

САМОФАЛОВА Д.А.[✉], КАРПОВ П.А., РАЄВСЬКИЙ О.В., БЛЮМ Я.Б.Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: samofalova.dariya@gmail.com
[✉]samofalova.dariya@gmail.com, (066) 037-19-32РЕКОНСТРУКЦІЯ ПРОСТОРОВОЇ СТРУКТУРИ КОМПЛЕКСІВ РОСЛИННИХ
ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ ТИПУ 1, 2А, 4 З МІКРОЦИСТИНОМ-LR

Мікроцистин-LR (MCLR, рис. 1) є однією з найбільш поширених і токсичних форм групи мікроцистинів – циклічних гептапептидів ціанобактерій. Їх основними продуцентами є ціанобактерії родів *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, що викликають «цвітіння» води і глобальні екологічні лиха. За результатами моніторингу гідрогеологічної програми UNESCO «CYANONET», «цвітіння» ціанобактерій і поява їхніх токсинів підтверджена для водних ресурсів 65 країн світу, а у країнах з холодним кліматом продуценти мікроцистин-LR знайдені у 91 % озер [1].

Мікроцистин-LR розчиняється у воді і залишається стабільним у водоймах до 7 діб, а також тривалий час у фільтрованій або деіонізованій воді. Він стійкий до хімічного гідролізу або окислення при рН, близьких до нейтральних. При кип'ятінні мікроцистин-LR не руйнується протягом декількох годин. При високій температурі та екстремально високих або низьких рівнях рН внаслідок гідролізу за 10 тижнів деградує більше 90 % MCLR. Мікроцистин-LR окислюється озоном та іншими сильними окисниками, дуже стабільний при сонячному світлі, а його токсичність спрямована на органи, які здійснюють перенесення органічних іонів через

клітинні мембрани, тобто в першу чергу на печінку. Так, потрапляючи в кров, мікроцистин концентрується в печінці, сприяє виникненню великих крововиливів, внаслідок чого печінка збільшується в розмірах. Описані клінічні симптоми при інтоксикації мікроцистином – це діарея, нудота, озноб, слабкість, блідість [4].

Токсичність мікроцистину-LR зумовлена його здатністю до сильного інгібування протеїнфосфатаз, в першу чергу серин/треонінових протеїнфосфатази 1 (ПФ1) і протеїнфосфатази 2А (ПФ2А), а також порушувати ключові клітинні та метаболічні процеси [5]. Окрім того, він викликає окисний стрес за участю активних форм кисню, порушення мітотичних та диференційних процесів в еукаріотичних клітинах, зокрема гепатоцитах людини та інших клітинах, що теж відчувають зміни, аналогічні тим, що відбуваються у гепатоцитах [6, 7]. Але, незважаючи на велику кількість даних щодо інгібування ПФ типу 1 та 2А, існує твердження, що за участю мікроцистину-LR саме окисний стрес та активація мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPKs) відіграє вирішальну роль у молекулярних подіях, що призводять до руйнування цитоскелету [8].

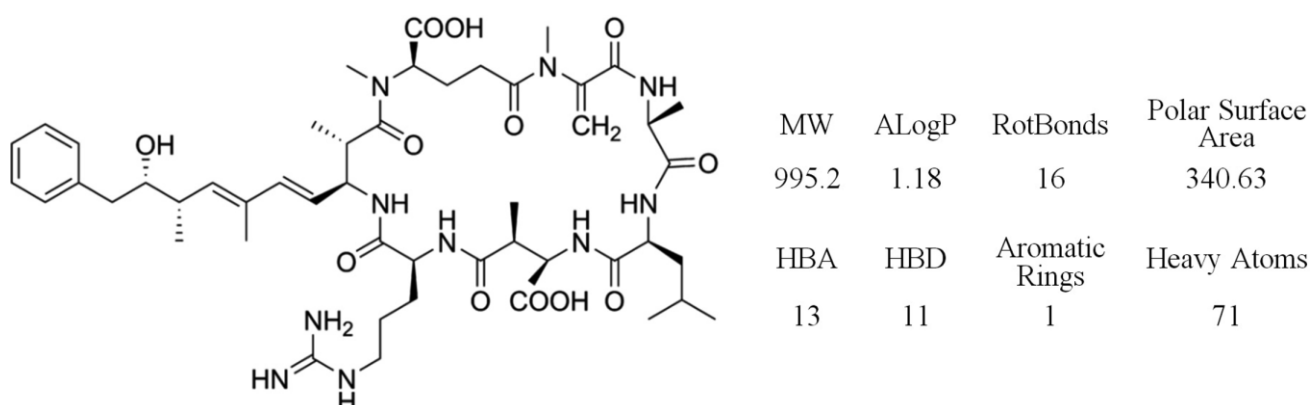


Рис. 1. Структурна формула та фізико-хімічні параметри мікроцистину-LR [Microcystin-LR; PRD_000212; C₄₉H₇₅N₁₀O₁₂; 2,3].

Мікроцистин-LR використовується як селективний інгібітор ПФ1 і ПФ2А тваринного походження, але його селективність у випадку рослинних фосфатаз практично не вивчена. Наші попередні дослідження підтверджують можливість здатність мікроцистину-LR специфічно взаємодіяти з рослинними ПФ1 і ПФ2А, а також пригнічувати активність ПФ4 [9]. Було показано, що ліганд-білкова взаємодія із сайтами зв'язування в більшості випадків відбувається за участі іонів металів та молекул води [10]. Саме завдяки селективності взаємодії мікроцистин-LR є важливим молекулярним інструментом дослідження функціональної ролі окремих протеїнофосфатаз. Завданням нашого дослідження було визначення структурних особливостей взаємодії мікроцистину-LR з рослинними ПФ1, ПФ2А і ПФ4, пов'язаними з регуляцією мікротрубочкового цитоскелету, а також порівняння сайтів зв'язування мікроцистину-LR у протеїнофосфатаз тварин і вищих рослин.

Матеріали і методи

Реконструкцію і її оптимізацію геометрії 3D-моделей рослинних протеїнофосфатаз та біологічно активної конформації мікроцистину-LR виконували згідно раніше відпрацьованої методики [10]. Сайт зв'язування ліганду було встановлено на підставі аналізу матричних структур ПФ з RCSB Protein Data Bank (<http://rcsb.org>). Моделювання комплексів мікроцистину-LR з досліджуваними протеїнофосфатазами виконували за допомогою гнучкого молекулярного докінгу в програмі CCDC GOLD Suite 5.3 [11]. Оцінку результатів докінгу здійснювали на підставі штатних функцій CCDC GOLD (GoldScore, Asp і ChemScore), а також, аналізу наявності водневих зв'язків [11]. Оцінку амінокислотного складу сайтів зв'язування, візуалізацію й аналіз отриманих структурних даних виконували за допомогою програми BIOVIA DS Visualizer (<http://accelrys.com/>).

Результати та обговорення

Із використанням методу профільного моделювання було побудовано структурні моделі рослинних протеїнофосфатаз типів 1, 2А і 4 з *Arabidopsis thaliana*, оскільки саме ці протеїнофосфатази можуть бути причетні до дефосфорилювання α -, β - та γ -тубулінів [12, 13]. Аналіз

особливостей просторової структури комплексів тваринних протеїнофосфатаз із мікроцистином-LR було здійснено на підставі експериментально доведених структур із RCSB Protein Data Bank (комплекси ПФ1 і ПФ2А з мікроцистином-LR, отримані за допомогою методу кристалографії – PDB: PP1A – 1FJM, 3DW8; PP2AA – 2NYM, 2NPP, 2NYL, 3FGA, 2IAE, 2IE3). Це дозволило нам ідентифікувати амінокислотний склад сайтів зв'язування: x -[GDY VDRG]- x -[ILRGNHESXQI]- x -[YG]- x -[VPHEG]- x -[CDLLWSDP]- x -[SPRGAG]- x -[QLV]- x -[FSA PNYCYRCGN]- x у випадку ПФ2А з *Homo sapiens* (P67775_PP2AA-MCLR) та x -[GDY VDRG]- x -[LLRGNHEC]- x -[SI]- x -[YG]- x -[VPD QG]- x -[CDLLWSDP]- x -[NDRGVS]- x -[QVV]- x -[FSAPNYCGEFDN]- x у випадку ПФ1 з *Oryctolagus cuniculus* (P62139_PP1A_MCLR). Консервативність амінокислотних залишків було встановлено на підставі результатів множинного вирівнювання (рис. 2). Також було встановлено певні відмінності амінокислотного складу сайтів зв'язування у тваринних і рослинних гомологів. Так, певні варіації було відмічено у 3-му (Q), 5-му (H), 7-му (P і R) і у 9-му (C) амінокислотних положеннях відповідно до мотиву сайту зв'язування протеїнофосфатази 2А людини.

PDB-структури ПФ1 і ПФ2А мають різне походження, якість і дату депонування, що впливає на певну розбіжність координат атомів просторових структур (RMS=0,34). Водночас, порівняння первинної структури тваринних і рослинних гомологів ПФ доводить їх значну подібність. Це також підтверджують результати порівняння просторових структур протеїнофосфатаз. Зокрема, для ПФ1 середньоквадратичне відхилення (RMS) дорівнює 1,153 у випадку порівняння з PDB-структурами 1FJM, 3DW8. У випадку ПФ2А при порівнянні зі структурами 2NYM, 2NPP, 2NYL, 3FGA, 2IAE, 2IE3, RMS коливається від 0,938 до 1,006. Мінімальне значення RMS спостерігалось у випадку порівняння ПФ2А зі структурою 3FGA. Водночас RMS вирівнювання 3D-структур гомологів ПФ 4-го типу з ПФ1 – 3DW8 і ПФ2А – 2NYL знаходиться на рівні 0,842. Також результати структурного порівняння підтверджують попереднє припущення стосовно більшої подібності ПФ4 і ПФ2А, ніж ПФ4 і ПФ1.

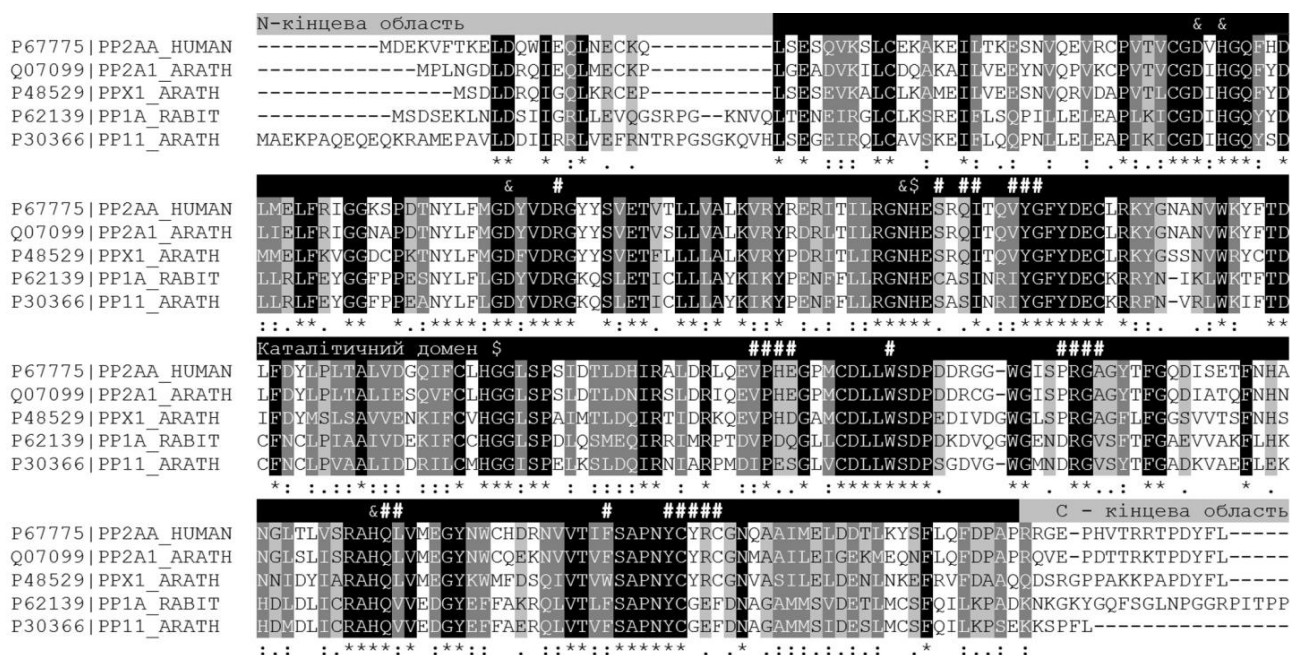


Рис. 2. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей PDB-структур PP1G і PP2AA (UniProtKB: P62139, P67775) з *H. sapiens*, *O. cuniculus* і їх рослинних гомологів – PP11, PP2A1, PPX1 (UniProtKB: P30366, Q07099, P48529) з *A. thaliana*. Універсальним символом IUPAC – X, позначені амінокислотні залишки, відсутні у матричних структур PP1G, PP2AA (PDB: PP1A – 1FJM, 3DW8; PP2AA – 2NYM, 2NPP, 2NYL, 3FGA, 2IAE, 2IE3), і відповідні залишки рослинного гомолога. Темно-сірим позначені ідентичні амінокислотні залишки (38 %), сірим – гомологічні залишки (64 %), білим – варіативні амінокислотні залишки (повну «розбіжність» фізико-хімічних властивостей у цих позиціях). На рисунку відзначено амінокислотні залишки, відповідальні за активні сайти (\$), сайти зв'язування металів (&), і амінокислотні залишки, відповідальні за зв'язування мікроцистину (#).

У результаті для подальшого докінгу було обрано найкращу матричну структуру і положення референсного ліганду для кожного з досліджених типів протеїнофосфатаз. Так, наприклад, за результатами структурного порівняння найближчими до ПФ2А виявилися структури 2NPP і 3FGA. Було логічно обрати найкращу за якістю PDB-структуру – 3FGA, але виявилось, що розміщення мікроцистину у цьому кристалі визначено не для цільової субодиноці (дистанція більш ніж 4.5 Å), а для регуляторної γ-субодиноці ПФ2А. Під час підготовки PDB-структур для докінгу засобами програми CCDC Hermes, було залишено лише один гомологічний ланцюг (мішень), ліганд (інгібітор), кофактор (Mn²⁺) активного центру, а також фізіологічні молекули води, тобто ті, що беруть безпосередню участь у зв'язуванні мікроцистину-LR. Так, у випадку комплексу ПФ1-мікроцистин-LR було залишено 9 молекул води, що утворюють зв'язки з атомами – OD2(ASP64-A), NE2(HIS66), OH(TYR272), OD2(ASP92),

O(HIS248), ND2(ASN124), NE2(HIS125), N(VAL250), NE2(GLN249), O(ARG221), – тоді як у комплексі ПФ2А-мікроцистин-LR ліганд зв'язується ковалентно, і зв'язки з молекулами води відсутні.

Подальша реконструкція комплексів рослинних протеїнофосфатаз з мікроцистином-LR була виконана шляхом молекулярного докінгу з використанням програми CCDC Gold Suite 5.3. У випадку ПФ1 і ПФ2А докінг проводили в експериментально встановлені сайти зв'язування, а у випадку ПФ4 – у комбінований (данні експерименту і гомології). Радіус сайту варіював від 10 до 25 Å (у зв'язку з великим розміром (24,7 Å) ліганду – 23 Å по контактній довжині молекули та невеликої взаємодіючої частини ліганду) від центрального атома сайту, що відповідає центральному залишку сайту у гомологічних PDB-структур: CE1/HE1 (HIS260) для ПФ1, OD2 (ASP82) для ПФ2А і HB2/CB (ASP79) для ПФ4. Також для перевірки методу докінгу центром сайту було обрано атом Mn²⁺, що зумовлено

більш поверхневим розташуванням цього сайту. Було задано умови повної рухливості ліганду для нативної форми мікроцистину-LR з PDB-структури (PRD_000212) та вільної форми з бази даних ChEMBL – 444092. Амінокислотні залишки мішені залишалися ригідними. Генетичний алгоритм CCDC Gold запускали у 100-кратному повторенні зі збереженням 50-ти кращих положень ліганду.

Отримані комплекси нативної та релаксованої форми мікроцистину-LR з мішенню (ПФ1, ПФ2А і ПФ4) були ранжовані згідно із значенням базових оціночних функцій. Так, значення GoldScore, Asp та ChemScore свідчить про спорідненість ліганду сайту (більше значення – краще) і про вигідність його конформаційного стану (менше значення – краще). Також було виконано порівняння результатів докінгу двох форм мікроцистину-LR відносно референсного положення

ліганду. Зокрема, високий відсоток ідентичності амінокислотних послідовностей і схожість фолдингу протеїнфосфатаз різного еволюційного походження дозволяють зробити висновок про значну подібність топології сайтів зв'язування. Також афінність мікроцистину-LR з молекулами ПФ1, ПФ2А, ПФ4 була підтверджена результатами молекулярного докінгу. На підставі аналізу поверхні сайтів зв'язування мішеней було обрано лідируючі конформації ліганду (рис. 3), а порівняння статистичних параметрів дозволило встановити кореляцію з активністю мікроцистину-LR. Показники GoldScore і Asp свідчать про краще зв'язування мікроцистину-LR з ПФ2А, ніж з ПФ1. Також на підставі порівняння показників Asp та ChemScore на декількох етапах докінгу було встановлено найвигідніше положення ліганду на поверхні сайту ПФ4.

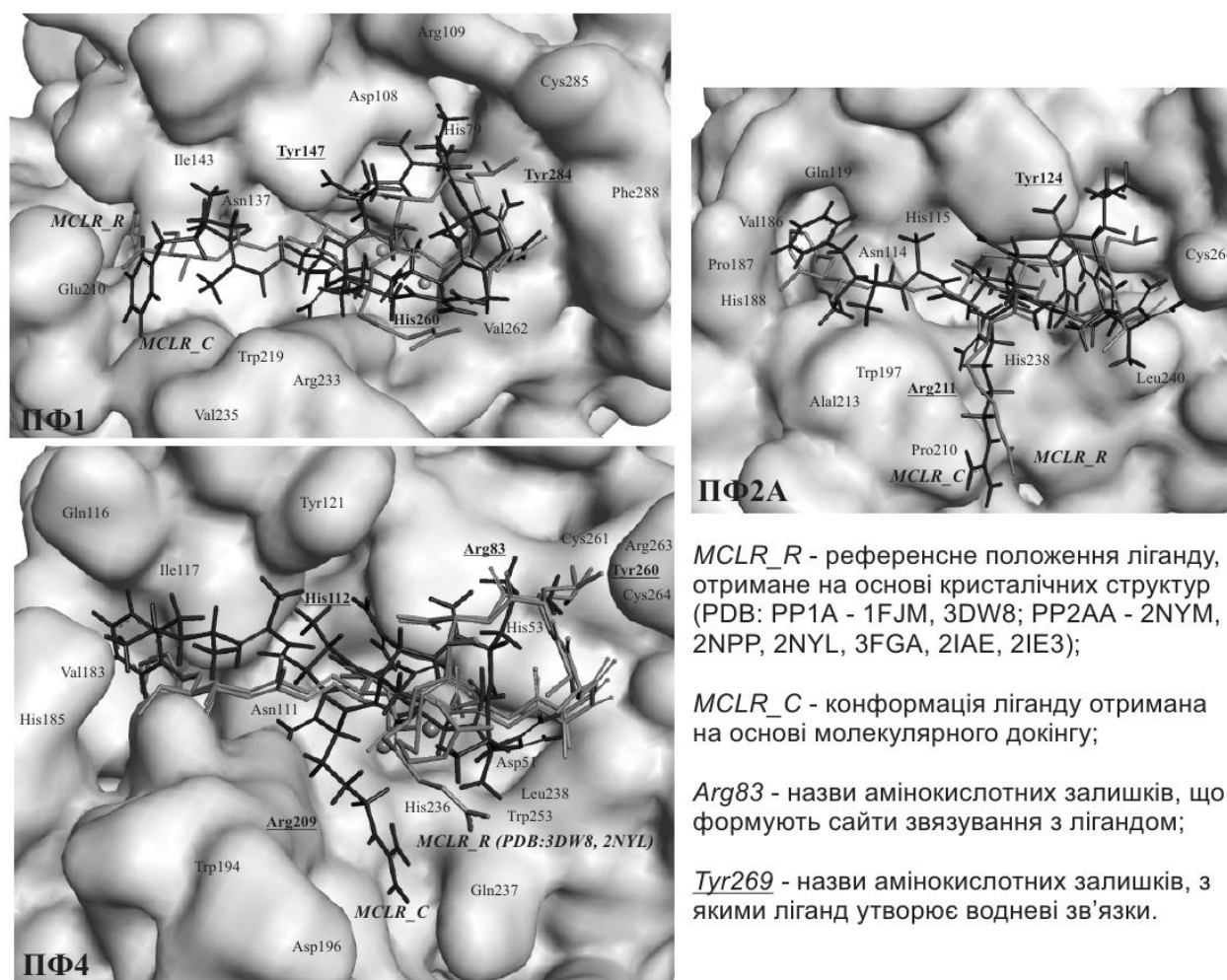


Рис. 3. Просторова структура та склад потенційних сайтів зв'язування рослинних протеїнфосфатаз 1, 2А і 4 з *A. thaliana* із мікроцистином-LR.

В останньому випадку референтними PDB-структурами були комплекси мікроцистину-LR з ПФ1 і ПФ2А (PDB: 3DW8 і 2NYL).

Висновки

Результати структурно-біологічного порівняння просторової структури протеїнофосфатаз ПФ1, ПФ2А, і ПФ4 з *A. thaliana* та їх тваринних гомологів переконливо свідчать про спільні механізми зв'язування мікроцистину-LR у тварин і вищих рослин. Значна ідентичність амінокислотного складу сайтів зв'язування мікроцистину-LR у ПФ1, ПФ2А, ПФ4 з *H. sapiens*,

O. cuniculus і *A. thaliana* підтверджує еволюційну консервативність сайту. Водночас результати аналізу найкращих конформаційних положень ліганду і статистичних показників докінгу підтвердили більш високу спорідненість мікроцистину-LR до ПФ2А, ніж до ПФ1, а також дозволили визначити механізм його зв'язування з ПФ4. Таким чином, отримані результати свідчать про можливість використання мікроцистину-LR для диференційованої регуляції активності рослинних ПФ1, ПФ2А і ПФ4, а також для з'ясування їх зв'язку з регуляцією мікротрубочок рослин.

Література

1. Codd G.A., Azevedo S.M.F.O., Bagchi S.N., Burch M.D., Carmichael W.W., Harding W.R., Kaya K., Utkilen H.C. International hydrological programme CYANONET: A global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management initial situation assessment and recommendations. – UNESCO, Paris: IHP-VI: Technical Documents in Hydrology, № 76, 2005. – 138 p.
2. Honkanen R.E., Zwiller J., Moore R.E., Daily S.L., Khatri B.S., Dukelow M., Boynton A.L. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265, N 32. – p. 19401–19404.
3. 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. – V. 264, N 2. – P. 187–192.
4. Bettina C. Hitzfeld, Stefan J. Höger and Daniel R. Dietrich. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment // Environm. Health Perspectives. – 2000. – V. 108. – p. 113–122.
5. Sassolas A., Catanante G., Fournier D., Marty J.L. Development of a colorimetric inhibition assay for microcystin-LR detection: comparison of the sensitivity of different protein phosphatases // Talanta. – 2011. – V. 85, N 5. – P. 2498–2503.
6. Dawson J.F., Holmes C.F. Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins // Front. Biosci. – 1999. – V. 4. – D. 646–658.
7. Vale C., Botana L. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins // FEBS J. – 2008. – V. 275. – P. 6060–6066.
8. Máthé C., Beyer D., M-Hamvas M., Vasas G. The effects of microcystins (cyanobacterial heptapeptides) on the eukaryotic cytoskeletal system // Mini Rev. Med. Chem. – 2016. – V. 16, N 13. – P. 1063–1077.
9. Самофалова Д., Карпов П., Блюм Я. Пошук рослинних молекулярних мішеней селективних інгібіторів серин-треонін специфічних протеїнофосфатаз // Вісник Львівського ун-ту. Серія біол. – 2014. – Т. 68. – С. 392–404.
10. Самофалова Д.А., Карпов П.А., Блюм Я.Б. Особливості ліганд-білкової взаємодії інгібіторів протеїнофосфатаз, потенційно пов'язаних з цитоскелетом // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2016. – Т. 19. – С. 229–233.
11. Cole J.C., Nissink J.W.M., Taylor R. Protein-ligand docking and virtual screening with GOLD. In: Virtual Screening in Drug Discovery (J. Alvarez and B. Shoichet, Eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2005. – P. 379–415.
12. De Wulf P., Montani F., Visintin R. Protein phosphatases take the mitotic stage // Curr. Op. Cell Biol. – 2009. – V. 21. – P. 806–815.
13. Kumar R., Musiyenko A., Oldenburg A., Adams B., Barik S. Post-translational generation of constitutively active cores from larger phosphatases in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for proteomics // BMC Mol. Biol. – 2004. – V. 5, N 6. doi: 10.1186/1471-2199-5-6.

SAMOFALOVA D.O., KARPOV P.A., RAEVSKY O.V., 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

RECONSTRUCTION OF SPATIAL STRUCTURE OF PLANT PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 1, 2A AND 4 IN COMPLEXES WITH MICROCYSTIN-LR

Aim. The major toxicity of Microcystin-LR (MCLR) has been ascribed to its potent ability to inhibit serine/threonine-specific protein phosphatase 1 (PP1) and protein phosphatase 2A (PP2A). Although MCLR is widely used in animal models its selectivity for these enzymes of plant origin is not still investigated in details for phylogenetically diversified

sources. **Methods.** The spatial structure of plant PP1, PP2A, PP4 protein phosphatases was reconstructed with homology modeling method. Flexible docking of MCLR was performed using CCDC GOLD Suite 5.3. For docking evaluations, GOLD scoring functions were used. **Results.** Information about amino acids, involved in ligand binding, was obtained from 8 experimentally proved human MCLR-PP1 and PP2A complexes. The sites of microcystin-LR binding with plant protein phosphatases (type-1, 2A and 4) were proved by comparative analysis and molecular docking. A high level of sequence and structure identity of plant and animal phosphatases allow us to conclude similarity of MCLR binding in PP1, PP2A and PP4.

Keywords: microcystin-LR, protein phosphatase, specific interaction, molecular docking.