

УДК 616-092

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

Волкова О.О.<sup>1</sup>, Шитяков С.В.<sup>1</sup>, Кравцов В.Ю.<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>2</sup> 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.<sup>1</sup>, Shityakov S.V.<sup>1</sup>, Kravtsov V.Yu.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ITMO University,

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

<sup>2</sup> 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 ( $\Delta G$ ) 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 ( $\Delta G$ ) доксицилина 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  $\Delta G$  использовалось в качестве меры сродства. Экспериментальное значение  $\Delta G$  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-

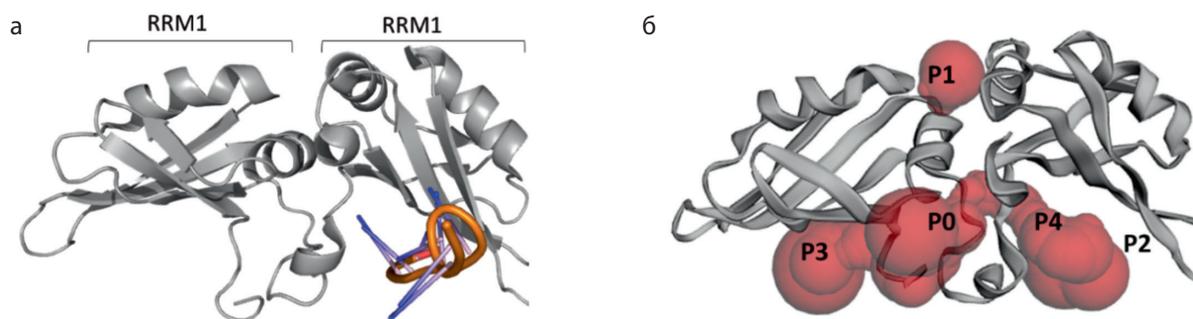


Рис. 1. (а) Структура hnRNP A2B1 в комплексе с РНК (PDB: 5HO4). (б) Сайты связывания hnRNP A2B1, предсказанные с помощью CASTr. Модель белка окрашена в серый цвет, поверхность связывающих карманов соответственно окрашена в красный цвет.

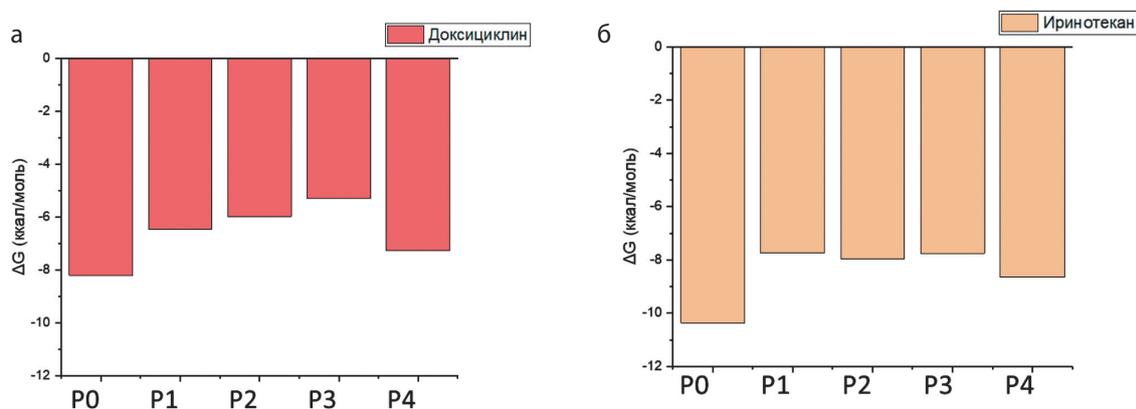


Рис. 2. Диаграмма рассчитанных энергий связывания  $\Delta G$  доксицилина (а) и иринотекана (б) с hnRNP A2B1 в каждом из карманов P0-P4.

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.

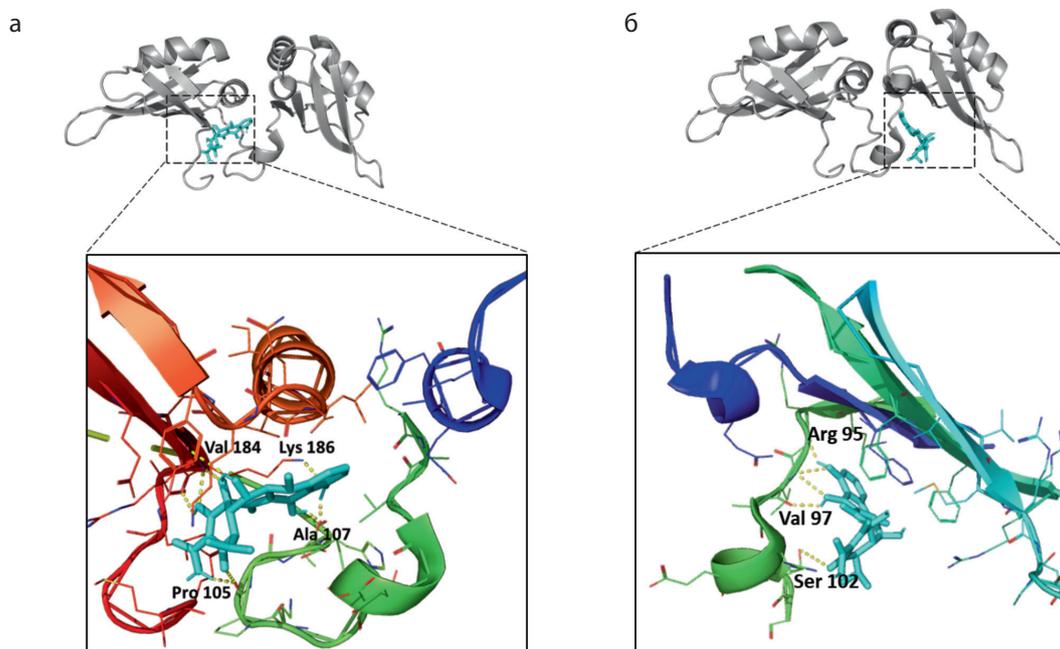
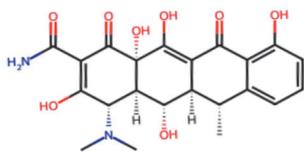
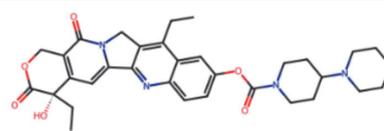


Рис. 3. Прогнозируемые положения доксициклина в карманах P0 (а) и P4 (б), полученные с помощью алгоритма AutoDock. Модели белка и лигандов окрашены в серый и голубой цвета, соответственно.

Таблица 1

Рассчитанные значения энергии связывания hnRNPA2B1 с доксициклином и иринотеканом.

Лиганд	$\Delta G_{P0}$ , ккал/моль	$\Delta G_{P4}$ , ккал/моль
 Доксициклин	-8,20	-7,26
 Иринотекан	-10,36	-8,64

Примечание:  $\Delta G_{P0}$ ,  $\Delta G_{P4}$  – 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>