

УДК 577.1:547.96

Транскрипционный фактор DLX5 как новая мишень для перспективных противоопухолевых препаратов

Р. А. Тимахов^{1,2,3*}, П. О. Федичев¹, А. А. Винник¹, J. R. Testa³, О. О. Фаворова²¹Квантум Фармасьютикалз, 125171, Москва, ул. Космонавта Волкова, 6А²ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздравсоцразвития РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Avenue, Philadelphia, USA, 19111

*E-mail: timakhov@gmail.com

Поступила в редакцию 11.05.2011 г.

РЕФЕРАТ На основании анализа кристаллической структуры транскрипционного фактора DLX5 человека из исходной библиотеки, содержащей 10^6 химических соединений, методом молекулярного докинга выбраны малые молекулы – потенциальные лиганды DLX5. Тестирование 14 соединений *in vitro* показало, что наилучшей способностью ингибировать пролиферацию лимфомных клеток мыши, экспрессирующих *Dlx5*, обладает соединение Q12, действие которого сопровождалось снижением экспрессии протоонкогена *c-myc*. Соединение Q12 проявило низкую токсичность на нормальных клетках эпителия яичника человека и на лимфомных клетках мыши, не экспрессирующих *Dlx5*. Это соединение может использоваться для дальнейшей химической оптимизации и разработки высокоэффективных противоопухолевых препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА DLX5, транскрипционный фактор, малые молекулы, онкологические заболевания, молекулярный докинг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ миРНК – малые интерферирующие РНК; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции; DLX5/Dlx5 – транскрипционный фактор человека/мыши, кодируемый геном *DLX5/Dlx5* (Distal less homeobox gene 5); K_d – константа связывания (аффинности); NSCLC (non-small cell lung cancer) – немелкоклеточный рак легкого.

ВВЕДЕНИЕ

В современной клинической практике для борьбы с онкологическими заболеваниями используется широкий набор лекарственных средств [1–3]. Однако даже при использовании всех доступных препаратов доля больных, отвечающих на терапию, очень невелика. Это свидетельствует о необходимости разработки новых эффективных адресных методов лечения онкологических заболеваний, основанных на глубоком понимании механизмов опухолевого роста.

Недавние исследования показали, что транскрипционный фактор DLX5 обладает онкогенной активностью. Сверхэкспрессия гена *DLX5* в клетках млекопитающих стимулирует клеточную пролиферацию [4] и наблюдается в клетках карциномы эндометрия, а также немелкоклеточного (NSCLC) и мелкоклеточного рака легкого [5, 6]. Подавление экспрессии *DLX5* с помощью миРНК в раковых клетках мыши и человека приводит к остановке их деления [4, 7]. Новые данные говорят о прямом влиянии DLX5 на экспрессию протоонкогена *c-myc* [8]. Все это позволяет рассматривать DLX5 как перспективную мишень,

для которой могут быть найдены специфические лиганды со свойствами ингибиторов онкогеназа.

Проблему поиска лигандов того или иного белка часто пытаются решать с помощью так называемого высокопроизводительного скрининга [9–13]. Такой скрининг проводят на культуре клеток или на модели *in vitro*, используя ранее подготовленную библиотеку химических соединений. Логистика и стоимость исследований, необходимых для экспериментальной проверки сколько-нибудь значимого количества молекул, во многих случаях запредельно высоки. В силу этих причин в настоящей работе нами использован ранее разработанный алгоритм поиска ингибиторов новых белковых мишеней, основанный на анализе кристаллической структуры белка-мишени [14]. В основе алгоритма лежит молекулярный докинг химических соединений на известную трехмерную модель белка-мишени, определяющий вероятное положение химического соединения в лигандсвязывающем центре белка, а расчет молекулярной динамики применяется для уточнения энергии связывания лучших соединений. Как показывают наши и многие другие исследования [14–19], именно такой многоуровневый подход

эффективен и позволяет значительно сократить количество проводимых экспериментов. В нашем случае он позволил найти несколько лигандов транскрипционного фактора DLX5, перспективных для терапии онкологических заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка лигандов и молекулярный докинг

Для оптимизации времени вычислительного скрининга библиотека компании ENAMINE, состоящая из 10^6 соединений, была кластеризована с использованием содержащегося в пакете программ QUANTUM алгоритма Джарвиса–Патрика [20, 21] с ускорением [22], Мерой схожести молекул выбрана так называемая метрика Танимото, рассчитанная с помощью Daylight фингерпринтов молекул [23]. Параметры кластеризации выбирали таким образом, чтобы каждый кластер состоял в среднем из примерно 10 родственных структур, а общее количество некластеризованных молекул не превышало 20% от исходного количества соединений. Соединения, представляющие собой центроиды кластеров, были выбраны для дальнейшего скрининга. Для увеличения скорости молекулярного докинга из всей библиотеки центроидов отобрали молекулы с наименьшей молекулярной массой. Все выбранные соединения были извлечены из поставляемых ENAMINE sdf-файлов и обработаны в пакетном режиме. Дополнительного обогащения библиотеки молекулами, активными в отношении онкомишеней, или другими способами не проводили. Типизацию белка, лигандов и скрининг *in silico* осуществляли с помощью соответствующих инструментов из пакета QUANTUM.

Программа предсказывает константы связывания (аффинности, K_d) малых молекул с белком-мишенью с точностью около одного порядка путем оценки их межмолекулярных взаимодействий, используя точные модели атомных сил в водном окружении [14, 24–26]. При расчетах использовали иерархию физических моделей молекулярных взаимодействий. Для первоначального нахождения положения лиганда в активном центре белка и оценки энергии связывания белок-лигандного комплекса производили докинг лиганда на жесткую структуру белка, а затем результаты уточняли на модели гибкого белка. Для оценки потенциальной энергии взаимодействия применяли модифицированную модель меж- и внутримолекулярных взаимодействий AMBER/GAFF [27]. Свободную энергию оценивали с помощью линейной модели взаимодействия [28]. Водное окружение моделировали с использованием модифицированной обобщенной модели Борна [25]. Алгоритм описан ранее в статье [14], где при-

менялся для поиска ингибиторов белок-белковых взаимодействий.

Молекулярный докинг молекул из исходной библиотеки соединений производили на жесткую структуру белка DLX5 2DJN, взятую из базы Protein Data Bank (PDB) [29]. Выделенная для молекулярного докинга область на трехмерной структуре имела размер 2 x 2 x 2 нм. Лиганды с наилучшими предсказанными энергиями связывания были пересчитаны в модели с полностью подвижным белком [14, 15]. Чтобы убедиться, что обнаруженные молекулы не были описаны ранее, проверяли, не представлены ли эти соединения и/или их аналоги в базах данных и не упомянуты ли они в обзорах, посвященных известным ингибиторам.

Клеточные культуры

В работе использовали линию 42 Т-клеточной лимфомы Akt2-трансгенных мышей (42-936, 42-577 и 42-588) и линию 72 (wt136), охарактеризованные ранее [30]. Клетки культивировали на среде Iscove's MDM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Остальные клеточные линии культивировали в среде RPMI с 10% ЭТС. Все клеточные культуры содержали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Потенциальные ингибиторы DLX5 (Dlx5) в концентрации 10 мкМ добавляли в среду, содержащую 10⁵ опухолевых клеток, с последующей инкубацией в течение 96 ч при 37°C. Пролиферацию клеток оценивали с помощью набора CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay («Promega») в соответствии с протоколом производителя. Каждый опыт повторяли не менее 3 раз.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

РНК выделяли из клеток линии 42 Т-клеточной лимфомы мыши после инкубации с веществом Q12 и DMSO в течение 96 ч с использованием набора RNeasy@ Kit в соответствии с протоколом производителя. ОТ-ПЦР в реальном времени (не менее трех повторов) проводили в специальной службе Фокс-Чейзовского онкологического центра. Пробы для оценки экспрессии генов *c-myc*, *Dlx5* и *Tbp* синтезированы фирмой «Applied Biosystems».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска новых молекул-лигандов DLX5 использовали программный комплекс QUANTUM, основанный на анализе кристаллической структуры белка [14, 24–26]. Этот подход позволяет не только идентифицировать молекулы, потенциально связывающиеся с данным белком, но и минимизировать количество ложноположительных результатов, когда молекулы с предсказанной *in silico* высокой энергией связывания не проявляют функциональной активности в эксперименте. Поиск был затруднен отсутствием

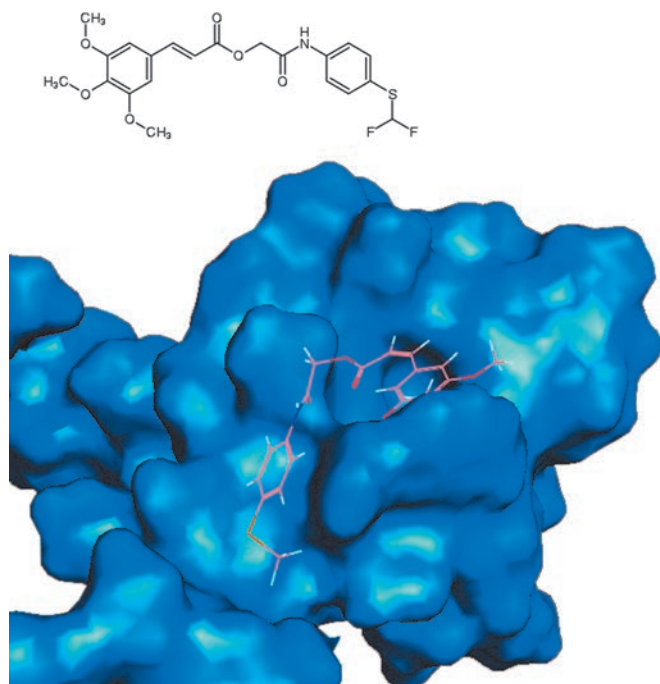


Рис. 1. Молекулярный докинг одного из отобранных для дальнейших исследований соединений: химическая структура и расположение в активном сайте транскрипционного фактора DLX5.

предварительной информации о связывании известных соединений с белком DLX5, поэтому исследования проводили «вслепую». Лучшие молекулы и все их структурные аналоги из исходной библиотеки ENAMINE были отсортированы по величине предсказанной энергии связывания. По результатам молекулярного докинга отобрали 100 лигандов, из них 14 с наилучшей предсказанной энергией связывания белка DLX5 были заказаны и синтезированы в компании ENAMINE, а затем проверены на культурах клеток. Пример молекулярного докинга с активным центром DLX5 одного из этих лигандов показан на рис. 1.

В качестве модели для проверки специфической активности выбранных лигандов использовали клетки ранее охарактеризованной линии 42 Т-клеточной лимфомы Akt2-трансгенных мышей [4, 30]. Эти клетки несут клональную хромосомную перестройку – инверсию хромосомы 6, которая приводит к транслокации гена *Dlx5* в область, находящуюся под контролем Т-клеточного энхансера, и к сверхэкспрессии белка *Dlx5*. Лимфомные клетки 42-936 инкубировали с каждым из 14 выбранных лигандов DLX5 и оценивали влияние последних на пролиферацию. Как видно из рис. 2А, лиганды с разной эффективностью влияют на пролиферацию лимфомных клеток, лучшую ингибирующую активность проявили соединения под номерами Q8, Q12, Q9 и Q13. Возможное неспецифическое цитотоксическое действие отобранных соединений

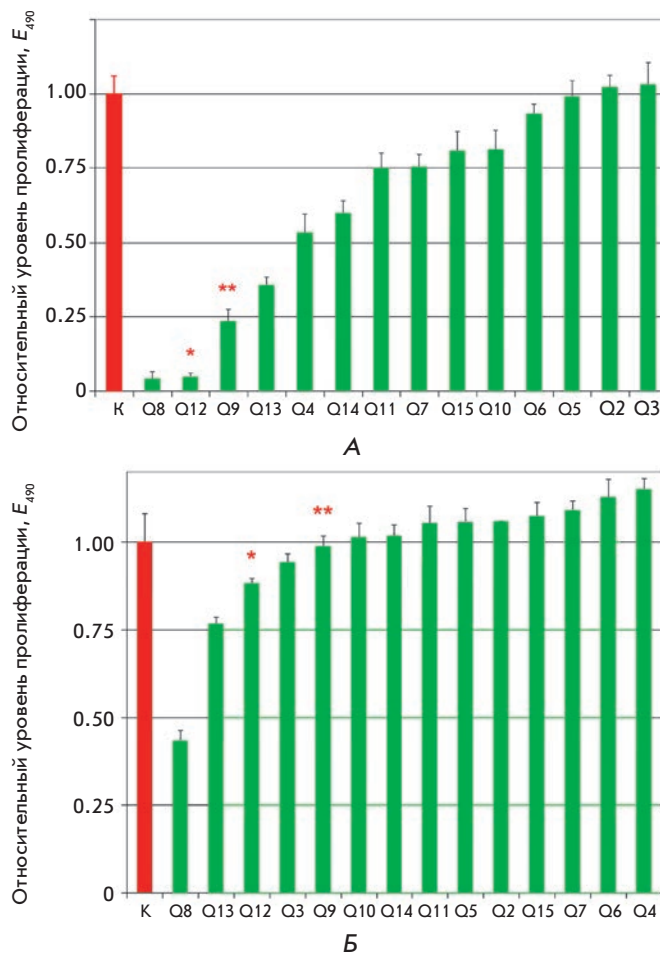


Рис. 2. Экспериментальная оценка свойств 14 соединений, для которых предсказана высокая энергия связывания с трехмерной структурой DLX5: их эффективность, оцениваемая по влиянию на пролиферацию *Dlx5*-позитивных клеток лимфомы мышей 42-936 (А), и цитотоксичность, определяемая по влиянию на пролиферацию нормальных клеток эпителия яичника человека (Б). К – уровень пролиферации клеток в контроле. Звездочками отмечены столбцы, отражающие эффект наиболее перспективных соединений Q12 (*) и Q9 (**).

проверяли на нормальных клетках эпителия яичника человека, не экспрессирующих *DLX5* (рис. 2Б). При сравнении с контролем видно, что большинство молекул-лигандов, за исключением соединений Q8 и Q13, не проявляют значительной цитотоксичности. Поскольку Q8 и Q13 обладают цитотоксическим эффектом, их исключили из дальнейшего рассмотрения. Вещества Q12 и Q9 выбрали для дальнейшего изучения как наиболее перспективные.

Для исключения возможности неспецифического влияния Q12 и Q9 на клетки лимфоидного ряда их действие проверяли на клетках линии 72 Т-клеточной лимфомы Akt2-трансгенных мышей,

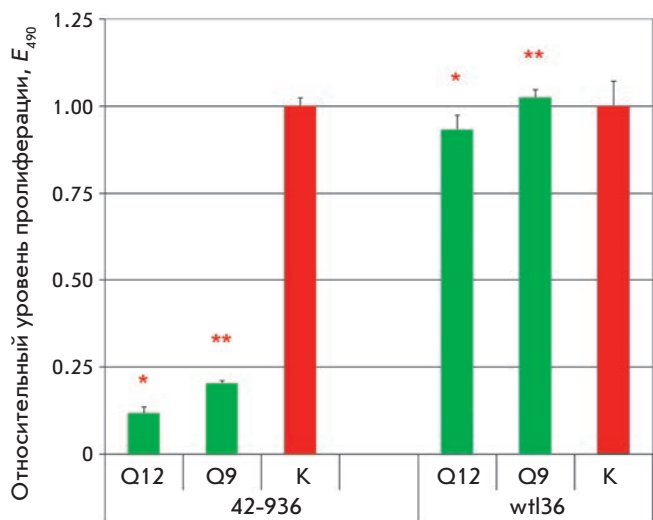


Рис. 3. Селективность соединений Q9 и Q12 на клетках лимфомы мышей. Левая панель: влияние на пролиферацию Dlx5-экспрессирующих лимфомных клеток 42-936. Правая панель: влияние на пролиферацию лимфомных клеток wtf36, не экспрессирующих Dlx5. Остальные обозначения как на рис. 2.

не экспрессирующих *Dlx5* (рис. 3). Клетки линии 72 содержат хромосомную перестройку другого типа – транслокацию между хромосомами 14 и 15 (t(14;15)), которая приводит к повышенной экспрессии протоонкогена *c-myc* [30]. На рис. 4 приведены также результаты влияния соединения Q12 на пролиферацию еще двух подтипов лимфомных клеток, экспрессирующих *Dlx5* – 42-577 и 42-588, а также на пролиферацию лимфомных клеток Jurkat и Molt16 человека, в которых не экспрессируется *DLX5*. Из данных, представленных на рис. 3 и 4, можно сделать общий вывод, что соединения Q9 и Q12 не влияют на пролиферацию клеток, не экспрессирующих *Dlx5*, однако высокоэффективно подавляют пролиферацию клеток, в которых экспрессируется этот фактор.

Известно, что транскрипционный фактор *DLX5* может прямо регулировать экспрессию протоонкогена *c-myc* [8, 30]. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени исследовано влияние Q12 на экспрессию *c-myc* в лимфомных клетках 42-936, экспрессирующих *Dlx5*. На рис. 5 представлены уровни мРНК *c-myc* относительно эндогенного контроля – мРНК ТАТА-связывающего белка (Тbp) или мРНК *Dlx5*, а также мРНК *Dlx5* относительно мРНК Тbp в присутствии 10 мкМ Q12 и без добавления последнего. Видно, что экспрессия *c-myc* значительно снижается под действием Q12, тогда как экспрессия *Dlx5* при этом не меняется. Эти результаты согласуются с представлением об ингибиторном эффекте лиганда Q12 на транскрипционную активность фактора *Dlx5*.

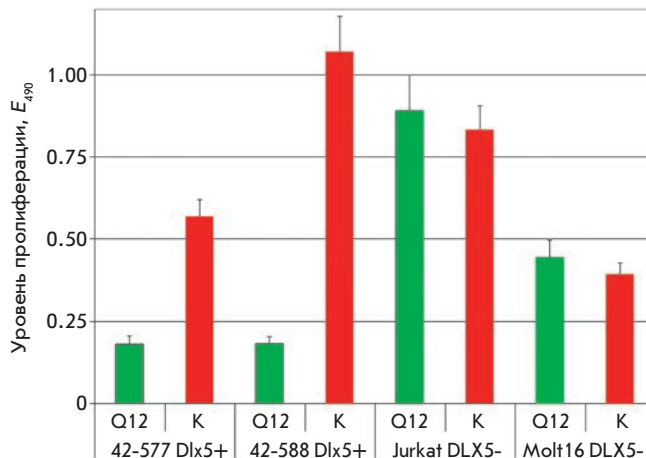


Рис. 4. Селективность соединения Q12 на клетках лимфомы человека. Слева – пролиферация Dlx5-позитивных лимфомных клеток мыши 42-577 и 42-588. Справа – пролиферация лимфомных клеток человека Jurkat и Molt16, не экспрессирующих *DLX5*. Остальные обозначения как на рис. 2.

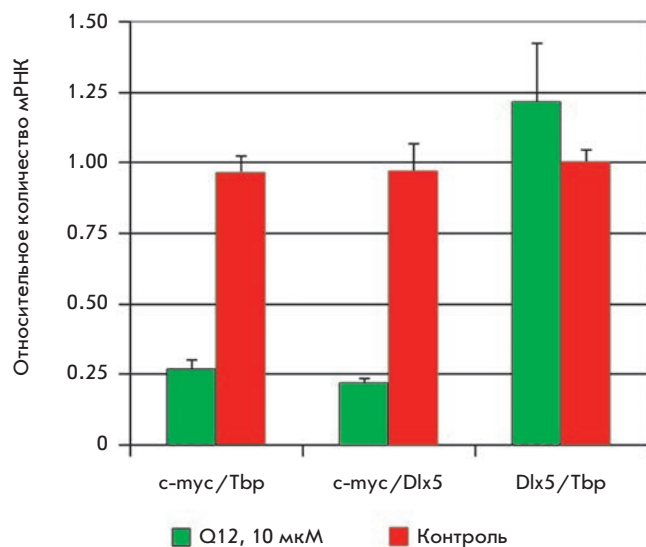


Рис. 5. ОТ-ПЦР в реальном времени. Оценка экспрессии *c-myc* и *Dlx5* в лимфомных клетках мыши 42-936, культивированных в присутствии 10 мкМ Q12, по уровню их мРНК. Тbp – ТАТА-связывающий белок.

Хотя эти данные нуждаются в проверке на большем числе клеточных линий, привлекательно уже по результатам этой работы сделать предварительный вывод о специфичности связывания лигандом Q12 транскрипционного фактора *DLX5*.

Использованные в нашей работе подходы позволили экспериментально выявить наиболее активные ингибиторы *Dlx5* (*DLX5*) из числа проверенных. В дальнейшем планируется оптимизировать структуру найденных соединений по таким параметрам,

как повышение эффективности, уменьшение возможной неспецифической токсичности и увеличение метаболической стабильности. Следующий этап нашей работы предполагает оценку активности и токсичности оптимизированных соединений *in vivo*, а также прямые измерения их K_d .

ВЫВОДЫ

С целью выяснения принципиальной возможности использования транскрипционного фактора DLX5 в качестве мишени для противоопухолевых средств и создания лекарств, способных подавлять развитие некоторых типов опухолей человека (Т-лимфом, рака легкого и яичников), проведен поиск специфических лигандов фактора DLX5 на основе анализа его кристаллической структуры. Показано, что более 50% отобранных методом молекулярного докинга соединений обладают способностью в микромолярных концентрациях ингибировать пролиферацию экспрессирующих *Dlx5* клеток мыши. При этом многие молекулы, выбранные на основе структуры DLX5, не влияют на клетки других типов, не экспрессирующие этот транскрипционный фактор, что служит доказатель-

ством специфичности отобранных нами химических соединений. Наилучшими по соотношению параметров, характеризующих эффективность и отсутствие неспецифической цитотоксичности, оказались соединения Q12 и Q9. Наблюдаемое снижение экспрессии *c-тус* под действием Q12 свидетельствует об ингибиторном эффекте этого лиганда на транскрипционную активность фактора Dlx5. Найденные нами соединения – первые описанные низкомолекулярные лиганды DLX5, которые могут использоваться для последующей химической оптимизации и разработки высокоэффективных противоопухолевых средств. ●

Работа выполнена в рамках межинститутского сотрудничества между Российским государственным медицинским университетом (кафедра молекулярной биологии и медицинской биотехнологии) и Фокс-Чейзовским онкологическим центром в сотрудничестве с компанией Квантум Фармасьютикалз. Авторы выражают благодарность Е.Г. Гетманцеву и Л.И. Меньшикову за помощь в проведении расчетов и плодотворные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Albain K.S., Nag S.M., Calderillo-Ruiz G., Jordaan J.P., Llobart A.C., Pluzanska A., Rolski J., Melemed A.S., Reyes-Vidal J.M., Sekhon J.S., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. P. 3950–3957.
- Shepherd F.A., Pereira J.R. // *N. Engl. J. Med.* 2005. V. 353. P. 123–132.
- Kris M.G., Natale R.B., Herbst R.S., Lynch Jr. T.J., Prager D., Belani C.P., Schiller J.H., Kelly K., Spiridonidis H., Sandler A., et al. // *JAMA.* 2003. V. 290. № 16. P. 2149–2158.
- Tan Y., Timakhov R.A., Rao M., Altomare D.A., Xu J., Liu Z., Gao Q., Jhanwar S.C., Di Cristofano A., Wiest D.L., et al. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 5. P. 1296–1302.
- Pedersen N., Mortensen S., Sorensen S.B., Pedersen M.W., Rieneck K., Bovin L.F., Poulsen H.S. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 8. P. 1943–1953.
- Maxwell G.L., Chandramouli G.V.R., Dainty L., Litz T.J., Berchuck A., Barrett J.C., Risinger J.I. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 4056–4066.
- Kato T., Sato N., Takano A., Miyamoto M., Nishimura H., Tsuchiya E., Kondo S., Nakamura Y., Daigo Y. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. P. 2363–2370.
- Xu J., Testa J.R. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 20593–20601.
- Broach J.R., Thorner J. // *Nature.* 1996. V. 384. P. 14–16.
- Young K., Lin S., Sun L., Lee E., Modi M., Hellings S., Husbands M., Ozenberger B., Franco R. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 946–950.
- Hamasaki K., Rando R.R. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 261. P. 183–190.
- Moore K.J., Turconi S., Miles-Williams A., Djaballah H., Hurskainen P. // *J. Biomol. Screen.* 1999. V. 4. P. 205–214.
- Dunn D., Orłowski M., McCoy P., Gastgeb F., Appell K. // *J. Biomol. Screen.* 2000. V. 5. P. 177–188.
- Joce C., Stahl J.A., Shridhar M., Hutchinson M.R., Watkins L.R., Fedichev P.O., Yin H. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. № 18. P. 5411–5413.
- Okimoto N., Futatsugi N., Fuji H., Suenaga A., Morimoto G., Yanai R., Ohno Y., Narumi T., Taiji M. // *PLoS Comput. Biol.* 2009. V. 5. № 10. P. 1–13.
- Doman T., Huo S., Wang J., Cieplak P., Kollman P.A., Kuntz I.D. // *J. Med. Chem.* 2002. V. 45. P. 1412–1419.
- Masukawa K.M., Kollman P.A., Kuntz I.D. // *J. Med. Chem.* 2003. V. 46. P. 5628–5637.
- Kuhn B., Gerber P., Schulz-Gasch T., Stahl M.J. // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. P. 4040–4048.
- Ferrara P., Curioni A., Vangrevelinghe E., Meyer T., Mordasini T. // *J. Chem. Inf. Model.* 2006. V. 46. P. 254–263.
- Jarvis R.A., Patrick E.A. // *IEEE Trans. Comput.* 1973. V. 22. № 11. P. 1025–1034.
- Willett P. *Similarity and Clustering in Chemical Information Systems*. N.Y. USA: John Wiley & Sons, Inc., 1987. 266 p.
- Li W. // *J. Chem. Inf. Model.* 2006. V. 46. № 5. P. 1919–1923.
- Flower D.R. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1998. V. 38. P. 379–386.
- Fedichev P.O., Men'shikov L.I. // *Arxiv preprint.* 2006. arXiv:cond-mat/0601129v3
- Fedichev P.O., Getmantsev E.G., Menshikov L.I. // *J. Comput. Chem.* 2011. V. 32. № 7. P. 1368–1376.
- Men'shikov L.I., Fedichev P.O. // *Rus. J. Phys. Chem.* 2011. V. 85. № 5. P. 906–908.
- Case D.A., Darden T.A., Cheatham III. T.E., Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., et al. // *AMBER 11.* 2010. University of California, San Francisco.
- Hansson T., Marelus J., Åqvist J. // *J. COMP-AID MOL DES.* 1996. V. 12. P. 27–35.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 235–242.
- Timakhov R.A., Tan Y., Rao M., Liu Z., Altomare D.A., Pei J., Wiest D.L., Favorova O.O., Knepper J.E., Testa J.R. // *Genes Chromosomes Cancer.* 2009. V. 48. № 9. P. 786–794.