

ПОИСК ПРОИЗВОДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНФОСФАТАЗ, ПОТЕНЦИАЛЬНО СВЯЗАННЫХ С РЕГУЛЯЦИЕЙ ЦИТОСКЕЛЕТА РАСТЕНИЙ

В растениях роль протеинфосфатаз многообразна, поскольку они как важные игроки обратимого фосфорилирования белков влияют на активность ионных каналов, углеродный и азотный обмены, дифференциацию и протекание фотосинтеза, взаимодействуют и регулируют активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны [1]. Известно, что протеинфосфатазы PP6, PP2A и PP5 причастны к модуляции фитохром-опосредованных сигналов, контролирующих начало цветения в *Arabidopsis thaliana* [2, 3]. В связи с их функциональными эффектами представляется целесообразным иметь определенный набор молекулярных инструментов тонкого контроля активности отдельных протеинфосфатаз с целью дальнейшего практического использования. Такими молекулярными инструментами могут выступать ингибиторы протеинфосфатаз, характеризующиеся высокой степенью селективности [4]. На данное время известно около десятка достаточно специфических ингибиторов животных серин/треониновых протеинфосфатаз, которые также оказывают эффект и на растительные объекты: торможение развития, подавление роста корней, подавление фотосинтеза, некрозы, обусловленные окислительным стрессом [5]. Поэтому при применении ингибиторов протеинфосфатаз животного происхождения на растениях резонным является вопрос идентичности мишеней и механизмов действия данных веществ у животных и растений. В ряде случаев применение уже известных ингибиторов протеинфосфатаз животного происхождения на растительных гомологах было недостаточно аргументированным по причине недостатка информации о механизмах их взаимодействия. В полной мере это относится и к ингибиторам протеинфосфатаз, способных дефосфорилировать белки цитоскелета по остаткам серина и треонина: окадаиновой кислоте, микроцистину, каликулину, таутомицину, нодуларину, мотупорину, кантаридину, кантаридиновой кислоте и эндоталу [6–9]. Так, среди них есть более сильные ингибиторы (окадаиновая к-та и каликулин) и более слабые, имеющие

схожие сайты связывания с PP1 и PP2a, [10]) и совершенно различные, как в случае с протеинфосфатазами типов 4 и 6 [11].

Ранее путем хемогеномного профилирования нами было показано, что окадаиновая кислота, микроцистин, каликулин и таутомицин, будучи селективными ингибиторами протеинфосфатаз типов 1 и А, также способны подавлять активность серин/треонин-специфичные протеинфосфатазы растительных типов 4, 5 и 6. Так, будучи консервативными ингибиторами протеинфосфатазы типа 1, в растительных клетках нодуларин и мотупорин потенциально способны действовать на активность протеинфосфатаз 2А и протеинфосфатаз типа 4, 5 и 6. Исключение составила группа кантаридиновых ингибиторов, которая может действовать почти на все серин/треонин-специфичные протеинфосфатазы, кроме типа 7 [12]. Именно поэтому, анализируя ингибиторы данной группы протеинфосфатаз животного происхождения нашей целью была разработка алгоритма, с помощью которого можно найти, модифицировать или создать вещества, отличающиеся повышенной селективностью в отношении определенных типов протеинфосфатаз растительного происхождения.

Материалы и методы

Промодели растительных гомологов были построены с использованием сервера I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Оптимизацию геометрии реконструированных промоделей осуществляли с применением силового поля Amber3 [13] и с помощью метода связанного градиента [14, 15]. Оценку качества моделей проводили на основании данных карт Рамачандрана, графиков DOPE и ANOLEA [15], с помощью программного пакета Swiss-PdbViewer v.4.0.1 [16]. Анализ релаксированных и биологически активных конформаций лигандов, определенных на основе анализа комплексов из PDB (<http://rcsb.org>), проводили с использованием программ LigandScout (<http://www.inteligand.com/>) и DS Visualizer 2.5 (Accelrys Software Inc.

– <http://accelrys.com/>). Предварительное обогащение выборки лигандов баз данных низкомолекулярных веществ - PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) и ZINC (<http://zinc.docking.org/>) осуществляли на основании правил Липинского [17]. Анализ вероятных сайтов связывания потенциальных ингибиторов с исследуемыми протеинфосфатазами выполняли с помощью метода гибкого молекулярного докинга в программе CCDC GOLD Suite 5.1. При этом задавались параметры соответствующего белка-мишени, лиганда и условия докинга (атом центра и радиус области для докинга). Оценку результатов докинга осуществляли на основании штатных функций программ GoldScore, ChemScore/ASP [18]. Проверку статуса и свойств лигандов выполняли путем анализа баз данных ZINC (<http://zinc.docking.org/>), eMolecules (<http://www.emolecules.com/>) и PubChem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>).

Результаты и обсуждение

Ранее нами был проведен анализ и реконструкция фосфатомов растений (*Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrella patens*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*). Основываясь на гомологии последовательностей, пространственной структуры и субстратной специфичностью, протеинфосфатазы были разделены на три основные группы, объединяющие классические серин/треонин-специфичные протеинфосфатазы, суперсемейство тирозин-специфичных протеинфосфатаз, и наименее изученную группу протеинфосфатаз, представленную двумя семействами аспаргат-специфичных протеинфосфатаз [19]. Полученные данные позволили судить о полноте фосфатомов, а также предположить существование значительных филогенетических отличий между фосфатомами мха *P. patens* и двудольного растения *A. thaliana* с одной стороны и представителями однодольных с другой стороны (*T. aestivum*, *O. sativa*, *Z. mays*) [19].

В дальнейшем нами было выполнено профильное моделирование представителей трех типов серин/треонин-специфичных протеинфосфатаз из *A. thaliana*, потенциально дефосфорилирующих альфа-, бета- и гамма-тубулины (UniprotKB: PP1_P30366, PP2A_Q07099, PP4/PPX_P48529). Моделирование было выполнено с помощью сервера I-TASSER при стандартных настройках и исключении матриц с низким разрешением. Для данной группы были обнаружены очень высокие показатели сходства. Так, иден-

тичность составляла 80–82 %, сходство 90–93 %, а процент генов при сравнении каталитических доменов растительных гомологов и протеинфосфатаз человека не превышал 0,4 %. Неструктурированные N- и C-концевые участки отобранных моделей были удалены вплоть до границ каталитических доменов. Это было обосновано отсутствием для вышеупомянутых фрагментов соответствующих экспериментально доказанных шаблонных структур. Верификация моделей основывалась на трех составляющих: (1) карта Рамачандрана, что является конформационной картой двугранных углов между аминокислотными остатками, (2) графике DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) и (3) ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment), отражающих значения свободной энергии для каждой отдельной аминокислоты. В результате верификации из 15 моделей для дальнейшего молекулярного докинга было отобрано по одной модели для каждого типа протеинфосфатаз.

Анализ шаблонных PDB-структур позволил отобрать наиболее специфичный ингибитор протеинфосфатаз типа 1 и 2A – окадаиновую кислоту (CID 446512; 9,10-Deerithio-9,10-didehydroacanthifolicin, CAS №78111-17-8 и 78111-14-5). С использованием программы LigandScout 3.02 для данного ингибитора были установлены области донорно-акцепторных взаимодействий, особенностей топологии и фармакофорные свойства. Используя гетероциклическое ядро окадаиновой кислоты в качестве запроса, нами был выполнен поиск близких производных депонированных в базах данных PubChem и ZINC. Последующая работа с полученной выборкой производных требовала значительного сокращения и обработки. Как известно, соединения могут быть отобранными на основе дескрипторов их свойств. Наиболее известный набор свойств описывается правилом Липинского [17, 20]. Эти правила утверждают, что вещество – лекарственный препарат для перорального применения – не должно нарушать более одного из следующих критериев: содержать не более 5 доноров водородных связей (атомы кислорода или азота с одним или несколькими водородом); содержать более 10 акцепторов водородных связей (атомы кислорода или азота); иметь молекулярную массу не более 500; иметь коэффициент распределения октанол-вода (logP) не более 5. В результате хемоинформационного анализа и препроцессинга первичной выборки, основываясь на правилах Липинского, из 144 найденных веществ было

отобрано 26 (PubChem: 65452, 72370, 197168, 44288019, 44451975, 6441186, 6442282, 9852385, 9917197, 10259037, 133001, 10437923, 10440900, 10581662, 9810184, 10887444, 10052192, 3053530, 6426775 10930148 10930902, 11039953, 11320304, 11331514, 21775564, 23228641).

Подготовка лигандов к молекулярному докингу была выполнена с помощью программного модуля CCDC Hermes. Исследуемые лиганды проверялись на наличие всех атомов, правильность связей и сохранялись в полном формате *.mol2 для дальнейшего докинга. Анализ сайтов связывания потенциальных ингибиторов с исследуемыми протеинфосфатаз типов 1, 2а и 4 из *A. thaliana* был выполнен с помощью метода гибкого молекулярного докинга в программном пакете CCDC GOLD (при стандартных параметрах, за исключением некоторых условий – атом центра и радиус области для докинга). Для фосфатазы типа 1 таким атомом был NE2 (HIS125) при радиусе сайта 15 E, а для PP2a центральным атомом был – ND2 (ASN117) при радиусе сайта в 20 E, а для фосфатазы типа 4 – атом ND1 (ARG129) при сайте радиусом 15 E. В процессе докинга задава-

лись условия полной подвижности 26-ти лигандов, когда все аминокислотные остатки белка оставались ригидными. В каждом случае генетический алгоритм запускался в 100-кратном повторении, с сохранением 50-ти лучших фреймов. В качестве оценочных функций указывались параметры GoldScore, ChemScore/ASP. Значение этих функций свидетельствует о сродстве лиганда к данному сайту (большее значение – лучше) и о выгодности конформационного состояния самого лиганда (меньшее значение – лучше) соответственно. Высокий процент идентичности аминокислотных последовательностей и сходство фолдинга протеинфосфатаз различного эволюционного происхождения позволяют сделать вывод об идентичности топологии сайтов связывания оксадиновой кислоты с молекулами протеинфосфатаз 1 и 2А и ее аффинности, что подтверждалось данными экспериментов [10]. Согласно вышеуказанному алгоритму, нами было отобрано пять веществ (PubChem: CID10437923, CID44288019, CID3053530, CID10930902, CID44451975) с ранее неизвестными свойствами (рис. 1). Данные соединения позиционируются нами как новые

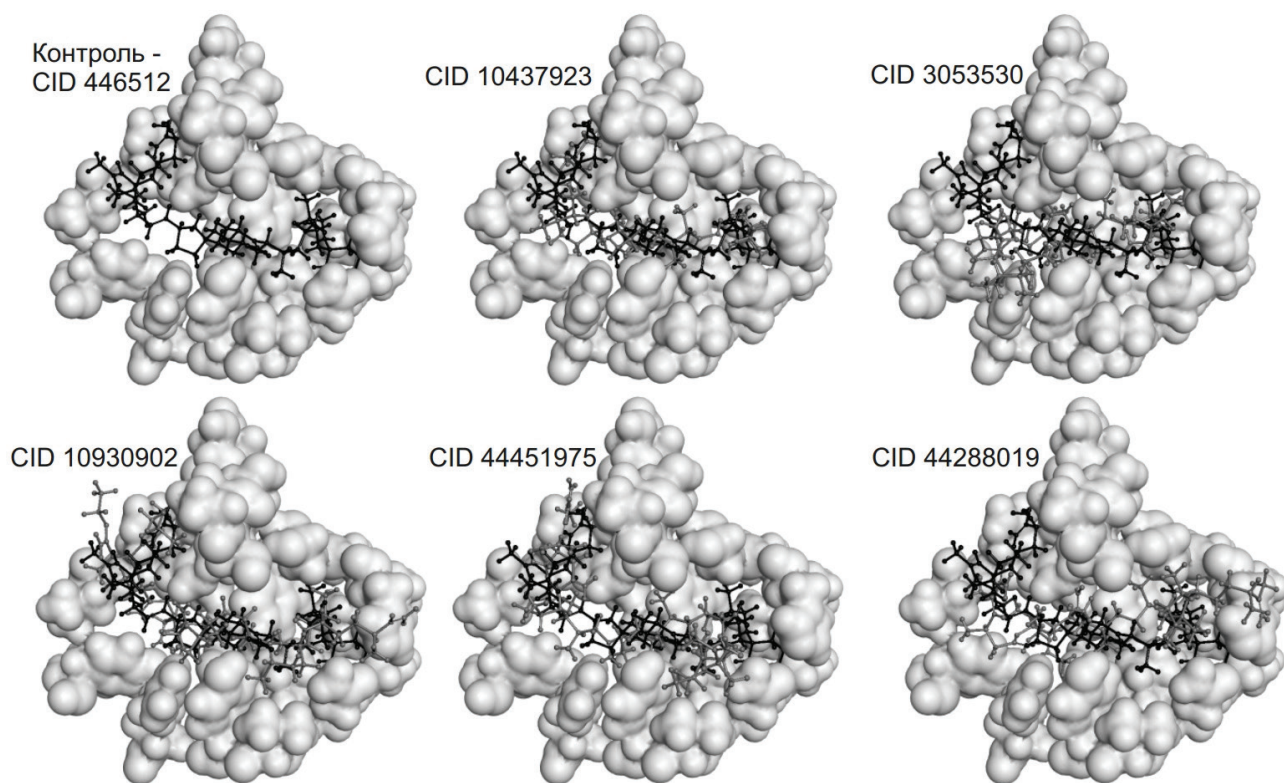


Рис. 1. Пример результатов молекулярного докинга протеинфосфатаз с исследуемыми гомологами оксадиновой кислоты (контроль, CID 446512): фрагмент пространственной структуры комплекса каталитического субъединицы протеинфосфатазы PP2a из *A.thaliana* (UniprotKB:Q07099) [10] с лигандами

перспективные ингибиторы трех типов растительных протеинфосфатаз и отобраны для дальнейшего лабораторного исследования.

Выводы

В результате данной работы была выполнена ревизия протеинфосфатаз, потенциально влияющих на динамику цитоскелета растений. Установлены особенности их взаимодействия со специфическими ингибиторами. Созданы локальные базы данных оптимизированных моделей целевых протеинфосфатаз, а также библиотеки лигандов, отобранных на основании сходства ге-

тероциклического ядра. Разработаны алгоритмы хемоинформационного поиска и молекулярного докинга для протеинфосфатаз с ингибиторами разной степени специфичности. Отобрано 5 веществ-лидеров, которые рассматриваются нами как перспективные ингибиторы протеинфосфатаз растений.

Частично исследование было выполнено в рамках проекта УНТЦ#5215: «Поиск эффективных ингибиторов протеинфосфатаз с помощью нанохимических подходов и оценка их биологической эффективности *in silico*».

ЛИТЕРАТУРА

- Gardiner J., Overall R., Marc J. Plant microtubule cytoskeleton complexity: microtubule arrays as fractals // *J. Exp. Bot.* – 2012. – 63, N 2. – P. 635–642.
- Kim D., Kang J., Yang S., Chung K.S., Song P.S., Park C.M. A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 2002. – 14, N 12. – P. 3043–3056.
- Ryu J., Kim J., Kunkel T., Kim B.C., Cho D.S., Hong S.H., Kim S.H., Fernández A.P., Kim Y., Alonso J.M., Ecker J.R., Nagy F., Lim P.O., Song P.S., Schdfer E., Nam H.G. Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer // *Cell.* – 2005. – 120, N 3. – P. 395–406.
- Cohen P. Protein phosphatase 1-targeted in many directions // *J. Cell. Sci.* – 2002. – 115, N 2. – P. 241–256.
- Pastuglia M., Azimzadeh J., Camilleri C., Bouchez D. Forward and reverse genetics in *Arabidopsis*: isolation of cytoskeletal mutants // *Cell Biol. Int.* – 2003. – 27. – P. 249–250.
- Tanti J., Grïmeaux T., Van Obberghen E., Le Marchand-Brustel Y. Effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases-1 and -2A, on glucose transport and metabolism in skeletal muscle // *J. Biol. Chem.* – 1991. – 266, N 4. – P. 2099–2103.
- Xing Y., Xu Y., Chen Y., Jeffrey P.D., Chao Y., Lin Z., Li Z., Strack S., Stock J.B., Shi Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins // *Cell.* – 2006. – 127. – P. 341–352.
- Vale C., Botana L. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins // *FEBS J.* – 2008. – 275. – P. 6060–6066.
- Fagerholm A., Habrant D., Koskinen A. Calyculins and related marine natural products as serine-threonine protein phosphatase PP1 and PP2A inhibitors and total syntheses of calyculin A, B, and C // *Mar. Drugs.* – 2010. – 8. – P. 122–172.
- Самофалова Д.А., Карпов П.А., Ныпорко О.Ю., Блюм Я.Б. Реконструкция пространственной структуры комплексов растительных протеинфосфатаз типа 1 и 2А с окадаиновой кислотой // *Цитология и генетика.* – 2011. – 45, № 3. – С. 26–34.
- Samofalova D.A., Karpov P.A. Reconstruction of spatial structure of plant protein phosphatase type-1 and -2A in complex with microcystin-LR // X international interdisciplinary scientific conference “Shevchenkivska vesna 2012: life sciences”. – Kiev, 2012. – P. 270.
- Самофалова Д., Карпов П., Блюм Я. Пошук рослинних молекулярних мішеней селективних інгібіторів серинтреонін специфічних протеїнфосфатаз // *Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна.* – 2014. – 68. – С. 392–404.
- Ponderand J., Case D. Force fields for protein simulations // *Adv. Prot. Chem.* – 2003. – 66.–P. 27–85.
- Hultje H.-D., Sippl W., Rognan D., Folkers G. *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications.* 3rd Ed. – John Wiley & Sons – Hoboken NJ, 2008. – 320 p.
- Ramachandran K.I., Deepa G., Namboori K. *Computational Chemistry and Molecular Modeling: Principles and Applic.* – Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. – 397 p.
- Guex N., Peitsch M. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis.* – 1997. – 18. – P. 2714–2723.
- Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – 46, N 1–3. – P. 3–26.
- Cole J., Nissink J., Taylor R. Protein ligand docking and virtual screening with GOLD // *Virtual Screening in Drug Discovery.* – 2005.
- Самофалова Д.А., Карпов П.А., Блюм Я.Б. Сравнительный биоинформационный анализ фосфатомов человека и высших растений // *Цитология и генетика.* – 2015. – 49, № 4. – С. 3–10.
- Leeson P. Chemical beauty contest // *Nature.* – 2012. – 481. – P. 455–456.

SAMOFALOVA D.A., KARPOV P.A., BLUME YA.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Academy of Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: samofalova.dariya@gmail.com*

SEARCH FOR NEW PROTEIN PHOSPHATASE INHIBITORS – POTENTIAL REGULATORS OF THE PLANT CYTOSKELETON

Aims. Okadaic acid (OA) strongly inhibits protein serine/threonine phosphatases PP1 and PP2A/2B. In comparison with the other inhibitors the inhibitory effect of OA is strongest for PP2A, followed by PP1, and then PP2B. This toxin is now used as powerful research tool of an increasingly wide variety of cellular events regulated by reversible protein phosphorylation. Because of the lack of highly PP1 and PP2A/2B selective inhibitors, design and search of new biologically active OA derivatives is extremely important. **Methods.** Modeling of PP1 and PP2A spatial structures were performed using SWISS-MODEL server. The ligands for molecular docking were prepared using CCDC Hermes molecular editor. Flexible docking of OA derivatives was performed using CCDC GOLD Suite 5.1. Binding site for PP1 was specified in 15 Å radius about -NE2 (HIS125), PP2A in 20 Å radius about -ND2 (ASN117), and for PP4 in 15 Å radius about -ND1 (ARG129). For docking evaluations, CCDC GOLD scoring functions (ChemScore, GoldScore and ASP) were used. Finally, docking results were evaluated by molecular dynamics simulations in GROMACS. **Results.** Using template based modeling and human structures of PP1 (PDB: 1U32) and PP2A (PDB: 2IE4) in complex with okadaic acid 3D-models of plant homologues from *Arabidopsis thaliana*, *Emericella nidulans* and *Salmonella typhimurium* were build. A high level of sequence and structure identity in plant and animal phosphatases allow us to conclude similarity of OA binding sites in PP1, PP2A and PP4. Based on chemoinformatic analysis using PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) and ZINC (<http://zinc.docking.org/>) databases, 26 OA-derivatives were selected. Complexes with selected ligand were predicted by results of flexible docking and evaluated by docking scoring functions and MD results. **Conclusions.** As a result, five compounds not previously described as PP1, PP2A and PP4 inhibitors, were selected.

Keywords: protein phosphatases, okadaic acid, derivatives, chemoinformatics.