

УДК 616-092

Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2B1 (hnRNPA2B1) как патогенетически значимая лекарственная мишень для онкотерапии (молекулярный докинг иринотекана и доксициклина)

Волкова О.О.¹, Шитяков С.В.¹, Кравцов В.Ю.^{1,2}

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики».

191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, д. 9

² Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук».

194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 8, корп. 3, литер А

Актуальность. В последние годы гиперэкспрессия и накопление гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A2B1 (hnRNPA2B1) в новообразованиях рассматривается как новая типовая реакция, развивающаяся в ходе злокачественной прогрессии, а сам hnRNPA2B1 становится патогенетически значимой мишенью для противоопухолевых препаратов.

Целью нашего исследования стало теоретическое моделирование *in silico* методом молекулярного докинга взаимодействий противоракового препарата иринотекана и антибиотика тетрациклинового ряда доксициклина с белком hnRNPA2B1.

Результаты проведённых докингов указывают на ещё один механизм дезактивации hnRNPA2B1 за счет связывания лигандов с белком вместо молекул РНК. Среди наиболее вероятных карманов (P0–P4) наилучшее сродство наблюдалось в карманах P0 и P4, принадлежащих к доменам RRM1 и RRM2 соответственно. Оказалось, что сродство иринотекана ($\Delta G = -10,36$ ккал/моль) выше, чем сродство доксициклина ($\Delta G = -8,20$ ккал/моль). Полученное значение энергии связывания доксициклина указывает на образование комплекса hnRNPA2B1–доксициклин, что делает дальнейшее рассмотрение доксициклина как таргетного противоопухолевого препарата перспективным.

Заключение. Рассчитанные значения энергии связывания указывают на фармакологически значимое образование комплексов hnRNPA2B1–иринотекан и hnRNPA2B1–доксициклин, что указывает на ещё один плейотропный противоопухолевый эффект этих препаратов.

Ключевые слова: молекулярный докинг; *in silico*; гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин hnRNPA2B1; доксициклин; иринотекан.

Для цитирования: Волкова О.О., Шитяков С.В., Кравцов В.Ю. Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2B1 (hnRNPA2B1) как патогенетически значимая лекарственная мишень для онкотерапии (молекулярный докинг иринотекана и доксициклина). *Патогенез*. 2023; 21(4): 48–52.

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.04.48–52

Для корреспонденции: Волкова Ольга Олеговна, e-mail: volkova@infochemistry.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 333 22-65-00022 «Исследование роли белка HNRNPA2B1 в метаболизме R- петель, геномной стабильности и радиорезистентности».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 04.10.2023

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) as a pathogenetically significant drug target for oncology therapy (molecular docking of irinotecan and doxycycline)

Volkova O.O.¹, Shityakov S.V.¹, Kravtsov V.Yu.^{1,2}

¹ ITMO University,

Lomonosova Str. 9, St. Petersburg 191002, Russian Federation

² Zh.I. Alferov Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, Khlopina Str., 8 Bldg. 3 letter A, St. Petersburg 194021, Russian Federation

Context. In recent years, overexpression and accumulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) in neoplasms has been considered as a new typical reaction on cancer progression. Therefore, hnRNPA2B1 is a pathogenetically significant target for antitumor drugs.

The aim of our study was the theoretical modeling *in silico* of the interactions of the anti-cancer drug irinotecan and the tetracycline antibiotic doxycycline with the hnRNPA2B1 protein.

Results. The affinity of doxycycline and irinotecan to hnRNPA2B1 was calculated by molecular docking method. According to the results, affinity of irinotecan ($\Delta G = -10.36$ kcal/mol) is higher than the affinity of doxycycline ($\Delta G = -8.20$ kcal/mol). However, the value of the binding energy of doxycycline indicates the formation of the hnRNPA2B1 – doxycycline complex, which makes further studies of doxycycline as an anticancer drug potentially interesting.

Conclusion. The binding energies (ΔG) of irinotecan and doxycycline to the target RNA-binding protein hnRNPA2B1 obtained by molecular modeling were -10.36 kcal/mol and -8.20 kcal/mol respectively. The calculated binding energy values indicate the

pharmacologically significant formation of hnRNPA2B1–irinotecan and hnRNPA2B1–doxycycline complexes, which indicates another anti-cancer pleiotropic effect of these drugs.

Key words: molecular docking; *in silico*; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1); doxycycline; irinotecan.

For citation: Volkova O.O., Shityakov S.V., Kravtsov V.Yu. [Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) as a pathogenetically significant drug target for oncology therapy (molecular docking of irinotecan and doxycycline)]. *Pathogenesis*. 2023; 21(4): 48–52

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.04.48-52

For correspondence: Volkova Olga Olegovna, e-mail: volkova@infochemistry.ru

Funding. The research was funded by the Russian Science Foundation (# 333 22-65-00022) “Deciphering the role of HNRNPA2B1 in R-loop metabolism, genome stability and radioresistance».

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 04.10.2023

Введение

Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2B1 (hnRNPA2B1) относится к РНК-связывающим белкам (RNP), которые взаимодействуют с РНК через специфические РНК-связывающие домены и обеспечивают жизнеспособность клеток [1]. Белок hnRNPA2B1 задействован практически в каждом этапе синтеза и процессинга РНК: в ядре – в транскрипции, сплайсинге пре-мРНК, выборе сайта полиаденилирования и ядерном транспорте. В цитоплазме hnRNPA2B1 участвует в сборке гранул РНК, транспорте, локализованной трансляции, регуляции деградации мРНК; в репарации ДНК, поддержании теломере и распознавании вирусной ДНК [2].

Большое внимание уделяется hnRNPA2B1 как патогенетической лекарственной мишени при различных нарушениях [3–5], и особенно интересно исследование роли белка в онкологических заболеваниях [6–10]. Гиперэкспрессия и накопление hnRNPA2B1 в новообразованиях уже рассматривается как новая типовая реакция, развивающаяся в ходе злокачественной прогрессии, а сам hnRNPA2B1 – как патогенетически значимая мишень для противоопухолевых препаратов [7]. hnRNPA2B1 может быть многообещающей мишенью для лечения рака предстательной железы [8], рака молочной железы [9], также hnRNPA2B1 является потенциальной терапевтической мишенью при множественной миеломе [10].

Таким образом, становится очевидной необходимость подбора лигандов – активных веществ, лекарственных препаратов, избирательно связывающихся с hnRNPA2B1. Для решения подобных задач изначально проводится молекулярный докинг, который представляет собой метод молекулярного моделирования взаимодействия между небольшой молекулой (лигандом) и белком (мишенью), что позволяет предсказать структуру комплекса белок–лиганд. Процесс докинга включает в себя два этапа: предсказание конформации, положения и ориентации лиганда внутри сайта связывания, и оценка аффинности связывания. Ранее было опубликовано исследование [11], посвященное разработке препаратов для лечения рака мочевого пузыря, в ходе которого был проведен скрининг *in silico* базы данных соединений zinc15 и выявлены 8 препаратов-кандидатов, обладающих наибольшей аффинностью к hnRNPA2B1.

В этом же 2023 году, ранее вышла статья [12] о лиганде – эрготамине, который потенциально может выступать в качестве перепрофилирующего лекарственного средства для лечения рецидивирующих эпителиальных опухолей тимуса, нацеливаясь на hnRNPA2B1.

Целью нашего исследования стало моделирование *in silico* взаимодействий противоракового препарата иринотекана и антибиотика тетрациклинового ряда доксициклина с hnRNPA2B1.

Материалы и методы исследования

Молекулярный докинг. Структура hnRNPA2B1 была загружена из банка данных белков RCSB (идентификаторы PDB: 5HO4). Структуры доксициклина и иринотекана были получены из базы данных DrugBank (DBANDOX: 00254, DBANIRT: 00762). Для оптимизации структур лигандов использовали программу Avogadro. Алгоритм AutoDock был реализован для моделирования взаимодействия hnRNPA2B1–лиганд. В исследовании использовались стыковочные сетки трехмерного размера 22,5 Å. Расположение сайтов связывания P0, P1, P2, P3, P4 было выбрано со следующими декартовыми координатами –29,847 Å (ось x), 6,098 Å (ось y), 0,646 Å (ось z) для P0; –17,851 Å (ось x), –11,584 Å (ось y), 9,366 Å (ось z) для P1; –9,104 Å (ось x), 25,425 Å (ось y), 9,366 Å (ось z) для P2; –46,594 Å (ось x), 2,846 Å (ось y), 7,394 Å (ось z) для P3; –17,542 Å (ось x), 19,071 Å (ось y), 5,665 Å (ось z) для P4 соответственно. Для обнаружения сайтов связывания hnRNPA2B1 использовался веб-сервер CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of Belts) 3.0. Программное обеспечение молекулярной визуализации PyMOL (Molecular Graphics System, версия 2.5.4) использовалось для визуализации результатов молекулярного докинга.

Результаты исследования

Анализ сайтов связывания. Определение активных центров белка является первым этапом моделирования взаимодействий белок–лиганд с помощью методов молекулярного докинга. Белок hnRNPA2B1 имеет несколько активных сайтов связывания, включая РНК-связывающие домены RRM1 и RRM2 (рис. 1, а). Были изу-

чены пять связывающих карманов: отдельный карман P0; карманы P2 и P4, принадлежащие RRM2; и карманы P0 и P3 в домене RRM1, соответственно (рис. 1, б). Выбор этих карманов основан на изучении взаимодействия hnRNP A2B1 с лигандом PAC-5 [13] и анализ структуры белка с помощью веб-сервера CASTr (рис. 1, б).

Согласно рассчитанному значению энергии связывания (ΔG) доксициклина и иринотекана с hnRNP A2B1, наиболее энергетически выгодное связывание происходит в карманах P0 и P4 (рис. 2), что также согласуется с исследованием [13].

Геометрическое строение карманов P0 и P4 позволяет молекуле лиганда легко связываться с белком, однако участок P0 является более предпочтительным из-за его меньшего размера по сравнению с P4, содержащим фрагмент РНК.

Известно, образование комплексов белок–лиганд обусловлено нековалентными межмолекулярными взаимодействиями. Доксициклин относится к группе антибиотиков тетрациклинового ряда, в структуре которых присутствуют гидроксильные и карбонильные группы, благодаря чему молекула способна образовывать связи с аминокислотами белка. Так, доксициклин связывается с аминокислотами Pro 105, Ala 107, Lys 186 в кармане P0 (рис. 3, а) и Arg 95, Val 97, Ser 102 в кармане P4, соответственно (рис. 3, б).

Анализ энергии связывания. Изменение параметра свободной энергии Гиббса ΔG использовалось в качестве меры сродства. Экспериментальное значение ΔG больше нуля указывает на образование комплекса. Наиболее отрицательное значение указывает на лучшее сродство лиганда и его способность образовывать комплекс с целевой молекулой. Согласно результатам (табл. 1), иринотекан и доксициклин являются потенциальными лигандами для hnRNP A2B1, однако иринотекан обладает более высоким сродством к белку.

Обсуждение

Согласно кристаллической структуре hnRNP A2B1 (PDB: 5HO4, [14]), полученной рентгеноструктурным анализом, белок имеет РНК-связывающие домены RRM1 и RRM2, разделенные линкером из 15 аминокислот; С-концевую богатую глицином область, которая включает прионоподобный домен, содержащий сигнал ядерной локализации. Деактивация hnRNP A2B1 возможна за счет связывания лигандов с белком вместо молекул РНК. Среди наиболее вероятных карманов (P0–P4) наилучшее сродство наблюдалось в карманах P0 и P4, принадлежащих RRM1 и RRM2, соответственно.

В нашей статье представлены два лиганда – иринотекан и доксициклин, которые показали наиболь-

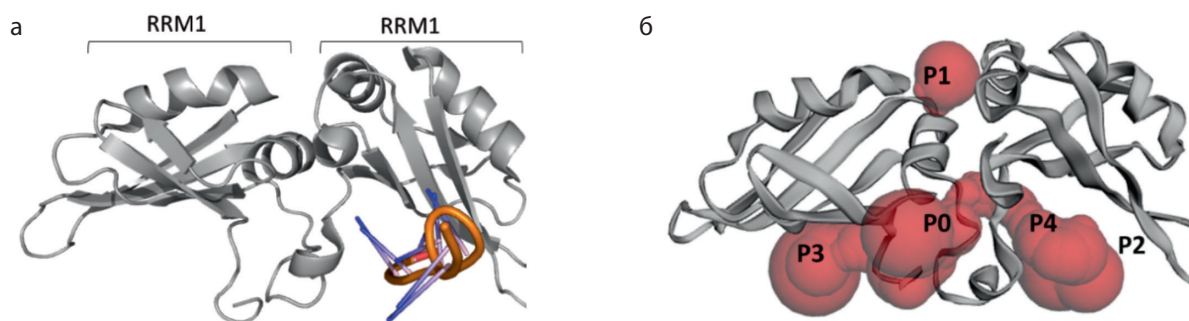


Рис. 1. (а) Структура hnRNP A2B1 в комплексе с РНК (PDB: 5HO4). (б) Сайты связывания hnRNP A2B1, предсказанные с помощью CASTr. Модель белка окрашена в серый цвет, поверхность связывающих карманов соответственно окрашена в красный цвет.

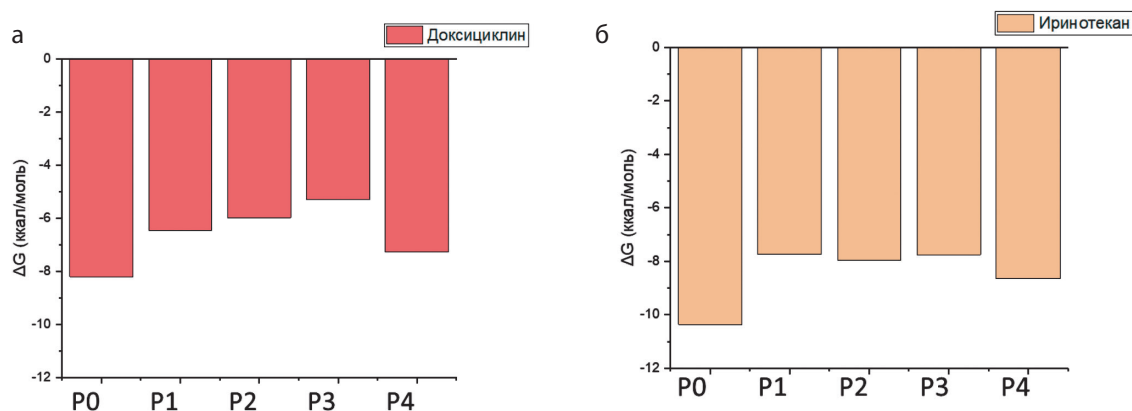


Рис. 2. Диаграмма рассчитанных энергий связывания ΔG доксициклина (а) и иринотекана (б) с hnRNP A2B1 в каждом из карманов P0-P4.

шую фармакологически значимую аффинность к мишени hnRNPA2B1. Отметим, иринотекан и доксициклин были выбраны для нашего исследования, поскольку на этапе предварительного анализа показали больший потенциал по сравнению с противоопухолевыми препаратами (гемситабин, топотекан, цефитиниб, цитарабин) и рядом антибиотиков тетрациклинового ряда (оксациллин, дигидрострептомицин, цефтраксим, цефрандин, цефоперазон, цефразидин, ампициллин и хлорамфеникол). Однако, в будущем необходимо рассмотреть все указанные препараты детально.

Иринотекан – хорошо известный препарат, который уже давно используется в противоопухолевой терапии [15, 16]. Однако его применение ограничено наличием значительных побочных эффектов, в том числе кишечного мукозита [17]. Основной мишенью противоракового препарата иринотекан является топоизомер-

аза 1, однако, согласно результатам расчетов энергии связи, иринотекан ($\Delta G = -10,36$ ккал/моль) также способен ингибировать hnRNPA2B1.

Доксициклин широко используется в качестве антибиотика благодаря его антибактериальной активности и хорошим показателям безопасности при длительном применении [18], он также обладает интересным потенциалом для повышения терапевтической активности некоторых методов лечения рака благодаря его цитотоксическим и антипролиферативным свойствам в различных раковых клетках [19]. Аффинность доксициклина ниже, чем аффинность иринотекана, но значение ($\Delta G = -8,20$ ккал/моль) также предполагает связывание доксициклина с hnRNPA2B1. Дальнейшее рассмотрение доксициклина как таргетного противоопухолевого препарата представляется очень перспективным.

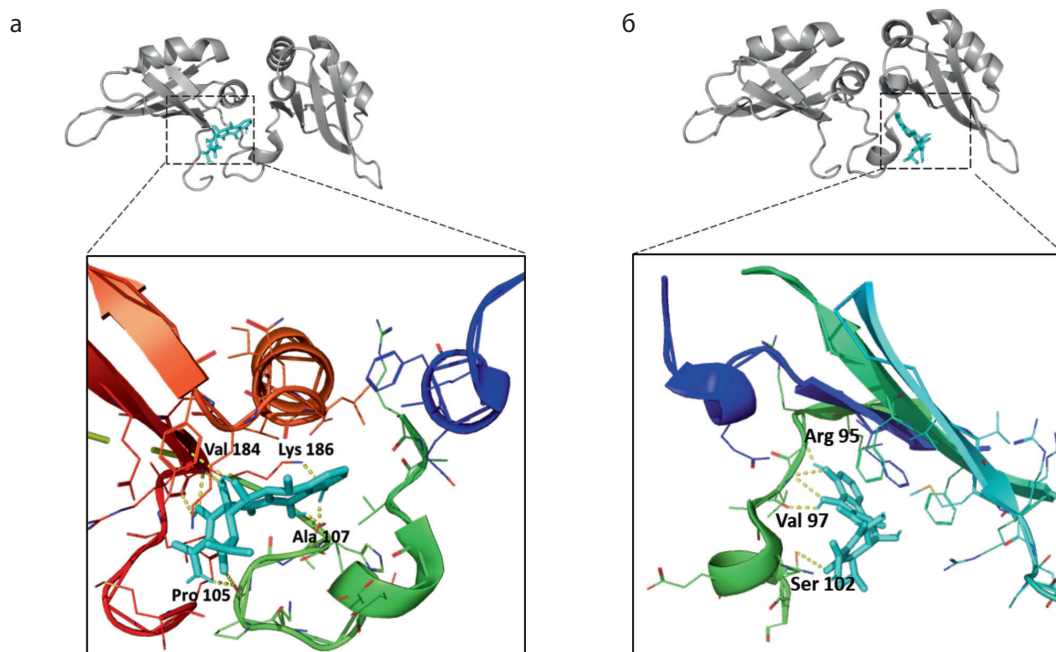
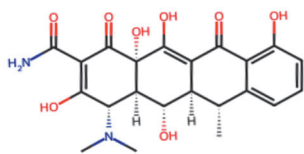
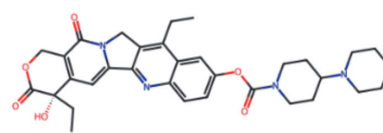


Рис. 3. Прогнозируемые положения доксициклина в карманах P0 (а) и P4 (б), полученные с помощью алгоритма AutoDock. Модели белка и лигандов окрашены в серый и голубой цвета, соответственно.

Таблица 1

Рассчитанные значения энергии связывания hnRNPA2B1 с доксициклином и иринотеканом.

| Лиганд | ΔG_{P0} , ккал/моль | ΔG_{P4} , ккал/моль |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
|  Доксициклин | -8,20 | -7,26 |
|  Иринотекан | -10,36 | -8,64 |

Примечание: ΔG_{P0} , ΔG_{P4} – энергия связывания лигандов с hnRNPA2B1 в карманах P0 и P4.

Таким образом, на этапе теоретического моделирования *in silico* мы предсказали фармакологически значимое образование комплексов hnRNP A2/B1–иринотекан и hnRNP A2/B1–доксикарбин, что указывает на ещё один противораковый плейотропный эффект этих препаратов. В настоящее время мы начали изучение связывания иринотекана и доксикарбина с hnRNP A2/B1 методом QCM (quartz crystal microbalance) и в дальнейшем планируем экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo*.

Выводы

Методом молекулярного докинга изучены связывания иринотекана и доксикарбина с мишенью – гетерогенным ядерным рибонуклеопротеином A2/B1 (hnRNP A2/B1). Выявлено сродство иринотекана ($\Delta G = -10,36$ ккал/моль) и доксикарбина ($\Delta G = -8,20$ ккал/моль). Рассчитанные значения энергии связывания указывают на фармакологически значимое образование комплексов hnRNP A2/B1–иринотекан и hnRNP A2/B1–доксикарбин, что указывает на ещё один механизм дезактивации hnRNP A2/B1 за счет связывания лигандов с белком вместо молекул РНК. Среди наиболее вероятных карманов (P0–P4) наилучшее сродство наблюдалось в карманах P0 и P4, принадлежащих к доменам RRM1 и RRM2 соответственно.

Список литературы / References

- Xie W., Zhu H., Zhao M., Wang L., Li S., Zhao C., Zhou Y., Zhu B., Jiang X., Liu W., Ren C. Crucial roles of different RNA-binding hnRNP proteins in Stem Cells. *Int. J. Biol. Sci.* 2021; 17(3): 807–817. DOI: 10.7150/ijbs.55120
- Liu Y., Shi S. The roles of hnRNP A2/B1 in RNA biology and disease. *WIREs RNA*. 2020; 12(2): e1612. DOI: 10.1002/wrna.1612
- Thibault P.A., Ganesan A., Kalyanamoorthy S., Clarke J.-P.W.E., Salapa H.E., Levin M.C. hnRNP A/B Proteins: An Encyclopedic Assessment of Their Roles in Homeostasis and Disease. *Biology*. 2021; 10(8): 712. DOI: 10.3390/biology10080712
- Geuens T., Bouhy D., Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet.* 2016; 135: 851–867. DOI: 10.1007/s00439-016-1683-5
- Cho S.B., Ahn K.J., Kim D.H., Zheng Z., Cho S., Kang S.-W., Lee J.H., Park Y.-B., Lee K.H., Bang D. Identification of hnRNP-A2/B1 as a Target Antigen of Anti-Endothelial Cell IgA Antibody in Behçet's Disease. *J. Invest. Dermatol.* 2012; 132: 601–608. DOI: 10.1038/jid.2011.397
- Tauler J., Zudaire E., Liu H., Shih J., Mulshine J.L. hnRNP A2/

B1 Modulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 2010; 70(18): 7137–7147. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0860

- Tang J., Chen Z., Wang Q., Hao W., Gao W.-Q., Xu H. hnRNP A2/B1 Promotes Colon Cancer Progression via the MAPK Pathway. *Front. Genet.* 2021; 12: 666451. DOI: 10.3389/fgene.2021.666451
- Qi F., Shen W., Wei X., Cheng Y., Xu F., Zheng Y., Li L., Qin C., Li X. CSNK1D-mediated phosphorylation of HNRNP A2/B1 induces miR-25-3p/miR-93-5p maturation to promote prostate cancer cell proliferation and migration through m6A-dependent manner. *Cell. Mol. Life Sci.* 2023; 80: 156. DOI: 10.1007/s00018-023-04798-5
- Liu Y., Li H., Liu F., Gao L.-B., Han R., Chen C., Ding X., Li S., Lu K., Yang L., Tian H.-M., Chen B.-B., Li X., Xu D.-H., Deng X.-L., Shi S.-L. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 is a negative regulator of human breast cancer metastasis by maintaining the balance of multiple genes and pathways. *EBioMedicine*. 2020; 51: 102583. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.11.044
- Jia C., Guo Y., Chen Y., Wang X., Xu Q., Zhang Y., Quan L. HN-RNP A2/B1-mediated m6A modification of TLR4 mRNA promotes progression of multiple myeloma. *J. Transl. Med.* 2022; 20: 537. DOI: 10.1186/s12967-022-03750-8
- Hui P., Ni F., Zheng L., Jia L., Wang Z. Identification of immunotherapy-related lncRNA signature for predicting prognosis, immunotherapy responses and drug candidates in bladder cancer. *BMC Cancer*. 2023; 23: 355. DOI: 10.1186/s12885-023-10828-z
- Zhou Z., Lu Y., Gu Z., Sun Q., Fang W., Yan W., Ku X., Liang Z., Hu G. HNRNP A2/B1 as a potential therapeutic target for thymic epithelial tumor recurrence: An integrative network analysis. *Comput. Biol. Med.* 2023; 155: 106665. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2023.106665
- Zuo D., Chen Y., Cai J., Yuan H.-Y., Wu J.-Q., Yin Y., Xie J.-W., Lin J.-M., Luo J., Feng Y., Ge L.-J., Zhou J., Quinn R.J., Zhao S.-J., Tong X., Jin D.-Y., Yuan S., Dai S.-X., Xu M. A hnRNP A2/B1 agonist effectively inhibits HBV and SARS-CoV-2 omicron *in vivo*. *Protein Cell*. 2022; 14(1): 37-50. DOI: 10.1093/procel/pwac027
- Wu B., Su S., Patil D.P., Liu H., Gan J., Jaffrey S.R., Ma J. Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat. Commun.* 2018; 9: 420. DOI: 10.1038/s41467-017-02770-z
- Fuchs C., Mitchell E.P., Hoff P. M. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2006; 32. (7): 491–503. DOI: 10.1016/j.ctrv.2006.07.001
- Bailly C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacol. Res.* 2019; 148: 104398. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104398
- de Alencar N.M.N., da Silveira Bitencourt F., de Figueiredo I.S.T., Luz P.B., Lima-Júnior R.C.P., Aragão K.S., Magalhães P.J.C., de Castro Brito G.A., Ribeiro R.A., de Freitas A.P.F., Ramos M.V. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). *Phytother. Res.* 2016; 31(2): 312–320. DOI: 10.1002/ptr.5752
- Holmes N.E., Charles P.G.P. Safety and Efficacy Review of Doxycycline. *Clinical Medicine. Therapeutics 1. CMT.* 2009; S2035. DOI: 10.4137/CMT.S2035
- Markowska A., Kaysiewicz J., Markowska J., Huczyński A. Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2019; 29: 1549–1554. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.04.045

Сведения об авторах:

Волкова Ольга Олеговна — аспирант, инженер научно-образовательного центра инфохимии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»; <https://orcid.org/0000-0002-5812-6162>

Шитяков Сергей Васильевич — доктор медицинских наук, ординарный профессор научно-образовательного центра инфохимии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»; <https://orcid.org/0000-0002-6953-9771>

Кравцов Вячеслав Юрьевич — профессор, доктор биологических наук, ординарный профессор научно-образовательного центра инфохимии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»; профессор кафедры нанобиотехнологий Санкт-Петербургского национально-исследовательского академического университета имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук; <https://orcid.org/0000-0003-3910-5160>