

## Bioinformatic design and optimization of inhibitory peptides for Tropomyosin receptor kinase B in U266 cell line

M. Kafshdouzi Amin \*

H. Rahimi\*\*

N. Gheibi\*\*\*

M. Karimipoor\*\*\*\*

\*M.Sc. student of Medical Biotechnology, Faculty of Paramedical Sciences, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

\*\*Assistant Professor of Medical Biotechnology, School of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

\*\*\*Associate Professor of Biophysics, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

\*\*\*\*Assistant Professor of Biologic Products, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

### \*Abstract

**Background:** Tropomyosin receptor kinase B (TRK B) is one of the oncogene agents.

**Objective:** The aim of this study was to design and optimize inhibitory peptides for TRK B in U266 cell line.

**Methods:** This study was conducted in Qazvin University of Medical Sciences during 2012. After generating the peptides library using sequence tolerance method and optimizing energy of peptides employing backrub protocol in Rosetta 3.3 software package, the most stable peptides were selected based on the energy scores in R package. Prediction of the three-dimensional structure of the peptides was performed using the molecular dynamic simulation. Peptides-TRK B docking was evaluated by HADDOCK web server. The most stable peptides were designed and their cytotoxicity effects on U266 cells were investigated by the MTT assay.

**Findings:** The designed peptides were stable in terms of energy and structure and had high affinity for binding to TRK B. For measuring cell survival during 24 hours treatment of U266 cell line with these peptides, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>%) was obtained 350.2 and 199.5 nM for peptide one and two, respectively.

**Conclusion:** With regards to the results, it seems that TRK B inhibition can block cancer growth in this cell line.

**Keywords:** Brain-Derived Neurotrophic Factor, Tropomyosin Receptor Kinase B, Peptides, Oncogenes, Computer Simulation

**Corresponding Address:** Nematollah Gheibi, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

**Email:** gheibi\_n@yahoo.com

**Tel:** +98-281-3324971

**Received:** 9 Feb 2013

**Accepted:** 17 Jul 2013

## طراحی بیوانفورماتیکی و بهینه‌سازی پپتیدهای مهارکننده گیرنده تروپومایوزین کیناز B در رده سلولی U266

مرضیه کفشدوزی امین\*

دکتر حمزه رحیمی\*\*

دکتر نعمت الله غیبی\*\*\*

دکتر مرتضی کریمی‌پور\*\*\*\*

\* دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین  
 \*\* استادیار بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده علوم نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
 \*\*\* دانشیار بیوفیزیک مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین  
 \*\*\*\* استادیار فرآورده‌های بیولوژیک مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انیستیتو پاستور ایران

آدرس نویسنده مسؤل: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه، تلفن ۰۲۸۱-۳۳۲۴۹۷۱

Email: gheibi\_n@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۱

### \* چکیده

**زمینه:** گیرنده تروپومایوزین کیناز (Tropomyosin Receptor Kinase B, TRK B) یکی از پروتئین‌های سرطان‌زاست.

**هدف:** مطالعه به منظور طراحی و بهینه‌سازی پپتیدهای مناسب جهت مهار TRK B انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه پایه در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد، پس از طراحی کتابخانه پپتیدی با روش tolerance sequence و بهینه‌سازی انرژی پپتیدهای طراحی شده با روش backrub در بسته نرم‌افزاری Rosseta 3.3، پپتیدهای دارای حداکثر پایداری، براساس مقادیر backrub توسط نرم‌افزار R انتخاب شدند. ساختار سه بُعدی پپتیدها با استفاده از روش دینامیک مولکولی تعیین و میزان اتصال این پپتیدها توسط نرم‌افزار HADDOCK بررسی شد. پایدارترین پپتیدها سنتز و اثر سمی آن‌ها با استفاده از آزمون MTT بر روی رده سلولی U266 مطالعه شد.

**یافته‌ها:** پپتیدهای طراحی شده از لحاظ انرژی و ساختاری کاملاً پایدار بودند و تمایل بالایی برای اتصال به TRK B نشان دادند. پس از سنجش بقای سلول به کمک روش MTT ضمن تیمار رده سلولی U266 با این پپتیدها بعد از ۲۴ ساعت، غلظت مهار سلولی ۵۰ درصد (IC 50%) پپتیدهای یک و دو ۳۵۰/۲ و ۱۹۹/۵ نانومولار به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌ها، به نظر می‌رسد مهار TRK B می‌تواند به توقف رشد در این رده سلولی سرطانی منجر شود.

**کلیدواژه‌ها:** عامل نئوتروفیک مشتق شده مغزی، گیرنده تروپومایوزین کیناز B، پپتیدها، آنکوژن‌ها، مدل‌سازی رایانه‌ای

### \* مقدمه:

عامل اتصال اختصاصی از خانواده نئوتروفین‌ها دارند. خانواده نئوتروفین‌ها در گسترش سیستم عصبی محیطی و مرکزی نقش مهمی دارند و آبشارهای بقاء، تمایز، توقف رشد و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها را ایجاد می‌کنند.<sup>(۴)</sup> تحقیق‌ها نشان داده‌اند که اتصال عامل نئوتروفیک مشتق شده مغزی (BDNF) به TRK B در تمایز، تکثیر، مهاجم، رگ زایی و پاسخ شیمی درمانی در سرطان‌های نوروبلاستوما، ریه، پروستات، پانکراس و تخمدان اثر

سرطان به عنوان یکی از کشنده‌ترین بیماری‌ها و دومین عامل مرگ و میر در سال ۲۰۱۱ بیان شده است.<sup>(۱،۲)</sup> تاکنون روش‌های مختلفی از جمله جراحی، رادیو درمانی، شیمی درمانی، مونوکلونال آنتی‌بادی و پپتید درمانی برای درمان سرطان به کار رفته است.<sup>(۳)</sup>

گیرنده تروپومایوزین کیناز (TRK B) به عنوان یکی از پروتئین‌های سرطان‌زا شناخته شده و شامل TRK A، TRK C و TRK B است. هر کدام از این گیرنده‌ها

محاسبه شد.<sup>(۱۱)</sup> انتخاب بهترین پپتیدها براساس مقدار انرژی محاسبه شده و تحلیل مقادیر انرژی در برنامه R انجام شد. ساختار سه بُعدی پایدارترین پپتیدها با استفاده از نرم‌افزار Hyperchem ۷ (شرکت Hypercube) پیشگویی شد. در این نرم‌افزار ساختارهای حاصل با استفاده از روش دینامیک مولکولی از لحاظ انرژی بهینه شدند تا بهترین ساختار ممکن برای هر توالی به دست آید.<sup>(۱۲)</sup> برای یافتن پپتیدی با بهترین تمایل به TRK B به وسیله نرم‌افزار HADDOCK (High Ambiguity Driven protein-protein Docking) پپتیدها به گیرنده تعیین شد که امتیازبندی آن براساس میزان تمایل اتصال پپتیدهای طراحی شده با TRK B است.<sup>(۱۳)</sup> براساس میزان تمایل به گیرنده، دو عدد از بهترین پپتیدها به شرکت TAG Copenhagen (دانمارک) سفارش داده شدند که توالی آن‌ها شامل NTDLLNSNDNG و TGLDSDGLYQN (پپتید اول) و (پپتید دوم) بود.

سپس برای ارزیابی اثر سمیت پپتیدهای طراحی شده بر روی رده سلول سرطانی U266، از آزمون MTT استفاده شد. بدین صورت که سلول‌ها در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های ۵۰، ۲۰۰، ۳۵۰ و ۵۰۰ نانومولار هر کدام از پپتیدها، تیمار شدند. این غلظت‌ها براساس مطالعه کازورلا و همکاران تعیین<sup>(۸)</sup> و داده‌ها با آزمون‌های آماری آنوای یکطرفه و تبعی توکی و پست‌هاک تحلیل شدند.

#### \* یافته‌ها:

پنج عدد از بهترین پپتیدهای حاصل دارای کم‌ترین میزان انرژی بودند که در بالای خط نقطه چین قرار گرفته‌اند. توالی پپتیدهای حاصل از طراحی بیوانفورماتیکی در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه اثر پپتیدهای شماره یک و دو در آزمایشگاه بررسی شد. ساختار سه بُعدی پنج پپتید برتر در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. پپتیدهای یک و دو (قسمت A و B)

می‌گذارد.<sup>(۵۴)</sup> بنابراین مهار کردن عامل نئوتروفیک مشتق شده مغزی به عنوان یک هدف درمانی برای مهار رشد تومورها و همچنین مهار رگ زایی در سلول‌های سرطانی شناخته شده است.<sup>(۶۴)</sup>

یکی از عوامل مهاری گیرنده تروپومایوزین کیناز، توالی پپتیدی سیکلوتراکسین با توالی TKCNPMGYTKE است که در مطالعه انجام شده توسط محققین، باعث مهار TRK B در موش شده است.<sup>(۸۷)</sup>

ناحیه اتصالی با گیرنده TRK B در منطقه سوم از دومین دوم عامل نئوتروفیک مشتق شده مغزی یعنی توالی آمینو اسیدی ۶۶-۵۶ پروتئین است.<sup>(۸)</sup> داروهای پپتیدی به دلیل داشتن مزایایی از جمله اندازه کوچک، قابلیت انطباق برای اتصال با اهداف دارویی و توانایی اختلال در اتصال پروتئین-پروتئین مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند.<sup>(۹۷)</sup> بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی و طراحی بیوانفورماتیکی پپتید مهارکننده TRK B انجام شد.

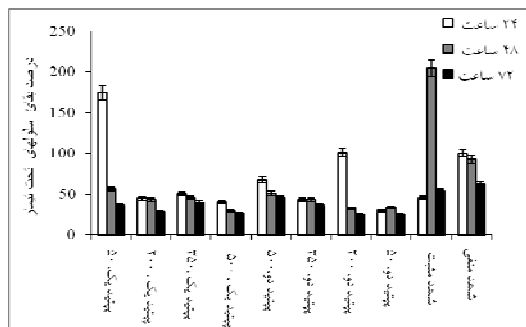
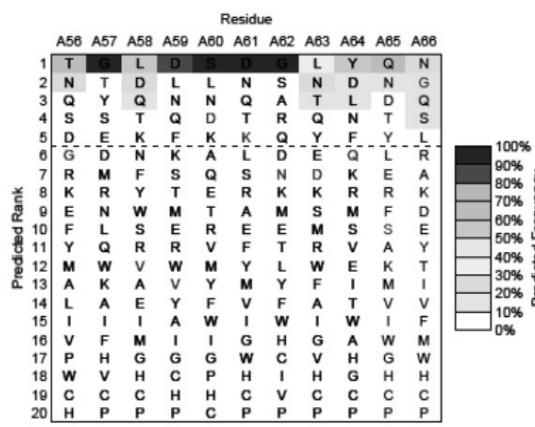
#### \* مواد و روش‌ها:

این مطالعه پایه در سال ۱۳۹۱ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. به صورت کلی مرحله به مرحله به ترتیب زیر صورت گرفت: ابتدا کتابخانه پپتیدی شامل دو بخش ساخت و ایجاد کانفورماسیون‌های انعطاف‌پذیر اسکلت پپتیدی (ensemble generation) و همچنین بررسی موتاسیون‌های متناسب با کانفورماسیون اسکلت پپتید اولیه انجام شد. اسکلت‌های انعطاف‌پذیر پپتیدی با استفاده از روش backrub و sequence tolerance ایجاد و انرژی آن‌ها با استفاده از محاسبات مونت کارلو (Monte Carlo) بهینه شد. این الگوریتم در مجموعه نرم‌افزاری Rosetta 3.3 تنظیم و طراحی شد.<sup>(۱۰)</sup> مرحله بعد شامل ایجاد موتاسیون‌های مختلف بود که با استفاده از الگوریتم ژنتیک انجام شد. سپس مقدار انرژی برای هر موتانت با استفاده از ماتریکس تعیین موقعیت Position weight matrix (PWM) و رابطه ولتزنم

ساختار ماریپیچی (هلیکسی) داشتند.

۱۹۸ نانو مولار و پپتید سیکلوتراکسین (شاهد مثبت) ۲۰۰ نانو مولار به دست آمد (جدول شماره ۱).

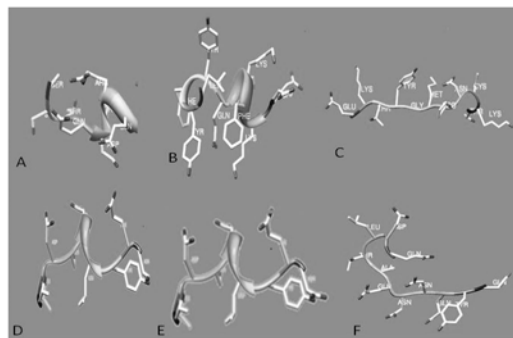
شکل ۱- پپتیدهای حاصل از مطالعه به ترتیب انرژی



جدول ۱- مقایسه مقادیر IC50% نانومولار پپتید یک، دو و سیکلوتراکسین به عنوان شاهد مثبت

پپتید	زمان تیمار	ساعت ۲۴	ساعت ۴۸	ساعت ۷۲
پپتید یک TGLDSDGLYQN	۳۵۰/۲	۱۹۹/۶	۱۹۹	
پپتید دو NTDLLNSNDNG	۱۹۹/۵	۱۹۸	۱۹۸/۳	
پپتید سیکلوتراکسین TKNPMGYTKE	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	

شکل ۲- ساختار سه بُعدی پنج عدد از پپتیدهای طراحی شده با بالاترین پایداری و پپتید سیکلوتراکسین به عنوان شاهد مثبت



**\* بحث و نتیجه گیری:**

این مطالعه نشان داد که پپتیدهای طراحی شده در غلظت‌های ۵۰، ۲۰۰، ۳۵۰ و ۵۰۰ نانو مولار اثر مهارتی مناسبی بر علیه گیرنده TRKB و در نتیجه سلول‌های سرطانی U266 داشتند. TRKB به عنوان یک عامل مؤثر در بیماری‌زایی سرطان شناخته شده و نشان داده شده است که مهار آن باعث توقف رشد سلول‌های سرطانی می‌شود.<sup>(۵،۴)</sup> بنابراین با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، پپتیدهایی با تمایل بالا بر علیه این گیرنده طراحی شد.

در این مطالعه پپتیدهای طراحی شده با مهار TRKB باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی شدند و تمایل خوبی برای اتصال به TRKB داشتند. در مقایسه با ساختار

تیمار سلول‌ها در بازه‌های زمانی‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های ۵۰، ۲۰۰، ۳۵۰ و ۵۰۰ نانومولار هر کدام از پپتیدها، کاهش درصد بقای سلول‌ها را نسبت به گروه شاهد بدون تیمار نشان داد ( $P < 0.001$ ). البته این معنی‌داری در غلظت‌های ۵۰ نانومولار پپتید یک و ۲۰۰ نانومولار پپتید دو در بازه زمانی ۲۴ ساعت مشاهده نشد (نمودار شماره ۱).

بررسی پپتیدهای طراحی شده بر روی رده سلولی U266 نشان داد که این پپتیدها باعث مهار TRKB شده‌اند. درصد IC50 پپتید یک ۱۹۹/۶ نانو مولار، پپتید دو

### \* سپاس‌گزاری:

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت حمایت مالی از پایان نامه کارشناسی ارشد این دانشگاه و همکاری انستیتو پاستور ایران قدردانی می‌شود.

### \* مراجع:

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011 Jul-Aug; 61 (4): 212-36
2. Stewart BW, Kleihues P. World cancer report: Lyon, France: IARC press; 2003. 215-22
3. Antosova Z, Mackova M, Kral V, Macek T. Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever? *Trends Biotechnol* 2009 Nov; 27 (11): 628-35
4. Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk-the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 2009 Oct 1; 15 (19): 5962-7
5. Walch ET, Marchetti D. Role of neurotrophins and neurotrophins receptors in the in vitro invasion and heparanase production of human prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 1999 Jun; 17 (4): 307-14
6. Yu X, Liu L, Cai B, He Y, Wan X. Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TRk B in human ovarian cancer. *Cancer Sci* 2008 Mar; 99 (3): 543-52
7. Zhang L, Hu Y, Sun Cy, et al. Lentiviral shRNA silencing of BDNF inhibits in vivo multiple myeloma growth and angiogenesis via down-regulated stroma-derived VEGF expression in the bone marrow milieu. *Cancer Sci* 2010 May; 101 (5): 1117-24

سیکلوتراکسین که به صورت بسته بود، انتهای توالی پپتید A یک هلیکس داشت و در دو انتهای پپتید به هم نزدیک می‌شد، پپتید B تمایل به تشکیل یک هلیکس ساختاری بزرگ داشت، ولی جهت هلیکس‌های تشکیل شده عکس هم دیگر بودند. پپتیدهای C و D در ناحیه وسط به صورت هلیکس بودند و ساختار کلی آن‌ها بیش‌تر شبیه به ساختار سیکلوتراکسین بود. در پپتید E هیچ ساختار دومی مشاهده نشد.

در این مطالعه پپتیدهای طراحی شده مانند سایر ترکیب‌های مهارکننده مطالعه شده بر روی TRK B<sup>(۱۴و۱۵)</sup>، کاهش درصد بقای سلول‌ها نسبت به گروه شاهد بدون تیمار را نشان دادند و این کاهش در هر دوز غلظت وابسته به زمان بود و با افزایش زمان تیمار، میزان بقای سلول سرطانی کاهش می‌یافت. از طرفی برای هر تیمار پپتید یک کاهش بقا وابسته به غلظت مشاهده شد.

لو ژانگ نشان داد که مهار TRK B با استفاده از Sh RNA با توالی نوکلئوتیدی مشخص به عنوان مهارکننده بر روی رده سلولی U266 مولتیپل مایلوما باعث مرگ می‌شود.<sup>(۶)</sup> در مطالعه تاپلی و همکاران، K252a به عنوان مهارکننده TRK B طراحی و با غلظت ۵۰ درصد مهار ۱۰ تا ۳۰ نانومولار، باعث مهار گیرنده TRK B شد.<sup>(۱۴)</sup> در مطالعه کامارتو و همکاران نیز CEP-751 به عنوان یک بازدارنده گیرنده TRK B در غلظت ۱۰۰ نانومولار به عنوان یک عامل ضد تومور بر علیه سلول NIH3T3، باعث عدم رشد تومور سلول‌های موش شد.<sup>(۱۵)</sup>

در مطالعه‌های قبلی نشان داده شد که سیکلوتراکسین بعد از ۲۴ ساعت اثرگذار است،<sup>(۸)</sup> پپتیدهای طراحی شده در این مطالعه در زمان مشابه اثر بهتری نسبت به سیکلوتراکسین از خود نشان دادند.

با توجه به نتایج حاصل در این مطالعه، به نظر می‌رسد این روش می‌تواند برای طراحی پپتیدهای مهارکننده استفاده شود.

8. Cazorla M, Jouvenceau A, Rose C, et al. Cyclotraxin-B, the first highly potent and selective TRk B inhibitor, has anxiolytic properties in mice. *PLoS One* 2010 Mar 19; 5 (3): e9777
9. Iyer R, Evans AE, Qi X, et al. Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2010 Mar 1; 16 (5): 1478-85
10. Leaver-Fay A, Tyka M, Lewis SM, et al. ROSETTA3: An object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods Enzymol* 2011; 487: 545-74
11. Smith CA, Kortemme T. Backrub-like backbone simulation recapitulates natural protein conformational variability and improves mutant side-chain prediction. *J Mol Biol* 2008 Jul 18; 380 (4): 742-56
12. Froimowitz M. HyperChem: A software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques* 1993 Jun; 14 (6): 1010-3
13. De Vries SJ, van Dijk M, Bonvin AM. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nat Protoc* 2010 May; 5 (5): 883-97
14. Tapley P, Lamballe F, Barbacid M. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the TRK family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 1992 Feb; 7 (2): 371-81
15. Strock CJ, Park JI, Rosen M, et al. CEP-701 and CEP-751 inhibit constitutively activated RET tyrosine kinase activity and block medullary thyroid carcinoma cell growth. *Cancer Res* 2003 Sep 1; 63 (17): 5559-63