

Д.А. САМОФАЛОВА, П.А. КАРПОВ,  
А.Ю. НЫПОРКО, Я.Б. БЛЮМ

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев  
E-mail: samofalova\_dariya@i.ua

## РЕКОНСТРУКЦИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕИНФОСФАТАЗ ТИПА 1 И 2А С ОКАДАИНОВОЙ КИСЛОТОЙ



*На основании известных пространственных структур протеинфосфатаз 1 и 2А из *Ното сариенс* выполнено профильное моделирование их растительных гомологов из *Arabidopsis thaliana*. Качество построенных моделей подтверждено значениями среднеквадратических отклонений между атомами и результатами конфирмационного анализа. По результатам сравнительного анализа и молекулярной динамики идентифицированы и подтверждены сайты связывания окадаиновой кислоты молекулами протеинфосфатаз типов 1 и 2А из *A. thaliana*.*

© Д.А. САМОФАЛОВА, П.А. КАРПОВ, А.Ю. НЫПОРКО,  
Я.Б. БЛЮМ, 2011

**Введение.** Обратимое фосфорилирование, осуществляемое целостной системой ферментов — протеинкиназ и протеинфосфатаз, представляет собой универсальный механизм регуляции структурных и функциональных свойств обширной группы белков [1, 2]. Процесс дефосфорилирования является таким же важным, как и процесс фосфорилирования белков, соответственно протеинфосфатазы являются обязательными интегральными компонентами целого ряда жизненно важных сигнальных систем клетки [3]. В отличие от протеинкиназ, имеющих общее эволюционное происхождение, разные группы протеинфосфатаз (ПФ) берут свое начало от различных предковых последовательностей и отличаются по структуре и механизмам действия [4].

Основываясь на сходстве последовательностей, пространственной структуры и механизма катализа, протеинфосфатазы разделяют на три основные группы [4, 5]. Первая группа объединяет классические серин-треонинспецифичные (протеинфосфатазы 1, 2(А, В, С), 4, 5, 6 и 7) и  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -зависимые протеинфосфатазы. Вторая группа представлена семейством тирозинфосфатаз, дефосфорилирующих белки по остаткам тирозина. Третья, наименее изученная группа, представлена аспаргинспецифичными протеинфосфатазами, содержащими характерный DXDXT/V мотив каталитической структуры [4, 6, 7].

Известно, что *in vivo* серин-треониновые протеинфосфатазы существуют в виде набора олигомерных комплексов, состоящих из множественных комбинаций каталитических и регуляторных субъединиц (типы укладки субъединиц —  $\alpha+\beta$ ,  $\alpha/\beta$  либо все  $\alpha$ ) [8], и контролируют широкий спектр сигнальных путей за счет непосредственного гидролиза фосфорилированного субстрата [9]. Процесс гидролиза происходит при участии двух кофакторов — ионов металлов (как правило,  $Mn^{2+}$  и/или  $Mg^{2+}$ ), связанных ковалентными связями в активном центре фермента, и регуляторной субъединицы, формирующей подковообразный «каркас», который поддерживает каталитическую субъединицу с помощью специфичного С-хвоста [9, 10].

Эффективным инструментом исследования и доказательства процессов обратимого фосфорилирования белков является анализ с применением селективных ингибиторов протеинки-

наз и протеинфосфатаз [11]. Одним из таких высокоспецифичных ингибиторов протеинфосфатаз является окадаиновая кислота (рис. 1) [11–14] – монокарбоновая кислота  $C_{44}H_{68}O_{13}$  (молекулярная масса – 764,9 Да), впервые выделенная из губок *Halichondria okadaei* и *H. melanodocia* [15], а также продуцируемая динофлагеллятами *Prorocentrum lima* [12] и *Dinophysis sp.* [13, 16]. Гидрофобность окадаиновой кислоты позволяет ей проникать внутрь клетки и стимулировать фосфорилирование белков [17] подобно механизму действия инсулина [18]. Она вызывает вазодилатацию [19], увеличивает выпуск транмиттеров при нейромышечном соединении [20] и является мощным канцерогенным агентом [21]. Результаты ряда экспериментов на животных объектах свидетельствуют о том, что окадаиновая кислота является селективным ингибитором протеинфосфатаз типов 1 и 2А [10, 16, 22–24]. Селективное ингибирующее действие окадаиновой кислоты было неоднократно подтверждено в экспериментах на растительных клетках [25–28], в том числе было доказано ее влияние на структуру микротрубочек [29]. Являясь сильным и специфическим ингибитором протеинфосфатаз типов 1 и 2А, окадаиновая кислота имеет более низкое сродство к ПФ типа 2В и не ингибирует ПФ типа 2С [30].

Именно в силу такой селективной активности окадаиновая кислота является важным инструментом для изучения протеинфосфатаз и выяснения их функциональной роли как в клетках животных, так и растений. Например показано, что обработка корней *Arabidopsis thaliana* окадаиновой кислотой приводит к стабилизации кортикальных микротрубочек, изменяет их организацию с поперечной на хаотичную и может вызывать их полную дезорганизацию [29]. Кроме того, обработка окадаиновой кислотой влияет на морфологию корневых волосков, вызывая их вздутие и ветвление, что напрямую связано с нарушением ориентации микротрубочек [29].

Известно большое количество селективных ингибиторов протеинфосфатаз типов 1 и 2А, но именно окадаиновая кислота представляет собой первоочередной объект для исследований структурно-биологических механизмов

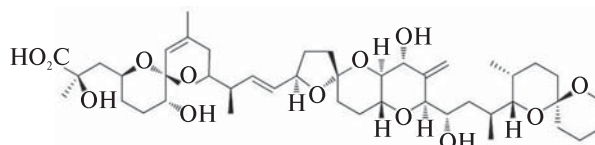


Рис. 1. Структурная формула окадаиновой кислоты [11–14]

ингибирования протеинфосфатаз, поскольку в настоящее время экспериментально установлен сайт ее связывания с протеинфосфатазами животного происхождения [10, 31–33]. В то же время, несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов функционирования протеинфосфатаз у растений [1, 34], особенности взаимодействия растительных гомологов животных протеинфосфатаз с окадаиновой кислотой (с учетом возможных отличий пространственной структуры) остаются неизученными. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение структурных механизмов специфического взаимодействия окадаиновой кислоты с протеинфосфатазами растений и сравнительный анализ сайтов ее связывания на поверхности молекул протеинфосфатаз из животных и растений.

**Материалы и методы.** Поиск гомологов животных протеинфосфатаз из модельного растения *Arabidopsis thaliana* осуществляли на основании результатов Blastp сканирования базы данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>) [35]. Парные выравнивания аминокислотных последовательностей выполняли в программе Clustal X (2.0.5) с применением серии матриц BLOSUM [36, 37].

Реконструкцию пространственной структуры каталитических субъединиц растительных гомологов животных протеинфосфатаз типов 1 (UniProt: P48482) и 2А (UniProt: O04951) из *A. thaliana* осуществляли методами профильного моделирования [38]. Матричные структуры были отобраны на основании результатов Blast-сканирования Международного банка белковых структур RCSB PDB (Protein Data Bank – <http://www.rcsb.org/>) [39, 40]. Выбор оптимальных матриц свертки проводили на основании таких параметров, как целостность структуры, протяженность консенсусной области, процент идентичности, процент сходства, а также на основании кри-

терия качества пространственных моделей [38, 41].

Процедуры растительных гомологов были построены с использованием программного пакета Modeller 9v7 [42]. Комплексы растительных протеинфосфатаз с омега-амино кислотой реконструировали при помощи метода пространственного наложения промоделей растительных протеинфосфатаз с соответствующими комплексами омега-амино кислоты и протеинфосфатаз животных. Оптимизацию геометрии реконструированных промоделей и комплексов с омега-амино кислотой осуществляли с применением силового поля Amber3 [43] при помощи метода сопряженного градиента [44–46].

Анализ трехмерной структуры, аминокислотный состав сайта связывания и характер укладки полипептидной цепи протеинфосфатаз выполняли с применением программы Swiss-PdbViewer v.4.0.1 [47] и информации, представленной в базе данных классификации белковых структур SCOP (Structural Classification of Proteins – <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/>) [8].

Стабильность комплексов животных и растительных протеинфосфатаз с омега-амино кислотой оценивали на основании расчета молекулярной динамики с применением программного пакета GROMACS при использовании одноименного силового поля [48]. Все расчеты молекулярной динамики выполняли в водном окружении (модули «editconf» и «genbox»). Размеры водного бокса определялись размерами исследуемых комплексов и составляли 6,18 × 5,43 × 5,73 нм для протеинфосфатазы типа 1 и 5,90 × 6,47 × 5,46 нм для протеинфосфатазы типа 2А. Оптимизацию геометрии моделей осуществляли путем минимизации свободной энергии с применением вычислительных модулей «grompp» и «mdrun», силового поля ffgmx и алгоритма крутого спуска (steepestdescent) при максимальном количестве шагов 1000 и градиенте 0,1. Расчет молекулярной динамики проводили при температуре 300 °К в течение 100 нс. Файлы координат (\*.gro) и топологии (\*.itp) молекулы омега-амино кислоты для последующей оптимизации геометрии и расчетов молекулярной динамики комплексов растительных протеин-

фосфатаз с омега-амино кислотой в программе GROMACS были получены с помощью сервера PRODRG (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrp/prodrp.html>) [49].

Результаты расчетов молекулярной динамики для протеинфосфатаз животных и растений, комплексов протеинфосфатаза – омега-амино кислоты и омега-амино кислоты в свободном и связанном состоянии оценивали на основании среднеквадратического отклонения между атомами (RMSD) и значений конформационных энергий (энергия ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий, CE) [44].

Визуализацию поведения комплекса на протяжении молекулярной динамики осуществляли с применением программного пакета VMD 1.8.6 [50]. Качество моделей оценивали на основании данных карт Рамачандрана [51], значений среднеквадратических отклонений между атомами матричных структур и оптимизированных моделей растительных гомологов с применением программного пакета Swiss-PdbViewer v.4.0.1 [47].

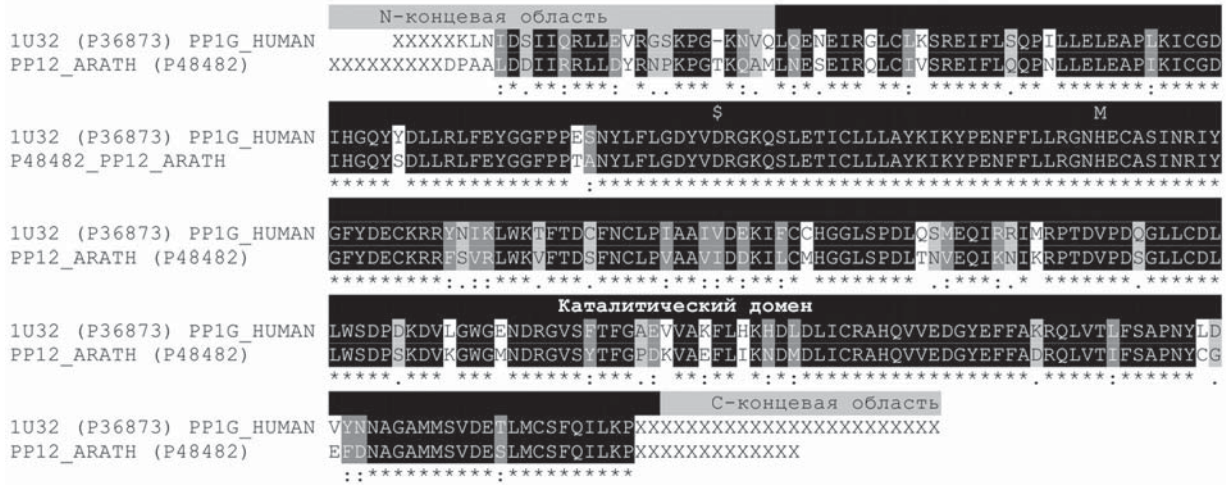
Оценку консервативности аминокислотного состава сайтов связывания, визуализацию и анализ полученных данных производили с помощью программы DS Visualizer 2.5 (Accelrys Software Inc. – <http://accelrys.com/>).

#### Результаты исследований и их обсуждение.

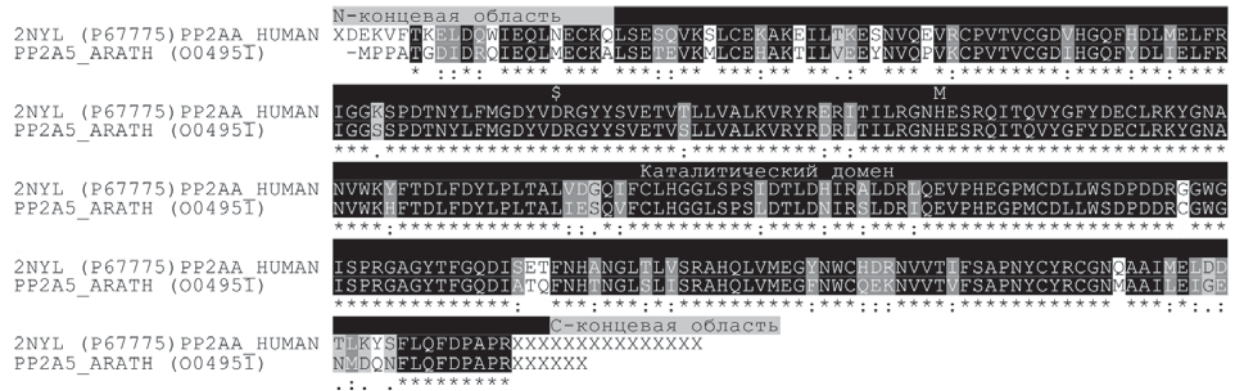
Ранее нами было показано, что среди серинтреониновых протеинфосфатаз *Arabidopsis thaliana* L. имеются представители семейств протеинфосфатаз 1, 2А и 2С [52, 53]. Поэтому на основании результатов анализа экспериментально полученного протеома *A. thaliana* для реконструкции комплексов растительных протеинфосфатаз и омега-амино кислоты были отобраны каталитические субъединицы протеинфосфатаз типов 1 и 2А (UniProt: P48482 и O04951). Результаты сканирования RCSB Protein Data Bank с применением алгоритма Blast (инструмент PDB «Sequence search») позволили обнаружить наличие экспериментально доказанных структур комплексов животных протеинфосфатаз типов 1 и 2А с омега-амино кислотой. Для дальнейшего профильного моделирования растительных протеинфосфатаз по гомологии были отобраны матричные PDB-структуры 1U32 (для протеинфосфатазы 1) и 2NYL (для протеинфосфатазы 2А). На рис. 2



Реконструкция пространственной структуры комплексов растительных протеинфосфатаз



**Рис. 2.** Парное выравнивание аминокислотных последовательностей матричной структуры PP1G из *H. sapiens* и ее растительного гомолога PP12 из *A. thaliana*. Здесь и на рис. 3 универсальным символом IUPAC – X обозначены аминокислотные остатки, отсутствующие в матричной структуре PP1G (PDB: 1U32), и соответствующие остатки растительного гомолога. Темно-серым обозначены идентичные аминокислотные остатки, серым – гомологичные остатки, белым – вариативные аминокислотные остатки (полное «несовпадение») физико-химических свойств в данных позициях. S – остатки, ответственные за связывание металлов; M – консервативные аминокислоты активного центра



**Рис. 3.** Парное выравнивание аминокислотных последовательностей матричной структуры PP2AA (UniProt: P67775) из *H. sapiens* и ее растительного гомолога – PP2A5 (UniProt: O04951) из *A. thaliana*. Обозначения см. рис. 2

и 3 приведены данные парных выравниваний (программа ClustalX) соответствующих фрагментов последовательностей протеинфосфатаз 1 и 2A животного и растительного происхождения. Результаты анализа выравниваний аминокислотных последовательностей протеинфосфатаз животных и их растительных гомологов свидетельствуют об их 77,5–79,5%-ной идентичности при 86,6–91,5%-ном сходстве.

Известно, что молекулы протеинфосфатаз типа 1 и 2A растений представляют собой глобулярные водорастворимые белки [1] и могут

существовать в виде отдельных каталитических субъединиц, гетеродимеров, состоящих из каталитической и регуляторной субъединицы, либо гетеротримеров, состоящих из каталитической и двух различных регуляторных субъединиц [1, 9, 54]. Для обоих типов растительных ПФ присущ тип укладки  $\alpha + \beta$ , идентичный их гомологам животного происхождения [10]. Полные аминокислотные последовательности, представленные в банке данных UniProt, содержат 307 остатков для протеинфосфатазы 2A (UniProt: O04951) и 312 остат-

ков для протеинфосфатазы 1 (UniProt: P48482). Молекулярная масса молекул этих белков из *A. thaliana* составляет 33,608 кДа в случае протеинфосфатазы 1 и 33,214 кДа — в случае протеинфосфатазы 2А. При этом объем реконструированных структур протеинфосфатаз 1 и 2А равен 24537 и 24072 Å<sup>2</sup> при общих зарядах их молекул, равных –5 и –6 соответственно. На рис. 4 и 5 (см. вклейку) представлены ленточные диаграммы пространственных структур протеинфосфатаз 1 и 2А из *A. thaliana*, реконструированных по гомологии с их животными аналогами.

Результаты анализа карт Рамачандрана, рассчитанных для протеинфосфатаз растений и животных, показали, что 94 % аминокислотных остатков протеинфосфатазы 1 и 96 % остатков протеинфосфатазы 2А имеют оптимальные значения углов внутреннего вращения φ и ψ, что свидетельствует об их нахождении в областях разрешенных конформаций [51]. В случае протеинфосфатазы 1 в запрещенных областях конформационной карты остаются 17 остатков, которые располагаются в непосредственной близости от границы участков с напряженной конформацией. В случае протеинфосфатазы 2А в запрещенных областях находятся 10 аминокислотных остатков. Следовательно, полученные данные свидетельствуют о высокой достоверности реконструированных моделей пространственной структуры молекул протеинфосфатаз из *A. thaliana*. Общие отличия матричных PDB-структур протеинфосфатаз 1U32 (протеинфосфатаза 1) и 2NYL (протеинфосфатаза 2А) из *Homo sapiens* и реконструированных моделей протеинфосфатаз из *A. thaliana* были определены на основании суммарного значения среднеквадратического отклонения (RMSD). При этом общее значение RMSD составило 1,9 Å для протеинфосфатазы 1 и 1,7 Å — для протеинфосфатазы 2А. Считается, что структуры имеют достоверное сходство, если значение RMSD составляет ≤3 Å [38]. Таким образом, данные анализа карт Рамачандрана и значения RMSD свидетельствуют о высоком сходстве пространственной укладки контрольных протеинфосфатаз 1 и 2А из *H. sapiens* и их растительных гомологов из *A. thaliana*.

Последующая реконструкция комплексов растительных протеинфосфатаз с окадаиновой

кислотой была выполнена путем профильного моделирования с использованием экспериментально полученных структур матричных комплексов окадаиновой кислоты и протеинфосфатаз типа 1 и 2А из *H. sapiens* (PDB: 1U32 и 2NYL). Высокий процент идентичности аминокислотных последовательностей и сходство укладки протеинфосфатаз животного и растительного происхождения позволяют нам сделать вывод об идентичности топологии сайтов связывания окадаиновой кислоты с молекулами животных и растительных протеинфосфатаз 1 и 2А. В пользу этого также косвенно свидетельствует большой размер лиганда и, соответственно, поверхности сайтов интерактивного взаимодействия ПФ1 и ПФ2А с окадаиновой кислотой.

Сравнительный анализ пространственной структуры комплексов протеинфосфатазы 1 и 2А из *A. thaliana* и *H. sapiens* в комплексе с окадаиновой кислотой позволил идентифицировать аминокислотный состав сайтов связывания (рис. 6 и 7, см. вклейку): R96-x (18)-H125-x (3)-S129-I130-x-I133-Y134-x (71)-W206-x (13)-D220-R221-G222-V223-x (26)-V250-x (21)-Y272-L273-x-V275-Y276 — в случае протеинфосфатазы 1 из *H. sapiens* и R102-x (18)-H131-x (3)-S135-I136-x-I139-Y140-x (71)-W212-x (13)-D226-R227-G228-V229-x (26)-V257-x (21)-Y278-C279\*-x-E281\*-F282\* (нумерация аминокислотных остатков приведена согласно положениям элаймента, см. рис. 2) — в случае протеинфосфатазы 1 из *A. thaliana*. При этом были установлены отличия по последним трем аминокислотным остаткам сайтов связывания (\*): L273, V275, Y276 (ПФ1 из *H. sapiens*) и C279, E281, F282 (ПФ1 из *A. thaliana*) соответственно. В случае протеинфосфатазы 2А сайт связывания окадаиновой кислоты у гомолога из *A. thaliana* оказался идентичным по аминокислотному составу ПФ2А из *H. sapiens*: R89-x (27)-N117-H118-x (3)-Q122-I123-x (3)-Y127-x (61)-V189-P190-H191-x (8)-W200-x (12)-P213-R214-G215-A216-x (26)-L243-x (21)-Y265-C266-x-R268-C269, но с шагом смещения порядка нумерации на два остатка (см. рис. 3).

Результаты парного выравнивания полных последовательностей гомологичных протеинфосфатаз 2А из *A. thaliana* и *H. sapiens* выявили их 79,5%-ную идентичность при 91,5%-ном

сходстве аминокислотных остатков, соответственно аминокислотный состав протеинфосфатазы 1 оказался идентичным на 77,5 % при 86,6%-ном сходстве. В то же время аминокислотный состав интерактивных сайтов связывания окадаиновой кислоты имел 100%-ную идентичность в случае протеинфосфатазы 2А и 85,5%-ную идентичность в случае протеинфосфатазы 1. Исходя из этих данных, можно говорить о высокой консервативности сайта связывания окадаиновой кислоты протеинфосфатазами 1 и 2А из *A. thaliana* и *H. sapiens*.

Стабильность комплексов животных и растительных протеинфосфатаз 1 и 2А с окадаиновой кислотой оценивали с помощью метода длительной молекулярной динамики в интервале 100 нс. При этом для каждого типа протеинфосфатаз в качестве контроля использовали результаты расчетов динамики свободного лиганда, окруженного соответствующим периодическим водным боксом. На протяжении расчета динамики молекул животных и растительных протеинфосфатаз 1 и 2А отсутствовали сообщения о некорректных или недопустимых значениях конформационных параметров, что свидетельствует о высоком качестве и стабильности молекулярных комплексов [38].

Для животных и растительных протеинфосфатаз, комплексов протеинфосфатаза — окадаиновая кислота и окадаиновой кислоты в свободном и связанном состоянии результаты молекулярной динамики анализировали с учетом двух критериев: среднеквадратического отклонения между атомами (конформационные колебания, RMSD) и конформационной энергии (энергия ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий, SE). Полученные данные свидетельствуют о том, что амплитуда RMSD (рис. 8) и уровень конформационной энергии (рис. 9) уменьшаются и стабилизируются при связывании с молекулами обоих типов исследуемых протеинфосфатаз. При этом в комплексах протеинфосфатаз из *A. thaliana* эти изменения более выражены по сравнению с комплексами протеинфосфатаз из *H. sapiens*. Результаты исследования молекулярной динамики окадаиновой кислоты в связанном и свободном состоянии также подтверждают тот факт, что стабилизация уровней энергетических и конформационных колебаний происхо-

дила во всех случаях очень быстро — в течение первых 2 нс.

Известно, что снижение уровня энергии лиганда (в данном случае энергии окадаиновой кислоты) при переносе из водного окружения в определенную область белка является достаточным доказательством возможности образования комплекса «белок—лиганд» [46]. С учетом этого уменьшение и стабилизация амплитуды RMSD и уровня конформационной энергии согласно анализу результатов молекулярной динамики свидетельствует в пользу того, что предполагаемые области поверхности протеинфосфатаз 1 и 2А растений с высокой вероятностью являются сайтами связывания окадаиновой кислоты. Амплитуда молекулярных колебаний уменьшается и стабилизируется, причем в случае протеинфосфатазы 2А более существенно, чем в случае протеинфосфатазы 1, что на клеточно-физиологическом уровне может означать дифференциальную чувствительность регуляторных путей, в которых участвуют различные типы фосфатаз, к действию окадаиновой кислоты.

Уровни конформационной энергии окадаиновой кислоты при переносе из водного окружения в сайты связывания на поверхности молекул всех исследованных протеинфосфатаз существенно уменьшались (в пределах от 240,7 до 684,9 кДж/моль), что свидетельствует о большей энергетической выгодности связанного с протеинфосфатазой состояния окадаиновой кислоты по сравнению со свободным. Стабилизация уровней колебаний энергии также происходила в очень коротком временном промежутке — в течение первых 2 нс расчета молекулярной динамики, что свидетельствует о высоком качестве рассчитанных нами исходных структур. Следует отметить, что уровень энергетического плато для молекулы протеинфосфатазы растений имеет в среднем величину 1506 кДж/моль энергии.

Полученные результаты подтверждают тот факт, что амплитуда конформационных колебаний уменьшается и стабилизируется в моделях растений более значительно, чем в белках животных, и в случае протеинфосфатазы 2А также более выражено, чем в случае протеинфосфатазы 1. В целом наши данные относительно структурных механизмов связывания



окадаиновой кислоты с протеинфосфатазами, а также доказательство того факта, что ее сродство к протеинфосфатазе 2А выше, чем к протеинфосфатазе 1, позволяют еще раз подтвердить ранее высказанное предположение о том, что протеинфосфатаза 2А может играть ключевую роль в регуляции роста корневых волосков и участия микротрубочек в этом процессе [29].

Таким образом, результаты реконструирования пространственной структуры протеинфосфатаз 1 и 2А из *A. thaliana* убедительно свидетельствуют об общности структурных механизмов взаимодействия данных типов протеинфосфатаз с окадаиновой кислотой у животных и высших растений. Высокий уровень идентичности аминокислотного состава сайтов связывания окадаиновой кислоты для протеинфосфатаз типа 1 и 2А различного происхождения свидетельствует о высокой консервативности этих сайтов в эволюционно отдаленных парах ПФ1 и ПФ2А из *H. sapiens* и *A. thaliana*. Связывание окадаиновой кислоты в проанализированных сайтах приводит к существенному уменьшению амплитуды ее молекулярных колебаний в комплексе как с животными, так и растительными протеинфосфатазами, что свидетельствует о стабилизации ее пространственной структуры в связанном состоянии по сравнению со свободным [44, 45]. Конформационная энергия окадаиновой кислоты в результате переноса из водного окружения в сайты связывания на поверхности молекул всех исследуемых протеинфосфатаз существенно уменьшается, что свидетельствует о большей энергетической выгоды связанного состояния по сравнению со свободным. При этом уменьшение и стабилизация молекулярных и энергетических колебаний окадаиновой кислоты при связывании с протеинфосфатазой 2А происходит быстрее и эффективнее, чем в соответствующем сайте на поверхности молекулы протеинфосфатазы 1. Это свидетельствует [44, 45] о более высоком сродстве данного ингибитора к протеинфосфатазе 2А, чем к протеинфосфатазе 1. Экспериментальное определение пороговых значений концентраций окадаиновой кислоты, необходимых для дифференцированной регуляции активности обоих типов протеинфосфатаз у

растений, может быть использовано в дальнейшем в качестве эффективного инструмента для изучения клеточных процессов, связанных с обратимым фосфорилированием белков.

*Настоящая работа выполнена в рамках проекта УНТЦ № 5215: «Поиск эффективных ингибиторов протеинфосфатаз при помощи нанохимических подходов и оценка их биологической эффективности in silico» при использовании вычислительных возможностей и ресурсов Украинского Академического Грива (УАГ — <http://uag.bitp.kiev.ua/index.php>).*

*D.A. Samofalova, P.A. Karpov,  
A.Y. Nyporko, Ya.B. Blume*

#### RECONSTRUCTION OF SPATIAL STRUCTURE OF PLANT PROTEIN PHOSPHATASE TYPE-1 AND -2A IN COMPLEX WITH OKADAIC ACID

The homology modeling, based on known temple structures of *Homo sapiens* protein phosphatase type-1 and -2A was implemented. The spatial structures of the human protein phosphatases and their plant homologs from *Arabidopsis thaliana* was predicted. The quality of models was confirmed by conformational analysis and root mean square deviations. The sites of okadaic acid binding in molecules of plant protein phosphatases (type-1 and -2A) were proved by the data of comparative analysis and molecular dynamics.

*Д.О. Самофалова, П.А. Карпов,  
О.Ю. Ныпорко, Я.Б. Блюм*

#### РЕКОНСТРУКЦІЯ ПРОСТОРОВОЇ СТРУКТУРИ КОМПЛЕКСІВ РОСЛИННИХ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ ТИПУ 1 ТА 2А З ОКАДАЇНОВОЮ КИСЛОТОЮ

На підставі відомих просторових структур протеїнфосфатаз 1 та 2А з *Homo sapiens* виконано профільне моделювання їхніх рослинних гомологів з *Arabidopsis thaliana*. Якість побудованих моделей підтверджена значеннями середньоквадратичних відхилень між атомами, а також даними конформаційного аналізу. За результатами порівняльного аналізу і молекулярної динаміки ідентифіковано і підтверджено сайти зв'язування окадаїнової кислоти молекулами протеїнфосфатаз типів 1 і 2А з *A. thaliana*.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Luan S. Protein phosphatases in plants // Annu. Rev. Plant Biol. — 2003. — 54. — P. 63–92.
2. Wang H., Chevalier D., Larue C., Cho S.K., Walkera J.C. The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana* // *Arabidopsis Book*. — Rockville, 2007. — P. 1–38.

3. Wu J.Q., Guo J.Y., Tang W., Yang C.-S., Freel C.D., Chen C., Nairn A.C., Kornbluth S. P1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation // *Nature Cell Biol.* – 2009. – **11**. – P. 644–651.
4. Almo S., Bonanno J., Sauder M. Structural genomics of protein phosphatases // *J. Struct. Funct. Genom.* – 2007. – **8**. – P. 121–140.
5. Wolstencroft K., Lord P., Taberner L., Brass A., Stevens R. Protein classification using ontology classification // *Bioinformatics.* – 2006. – **22**, № 14. – P. e530–e538.
6. Kerk D., Templeton G., Moorhead G.B.G. Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants // *Plant Physiol.* – 2008. – **146**. – P. 351–367.
7. Purich D.L. Enzyme kinetics and mechanism : Detection and characterization of enzyme reaction intermediates // *Meth. Enzymol.* – 2002. – **354**. – P. 515.
8. Andreeva A., Howorth D., Brenner S., Hubbard T., Chothia C., Murzin A. SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data // *Nucl. Acids. Res.* – 2004. – **32**. – P. 226–229.
9. Mamby M. The 3D structure of protein phosphatase 2A: new insights into a ubiquitous regulator of cell signaling // *ACS Chem. Biol.* – 2007. – **2**, № 2. – P. 99–103.
10. Xing Y., Xu Y., Chen Y., Jeffrey P., Chao Y., Zheng L., Li Z., Strack S., Stock J., Shi Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins // *Cell.* – 2006. – **127**. – P. 341–352.
11. Fagerholm A., Habrant D., Koskinen A.M.P. 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.
12. Murakami Y., Oshima Y., Yasumoto T. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima* // *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* – 1982. – **48**, № 1. – P. 69–72.
13. Murata M., Shimatani M., Sugitani H., Oshima Y., Yasumoto T. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning // *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* – 1982. – **48**, № 4. – P. 549–552.
14. Matsumori N., Murata M., Tachibana K. Conformational analysis of natural products using long-range carbon-proton coupling constants : Three-dimensional structure of okadaic acid in solution // *Tetrahedron.* – 1995. – **51**, № 45. – P. 12229–12238.
15. Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Van Engen D., Clardy J., Gopichand Y., Schmitz F.J. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria* // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1981. – **103**, № 9. – P. 2469–2471.
16. Sasaki K., Murata M., Yasumoto T., Mseskes G., Takai A. Affinity of okadaic acid to type-1 and type-2A protein phosphatases is markedly reduced by oxidation of its 27-hydroxyl group. // *Biochem. J.* – 1994. – **298**. – P. 259–262.
17. Haystead T., Sim A., Carling D., Honnor R., Tsukitani Y., Cohen P., Hardie D.G. Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism // *Nature.* – 1989. – **337**, № 6202. – P. 78–81.
18. 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. – **266**, № 4. – P. 2099–2103.
19. Takai A., Bialojan C., Troschka M., Rüegg C. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin // *FEBS Lett.* – 1987. – **217**, № 1. – P. 81–84.
20. Abdul-Ghani M., Kravitz E., Meiri H., Rahamimoff R. Protein phosphatase inhibitor okadaic acid enhances transmitter release at neuromuscular junctions // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1991. – **88**, № 5. – P. 1803–1807.
21. Saganuma M., Fujiki H., Suguri H., Yoshizawa S., Hirota M., Nakayasu M., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Sugimura T. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1988. – **85**, № 6. – P. 1768–1771.
22. Contour-Galceran M.-O., Sidhu A., Prévost G., Bigg D., Ducommun B. What's new on CDC25 phosphatase inhibitors // *Pharmacol. Therap.* – 2007. – **115**, № 1. – P. 1–12.
23. Dawson J., Holmes C. Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins // *Front. Biosci.* – 1999. – **4**. – P. 646–658.
24. Vale C., Botana L. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins // *FEBS J.* – 2008. – **275**. – P. 6060–6066.
25. 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. – **264**. – P. 187–192.
26. MacKintosh C., Coggins J., Cohen P. Plant protein phosphatases. Subcellular distribution, detection of protein phosphatase 2C and identification of protein phosphatase 2A as the major quinate dehydrogenase phosphatase // *Biochem. J.* – 1991. – **273**, Pt. 3. – P. 733–738.
27. Senna R., Simonin V., Silva-Neto M.A.C., Fialho E. Induction of acid phosphatase activity during germination of maize (*Zea mays*) seeds // *Plant Physiol. Biochem.* – 2006. – **44**, № 7–9. – P. 467–473.
28. Smith R.D., Walker J.C. Plant protein phosphatases //



- Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996. – 47. – P. 101–125.
29. Шеремет Я.А., Емец А.И., Вербелен Ж.-П., Блюм Я.Б. Влияние оксадиновой кислоты на морфологию корня *Arabidopsis thaliana* и организацию микротрубочек в его клетках // Цитология и генетика. – 2009. – 43, № 1. – С. 3–10.
  30. Cohen P., Cohen P.T. Protein phosphatases come of age // J. Biol. Chem. – 1989. – 264, № 36. – P. 214–358.
  31. Maynes J., Bateman K., Cherney M., Das A., Luu H., Holmes C., James M. Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1 // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, № 47. – P. 44078–44082.
  32. Maynes J., Perreault K., Cherney M., Luu H., James M., Holmes C. Crystal structure and mutagenesis of a protein phosphatase-1: calcineurin hybrid elucidate the role of the beta12-beta13 loop in inhibitor binding // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, № 41. – P. 43198–43206.
  33. Xu Y., Xing Y., Chen Y., Chao Y., Lin Z., Fan E., Yu J., Strack S., Jeffrey P., Shi Y. Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme // Cell. – 2006. – 127. – P. 1239–1251.
  34. Melcher K., Zhou X., Xu H. Thirsty plants and beyond: structural mechanisms of abscisic acid perception and signaling // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2010. – 20, № 6. – P. 722–729.
  35. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt) // Nucl. Acids Res. – 2008. – 36. – D. 190–195.
  36. Jeannotte F., Thompson J., Gouy M., Higgins D., Gibson J. Multiple sequence alignment with Clustal X // Trends Biochem. Sci. – 1998. – 23. – P. 403–415.
  37. 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. – 23. – P. 2947–2948.
  38. Venselaar H., Krieger E., Vriend G. Homology modeling // Structural Bioinformatics / Eds P.E. Bourne, H. Weissig. – Hoboken NJ : John Wiley & Sons, 2009. – P. 715–732.
  39. Diella F., Gould C.M., Chica C., Via A., Gibson T. Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites – update // Nucl. Acids Res. – 2008. – 36. – P. 240–254.
  40. Marvin J., Padilla D., Ravichandran V., Schneider B., Thanki N., Weissig H., Westbrook J.D., Zardecki C. The Protein Data Bank // Biol. Crystallogr. – 2002. – 58. – P. 899–907.
  41. Claverie J.-M., Noterdame C. Bioinformatics for dummies. – New York : Wiley Publ., 2007. – 436 p.
  42. Eswar N., Marti-Renom M., Webb B., Madhusudhan M., Eramian D., Shen M., Pieper U., Sali A. Comparative protein structure modeling with MODELLER. current protocols in bioinformatics // John Wiley & Sons. – 2006. – P. 5.6.1–5.6.30.
  43. Ponderand J., Case D. Force fields for protein simulations // Adv. Prot. Chem. – 2003. – 66. – P. 27–85.
  44. Höltje H.-D., Sippl W., Rognan D., Folkers G. Molecular modeling : Basic principles and applications. – Hoboken NJ : John Wiley & Sons (Wiley-VCH), 2008. – 320 p.
  45. Bourne P.E., Weissig H. Structural Bioinformatics. – Hoboken NJ : John Wiley & Sons, 2009. – P. 715–732.
  46. Ramachandran K.I., Deepa G., Namboori K. Computational chemistry and molecular modeling : Principles and applications. – Berlin; Heidelberg : Springer-Verlag, 2008. – 397 p.
  47. Guex N., Peitsch M. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer : An environment for comparative protein modeling // Electrophoresis. – 1997. – 18. – P. 2714–2723.
  48. Hess B., Lindahl M., van der Spoel D., Berendsen H. GROMACS 4.0 // Manual. – 2007. – 350 p.
  49. Schuettelkopf A., van Aalten D.M.F. PRODRG – a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes // Acta Crystallogr. – 2004. – 60. – P. 1355–1363.
  50. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD – visual molecular dynamics // J. Mol. Graph. – 1996. – 14. – P. 33–38.
  51. Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations // J. Mol. Biol. – 1963. – 7. – P. 95–99.
  52. Nyporko A., Samofalova D., Blume Y.B. Phosphatome of *Arabidopsis thaliana* as a target for structural bioinformatics approaches // Abstracts of the 7<sup>th</sup> Plant Genom. Eur. Meet. (7 Plant GEM), (24–27 September, 2008). – Albena, Bulgaria, 2008. – P. 02.7. – P. 81.
  53. Samofalova D., Nyporko A., Blume Y. Structural peculiarities of plant protein phosphatase interaction with okadaic acid // 7<sup>th</sup> Int. Conf. Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology. Abstracts of the BGRS/SB conference (20–27 June, 2010). – Novosibirsk, Russia, 2010. – P. 254.
  54. Mumby M., Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth // Physiol. Rev. – 1993. – 73. – P. 673–699.
  55. Egloff M.P., Cohen P.T., Reinemer P., Barford D. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate // J. Mol. Biol. – 1995. – 254. – P. 942–959.

Поступила 20.01.10