, B.E., Mintzer, R., Fong., *et al.* 2013. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability. Journal of Biological Chemistry, 288 (37): 26926-26943.
14. Morris, G.M., Huey, R. and Olson, A.J., 2008. Using autodock for ligand-receptor docking. Current Protocols in Bioinformatics, 24 (1): 1-40.
15. 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.
16. Sinnokrot, M.O. and Sherrill, C.D., 2006. High-accuracy quantum mechanical studies of π−π interactions in benzene dimers. The Journal of Physical Chemistry A, 110 (37): 10656-10668.
17. Su, H., Yu, L., Nebbioso, A., Carafa, V., Chen, Y., Altucci, L. and You, Q., 2009. Novel N-hydroxybenzamide-based HDAC inhibitors with branched CAP group. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19 (22): 6284-6288.
18. Jia, H., Pallos, J., Jacques, V., *et al.* 2012. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors targeting HDAC3 and HDAC1 ameliorate polyglutamine-elicited phenotypes in model systems of Huntington's disease. Neurobiology of Disease, 46 (2): 351-361.
19. Yurek-George, A., Cecil, A.R.L., Mo, A.H.K., *et al.* 2007. The first biologically active synthetic analogues of FK228, the depsipeptide histone deacetylase inhibitor. Journal of Medicinal Chemistry, 50 (23): 5720-5726.
20. Atadja, P., 2009. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. Cancer Letters, 280 (2): 233-241.
21. Singh, A., Patel, V.K., Jain, D.K., Patel, P. and Rajak, H., 2016. Panobinostat as pan-deacetylase inhibitor for the treatment of pancreatic cancer: recent progress and future prospects. Oncology and Therapy, 4 (1): 73-89.