

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ВЛИЯНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ГЕЛДАНАМИЦИНА НА САЙТ ФОСФОРИЛОВАНИЯ THR90 HSP90****К.А. Щербаков, Д.С. Щербинин, А.В. Веселовский***Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: veselov@ibmh.msk.su

Рак предстательной железы (РПЖ) является гормон-зависимым, в его развитии активно участвует андрогеновый рецептор (AR), выполняющий роль фактора транскрипции. В неактивном состоянии в цитозоле AR находится в комплексе с белком теплового шока HSP90 и рядом других белков. Взаимодействие с агонистом приводит к конформационным изменениям в AR, в результате чего комплекс AR с шаперонами распадается и AR транспортируется в ядро. Недавно было обнаружено, что для диссоциации комплекса шаперона HSP90 и AR необходимо фосфорилирование остатка Thr-90 N-концевого домена HSP90. В данной работе методами молекулярного моделирования исследовано влияние ингибитора HSP90 гелданамицина, взаимодействующего с АТФ-связывающим сайтом, на сайт фосфорилирования Thr90. Было показано, что связывание ингибитора не сильно влияет на размер и подвижность аминокислотных остатков полости около Thr90. Предполагается, что связывание ингибитора с HSP90 не приводит к изменению структуры белка и не может влиять на его фосфорилирование, что отчасти может объяснить невысокую эффективность такого типа препаратов в химиотерапии РПЖ.

Ключевые слова: шаперон HSP90; рак простаты; молекулярная динамика; сеть взаимодействия аминокислотных остатков; RIN

DOI: 10.18097/BMCRM00145**ВВЕДЕНИЕ**

Рак предстательной железы (РПЖ) остаётся одной из самых распространённых причин смерти среди мужчин в развитых странах. По этой причине значительные усилия направлены на выявления механизмов патогенеза заболевания, разработку способов его профилактики и лечения.

РПЖ часто является гормон-зависимым видом рака [1], так как рост и пролиферация злокачественных клеток стимулируются при действии андрогенов. Поэтому основным направлением лечения РПЖ является снижение количества андрогенов в организме. Часто после лечения может наблюдаться рецидив этого заболевания, которое связывают с мутациями, придающими способность раковым клеткам отвечать на низкие концентрации андрогенов. Так, в случае рецидива может наблюдаться повышенная экспрессия нормальных и мутированных форм андрогенного рецептора (AR), способных активироваться в отсутствие андрогенов [2, 3].

В настоящее время используют два основных подхода для лечения РПЖ, основанных на ингибировании синтеза андрогенов, – блокирование цитохрома P450 17A1 (17- α -гидроксилаза, 17,20-лиаза), например, абиратероном [4] и инактивация AR посредством его антагонистов (ципротерон, флутамид, бикалутамид и др.) [5].

В цитоплазме AR находится в комплексе с шапероном HSP90 и рядом других белков в конформации, в которой он может взаимодействовать с агонистом с высокой аффинностью. Связывание агониста с AR приводит к конформационным изменениям в AR, в результате чего

его комплекс с шаперонами распадается, а рецептор транспортируется в ядро.

Недавно было обнаружено, что для диссоциации комплекса шаперона HSP90 и AR недостаточно связывания с агонистом и необходимо дополнительное фосфорилирование остатка Thr-90 HSP90 [6]. Фосфорилирование осуществляется протеинкиназой PKA 1. Было установлено, что HSP90 фосфорилируется по единственному остатку Thr-90 [6]. В трансфицированных мутантным HSP90 T90A клетках LNCaP значительная часть AR оставалась в комплексе с HSP90 в цитоплазме, в то время как в клетках, экспрессировавших дикий тип HSP90, наблюдалась полная диссоциация комплекса AR-HSP90, а рецептор транслоцировался в ядро. Все это свидетельствует о том, что фосфорилирование HSP90 по остатку Thr90 является необходимым условием для диссоциации комплекса HSP90 и AR и последующей транслокации последнего в ядро.

Ингибиторы HSP90, блокирующие АТФ-связывающий карман, рассматриваются в качестве лекарств для лечения ряда опухолевых заболеваний, в том числе и РПЖ [7-9]. Но для этого типа рака они показали низкую эффективность [10]. Кроме того, для ингибиторов HSP90 высок риск побочных эффектов [11]. Поэтому ингибиторы, способные блокировать фосфорилирование HSP90, могут оказаться перспективной альтернативой «классическим» ингибиторам этого белка. При этом остается неясным, способны ли «классические» ингибиторы препятствовать фосфорилированию Thr90. В работе методами молекулярного моделирования была исследована способность ингибитора HSP90 – гелданамицина – влиять на этот процесс.



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы пространственные структуры N-концевого домена HSP90 в свободной форме (PDB ID: 3T0H) и в комплексе с гелданамицином (PDB ID: 1YET), полученные из PDB (www.rcsb.org).

Поиск полостей на поверхности белков проводили с помощью сервера CASTp [12].

Расчеты молекулярной динамики (МД) проводили в пакете GROMACS 2020 (www.gromacs.org) [13]. Атомы белка были параметризованы с использованием силового поля ff14SB, лиганда — силового поля GAFF. Растворитель был задан в явном виде для чего в систему добавили ~15000 молекул воды (модель TIP3P). Для нейтрализации заряда системы были добавлены ионы Na⁺.

Минимизацию обеих систем производили в течение 50000 шагов с использованием метода градиентного спуска. После чего обе системы были уравновешены с применением NVT ансамбля на траектории 5 нс с последующим уравновешиванием с NPT ансамблем на протяжении 10 нс.

Расчеты МД проводили на траектории в 300 нс, с шагом в 2 фс при температуре 300 К и давлении 1 бар. Для поддержания заданных температуры и давления использовали термостат Берендсена и баростат Парринелло-Рахмана. На связи с атомами водорода были наложены ограничения с применением алгоритма LINCS. Расчет электростатических взаимодействий производили с использованием метода Particle Mesh Ewald (PME). Отсечку электростатических взаимодействий осуществляли на расстоянии в 12 Å.

Визуализацию траекторий МД осуществляли при помощи пакетов VMD [14] и PyMol [15]. Анализ траекторий МД осуществляли при помощи внутренних инструментов GROMACS: `gmx rmsf` и `gmx rmsd`.

Для вычисления расстояния между центрами масс amino- и карбоксильных групп боковых цепей остатков Glu178 и Lys185 был использован инструмент Salt Bridges, входящий в состав VMD.

Сеть взаимодействий остатков (RIN, Residue-Interaction Network) была построена при помощи программы RING [16]. Для расчетов были использованы участки траектории МД 100-300 нс. Из каждой траектории было извлечено по 200 структур с интервалом в 1 нс. Все RIN были построены с использованием стандартных значений отсечек для различных типов контактов: солевой мостик – 4.0 Å; S-S связи – 2,5 Å; π - π взаимодействия – 6.5 Å; π -катионные взаимодействия – 5.0 Å; H-связь – 3.5 Å; VDW – 0.5 Å. Все построенные RIN для каждой из исследуемых структур были объединены в общую сеть. В процессе объединения все найденные близкие контакты собирали в один файл, и для каждого были рассчитаны частоты появления. Для дальнейшего анализа использовали только те взаимодействия, которые были обнаружены более чем в 70 RIN. Единая сеть была построена на основе устойчивых контактов, представленных как минимум в 70 из 200 структур. Все необходимые пептидные связи были дополнительно добавлены вручную в виде ребер к графам RIN с весом, равным 200. Визуализацию и дальнейший анализ RIN выполняли при помощи программы Cytoscape и подключаемых модулей DyNet и Presca [17, 18] (<https://apps.cytoscape.org/apps/dynet>).

Объем полости на белке был оценен с помощью программы fpocket [19].

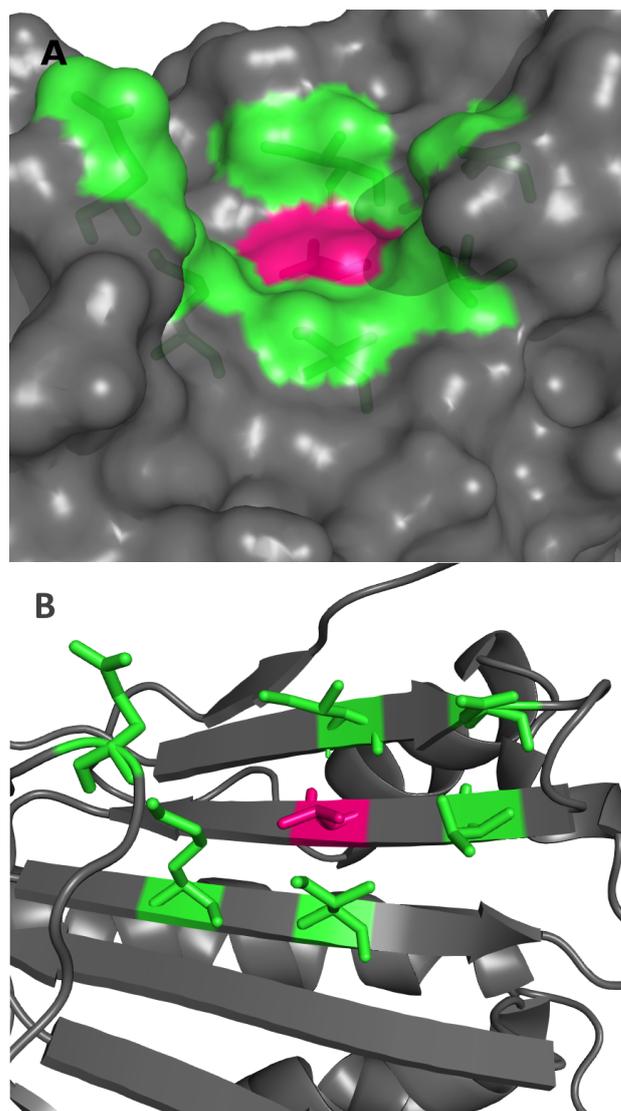


Рисунок 1. А - полость в области фосфорилируемого остатка Thr90 в белке HSP90; В - остатки, образующие указанную полость.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ структуры HSP90 показал, что фосфорилируемый остаток Thr-90 располагается в полости, сформированная остатками Ile81, Asn83, Thr88, Thr90, Glu178, Lys185, Ile187 (рис. 1А). Данный карман расположен преимущественно на внешнем слое β -листа за исключением остатка Glu-178, который расположен на петле, соединяющей два антипараллельных бета-тяжа (рис. 1Б).

Для анализа влияния связывания ингибиторов HSP90 в АТФ-связывающем кармане были проведены расчеты молекулярной динамики свободного N-концевого домена HSP90 (PDB ID: 3T0H) и в комплексе с ингибитором гелданамицином (PDB ID: 1YET), находящимся в месте связывания АТФ.

В процессе молекулярной динамики обе структуры N-концевого домена HSP90 оставались стабильными. Величины RMSD приведены на рисунке 2. Для комплекса с гелданамицином наблюдалось возрастание значения RMSD до ~3Å в первые 90 нс динамики, после чего значение RMSD выходило на плато. RMSD для свободной формы достигало значения в ~1,4 Å и выходило на плато в течение

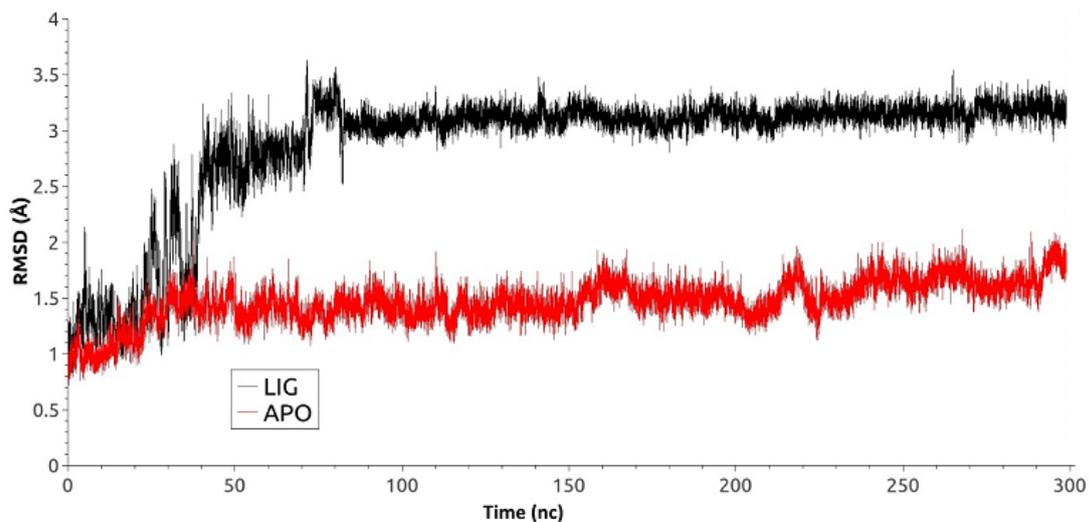


Рисунок 2. Значения RMSD для апо-(красный) и лиганд-связанной (чёрный) форм HSP90.

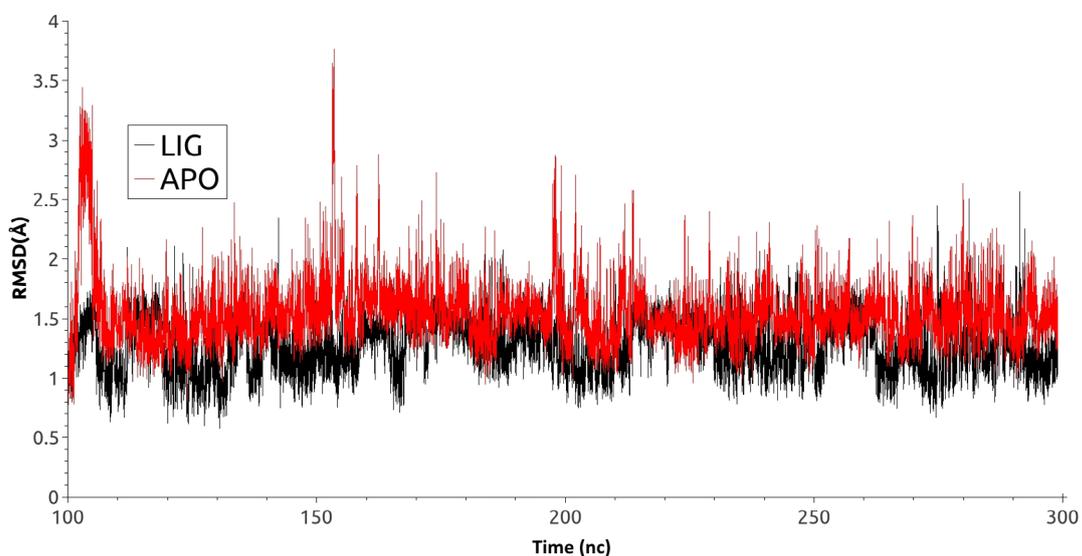


Рисунок 3. Значения RMSD для остатков в области фосфорилируемого остатка Thr90 для свободной (красный) и лиганд-связанных (чёрный) форм белка HSP90.

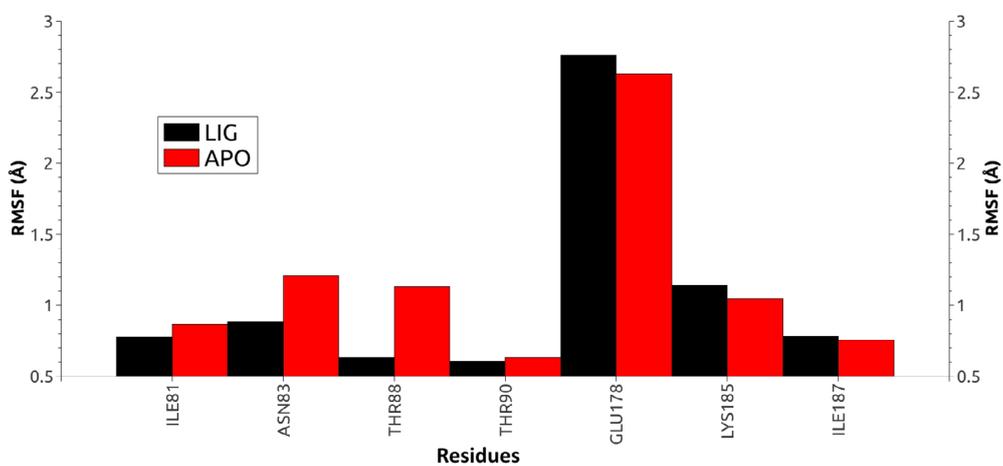


Рисунок 4. Значения RMSF для остатков в области фосфорилируемого остатка Thr90 для свободной (красный) и лиганд-связанных (чёрный) форм белка HSP90.

30 нс. Однако график, описывающий участок траектории после выхода системы на плато, вел себя менее стабильно и показывал большие флуктуации значения RMSD (0.15 Å) по сравнению с лиганд-связанной формы белка (0.1 Å). Более низкие флуктуации значений RMSD у лиганд-связанной формы в сравнении с апо-формой указывают на то, что связывание лиганда способствует стабилизации общей структуры домена.

Далее была рассмотрена конформационная подвижность сайта в районе фосфорилируемого остатка. Для анализа были выбраны наиболее стабильные участки траектории молекулярной динамики в промежутке от 100 нс до 300 нс. Анализ изменения величин RMSD (рис. 3) показал, что в обоих формах белка рассматриваемый сайт окажется стабилен. Однако у свободной формы HSP90 карман является более подвижным, что отражается в более высоком среднем значении RMSD (~1.54 Å против 1.27 Å) и характеризуется наличием большего числа пиков на графике по сравнению с лиганд-связанной формой. Для выявления вклада отдельных остатков в общую подвижность кармана HSP90 были рассчитаны их значения RMSF (рис. 4). Остатки Asn83 и Thr88 в свободной форме оказались заметно более подвижными в сравнении с лиганд-связанной формой. Высокую подвижность для обеих форм в ходе динамики показал остаток Glu178, (RMSF 2.8-2.9Å). Для этого остатка наблюдали две основные конформации. В первой конформации Glu178 образует солевой мостик с другим остатком кармана Lys185 (рис. 5A). Во второй конформации боковая цепь Glu178 развёрнута на 180 градусов и обращена в сторону растворителя (рис. 5B). Для выявления стабильности солевого мостика между Glu178 и Lys185 были рассчитаны расстояния между центрами масс аминокислотных групп указанных остатков на участке траектории в 100-300 нс для обеих форм (рис. 6). Для первой конформации расстояние между центрами масс указанных функциональных групп варьировало в пределах 2.5-3.5 Å, для второй — в пределах 6-10 Å. Видно, что в отличие от свободного фермента в лиганд-связанной форме солевой мостик сохраняется в течение более продолжительных периодов (расстояние между центрами масс ~3Å), тогда как

в свободной форме долгоживущая связь не формируется.

Чтобы выяснить, как связывание гелданамицина влияет на обнаруженные различия в конформационной подвижности исследуемого кармана HSP90 между свободной и лиганд-связанной формами, была построена сеть взаимодействий остатков (RIN) для остатков, составляющих исследуемый карман, с остатками Asn 51, Ser52, Asp54 Ala55, Lys58, Asp93, Asp95, Ile96, Gly97, Met98, Asp102, Asp106, Leu107, Lys112, Phe138, Val150, Thr184, непосредственно взаимодействующими с гелданамицином [20] (рис. 7). Для этого были найдены кратчайшие пути в RIN между указанными выше группами остатков. Для расчетов были использованы участки траектории МД 100-300 нс. Анализ сети показал, что взаимодействие между сайтами отличается для свободной и связанной форм белка. Так, в апо-форме в

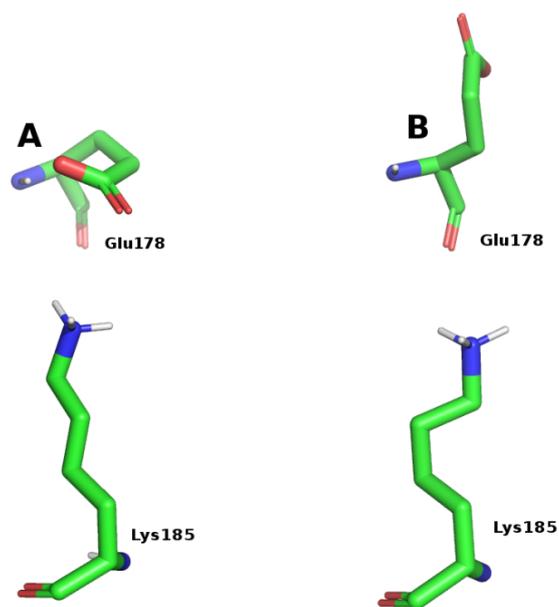


Рисунок 5. Конформации Glu178 и Lys185 при образовании солевого мостика (A) и при обращении Glu178 в сторону растворителя (B).

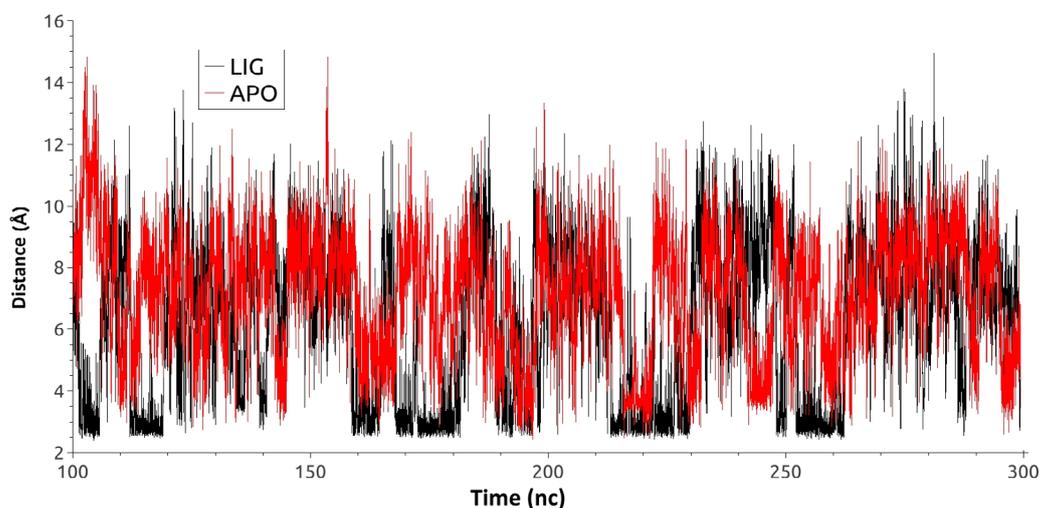


Рисунок 6. Расстояние между центрами масс аминокислотной группы Lys185 и карбоксильной группы Glu178 для свободной (красный) и лиганд-связанной (чёрный) форм HSP90.

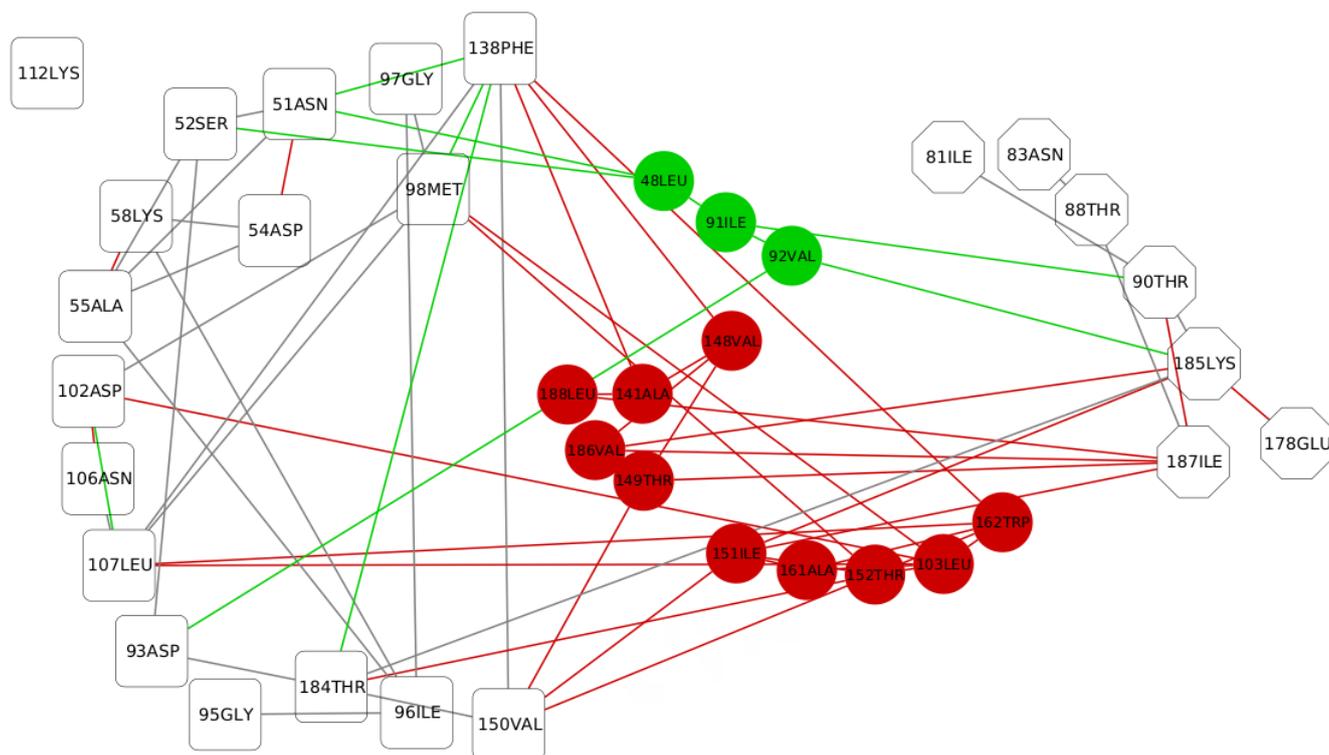


Рисунок 7. Карта взаимодействий между аминокислотными остатками (RIN). Квадратами обозначены остатки, образующие сайт связывания гелданамицина, шестиугольниками — остатки, образующие исследуемую полость, кругами — остатки через которые осуществляется взаимодействие между указанными выше сайтами. Зеленым выделены остатки и взаимодействия, уникальные для апо-формы, красным – для лиганд-связанной формы.

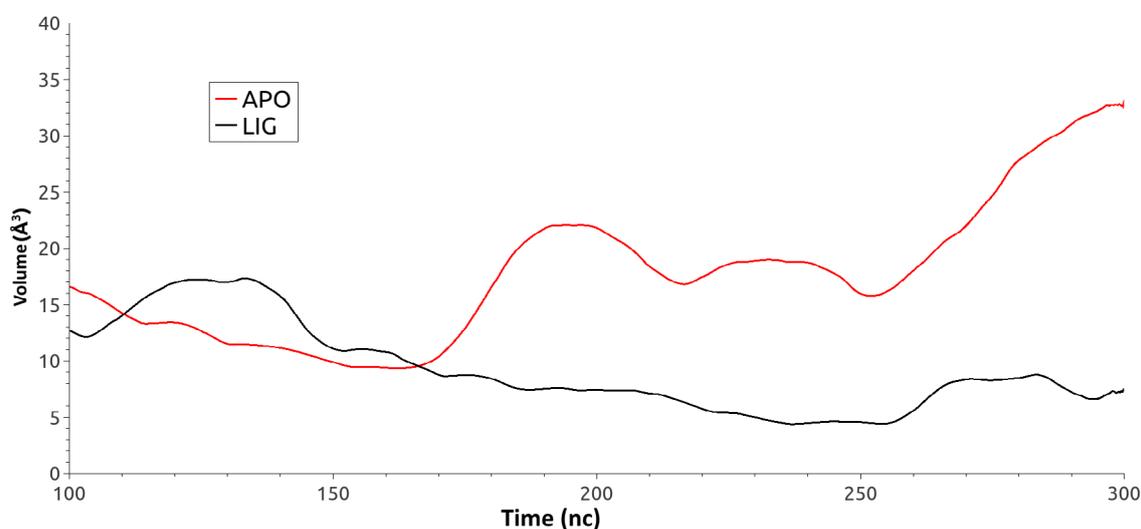


Рисунок 8. Изменение объема полости около фосфорилируемого остатка Thr90 для свободной (красный) и лиганд-связанной (черный) формы белка HSP90.

передачу взаимодействия между сайтом связывания лиганда и окрестностью Thr90 вовлечено 3 остатка (Leu48, Ile91, Val92), не входящих в эти сайты, в то время как для лиганд-связанной формы в передаче взаимодействия участвует уже 10 таких остатков (Val148, Ala141, Leu188, Val186, Thr149, Ile151, Ala161, Thr152, Leu103, Trp162). Таким образом, различаются не только количество остатков, участвующих во взаимодействии между сайтами, но и маршруты внутри сети RIN, по которым это взаимодействие осуществляется.

Дополнительно был оценен размер полости около фосфорилируемого остатка в процессе молекулярной динамики для свободного и связанного с ингибитором HSP90 (рис. 8). Видно, что изменение объема полости было разнонаправленным. Для свободного белка наблюдалось незначительное увеличение полости, тогда как для связанного с ингибитором – ее уменьшение. Так объем полости в свободном белке увеличился с $\sim 16.5 \text{ \AA}^3$ на 100 нс до $\sim 32 \text{ \AA}^3$ к 300 нс, т. е. возрос на 94%. В лиганд-связанной

форме объём полости на том же временном промежутке уменьшился на 28% – с $\sim 12.8 \text{ \AA}^3$ до $\sim 10 \text{ \AA}^3$. Но в обоих случаях они были незначительными. Никакой корреляции между изменением объема и образованием ионной связи остатками Lys185 и Glu178 отмечено не было.

Таким образом, можно заключить, что связывание ингибитора в АТФ-связывающем кармане не влияет на структуру полости около фосфорилируемого Thr-90 HSP90, поэтому связывание лиганда не должно влиять на процесс фосфорилирования. «Классические» ингибиторы HSP90 не могут быть использованы для предотвращения фосфорилирования Thr90. Это требует разработки специальных ингибиторов, направленных на связывание с карманом, расположенным в непосредственной близости от Thr90.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 19-34-90057.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Culig, Z., Santer, F.R.* (2014) Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, **33**(2-3), 413-427. DOI: 10.1007/s10555-013-9474-0
2. *Gelman, I.H.* (2014) Androgen receptor activation in castration-recurrent prostate cancer: the role of Src-family and Ack1 tyrosine kinases. *Int. J. Biol. Sci.*, **10**(6), 620-626. DOI: 10.7150/ijbs.8264
3. *Culig, Z., Klocker, H., Bartsch, G., Hobisch, A.* (2001) Androgen receptor mutations in carcinoma of the prostate: significance for endocrine therapy. *Am. J. Pharmacogenomics*, **1**(4), 241-249. DOI: 10.2165/00129785-200101040-00001

4. *Thakur, A., Roy, A., Ghosh, A., Chhabra, M., Banerjee, S.* (2018) Abiraterone acetate in the treatment of prostate cancer. *Biomed. Pharmacother.*, **101**, 211-218. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.067
5. *Heinlein, C.A., Chang, C.* (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr. Rev.*, **25**(2), 276-308. DOI: 10.1210/er.2002-0032
6. *Dagar, M., Singh, J.P., Dagar, G., Tyagi, R.K., Bagchi, G.* (2019) Phosphorylation of HSP90 by protein kinase A is essential for the nuclear translocation of androgen receptor. *J. Biol. Chem.*, **294**(22), 8699-8710. DOI: 10.1074/jbc.RA119.007420
7. *Hoter, A., El-Sabban, M.E., Naim, H.Y.* (2018) The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(9), 2560. DOI: 10.3390/ijms19092560
8. *Solit, D.B., Scher, H.I., Rosen, N.* (2003) Hsp90 as a therapeutic target in prostate cancer. *Semin. Oncol.*, **30**, 709-716. DOI: 10.1016/s0093-7754(03)00346-4
9. *Bohush, A., Bieganowski, P., Filipek, A.* (2019) Hsp90 and Its Co-Chaperones in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(20), 4976. DOI: 10.3390/ijms20204976
10. *Wang, Y., McAlpine, S.R.* Heat-shock protein 90 inhibitors: will they ever succeed as chemotherapeutics? (2015) *Future Med. Chem.*, **7**(2), 87-90. DOI: 10.4155/fmc.14.154
11. *Altieri, D.C.* (2010) Mitochondrial Hsp90 chaperones as novel molecular targets in prostate cancer. *Future Oncol.*, **6**(4), 487-489. DOI: 10.2217/fo.10.26
12. *Wei, T., Chang, C., Xue, L., Jieling, Zh., Jie, L.* (2018) CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research*, **46**, W363-W367. DOI: 10.1093/nar/gky473
13. Abraham, M.J., van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B. and the GROMACS development team, (2020) GROMACS User Manual Release 2020
14. *Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K.* (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, **14**(1), 33-38. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
15. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2.3pre, Schrödinger, LLC. (pymol.org/2/)
16. *Piovesan, D., Minervini, G., Tosatto, S.C.E.* (2016) The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks. *Nucleic Acids Research*, **44**(W1), W367-74. DOI: 10.1093/nar/gkw315
17. *Goenawan, I.H., Kenneth B., Lynn D.J.* (2016) DyNet: visualization and analysis of dynamic molecular interaction networks. *Bioinformatics*, **32**(17):2713-5. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw187
18. *Scardoni, G., Tosadori, G., Pratap, S., Spoto, F., Laudanna, C.* (2015) Finding the shortest path with PesCa: a tool for network reconstruction. *F1000Res.*, **4**, 484. DOI: 10.12688/F1000RESEARCH.6769.2
19. *Le Guilloux, V., Schmidke, P., Tuffery, P.* (2009) Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics*, **10**, 168. DOI: 10.1186/1471-2105-10-168
20. *Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., Pavletich, N.P.* (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, **89**(2), 239-250. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80203-2

Поступила: 12.04.2021
 После доработки: 27.04.2021
 Принята к публикации: 30.04.2021

EFFECT OF GELDANAMYCIN BINDING ON THE THR90 PHOSPHORYLATION SITE OF HSP90*K.A. Shcherbakov, D.S. Shcherbinin, A.V. Veselovsky**

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail:veselov@ibmh.msk.su

Prostate cancer is hormone-dependent and the androgen receptor (AR) is involved in its development. AR is a transcription factor that is activated by ligand binding, result in its translocation into the nucleus, where it initiates gene transcription. In an inactive state in cytoplasm AR exists as a complex with heat shock protein 90 (HSP90) and some other proteins. When the agonist binds, a conformational change in AR occurs, resulting in HSP90 and other chaperones dissociating. Recently it has been shown that for the dissociation of the HSP90-AR complex and the translocation of the latter into the nucleus, phosphorylation of the Thr-90 residue of the N-terminal domain of HSP90 is necessary. In this work, the effect of the HSP90 inhibitor, geldanamycin, interacting with the ATP-binding site, on the Thr90 phosphorylation site was investigated by molecular modeling methods. It has been shown that inhibitor binding slightly affects the size and mobility of cavity around Thr90. It is suggested that inhibitor binding to HSP90 does not result in changing the protein structure and does not influence on protein phosphorylation, and partially explains low effectiveness of such type of drugs in the therapy of prostate cancer.

Key words: chaperone HSP90; prostate cancer; molecular dynamics; amino acid residue interaction network; RIN

FUNDING

This work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (project number 19-34-90057).

Received: 12.04.2021, revised: 27.04.2021, accepted: 30.04.2021