

УДК 57.052.6:577.151

ПОШУК РОСЛИННИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МІШЕНЕЙ СЕЛЕКТИВНИХ ІНГІБІТОРІВ СЕРИН-ТРЕОНІН СПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ

Д. Самофалова*, П. Карпов, Я. Блюм

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

вул. Осиповського, 2а, Київ 04123, Україна

e-mail: samofalova.dariya@gmail.com

На підставі результатів хомогеномного аналізу тваринних та рослинних протеїнфосфатаз було виконано кластеризацію за подібністю сайтів зв'язування ряду комерційно доступних інгібіторів. Встановлено рослинні протеїнфосфатази, які є найбільш вірогідними мішенями окадаїнової кислоти, мікроцистину, калікуліну, таутоміцину, нодуларину, мотупорину, кантаридину, кантаридинової кислоти та ендоталу.

Ключові слова: інгібітори протеїнфосфатаз, біоінформатика, хомогеномний аналіз, молекулярний докінг.

Ефективним інструментом експериментального дослідження зворотнього фосфорилювання білків є застосування різноманітних інгібіторів, і зокрема, селективних інгібіторів протеїнфосфатаз (ПФ) [8]. Зараз найбільш поширеними комерційними інгібіторами тваринних і рослинних ПФ є окадаїнова кислота, мікроцистин-LR, калікулін А, таутоміцин, нодуларин і мотупорин, кантаридин, кантаридинова кислота і ендотал [11, 34, 35, 37].

Серед них найбільш дослідженою сполукою є окадаїнова кислота (ОК, CID 446512), відома як міцний та специфічний інгібітор ПФ типів 1 і 2А. Вона демонструє незначну афінність до ПФ типу 2В, і відсутність дії на 2С [34]. Завдяки гідрофобності ОК здатна проникати в клітину і викликати підвищення рівня фосфорилювання білків. Відомо, що подібно до механізму дії інсуліну [34], ОК збільшує випуск трасміттеру в нейром'язових функціях [4], викликає вазодилатцію та є потужним агентом, що провокує утворення ракових пухлин [12].

Подібний механізм дії мають дві інші речовини, які також було отримано з ціанобактерій: мікроцистин-LR (МЦ-LR, CID 445434) і його гідрогенізована форма

дигідромікроцистин (CID 6441227). Зараз, вони є одними з найбільш поширених і водночас найбільш токсичних інгібіторів з групи мікроцистинів [22]. Саме здатність до потужного пригнічення ПФ1 та ПФ2А є фактором, що обумовлює токсичність MCLR і вплив відповідних ціанобактерій на екосистему [14]. Раніше нами було реконструйовано просторову структуру ПФ1, 2А з *Arabidopsis thaliana* і людини та доведено спільність структурних механізмів їх взаємодії з оокаїновою кислотою та мікроцистином [28, 29].

Інші два інгібітори ПФ, що мають потужну та протилежну від ОК дію на ПФ1 і ПФ2А – отримані з *Streptomyces verticillatus* таутоміцин (CID 440646) [23], та калікулін А (CID 5311365) [11]. Селективність та інгібіторний профіль таутоміцину роблять його корисним інструментом під час ідентифікації різних підтипів протеїнфосфатаз [17]. В свою чергу, калікулін А, зараз позиціонується як інгібітор, що перевищує за ефективністю дії оокаїновою кислоту [11]. Калікулін добре інгібує ПФ2А, в 10 разів краще – ПФ1, стимулює скорочення гладких м'язів [15], інгібує апоптоз [33] і є індуктором пухлиноутворення [12].

Представники іншої великої групи речовин: нодуларин – R (CID 45483039) і мотупорин (нодуларин – V, CID 46173077) було виділено з ціанобактерії *Nodularia spumigena* і морської губки, що була зібрана на острові Moturoa в Папуа-Новій Гвінеї. Ці циклічні низькомолекулярні пептидні сполуки мають незначні структурні відмінності та відрізняються тим, що у мотупорину в фармакофорі знаходиться валін замість аргініну [10]. Вони є потужними інгібіторами ПФ1, ПФ2А, а також, мають менш виражений ефект на ПФ2В.

Ще одна група речовин знаходить застосування в очищенні фосфорильованих білків. Речовини цієї групи відрізняються від інших інгібіторів ПФ походженням, оскільки є індукторами отруйної гемолімфи жуків род. *Meloidae*. Типовими представниками вищезазначених речовин є кантаридин (CID 5944) – перспективний селективний інгібітор ПФ2А, здатний гідролізуватися у водному середовищі до кантаридинової кислоти (CID 2544), а також ендотал (CID 3225) – інгібітор середньої сили, що діє виключно на ПФ2А [21]. Нажаль, незважаючи на добре відому цільову дію на ПФ, клінічне застосування цих речовин обмежено через їх цитотоксичність [13].

Незважаючи на те, що досліджувана група інгібіторів є потенційними препаратами для лікування онкологічних захворювань, нейродегенеративних розладів і цукрового діабету II типу, є важливими інструментами доведення ролі дефосфорильовання в клітинах тварин і рослин, а також засобом дослідження функціональної ролі окремих протеїнфосфатаз в сигнальних каскадах клітини, відмінності у фосфатомах обумовили цілком логічне питання відносно селективності інгібіторів тваринних ПФ під час їх використання на рослинних об'єктах. Для цього на основі результатів аналізу фосфатому людини, було проведено

біоінформаційний і хомогеномний аналіз фосфатомів *Arabidopsis thaliana* і *Physcomitrella patens*, повні фосфатоми яких були складені та проаналізовані у наших попередніх дослідженнях.

Матеріали та методи

Визначення сайтів зв'язування та їх амінокислотного складу було виконано з використанням експериментально встановлених комплексів ПФ-інгібітор з RCSB Protein Data Bank [24]. Амінокислотні послідовності ПФ з *H. sapiens*, *A. thaliana*, *P. patens* було отримано з бази даних UniProtKB [36]. Вибірка мішеней ґрунтувалась на результатах попередніх досліджень [30].

Множинні та профільні вирівнювання амінокислотних послідовностей і профілів сайтів зв'язування лігандів, виконували в програмі Clustal X [19].

Існування і ступень консервативності сайтів зв'язування інгібіторів оцінювали за допомогою інструментів програм EMBOSS і LeadIT [20, 27].

Кластеризацію профілей кожної групи ПФ, виконували із застосуванням методу зв'язування найближчих сусідів (Neighbor - Joining) [9, 19, 25, 26]. Візуалізацію та аналіз дерев було виконано за допомогою програми MEGA5 [16].

Реконструкція, перевірка якості та стабільності просторової структури, каталітичних субодниць рослинних ПФ з *A. thaliana* здійснено за раніше відпрацьованою методикою [28]. Під час реконструкції промоделей також застосовували сервер I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Остаточна верифікація і відбір моделей виконувались за результатами серверу MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).

Аналіз імовірних сайтів зв'язування інгібітору з мішенню виконувався методом гнучкого молекулярного докінгу в програмі CCDC GOLD Suite 5.1 [7]. Докінг здійснювався з врахуванням повної рухливості ліганду, за умови статичності амінокислотних залишків мішені. У кожному випадку здійснювалось 100 циклів генетичного алгоритму, з збереженням 50-ти кращих фреймів. Остаточний відбір комплексу здійснювався на підставі оціночних функцій CCDC GOLD: GoldScore, ChemScore і ASP [7].

Результати і їхнє обговорення

Відправною точкою дослідження була інформація про склад сайтів зв'язування інгібіторів на підставі кристалографічно доведених ліганд-білкових комплексів. Тому, у якості джерел первинної інформації про амінокислотний склад сайтів зв'язування і контроль, було використано 20 експериментально підтверджених комплексів ПФ людини з окадаїновою кислотою, мікроцистином, калікуліном, таутоміцином, нодуларином, мотупорином, кантаридином, норкантаридином, кантаридиновою кислотою і ендоталом (Таблиця 1), що були отримані з RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). У зв'язку з

тим, що в x-Ray структурах майже завжди відсутні N- і С- кінцеві частини молекули та ділянки з'язування між структурними доменами, повні амінокислотні послідовності контрольних структур, були встановлені на підставі результатів парних вирівнювань з оригінальними амінокислотними послідовностями і найближчими рослинними гомологами (Таблиця.1). Процентні показники (% ідентичності, % подібності, % гепів) наведені на підставі результатів парного вирівнювання каталітичних доменів ПФ людини і каталітичних доменів відповідних рослинних гомологів.

Таблиця 1

Результати біоінформаційного аналізу контрольних комплексів ПФ-Інгібітор з рослинними гомологами з *A. thaliana*

ІНГІБІТОР	PDB	ТИП ПФ	UniProtKB	Найближчий гомолог	Статус в UniProt (Rev./Unrev.)	Показники (%)		
						Ідент. (%)	Под. (%)	Гепи (%)
Кантаридин	3H68, 3H63	PPP5	P53041	Q84XU2	+	62.8	78.7	0.0
Норкантаридин	3H61	PPP5	P53041	Q84XU2	+	62.8	78.7	0.0
Кантаридинова к-та	3H67, 3H62	PPP5	P53041	Q84XU2	+	62.8	78.7	0.0
Ендотал	3H69, 3H64	PPP5	P53041	Q84XU2	+	62.8	78.7	0.0
Окадаїнова к-та	2IE4	PP2AA	P67775	Q07099	+	81.9	93.4	0.0
	1U32, 1JK7	PP1G	P62136	P48482	+	83.8	92.3	0.0
Таутоміцин	3E7B	PP1A	P62136	P48482	+	83.8	92.3	0.0
Нодуларин	3EGH, 3E7A	PP1A	P62136	P48482	+	83.8	92.3	0.0
Мікроцистин	2NYM, 2NPP	PP2AA	P67775	Q07099	+	81.9	93.4	0.0
	2NYL, 3DW8							
	1FJM	PP1A	P62139	P30366	+	80.8	92.3	0.4
Калікулін	1IT6	PP1G	P36873	O82733	+	79.3	90.4	0.0
Мотупорин	2BCD	PP1G	P36873	O82733	+	79.3	90.4	0.0

На основі результатів аналізу контрольних комплексів було виконано пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні лігандів та побудовані схеми сайтів із застосуванням мережевого інструменту PoseView (<http://poseview.zbh.uni-hamburg.de/>) та програмного пакету LeadIT 2.1.4. Таким чином, були з'ясовані амінокислотні залишки відповідальні за зв'язування функціональних груп лігандів. Так у зв'язуванні кантаридину з ПФ типу 5 (PDB: 3H68, 3H63) приймають участь лише 3 амінокислоти (His304, Asn303, Arg275), у випадку норкантаридину, кантаридинової кислоти і ендоталу з ПФ типу 5 (PDB: 3H61, 3H67, 3H62, 3H69, 3H64) у зв'язуванні беруть участь 3 амінокислотні залишки (Arg400, His304, Arg275); у зв'язуванні окадаїнової кислоти (PDB: 2IE4, 1U32, 1JK7) – 5 амінокислоти (Arg89, Arg214, His191, Trp200, Tyr265), у випадку ПФ2AA – 4 амінокислоти (Arg96, Arg221, Val223, Tyr272). У випадку ПФ 1-го типу відповідно: калікулін з ПФ1G (PDB: 1IT6)- утримують 4 амінокислоти (Arg96, Ser129, Arg221, Tyr272), а таутоміцин з ПФ1A (PDB: 3E7B) зв'язують ті ж самі амінокислотні залишки (Arg96, Ser129, Arg221, Tyr272) з доповненням 3-х (Trp206, Val223, Val250); нодуларини обох типів на

поверхні ПФ1 (PDB: 2BCD, 3E7A, 3EGH) утримують 4 амінокислотних залишки (Arg96, Val223, Trp206, Tyr272), а у зв'язуванні мікроцистину (PDB: 2NYM, 2NYL, 2NPP, 1FJM, 3DW8) приймає участь найбільша кількість амінокислотних залишків – 9 у випадку ПФ1 (Arg96, Ile130, Tyr134, Asp197, Arg221, Val223, Trp206, Tyr272, Glu275) та 6 амінокислот (Arg89, Ile 123, Tyr 127, His191, Trp200, Tyr265) для типу ПФ2А. Була дана оцінка консервативності амінокислотного складу сайтів зв'язування і їх оточення з використанням програм EMBOSS і LeadIT, результати представлені на рис. 1.

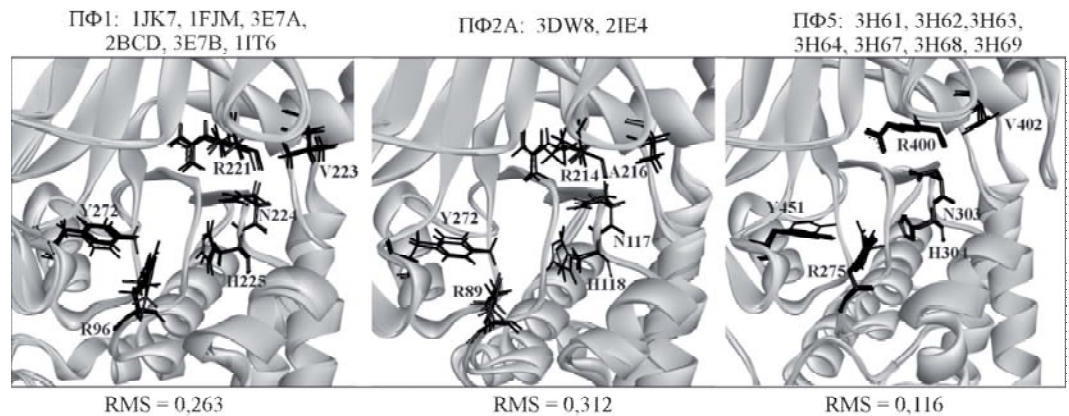


Рис.1. Просторове вирівнювання досліджуваних x-Ray структур ПФ типів 1, 2А і 5 з консервативною частиною активного сайту зв'язування досліджених інгібіторів.

Наступним етапом, на основі детального аналізу x-Ray комплексів було складено профілі амінокислот, що відповідають за зв'язування з інгібіторами протеїнфосфатаз людини типів 1, 2А і 5 (рис. 2).

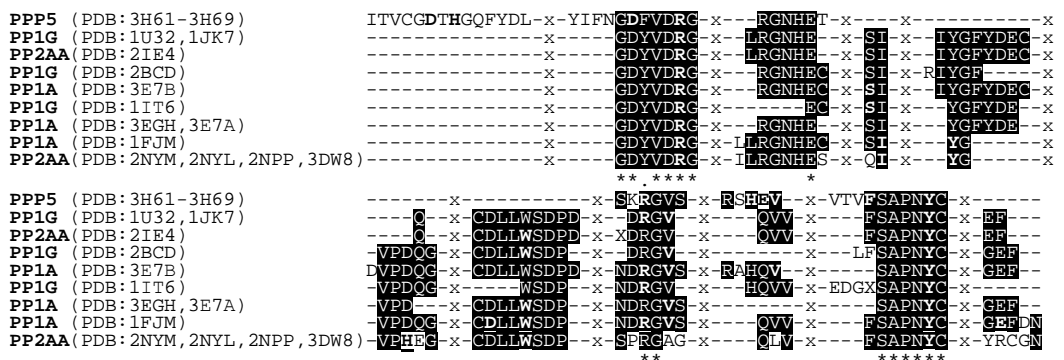


Рис. 2. Профілі сайтів зв'язування інгібіторів з серин-треонінспецифічними ПФ людини.

Універсальним символом IUPAC - X, позначено поділ між консервативними мотивами. Підкреслені амінокислотні залишки – визначені за допомогою інструменту PoseView, а всі інші, було визначено в програмі LeadIT 2.1.4. Саме на підставі порівняння

структурної топології амінокислотних залишків відповідальних за зв'язування та підтримання лігандів в сайтах зв'язування на поверхні протеїнфосфатаз було побудовано та проаналізовано множинне вирівнювання профілів амінокислотного складу сайтів зв'язування досліджуваних інгібіторів ПФ.

Обраний хомогеномний метод [9, 26] спочатку було перевірено з використанням гетерогенної групи ПФ, яка була відібрана за результатами пошуку рослинних гомологів ПФ людини [5, 30]. Аналогічно, 145 рослинних гомологів було поділено на 11 груп за результатами їх спільної кластеризації з ПФ тваринного походження: 1 і 2 – класичні та дуальні тирозинфосфатази, решта 9 груп включали серин-треонін-, тирозин-, аспартат - специфічні ПФ і фосфодіестерази [30]. Саме ці 9 груп було використано для подальшого пошуку можливих альтернативних мішеней. Використавши профілі сайтів зв'язування інгібіторів ПФ тваринного походження, було виконано спільне вирівнювання кожної з 9 груп. Визначаючи функціональні мотиви, було створено нову вибірку. Кластичний аналіз профілів сайтів зв'язування дозволив виділити групу серин-треонін - і аспартатспецифічних ПФ рослин (FYPP3_Q9LHE7, PPP5_Q84XU2, HAD_Q6IDA8, PP2A5_O04951 з *A. thaliana* і потенційні A9TXC9, A9TE32 з *P. patens*), яка увійшла в спільну кладу з гомологами ПФ людини, що з великою ймовірністю взаємодіють з відповідними інгібіторами. Крім того, було визначено спільну групу ПФ (A8MQN4, V3H7B7, Q9C8M6, Q00IB6, Q8LL04, TIM50_Q8VYE2, DBR1_Q94KO1) з *A. thaliana* та гомологів (A9U2J5, A9TTN5, A9T1Q3, A9S5I0, A9SPK4, A9TXM9, A9RQ71) з *P. patens*, що потенційно здатні до взаємодії з окадаїновою кислотою, мікроцистином, калікуліном, таутоміцином [1–3, 31, 32].

За результатами первинного пошуку альтернативних мішеней у рослин для 10 відомих інгібіторів серин-треонінспецифічних ПФ людини, виникла необхідність обґрунтованого відбору груп фосфатаз для подальшого аналізу. За результатами біоінформаційного аналізу було складено первинну вибірку фосфатомів для арабідопсису і моху. Поділ групи за субстратною специфічністю з'ясував наявність 112 серин-треонінспецифічних, 36 тирозинспецифічних (1, 2, 3 класу) і 26 аспартатспецифічних ПФ у *A. thaliana* і 29 потенційних ПФ усіх трьох груп у *P. patens* [30]. Саме ця група (204 рослинних ПФ) була використана для подальшого хомогеномного пошуку. Етапи дослідження були такими ж: спільне множинне вирівнювання патернів з каталітичними доменами 204 ПФ, аналіз консервативності функціонально важливих ділянок, профільне вирівнювання отриманих фрагментів і подальша кластеризація з використанням алгоритму зв'язування найближчих сусідів. З метою мінімізації можливих помилок під час вирівнювання, ПФ рослин було згруповано за їх субстратною подібністю.

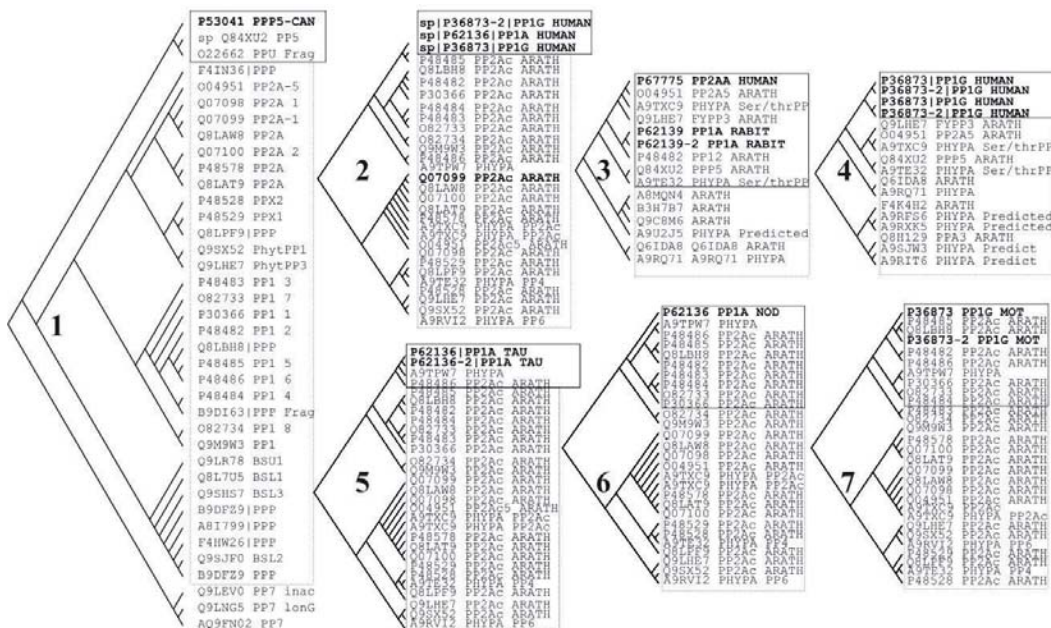


Рис. 3. Результати кластичного аналізу сайтів зв'язування інгібіторів з ПФ *H. sapiens*, *A. thaliana*, *P. patens*: 1 – група профілів кантаридинових інгібіторів, 2–ОК, 3–МЦ, 4 – калікуліну, 5 – таутоміцину, 6 – нодуларину, 7 – мотупорину.

В результаті було відібрано групи ПФ, які є найбільш вірогідними мішенями для кожного з інгібіторів. Висновок зроблено на підставі об'єднання спільної класифікації з контрольними профілями з *A. thaliana* і *H. sapiens*. Так, було встановлено, що існує значна ймовірність, що ОК, МЦ-LR, калікулін і таутоміцин можуть діяти на ПФ типів 5 (PPP5_Q84XU2), 6 (FYPP3_Q9LHE7) з *A. thaliana* та на потенційні ПФ (A9TXC9, A9TE32) з *P. patens*. Крім того група ПФ з *A. thaliana* (A8MQN4, B3HTB7, Q9C8M6, Q00IB6, Q8LL04, Q8VYE2, Q94KO1) і *P. patens* (A9U2J5, A9TTN5, A9T1Q3, A9S5I0, A9SPK4, A9TXM9), була визначена як потенційно здатна до взаємодії. Аналіз здатності зв'язувати нодуларин та мотупорин показав, що будучи консервативними інгібіторами серин-треонінспецифічних ПФ типу 1, в рослинних клітинах вони потенційно можуть діяти на ПФ типів 2А, 4, 5 та фітохром-асоційовані ПФ6. Також, результати кластеризації сайтів зв'язування селективних інгібіторів ПФ типу 5 - кантаридину, кантаридинової кислоти, нор-кантаридину і ендоталу з рослинними гомологами даного типу (PP5) і контролем, свідчать, що майже всі рослинні серин-треонінспецифічні ПФ є імовірними мішенями цих сполук. Це дозволяє розглядати вищезгадані речовини, як потенційні неспецифічні інгібітори більшості серин-треонінспецифічних ПФ. Таким чином, різна селективність цих сполук робить їх важливими інструментами дослідження зворотного фосфорилування та з'ясування функціональної ролі

окремих ПФ у клітинах тварин і рослин. Також підтверджено даними кладистики, що винятком для всіх інгібіторів стала група протеїнофосфатаз типу 7 (3 ізоформи: Q9LEV0, Q9LNG5, Q9FN02), яка не має сайтів зв'язування з жодним з них [18].

Для перевірки отриманих результатів, як контроль, було здійснено докінг окадаїнової кислоти на потенційну ПФ5 (UniProt: Q84XU2) з *A. thaliana*. При цьому негативним контролем була ПФ7 (UniProt: Q9FN02), яка за даними літератури та проведеного кладистичного аналізу не зв'язує окадаїнову кислоту та її похідні [6]. Так, було визначено найближчого гомолога ПФ5 людини (P53041) з експериментально отриманою просторовою структурою (PDB: 3H63). Оскільки показники подібності первинної структури мали середні значення: 50% ідентичності при 68% подібності повних послідовностей, для реконструкції 3-D структури було обрано лише найбільш консервативну ділянку – з 244 по 520 залишок, яка становить каталітичний домен (SMART: SM000156, 62,8% і 78,7% відповідно, при одночасній відсутності гепів (набл. 1). Для ПФ типу 7, поки що відсутні гомологи з вирішеною x-Ray структурою. Тому для реконструкції трьохвимірної моделі було використано декілька матричних структур.

Реконструкція структури обох каталітичних доменів була виконана за допомогою мережевого інструменту I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>): стандартні параметри, із застосуванням методу множинного суміщення шаблонних структур. Так, для реконструкції рослинної ПФ типу 5 були використані такі PDB-структури: ПФ5 (1WAO, ланцюг - 4), ПФ5 (1S95_A), ПФ1 (1S70_A), ПФ2A (3P71_C), ПФ2A (2IAE_C), ПФ1 (1U32_A) з *Homo sapiens* і PP5 (3ICF_A) з *Saccharomyces cerevisiae*, а для ПФ7 матрицями слугували: ПФ5 (1WAO, ланцюг – A), ПФ2A (3P71_C), ПФ2B (1AUI_A), ПФ2B (4PL1_A), ПФ2A (2IAE_C), ПФ1 (1U32_A) людини. Оскільки, матричні та реконструйовані структури характеризувалися високою ідентичністю сервером було побудовано лише по одній моделі ПФ. Показник якості (C-score) ПФ5 і ПФ7 коливалася від 0.70 до 1.19, а RMSD=2.2±1.7Å. Підтвердження структури виконали з базою даних SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>), а оптимізацію і верифікацію структур виконали шляхом короткочасної молекулярної динаміки в газовій фазі із застосуванням пакету Gromacs.

Перевірка моделі мішені та підготовка ліганду (наявність всіх атомів, правильність зв'язків, зберігалася у форматі *.Mol2) до докінгу виконувалась із застосуванням програми CCDC Hermes. Гнучкий докінг ПФ5 і ПФ7 з ОК було виконано за допомогою пакету CCDC GOLD, за умови: центрування по NE2- (HIS125) і радіусі докінгового простору = 20 Å. Під час докінгу була задана повна рухливість ліганду, при водночас, ригідності амінокислотних залишків білка. Кращі позиції лігандів були обрані на підставі показників GoldScore, ChemScore і ASP. Значення цих функцій свідчить про спорідненість ліганду до сайту (більше

значення – краще), а також, про вигідність конформаційного стану (менше значення – краще). Показники якості молекулярного докінгу за програмою CCDC GOLD для ОА з ПФ5 становили: GoldScore: -268.14 кДж/моль, ChemScore: -296.00 кДж/моль, ASP: -257.18 кДж/моль; та для ПФ7 124.64, 133.48 та 106,93 кДж/моль відповідно.

Високий відсоток ідентичності амінокислотних послідовностей, схожість фолдінгу протеїнфосфатаз різного еволюційного походження та оціночні функції докінгу, дозволяють зробити висновок про ідентичність топології сайтів зв'язування ОК з молекулами ПФ різних типів. На користь цього також опосередковано свідчить великий розмір ліганду і, відповідно, поверхні сайтів інтерактивної взаємодії ПФ5 з *A. thaliana*.

Отже, аналізуючи результати хомогеномного пошуку ми припускаємо, що окадаїнова кислота, мікроцистин, калікулін і таутоміцин, будучи селективними інгібіторами ПФ типу 1 та 2А, також здатні пригнічувати рослинні серин-треонінспецифічні ПФ типів 3, 5 і 6. Будучи консервативними інгібіторами, серин-треонінспецифічних протеїнфосфатаз типу 1, в рослинних клітинах нодуларин і мотупорин також, гіпотетично здатні діяти на ПФ 2А і ПФ типу 4, 5 і 6. Винятком стала група кантаридинових інгібіторів. Потенційно вони можуть діяти майже на всі рослинні серин-треонінспецифічні ПФ, крім типу ПФ7.

Частково, дослідження було виконано в рамках проекту УНТЦ #5215: «Пошук ефективних інгібіторів протеїнфосфатаз за допомогою нанохімічних підходів і оцінка їх біологічної ефективності in silico».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Самофалова Д. А., Карпов П. А., Блюм Я. Б. Анализ взаимодействия кантаридиновых ингибиторов с протеинфосфатазами растений // Биология растений и биотехнология: II конф. молодых ученых. К., 2013. С. 36.
2. Самофалова Д. А., Карпов П. А., Блюм Я. Б. Биоинформационный и хомогеномный анализ фосфатомов животных и высших растений // Непостоянство генома: V Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике. (Москва-Звенигород, 2012). С.57.
3. Самофалова Д. О., Карпов П. А. Ідентифікація рослинних мішеней калікуліну А методом кластеризації сайтів зв'язування // Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів: XII конф. молодих вчених. (Київ, 2012). С. 199.
4. Abdul-Ghani M., Kravitz E.A., Meiri H., Rahamimoff R. Protein phosphatase inhibitor okadaic acid enhances transmitter release at neuromuscular junctions // Proc. Natl. Acad. Sci. 1991. Vol. 88. N 5. P. 1803–1807.

5. *Almo S. C., Bonanno J.B., Sauder J.M.* et al. Structural genomics of protein phosphatases // *J. Struct. Funct. Genomics*. 2007. Vol. 8. N 2–3. P. 121–140.
6. *Cheng A., Dean N., Honkanen R.* Serine/Threonine Protein Phosphatase Type 1 γ 1 Is Required for the Completion of Cytokinesis in Human A549 Lung Carcinoma Cells // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 1846–1854.
7. *Cole J., Verdonk M., Hartshorn M.* et al. Improved protein-ligand docking using GOLD // *Proteins*. 2003. N 52. P. 609–623.
8. *Dawson J., Holmes C.* Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins // *Front. Biosci.* 1999. Vol. 4. P. 646–658.
9. *de Graaf C., Vischer H., de Kloe G.* et al. Small and colorful stones make beautiful mosaics: fragment-based chemogenomics // *Drug Discov. Today*. 2013. Vol. 18. P. 323–330.
10. *de Silva E., Williams D., Andersen R.* et al. Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the Papua New Guinea sponge *Theonella swinhoei* // *Gray.Tetrahedron Lett.* 1992. N 33. P. 1561–1564.
11. *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. N 8. P. 122–172.
12. *Fujiki H., Suganuma M.* Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2009. N 46. P. 221–254.
13. *Han W., Wang S., Liang R.* et al. Non-ionic surfactant vesicles simultaneously enhance antitumor activity and reduce the toxicity of cantharidin // *Int. J. Nanomedicine*. 2013. N 8. P. 2187–2196.
14. *Honkanen R. E. I, Zwiller J., Moore R. E.* et al. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. N 32. P. 19401–19404.
15. *Ishihara H., Martin B., Brautigam D.* et al. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. Vol. 159. N 3. P. 871–877.
16. *Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K.* MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences // *Brief. in Bioinf.* 2008. N 9. P. 299–306.
17. *Kurisaki T., Magae J., Isono K.* et al. Effects of tautomycin, a protein phosphatase inhibitor, on recycling of mammalian cell surface molecules // *J. Antibiot.* 1992. Vol. 45. N 2. P. 252–257.
18. *Kutuzov M., Evans D., Andreeva A.* Expression and characterization of PP7, a novel plant protein Ser/Thr phosphatase distantly related to RdgC/PPEF and PP5 // *FEBS Lett.* 1998.

- Vol. 440. N 1–2. P. 147–152.
19. *Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P. et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0 // *Bioinformatics*. 2007. N 23. P. 2947–2948.
 20. *Lengauer T., Lemmen C., Rarey M., Zimmermann M.* Novel technologies for virtual screening // *Drug Discovery Today*. 2004. N 9. P. 27–34.
 21. *Li Y. M., Mackintosh C., Casida J. E.* Protein phosphatase 2A and its [3H]cantharidin/[3H]endothall thioanhydride binding site. Inhibitor specificity of cantharidin and ATP analogues // *Biochem. Pharmacol.* 1993. Vol. 46. N 8. P. 1435–1443.
 22. *MacKintosh C., Beattie K. A., Klumpp S., Cohen P., Codd G. A.* Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants // *FEBS Lett.* 1990. N 264. P. 187–192.
 23. *MacKintosh C., Klumpp S.* Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 277. N 1–2. P. 137–140.
 24. *Marvin J., Padilla D., Ravichandran V. et al.* The Protein Data Bank // *Biol. Crystallogr.* 2002. N 58. P. 899–907.
 25. *Nei M., Kumar S.* Molecular evolution and phylogenetics // Oxford University Press. New York. 2000. 333 p.
 26. *Peng S., Lin X., Guo Z., Huang N.* Identifying multiple-target ligands via computational chemogenomics approaches // *Curr Top Med Chem.* 2012. Vol. 12. P. 1363–1375.
 27. *Rice P., Longden I., Bleasby A.* EMBOSS: The european molecular biology open software suite // *Trends in Genetics*. 2000. N 6. P. 276–277.
 28. *Samofalova D. A., Karpov P. A., Nyporko A. U., Blum Y. B.* Reconstruction of spatial structure of plant protein phosphatase type-1 and -2A in complex with okadaic acid // *Tsitol. Genet.* 2011. Vol. 45. N 3. P. 153–162.
 29. *Samofalova D. A., Karpov P. A.* Reconstruction of spatial structure of plant protein phosphatase type-1 and -2A in complex with microcystin-LR // *Shevchenkivska vesna 2012: life sciences: X Int. interdisciplinary scientific conf. Kiev. 2012. P. 270.*
 30. *Samofalova D., Karpov P., Blum Y.* Reconstruction of *Arabidopsis thaliana* phosphatome // *Int. Moscow conf. on comp. mol. biol. Moscow. 2011. P. 333-334.*
 31. *Samofalova D. A., Karpov P. A., Blume Ya. B.* Chemogenomic profiling for identification of okadaic acid receptors among plant serine/threonine-specific protein phosphatases // *Molecular Phylogenetics: 3rd Moscow Int. conf. Moscow. 2012. P.152.*
 32. *Samofalova D. A., Karpov P. A., Blume Ya. B.* Chemogenomic profiling: identification of potential interactions between microcystin-Lr and plant serine/threonine-specific protein

- phosphatases // Intracellular signaling and bioactive molecules design: III Int. Symposium. Lviv. 2012. P. 156.
33. Song Q., Lavin M. F. Calyculin A, a potent inhibitor of phosphatases-1 and -2A, prevents apoptosis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 190. N 1. P. 47–55.
34. Tanti J., Grémeaux 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. Vol. 266. N 4. P. 2099–2103.
35. Vale C., Botana L. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins // FEBS J. 2008. Vol. 275. P. 6060–6066.
36. Wu C.H., Apweiler R., Bairoch A. et al. The Universal Protein Resource (UniProt): an expanding universe of protein information // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 34. P.187-191.
37. Xing Y., Xu Y., Chen Y. et al. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins // Cell. 2006. Vol. 127. P. 341–352.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 23.09.14

прийнята до друку 24.09.14

IDENTIFICATION OF PLANT MOLECULAR TARGETS FOR SELECTIVE INHIBITORS OF SERINE-THREONIN PROTEIN PHOSPHATASES

D. Samofalova, P. Karpov, Ya. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine

2a, Osipovskogo St., Kyiv 04123, Ukraine

e-mail: samofalova.dariya@gmail.com

Hemogenomic profiling was performed for a number of animal and plant protein phosphatases. Similarity between inhibitor binding sites of some commercially available compounds were revealed. As a result, plant protein phosphatases – the most likely molecular targets for okadaic acid, microcystin, calyculin, tautomycin, nordularin, motuporin, cantharidin, cantharidin acid and endotal, were assign.

Keywords: protein phosphatase inhibitors, bioinformatics, hemogenomic analysis, molecular docking.

**ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ СЕЛЕКТИВНЫХ
ИНГИБИТОРОВ СЕРИН-ТРЕОНИН СПЕЦИФИЧНЫХ ПРОТЕИНФОСФАТАЗ****Д. Самофалова, П. Карпов, Я. Блюм***Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины**ул. Осиповского, 2а, Киев 04123, Украина**e-mail: samofalova.dariya@gmail.com*

Выполнена хомогенная кластеризация животных и растительных протеинфосфатаз выявившая степень сходства сайтов связывания для ряда коммерчески доступных ингибиторов. Установлены растительные протеинфосфатазы, которые являются наиболее вероятными мишенями омега-3-жирной кислоты, микроцистина, каликулина, таутомицина, нодуларина, мотупорина, кантаридина, кантаридиновой кислоты и эндотала.

Ключевые слова: ингибиторы протеинфосфатаз, биоинформатика, хомогенный анализ, молекулярный докинг.