

НОВОЖИЛОВ Д. О.^{1✉}, КАРПОВ П. А.¹, САМОФАЛОВА Д. О.¹, ПОПТАК М. А.², БЛЮМ Я. Б.¹

¹ Інститут харчової біології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, Осиповського, 2А, e-mail: novozhylov_do@nas.gov.ua

² ННЦ «Інститут біології та медицини»,

Україна, 03022, м. Київ-022, проспект Академіка Глушкова, 2

✉ novozhylov_do@nas.gov.ua

ІНГІБУЮЧИЙ ВПЛИВ KN-93 І KN-62 ЯК РЕЗУЛЬТАТ CaM-СПРЯМОВАНОГО БЛОКУВАННЯ АКТИВАЦІЇ ПРОТЕЇНКІНАЗИ CaMK2 ТВАРИН І ПРОТЕЇНКІНА З СДРК РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Мета. Визначити здатність з молекулярного погляду інгібіторів KN-93 та KN-62 порушувати функціонування рослинних гомологів CaMK2 і бути залученими як інструменти експериментального дослідження Ca²⁺-залежного фосфорилування у рослинних об'єктах. **Методи.** Відібрана референсна структура кальмодуліну 1 людини (*Homo sapiens*) та реконструйована просторова структура кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 з *Arabidopsis thaliana*. Проведений молекулярний докінг кальмодулін-спрямованих інгібіторів CaMK2 KN-93 та KN-62 до CALM1 з *H. sapiens* та кальцій-зв'язуючого домену СРК1 з *A. thaliana* з урахуванням повної рухливості ліганду за умови статичності амінокислотних залишків за допомогою CCDC GOLD Suite. **Результати.** Встановлена наявність просторово гомологічних структур у складі CALM1 та СРК1, які можуть бути сайтами зв'язування KN-93 та KN-62. Шляхом молекулярного докінгу встановлена вигідність цих кишень з погляду енергії зв'язування для KN-93 та KN-62, проведений порівняльний аналіз на основі результатів оціночних функцій CCDC GOLD Suite (GoldScore і ASPScore). **Висновки.** Отримано підтвердження того факту, що інгібітори тваринної протеїнкінази CaMK2 KN93 і KN62 здатні взаємодіяти з гомологічним до тваринного кальмодуліну сайтом CaM-подібного домену рослинної протеїнкінази СРК1, що може порушувати її функціональність.

Ключові слова: CaMK2, СДРК, СРК1, протеїнкінази, молекулярний докінг, KN-93, KN-62.

Одним із найважливіших факторів впливу на структуру і функціональний стан мікротрубочок є безпосередні посттрансляційні модифі-

кації тубуліну [1, 2]. Наразі вже визначено багато протеїнкіназ тваринного і дріжджового походження, активність яких пов'язана з прямою і опосередкованою регуляцією структури і динаміки мікротрубочок [1, 2]. Відомо, що в регуляції мікротрубочок людини беруть участь протеїнкінази CaMK2, MLCK, AMPK, BRSK, CHEK, DAPK, LKB1, MARK, PKD, RSK, DCLK1, TRIO, KALRN та TTN [3–6]. На сьогодні серед протеїнкіназ, здатних безпосередньо фосфорилувати тубулін як у тварин, так і у рослин, є представники суперродина протеїнкіназ CaMK2. Також доведена CaMK2-залежна регуляція мікротрубочок шляхом фосфорилування білків, асоційованих із мікротрубочками, таких як, наприклад, тваринні MAP6 [3]. Відомо, що протеїнкіназа CaMK2γ здатна фосфорилувати тубулін і деполімеразу мікротрубочок MCAK, тоді як протеїнкіназа CaMK2δ ембріональних аксонів мишей асоціюється як з мікротрубочками, так і з мікрофіламентами [7–9].

У клітинах тварин протеїнкіназа CaMK2 знаходиться у вигляді чотирьох ізоформ: α, β, γ і δ. Їх структура консервативна і передбачає декілька доменів: каталітичний, автоінгібіторний, кальмодулін-зв'язуючий та домен асоціації. За допомогою останнього мономери протеїнкіназ CaMK2 формують холоензим із 12-ти субодиниць. У вільному стані названий фермент не активний, проте під час формування комплексу з кальмодуліном, який у свою чергу асоційований із кальцієм, кальмодулін-зв'язуючий та автоінгібіторний домени цілком змінюють свою конформацію, звільняючи активний центр і АТФ-зв'язуючий сайт каталітичного домену [10].

На противагу тваринним протеїнкіназам CaMK2, роль їх рослинних гомологів у регуляції цитоскелету майже не вивчена. Водночас

міжвидова консервативність молекул тубуліну і достатньо виражена гомологія кальцій-залежних протеїнкіназ різного еволюційного походження [6] свідчать про можливе існування консервативних або ідентичних сайтів фосфорилування молекул тубуліну у тварин і вищих рослин. Виходячи з цього припущення, за допомогою методів класичної і структурної біоінформатики нами було знайдено сайти специфічного фосфорилування β - і γ - тубулінів *A. thaliana*. Водночас було визначено протеїнкіназу CPK21 як найближчого рослинного гомолога тваринної протеїнкінази CaMK2 і потенційного агента фосфорилування тубуліну вищих рослин [11]. Проте, незважаючи на значну подібність каталітичних доменів, інтактні структури протеїнкіназ CPK21 і CaMK2 мають суттєві відмінності. Так, група протеїнкіназ CDPK представлена мономерними білками, доменна архітектура яких передбачає каталітичний, автоінгібіторний і кальмодулін-подібний домен. Гіпотетично, в еволюційному плані рослинні протеїнкінази CDPK з'явилися внаслідок злиття протогенів, що кодували CaMK- та кальмодулін-подібні продукти, і об'єдналися за рахунок інтронної рекомбінації [12]. Вважається, що саме таким чином рослинні протеїнкінази CPK набули здатності самостійно зв'язувати іони кальцію без участі дискретного кальмодуліну [9, 13].

Існує доволі широкий спектр інгібіторів протеїнкіназ CaMK2, які відрізняються як специфічністю, так і принципом дії. Так, AIP (Autocamtide-2 inhibitor proteins) і AC3-I (Autocamtide-3 inhibitor) за типом дії нагадують автоінгібіторний домен CaMK2, що дозволяє їм блокувати роботу каталітичного домену. Ця група інгібіторів демонструє високу селективність до протеїнкінази CaMK2, і у більшості випадків їх інгібіторний ефект для цієї протеїнкінази більше, ніж у 100 разів перевищує дію на протеїнкінази PKC, PKA і CaMKIV. Інгібітори групи CaMKIIN також мають пептидну природу і побудовані на послідовності автоінгібіторного домену протеїнкінази CaMK2. У деяких випадках їх послідовності скорочені або модифіковані з метою підвищення специфічності. До іншої групи відносяться класичні інгібітори протеїнкіназ, які діють за механізмом блокування АТФ-зв'язуючої кишені протеїнкінази CaMK2. Така АТФ-конкурентна дія притаманна багатьом сполукам, зокрема SMP-114 і бербаміну (BBM). Але, незважаючи на потужний ефект, їх дія ха-

рактеризується значно нижчою специфічністю, і у випадку наукових досліджень протеїнкінази CaMK2 більше уваги приділяється інгібіторам, дія яких спрямована на порушення взаємодії кальмодулін-зв'язуючого домену з кальмодуліном. Найвідомішими серед них є KN-62 та KN-93. Зв'язуючись із кальмодуліном, вони блокують його «обгортання» навколо кальмодулін-зв'язуючого домену протеїнкінази CaMK2 [10]. KN-93 та KN-62 демонструють високу специфічність до протеїнкінази CaMK2 з $IC_{50} = 0,37$ мкМ для KN-93 та $IC_{50} = 0,9$ мкМ для KN-62, проте мають низку інших мішеней, активність яких пригнічується за вищих концентрацій. Серед них – протеїнкінази PKA, PKC, MLCK, CaMKI, CaMKIV, Fyn, Haspin, Hck, Lck, Tec та TrkA [14].

Важливість вивчення особливостей функціонування, регуляції та ролі протеїнкінази CaMK2 людини призвела до створення декількох класів відповідних інгібіторів. Однак, попри велику кількість наявних інгібіторів кальцій-залежних протеїнкіназ, питання визначення їх селективності у рослинних клітинах залишається актуальним. Значний прогрес у цьому напрямку може бути досягнутий шляхом поєднання традиційних методів пошуку активних селективних сполук із методами молекулярного моделювання. Тому завданням нашого дослідження було з'ясування здатності з молекулярного погляду інгібіторів KN-93 та KN-62 порушувати функціонування рослинних гомологів протеїнкінази CaMK2 і бути залученими як інструменти експериментального дослідження Ca^{2+} -залежного фосфорилування у рослин.

Матеріали і методи

Амінокислотні послідовності було отримано з бази даних UniprotKB [15] у форматі FASTA. Доменну архітектуру і межі кальцій-зв'язуючого домену було визначено за допомогою сервісу SMART [16].

Пошук та аналіз гомологічних білкових структур було здійснено в репозиторії RCSB Protein Data Bank за допомогою вбудованих пошукових і аналітичних інструментів [17]. Референсна структура кальмодуліну з лігандом була отримана з Protein Data Bank у форматі *.pdb. Структура інгібітора KN93 була отримана з бази даних ChEMBL [18] у форматі SMILE. Конвертація структур лігандів у повноатомний формат *.mol2 була виконана за допомогою інструмента OpenVabel [19]. За допомогою он-

лайн сервісу SWISS-MODEL [20] було побудовано модель кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana*. Для профільного вирівнювання послідовностей було використано програму ClustalX [21]. Усі просторові структури молекул були підготовлені за допомогою програмного пакету PyMol (www.pymol.org).

Молекулярний докінг було виконано в програмі CCDC GOLD Suite 5.3 з урахуванням повної рухливості лігандів за умови статичності амінокислотних залишків активного центру [22]. У кожному випадку здійснювалося 100 циклів генетичного алгоритму. Оцінювання результатів докінгу спиралося на показники оцінювальних функцій програми CCDC GOLD: GoldScore і ASPScore. Візуалізація структур і аналіз результатів докінгу виконувалися в програмах CCDC HERMES [22] та PyMol (www.pymol.org).

Результати та обговорення

Першочерговим завданням для визначення потенційної здатності інгібіторів KN-93 та KN-62 взаємодіяти з ферментами рослинного походження було встановлення подібності просторових структур молекул кальмодуліну і кальцій-зв'язуючих доменів протеїнкінази CPK. Також необхідно було оцінити подібність експериментально підтверджених ділянок сайтів зв'язування інгібіторів. Для цього за допомогою сервісу SMART були визначені межі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana* і засобами сервісу SWISS-MODEL здійснено пошук гомологічних структур у базі даних PDB. За таким алгоритмом була створена вибірка з 50-ти експериментально встановлених структур, які на наступному етапі були використані для шаблонного моделювання відповідних рослинних доменів протеїнкінази CPK. За критеріями подібності структура комплексу кальмодуліну (ізотип 1) людини з референсним інгібітором мелбранкамідом (PDB: 6EEW, CALM1, malbrancheamide) була обрана як контроль (Coverage 0.87; Identity 38.62).

Результати профільного вирівнювання послідовностей CALM1 людини та кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 арабідопсису підтвердили подібність їх амінокислотних послідовностей. Порівняння амінокислотного оточення референсного ліганду (CALM1: I101, L106, M125, M145) з аналогічними залишками у послідовності протеїнкінази CPK1 свідчить про наявність ідентичних залишків у пос-

лідовності CPK1: I543, L548, M585. У випадку кальмодулін-подібного домену рослинної протеїнкінази CPK1 спостерігається заміна метіоніну M125 на лейцин у структурно-відповідному положенні L565 (рис. 1).

Після реконструкції моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 за допомогою он-лайн сервісу SWISS-MODEL та оптимізації просторової структури в повноатомному силовому полі була підтверджена достатня подібність структур за середньоквадратичним відхиленням атомів (RMSD – 0.93). Також було встановлено потенційний сайт зв'язування мелбранкаміду на поверхні моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana*.

Таким чином, на основі експериментально доведеного сайту зв'язування кальмодулінового інгібітора мелбранкаміду були визначені ділянки CALM1 (Ile101, Leu106, Met125, Met145) і CPK1 (Ile543, Leu548, Leu565, Met585), за якими було побудовано карту сайту для наступного молекулярного докінгу. Аналіз результатів докінгу референсного інгібітора проти всієї поверхні кальмодулінів виявив закономірності у розподілі енергетично вигідних розташувань ліганду на білковій молекулі. Загалом було виявлено два енергетично та конформаційно вигідних сайти, навколо яких концентрувалась більшість варіантів розташування конформерів. Згідно з оціночними функціями GoldScore і ASPScore, найбільш енергетично вигідним були варіанти, що відповідали експериментально підтвердженому сайту структури 6EEW (рис. 2). Результати повторного докінгу ліганду у цей сайт зі зменшенням діаметру у 16 Å також засвідчили, що усі конформаційні позиції ліганду усередині зазначеної кишені мають вигіднішу енергію зв'язування, ніж сайти на поверхні білкової глобули.

Після калібрування системи, спираючись на аналогічні параметри докінгу, була перевірена можливість зв'язування кальмодулін-спрямованих інгібіторів CaMK2 саме з цією кишенею на поверхні CALM1. Під час проведення молекулярного докінгу інгібітори KN-93 та KN-62 також проявили аналогічно високу спорідненість до цієї кишені. Водночас аналогічні результати було отримано й у випадку докінгу KN-93 та KN-62 у гомологічні ділянки моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana*. На рис. 4 наведені приклади найбільш енергетично вигідних (згідно з оціню-

вальними функціями) конформацій білок-лігандних комплексів. Так, кращий варіант розташування KN-93 у структурі кишені CALM1 був оцінений скорінговими функціями Goldscore: 53.95, ASP: 19,23, що є вищими показниками, ніж кращий варіант розташування для референсного ліганду мелбранкамід у

(Goldscore: 32.26, ASP: 20.54). Аналогічні результати отримано у випадку з докінгом KN-93 до кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 – показники кращого результату Goldscore: 54,58; ASP: 21,26 (для порівняння: у випадку з мелбранкамідом і CPK1 Goldscore: 42,55; ASP: 18,54 відповідно).

```
CALM1_HUMAN 92-FDKDNGYIISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK
CPK1_ARATH 534-FDKDGSYIITPDELQQACEEFG--VEDVRIEELMRDVDQDNDGRIDYNEFVAMMQKG-590
*****.***:. **:. : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
```

Рис. 1. Фрагмент профільного вирівнювання послідовностей CALM1 *H. sapiens* (UniprotKB: P0DP23) та CPK1 *A. thaliana* (UniprotKB: Q06850).

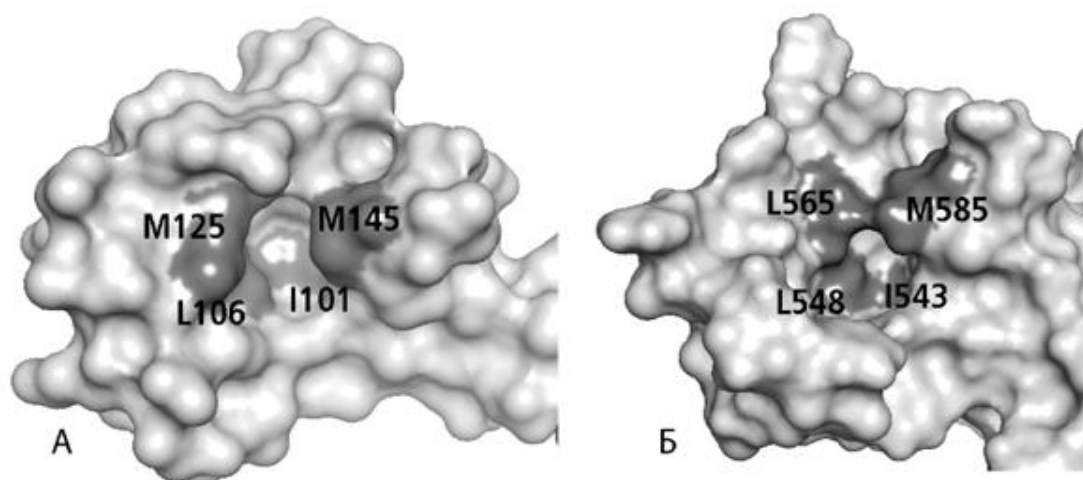


Рис. 2. Фрагмент структури молекули кальмодуліну CALM1 з *H. sapiens* (PDB: 6EEW) (А) та моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana* (Б). Темним кольором помічено амінокислоти сайту зв'язування мелбранкаміду на поверхні CALM1 та відповідні залишки гомологічної ділянки протеїнкінази CPK1.

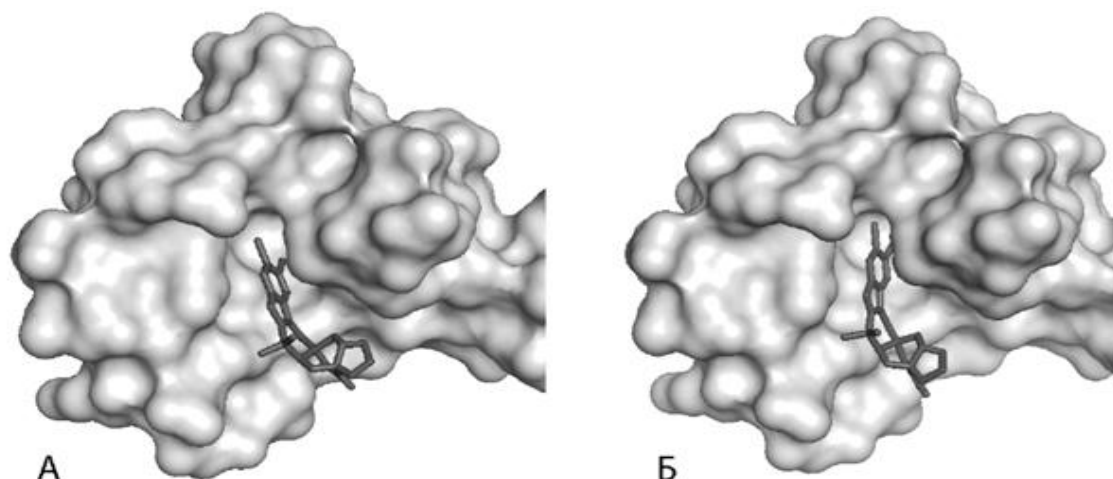


Рис. 3. Фрагмент структури експериментального комплексу CALM1 *H. sapiens* з канонічним інгібітором мелбранкамідом (PDB: 6EEW) (А) і приклад результату контрольного молекулярного докінгу мелбранкаміду у зазначений сайт CALM1 *H. sapiens* (Б).

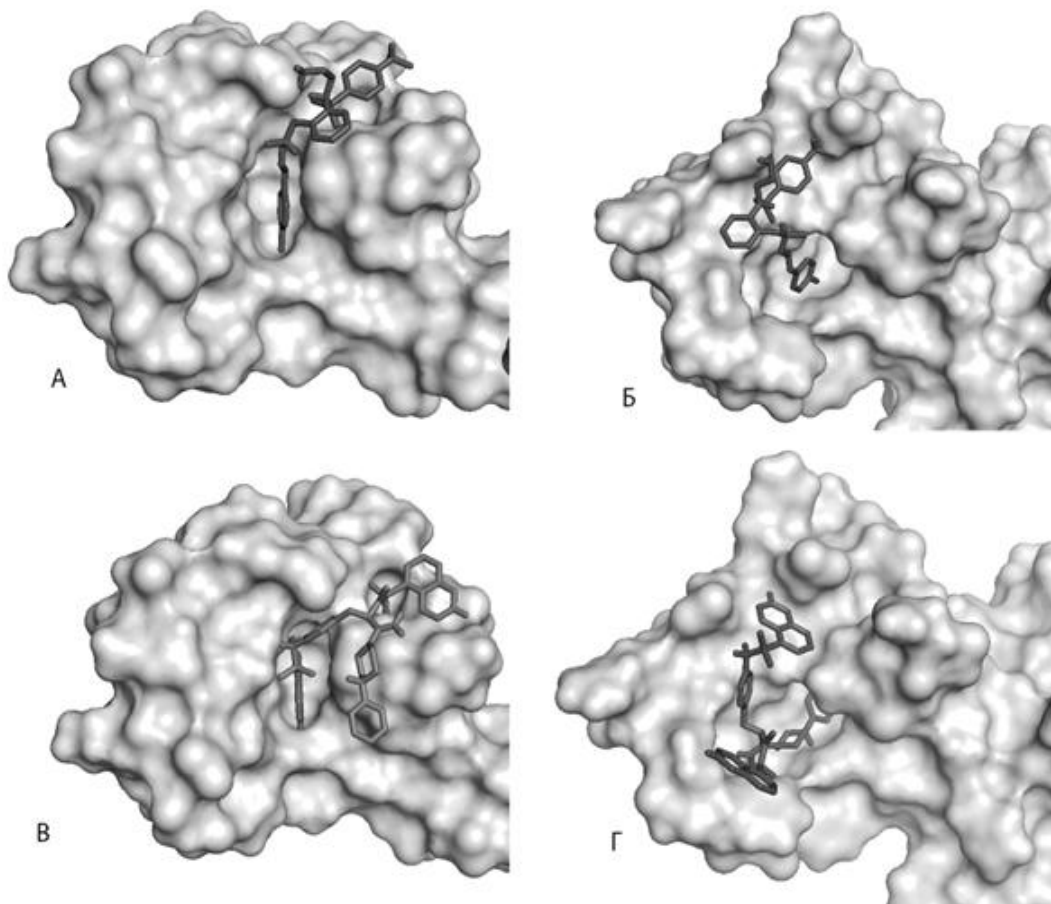


Рис. 4. Приклади результатів молекулярного докінгу. А – CALM1 *H. sapiens* з KN-93; Б – CPK1 *A. thaliana* з KN-93; В – CALM1 *H. sapiens* з KN-62; CPK1 *A. thaliana* з KN-62.

Найбільш енергетично вигідні варіанти розташування KN-62 за докінгу проти CALM1 і кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 продемонстрували такі результати: KN-62 та CALM1 – Goldscore: 73,93; ASP: 20,83; KN-62 та CPK1 – Goldscore: 63,79; ASP: 24,53. Таким чином, це дозволяє вважати, що кальмодулін-спрямовані інгібітори протеїнкінази CaMK2 – KN-93 та KN-62 – мають гомологічні й енергетично вигідні сайти зв'язування у структурах кальмодуліну людини та кальцій-залежної протеїнкінази арабідопсису. Такі припущення підтримують нашу первинну теорію і дають підстави для подальшого експериментального дослідження дії вищезазначених сполук на рослинних об'єктах *in vitro* та *in vivo*.

Висновки

За результатами проведеного дослідження було підтверджено припущення стосовно того, що інгібітори тваринної протеїнкінази CaMK2 – KN93 і KN62 – діють за механізмом зв'язування з кальмодуліном (CaM), що в свою чергу порушує утворення повнофункціонального комплексу з протеїнкіназою. Отримані результати свідчать про те, що KN-93 та KN-62 здатні аналогічним чином взаємодіяти з гомологічним сайтом CaM-подібного домену рослинної протеїнкінази CPK1. Спираючись на отримані результати, можна припустити, що вищезазначена взаємодія призводить до порушення автоактивації рослинної протеїнкінази CPK1 [13], а саме порушує взаємодію CaM-подібного домену і активаційної (CaM-зв'язуючої) ділянки ферменту.

Дослідження було виконано з використанням потужностей віртуальної організації CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid>) Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України.

References

1. Blume Ya.B., Lloyd C.W., Yemets A.I. The Plant Cytoskeleton: A Key Tool for Agro-Biotechnology. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2008. P. 145–159. doi: 10.1007/978-1-4020-8843-8_7.
2. Karpov P.A., Nadezhkina E.S., Yemets A.I., Matusov V.G., Nyporko A.Yu., Shashina N.Yu., Blume Ya.B. Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases. *BMC Genomics*. 2010. Vol. 11 (Suppl 1). S14. doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14.
3. Sheremet Ya.A., Yemets A.I., Vissenberg K., Verbelen J.P., Blume Ya.B. Effects of Inhibitors of Serine/Threonine Protein Kinases on Arabidopsis thaliana Root Morphology and Microtubule Organization in Its Cells. *Cell Tissue Biol*. 2010. Vol. 4, № 4. P. 399–409. doi: 10.1134/S1990519X10040139.
4. Baratier J., Peris L., Brocard, J., Gory-Fauré S., Dufour F., Bosc C., Fourest-Lieuvin A., Blanchoin L., Salin P., Job D., Andrieux A. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J. Biol. Chem*. 2006. Vol. 281, № 28. P. 19561–19569. doi: 10.1074/jbc. m509602200.
5. Wandosell F., Serrano L., Hernández M.A., Avila J. Phosphorylation of tubulin by a calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*. 1986. Vol. 261, № 22. P. 10332–10339.
6. Novozhylov D.O., Karpov P.A., Blume Ya.B. Bioinformatic Search for Ca²⁺- and calmodulindependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. *Cytol. Genetics*. 2017. Vol. 51, № 4. P. 239–46. doi: 10.3103/S0095452717040053.
7. Holmfeldt P., Zhang X., Stenmark S., Walczak C.E., Gullberg M. CaMKIIgamma-mediated inactivation of the Kin I kinesin MCAK is essential for bipolar spindle formation. *EMBO J*. 2005. Vol. 24, № 6. P. 1255–1266.
8. Easley C.A., Faison M.O., Kirsch T.L., Lee J.A., Seward M.E., Tombes R.M. Laminin activates CaMK-II to stabilize nascent embryonic axons. *Brain Res*. 2006. Vol. 1092, № 1. P. 59–68.
9. Baucum II A.J., Shonesy B.C., Rose K.L., Colbran R.J. Quantitative proteomics analysis of CaMKII phosphorylation and he CaMKII interactome in the mouse forebrain. *ACS Chem Neurosci*. 2015. Vol. 6, № 4. P. 615–631. doi: 10.1021/cn500337u.
10. Swilius M.T., Waxham M.N. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci*. 2008. Vol. 65, № 17. P. 2637–2657. doi: 10.1007/s00018-008-8086-2.
11. Karpov P.A., Novozhylov D.O., Isayenkov S.V., Blume Ya.B. Motif-Based Prediction of Plant Tubulin Phosphorylation Sites Associated with Calcium-Dependent Protein Kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol Genet*. 2018. Vol. 52, № 6. P. 428–439. doi: 10.3103/S0095452718060038.
12. Zhang X.S., Choi J.H. Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *J Mol Evol*. 2001. Vol. 53, № 3. P. 214–224. doi: 10.1007/s002390010211.
13. Karpov P.A., Yemets A., Blume Y. Calmodulin in Action: CaM Protein Kinases as Canonical Targets in Plant Cell. In book: *Calmodulin: Structure, Mechanisms and Functions*. 2019; Publisher: Nova Science Publishers, Inc., USA; Part of ISBN: 978-1-53614-948-7. P. 1–38.
14. Pellicena P., Schulman H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front Pharmacol*. 2014. Vol. 5, № 21. doi: 10.3389/fphar.2014.00021.
15. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucl. Acids Res*. 2008. № 36. P. 190–195. doi: 10.1093/nar/gk1929.
16. Letunic I., Doerks T., Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucl. Acids Res*. 2015. № 43. P. 257–260. doi: 10.1093/nar/gku949.
17. Burley S.K., Berman H.M., Kleywegt G.J., Markley J.L., Nakamura H., Velankar S. Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive. *Methods Mol Biol*. 2017. № 1607. P. 627–641. doi: 10.1007/978-1-4939-7000-1_26.
18. Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, Chambers J, Davies M, Hersey A, Light Y, McGlinchey S, Michalovich D, Al-Lazikani B, Overington JP. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res*. 2012. № 40. P. 1100–1107.
19. O'Boyle N.M., Banck M., James C.A., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G.R. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform*. 2011. № 3:33. doi: 10.1186/1758-2946-3-33.
20. Guex N., Peitsch M. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997. № 18. P. 2714–2723. doi: 10.1002/elps.1150181505.
21. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23. P. 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
22. Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol*. 1997. № 267. P. 727–748. doi: 10.1006/jmbi.1996.0897.

NOVOZHYLOV D.O.¹, KARPOV P.A.¹, SAMOFALOVA D.O.¹, POPITAK M.A.², BLUME Ya.B.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Academy of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: novozhylov_do@nas.gov.ua

² Biology And Medicine Institute Science Educational Center Of Taras Shevchenko National University Of Kyiv, Ukraine, 02000, Kyiv, Akademika Glushkova str., 2

THE INHIBITORY EFFECT OF KN-93 AND KN-62 AS A RESULT OF CaM-DIRECTED BLOCKING ANIMAL CAMK2 AND PLANT CDPK ACTIVATION

Aim. The goal of the study was determine whether, from a molecular point of view, inhibitors KN-93 and KN-62 are capable to disrupt the functioning of plant homologs of CaMK2 and being used as tools for the experimental study of Ca²⁺-dependent phosphorylation in higher plants. **Methods.** Selected calmodulin 1 *H. sapiens* reference structure and

reconstructed spatial structure of calcium-binding domain of CPK1 *A. thaliana*. We have conducted the molecular docking of calmodulin-mediated inhibitors to CaMK2: KN-93 and KN-62 for CALM1 *H. sapiens* and calcium-binding domain of CPK1 *A. thaliana* with full ligand mobility and static amino acid residues with the use of CCDC GOLD Suite. **Results.** We have established the presence of spatially homologous structures within CALM1 and CPK1 that might be the binding sites for KN-93 and KN-62. Performing the molecular docking we have shown the utility of those pockets from the point of binding energy for KN-93 and KN-62. We have conducted comparative analysis basing on the results of the CCDC GOLD Suite score functions (GoldScore and ASPScore). **Conclusions.** It has been shown that the inhibitors of animal CaMK2 - KN93 and KN62 are capable of interacting with the site of the CaM-like domain of the plant protein kinase CPK1 homologous to the similar site of animal calmodulin, which may impair its functionality. **Keywords:** CaMK2, CDPK, CPK1, protein kinases, molecular docking, KN-93, KN-62.