

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ ІНГІБІТОРІВ ІЗ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗАМИ, ЩО ПОТЕНЦІЙНО ПОВ'ЯЗАНІ З ЦИТОСКЕЛЕТОМ

Специфічні інгібітори ферментів є важливим інструментом сучасних клітинно-біологічних досліджень, спрямованих на вивчення особливостей функціонування та з'ясування функціональної ролі окремих ензимів або їх груп. Так, наприклад, певні відмінності перебігу молекулярних механізмів зворотного фосфорилування білків у регуляції клітинного циклу тварин є одним із прикладів, що зумовлює необхідність пошуку більш специфічних інгібіторів як протеїнкіназ, так і протеїнфосфатаз [1, 2].

Для серин/треонінових протеїнфосфатаз встановлена селективна дія таких інгібіторів, як оокадаїнова кислота, мікроцистин-LR, калікулін А, таутоміцин, нодуларин-R і мотупорин (нодуларин-V), кантаридин, кантаридинова кислота і ендотал, завдяки чому вони стали важливим інструментом дослідження ролі цих ензимів у внутрішньоклітинній трансдукції сигналів [3]. Оокадаїнова кислота, мікроцистин-LR і його гідрогенізована форма дигідромікроцистин мають схожий механізм дії [4]. Будучи специфічними інгібіторами тваринних протеїнфосфатаз 1 і 2А, вони характеризуються меншим рівнем спорідненості до протеїнфосфатаз типу 2В і зовсім не інгібують фосфатази типу 2С [3, 4]. Раніше нами було описано специфічні фізіологічні та клітинні ефекти оокадаїнової кислоти на коренях *Arabidopsis thaliana* [5], а у дослідях *in silico* також продемонстровано специфічність її зв'язування з протеїнфосфатазами 1 та 2А рослинного походження [6]. Дві сполуки – таутоміцин [7] та калікулін А – на сучасному етапі позиціонуються як інгібітори, що за константою інгібування перевищують оокадаїнову кислоту [8], але частіше використовуються під час дослідження дефосфорилування різними підтипами протеїнфосфатаз. Подібні за структурою і механізмом дії до мікроцистинової групи циклічні низькомолекулярні пептидні сполуки – нодуларин-R і мотупорин, які мають незначні структурні відмінності, є потужними інгібіторами протеїнфосфатаз 1 та 2А [9].

Остання група інгібіторів серин/треонінових протеїнфосфатаз, представники якої, на відміну від більшості інших інгібіторів протеїнфосфатаз, котрі за походженням є морськими токсинами, належить до індукторів отруйної гемолімфи жуків родини *Meloidae* [10]. Типовий їх представник – кантаридин, селективний інгібітор протеїнфосфатази 2А, який у водному середовищі гідролізується до кантаридинової кислоти, а також ендотал – інгібітор середньої сили, що діє виключно на протеїнфосфатазу 2А [10].

Більшість інгібіторів тирозин-специфічних фосфатаз представлена групами потужних, проте лише в деяких випадках селективних інгібіторів. У цілому їх поділяють на три класи: 1) інгібітори тирозинфосфатаз 1-го класу (класичні тирозинфосфатази); 2) інгібітори тирозинфосфатаз 2-го класу (тирозинфосфатази CDC25: А, В, С); 3) інгібітори тирозинфосфатаз 3-го класу (низькомолекулярні (LMW) тирозинфосфатази).

Найбільш відомим представником класу інгібіторів класичних рецепторних, нерелеваторних і дуальних тирозинфосфатаз є ортованадат натрію або ванадат. Будучи конкурентним інгібітором, ортованадат натрію забезпечує максимально ефективно інгібування тирозинфосфатаз [11], окислюючи цистеїн, який входить до складу каталітичного центру цих ферментів [12]. Також до інгібіторів тирозинфосфатаз першого типу відносять оксид феніларсину [13], дефостатин [14], етил-3,4-дефостатин [15] і комплексні інгібітори тирозинфосфатаз I, II, III [16]. У деяких випадках, зокрема під час дії ванадату і молібданату, більш значне інгібування тирозинфосфатаз проявляють не інтактні, а окисдовані форми – перванадат і пермомолібданат [12].

До другого класу відносяться інгібітори дуальних протеїнфосфатаз CDC25 (включаючи три ізоформи: А, В, С). Типовими представниками інгібіторів цього класу є ванадат, NO і перекис водню [11]. До 3-го класу інгібіторів низькомолекулярних тирозинфосфатаз відносяться такі сполуки, як ванадат і бензойна кислота [17]. Остан-

ня, окрім низькомолекулярних тирозинфосфатаз, також здатна інгібувати протеїнфосфатази типу 1В (РТР1В) [17]. Водночас, незважаючи на великий обсяг досліджень, сполуки, які мали б специфічну афінність до цілком конкретних тирозинфосфатаз, досі не відомі.

Оскільки на сьогодні не викликає сумнівів участь протеїнфосфатаз у процесах регуляції клітинного циклу, важливим питанням є з'ясування їх безпосередньої взаємодії та функціонального впливу на організацію та динаміку цитоскелету, перш за все мікротрубочок [18–20]. Зокрема, роль протеїнфосфатаз у регуляції мікротрубочок найчастіше пов'язують із представниками серин/треонінових протеїнфосфатаз РР1, РР2А, РР4, РР6 і РР7 [18, 19, 21, 22], а також групи, що об'єднує класичні та дуальні тирозинфосфатази: РТР1В, CDC25, РТРН1, РТРН11, РТРН13, РТР14, DSP-DEP1, DSP7, DSP14В [23–27]. Однак попри велику кількість існуючих інгібіторів протеїнфосфатаз, питання визначення їх селективності залишається актуальним. Значний прогрес у цьому напрямку може бути досягнутий шляхом поєднання методів традиційного драг-дизайну з методами молекулярного моделювання, структурної біо- і хемоінформатики. Тому завданням нашої роботи було провести ревізію відомих інгібіторів протеїнфосфатаз, що потенційно пов'язані з цитоскелетом, та визначити особливості їх взаємодії з відповідними ферментами.

Матеріали і методи

Інгібітори протеїнфосфатаз було відібрано на підставі матеріалів наукової літератури, результатів патентного пошуку (<https://patents.google.com/>), а також аналізу баз даних PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>), ZINC (<http://zinc.docking.org/>), eMolecules (<https://www.emolecules.com/>) та ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Порівняння релаксованих і біологічно активних конформацій лігандів із комплексів, депонованих у RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), було виконано з використанням online сервісу ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu/>) та програм LigandScout (<http://www.inteligand.com/>) і BIOVIA DS Visualizer (<http://accelrys.com/>). Структури сайтів зв'язування інгібіторів на поверхні досліджених протеїнфосфатаз, а також дослідження ролі молекул води у ліганд-білковій взаємодії було виконано із використанням online сервісів PoseView (<http://poseview.zbh.uni-hamburg.de>) і CCDC Relibase ([\[ccdc.cam.ac.uk\]\(http://ccdc.cam.ac.uk\)\). Релаксація та підготовка речовин була виконана із використанням online сервісу PRODRAG \(\[davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrag\]\(http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrag\)\) та силових полів MM+ і CHARMM \(Gromacs\).](http://relibase.</p>
</div>
<div data-bbox=)

Результати та обговорення

За результатами проведеного пошуку в базах даних Google Patents, PubChem, ZINC, eMolecules і ChEMBL було відібрано 231 речовину з селективною дією щодо серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз та 5700 речовин, специфічних до тирозинфосфатаз. Зведену групу потенційних інгібіторів було перевірено згідно з правилами драг-подібності, а також на наявність певних фрагментів – можливих фармакофорів. Кінцева вибірка складала структури, що входять до експериментально доведених комплексів із відповідними ферментами (табл.). З них 11 селективних інгібіторів серин/треонінових протеїнфосфатаз – окадаїнова кислота (ОКА), динофізистоксин (ХТ1,ХТ2), мікроцистин-LR (PRD_000212), дигідромікроцистин (мікроцистин-LA, PRD_000215), таутоміцин (Е7В), калікулін (СYU), нодуларин (PRD_000214), мотупорин (PRD_000213), норкантидин (ENL), кантаридинова кислота (NHC), ендотал (ENLconf) та 9 інгібіторів тирозинфосфатаз: 3-(оксаліламіно)-нафталін-2-карбонова кислота (761); 6-(оксаліламіно)-1h-індол-5-карбонова кислота (ОAI); 5-йод-2-(оксаліламіно)-бензойна кислота (878); 2-(оксаліламіно)-бензойна кислота (ОБА); [2-бромо-4-[(2R)-3-оксо-2,3-дифенілпропіл]феніл}(дифторо)метил]-фосфонова кислота (825); 7-(1,1-діоксо-1h-(бензо[d]ізотіазол-3-іл) оксиметил)-2-(оксаліламіно)-4,7-дигідро-5h-тієно[2,3-с]піран-3-карбонова кислота (DBD); фенілетиленсульфонат (PSY); (4-{(2S)-2-[(терт-бутоксикарбоніл)аміно]-3-метокси-3-оксопропіл} феніл)метанселенова кислота (ZYZ); (етиленсульфоніл)бензен (PVS).

На підставі RCSB PDB-BLAST пошуку були виявлені всі депоновані у Protein Data Bank експериментально доведені структури комплексів протеїнфосфатаз з селективними інгібіторами: 23 структури серин/треонін-специфічних і 9 структур тирозинфосфатаз. Відповідні низькомолекулярні речовини були перевірені на правильність структури, кількість донорів і акцепторів водневих зв'язків, кількість зв'язків, які вільно обертаються, і площу полярної поверхні з використанням online сервісу ZINCPharmer та програми LigandScout (табл.). Встановлено, що більшість

Результати аналізу інгібіторів серин/треонін- та тирозин-специфічних протеїнфосфатаз

Інгібітор	PDB	Тип ПФ	UniProtKB	Кількість молекул води, які приймають участь у взаємодії ліганду з білком	Наявність донорів/акцепторів у структурі інгібітору	Амінокислот. склад сайтів зв'язування лігандів з ПФ	
СЕРИН/ТРЕОНІН-СПЕЦИФІЧНІ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗИ							
1.	Норкантаридин	3H61	PPP5	P53041	5	1/8	3
2.	Кантаридинова кислота	3H68, 3H63, 3H67, 3H62	PPP5	P53041	5	1/8	2
3.	Ендотал	3H69, 3H64	PPP5	P53041	5	2/5	1
4.	Окадаїнова кислота	2IE4	PP2AA	P36873	1	1/5	5
		1U32, 1JK7	PP1G	P62136	1		4
5.	Мікроцистин-LR	2NYM, 2NYL, 2NPP	PP2AA	P67775	-	1/6	11
		1FJM, 3DW8	PP1A	P62139			10
6.	Дигідромікроцистин	2BDX	PP1G	P36873			12
7.	Калікулін А	1IT6	PP1G	P36873	5	1/6	4
8.	Нодуларин-R	3EGH, 3E7A	PP1A	P62136	18	1/6	9
9.	Мотупорин	2BCD	PP1G	P36873	4	1/6	5
10.	Таутоміцин	3E7B	PP1A	P62136	15	2/6	6
11.	Динофізистоксин	3K7V, 3K7W	PP2AA	P67775	1	1/5	5
ТИРОЗИН-СПЕЦИФІЧНІ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗИ							
1.	761	1C84	PTP1B	P18031	1	1/5	8
2.	OAI	1C83	PTP1B	P18031	1	2/5	11
3.	878	1ECV	PTP1B	P18031	1	1/5	8
4.	OBA	1C85	PTP1B	P18031	1	1/5	10
5.	825	3CWE	PTP1B	P18031	3	1/3	10
6.	DBD	1L8G	PTP1B	P18031	2	1/7	8
7.	PSY	3BM8	PTP yopH	P15273	-	1/3	7
8.	ZYZ	3D9C	PTP1B	P18031	2	1/0	3
9.	PVS	3BLU	PTP yopH	P15273	1	2/0	4

інгібіторів мали одну область можливого зв'язування донорів водневих зв'язків, окрім 4-х речовин, що мали декілька таких областей: ендоталу – селективного інгібітора протеїнфосфатази PP5, таутоміцину інгібітору протеїнфосфатази PP1 та двох інгібіторів тирозинфосфатаз – OAI і PVS.

Дослідження механізмів зв'язування 20-ти відібраних інгібіторів із ферментами дозволило встановити консервативні амінокислотні залишки, що безпосередньо зв'язують ліганд (за допомогою сервісу PoseView) (табл.). Варіабельні амінокислотні залишки сайтів, що відповідають за підтримку ліганду на поверхні ферментів, було встановлено на підставі аналізу результатів короткочасної молекулярної динаміки комплексів з використанням силових полів MM+ і CHARMM у програмі Gromacs. Зокрема, було встановлено, що група кантаридинових інгібіторів утворює

зв'язки з іонами металів – кофакторами активних центрів досліджуваних протеїнфосфатаз. Так, кантаридинова кислота і норкантаридин утворюють зв'язки з Mn^{2+} , тоді як ендотал зв'язується з двома молекулами Zn^{2+} .

Завдяки структурному аналізу в on-line сервісі CCDC Relibase було встановлено, що для взаємодії майже всіх досліджених інгібіторів з цільовими протеїнфосфатазами необхідно від 1-ї до 12-ти молекул води. Винятком є мікроцистин-LR, дигідромікроцистин і PSY (фенілетилсульфонат), зв'язування яких відбувається завдяки ковалентній взаємодії (табл.). На підставі аналізу топології досліджених лігандів із використанням програми BIOVIA DS Visualizer було створено локальну базу даних, що містить готові для молекулярного докінгу структури інгібіторів, їх детальний опис, файли топології, отрима-

ні за допомогою сервера PRODRAG, та інтерактивні посилання на відповідні статті бази даних PubChem.

Висновки

У результаті дослідження проведена ревізія інгібіторів протеїнфосфатаз, що належать до різних типів і потенційно здатні впливати на структуру і динаміку мікротрубочкового цитоскелету. Встановлено особливості взаємодії серин/треонін- і тирозинфосфатаз із селективними інгібіторами. Показано, що ліганд-білкова взаємодія із сайтами зв'язування в більшості випадків відбувається за участі іонів металів та молекул води. На підставі пошуку з використанням дескрипто-

рів і аналізу можливих фармакофорів було створено бібліотеку моделей структур інгібіторів протеїнфосфатаз, що пройшли етап релаксації методом молекулярної динаміки і підготовлені для подальшого молекулярного докінгу. Відпрацьований алгоритм пошуку інгібіторів тваринних протеїнфосфатаз дозволяє подальше дослідження особливостей їх взаємодії з протеїнфосфатазами рослин.

Дослідження було виконано за використання потужностей Грід-кластеру Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України та віртуальної організації CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/csllabgrid>).

ЛІТЕРАТУРА

- Samofalova D.A., Karpov P.A., Blume Ya.B. Bioinformatic comparison of human and higher plant phosphatomes // *Cytol. Genet.* – 2015. – 49, № 4. – P. 207–219.
- 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. – 11 Suppl 1. – S14. – Режим доступу: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-S1-S14>.
- Dawson J.F., Holmes C.F. Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins // *Front. Biosci.* – 1999. – 4. – D. 646–658.
- Vale C., Botana L. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins // *FEBS J.* – 2008. – 275. – P. 6060–6066.
- Sheremet Ya.A., Yemets A.I., Verbelen J.-P., Blume Ya.B., The effect of okadaic acid on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubule organization in its cells // *Cytol. Genet.* – 2009. – 43, № 1. – P. 1–8.
- Samofalova D.A., Karpov P.A., Nyporko A.Y., Blume Ya.B. Reconstruction of spatial structure of plant protein phosphatase type-1 and -2A in complex with okadaic acid // *Cytol. Genet.* – 2011. – 45, № 3. – P. 153–162.
- MacKintosh C., Klumpp S. Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A // *FEBS Lett.* – 1990. – 277, № 1–2. – P. 137–4046.
- 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.
- de Silva E., Williams D., Andersen R., Mix H., Holmes C., Allen M. Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the Papua New Guinea sponge *Theonella swinhoei* // *Gray.Tetrahedron Lett.* – 1992. – 33. – P. 1561–1564.
- Han W., Wang S., Liang R., Wang L., Chen M., Li H., Wang Y. Non-ionic surfactant vesicles simultaneously enhance antitumor activity and reduce the toxicity of cantharidin // *Int. J. Nanomedicine.* – 2013. – 8. – P. 2187–2196.
- Gordon J.A. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor // *Methods in Enzymol.* – 1991. – 201. – P. 477–482.
- Mikalsen S.-O., Kaalhus O. Properties of pervanadate and permolybdate connexin43, phosphatase inhibition, and thiol reactivity as model systems // *J. Biol. Chem.* – 1998. – 273. – P. 10036–10045.
- Ghelis T., Bolbach G., Clodic G., et al. Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells // *Plant Physiol.* – 2008. – 48. – P. 1668–1680.
- Imoto M., Kakeya H., Sawa T., Hayashi C., Hamada M., Takeuchi T., Umezawa K. Dephostatin, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces* I. Taxonomy, isolation, and characterization // *J. Antibiot.* – 1993. – 46, № 9. – P. 1342–1346.
- Watanabe T., Suzuki T., Umezawa Y., Takeuchi T., Otsuka M., Umezawa K. Structure-activity relationship and rational design of 3,4-dephostatin derivatives as protein tyrosine phosphatase inhibitors // *Tetrahedron.* – 2000. – 56. – P. 741–752.
- Arabaci G., Guo X.-C., Beebe K.D., Coggeshall K.M., Pei D. alpha-Haloacetophenone derivatives as photoreversible covalent inhibitors of protein tyrosine phosphatases // *J. Am. Chem. Soc.* – 1999. – 121. – P. 5085–5086.
- Xing K., Raza A., Löfgren S., Fernando M.R., Ho Y.S., Lou M.F. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase [LMW-PTP] and its possible physiological functions of redox signaling in the eye lens // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – 1774, № 5. – P. 545–555.
- De Wulf P., Montani F., Visintin R. Protein phosphatases take the mitotic stage // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2009. – 21. – P. 806–815.
- Blume Ya.B., Lloyd C.W., Yemets A.I. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression. In: *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology.* – Dordrecht, The Netherland: Springer, 2008. – P. 145–159.
- Jiang Y. Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2006. – 70, № 2. – P. 440–449.
- Zeng K., Bastos R.N., Barr F.A., Gruneberg U. Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2 // *J. Cell Biol.* – 2010. – 191. – P. 1315–1332.

22. Bollen M., Gerlich D.W., Lesage B. Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides // Trends Cell Biol. – 2009. – 19. – P. 531–541.
23. Trush V.V., Tanchuk V.Yu., Cherenok S.O., Kalchenko V.I., Vovk A.I. Calix[4]arene α -hydroxymethylphosphonic acids as potential inhibitors of protein tyrosine phosphatases // J. Org. Pharm. Chem. – 2014. – 45. – P. 39–42.
24. Liu X., Zheng H., Qu C.K. Protein tyrosine phosphatase Shp2 (Ptpn11) plays an important role in maintenance of chromosome stability // Cancer Res. – 2012. – 72, № 20. – P. 5296–5306.
25. Cho H.P., Liu Y., Gomez M., Dunlap J., Tyers M., Wang Y. The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules // Mol. Cell Biol. – 2005. – 25. – P. 4541–4551.
26. Lindqvist A., Källström H., Lundgren A., Barsoum E., Rosenthal C.K. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome // J. Cell Biol. – 2005. – 171, № 1. – P. 35–45.
27. Alonso A., Sasin J., Bottini N., Friedberg I., Friedberg I., Osterman A., Godzik A., Hunter T., Dixon J., Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome // Cell. – 2004. – 117, № 6. – P. 699–711.

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*

INTERACTION OF INHIBITORS WITH POTENTIAL CYTOSKELETON RELATED PROTEIN PHOSPHATASES

Aim. Recent studies revealed significant structure differences in phosphatase inhibitors suppressing serine/threonine and tyrosine-specific protein phosphatases (PPs), involved in MT-cytoskeleton structure and dynamics regulation. The matter of current study was revision of known inhibitors of «cytoskeletal» PPs, as well as the study of specific features of ligand-protein interaction. **Methods.** Deposited in RCSB PDB ligand-protein complexes were analyzed using ZINCPharmer, PoseView, CCDC Relibase, PRODRAG, LigandScout, Gromacs (MM+, CHARMM) and BIOVIA DS Visualizer. **Results.** Were established structural features of ligand-protein interactions for 32-x PDB structures: 23 for PPPs in complex with NHC, ENL, OKA, PRD_000212, PRD_000215, CYU, PRD_000214, PRD_000213, E7B, XT1/XT2 and 9 for PTPs in complex with 761, OAI, 878, OBA, 825; DBD, PSY, ZYZ, PVS. **Conclusions.** It was found that binding of PP-inhibitors with target proteins generally occurs with the assistance of metal ion(s) and water molecule(s). Also, it was created local database of PP-inhibitors with necessary for subsequent bioinformatic research: topology, biological activity and natural conformation.

Keywords: protein phosphatase inhibitors, PPP, PTP, chemoinformatics.