

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

САМОФАЛОВА ДАРІЯ ОЛЕКСІЇВНА



УДК: 57.052.6:577.151.042:576.311.348.7

**РЕКОНСТРУКЦІЯ ПРОСТОРОВОЇ СТРУКТУРИ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ,
ЗАДІЯНИХ В РЕГУЛЯЦІЇ ЦИТОСКЕЛЕТУ У РОСЛИН, ТА
СТРУКТУРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ ЇХ ВЗАЄМОДІЇ ЗІ
СПЕЦИФІЧНИМИ ІНГІБІТОРАМИ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертація є рукописом

Робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович,
державна установа «Інститут харчової
біотехнології та геноміки НАН України»,
завідувач відділу геноміки та молекулярної
біотехнології, директор

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Корнелюк Олександр Іванович,
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, завідувач відділу білкової
інженерії та біоінформатики

доктор хімічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Вовк Андрій Іванович,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В. П. Кухаря НАН України, завідувач
відділу механізмів біоорганічних реакцій,
директор

Захист відбудеться «22» січня 2019 року об 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ-123, вул. Осиповського, 2а, тел./факс: (044) 434-37-77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «21» грудня 2018 року.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради, к.б.н., доц.



Н. Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Протеїнфосфатази (PP) належать до складної групи ферментів, які виникли на ранніх стадіях еволюції, і разом із протеїнкіназами залучені у процеси зворотного фосфорилування-дефосфорилування білків. Однак вважається, що на відміну від протеїнкіназ, різні родини протеїнфосфатаз виникли на окремих етапах еволюції і не мають безпосередніх спільних предків, що в свою чергу підтверджують дані молекулярної філогенетики (Chen et al., 2017; Stern et al., 2007, Miskei et al., 2011). Існують групи протеїнфосфатаз, унікальні за будовою та функціями і характерні для представників окремих царств. Водночас існує певна еволюційна консервативність протеїнфосфатаз, причетних до таких фундаментальних процесів, як ріст і поділ клітин, диференціювання клітин, клітинна загибель тощо (Jiang et al., 2006). В першу чергу це стосується протеїнфосфатаз, залучених до мітотичних процесів і асоційованих з регуляцією цитоскелету, зокрема мікротрубочок (Tournebize et al., 1997). Відомо, що коректна збірка мітотичного веретена в значній мірі залежить від низки посттрансляційних модифікацій тубуліну і інших білків, що входять до складу мікротрубочок. Зокрема, ключове місце у цих процесах належить ансамблю протеїнкіназ і протеїнфосфатаз, які здатні безпосередньо взаємодіяти з мікротрубочками (Kim et al., 2010).

Було доведено існування зв'язку між функціонуванням мікротрубочок та активністю серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типів PP1, PP2A/PP2B, PP4 (PPX), PP6 і PP7 (Farkas et al., 2007; Moorhead et al., 2007; Blume et al., 2008; Awotunde et al., 2003). Вважається, що протеїнфосфатази типу PP1, PP2A і PP4 здатні до прямого дефосфорилування α -, β - і γ -тубуліну, що підтверджується їх впливом на організацію мікротрубочок *in vitro*. Водночас у випадку протеїнфосфатаз типів PP6 і PP7 доведена лише їх участь у регуляції мітозу і клітинного циклу, але безпосередня взаємодія з тубуліном залишається під питанням (Zeng et al., 2010; Bollen et al., 2009; DeWulf et al., 2009; Kumar et al., 2004). Особливої уваги заслуговує група, яка об'єднує класичні та дуальні тирозинфосфатази (RTP1B, CDC25, RTPH1, RTPN11, RTPN13, RTP14, DSP-DEP1, DSP7, DSP14B) (Liu et al., 2012; Alonso et al., 2004). Показано, що протеїнфосфатази CDC25a і CDC25b здатні активувати циклін-залежні протеїнкінази, які в свою чергу контролюють окремі фази мітозу. Протеїнфосфатаза RTP1B сприяє проліферації клітин, а RTPN11 (SHP2) необхідна для підтримки стабільності організації хромосом (Lindqvist et al., 2005). Таким чином, незважаючи на асоціацію вищезазначених протеїнфосфатаз з тубуліном, функції кожної з них унікальні і, на відміну від інших протеїнфосфатаз, відрізняються значною спеціалізацією (Tournebize et al., 2010).

Існує широкий спектр інгібіторів протеїнфосфатаз, які відрізняються за рівнем селективності і, відповідно, можуть використовуватися для дослідження різноманітних клітинних процесів (Zhang et al., 2013; McConnell et al., 2009). Враховуючи спеціалізовані функції окремих протеїнфосфатаз, а також

потенціал їх практичного використання як важливих молекулярних мішеней, існують значні і очевидні пробіли стосовно механізмів регуляції їх активності (Mitsubishi et al., 2003). Особливо це твердження має пряме відношення до наших уявлень щодо особливостей будови сайтів ліганд-білкової взаємодії і визначення структурних механізмів, що обумовлюють селективну дію окремих інгібіторів протеїнофосфатаз рослинного походження. Оскільки такі дані практично відсутні, дослідження механізмів взаємодії рослинних протеїнофосфатаз із специфічними інгібіторами є надзвичайно актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано в рамках бюджетних тем відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»: «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (2015-19 рр., № ДР 0115U002084); «Вивчення цитоскелету як критичної мішені для розробки нових агробіотехнологій та пошуку біологічно активних речовин за допомогою засобів геноміки та біоінформатики» (2010-14 рр., № ДР 0110U001224); а також в межах спільного проекту НАН України – НТЦУ №5215 «Пошук ефективних інгібіторів протеїнофосфатаз за допомогою нанохімічних підходів і оцінка їх біологічної ефективності *in silico*» (2009-10 рр., № ДР 0110U005523).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи був пошук і біоінформаційне дослідження протеїнофосфатаз рослин, що впливають на структуру і функціонування мікротрубочок, реконструкція їх просторової структури та визначення структурних механізмів специфічності їх взаємодії з різними групами інгібіторів.

Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

1. Виконати біоінформаційний порівняльний аналіз протеїнофосфатаз різного еволюційного походження, реконструювати повні фосфатоми вищих рослин і тварин та визначити їх відмінності.

2. Визначити протеїнофосфатази, пов'язані з регуляцією структури та функцій мікротрубочок рослин.

3. Побудувати тривимірні моделі просторової структури молекул протеїнофосфатаз тваринного і рослинного походження, які пов'язані з регуляцією структури та функцій мікротрубочок.

4. Провести аналіз структурних механізмів ліганд-білкової взаємодії з використанням експериментально встановлених комплексів протеїнофосфатаз з їхніми інгібіторами різної хімічної природи.

5. Перевірити можливість існування альтернативних рослинних мішеней уже відомих інгібіторів протеїнофосфатаз за допомогою методів профільного пошуку.

6. Виконати пошук та оцінку відомих інгібіторів протеїнофосфатаз з експериментально підтвердженою активністю та визначити їхні фізико-хімічні властивості.

7. Реконструювати комплекси рослинних протеїнофосфатаз з відомими інгібіторами за допомогою методів молекулярного докінгу.

8. Оцінити стабільність реконструйованих комплексів рослинних протеїнофосфатаз з обраними інгібіторами на підставі результатів молекулярної динаміки.

9. Відібрати перспективні похідні інгібіторів рослинних протеїнофосфатаз, асоційованих з мікротрубочками, з метою подальшого практичного використання у дослідженнях структурно-функціональних властивостей мікротрубочок та регуляції мітозу.

Об'єкт дослідження: структурна організація молекул протеїнофосфатаз рослин і тварин, які дефосфорилують тубулін і беруть участь у регуляції мікротрубочок цитоскелету та структурно-молекулярні особливості їх взаємодії зі специфічними інгібіторами.

Предмет дослідження: порівняльний аналіз просторових структур молекул протеїнофосфатаз вищих рослин та тварин та з'ясування закономірностей взаємодії протеїнофосфатаз рослинного походження з різними за хімічною структурою інгібіторами.

Методи дослідження. Методи парного та множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей, методи профільного аналізу функціональних доменів та мотивів, методи молекулярної філогенії, методи комп'ютерного моделювання та верифікації просторової структури молекул, дескрипторний та фармакофорний аналіз, методи молекулярної механіки, метод моделювання молекулярної динаміки, методи молекулярного докінгу.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше реконструйовано повні фосфатоми рослин і проаналізовано еволюційну дивергенцію фосфатомів вищих рослин і людини. Визначено групу рослинних гомологів тваринних протеїнофосфатаз, що належить до суперродин серин/треонін-, тирозин- та аспартат-специфічних протеїнофосфатаз. Відібрано групу рослинних протеїнофосфатаз, пов'язаних з регуляцією структури та функцій мікротрубочок. Встановлено структурні особливості взаємодії інгібіторів з протеїнофосфатазами рослин. Отримані дані розширюють уявлення стосовно механізмів, що обумовлюють селективність існуючих інгібіторів до протеїнофосфатаз рослинного походження.

Практичне значення одержаних результатів. У ході роботи реконструйовано тривимірні моделі протеїнофосфатаз людини і представників одно- та дводольних рослин. Оригінальні дані щодо їхніх молекулярних сайтів взаємодії з інгібіторами різної хімічної природи є важливими для подальшого раціонального дизайну сполук з підвищеною спорідненістю до зазначених молекулярних мішеней та дозволяють оптимізувати процес їх розробки. Похідні досліджених сполук з більшим рівнем спорідненості до цільових білків знайдуть застосування як інгібітори протеїнофосфатаз рослинного походження. Результати проведених досліджень були використані у навчальному процесі для підготовки фахівців за спеціальністю – біологія клітини та біоінженерії у Навчально-науковому центрі «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка при викладанні спецкурсу «Біоінформатика».

Особистий внесок здобувача. Постановка наукових завдань досліджень, структура дисертаційної роботи та інтерпретація отриманих результатів були зроблені спільно з науковим керівником. Всі експериментальні результати отримані самостійно за участю в їх обговоренні та узагальненні співавторів опублікованих наукових робіт.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи були представлені та обговорені на X-й, XI-й та XII-й Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Україна, Умань, 2017, Одеса, 2016, Чернівці, 2015), III-й Міжнародній конференції «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування» (Україна, Київ, 2015), Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми біофізики» (Україна, Львів, 2014), конференції «Plant Genomics and Biotechnology» (Україна, Київ, 2013), Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13) (Росія, Москва, 2013), 3-му з'їзді Українського товариства клітинних біологів з міжнародним представництвом (Україна, Ялта, 2012), на The Eighth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (Russia, Novosibirsk, 2012), на 3rd International Symposium «Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design» (Україна, Львів, 2012), на III-й Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics MolPhy-3» (Росія, Москва, 2012), на V-й Міжнародній школі з молекулярної генетики (Росія, Звенигород, 2012), на XII-й конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (Україна, Київ, 2012), на I-й конференції молодих вчених ІХБГ «Біологія рослин і біотехнологія» (Україна, Біла Церква, 2011).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 статей у фахових виданнях (3 з яких входять до наукометричної бази даних Scopus) і 15 тез у збірниках закордонних і вітчизняних з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 297 найменувань і додатків. Основний зміст дисертації викладено на 165 сторінках комп'ютерного (друкованого) тексту, вона містить 15 таблиць, 47 рисунків і додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляд літератури) розглянуто сучасний стан досліджень протеїнфосфатаз. Проаналізовано їх актуальну класифікацію, консервативність і варіабельність окремих фосфатомів, а також еволюційні аспекти походження представників різних класів протеїнфосфатаз. Окрему увагу зосереджено на зв'язку структурної організації протеїнфосфатаз і їхньої функціональної ролі. Узагальнено літературні дані, що стосуються механізмів взаємодії протеїнфосфатаз з лігандами. Зібрано і проаналізовано дані стосовно існуючих інгібіторів протеїнфосфатаз та особливостей їх взаємодії з

ферментами групи серин/треонін- (окадаїнова к-та, калікулін, мікроцистин, нодуларин, таутоміцин, кантаридин, фострієцин, циклоспорин), аспартат- (фторид берилію, рабепразол та його синтетичні аналоги: рабепразолсульфон, лансопразол, рабепразол N-оксид) та тирозин-специфічних (ванадат, молібдат, феніларсин, дефостатин та етил-3,4-дефостатин, бензойна кислота) протеїнфосфатаз. У ході аналізу літератури виявлено відсутність інформації щодо сполук, які проявляють специфічну спорідненість до різних представників рослинних протеїнфосфатаз.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Біоінформаційний пошук і аналіз послідовностей генів протеїнфосфатаз (Almo et al., 2007) та їх білкових продуктів у базах даних UniProtKB, GenBank, TAIR, PlatnGDB, EnsemblPlants, Phytozome і PTGBase виконано за допомогою різних алгоритмів родини BLAST (Boutet et al., 2016). Оцінку потенційної субстратної специфічності і доменної архітектури досліджуваних протеїнфосфатаз виконували із застосуванням мережевих інструментів SMART7 і STRING (Letunic et al., 2014). Вирівнювання амінокислотних послідовностей були виконані за допомогою програми ClustalX 2.1 із застосуванням матриць BLOSSUM (Larkin et al., 2007). Положення консервативних залишків і функціонально важливих мотивів оцінювали за допомогою програмного пакету EMBOSS (Olson, 2002). Філогенетичний аналіз протеїнфосфатаз здійснювали із застосуванням методу зв'язування найближчих сусідів (Neighbor-Joining, NJ) та еволюційного методу (UPGMA) (Loewenstein et al., 2008). Подальша візуалізація і аналіз дендрограм були виконані із використанням програм Dendroscope 3.5.9 і MEGA7 (Huson and Linz, 2018).

Матриці для профільного моделювання просторової структури протеїнфосфатаз були отримані з бази даних RCSB Protein Data Bank. Відбір шаблонів здійснювався за допомогою інструментів PDB-BLAST або PDB-FASTA. У випадку більш еволюційно віддалених білків було застосовано інструмент PSI-BLAST. Фізико-хімічні параметри протеїнфосфатаз рослин визначали за допомогою мережевого сервісу ProtParam tool. Вторинну структуру PP передбачали за допомогою методу SOPMA (Ashokan et al., 2010). Згортання моделей просторової структури білків здійснювали за допомогою профільного моделювання (Venselaar et al., 2009) з використанням програмного пакету Modeller 9v7 та он-лайн сервісу I-TASSER. Оптимізацію геометрії і перевірку стабільності промоделей здійснювали у програмному пакеті GROMACS (Pronk et al., 2013) із застосуванням силового поля CHARMM (Brooks et al., 2009). Якість моделей оцінювалась за допомогою програмного пакету Swiss-PdbViewer 4.1 на підставі показників середньоквадратичних відхилень атомів, енергетичних коливань молекулярної динаміки, карт Рамачандрана, графіків DOPE і ANOLEA. Остаточну верифікацію і відбір моделей виконували за допомогою серверу MolProbity (Venselaar et al., 2009).

Канонічні інгібітори протеїнфосфатаз було відібрано із баз даних ZINC, PubChem, eMolecules та ChEMBL на підставі даних літератури і результатів патентного пошуку. Порівняння програмно-релаксованих і експериментально підтверджених біологічно активних конформацій лігандів зі структур, депонованих в RCSB PDB, було виконано з використанням сервісу ZINC Pharmer, а також програм LigandScout і BIOVIA DSVisualizer. Файли топології лігандів були отримані з використанням мережевих сервісів PRODRG і Swiss-Param. Оптимізація геометрії і попередня підготовка лігандів була виконана з використанням силових полів MM+ і CHARMM (Gromacs) (Pronk et al., 2013).

Сайти потенційного зв'язування лігандів було визначено на підставі порівняння з експериментально підтвердженими структурами, депонованими в Protein Data Bank. Відповідні особливості ліганд-білкової взаємодії в експериментальних комплексах було досліджено із використанням сервісів PoseView і CCDC Relibase.

Передбачення структури ліганд-білкових комплексів за допомогою програми CCDC GOLD Suite 5.3 було здійснено в модельній системі, що враховує повну рухливість ліганду за умови статичності амінокислотних залишків цільового білка (Hartshorn et al., 2007). Верифікацію комплексів PP-інгібіторів проводили, враховуючи внутрішні оціночні функції програми GOLD, а також на підставі результатів обрахунку молекулярної динаміки (GROMACS з використанням одноіменного силового поля та повноатомного силового поля CHARMM). Траєкторію молекулярної динаміки (МД) оцінювали на підставі середньоквадратичного відхилення між атомами (RMS) і значень енергетичних коливань (KE), які включають у себе енергію Ван-дер-Ваальсових і кулонівських взаємодій. Ресурсоємні обрахунки було виконано з використанням потужностей грид-кластеру ДУ «ІХБГ НАН України» та віртуальної організації CSLabGrid.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Біоінформаційне порівняння фосфатомів людини і вищих рослин.

Анотовані і ще не відомі протеїнфосфатази рослинного походження представлені чисельною і гетерогенною групою білків, депонованих в базах даних GenBank, UniProtKB, TAIR, PlatnGDB, EnsemblPlants, Phytozome, PTGBase. Тому базуючись на результатах аналізу найбільш дослідженого фосфатому – фосфатому людини, було виконано комплексний біоінформаційний пошук і ідентифіковано 680 гомологів рослинного походження (Рис. 1).

Встановлено, що для потенційних протеїнфосфатаз рослин характерна довжина амінокислотних послідовностей близько 300-320 залишків, наявність каталітичного домену певного типу: серин/треонін- (PP2A: SM00156, PP2C: SM00332 або PP2C-SIG: SM00331), аспартат (CPDc-домен: SM000577), тирозин-специфічних протеїнфосфатаз (PTP SMART№: SM00194, DSP: SM000195, PTP/DSP: SM00012) і декілька субдоменів, що об'єднують неканонічні протеїнфосфатази.

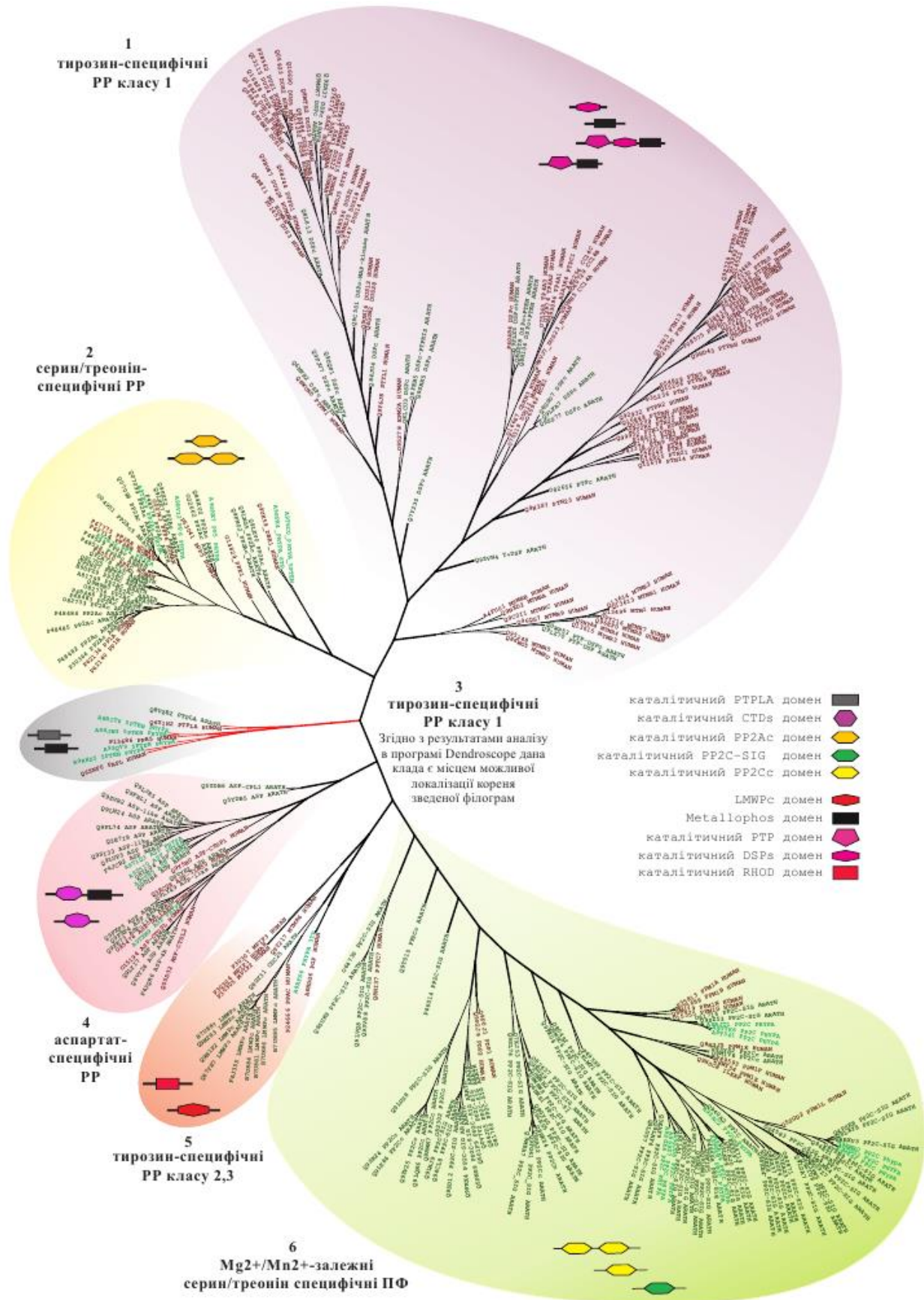


Рис. 1. Результати спільної кластеризації зведеної групи протеїнофосфатаз людини і потенційних рослинних протеїнофосфатаз з *A. thaliana* і *P. patens*.

Було підтверджено існування 175 індивідуальних протеїнфосфатаз (113 серин/треонін-, 36 тирозин- і 26 аспартат-специфічних протеїнфосфатаз) з *A. thaliana* і 29-ти потенційних протеїнфосфатаз з *P. patens*. Спільна кластеризація тваринних протеїнфосфатаз і їх рослинних гомологів виявила відсутність у вищих рослин ряду серин-треонін- (PPP3CC, PPP3CB, PPP3CA, PPP1CB, PPP1CA, PPP1CC, PPM2C, PPM1B) та тирозин-специфічних (EYA3, EYA2, PDX(CIN), SMPD1, SMPDL3A, SMPDL3B, MPPD2, NT5E (CD73), CTDSP1(SCP1) і CTDSP3(SCP3)) протеїнфосфатаз. Водночас було доведено існування унікальних протеїнфосфатаз, знайдених лише у *A. thaliana* (PDP2, PPM1M, MDP1, TIMM5), *P. patens* (CTDSP2(SCP1)) та однодольних *Z. mays* та *O. sativa* (EYA1, EYA4, DULLARD).

Визначено групу протеїнфосфатаз, пов'язаних з дефосфорилюванням мікротрубочок вищих рослин. На основі фосфатому *A. thaliana* шляхом профільного пошуку і аналізу даних літератури, визначено групу серин/треонін-специфічних (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP7), класичних нерцепторних тирозинових (PTPN1, PTPN3, PTPN11, PTPN13, PTPRJ) і дуальних протеїнфосфатаз (CDC25, DUSP7, DSP14), потенційно здатних дефосфорилювати молекули α -, β - і γ -тубуліну. Також відповідні групи було визначено у дводольних (*N. tabacum*, *M. sativa*), і однодольних (*O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum*) рослин.

Загалом було проаналізовано 151 протеїнфосфатазу рослин, які потенційно беруть участь у регуляції мікротрубочок. Для подальших досліджень було відібрано 17-ть білків (по одному представнику кожного типу протеїнфосфатаз 1, 2A і 4), для яких було встановлено високий рівень подібності амінокислотних послідовностей, наявність експериментально встановлених просторових структур каталітичних доменів, а також наявність експериментальних доказів впливу на функції мікротрубочок: P30366, Q07099, P48529 з *A. thaliana*; O0485, Q9XGH7, O04859 з *N. tabacum*; Q10NJ4, Q6EPR6, Q0DBD3 з *O. sativa* subsp. *japonica*; P48488, Q06009 з *M. sativa*; P22198, B4FSV7, C4J0A6 з *Z. mays*; W5EJ16, W5GEB7, W5FTD6 з *T. aestivum*.

Реконструкція просторової структури протеїнфосфатаз, потенційно залучених до регуляції мікротрубочок. Для шаблонної реконструкції просторової структури рослинних протеїн фосфатаз PP1, 2A і 4 було досліджено 116 їх найближчих гомологів з експериментально встановленою просторовою структурою. PDB-структури відбирались за показниками вирівнювань послідовностей, якістю структур та наявністю певних білкових чи низькомолекулярних лігандів. Останнє було необхідно для визначення контактних інтерфейсів міжмолекулярної взаємодії. За результатами аналізу було відібрано PDB-структури протеїнфосфатаз з *H. sapiens*, отримані за результатами кристалографії з роздільною здатністю 1,5-3 Å. За допомогою зазначених структур було визначено контактні поверхні взаємодії з регуляторними субодинаціями, а також сайти зв'язування молекул інгібіторів. Порівняльний аналіз первинної і третинної структур протеїнфосфатаз

підтвердив значну консервативність представників серин/треонін-специфічних РР рослинного і тваринного походження (Рис. 2).

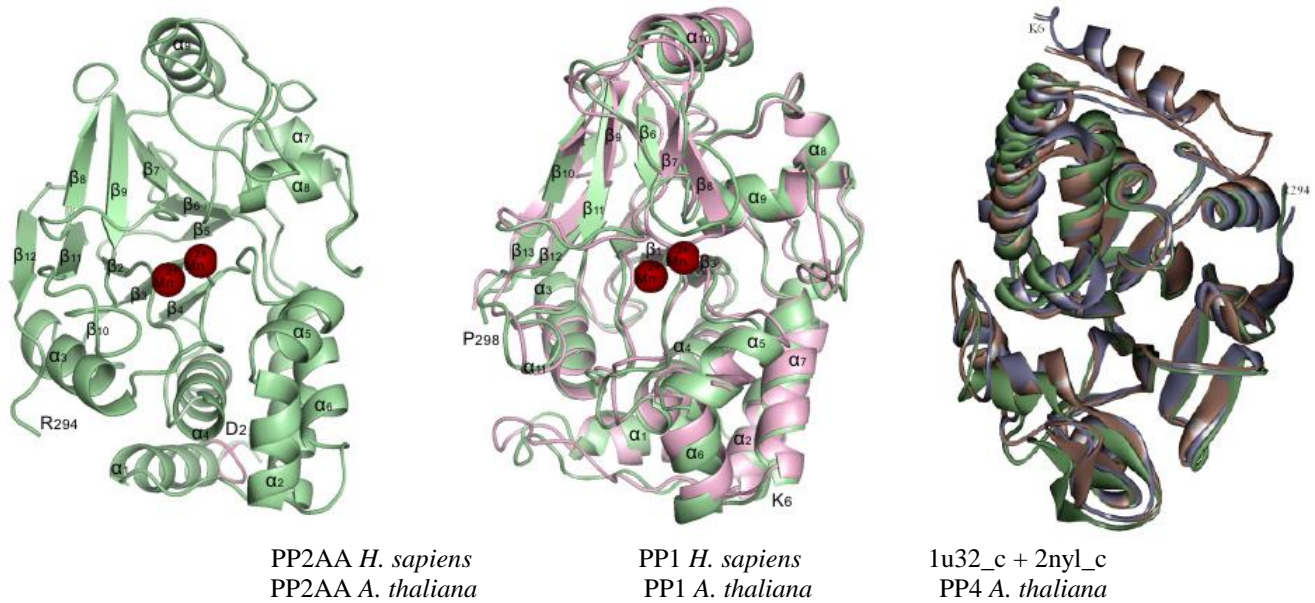


Рис. 2. Структурне порівняння каталітичних субодиниць PDB-структур протеїнофосфатаз тваринного походження з відповідними рослинними гомологами PP1, PP2A і PP4.

Моделювання просторових структур повнорозмірних серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз 1, 2A і 4 дозволило виконати порівняння будови їх каталітичних доменів та оцінити подібність функціонально важливих структурних мотивів. Відомо, що молекули протеїнофосфатаз PP1, 2A і 4 рослин є глобулярними водорозчинними білками (Luan et al., 2003). Вони можуть існувати як окремі каталітичні субодиниці, гетеродимери, представлені каталітичною і регуляторною субодиницями, або гетеротримери, які складаються з каталітичної і двох неоднорідних регуляторних субодиниць (Mumby, 1993). Було визначено, що для цих типів рослинних РР притаманний тип укладання $\alpha+\beta$, ідентичний до їх гомологів тваринного походження. Тому для більш точної реконструкції їхньої просторової структури було виконано первинну параметризацію та прогнозування утворення елементів вторинної структури за допомогою методу SOPMA. Показано, що не зважаючи на високий рівень гетерогенності первинної структури, фізико-хімічні властивості протеїнофосфатаз PP1, 2 і 4 співпадають за основними показниками на рівні всієї групи. Водночас, за розрахунками інструменту ProtParam, протеїнофосфатази PP2A мають значно нижчу стабільність структури у порівнянні з представниками PP4. При цьому належність до кислих білків (показники ізоелектричних точок) та високе значення аліфатичного індексу (AI) свідчать про стабільність цих РР в широкому діапазоні температур. Водночас дуже низький показник співвідношення гідрофільність/гідрофобність («Gravy») свідчить про більш гідрофільну природу протеїнофосфатаз PP1, 2 і 4. Для усіх досліджених каталітичних субодиниць PP1, 2 і 4 була характерна

консервативність С-кінцевої ділянки у порівнянні з N-кінцем. Згідно до результатів передбачення вторинної структури усі досліджені білки належать до змішаного типу з домінуванням α -спіральных структур. Саме унікальна α -структура каталітичного домену характерна для всієї групи серин/треонін-специфічних PP (Almo et al., 2007). Отримані дані було використано для визначення обмежень параметрів моделювання відібраних PP1, 2A і 4 рослин.

За допомогою серверу I-TASSER було реконструйовано просторову структуру 17-ти рослинних протеїнофосфатаз (близько 60 промоделей). За показниками серверів I-TASSER та MolProbity було відібрано найкращі структури і виконано оптимізацію їхньої геометрії. Стабільність моделей була підтверджена за допомогою молекулярної динаміки в водно-іонному оточенні (5-100 нс в залежності від об'єкту). Стабілізація структур відібраних моделей спостерігалась переважно після 2 нс з остаточним виходом на енергетичне плато при ~ 15000 кДж/моль. Остаточні моделі було отримано шляхом визначення оптимальної усередненої конформації стабільних енергетичних коливань МД з 1720 по 4920 пс. Якість моделей протеїнофосфатаз PP1, 2A і 4 з *A. thaliana*, *N. tabacum*, *M. sativa*, *O. sativa*, *Z. mays* та *T. aestivum* була підтверджена за допомогою сервісу MolProbity (діапазон 95-100) та конформаційних карт Рамачандрана (98,2% для PP1, 97,9 для PP2A та 97,5 для PP4). Це також підтверджує значну подібність просторових структур протеїнофосфатаз 1, 2A, 4 усіх досліджених видів рослин.

Окрім просторової структури, вирішальним фактором структурно-функціональних особливостей протеїнофосфатаз є наявність і амінокислотне оточення відповідних функціонально важливих мотивів. Такими важливими мотивами є область зв'язування АТФ і сайт взаємодії з кофакторами (іонами металів) активного центру, у зв'язку з чим особливу увагу було також звернуто на ділянки, які відповідають за зв'язування молекул інгібіторів. Контрольне порівняння просторових структур підтвердило консервативність топології всіх вищезазначених мотивів у рослинних протеїнофосфатаз PP1, PP2A і PP4. Відмінності у глобулярних фрагментах рослинних протеїнофосфатаз спостерігались лише в топології окремих амінокислот петлевих доменів. Зокрема, гістидин, який формує активний сайт PP і відповідає за зв'язування АТФ у більшості рослинних PP1, відрізнявся від маркерної PP1 з *A. thaliana* лише за конформацією (Рис. 3-А3). Однак слід зазначити, що це не викликає суттєвого порушення структури сайту. Аналіз амінокислот, безпосередньо відповідальних за зв'язування молекул інгібіторів, виявив лише поодинокі заміни окремих залишків. Так, на місці Pe143 PP1 *A. thaliana* у *Z. mays* присутній залишок Val. У випадку PP4 з *N. tabacum* замість Phe279 присутній триптофан. А у PP4 з *T. aestivum* замість Arg109 визначено залишок Ser (Рис.3, на прикладі представників PP1).

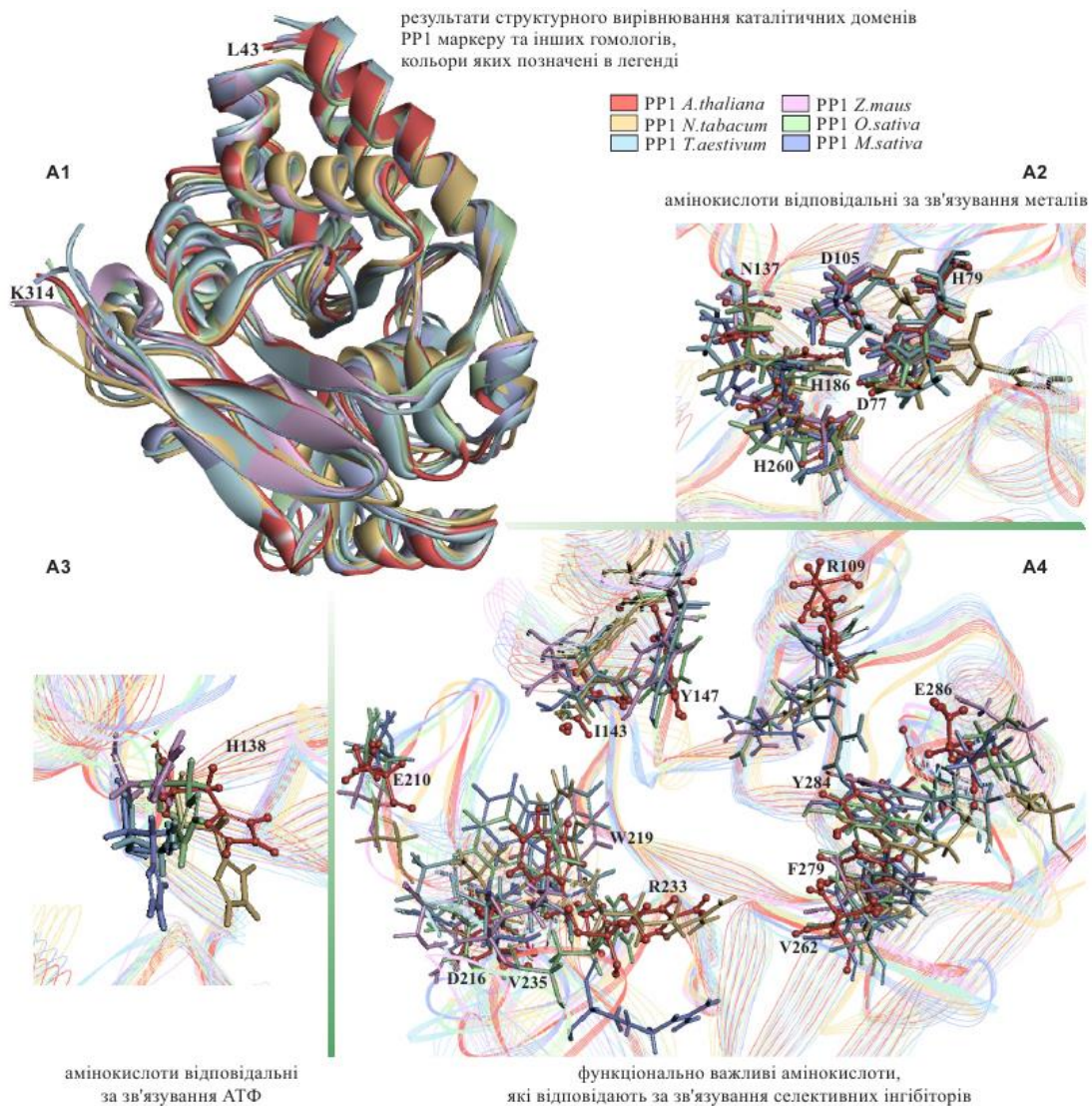


Рис. 3. Узагальнення результатів структурного порівняння каталітичних доменів протеїнфосфатаз та амінокислотного складу їхніх сайтів зв'язування з АТФ, кофакторами та інгібіторами.

Механізми зв'язування інгібіторів з рослинними протеїнфосфатазами. За результатами аналізу хімічних баз даних було відібрано 231 інгібітор серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз з доведеною біологічною активністю. Вищезазначена вибірка була використана як контроль. На підставі 2Д-фінгерпринтів, коефіцієнтів Танімото і Тверські (з порогом подібності 85%) для контролю було відібрано 1105 сполук. Серед контрольного набору лише 11 речовин мали не тільки біохімічне підтвердження активності, але й встановлений механізм ліганд-білкової взаємодії. Таким чином, на сьогодні існують експериментальні докази взаємодії протеїнфосфатаз PP1 і PP2A з окадаїновою кислотою і мікроцистином-LR, PP1 з мікроцистином-LA, калікуліном А, нодуларинами і таутоміцином, PP2A з динофізистоксинами, а також PP5 з кантаридином і ендоталом. Надалі ця інформація була використана при реконструкції та аналізі взаємодії зазначених інгібіторів з PP рослин і включала у себе профіль фізико-хімічних властивостей комплексів,

аналіз ліганд-білкової взаємодії, а також оцінку можливості існування альтернативних мішеней інгібіторів у рослин.

Перш за все було проведено аналіз оточення сайтів та фізико-хімічних параметрів речовин. Показано, що взаємодія інгібіторів з протеїнфосфатазами відбувається за участі від 1 до 18 функціонально значимих молекул води. Виключенням були мікроцистини (LR і LA), які взаємодіють ковалентно з протеїнфосфатазами PP2A. А також кантаридин і ендотал, що утворюють зв'язки з іонами металів PP5, тоді як у випадку їх відсутності під час виконання молекулярного докінгу інтеркалюють в товщу молекул протеїнфосфатаз PP1, 2A і 4. По-друге, було визначено консервативні амінокислоти сайтів зв'язування лігандів з протеїнфосфатазами. За результатами порівняння PDB-комплексів протеїнфосфатази PP1 з оокадаїновою кислотою, мікроцистином–LR і LA, калікуліном А, таутоміцином, нодуларином і мотупорином, ключовими для формування сайту зв'язування було визначено Arg96, Tyr221, Tyr272, Val223, Asn224, His225. У випадку протеїнфосфатази PP2A, що взаємодіють з оокадаїновою кислотою, мікроцистином–LR і динофізистоксином типу 1 і 2, відповідними залишками були Arg89, Tyr272, Arg214, Ala216, Asn217, His218. Тоді як для комплексів протеїнфосфатаз типу 5 з кантаридином і ендоталом консервативними залишками є Arg275, Tyr451, Arg400, Val402, Asn303, His304 (Рис. 4).

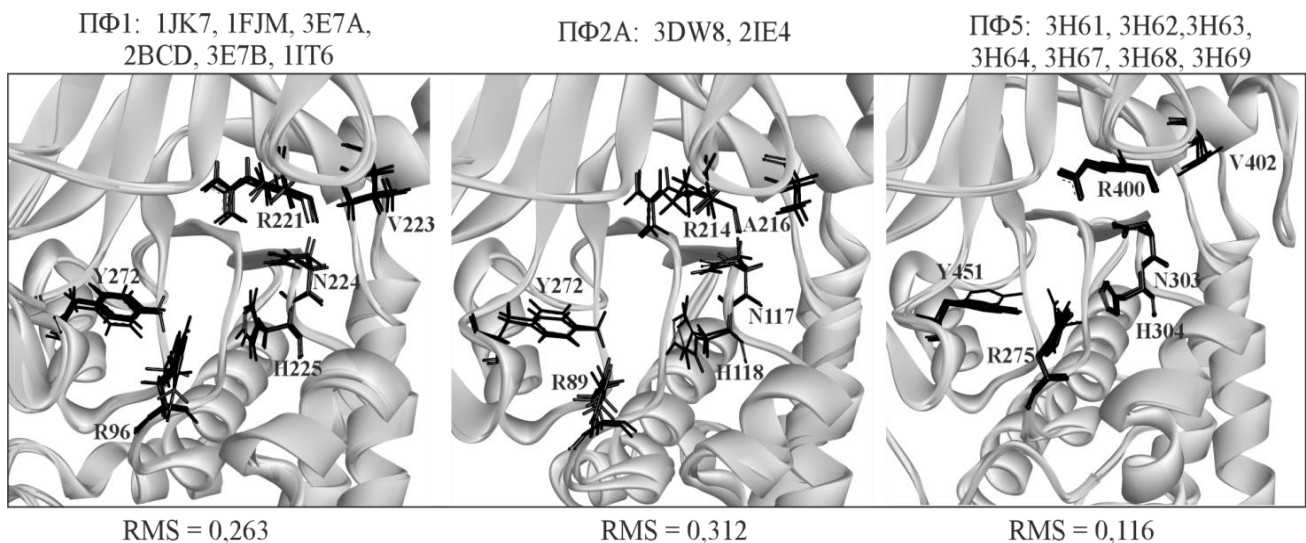


Рис. 4. Просторове вирівнювання досліджуваних PDB-структур протеїнфосфатаз типів 1, 2A і 5 людини з визначенням консервативного амінокислотного складу сайтів зв'язування інгібіторів.

Реалізація вищезазначених етапів дозволили відпрацювати максимально коректний алгоритм реконструкції комплексів рослинних протеїнфосфатаз з потенційними інгібіторами. Застосований протокол враховував кількість донорів/акцепторів ліганду, роль функціональних молекул води у формуванні водневих зв'язків мішень-ліганд, наявність і роль іонів металів в активному центрі протеїнфосфатазами. Також, враховувались особливості

амінокислотного складу, структури інтерфейсів сайтів зв'язування і такі технічно-важливі параметри докінгу як визначення центру та радіусу аналізованої ділянки що враховує розмір інгібітору (Рис. 5). Це дозволило уникнути помилок під час пошуку альтернативних рослинних мішеней відомих інгібіторів, результатів їх молекулярного докінгу, а також, сліпого гнучкого докінгу, який було використано при ліганд-білкових інтерфейсів PDB-структур протеїнфосфатаз PP1 і 2A з представників різних царств.

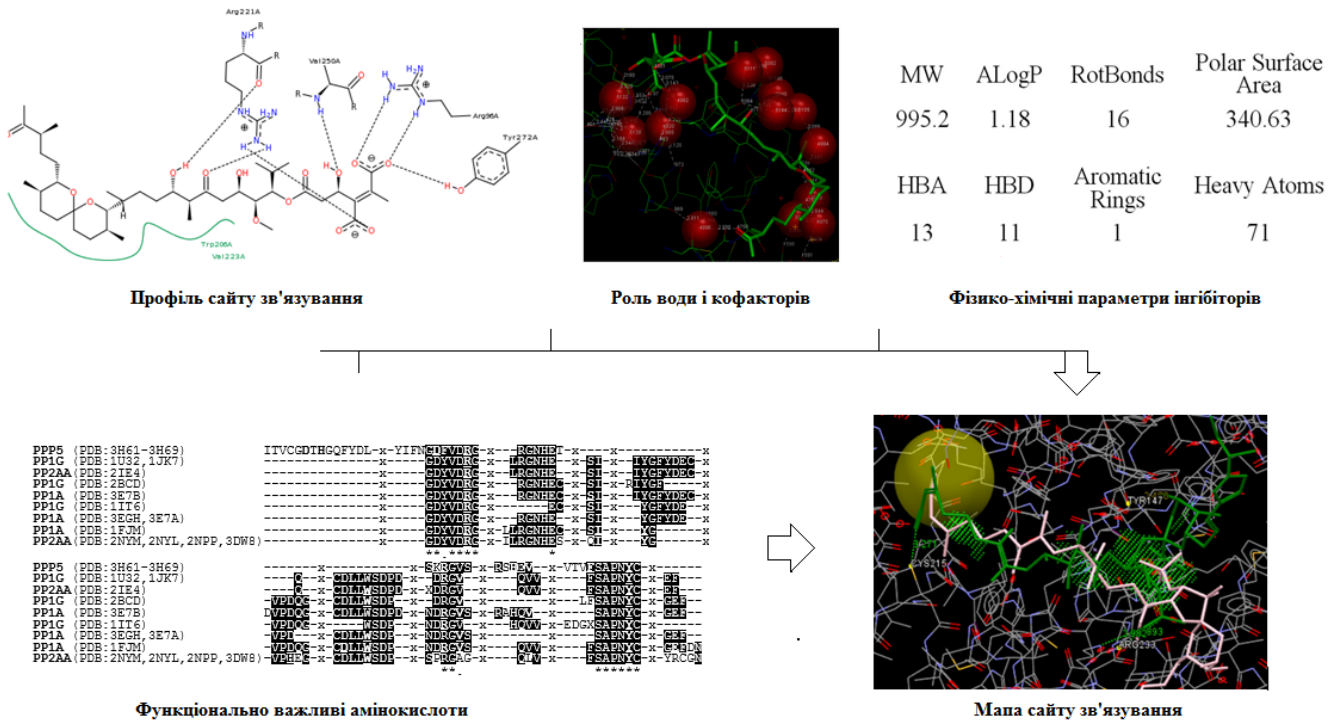


Рис. 5. Алгоритм реконструкції структури комплексів відомих селективних інгібіторів з серин/треонін-специфічними протеїнфосфатазами типу 1, 2A та 4 з *A. thaliana*.

Так, в результаті молекулярного докінгу відомих інгібіторів (Табл. 1) з протеїнфосфатазами 1, 2A і 4 з *A. thaliana* були встановлені оптимальні сайти ліганд-білкової взаємодії. Аналізуючи результати молекулярного докінгу сполук у сайті PP та верифікації отриманих комплексів, можна зробити ряд припущень. Окадаїнова кислота на відміну від її похідних динофізистоксинів типу 1 і 2 має більш високу загальну спорідненість до PP рослин. Щодо диференційної дії, більш значні показники спорідненості вона має до протеїнфосфатази PP2A, ніж до протеїнфосфатаз PP1 та PP4. Калікулін, що має значну подібність до окадаїнової кислоти, займає друге місце за оціночними функціями докінгу і так само відрізняється більшою селективністю до протеїнфосфатази PP2A, ніж до протеїнфосфатази PP1. Так, порівняно з стандартним протоколом молекулярного докінгу калікуліну і протеїнфосфатази PP4, докінг на поверхню молекули протеїнфосфатази PP1 і перевірка за допомогою методу МД вимагали постійного коректування параметрів. Ще трохи нижчі показники оціночних функцій докінгу має таутоміцин. Але він, на

відміну від перших двох лідерів, відрізняється більшою селективністю до протеїнофосфатази PP1, ніж до протеїнофосфатаз PP2A і PP4, що цілком співпадає з даними літератури. Варто зазначити, що за даними профільного аналізу, оокадаїнова кислота, калікулін і таутоміцин, які є селективними інгібіторами протеїнофосфатаз PP1 та PP2A, також здатні пригнічувати активність рослинних протеїнофосфатаз PP3, 5 і 6. Це також, підтверджують аналіз результатів докінгу і наявних даних літератури.

Таблиця 1

Результати докінгу інгібіторів з протеїнофосфатазами 1, 2A і 4 рослинного походження

	Оокадаїнова к-та	Динофізистоксин 1	Динофізистоксин 2	Мікроцистин-LR	Мікроцистин-LA	Нодуларин-R	Нодуларин-V	Калікулін	Таутоміцин	Кантаридин	Ендотал
Оціночні функції	PP1										
Номер конформеру (1-100)	81	12	6	55	17	4	2	53	93	26	11
GoldScore програми GOLD	70.9	55.1	59.2	68.2	69.2	56.1	52.4	61.6	62.2	40.8	40.1
AspScore програми GOLD	21.8	29.9	48.3	32.4	40.1	17.6	23.7	31.5	20.7	13.9	13.3
Водневі зв'язки (№)	3	2	3	4	2	3	3	3	2	3	6
Короткі взаємодії (+/-)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Референсна структура (+/-)	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-
	PP2A										
Номер конформеру (1-100)	13	54	16	13	56	68	23	80	48	4	6
GoldScore програми GOLD	77.1	51.1	48.3	73.3	74.3	63.1	62.8	75.1	60.3	43.2	42.1
AspScore програми GOLD	40.8	32.5	27.9	45.1	40.7	20.5	30.3	31.3	17.8	23.6	21.5
Водневі зв'язки	4	2	1	3	3	3	2	3	3	5	2
Короткі взаємодії	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Референсна структура	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PP4										
Номер конформеру (1-100)	27	16	52	7	16	66	87	69	70	48	26
GoldScore програми GOLD	68.6	51.3	55.7	66.2	59.9	50.3	49.7	60.4	55.4	37.8	32.5
AspScore програми GOLD	34.6	46.7	44.3	32.5	42.6	15.4	20.2	10.5	24.2	15.2	12.9
Водневі зв'язки	1	4	3	2	2	4	3	5	2	4	3
Короткі взаємодії	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Референсна структура	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-

Нодуларин і мотупорин, будучи консервативними інгібіторами протеїнофосфатази PP1 в рослинних клітинах, можуть знижувати активність протеїнофосфатази PP2A, до якої мають більшу селективність, ніж до протеїнофосфатаз PP1 і PP4. Окрім того, порівнюючи сайти зв'язування інгібіторів протеїнофосфатаз за допомогою профільних методів, було встановлено, що вони можуть пригнічувати активність протеїнофосфатаз PP5 і 6.

Стосовно кантаридину і ендоталу, за результатами профільного аналізу було припущено, що вони мають низьку специфічність, і можуть діяти майже на всі рослинні серин/треонін-специфічні протеїнофосфатази, окрім протеїнофосфатази типу PP7. Останнє обумовлюється консервативністю сайту зв'язування цих лігандів. Однак це твердження носить гіпотетичний характер і підтверджене тільки за допомогою методів молекулярного моделювання. Зараз можна лише зробити припущення, що похідні кантаридину можуть знижують активність протеїнофосфатази PP2A, що співпадає з даними літератури.

Також за результатами комбінації методів хемоінформаційного пошуку і молекулярного докінгу була створена бібліотека потенційних інгібіторів протеїнофосфатаз. Сполуки, які були відібрані на підставі подібності до гетероциклічного ядра оадаїнової кислоти, мають певні структурні відмінності, що також передбачає певні відмінності у специфічності. Найбільш перспективними з них є 5 речовин:

CID44288019 – (E,4R)-6-((3R,4S,5R,8S,9S,12R)-12-((2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-диметил-8-((3S)-3-метил-4-оксопентил)-1,7-діоксаспіро(5.5)ундека-2-іл)-5,9-дигідрокси-4-метокси-2,8-диметил-7-оксотридекан-3-іл)окси-4-гідрокси-2-метил-6-оксогекс-2-еноєва кислота;

CID3053530 – 2-(6-(6-(3-(5-етил-5-гідрокси-6-метилоксан-2-іл)-3,10,12-триметил-4,6,8-триоксадиспіро(4.1.5[^]{7}.3[^]{5}))пентадец-13-ен-9-іл)-3-гідрокси-4-метил-5-оксооксан-2-іл)-3,5-диметилоксан-2-іл)бутанова кислота;

CID44451975 – (Z)-2-((1R)-3-((3R,4S,5R,8S,9S,12R)-12-((2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-диметил-8-((3S)-3-метил-4-оксопентил)-1,7-діоксаспіро(5.5)ундека-2-іл)-5,9-дігідрокси-4-метокси-2,8-диметил-7-оксотридекан-3-іл)окси-1-гідрокси-3-оксопропіл)-3-метилбут-2-енедіова кислота;

CID10437923 – (E,3R,4S,8S,9S,12R)-12-((2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-диметил-8-((3S)-3-метил-4-оксопентил)-1,7-діоксаспіро(5.5)ундекан-2-іл)-3,9-дигідрокси-4-метокси-2,8-диметилтридец-5-ен-7-он;

CID10930902 – 2-O-трет-бутил-4-O-((3R,4S,5R,8S,9S,12R)-12-((2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-диметил-8-((3S)-3-метилпент-4-еніл)-1,7-діоксаспіро(5.5)ундекан-2-іл)-5,9-дигідрокси-4-метокси-2,8-диметил-7-оксотридекан-3-іл)1-O-етил (Z,3R)-3-гідрокси-1-метилбут-1ен-1,2,4-трикарбоксилат.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі виконано порівняльне дослідження фосфатомів вищих рослин і тварин та встановлено спільні риси і відмінності у складі представників протеїнофосфатаз з різних царств. Відібрано групу протеїнофосфатаз, які беруть участь у регуляції мікротрубочок рослин та за допомогою методів хемоінформатики і молекулярного моделювання встановлено особливості, що обумовлюють їх специфічну взаємодію з інгібіторами.

1. На підставі подібності до 150-ти протеїнофосфатаз, що складають фосфатом людини, було виконано біоінформаційне порівняння 680-х потенційних гомологів з вищих рослин, що підтвердило існування 175 індивідуальних рослинних протеїнофосфатаз (113 серин/треонін-, 36 тирозин- і

26 аспартат-специфічних протеїнфосфатаз) з *A. thaliana* і 29-ти потенційних протеїнфосфатаз з *P. patens*. Встановлена відсутність у вищих рослин ряду серин/треонін- (PPP3CC, PPP3CB, PPP3CA, PPP1CB, PPP1CA, PPP1CC, PPM2C, PPM1B) та тирозин- (EYA3, EYA2, PDX(CIN), SMPD1, SMPDL3A, SMPDL3B, MPPD2, NT5E(CD73), CTDSP1(SCP1) і CTDSP3(SCP3)) специфічних протеїнфосфатаз, а також доведено існування видоспецифічних протеїнфосфатаз у *A. thaliana* (PDP2, PPM1M, MDP1, TIMM5), *P. patens* (CTDSP2(SCP1)) та однодольних *Z. mays* та *O. sativa* (EYA1, EYA4, DULLARD).

2. За результатами реконструкції повного фосфатому *A. thaliana*, профільного пошуку та даних літератури визначено групу серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP7), класичних нерцепторних тирозинфосфатаз (PTPN1, PTPN3, PTPN11, PTPN13, PTPRJ) і дуальних протеїнфосфатаз (CDC25, DUSP7, DSP14), потенційно здатних дефосфорилувати α -, β -, γ -тубуліни дводольних (*N. tabacum*, *M. sativa*) і однодольних (*O. sativa*, *Z. mays* і *T. aestivum*) рослин, а також відібрано 151 протеїнфосфатазу, які потенційно можуть впливати на мікротрубочки вищих рослин.

3. Створено локальну базу даних, що включає 60 експериментально-встановлених PDB-структур тваринних протеїнфосфатаз, за допомогою якої здійснено профільну реконструкцію 17-ти представників серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типів 1, 2A і 4 з *A. thaliana*, *N. tabacum*, *O. sativa* subsp. *japonica*, *M. sativa*, *Z. mays* та *T. aestivum*. Результати аналізу амінокислотних послідовностей, фізико-хімічних властивостей, просторових структур та молекулярної динаміки протеїнфосфатаз 1, 2A, 4 переконливо засвідчили подібність їх топології у тварин і вищих рослин.

4. За результатами аналізу структурних механізмів утворення ліганд-білкових комплексів, встановлено, що зв'язування інгібіторів і молекул протеїнфосфатаз у більшості випадків відбувається за участю іонів металів активного центру відповідної протеїнфосфатази та молекул води (від 1 до 18-ти), що утворюють водневі зв'язки у сайтах ліганд-білкової взаємодії. Виключенням є мікроцистини, які взаємодіють з молекулами протеїнфосфатаз PP2A завдяки утворенню ковалентних зв'язків.

5. За результатами пошуку альтернативних мішеней інгібіторів протеїнфосфатаз висунуто припущення, що такі селективні інгібітори протеїнфосфатаз PP1 та 2A, як окадаїнова кислота, мікроцистин, калікулін і таутоміцин також здатні пригнічувати активність рослинних серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типів 3, 5 і 6. Нодуларин і мотупорин, які є консервативними інгібіторами серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типу 1 в рослинних клітинах, також здатні інгібувати активність протеїнфосфатази PP2A і протеїнфосфатази типів 4, 5 і 6. Водночас, визначена низька специфічність похідних кантаридину, що передбачає їх вплив майже на всі рослинні серин/треонін-специфічні протеїнфосфатази, окрім типу PP7.

6. На підставі структурного аналізу властивостей потенційних інгібіторів протеїнфосфатаз встановлено, що більшість з них мають лише одну область

можливого зв'язування донорів водневих зв'язків. Виключення складають ендотал - селективний інгібітор PP5, та таутоміцин - інгібітор протеїн фосфатази PP1, які мають декілька областей зв'язування і більшу площу полярної поверхні та кількість рухливих зв'язків.

7. На підставі результатів молекулярного докінгу доведена ідентичність структурних механізмів ліганд-білкової взаємодії тваринних протеїнофосфатаз і їх рослинних гомологів з оадаїновою кислотою, мікроцистином, дигідромікроцистином, калікуліном, нодуларином, мотупорином, таутоміцином, динофізистоксинами обох типів, кантаридином та ендоталом, що цілком співпадає з результатами профільного аналізу. Виключення складають кантаридин і ендотал, для яких дані молекулярного докінгу та профільного аналізу відрізняються.

8. Результати оцінки молекулярної динаміки комплексів рослинних протеїнофосфатаз PP1, PP2A і PP4 з інгібіторами в діапазоні від 5 до 100 нс із застосуванням повноатомного силового поля і водно-іонного оточення доводять більшу енергетичну вигідність зв'язаного стану досліджених інгібіторів, ніж їх вільного стану.

9. Спираючись на опорну структуру оадаїнової кислоти та результати біоінформаційного і хемоінформатичного пошуку, створена бібліотека лігандів, подібних за будовою до гетероциклічного ядра оадаїнової кислоти, та відібрано 5 речовин (PubChem: CID10437923, CID44288019, CID3053530, CID10930902, CID44451975), які запропоновано як нові потенційні інгібітори протеїнофосфатаз PP1, PP2A і PP4.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Самофалова ДО, Карпов ПА, Раєвський ОВ, Блюм ЯБ. Реконструкція просторової структури комплексів рослинних протеїнофосфатаз типу 1, 2а, 4 з мікроцистином-LR. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:339-344. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*

2. Samofalova DA, Karpov P.A., Raevsky A.V., Blume Ya.B. Protein phosphatases associated with the microtubules regulation: spatial structure reconstruction and analysis. Cell Biol. Int. 2017. Available from: doi: 10.1002/cbin.10810. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, постановка експериментів, участь у написанні статті)*

3. Самофалова ДА, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Особливості ліганд-білкової взаємодії інгібіторів протеїнофосфатаз, потенційно пов'язаних з цитоскелетом. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:229-233. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*

4. Samofalova DA, Karpov PA, Blume Ya.B. Bioinformatic comparison of human and higher plant phosphatomes. Cytol. Genetics. 2015;49(4):3-10.

(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)

5. Самофалова ДА, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Поиск производных ингибиторов протеинфосфатаз, потенциально связанных с регуляцией цитоскелета растений. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;15:87-91. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, розроблена схема досліджень та сформульовані висновки разом зі співавторами, постановка експериментів, написання статті)*

6. Самофалова Д, Карпов П, Блюм Я. Пошук рослинних молекулярних мішеней селективних інгібіторів серин-треонін специфічних протеїнофосфатаз. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2014;68:392-404. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*

7. Samofalova DA, Karpov PA, Nyporko AU, Blum YB. Reconstruction of the spatial structure of plant phosphatases types 1 and 2A in complexes with okadaic acid. Cytol. Genetics. 2011;45(3):153–162. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*

8. Самофалова ДО, Карпов ПА. Дослідження протеїнофосфатаз типу 6, що потенційно здатні регулювати динаміку мікротрубочок у рослин. III Міжнародна конференція "Актуальні проблеми наук про життя та природокористування", 2015, 28–31 жовтня, Київ, Україна. с.249.

9. Самофалова ДА, Карпов ПА. Аналіз взаємодії кантаридинових інгібіторів с растительными протеинфосфатазами. Друга конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія», 2013, 23-24 грудня, Київ, Україна. с.36.

10. Karpov PA, Samofalova DA, Blume YaB. Search of effective protein phosphatases inhibitors using nanochemical approaches and evaluation of their biological activity in silico. Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13), 2013, 25–28 July, Moscow, Russia. p.228.

11. Самофалова ДО, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Результати біоінформаційного і філогенетичного аналізу групи серин-треонінспецифічних протеїнофосфатаз тваринного і рослинного походження. 3-й з'їзд Українського товариства клітинних біологів з міжнародним представництвом, 2012, 16-20 травня, Ялта, Україна. с.174.

12. Karpov PA, Samofalova DA, Blume YaB. Identification of new derivatives of okadaic acid - selective inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1) and 2A (PP2A). The eighth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology, 2012, 25–29 June, Novosibirsk, Russia. p.277.

13. Karpov PA, Samofalova DA, Blume YaB. Chemogenomic profiling: identification of potential interactions between microcystin-Lr and plant serine/threonine-specific protein phosphatases. 3rd International Symposium: «Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design», 2012, 17-23 September, Lviv, Ukraine. p.156.

14. Karpov PA, Samofalova DA, Blume YaB. Chemogenomic profiling for identification of okadaic acid receptors among plant serine/threonine-specific protein phosphatases. III Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics MolPhy-3», 2012, 31-04 August, Moscow, Russia. p.152.
15. Самофалова ДА., Карпов ПА., Блюм ЯБ. Биоинформационный и хемогеномный анализ фосфатомов животных и высших растений. V Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике «Непостоянство генома», 2012, 3 – 7 декабря, Звенигород, Россия. с.57.
16. Самофалова ДА., Карпов ПА. Ідентифікація рослинних мішеней калікуліна А методом кластеризації сайтів зв'язування. XII конференція молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів», 2012, 15-16 листопада, Київ, Україна. с.199.
17. Karpov PA, Samofalova DA, Blume YaB. Reconstruction of the spatial structure of plant phosphatases PP1 and PP2a in complexes with microcystin-LR. X Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Шевченківська весна 2012: біологічні науки», 2012, 19-23 березня, Київ, Україна. с.271.
18. Karpov PA, Samofalova DA, Blume YaB. Structural features of plant protein phosphatases PP1 and PP2A and there interaction with okadaic acid. The Plant Genomics European Meeting, 2011, 4-7 May, Istanbul, Turkey. p.90.
19. Karpov PA, Samofalova DA, Blume YaB. Reconstruction of Arabidopsis thaliana phosphatome. Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'11), 2011, 21–24 July, Moscow, Russia. p.333-334.
20. Самофалова ДА., Карпов ПА., Блюм ЯБ. Результаты сравнительного биоинформационного анализа серин-треонин специфичных протеинфосфатаз из животных и высших растений. I конференція молодих вчених ІХБГ НАН України «Биология растений и биотехнология», 2011, 5-7 червня, Біла Церква, Україна. с.71.
21. Samofalova DA, Nyporko AYU, Blume YaB. Structural peculiarities of plant protein phosphatase interaction with okadaic acid. The 7th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, 2010, 20–27 June, Novosibirsk, Russia. p.254.
22. Nyporko A, Samofalova D, Blume YB. Phosphatome of Arabidopsis thaliana as a target for structural bioinformatics approaches. 7th Plant Genomics European Meeting (7 Plant GEM), 2008, 24-27 September, Albena, Bulgaria. p.81.
23. Blume YB., Karpov PA, Nyporko AYU, Samofalova DA, Sheremet YaO, Yemets AI. Elucidation of microtubule regulation for practical applications through bioinformatic analysis of Arabidopsis kinome and phosphatome. V міжнародна конференція “Геном рослин”, 2008, 13-16 жовтня, Одеса, Україна. с.162–164.

АНОТАЦІЯ

Самофалова Д.О. Реконструкція просторової структури протеїнфосфатаз, задіяних в регуляції цитоскелету у рослин, та структурно-біологічні механізми їх взаємодії зі специфічними інгібіторами. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2018.

Дисертацію присвячено дослідженню протеїн фосфатаз, задіяних в регуляції цитоскелету у рослин та вивченню особливостей їх взаємодії зі специфічними інгібіторами. У результаті проведених досліджень було реконструйовано повні фосфатоми рослин, які представлені суперродинами серин/треонін-, тирозин- та аспаратат-специфічних протеїнфосфатаз. Відібрано групу рослинних протеїнфосфатаз, пов'язаних з регуляцією структури та функцій мікротрубочок, та реконструйовано тривимірні моделі протеїнфосфатаз людини і представників одно- та дводольних рослин. Встановлено структурно-біологічні особливості взаємодії інгібіторів з протеїнфосфатазами рослин. Оригінальні дані щодо сайтів ліганд-білкової взаємодії розширюють уявлення стосовно механізмів, що обумовлюють селективність відомих інгібіторів протеїнфосфатаз та особливостей їх дії в клітинах вищих рослин та мають значення для подальшого раціонального дизайну сполук з антифосфатазною активністю. Встановлені відмінності спорідненості інгібіторів до різних PP1, PP2A і PP4 рослин дають можливість оптимізувати молекулярний дизайн нових біологічно активних сполук із підвищеною селективністю до зазначених молекулярних мішеней. Висловлено припущення про 5 похідних інгібіторів протеїнфосфатаз з більшим рівнем спорідненості до цільових PP1, PP2A, PP4, які можуть знайти застосування як нові ефективні інгібітори протеїнфосфатаз вищих рослин.

Ключові слова: фосфатом, PPP (PP1, PP2A, PP4), РТР, специфічна взаємодія, хемоінформатика, молекулярне моделювання та докінг *in silico*, інгібітори протеїнфосфатаз та їх похідні.

АННОТАЦИЯ

Самофалова Д.А. Реконструкция пространственной структуры протеинфосфатаз, участвующих в регуляции цитоскелета у растений и структурно-биологические механизмы их взаимодействия со специфическими ингибиторами. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 - цитология, клеточная биология, гистология. - ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию протеинфосфатаз, задействованных в регуляции цитоскелета у растений и изучению особенностей их взаимодействия со специфическими ингибиторами. В результате проведенных исследований было реконструировано полные фосфатомы растений, которые представлены суперсемействами серин/треонин-, тирозин- и аспартат-специфичных протеинфосфатаз. Отобрана группа растительных протеинфосфатаз, связанных с регуляцией структуры и функций микротрубочек, и реконструировано трехмерные модели протеинфосфатаз человека и представителей одно- и двудольных растений. Определены структурно-биологические особенности взаимодействия ингибиторов с протеинфосфатазами растений. Оригинальные данные по сайтам лиганд-белковых взаимодействий расширяют представление о механизмах, которые обуславливают селективность известных ингибиторов протеинфосфатаз и предсказывают их действие в клетках высших растений, а также имеют значение для дальнейшего рационального дизайна соединений с антифосфатазной активностью. В работе определены различия родства ингибиторов к различным PP1, PP2A и PP4 растений, которые дают возможность оптимизировать молекулярный дизайн новых биологически активных соединений с повышенной селективностью к указанным молекулярным мишеням. Высказано предположение о 5 производных ингибиторах протеинфосфатаз с большим уровнем сродства к целевым PP1, PP2A, PP4, которые могут найти применение как новые эффективные ингибиторы протеинфосфатаз высших растений.

Ключевые слова: фосфатом, PPP (PP1, PP2A, PP4), РТР, специфическое взаимодействие, хемоинформатика, молекулярное моделирование и докинг *in silico*, ингибиторы протеинфосфатаз и их производные.

ANNOTATION

Samofalova D.O. Reconstruction spatial structure of the protein phosphates involved in regulation of cytoskeleton in plants, structural and biological mechanisms of their interaction with specific inhibitors. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

Protein phosphatases associated with the cytoskeleton regulation in plants are considered in the presented Thesis. Characteristics of their interaction with specific inhibitors are studied. As a result of the research, complete plant phosphatomes, represented with serine/threonine-, tyrosine-, and aspartate-specific protein phosphatase superfamilies, were reconstructed. A group of plant protein phosphatases associated with the microtubules regulation has been selected, models of human protein phosphatase and homolog proteins of monocotyledonous and dicotyledonous plants were constructed. Structural and biological features of interaction between inhibitors and plant protein phosphates were established. The original data on ligand-protein interaction sites extends the view of mechanisms that determine the

selectivity of known protein phosphatase inhibitors and peculiarities of their structures in higher plant cells. These data are relevant for the subsequent rational design of compounds with antiphosphatase activity. The established differences in the affinity of inhibitors toward different PP1, PP2A and PP4 plants made it possible to optimize the molecular design of new biologically active compounds with increased selectivity against these molecular targets. 5 derivatives of protein phosphatase inhibitors with a higher levels of affinity to the target PP1, PP2A, PP4 were proposed. It is possible to use the described compounds as new effective inhibitors of protein phosphatase in higher plants.

Key words: phosphatome, PPP (PP1, PP2A, PP4), PTP, specific interaction, chemoinformatics, molecular modeling and docking *in silico*, protein phosphatase inhibitors and their derivatives.