

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

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**САМОФАЛОВА ДАРІЯ ОЛЕКСІЇВНА**

УДК: 57.052.6:577.151.042:576.311.348.7

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**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

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.



Д.О. Самофалова

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, академік НАН  
України Блюм Ярослав Борисович

Київ – 2018

## 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.

Протеїнфосфатази належать до складної групи ферментів, які виникли на ранніх стадіях еволюції і спільно із протеїнкіназами залучені у процеси фосфорилювання-дефосфорилювання білків. На відміну від протеїнкіназ, різні родини протеїнфосфатаз виникли на окремих етапах еволюції і не мають безпосередніх спільних предків, що підтверджено даними молекулярної філогенетики та біоінформатики. Окремі групи протеїнфосфатаз унікальні за будовою та функціями і характерні для представників окремих царств. В першу чергу це стосується протеїнфосфатаз, залучених до мітотичних процесів і асоційованих з регуляцією цитоскелету. Було доведено існування зв'язку між функціонуванням мікротрубочок та активністю серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типів PP1, PP2A/PP2B, PP4, PP6 і PP7. Вважається, що протеїнфосфатази типу PP1, PP2A і PP4 здатні до прямого дефосфорилювання  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -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. Особливої уваги заслуговує група, яка об'єднує класичні та дуальні тирозинфосфатази (PTP1B, CDC25, PTPN1, PTPN11, PTPN13, PTP14, DSP-DEP1, DSP7, DSP14B). Показано, що протеїнфосфатази CDC25a і CDC25b здатні активувати циклін-залежні протеїнкінази, які в свою чергу контролюють окремі фази мітозу.

Протеїнфосфатаза PTP1B сприяє проліферації клітин, а PTPN11 (SHP2) необхідна для підтримки стабільності організації хромосом.

Також існує широкий спектр інгібіторів протеїнфосфатаз, які відрізняються за рівнем селективності і, відповідно, можуть використовуватися для дослідження різноманітних клітинних процесів. Враховуючи спеціалізовані функції окремих протеїнфосфатаз, а також потенціал їх практичного використання як важливих молекулярних мішеней, існують значні і очевидні прогалини в механізмах в регуляції їх активності. Особливо це твердження стосується наших уявлень про особливості будови сайтів ліганд-білкової взаємодії і визначення структурних механізмів, що обумовлюють селективну дію окремих інгібіторів протеїнфосфатаз рослинного походження. Оскільки такі дані практично відсутні, дослідження механізмів взаємодії рослинних протеїнфосфатаз із специфічними інгібіторами є надзвичайно актуальним.

Саме тому метою нашого дослідження було провести біоінформаційне дослідження протеїнфосфатаз рослин, які впливають на структуру і функціонування мікротрубочок, реконструювати їх просторову структуру та визначити структурні механізми специфічності їх взаємодії з різними групами інгібіторів.

В результаті проведених досліджень встановлено 680-т анотованих і ще не відомих протеїнфосфатаз рослинного походження, депонованих в базах даних GenBank, UniProtKB, TAIR, PlatnGDB, EnsemblPlants, Phytozome, PTGBase. За основу було використано найбільш досліджений фосфатом – фосфатом людини. 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, які об'єднують неканонічні протеїнфосфатази. А також на основі комплексного біоінформаційного пошуку 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).

На основі фосфатому *A. thaliana* шляхом профільного пошуку і аналізу даних літератури визначено протеїнфосфатази, пов'язані з дефосфорилуванням мікротрубочок вищих рослин, зокрема групи серин/треонін-специфічних (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP7), класичних нерцепторних тирозинових (RTPN1, RTPN3, RTPN11, RTPN13, RTPRJ) і дуальних протеїнфосфатаз (CDC25, DUSP7, DSP14), потенційно здатних дефосфорилувати молекули  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -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, 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*. Для реконструкції їх просторової структури було досліджено 116 їх найближчих гомологів з експериментально встановленою просторовою структурою та підтверджено значну консервативність представників серин/треонін-специфічних PP рослинного і

тваринного походження. Визначено, що для цих типів рослинних PP притаманний тип укладання  $\alpha+\beta$ , ідентичний до їх гомологів тваринного походження. Показано, що не зважаючи на високий рівень гетерогенності первинної структури, фізико-хімічні властивості протеїнфосфатаз PP1, PP2 і PP4 співпадають за основними показниками на рівні всієї групи. Водночас, для усіх досліджених каталітичних субодиниць PP1, PP2 і PP4 була показана характерна консервативність С-кінцевої ділянки у порівнянні з N-кінцем та унікально  $\alpha$ -структура каталітичного домену, яка характерна для всієї групи серин/треонін-специфічних PP.

Реконструкцію просторової структури 17-ти рослинних протеїнфосфатаз (близько 60 промоделей) проведено за допомогою серверу I-TASSER. Якість моделей протеїнфосфатаз PP1, PP2A і PP4 з *A. thaliana*, *N. tabacum*, *M. sativa*, *O. sativa*, *Z. mays* та *T. aestivum* була підтверджена за допомогою короткочасної молекулярної динаміки в водно-іонному оточенні (5-100 нс в залежності від об'єкту), оцінки сервісу MolProbity (діапазон 95-100) та конформаційних карт Рамачандрана (98,2% для PP1, 97,9 для PP2A та 97,5 для PP4).

Після реконструкції просторової структури рослинних протеїнфосфатаз PP1, PP2A і PP4 було проведено порівняння топології їх функціональних мотивів, таких як область зв'язування АТФ, сайту взаємодії з кофакторами (іонами металів) активного центру, а також ділянок, відповідаючих за зв'язування молекул інгібіторів відповідних PP. Відмінності у глобулярних фрагментах рослинних протеїнфосфатаз 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. 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.

Наступним етапом дослідження механізмів зв'язування інгібіторів з рослинними протеїнофосфатазами був проведений аналіз хімічних баз даних, за яким відібрано 231 інгібітор серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз 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 протеїнофосфатаз PP1 і PP2A з оадаїновою 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 аналізу 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. Показано, що взаємодія інгібіторів з протеїнофосфатазами відбувається при участі від 1 до 18 функціонально значимих молекул води. Виключенням були мікроцистини (LR і LA), які взаємодіють ковалентно з PP2A. А також кантаридин і ендотал, що утворюють зв'язки з іонами металів PP5, які у випадку їх відсутності під час виконання докінгу інтеркалюють в товщу молекул протеїнофосфатаз PP1, PP2A і PP4. За результатами порівняння PDB-комплексів протеїнофосфатази PP1 з оадаїновою 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 протеїнофосфатази PP2A взаємодіючої з оадаїновою кислотою, мікроцистином-LR і динофізистоксином типу 1 і 2, відповідними залишками були Arg89, Tyr272, Arg214, Ala216, Asn217, His218.

Тоді як для комплексів протеїнофосфатаз PP5 з кантаридином і ендоталом консервативними залишками є Arg275, Tyr451, Arg400, Val402, Asn303, His304.

Реалізація вищезазначених етапів дозволила відпрацювати максимально коректний алгоритм реконструкції комплексів рослинних протеїнофосфатаз з потенційними інгібіторами. Так, 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 протеїнофосфатази PP2A, ніж до протеїнофосфатаз 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 протеїнофосфатази PP2A, ніж до протеїнофосфатази PP1. Так, порівняно з стандартним протоколом молекулярного докінгу калікуліну і протеїнофосфатази PP4, докінг на поверхню молекули протеїнофосфатази PP1 і перевірка за допомогою методу МД потребували постійної корекції 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, окадаїнова кислота, калікулін і таутоміцин, які є селективними інгібіторами протеїнофосфатаз PP1 та PP2A, також здатні пригнічувати активність рослинних протеїнофосфатаз PP3, PP5 і PP6. Це також, підтверджує аналіз результатів докінгу і наявних даних літератури. 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 PP6. 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 протеїнфосфатази, окрім протеїнфосфатази типу PP7. Однак це твердження носить гіпотетичний характер і підтверджується тільки за допомогою методів молекулярного моделювання. Припускаємо, що похідні кантаридину знижують активність протеїнфосфатази PP2A, що співпадає з даними літератури.

Також за результатами комбінації методів хемоінформаційного пошуку і молекулярного докінгу була створена бібліотека потенційних інгібіторів протеїнфосфатаз. 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 (PubChem: CID10437923, CID44288019, CID3053530, CID10930902, CID44451975), які можуть знайти застосування як нові потенційні інгібітори протеїнфосфатаз вищих рослин.

Отже в результаті дисертаційного дослідження вперше реконструйовано повні фосфатоми рослин і проаналізовано еволюційну дивергенцію фосфатомів вищих рослин і людини. Визначено групу рослинних гомологів тваринних протеїнфосфатаз, що належить до суперродин серин/треонін-, тирозин- та аспартат-специфічних протеїнфосфатаз. Відібрано групу рослинних протеїнфосфатаз, пов'язаних з регуляцією структури та функцій мікротрубочок та встановлено структурні особливості їх взаємодії зі специфічними інгібіторами. Отримані дані розширюють уявлення стосовно механізмів, що обумовлюють селективність існуючих інгібіторів до протеїнфосфатаз рослинного походження та є важливими для подальшого раціонального дизайну сполук з підвищеною спорідненістю до зазначених молекулярних мішеней та дозволяють оптимізувати процес їх розробки.

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



## Список публікацій за темою дисертаційної роботи

### Статті:

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 PA, Raevsky AV, Blume YaB. 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 YaB. 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)

Тези:

8. Самофалова ДО, Карпов ПА. Дослідження протеїнфосфатаз 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 протеїнфосфатаз 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 YaB. 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 YaB, 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.

## SUMMARY

*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 belong to a complex group of enzymes that arose in the early stages of evolution and, along with protein kinases are involved in phosphorylation and dephosphorylation of proteins. Unlike protein kinases, various families of protein phosphatases arose at separate stages of evolution and do not have direct common ancestors, as evidenced by data from molecular phylogenetics and bioinformatics. Separate groups of protein phosphatases are unique in structure and functions and typical for representatives of individual kingdoms. First of all it concerns protein phosphatases, involved in mitotic processes and processes associated with cytoskeleton regulation. It was proved that there is a link between the functioning of the microtubules and the activity of serine/threonine-specific protein phosphatases PP1, PP2A/PP2B, PP4, PP6 and PP7. It is believed that PP1, PP2A and PP4 protein phosphatases are capable of direct dephosphorylation of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tubulins, which is confirmed by their influence on the organization of microtubules in vitro. At the same time, in case of PP6 and PP7 protein phosphatases, only their participation in regulation of mitosis and cell cycle was proved, but direct interaction with tubulin remains questionable. The group that combines classical and dual tyrosine phosphatases deserves special attention (PTP1B, CDC25, PTPH1, PTPN11, PTPN13, PTP14, DSP-DEP1, DSP7, DSP14B). It was shown that CDC25a and CDC25b protein phosphatases are capable of activating cyclin-dependent protein kinases, which in their turn control individual phases of mitosis. PTP1B promotes cell proliferation, and PTPN11 (SHP2) is necessary for chromosomes stability.

There is also a wide range of protein phosphatase inhibitors that differ in the level of selectivity and, accordingly, can be used to study a variety of cellular

processes. Taking into account the specialized functions of individual protein phosphatases, as well as the potential of their practical use as important molecular targets, there are significant and obvious gaps in the mechanisms of regulation of their activity. In particular, this statement has a direct relation to our ideas about the features of the structure of sites of ligand and protein interaction and the definition of structural mechanisms that determine the selective action of individual protein phosphatase inhibitors of plant origin. Since such data are practically missing, the study of mechanisms of interaction of plant protein phosphatases with specific inhibitors is extremely topical.

That is why the purpose of our study was to conduct a bio-informational study of protein phosphatases of plants that affect the structure and functioning of microtubules, reconstruct their spatial structure and determine the structural mechanisms of the specificity of their interaction with different groups of inhibitors.

As a result of the conducted researches, 680 annotated and not yet known plant protein phosphatases deposited in the databases GenBank, UniProtKB, TAIR, PlatnGDB, EnsemblPlants, Phytozome and PTGBase were established. The most studied phosphatome - phosphatome of human - was used as the basis. It was found that for potential protein phosphatases of plants, the length of the amino acid sequences of about 300-320 residues, the presence of the catalytic domain of a certain type: serine/threonine- (PP2A: SM00156, PP2C: SM00332 or PP2C-SIG: SM00331), aspartate- (CPDc-domain: SM000577), tyrosine-specific protein phosphatases (PTP SMART#: SM00194, DSP: SM000195, PTP/DSP: SM00012) and several subdomains that combine non-canonical protein phosphatases, is typical. Also, on the basis of the comprehensive bio-information search, the existence of 175 individual protein phosphatases (113 serine/threonine, 36 tyrosine-specific and 26 aspartate-specific protein phosphatases) from *A. thaliana* and 29 potential protein phosphatases from *P. patens* was confirmed. The joint clustering of animal protein phosphatases and their plant homologs revealed the absence in higher plants of a number of serine/threonine- (PPP3CC, PPP3CB, PPP3CA, PPP1CB, PPP1CA, PPP1CC, PPM2C, PPM1B) and tyrosine-specific (EYA3, EYA2, PDX(CIN), SMPD1,

SMPDL3A, SMPDL3B, MPPD2, NT5E (CD73), CTDSP1(SCP1) CTDSP3(SCP3)) protein phosphatases. At the same time, the existence of the unique protein phosphatases, found only in *A. thaliana* (PDP2, PPM1M, MDP1, TIMM5), *P. patens* (CTDSP2(SCP1)) and monocotyledon *Z. mays* and *O. sativa* (EYA1, EYA4, DULLARD), was proved.

On the basis of the phosphatome *A. thaliana*, by means of the profile search and analysis of the literature data, protein phosphatases, which are associated with dephosphorylation of the microtubules of higher plants, were determined, in particular, the serine/threonine-specific group (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP7), classical non-receptor tyrosine (PTPN1, PTPN3, PTPN11, PTPN13, PTPRJ) and dual protein phosphatases (CDC25, DUSP7, DSP14), potentially capable of dephosphorizing the molecules  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ - tubulin. Also, the respective groups were determined in dicotyledonous (*N. tabacum*, *M. sativa*), and monocotyledon (*O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum*) plants. In total, 151 plant protein phosphatases that potentially participate in the regulation of microtubules were analyzed. For further studies, 17 proteins were selected for which a high level of similarity of amino acid sequences, the presence of experimentally established spatial structures of catalytic domains, as well as the presence of experimental evidences of the effect on microtubule functions was determined: P30366, Q07099, P48529 from *A. thaliana*; O0485, Q9XGH7, O04859 from *N. tabacum*; Q10NJ4, Q6EPR6, Q0DBD3 from *O. sativa* subsp. japonica; P48488, Q06009 from *M. sativa*; P22198, B4FSV7, C4J0A6 from *Z. mays*; W5EJI6, W5GEB7, W5FTD6 from *T. aestivum*. For the reconstruction of the spatial structure, 116 of their closest homologs were studied with the experimentally established spatial structure, and the significant conservatism of the serine/threonine-specific PP of plant and animal origin was confirmed. It was determined that for these types of plant PPs, the type of laying  $\alpha+\beta$  is identical to their homologs of animal origin. It has been shown that despite the high level of heterogeneity of the primary structure, the physical and chemical properties of the protein phosphatases PP1, 2 and 4 coincide by the main indicators at the level of the entire group. At the same time, for all studied catalytic subunits PP1, 2 and 4, the characteristic conservatism of the

C-terminal region was shown in comparison with the N-terminus and the unique  $\alpha$ -structure of the catalytic domain, typical for the entire group of serine/threonine-specific PPs.

Reconstruction of the spatial structure of 17 plant protein phosphatases (about 60 master models) was conducted using the server I-TASSER. Quality of protein phosphatase models PP1, PP2A and PP4 from *A. thaliana*, *N. tabacum*, *M. sativa*, *O. sativa*, *Z. may* and *T. aestivum* was confirmed by short-term molecular dynamics in the water and ion environment. (5-100 ns depending on the object), estimation by the service MolProbity (the range 95-100) and Ramachandran conformational cards (98.2% for PP1, 97.9 for PP2A and 97.5 for PP4).

After reconstruction of the spatial structure of plant protein phosphatases PP1, PP2A and PP4, the comparison of the topology of their functional motives, such as the binding sites of ATP, the site of interaction with the cofactors (metal ions) of the active center, as well as the regions responsible for binding the molecules of inhibitors of the corresponding PPs, was carried out. Differences in globular fragments of plant protein phosphatases were observed only in the topology of individual amino acids of loop domains. In particular, histidine, which forms the active site of PP and is responsible for binding ATP in most plant PP1, differed from the marker PP1 from *A. thaliana* only in terms of conformation. However, it should be noted that this does not cause a significant violation of the site structure. The analysis of amino acids directly responsible for binding the molecules of inhibitors revealed only substitutions of individual residues. Thus, in the place of Ile143 PP1 *A. thaliana* y *Z. mays* there is a residue of Val. In case of PP4 from *N. tabacum*, instead of Phe279, there is tryptophan, and in PP4 from *T. aestivum* the residue of Ser was found instead of Arg109.

The next stage of the study of binding mechanisms of inhibitors with plant protein phosphatases was the analysis of chemical databases, and 231 inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases with proven biological activity were selected. The aforementioned sample was used as a control. Based on the 2D-finger prints, Tanimoto and Tversky indices (with the threshold of similarity 85%), 1105



compounds were selected for control. Among the control set, only 11 substances had not only biochemical confirmation of activity, but also the established mechanism of ligand and protein interaction. Thus, for today there are experimental evidences of the interaction of PP1 and PP2A protein phosphatases with okadaic acid and microcystin-LR, PP1 with microcystin-LA, calyculin A, nodularin and tautomycin, PP2A with dinophysistoxins, and PP5 with cantharidin and endothall.

Subsequently, this information was used in the reconstruction and analysis of the interaction of these inhibitors with plants PPs, and included the profile of the physical and chemical properties of complexes, analysis of the ligand and protein interaction, as well as the evaluation of the possibility of the existence of alternative targets for inhibitors in plants. It has been shown that the interaction of inhibitors with protein phosphatases occurs with the participation of 1 to 18 functionally significant water molecules. The exceptions were microcystins (LR and LA) that interact covalently with PP2A, as well as cantharidin and endothall, that form bonds with PP5 metal ions, whereas in case of their absence during docking, they intercalate into the thickness of the molecules of protein phosphatases PP1, PP2A and PP4. Based on the results of the comparison of PDB-complexes of protein phosphatase PP1 with okadaic acid, microcystin-LR and LA, calyculin A, tautomycin, nodularin and motuporin, Arg96, Tyr221, Tyr272, Val223, Asn224, His225 were identified as the key for forming the binding site. In case of protein phosphatase PP2A that interact with okadaic acid, microcystin-LR and dinophysistoxin of the types 1 and 2, the respective residues were Arg89, Tyr272, Arg214, Ala216, Asn217, His218. While for complexes of protein phosphatase type 5 with cantharidin and endothall, the conservative residues are Arg275, Tyr451, Arg400, Val402, Asn303, His304.

The implementation of the above-mentioned stages allowed us to work out the most correct algorithm for reconstructing plant protein phosphatase complexes with potential inhibitors. Thus, by analyzing the results of molecular docking of compounds in the PP site and verification of the resulting complexes, we can make a number of assumptions. Unlike its derivatives of dinophysistoxins type 1 and 2, okadaic acid has a higher overall affinity for plants PPs. Regarding the differential

action, more significant indicators of affinity it has for protein phosphatase PP2A than to protein phosphatases PP1 and PP4. Calyculin, which has a significant similarity to okadaic acid, ranks second in the evaluation functions of docking and also has a greater selectivity to protein phosphatase PP2A than to protein phosphatase PP1. Thus, compared to the standard protocol and molecular docking of calyculin and protein phosphatase PP4, docking for the surface of the molecule of protein phosphatase PP1 and testing using the molecular dynamics method requires constant parameters adjustment. Tautomycin has a bit lower levels of the evaluation functions of docking. However it, in contrast to the first two leaders, has a greater selectivity to protein phosphatase PP1 than to protein phosphatases PP2A and PP4, which is completely in line with the literature data. It should be noted that, according to the profile analysis, okadaic acid, calyculin and tautomycin, which are selective inhibitors of protein phosphatases PP1 and PP2A, are also capable of inhibiting the activity of plant protein phosphatases PP3, PP5 and PP6. This is also confirmed by analysis of docking and available literature data. Nodularin and motuporin, being conservative PP1 protein phosphatase inhibitors in plant cells, may decrease the activity of the protein phosphatase PP2A, to which they have greater selectivity than to protein phosphatases PP1 and PP4. Moreover, by comparing binding sites of protein phosphatase inhibitors using profile techniques, it has been found that they can suppress the activity of protein phosphatases PP5 and 6. Concerning cantharidin and endothall, according to the profile analysis it was assumed that they have low specificity and may act on almost all plant serine/threonine-specific protein phosphatases except for protein phosphatase PP7. However, this statement is hypothetical and confirmed only with the help of molecular modeling methods. We assume that derivatives of cantharidin reduce the activity of the protein phosphatase PP2A, which is in line with the literature data.

Also, a library of potential inhibitors of protein phosphatases was created based on the combination of methods of chemoinformatic search and molecular docking. The compounds selected on the basis of the similarity to the heterocyclic okadaic acid core have certain structural differences, which also implies certain differences in

specificity. The most prospective of these are 5 substances (PubChem: CID10437923, CID44288019, CID3053530, CID10930902, CID44451975), which can be used as new potential inhibitors of protein phosphatases of higher plants.

Thus, as a result of the thesis research, for the first time, full plants phosphatome were reconstructed, and the evolutionary divergence of phosphatomes of higher plants and humans was analyzed. A group of plant homologs of animal protein phosphatases belonging to superfamilies of serine/threonine-, tyrosine- and aspartate-specific protein phosphatases was determined. A group of plant protein phosphatases associated with the regulation of the structure and functions of microtubules was selected, and structural features of their interaction with specific inhibitors were determined. The obtained data improve the understanding of mechanisms that determine the selectivity of existing inhibitors to plant protein phosphatases and are important for the subsequent rational design of compounds with high affinity for these molecular targets, and allow optimizing the process of their development.

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

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	23
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1. ФУНКЦІОНАЛЬНА РОЛЬ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ ЇХ КЛАСИФІКАЦІЯ, СТРУКТУРА ТА ВЗАЄМОДІЯ З ІНГІБІТОРАМИ .....	30
1.1. Класифікація протеїнфосфатаз і їх роль у життєдіяльності клітини.....	30
1.1.1. Серин/треонін-специфічні протеїнфосфатази.....	32
1.1.2. Тирозин-специфічні протеїнфосфатази.....	43
1.1.3. Аспартат-специфічні протеїнфосфатази .....	44
1.1.4. Особливості структурної організації протеїнфосфатаз .....	46
1.2. Специфічні інгібітори протеїнфосфатаз та особливості їх взаємодії з ферментами .....	51
1.2.1. Інгібітори серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз .....	51
1.2.2. Інгібітори тирозин-специфічних протеїнфосфатаз .....	52
1.2.3. Інгібітори аспартат-специфічних протеїнфосфатаз .....	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	55
2.1. Матеріали дослідження .....	55
2.2. Біоінформаційний пошук і аналіз послідовностей генів протеїнфосфатаз та їх білкових продуктів .....	56
2.2.1. Аналіз доменної архітектури та структури протеїнфосфатаз.....	57
2.2.2. Кладистичні методи, використані для аналізу протеїнфосфатаз.....	58
2.3. Відбір, моделювання просторової структури та оцінка якості побудованих моделей протеїнфосфатаз .....	58
2.3.1. Відбір та аналіз якості матричних структур протеїнфосфатаз людини як потенційних матриць для моделювання.....	58
2.3.2. Побудова 3-мірних моделей протеїнфосфатаз за допомогою профільного методу реконструкції.....	59
2.3.3. Оптимізація та верифікація реконструйованих моделей протеїнфосфатаз за допомогою методу короткочасної молекулярної динаміки .....	60
2.4. Ідентифікація сайтів зв'язування селективних інгібіторів на поверхні молекул протеїнфосфатаз.....	61
2.4.1. Відбір та аналіз інгібіторів протеїнфосфатаз.....	61

2.4.2. Пошук та аналіз сайтів зв'язування лігандів з протеїнофосфатазами на підставі гомології з експериментально підтвердженими комплексами.....	61
2.4.3. Профільна кластеризація емпіричних та експериментально доведених сайтів зв'язування лігандів з протеїнофосфатазами .....	62
2.5. Використання методу молекулярного докінгу для передбачення структури ліганд-протеїнофосфатного комплексу.....	62
2.6. Оцінка стабільності ліганд-білкових комплексів у водному оточенні за допомогою методів тривалої молекулярної динаміки.....	63
2.7. Оцінка можливості дизайну нових похідних відомих інгібіторів протеїнофосфатаз.....	64
2.8. Обчислювальні ресурси.....	65
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ БІОІНФОРМАЦІЙНОГО ПОРІВНЯННЯ ФОСФАТОМІВ ЛЮДИНИ І ВИЩИХ РОСЛИН.....</b>	<b>66</b>
3.1. Аналіз первинної структури протеїнофосфатаз за допомогою геномних та протеомних баз даних.....	66
3.2. Аналіз доменної архітектури та структури протеїнофосфатаз .....	67
3.3. Аналіз результатів множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей протеїнофосфатаз та їх філогенетичний аналіз.....	69
3.4. Відбір та характеристика протеїнофосфатаз, пов'язаних з регуляцією мікротрубочок у рослин.....	81
<b>РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОСТОРОВОЇ СТРУКТУРИ ПРОТЕЇНОФОСФАТАЗ, ПОТЕНЦІЙНО ЗДАТНИХ ДО РЕГУЛЯЦІЇ МІКРОТРУБОЧОК .....</b>	<b>88</b>
4.1. Відбір та перевірка якості просторових структур протеїнофосфатаз різного еволюційного походження.....	88
4.2. Реконструкція та верифікація просторової структури протеїнофосфатаз, потенційно залучених до регуляції мікротрубочок .....	91
<b>РОЗДІЛ 5. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ АСПЕКТИ УТВОРЕННЯ КОМПЛЕКСІВ СЕЛЕКТИВНИХ ІНГІБІТОРІВ З ПРОТЕЇНОФОСФАТАЗАМИ .....</b>	<b>103</b>
5.1. Відбір, аналіз та реконструкція просторової структури відомих селективних інгібіторів протеїнофосфатаз.....	103
5.2. Відбір за гомологією та аналіз механізмів взаємодії інгібіторів з тваринними протеїнофосфатазами на підставі експериментально встановлених комплексів .....	104

5.3. Ідентифікація можливих рослинних мішеней відомих інгібіторів серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз за допомогою методів профільного аналізу .....	108
5.4. Гнучкий докінг відомих селективних інгібіторів серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз у потенційні сайти їх зв'язування.....	115
5.4.1. Реконструкція структури комплексів ооадаїнової кислоти з протеїнофосфатазами типу 1, 2А, 4 з <i>A. thaliana</i> .....	116
5.4.2. Реконструкція структури комплексів мікроцистину-LR і мікроцистину-LA з протеїнофосфатазами типу 1, 2А, 4 з <i>A. thaliana</i> .....	124
5.4.3. Реконструкція структури комплексів нодуларину-R і нодуларину-V з протеїнофосфатазами типу 1, 2А, 4 з <i>A. thaliana</i> .....	131
5.4.4. Реконструкція структури комплексів калікуліну з протеїнофосфатазами типу 1, 2А, 4 з <i>A. thaliana</i> .....	136
5.4.5. Реконструкція структури комплексів таутоміцину з протеїнофосфатазами типу 1, 2А, 4 з <i>A. thaliana</i> .....	139
5.4.6. Реконструкція структури комплексів динофізистоксинів з протеїнофосфатазами типу 1, 2А, 4 з <i>A. thaliana</i> .....	142
5.4.7. Реконструкція структури комплексів кантаридину і ендоталу з протеїнофосфатазами типу 1, 2А, 4 з <i>A. thaliana</i> .....	144
5.5. Перевірка сайтів зв'язування селективних інгібіторів з рослинними протеїнофосфатазами за допомогою молекулярної динаміки .....	150
5.6. Дизайн та аналіз похідних селективних інгібіторів з підвищеною спорідненістю до рослинних протеїнофосфатаз типів 1, 2А і 4.....	154
РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	160
ВИСНОВКИ.....	166
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	169
Додаток А.....	200
Додаток Б .....	201
Додаток В.....	207
Додаток Г .....	209
Додаток Д.....	212
Додаток Е .....	215
Додаток Ж.....	216
Додаток И.....	217

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

Å – ангстрем

Да – дальтон

кДа – кілодальтон

кДж – кілоджоуль

МД – молекулярна динаміка

пс – пікосекунди

нс – наносекунди

ПФ (PP) – протеїнфосфатази

RMS – середньоквадратичне відхилення атомів

КЕ – конформаційна енергія

ФПФ (PPP) – родина фосфопропротеїнфосфатази

ФТФ (PTR) – родина фосфотирозинфосфатаз

ПФМ (PPM) – родина  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  залежних протеїнфосфатаз

IC<sub>50</sub> – концентрація речовини, що інгібує ріст або викликає загибель 50 % клітин *in vitro*

K<sub>i</sub> – коефіцієнт інгібування

MW – молекулярна вага

ALogP – коефіцієнт ліпофільності

RotBonds – обертальні зв'язки

PSA – площа полярної поверхні

HBA – акцептори H<sup>+</sup>

HBD – донори H<sup>+</sup>

AromRings – ароматичні кільця

HAS – важкі атоми

## ВСТУП

**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 підтверджено даними молекулярної філогенетики [39, 181, 234]. 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 [79, 119, 136, 215, 231]. В першу чергу це стосується протеїнфосфатаз, залучених до мітотичних процесів і асоційованих з регуляцією цитоскелету, зокрема мікротрубочок [88, 251, 258]. 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 [23, 137].

Було доведено існування зв'язку між функціонуванням мікротрубочок та активністю серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типів PP1, PP2A/PP2B, PP4 (PPX), PP6 і PP7 [10, 22, 70, 185]. Вважається, що протеїнфосфатази типу PP1, PP2A і PP4 здатні до прямого дефосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -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 [24, 59, 145]. Особливої уваги заслуговує група, яка об'єднує класичні та дуальні тирозинфосфатази (PTP1B, CDC25, PTPN1, PTPN11, PTPN13, PTP14, DSP-DEP1, DSP7, DSP14B) [3, 163]. Показано, що



протеїнфосфатази CDC25a і CDC25b здатні активувати циклін-залежні протеїнкінази, які в свою чергу контролюють окремі фази мітозу. Протеїнфосфатаза PTP1B сприяє проліферації клітин, а PTPN11 (SHP2) необхідна для підтримки стабільності організації хромосом [160]. Таким чином, незважаючи на асоціацію вищезазначених протеїнфосфатаз з тубуліном, функції кожної з них унікальні і відрізняються значною спеціалізацією [250].

Існує широкий спектр інгібіторів протеїнфосфатаз, які відрізняються за рівнем селективності і, відповідно, можуть використовуватися для дослідження різноманітних клітинних процесів [88, 173, 251, 290]. Враховуючи спеціалізовані функції окремих протеїнфосфатаз, а також потенціал їх практичного використання як важливих молекулярних мішеней, існують значні і очевидні прогалини стосовно механізмів регуляції їх активності [182, 191]. 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 протеїнфосфатаз рослинного походження. Оскільки такі дані практично відсутні, дослідження механізмів взаємодії рослинних протеїнфосфатаз 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 протеїнфосфатаз за допомогою нанохімічних підходів і оцінка їх біологічної ефективності *in silico*» (2009-10

рр., № ДР 0110U005523). Ресурсоємні дослідження виконано в рамках роботи ВО CSLabGrid, що є частиною Українського Національного Грідю.

**Мета та завдання дослідження.** Метою роботи був пошук і біоінформаційне дослідження протеїнфосфатаз рослин, які 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 протеїнфосфатаз різного еволюційного походження, реконструювати повні фосфатоми вищих рослин і тварин та визначити їх відмінності.
2. Визначити протеїнфосфатази, пов'язані з регуляцією структури та функцій мікротрубочок рослин.
3. Побудувати тривимірні моделі просторової структури молекул протеїнфосфатаз 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 протеїнфосфатаз з їхніми інгібіторами різної хімічної природи.
5. Перевірити можливість існування альтернативних рослинних мішеней уже відомих інгібіторів протеїнфосфатаз за допомогою методів профільного пошуку.
6. Виконати пошук та оцінку відомих інгібіторів протеїнфосфатаз з експериментально підтвердженою активністю та визначити їхні фізико-хімічні властивості.
7. Реконструювати комплекси рослинних протеїнфосфатаз з відомими інгібіторами за допомогою методів молекулярного докінгу.
8. Оцінити стабільність реконструйованих комплексів рослинних протеїнфосфатаз 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 структурні 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.** В роботі реконструйовано тривимірні моделі протеїнофосфатаз людини і представників

одно- та дводольних рослин. Отримані 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 протеїнфосфатаз рослинного походження. Результати проведених досліджень були використані у навчальному процесі для підготовки фахівців у Навчально-науковому центрі «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка при викладанні спецкурсу «Біоінформатика» і «Структурна біоінформатика», а також у викладанні дисципліни «Біохімія» для студентів (ОС Бакалавр) факультету захисту рослин, біотехнології та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

**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 Eight 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.

\*\*\*

Дисертант висловлює щиру подяку науковому керівнику академіку НАН України, професору, д.б.н. Ярославу Борисовичу Блюму за наукове керівництво та обрання актуальної теми дисертаційної роботи, допомогу при інтерпретації отриманих результатів та написанні дисертаційної роботи. Автор дякує за поради та допомогу під час проведення досліджень та аналізу результатів завідувачу лабораторії біоінформатики та структурної біології с.н.с., к.б.н. Павлу Андрійовичу Карпову. Також автор дякує колективу лабораторії біоінформатики та структурної біології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за консультації при плануванні експериментів.

Особлива подяка сім'ї за розуміння та підтримку під час виконання дисертаційної роботи.

# РОЗДІЛ 1

## ФУНКЦІОНАЛЬНА РОЛЬ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ ЇХ КЛАСИФІКАЦІЯ, СТРУКТУРА ТА ВЗАЄМОДІЯ З ІНГІБІТОРАМИ

(Огляд літератури)

### 1.1. Класифікація протеїнфосфатаз і їх роль у життєдіяльності клітини

Протеїнфосфатази – це група ферментів, які каталізують реакцію гідролізу фосфоефірного зв'язку амінокислотного залишку різноманітних білків. Згідно з загальноприйнятими підходами, на початкових стадіях досліджень родини тваринних протеїнфосфатаз були визначені на підставі їх субстратної специфічності [32, 46, 289]. Така класифікація загалом підтверджується результатами експериментальної геноміки [132, 168]. Однак виявилось, що деякі протеїнфосфатази, раніше визначені як серин/треонін-специфічні, також здатні дефосфорилувати залишки тирозину [139, 195, 256]. Це дозволило виділити групи серин/треонінових, тирозинових і дуальних протеїнфосфатаз. Також було встановлено, що деякі фосфатази мають подвійну специфічність, здатні вибірково дефосфорилувати білки по амінокислотним залишкам цистеїну, аргініну, лізину, аспаргіну, гістидину і глутамінової кислоти [3, 11, 15, 60, 157, 241]. Так деякі представники суперродини аспартат-залежних фосфатаз групи (HAD) можуть дефосфорилувати серин або треонін [157, 249]. Цю групу ферментів раніше було охарактеризовано як представників серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз, але згодом було доведено, що вони використовують аспарагінову кислоту лише як каталізатор, і мають DXDXT/V мотив активного сайту, подібний до раніше охарактеризованого TFHF-асоційованого С-кінцевого домену (CTD) фосфатаз-1 (FCP1) і малої CTD фосфатази (SCP), які дефосфорилуються CTD великою субодиницею РНК полімерази II (PolII) [278, 279, 289].

На сьогодні, за подібністю амінокислотних послідовностей, просторової структури та механізму каталізу, протеїнфосфатази поділяють на три групи (Табл. 1.1) [2, 270].

Таблиця 1.1

### Класифікація та функціональне значення протеїнфосфатаз людини

Родина	Клас	Число генів	Регуляторні субодиниці	Приклад функції чи субстрату
Серин/треонін-специфічні протеїнфосфатази				
Родина PPP	PP1	3	>90(e.g.,Repo-Man)	Конденсація хроматину
	PP2A	2	A, B, etc.	Зв'язок хромосом
	PP4	1	R1, R2, R3 $\alpha$ / $\beta$	Репарація ДНК ( $\gamma$ -H2AX)
	PP5	1	-	Клітинний стрес
	PP6	1	SAP1-3, etc	Сигнальний шлях NF- $\kappa$ B
	PP2B	3	Regulatory B, CaM	Імунна відповідь (NFAT)
	PP7	2	-	-
Родина PPM	PP2C	18	-	TGF $\beta$ сигналінг (SMADs)
Тирозин-специфічні протеїнфосфатази				
Клас I PTPs (класичні)	Receptor PTP	21	-	Клітинна адгезія / взаємодія з тубуліном
	Non-receptor PTP	17	-	Сигнальний шлях інсуліну / рецептори інсуліну
Клас I PTPs (DSPs)	MAPKP	11	-	Сигнальний шлях MAPK
	Slingshots	3	-	Динаміка актину / кофілін
	PRLs	3	-	-
	Atypical DSP	19	-	Потенційна дія на мРНК
	CDC14	4	-	Цитокінез, термінальна стадія мітозу
	PTEN	5	-	Взаємодія з PP типу PIP3
	Myotubularins	16	-	Взаємодія з PP типу PtdIns3P, PtdIns(3,5)P2
Клас II PTPs	CDC25s	3	-	Сприяння мітозу / взаємодія з ПК типу CDKs
Клас III PTPs	LMWPTP	1	-	-
Аспарат-специфічні протеїнфосфатази				
FCP/SCP	FCP1	1	RAP74 of TFIIIF	Транскрипція / Pol II
	SCP	3	-	TGF $\beta$ сигналінг (SMADs)
	FCP/SCP-like	4	-	-
Родина HAD		5	-	Динаміка актину / кофілін

Перша група PP представлена класичними серин/треонін-специфічними протеїнфосфатазами: великою родиною фосфопропротеїнфосфатаз (PPP: PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 і PP7) і представниками Mg<sup>2+</sup> або Mn<sup>2+</sup> залежної (PPM) родини PP2C протеїнфосфатаз [46, 89, 227, 288]. Суперродина

протеїнфосфатаз, що дефосфорилують тирозин (РТР), утворює другу групу [3, 30, 134, 208]. Третя група складається з протеїнфосфатаз, здатних дефосфорилувати залишки аспарагінової кислоти з унікальною DXDXHT/V каталітичною сигнатурою [134, 184, 185].

### 1.1.1. Серин/треонін-специфічні протеїнфосфатази

Ферменти, що належать до цієї родини, мають серин/треонін-протеїнфосфатазну активність, і за невеликими винятками з РТР родини і аспартат-залежної родини вони належать до родин PPP і PPM (Табл.1.1). Активність фосфатаз цієї родини, в екстрактах клітин ссавців спочатку була визначена за допомогою біохімічних методів і віднесена або до типу 1 (PP1), або до типу 2 (PP2). Пізніше класифікація цієї родини була перероблена з врахуванням необхідності присутності кофакторів і субстратної специфічності. Так, кофактором фосфатази PP2B є іони  $\text{Ca}^{2+}$ , а кофактором фосфатази PP2C - іони  $\text{Mg}^{2+}$ . Згодом за результатами молекулярних та геномних досліджень було відкрито групу споріднених протеїнфосфатаз (типи 4, 5, 6 та інші) і встановлено можливу спільну еволюційну історію цих білків.

*Протеїнфосфатази типу 1 (PP1).* У людини протеїнфосфатази типу 1 кодуються трьома близькоспорідненими генами (PP1  $\alpha$ , PP1  $\beta / \delta$  і PP1  $\gamma$ ). Також вони кодуються ще двома ізоформами –  $\gamma 1$  і  $\gamma 2$ , які виникають за рахунок альтернативного сплайсингу. За винятком *Saccharomyces cerevisiae*, які мають один PP1 ген (glc7), еукаріоти мають декілька генів PP1: 8 – у *Arabidopsis thaliana*, 4 – у *Drosophila melanogaster* і приблизно 30 – у *Caenorhabditis elegans* [49, 225]. Хоча цитозольні форми PP1 ссавців, мішенню яких є міозин, детально вивчені, було показано, що активність PP1, зокрема, дуже висока у ядрі. Питанням залишається функціональне значення різних ізоформ PP1, однак, дані *in vivo* свідчать, що їм притаманні різні патерни субклітинної локалізації [4, 254]. Всі PP1-ізоформи виявляються у ядрі в інтерфазних клітинах, тоді як для PP1 $\gamma$  і PP1 $\beta/\delta$  показано додаткове накопичення в ядерцях [94, 155, 254].



Патерни локалізації ізоформ PP1 також динамічні і змінюються завдяки клітинному циклу, відповідаючи на різні клітинні пертурбації [185].

Від самого початку при фракціонуванні за допомогою іонообмінної хроматографії було виявлено дві головні форми PP1 ссавців: NIPP1 і PNUTS (також відома як p99) [116]. Подальші дослідження продовжували додавати нові цільові субодиниці до їх зростаючого списку [116, 149, 164, 216, 252, 254]. Протеомні підходи також виявилися придатними для ідентифікації нових PP1-взаємодіючих субодиниць [252]. Саме комбінація покадрової (time-lapse) флуоресцентної мікроскопії та кількісної мас-спектрометрії (SILAC technique [254]) була використана не тільки для ідентифікації відомих і нових білкових партнерів PP1, але і для встановлення їх диференційного зв'язування з  $\alpha$ - і  $\gamma$ -ізоформами PP1 [254]. Комбінація переваг цих ідентифікованих ізоформ з паралельним аналізом PP1 $\gamma$ , що специфічно накопичується на хроматині під час анафази і залишається в асоціації з ним протягом всієї інтерфази, призвела до ідентифікації нових ядерних цільових субодиниць, які забезпечують регульовану взаємодію PP1 з хроматином в ході клітинного циклу [253]. Саме такий PP1-зв'язуючий комплекс важливий для життєздатності клітини та бере участь у підтримці хромосомної архітектури під час сегрегації хромосом [259].

У тварин PP1 переважно дефосфорилують  $\beta$ -субодиницю фосфорилази кінази і специфічно інгібуються термостабільними інгібіторами типу-1 і -2 (I-1 і I-2). Порівняно з ними протеїнфосфатази типу 2A дефосфорилують  $\alpha$ -субодиницю фосфорилази кінази і нечутливі до I-1 і I-2. Окадаїнова кислота є більш сильним інгібітором для PP2A, ніж для PP1. Зокрема, на підставі цих відмінних особливостей, фосфатази PP1 були визначені у декількох видів рослин [165]. PP1 з *A. thaliana* були виділені за допомогою мікроцистин-афінної хроматографії. Вони інгібуються окадаїновою кислотою і інгібітором 2-го типу, але показують більшу чутливість до мікроцистину типу LR, нодуларину і калікуліну типу A, в порівнянні з PP1 у ссавців. Результати мас-спектрометричного аналізу очищених PP1 з *A. thaliana* вказують на наявність від чотирьох до восьми ізоформ каталітичних субодиниць PP типу 1 [8, 236]. Це

слугувало приводом для пошуку білка PP1-7/AtPP1bg, що був названий як PP1-6 і At5g43380, і пізніше перейменований у PP1-7. Секвенування генома *A. thaliana* дозволило виявити дев'ятий ген для ізоферменту PP1-8 (PP1iso8) [244]. На основі молекулярно-генетичного аналізу було показано, що амінокислотні послідовності рослинних і тваринних PP1 характеризуються значною філогенетичною розбіжністю через гетерогенність їх N- і C-кінцевих доменів, тож PP1 можуть бути класифіковані в різні підродини [244]. Всі PP1 є активними ферментами, несуть консервативні залишки, які формують активний сайт і потенційно беруть участь в регуляції клітинного циклу [150]. Так, попередньо було передбачено, що ізоформи протеїнфосфатази PP1-3 і PP1-6 містять можливі сайти впізнавання для CdK2, але невідомо, чи інгібуються вони CDK2 кіназами. Ізоформа PP1-2 пригнічує мутацію *glc7* при діленні дріжджів [222], тоді як PP1-1 є супресором мутації в *cdc25*, що зупиняє клітинний цикл до мітозу, але на відміну від ізоформи PP1-2, не може зупинити дефект поділу сестринських хроматид у мутанту *dis2-11* [73]. А білок PP1-6/AtPPbg доповнює мутації *bimG11* у *Aspergillus nidulans*, що як і *dis2-11*, при анафазі викликає дефект чутливий до температури.

Всі ізоформи PP1 виявлені у великих білкових комплексах, а отже можуть зв'язувати декілька партнерів комплексу [236]. Показано, що PP1-1 взаємодіє з AXR3, представником сім'ї транскрипційних факторів AUX/IAA, що припускає залучення даної ізоформи PP1 у передачу сигналів ауксину. Тоді як у *A. thaliana* відбувається кодування потенційних ортологів деяких еволюційно віддалених регуляторних субодиниць PP1, які утворюють кілька спільних комплексів з каталітичною субодиницею без участі RV-X-F мотиву [236]. Крім того, також було визначено потенційний ортолог PP1 регулятор NIPP-1 (At5g47790), який так само містить PP1-зв'язуючий RV-X-F мотив [37]. Також показано, що білок DDL (At3g20550) відповідає іншому ортологу NIPP-1, який несе кінцевий FHA домен (SMART №: SM00240) [66, 199]. Проте залишається відкритим питання, чи функціонують ці NIPP-1-подібні білки як регулятори фосфатаз. Згідно даним ресурсу TAIR у мутанта DDL

спостерігалась затримка росту, зміна форми листків з звичайних на фігурні, поява аномальних квіток, що потенційно свідчить про роль DDL в регуляції розвитку рослин (arabidopsis.org).

*Протеїнфосфатази типу 2A (PP2A)*. Вважається, що PP2A регулюють активність ключових ферментів метаболізму рослин *in vitro* (наприклад, сахароза фосфат-синтаз, 3-гідрокси-3-метилглутарил КоА редуктаз-1 (HMG-CoA) і нітрат-редуктаз), але більшість з цих даних ще потребує перевірки в умовах *in vivo* [70]. У клітинах різного еволюційного походження PP2A представлені макромолекулярними комплексами. Так ссавці мають два гени ферменту PP2A (PPP2C  $\alpha$  і PPP2C  $\beta$ ) і два гени для регуляторної субодиниці A (PR65  $\alpha$  і PR65  $\beta$ ). Щодо регуляторних субодиниць типу B показано наявність чотирьох типів з множинними генами в кожній групі:

- 1) група B (відома також як B55, PR55 або PPP2R2),
- 2) група B' (відома також як B56, PR61 або PPP2R5),
- 3) група B'' (відома також як PR72 або PPP2R3),
- 4) група B''' (відома також як PR93/SG2NA і PR11/striatin).

Результати досліджень фосфатомів рослинного походження показали наявність п'яти каталітичних субодиниць PP2A у *A. thaliana*, які філогенетично можливо розділити на дві групи [70]. Гени каталітичних субодиниць PP2A експресуються в усіх органах, хоча на різних рівнях [117]. При стимуляції експресії гену каталітичної субодиниці PP2A була виявлена надлишкова експресія передбачуваного G-білка в поєднанні з рецептором GCR1, що збігається з посиленням активності сигналізації гібереліну [47]. Мовчання генів, що кодують каталітичні субодиниці PP2A, посилюється у відповідь на дію бактеріальних і грибових білків, підвищену експресію гену PR, та локалізовану клітинну смерть в стеблах і листках. Це дозволяє припустити потенційну роль протеїнфосфатаз типу 2A в передачі захисних сигналів у рослин [198].

У *A. thaliana* експресуються три ізоформи регуляторних субодиниць-PP2Aa типу: PDF1, PDF2 і RCN1, що також складаються з тандемних HEAT-

повторів, маючи підковоподібну архітектуру для зв'язування каталітичних та асоційованих субодиниць [21]. RCN1 було вперше описано як регулятор транспорту ауксину та індуктор геотропізму [78]. На додаток до збільшення чутливості до нафтилфталамінової кислоти (NPA, синтетичного аналога абсцизової кислоти – АБК), мутація гену RCN1 призводить до пригнічення чутливості до АБК на стадії проростання насіння, захисних відповідей клітин та експресії генів. Що в подальшому послаблює діяльність PP2A і призводить до дефектів у формуванні апікального кінчика, а також подовження гіпокотила і деформації кореневої системи [207]. Так, у *in vitro* дослідженнях показано, що регуляторний білок RCN1 взаємодіє з каталітичною субодиницею PP2A-1, яка потенційно зв'язується з Raf-подібною кіназою CTR1, негативним регулятором сигналізації етилену [152]. Хоча RCN1 і PP2A-1 не фосфорилуються за допомогою CTR1 цілком можливо, що CTR1 є субстратом PP2A [70]. Також протеїнфосфатаза RCN1 взаємодіє з регулятором транскрипції ROC7, але пригнічення дії ROC7, на відміну від мутації гену RCN1, стимулює ріст коренів, не впливаючи на відповідь абсцизової кислоти [115]. Рослини, що несуть мутації в генах PDF1 і PDF2 регуляторної субодиниці типу А, демонструють тільки невеликі фенотипічні зміни [291]. Тим не менш, подвійні *rcn1* і або *pdf1* або *pdf2*, мутанти демонструють серйозні вади, у тому числі аномалії ембріогенезу, дефекти радіального розширення клітини, карликовість і стерильність. Це означає, що RCN1 грає фундаментальну роль у регуляції діяльності PP2A. А, в зв'язку з тим, що PP2A ізоформи субодиниці А виконують функції які частково перекриваються, наслідки мутацій *pdf1* і *pdf2* видно тільки при відсутності RCN1 [70].

Щодо функцій інших регуляторних субодиниць PP2A – двох ізоформ 55 кДа з *A. thaliana*, які містять п'ять вироджених WD-40 повторів і демонструють 43-48% ідентичності амінокислотної послідовності з регуляторними субодиницями типу В у тварин і дріжджів, відомо небагато [51]. Так у *A. thaliana* було показано наявність дев'яти В' субодиниць PP2A, з яких тільки АТВ'- $\alpha$  і АТВ'- $\beta$  містять потенційну цільову послідовність. Ген АТВ'- $\gamma$

виробляє транскрипти завдяки альтернативному сплайсингу. Один з них, що має 5'-інтрон, накопичується під дією теплового стресу і служить стрес-індуктором при нормальних і стресових умовах [198]. Згодом було знайдено п'ять PP2B'' субодиниць у *A.thaliana*, що несуть кальцій-зв'язуючі мотиви (EF-hand, SMART №: SM00054). Зокрема, білок TON2 (TONNEAU2) являє собою B''-подібні субодиниці, які показують схожість з PR72 B'' – субодиницею людини і взаємодіє з каталітичною субодиницею PP2A. Також показано, що мутація *ton2* впливає на організацію тіла розсади і викликає аномалії при складанні мікротрубочок у препрофазну стрічку під час мітозу [36].

Результати досліджень, присвячених клітинній локалізації протеїнфосфатаз PP2A свідчать про те, що А і С субодиниці PP2A приблизно вдвічі частіше концентруються в ядрі, ніж в цитоплазмі, і зовсім не з'являються в ядерцях, у той час як регуляторні субодиниці типів B55 $\delta$ , B56 $\alpha$ , B56 $\beta$  і B56 $\epsilon$  є цитозольними. Інші субодиниці B55, -B56 $\delta$  і -B56 $\gamma$  зустрічаються у високій концентрації в ядрі, а регуляторні субодиниці PR48 і PR90, що специфічно зв'язуються з N-кінцевим сегментом білка ініціації реплікації CDC6, є виключно ядерними [174]. Як було встановлено, у *S. cerevisiae*, PP2A субодиниці мають динамічні патерни локалізації, тож обидві каталітичні субодиниці (Pph21 і Pph22), а також регуляторні А, В, В', потенційно мають часткову ядерну та цитозольну локалізацію [84].

*Протеїнфосфатази типу 4 (PP4)*. Протеїнфосфатази типу PP4 (також відомі як PPX) найбільш близькі до каталітичних субодиниць PP2A, беруть участь у регуляції взаємодії мікротрубочок з центросомами у тварин і рослин [31, 159], а також взаємодіють з  $\alpha 4$ , відомим як IGBP1 – імуноглобулін асоційований білок типу 1 (або Tap42 у дріжджів) і Tip41 – активатором PP2A [203].

За винятком *S. cerevisiae*, для яких показано наявність тільки одного гену PP4 (PPH3), еукаріоти мають декілька генів PP4, зокрема для *A. thaliana* було показано наявність двох: PPX-1 і PPX-2, які експресуються на низьких рівнях в різних органах. Зокрема PPX-1 показує колокалізацію з ферредоксином в

кореневих епідермальних клітинах, є білком просвіту в пластидах коренів. Однак не з'ясовано, чи приймає PPX-1 участь в регуляції пластид-специфічних кіназ і їх субстратів [205].

За останні десятиліття досягнуті суттєві успіхи у розумінні ролі PP4 у відповіді на пошкодження ДНК, а також в ідентифікації PP4-регуляторних субодиниць і PP4-зв'язуючих білків. У роботах [87] була показана стабільна експресія за допомогою тандемних іонообмінних колонок з пришитими тегамі (TAP-tag), каталітичних субодиниць PP4 в клітинах ссавців, необхідна щоб виявити потенційних партнерів [87]. За допомогою комбінації методів рідинної хроматографії та мас-спектрометрії (LC-MS/MS) було встановлено, що PP4 утворює імовірні комплекси з регуляторними субодиницями R1, R2, R3 ( $\alpha$  і  $\beta$ ), IGBP1, Tip41, а також входить у восьми-субодиничний АТР-залежний комплекс шаперонів TRiC (відомий також як CCT). Щодо локалізації у клітині, за даними літератури регуляторні субодиниці PP4 – R2 (Psy4) і R3 (Psy2) з *S. cerevisiae* є виключно ядерними, в той час як PP4 (Pph3) і каталітичні субодиниці з *A. thaliana* є цитоплазматичними і ядерними [70].

*Протеїнфосфатази типу 5 (PP5)*. На відміну від інших PP, даний тип ферментів містить серію з трьох N-кінцевих TPR доменів, функція яких – утримувати фермент неактивним. Структурний аналіз PP5 людини показав, що механізм інгібування TPR-протеїнфосфатазного домену подібний до типу інгібування PP2B і відбувається за допомогою його C-кінцевого регуляторного сегменту, а також до механізму інгібування PP1C при використанні токсинів [275]. Ферменти є цитоплазматичними і ядерними у еу- та прокаріотів, а C-кінець містить консервативну послідовність, яка відповідає за ядерну локалізацію [26].

Незважаючи на присутність у більшості еукаріотів, ферменти PP5 не були широко вивчені, у зв'язку з тим, що вони мають низьку активність у тестах *in vitro* і низький відсоток ідентичності при порівнянні сиквенсів з іншими протеїнфосфатазами [70]. Білки PP5 містять три N-кінцевих TPR-домени, які разом з їх C-кінцевими послідовностями, діють як аутоінгібіторні домени [175].

Показано, що PP5 є компонентами глюкокортикоїдних рецепторів (Hsp90) і криптохромних (CRY1 і CRY2) комплексів та беруть участь у регуляції іонних каналів, сигналізації гормональних рецепторів, клітинному циклі, апоптозі. Арахідонова кислота і нокодазол беруть участь у деполімеризації мікротрубочок, стимулюють дисоціацію PP5 від теплового шоку і їх подальшу протеолітичну активацію [283].

У вищих рослин PP5 кодується одиночними генами, які виробляють два альтернативно з'єднаних транскрипти, що кодують ізоформи PP5 [57]. Ізоформа 1 масою 62 кДа, несе в собі два N-кінцевих трансмембранних домени, які локалізуються в ендоплазматичному ретикулумі. Функція ізоформи 1, поки що невідома. Ізоформа 2 молекули PP5 масою 55-кДа (RAPP5 – фітохром-асоційована протеїнфосфатаза 5) взаємодіє з фітохромом PhyA у дво-гібридній фоторецепторній системі рослин і переважно дефосфорилує біологічно активну світло-поглинаючу Pfr-форму PhyA *in vitro* [215]. Специфічність RAPP5 полягає у зв'язуванні її TPR домену з Pfr-формою PhyA, яка також залежить від спектральної форми фітохрому. У темряві, RAPP5 і PhyB локалізовані в цитоплазмі – при освітленні, вони переміщуються в ядро до білкового комплексу RAPP5 з PhyB. Експерименти з мутантами *rapp5* і лінією гіперекспресії показують, що підвищення рівня RAPP5 корелює з опосередкованою фоточутливістю мутантних форм PhyA і PhyB, і призводить до підвищеної експресії генів індукованих світлом [215]. Білок PP5 також взаємодіє з імунним білком типу 2 (I-2) і двома членами родини шаперонів Hsp90 у помідорів. Пригнічення Hsp90, без участі PP5, блокує клітинну смерть викликану I-2, що вказує на правильну форму I-2, яка регулюється за допомогою Hsp90-PP5 комплексу [70, 124].

*Протеїнфосфатази типу 6 (PP6)*. Білки типу SIT4 з *S. cerevisiae*, PPE1 з *S. pombe*, PPV з *D. melanogaster* і PP6 людини мають декілька споріднених партнерів для зв'язування, які позначаються як PP6 чи Sit4-асоційовані білки (SAPs) і консервативні в інших еукаріотів [233]. Дріжджова молекула PP6 є як ядерною, так і цитоплазматичною. Ферменти типу PP6 беруть участь у

регуляції транскрипції, трансляції, морфогенезу і клітинного циклу [46]. Так само як PP5, протеїнфосфатази типу 6 (PP6/FyPP), були виявлені при взаємодії з фітохромом PhyA у *Pisum sativum*, *Avena sativa* і *A. thaliana*, а у дріжджів при взаємодії PP6 з PhyB. Досліди *in vitro* показують, що PP6 переважно асоціює з фосфорильованою формою PhyA і Pfr-формами PhyA і PhyB [136]. У той час як PhyA і PhyB імпортуються в ядро при освітленні світлом червоного кольору, PP6 показує конститутивну цитоплазматичну локалізацію. Тип PP6 з *A. thaliana* має два гомолога AtFyPP1 і AtFyPP3, які відрізняються тільки двома амінокислотними залишками. PP6 з гороху і AtFyPP дефосфорилує аутофосфорильовані PhyA з вівса *in vitro*, але, на відміну від PP2A, тільки за наявності  $Fe^{2+}$  або  $Zn^{2+}$ . Підвищена експресія PP6 у гороху і в дослідях *A. thaliana* показує уповільнення цвітіння, в той час як інгібування AtFyPP викликає раннє цвітіння. Тому можна припустити, фенотипову аналогію з мутантами PhyA і PhyB [136]. Протеїнфосфатаза PP6 дефосфорилує PhyA і PhyB та, імовірно, може викликати протилежні ефекти регуляції під час цвітіння [70]. Ця розбіжність пояснює той факт, що AtFyPP3 більше експресується в умовах довгострокового дня, ніж при коротких днях, в той час як AtFyPP1 не вказує такий перепад у регуляції [136]. Отже, наявні дані дозволяють припустити, що гени PP6 у *A. thaliana* грають різні ролі в регуляції PhyA і PhyB та, можливо, контролюють час цвітіння.

*Протеїнфосфатази туну 2В (PP2В)*. Часто ферменти PP2В і PP7 згруповані разом тому, що вони активуються за допомогою  $Ca^{2+}$  та здатні безперервно дефосфорилувати більшість залишків серину і треоніну у цитозолі [176]. Окрім впливу постійної активації та інактивації транспорту кальцію, важливого аспекту сигналізації, специфічність субстрату регулюється різними білок-білковими комплексами. Зокрема з анкерними білками та субстратами, що алостерично взаємодіють з PP2В [212, 213]. Так білок типу 79 А-кінази (АКАР79, АКАР150 у гризунів - продукти гену АКАР5) взаємодіє як з PP2В, так і з протеїнкіназою типу А (РКА) [45, 192]. Така спільна локалізація кіназ та фосфатаз дозволяє точно контролювати сигнальні каскади опосередковані



посттрансляційними модифікаціями [192]. Хоча невелика частина білків типу PP2B розташовується в ядрі, мало що відомо про їх роль там. У рослин цей тип ферментів відсутній [70].

*Протеїнфосфатази туну 7 (PP7)*. Ферменти цього типу мають  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі EF-hand мотиви. Вони взаємодіють з кальмодуліном у кальцій-залежній системі, але, на відміну від кальцінейринів білки типу PP7 пригнічують кальмодулін [5]. За гомологією сиквенсу ці протеїнфосфатази дуже близькими є тільки до ортолога фосфатази RDGC з *D. melanogaster* [106]. У *A. thaliana* є два PP7-подібних гени, але вони майже виключно локалізуються в ядрі і потенційно регулюють передачу сигналів блакитного світла [183]. Ген At1g48120 кодує довгу послідовність PP7, тоді як продукт At5g10900, імовірно, неактивний, за умови недоліку, в незамінних амінокислотах каталітичного центру. На відміну від інших серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз, AtPP7 несе три вставки в С-кінцевій частині його каталітичного домену. AtPP7 може бути активована шляхом протеолітичного розщеплення, на що вказує, її перша функціональна вставка в аутоінгібіторному регіоні. AtPP7 є ферментом стійким до оокідаційної кислоти і калікуліну, але пригнічується неорганічним фосфатом. Таким чином, AtPP7 потенційно має фосфат-зв'язуючий сайт для аллостеричного регулювання, і може функціонувати як сенсорна фосфатна система [147].

Показано, що активність рекомбінантного AtPP7 зворотньо регулюється окисно-відновними агентами, але біологічне значення цього ефекту поки що не з'ясовано [5]. Ефект зниження активності AtPP7 у *A. thaliana* був встановлений при виявленні причини дефекту в криптохром-опосередкованій сигналізації синього світла, що призводило до втрати інгібування росту гіпокотля [183]. Припустивши, що AtPP7 є потенційним партнером комплексу з CRY фосфатазами (із-за переважної ядерної локалізації обох білків) [6, 183]. Було показано, що AtPP7 діє нижче по каскаду криптохромів, які регулюють експресію генів хлоропластів (таких як *psbD*) і регулює фактори синього світла, такі як SIG5 [183]. Тим не менш, рослини дикого типу та AtPP7-дефіцитні

рослини не показують істотної різниці в транскрипції CRY1 і CRY2 в блакитному або білому світі, а надлишкова експресія AtPP7 не викликає гіперчутливості до синього світла. Таким чином, необхідні подальші дослідження для визначення точного призначення AtPP7 у синьо-світловій сигналізації [6, 183].

*Протеїнфосфатази  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -залежної родини (PPM).* Результати порівняння PDB-структур білків PPM-родини PP2C $\alpha$  з іншими представниками PPP показали, що активні сайти двох родин дуже подібні, хоча повні амінокислотні послідовності родин не мають якоїсь гомології [53]. За даними літератури, принаймні 18 PP2C генів показано у *H. sapiens* і передбачено 7 генів у *S. cerevisiae*. Хоча варто відзначити, що у *A. thaliana* було виявлено 80 генів PP2C, які кодують різні домени каталітичних субодиниць, а також N- і C-кінцеві хвости, які відповідають за клітинну локалізацію та взаємодію з субстратами [220, 224]. Представники протеїнфосфатаз типу PP2C у *H. sapiens* мають цитоплазматичну та ядерну локалізацію (PP2C $\alpha$ , PP2C $\delta$  і PP2C $\epsilon$ ), тоді як PP2C $\gamma$ , PP2C $\kappa$  і PP2C $\beta$  переважно локалізовані у ядрі [52]. Первинно білок PP2C $\gamma$  був виявлений як компонент сплайсосом і охарактеризований як премРНК -фактор сплайсингу [52, 214].

*Протеїнфосфатази з Kelch-повторами в доменах.* Біохімічні та генетичні дослідження *A. thaliana* дозволили виявити додатково чотири нові типи протеїнфосфатаз, які віддалено пов'язані з PP1, але на відміну від ферментів даного типу, містили тандем N-кінцевих Kelch-повторів, які утворюють бета-структурний мотив, що потенційно відповідає за білок-білкові взаємодії [147, 186]. Одного з представників було виявлено при дослідженні брасиностероїдного рецептору *BR11*, що дозволило ідентифікувати мутантний *bsu1-1D*, який гіперекспресує BSU1 (At1g03445), одну з фосфатаз цього типу [186]. Інші три BSU1-подібні гени були досліджені згодом і позначені як BSL1 (At4g03080), BSL2 (At1g08420) і BSL3 (At2g27210) [186].

Дослідження протеїнфосфатаз з Kelch-повторами у еукаріотів показали, що BSU1 експресується в *E. coli* і функціонують як активні фосфатази. Як і

PP1, BSU1 інгібуються тільки оадаїновою кислотою, але, на відміну від них, не чутливі до інгібітору I-2. Вперше локалізація BSU1 була показана в ядрі, але подальше дослідження дозволило виявити їх в цитоплазмі [186]. BSU1 надлишково експресується в результаті домінантної мутації *bsu1-ID*, частково пригнічує карликовий фенотип мутанту BIN2, експресуючий гомолога глікогенсинтази-кінази-3, який діє як негативний регулятор сигналізації брасиностероїдів (BR) [186]. Сприйняття стероїдних гормонів за допомогою LRR-доменів (лейцин-багатого рецептору) кінази BRI1 викликає дефосфорилування і подальше накопичення факторів транскрипції BES1 і VZR1, що функціонують в якості позитивних регуляторів BR-індукованих генів [20]. Нижче по каскаду ніж BRI1 діє BIN2 (*At1g75080*), який також викликає убіквітинування і протеасомну деградацію BES1 [280]. У мутанта *bsu1-ID* в більшій кількості представлено дефосфорильований BES1, тоді як у дослідженнях *in vitro* BIN2-фосфорильований BES1 дефосфорилується рекомбінантним BSU1. Таким чином, BSU1 виступає проти впливу BIN2 шляхом сприяння дефосфорилуванню та активації BES1. У BR -стимульованих клітинах, BIN2 заблокований, а BSU1 активується за допомогою невідомого механізму. Комбінація нокауту *bsu1* і *bsl1* не показала ніяких фенотипових змін пов'язаних з брасиностероїдами, що потенційно може вказувати на функціональне перекриття між протеїнфосфатазами типів BSU1 і BSL. Тим не менш, рослини з подвійним нокдауном інформаційної РНК для BSL2-BSL3 мають карликовий фенотип, який нагадує фенотип рослин зі слабкими алелями BRI1. Оскільки BSL гени експресуються на більш високому рівні, ніж BSU1, потенційні BSL2 і BSL3, складають більшу частину дефосфорильованої діяльності BES1 [186].

### 1.1.2. Тирозин-специфічні протеїнфосфатази

Суперродина тирозинфосфатаз РТР була визначена на основі каталітичної сигнатури CX5R, унікального мотиву амінокислотної послідовності

каталітичного домену, який був виявлений вже у першій очищеній РТР, проте наступними дослідженнями показано, що для більшості представників цієї родини субстратами також можуть бути фосфорильовані серин і треонін, мРНК і фосфоінозитолі [248].

У зв'язку з новими отриманими даними суперродина протеїнфосфатаз РТР, яка дефосфорилує білки по залишках тирозину була розділена на еволюційно самостійні класи на основі консервативних мотивів амінокислотних послідовностей і структури генів: клас 1 (класичні РТРs: рецепторні, нерцепторні і дуальні тирозинфосфатази DSPs: MAPKР, Slingshost, PRLs, atypical DSP, CDC14, PTEN, Myotubularins); клас 2 (CDC25s); клас 3 (LMWРТР) (Табл. 1.1) [3, 30, 134, 185, 208]. Більшість класичних нерцепторних РТР-з класу I ( РТР36, РЕР-РТР, SH-РТР1, РТР-S, РТР-BL, SHP-1, ТСРТР (відома також як ТС45) і РТРε) були охарактеризовані, як ті, що переважно локалізовані в ядрі [247].

Ген РТРε генерує альтернативні транскрипти, з яких тільки один має N-кінцевий мотив, який відповідає на транслокацію у ядро [74]. ТСРТР розташовується в ядрі до тих пір, поки не буде перенесена в цитоплазму у відповідь на активацію епідермального рецептору фактора росту (EGFR). Де протеїнфосфатази ТСРТР зможуть як клітинні субстрати розпізнати фактор росту EGFR і адапторний білок p52shc [246]. Активація АМР-активованої протеїнкінази, індукована метаболічно і лікарськими засобами, є єдиним стресом, що викликає накопичення ТСРТР в цитоплазмі. Таким чином функція ТСРТР може регулюватись *in vivo* [246].

### **1.1.3. Аспаргат-специфічні протеїнфосфатази**

Третя суперродина протеїнфосфатаз, раніше була віднесена до серин/треонін-специфічних ферментів [89]. Але в подальшому була виділена окремо від інших і представлена двома родинами аспаргат-специфічних протеїнфосфатаз (FCP / SCP (FCP1, SCP, FCP / SCP-like) і HAD), каталітична

субодиниця яких містить характерний DXDXT/V мотив в N-кінцевій ділянці молекули [2, 133, 184, 185].

Перший клас відкрито з ідентифікацією FCP1, очищеної і локалізованої в ядрі протеїнфосфатази, субстратом для якої є аспарагінова кислота і яка відповідальна за дефосфорилування CTD – найбільшої субодиниці РНК-полімерази II (Pol II). Цей клас включає переважно локалізовані в ядрі SCP ферменти, більшість з яких позбавлена BRCT-домену, присутнього в FCP1 [177, 279] і чотирьох інших ферментах (Табл. 1.1). Головними представниками є 5 класів PP (FCP1, SCP, Dullard, CTDSPL2, UBLCP1) з підтверженою активністю і один TIMM50 – для якого вона не підтверджена. Чотири з п'яти класів діють на С-кінцевий домен (CTD) РНК-полімерази II (Pol II). Переважно представники даного класу складаються з тандемних гептапептидних сегментів (YSPTSPS), що повторюються. Відмінною ознакою типів FCP1 і SCP є їх взаємодія з С-кінцевим доменом РНК-полімерази II та його дефосфорилування [105]. Початково, наявність даного типу PP була показана в нейронах *H. sapiens* і описана чотирма типами протеїнфосфатаз – SCP1 (CTDSP1), SCP2 (CTDSP2), і SCP3 (CTDSPL), CTDSPL2. Тип CTDSPL2 було віднесено до другого класу аспартат-специфічних PP [279], хоча вони об'єднані одним типом НАД – каталітичного домену і взаємодіють переважно з транскрипційним комплексом REST/NRSF.

Другий клас аспартат-специфічних протеїнфосфатаз представлений родиною НАД. Подібно ферментам класів FCP і SCP, представники родини НАД також мають мотив послідовності – DXDXT/V і використовують унікальний аспартат-базований каталітичний механізм [177]. Проте варто зазначити, що за попередніми висновками аналізу доменної архітектури деякі представники цієї родини мають подвійну специфічність і можливість дефосфорилувати серин і треонін [220]. За останні десятиліття увагу привернули декілька членів родини НАД, такі як протеїнфосфатаза – хронофін (cofilin phosphatase chronophin), контролююча дефосфорилування кофіліну і

отже, динаміку актинового цитоскелету, і протеїнфосфатазу – Eyes Absent (Eya), яка функціонує у якості транскрипційного фактору в ядрі [89, 157, 249].

Щодо аналізу класифікації протеїнфосфатаз, то багатьма дослідниками була показана їх гетерогенність. Результати цих дослідів все частіше призводять до висновків, що усі родини протеїнфосфатаз беруть свій початок від різних попередників, на відміну від їх антагоністів – протеїнкіназ, маючих загальне еволюційне походження [2, 38, 76, 271]. Тим не менш, в останні роки досягнуто значного прогресу у розумінні ролі протеїнфосфатаз тварин та їх класифікації всередині окремо взятих фосфатомів [133, 134, 141, 185, 257]. У дослідженні фосфатомів рослинного походження прогрес не настільки суттєвий. Більшість рослинних протеїнфосфатаз була описана і названа на підставі біохімічної подібності з уже відомими ферментами ссавців. Однак згодом даний список був значно розширений в результаті появи значної кількості протеїнфосфатаз, не виявлених у ссавців [257]. Це призвело до того, що було запропоновано декілька схем класифікації протеїнфосфатаз рослин, однак ясність в цьому питанні відсутня [134, 165, 229, 257, 266]. Крім того, принципи поділу на групи часто виявлялися досить умовними і суперечливими.

#### **1.1.4. Особливості структурної організації протеїнфосфатаз**

Відомо, що в умовах *in vivo* протеїнфосфатази існують у вигляді набору олігомерних комплексів, які складаються з множинних комбінацій каталітичних та регуляторних субодиниць (типи укладання субодиниць:  $\alpha+\beta$ ,  $\alpha/\beta$  або всі  $\alpha$ ) [6]. Ці комплекси контролюють широкий спектр сигнальних шляхів за рахунок безпосереднього гідролізу фосфорильованого субстрату [189]. Процес гідролізу відбувається за участю двох кофакторів – іонів металів (як правило,  $Mn^{2+}$  та/або  $Mg^{2+}$ , чи  $Fe^{2+}$ ), пов'язаних ковалентними зв'язками в активному центрі ферменту, та за участю регуляторної субодиниці, формуючої підковоподібний «каркас» (характерний для представників родини PPP), і підтримуючої каталітичну субодиницю за допомогою специфічного С-хвоста

[273, 288]. Так, серин/треонін-специфічні протеїнфосфатази типу 2А окрім димерної структури молекули ( $\alpha+\beta$ ) доповнюються у гетеротримери за рахунок однієї з трьох ізоформ регуляторних субодиниць. Протеїнфосфатази типу 1 у клітині представлені не поодинокі, а являють собою суму різних, взаємодіючих між собою ізоформ РР 1, регуляторних та асоційованих з ними білків. Зокрема для цього типу протеїнфосфатаз описано більше 90 білкових партнерів [273]. Таку структурну організацію було показано за допомогою іммунофарбування деяких націлених на ядро субодиниць РР1 [185]. Ймовірно різна локалізація ізоформ РР1 вказує на відмінності у специфічності взаємодій з певними цільовими або регуляторними субодиницями і тим самим впливає на потенційне включення в різні сигнальні комплекси. За невеликими винятками, РР1 взаємодіють зі своїми цільовими субодиницями за допомогою невеликого мотиву RV-X-F. Він вважається головним сайтом зв'язування РР1 з вторинними сайтами, що вносить певну змінну у взаємодію з різними ступенями [34, 245]. На даний час відомо більше 90 цільових субодиниць з подібною РР1 сигнатурою, що зв'язуються за допомогою RV-X-F мотиву, і потенційно ще більше партнерів буде відкрито згодом. Результати перевірки мотиву в анотованих РР1-зв'язуючих білках разом з експериментальним дослідженнями, визначили мотив як R/K1-2V/I[P]F/W, в якому будь-яка амінокислота може займати місце в дужках, за винятком проліну [265]. Поглиблені дослідження дозволили ще більш точно визначити цей сайт зв'язування, що потім було використано в якості біоінформаційного інструменту для передбачення 84 нових РР1-взаємодіючих білків, законсервованих в геномі ссавців [178]. Так, наприклад, 7 з 8-ми передбачених партнерів протеїнфосфатаз типу 1, підтвердили їх взаємодію з РР1 *in vitro* [178]. Необхідно відзначити, що навіть за допомогою визначеного R/K1-2V/I[P]F/W сайту розпізнаються не всі білки, як наприклад, міозин-взаємодіюча фосфатаза типу 1 (МУРТ1).

Ферменти РР2А типу існують в клітинах рослин і тварин як гетеродимер з каталітичної (РР2Ас) та регуляторної субодиниці (РР2Аа) або гетеротример з

додатковою PP2A-асоційованою субодиницею. Так субодиниця А (PP2A $\alpha$ ) містить HEAT-повтор і формує підковоподібний каркас, щоб підтримувати каталітичну субодиницю С (PP2A $\gamma$ ) за допомогою свого унікального С-кінцевого хвоста [273]. Специфічна будова даної регуляторного білка пояснює, чому саме субодиниця А зв'язується тільки з PP2A $\gamma$ , а не з іншими ферментами родини серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз. Крім А $\alpha$  і С $\alpha$ , просторова структура комплексів PP2A містить також B56 $\gamma$ 1 субодиницю, яка взаємодіє з субодиницею С поблизу активного сайту, зумовлюючи тим самим специфічність ферментів цього типу до субстрату [43, 273, 274]. Каталітична субодиниця С може також зв'язувати регуляторний білок  $\alpha$ 4 (відомий також як IGBP1; ортолог дріжджового асоційованого фосфатазного 2A білка розміром 42 kDa (Tap42) у ссавців і Tap42-взаємодіючий білок (Tir41), який контролює передачу сигналу мішеням рапаміцину (сигнальний кіназний каскад TOR, GO:0031929) [87, 114]. Характерними регуляторними субодиницями фосфатази PP4 є R1, R2, R3 $\alpha/\beta$ , тоді як PP4 частіше всього знаходиться у комплексі з SAP1–3 [57, 70].

У вищих рослин PP5 кодується одиночними генами, які виробляють два альтернативно з'єднаних транскрипти, що кодують ізоформи PP5 [57]. Ізоформа 1 – 62-кДа, яка несе в собі два N-кінцевих трансмембранних домени, які локалізуються в ендоплазматичному ретикулумі і функція ізоформи 1, поки що невідома. Ізоформа 2 PP5 – 55-кДа, PAPP5 (Фітохром-асоційована протеїнфосфатаза 5) взаємодіє з фітохромом PhyA у дво-гібридній системі і переважно дефосфорилує біологічно активну світло-поглинаючу Pfr-форму PhyA *in vitro* [215]. Специфічність PAPP5 виникає через зв'язування його TPR домену з Pfr-формою PhyA. Взаємодія PAPP5 з PhyA також залежить від спектральної форми. У темряві, PAPP5 і PhyB локалізовані в цитоплазмі – при освітленні, вони переміщуються в ядро, де локалізується PAPP5 в перемішку з PhyB. Експерименти з мутантами *rapp5* і з лінією гіперекспресії показують, що підвищення рівня PAPP5 корелює з опосередкованою фоточутливістю як у PhyA і PhyB, що призводить до підвищеної експресії генів індукованих світлом



[136, 215]. PP5 також взаємодіє з хворобочутливим білком I-2 з і двома членами родини Hsp90 у помідорів. Пригнічення Hsp90, але не PP5, блокує клітинну смерть викликану I-2, що вказує на правильну укладку I-2, який управляється за допомогою Hsp90-PP5 комплексу [70].

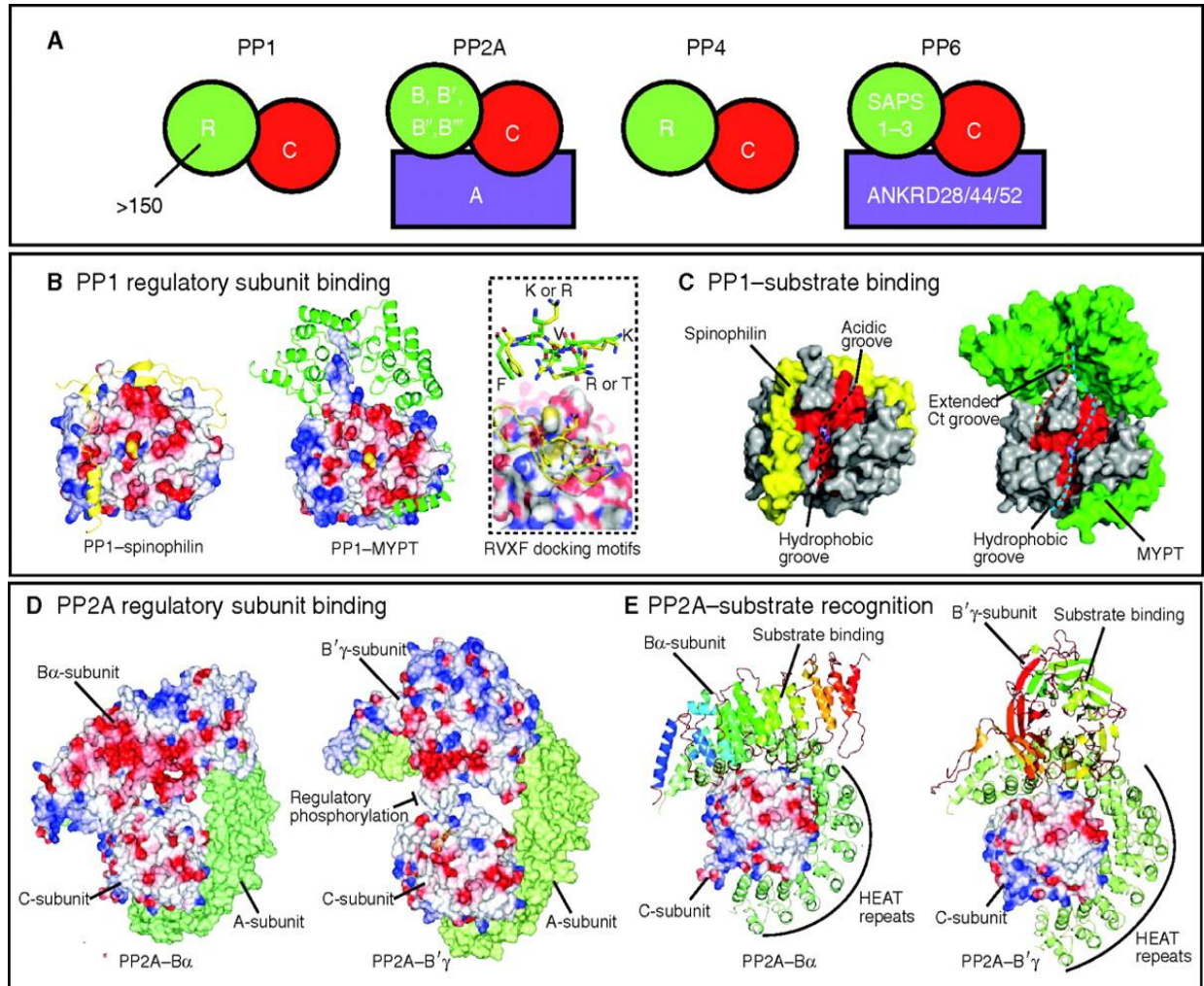


Рис. 1.1. Структура ферментів родини фосфопротеїнофосфатаз та характеристика їхньої субстратної селективності [14]

PP2B тип протеїнофосфатаз, відомий також як PP3, або кальцінейрин у ссавців, але відсутній у рослин, складається з каталітичної A субодиниці і окремої B субодиниці, яка споріднена з кальмодуліном, тоді як тип PP2C – представлений скупченням каталітичних субодиниць PP [2, 243, 270]. Інші серин/треонін-, тирозин- та аспартат-специфічні протеїнофосфатази представлені тільки ізоформами каталітичних субодиниць поодинокі або у комплексі з іншими білковими партнерами [270].

Варто також відмітити, різний молекулярний механізм роботи протеїнфосфатаз. Так серин/треонін-, тирозин- та аспартат-специфічні протеїнфосфатази використовують зовсім різні каталітичні механізми для того, щоб дефосфорилювати свої субстрати [13]. Тирозин-специфічні протеїнфосфатази, які кодуються за допомогою величезної родини генів, об'єднані спільною ознакою – консервативним мотивом активного сайту HСX5R, де цистеїн діє як нуклеофіл і утворює тимчасовий комплекс фосфоцистеїн під час гідролізу [13; 71].

Порівняно з ними, ферменти родини серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз використовують для каталізу два іони металів, як правило,  $Mn^{2+}$  або  $Fe^{2+}$ , які координуються консервативними амінокислотними залишками для кожного класу протеїнфосфатаз [227]. Зв'язані іони металів координують фосфатну групу субстрату і стабілізують негативний заряд, полегшуючи таким чином нуклеофільну атаку на фосфор в молекулах води і гідроліз складноефірного зв'язку фосфату [90]. Крім того, що марганець і залізо потрібні для активності серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз, тому дефіцит цих елементів призводить до сповільнення росту клітин, у ссавців – в першу чергу еритроцитів [227].

Близька подібність структури і діяльності каталітичних субодиниць ферментів суперродини PPP не дає єдиного пояснення механізмам біологічних функцій, специфічності і різноманітності субстратів, які спостерігаються в клітинах [14]. Різні фосфатази також регулюють передачу сигналів завдяки впливу на небілкові субстрати. Зокрема, білки типу PTEN, що мають тирозинфосфатазний домен та відображають структурні особливості тирозин-специфічних фосфатаз, але, не зважаючи на це, PTEN, як правило, каталізує тільки вилучення фосфату з 3' – положення фосфатидил-інозитулу, дефосфорилює PIP3 і взаємодіє з казеїн-кіназою 2, але те як він контролюється зворотнім фосфорилуванням, залишається практично не вивченим [142].

## 1.2. Специфічні інгібітори протеїнфосфатаз та особливості їх взаємодії з ферментами

### 1.2.1. Інгібітори серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз

Важливим інструментом для вивчення функціонування серин/треонін-специфічних РР є дія інгібіторів, що дозволяє не лише охарактеризувати шляхи залежної від фосфорилування сигнальної трансдукції, але й цілеспрямовано впливати на ряд клітинно-біологічних процесів (Табл.1.2) [238].

Таблиця 1.2

#### Характеристика інгібіторів за дією на різні типи протеїнфосфатаз

ТИП РР	PP1	PP2A	PP2B	PP4	PP5	PP6	PP7	PP2C
Фізіологічні функції	чисельні	чисельні	чисельні	подовження МТ на центросомі	клітинний ріст, відповідь на стрес	регуляція клітин. циклу	Стійкість до оокдаїнової кислоти та похідних	чисельні
Оокадаїнова к-та	+	+	+/-	+	+	-	-	-
Калікулін	+	+	-	+	+	-	-	-
Мікроцистин	+	+	-	+	+	-	-	-
Нодуларин	+	+	-	-	-	-	-	-
Таутоміцин	+	+	-	+	+	-	-	-
Кантаридин	+	+	-	+	-	-	-	-
Фострієцин	-	+	-	+	-	-	-	-

Результати останніх досліджень показали, що оокадаїнова кислота є специфічним інгібітором для тваринних та рослинних РР типу 1 і 2а [55, 226, 261]. Оокадаїнова кислота є сильним та специфічним інгібітором РР типу 1 та 2А, але має меншу спорідненість до РР типу 2В і зовсім не інгібує РР типу 2С [46]. Гідрофобність оокадаїнової кислоти дозволяє їй увійти в клітину та стимулювати фосфорилування білка, що подібно до механізму дії інсуліну [242], оскільки збільшує вивільнення вазопресину в нейром'язевій функції, викликає вазодилатцію [240], і є потужним агентом, що провокує утворення ракових пухлин [260]. Ще два сильних інгібітори мають протилежну від оокадаїнової кислоти спорідненість до протеїнфосфатаз 1 та 2а. Таутоміцин –

специфічний інгібітор PP, отриманий з *Streptomyces verticillatus* [40]. Його фізико-хімічні властивості й унікальний інгібіторний профіль роблять цю сполуку корисним інструментом для того, щоб ідентифікувати підтипи протеїнфосфатаз [146]. Калікулін А (calyculin A) – структурно унікальний морський токсин з сильною та специфічною інгібуючою дією протеїнфосфатаз [69, 230]. Калікулін добре інгібує PP2A, але в 10 разів краще PP1. У клітині він стимулює скорочення гладеньких м'язів [113], викликає внутрішньоклітинне фосфорилування білків у культурі гепатоцитів людини [237] і є сильним індуктором розвитку пухлин [77], а також інгібує апоптоз [230].

Схожий до окадаїнової кислоти механізм інгібування мають ще дві речовини: мікроцистин-LR і мікроцистин-LA - циклічні пептиди, отримані з ціанобактерій (microcystin-LR/microcystin-LA, MCLR/ MCLA) [104, 167]. Його токсичність спрямована на органи, які здійснюють перенесення органічних іонів через клітинні мембрани, тобто в першу чергу на печінку, потрапляючи в кров, мікроцистин концентрується в печінці, сприяє виникненню великих крововиливів, внаслідок чого печінка збільшується в розмірах [104, 167]. Ще одну групу речовин використовують для інгібування PP1 і PP2A під час очищення фосфорильованих білків: кантаридин (cantharidin) – можливий і селективний інгібітор PP2A, здатний гідролізуватися у водному середовищі в кантаридинову кислоту [19, 96, 158] та ендотол (endothall), що інгібує тільки PP2A із середньою силою [68, 103].

### **1.2.2. Інгібітори тирозин-специфічних протеїнфосфатаз**

Аналогічно фосфорилуванню білків по залишках серину і треоніну, рівень фосфорилування по залишках тирозину контролюється специфічними тирозинкіназами і тирозинфосфатазами (ТФ) [272]. Порушення балансу їхньої злагодженої роботи та активності є причиною виникнення цілого ряду захворювань людини, в тому числі і онкологічних [120, 272]. Доведено, що цілий ряд тирозинфосфатаз причетний до процесів онкогенезу і

пухлиноутворення. При розробці нових методів хіміотерапії саме тирозинфосфатази вважаються найбільш перспективними з ряду цільових білків-мішеней, а пошук та ідентифікація їхніх інгібіторів є запорукою ефективності того чи іншого виду терапії [120]. Дані зусилля увінчалися створенням ряду потужних, проте лише в деяких випадках селективних інгібіторів ТФ, таких як інгібітори протеїнфосфатаз PTP1B, SHP2, CDC25 I PRL. При цьому більшість інших вживаних в медицині інгібіторів тирозинфосфатаз не є специфічними, або включають агенти з уявною специфічністю по відношенню до амінокислотних залишків, як, наприклад, ортованадат, що здатний також окислювати цистеїн, який входить до складу активного центру каталітичної субодиниці [180]. Тому, не дивлячись на велику кількість відомих інгібіторів тирозинфосфатаз, попит на високоселективні інгібітори так само високий, як і раніше. Значний прогрес в даному напрямку, без сумніву, може бути досягнутий поєднанням методів супрахімії і моделювання молекулярних структур та міжмолекулярних взаємодій [282].

Серед існуючих інгібіторів тирозинфосфатаз виділяють три класи:

- 1) інгібітори цистеїн-залежних ТФ, що інгібують класичні рецепторні і нерцепторні тирозинфосфатази;
- 2) інгібітори цистеїн-залежних низькомолекулярних ТФ (LMW-PTP);
- 3) інгібітори цистеїн-залежних тирозинфосфатаз Cdc25 (A, B, C).

Найбільш відомим представником класу інгібіторів цистеїн-залежних ТФ, що інгібують класичні рецепторні та нерцепторні тирозинфосфатази, є ортованадат натрію або ванадат ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Будучи конкурентним інгібітором, ортованадат натрію забезпечує максимально ефективне інгібування ТФ при використанні протоколу Гордона [93]. Також до інгібіторів ТФ першого типу відносять оксид феніларсину [86], дефостатін [111] і етил-3,4-дефостатин [7, 269]. До класу інгібіторів цистеїн-залежних низькомолекулярних тирозинфосфатаз (LMW-PTP) відносяться такі інгібітори тирозинфосфатаз, як ванадат і бензойна кислота [191]. Остання, окрім низькомолекулярних тирозинфосфатаз, також здатна інгібувати фосфатази типу 1B (PTP1b) [191].

До третього класу відносяться інгібітори цистеїн-залежних дуальних протеїнфосфатаз CDC25 (включаючи три ізоформи: А, В, С). Фосфатази CDC25 є ключовими регуляторами клітинного циклу і виконують центральну роль, виступаючи як контрольна точка відповіді на пошкодження ДНК [50]. Даний клас протеїнфосфатаз представляє особливий практичний інтерес, оскільки фосфатази CDC25 неодноразово використовувалися як цільові білки при розробці протоколів протипухлинної терапії із застосуванням методів *in silico* для передбачення можливих механізмів дії перспективних інгібіторів [153]. Типовими представниками інгібіторів даного класу є ванадат, NO і перекис водню [290]. Крім того, за даними літератури, в деяких випадках, як наприклад з ванадатом і молібдатом, значно більшу ефективність інгібування ТФ виявляють не інтактні, а окисдовані форми: перванадат і пермолібдат [27; 180].

### **1.2.3. Інгібітори аспартат-специфічних протеїнфосфатаз**

Дослідження інгібіторів даної групи розпочали після реконструкції та структурного аналізу Fcp/Scp протеїнфосфатаз [285-287]. Було запропоновано, що гідрофобна  $\beta$ -складчата кишеня, характерна для даного типу РР, є потенційним сайтом зв'язування інгібуючих агентів, зокрема, для фториду берилію (beryllofluoride), рабепразолу (rabeprazole) та його синтетичних аналогів (rabeprazole sulfone, lansoprazole, rabeprazole N-oxide) [285, 279]. Водночас, незважаючи на активне дослідження інгібіторів протеїнфосфатаз, досі невідомі сполуки, які мали б специфічну афінність до цілком конкретних аспартат-специфічних протеїнфосфатаз.

Отже, незважаючи на прогрес у розумінні ролі дефосфорилування в клітині, особливість просторової структури протеїнфосфатаз рослин і їхньої взаємодії зі специфічними інгібіторами досі потребує вивчення. Саме комбінація експериментальних методів з *in silico* аналізом взаємодії РР-інгібітор дозволить висувати гіпотези про невідомі внутрішньоклітинні функції молекулярних каскадів дефосфорилування.

## РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріали дослідження

Для порівняльного аналізу рівнів подібності та наступного філогенетичного аналізу було використано нуклеотидні та амінокислотні послідовності серин/треонін-, тирозин- та аспартат-специфічних протеїнофосфатаз різного еволюційного походження, зокрема людини (*H. sapiens*), моху (*P. patens*), дводольних рослин (*A. thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Medicago sativa*) і однодольних (*Oryza sativa*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*).

Для аналізу та анотації нуклеотидних та амінокислотних сиквенсів протеїнофосфатаз було використано ряд біоінформаційних та структурно-біологічних баз даних (зокрема, UniprotKB і GenBank, а також TAIR, PlantGDB, Ensembl Plants, Phytozome, PTGBase), он-лайн інструментів (SMART, STRING, BLAST, Prot Paramtool ExPASy, SCOP, PRODRG, Swiss-Param, CCDC Relibase, PoseView) та ряд програмних пакетів (ClustalX, MEGA, CCDC GOLD, JChem, GROMACS).

Для з'ясування структурних механізмів зв'язування було використано моделі низькомолекулярних сполук: оокадаїнова кислота (RCSB PDB: OKA), динофізистоксин (PDB: XT1, XT2), мікроцистин-LR (PDB: PRD\_000212), дигідромікроцистин (мікроцистин-LA, PDB: PRD\_000215), таутоміцин (PDB: E7B), калікулін (PDB: CYU), нодуларин (PDB: PRD\_000214), мотупорин (PDB: PRD\_000213), кантаридин та норкантаридин (PDB: NHC і ENL).

Для пошуку можливих сайтів зв'язування селективних інгібіторів з протеїнофосфатазами в роботі було використано реконструйовані нами тривимірні моделі протеїнофосфатаз типів 1, 2A і 4 людини та рослин (описано в розділі, присвяченому моделюванню просторової структури).

## 2.2. Біоінформаційний пошук і аналіз послідовностей генів протеїнфосфатаз та їх білкових продуктів

На основі даних літератури, назв відповідних генів [2] та аналізу баз даних UniprotKB і GenBank [17, 29] було виконано BLASTn і BLASTp – пошук еталонних амінокислотних послідовностей протеїнфосфатаз людини. Для виключення помилок і різночитання назви протеїнфосфатаз наводяться згідно з назвами відповідних генів (згідно з даними Almo et.al. 2007 і Luan et.al. 2003) [2, 165].

Група 1 – тирозин-специфічні протеїнфосфатази (PTPBAS (PTPN13), PTP1B (PTPN1), TCPTP (PTPN2), STEP (PTPN5), SHP1 (PTPN6), IA2 (PTPRN), IA2B (PTPRN2), PTPN20, MEG1 (PTPN4), PCPTP1 (PTPRR), NEPTP (PTPN7), MEG2 (PTPN9), PEST (PTPN12), LYP (PTPN22), BDP1 (PTPN18), PTPA (PTPRU), PTPK (PTPRK), PTPP (PTPRT), PTP $\mu$  (PTPRM), PTPD1 (PTPN21), PTPH1 (PTPN3), PTPГ (PTPRG), DEP1 (PTPRJ), PTPB (PTPRB), PTPZ (PTPRZ1), PTP $\Delta$  (PTPRD), LAR (PTPRF), SAP1 (PTPRH), GLEPP1 (PTPRO), PTPRQ, HDPTP (PTPN23), PTPA (PTPRA), PTP $\Sigma$  (PTPRS), PTP $\epsilon$  (PTPRE), CD45 (PTPRC), PEZ (PTPN14)).

Група 2 – дуальні протеїнфосфатази (VPS29 (DC7, DC15, MDS007), MTMR11, MTMR10, MTMR12 (KIAA1682, PIP3AP), MTMR9 (C8ORF9, MTMR8), MTMR2 (KIAA1073), MTMR1, MTM1 (CG2), MTMR4 (KIAA0647, ZFYVE11), MTMR3 (KIAA0371, ZFYVE10), MTMR6, MTMR7, MTMR8, SBF1 (MTMR5), SBF2 (CMT4B2, KIAA1766, MTMR13), PTP4A3 (PRL3), PTP4A2 (PRL2, PTPCAAX2, BM-008), PTP4A1 (PRL1, PTPCAAX1), PTPDC1 (PTP9Q22), EPM2A, DUSP10 (MKP5), DUSP21 (LMWDSP21), DUSP18 (LMWDSP20), DUSP14 (MKP6), DUSP9 (MKP4), DUSP7 (PYST2), DUSP6 (MKP3, PYST1), DUSP22 (JSP1, LMWDSP2, MKPX), DUSP12, DUSP19 (DUSP17, LMWDSP3, SKRP1), DUSP15 (C20ORF57, VHY), DUSP4 (MKP2, VH2), DUSP2 (PAC1), DUSP1 (CL100, MKP1, PTPN10, VH1), DUSP8 (C11ORF81, VH5), DUSP16 (KIAA1700, MKP7), DUSP5 (VH3), SSH3 (SSH3L), SSH2 (KIAA1725, SSH2L), SSH1 (KIAA1298, SSH1L), DUSP13 (BEDP, MDSP), DUSP26 (DUSP24, LDP4, MKP8, NATA1, SKRP3), DUPD1 (DUSP27), DUSP28, STYXL1 (DUSP24, MKSTYX), STYX, ACP1, CDC25B (CDC25HU2), CDC25C, ACP5, CDC25A,



CDKN3 (CDI1, CIP2, KAP), DUSP23 (LDP3, VHZ), DUSP11 (PIR1), RING1B (CAP1A), CDC14C (CDC14B2), CDC14B, CDC14A).

Некласифіковані протеїнфосфатази – велика зведена група, що поєднує 9 філогенетично диференційованих груп (згідно з даними Almo et.al. 2007) (PPEF1, PPEF2, PPP1CA, PPP1CB, PPP1CC, PPP2CA, PPP2CB, PPP3CA, PPP3CB, PPP3CC, PPP4C, PPP5C, PPP6C, EYA1, EYA2, EYA3, EYA4, PDXP(CIN), MDP-1, ACP5, PAPL, PTEN, TPTE, DBR1, ILKAP, PDP2, PHLPP, PPM1B, PPM1D, PPM1E, PPM1F, PPM1G, PPM1H, PPM1J, PPM1K, PPM1L, PPM1M, PPM2C, TAB1, MPPD2, MPPE1, MRE11A, NT5E(CD73), SMPD1, SMPDL3A, SMPDL3B, CTDP1, CTDSP1(SCP1), CTDSP2(SCP2), CTDSP3(SCP3), DULLARD (CTDNEP1), TIMM50) [2]. Наведені вище повні амінокислотні послідовності анотованих протеїнфосфатаз людини були використані у якості первинної та референсної вибірки для реконструкції фосфатому рослин.

Пошук рослинних гомологів здійснювали на підставі алгоритму BLASTp з обмеженням пошуку по групі «Viridiplantae» і застосуванням наступних параметрів: вагова матриця – BLOSUM62, число очікуваних збігів з випадковою вибіркою із порогом  $E = 10$  при активній фільтрації низькоструктурованих ділянок і фрагментів вирівнювань, що містять гепи [17, 25, 29, 122] при використанні баз даних UniprotKB і GenBank, а також TAIR, PlatnGDB, Ensembl Plants, Phytozome, PTGBase[18, 92, 135, 281].

Первинну вибірку послідовностей гомологів виконували на підставі ваги вирівнювань, а також відсоткових показників ідентичності, подібності і наявності гепів [25, 122].

### **2.2.1. Аналіз доменної архітектури та структури протеїнфосфатаз**

Для оцінки потенційної специфічності та доменної архітектури рослинних протеїнфосфатаз виконували профільний аналіз і визначали межі каталітичних доменів досліджуваних білків із застосуванням мережевого інструменту SMART7 ([www.smart.embl-heidelberg.de](http://www.smart.embl-heidelberg.de)) [156] та на підставі даних статей UniProtKB [25], регулюючи відбір та аналіз за унікальними структурами

каталітичних доменів PP2A (SMART: SM000156), PTPc (SMART: SM00194), DSPc (SM000195).

Аналіз потенційної функції рослинних гомологів виконували на підставі моделювання білок-білкових взаємодій проти анотованих протеїнфосфатаз ссавців (*H. sapiens*, *M. musculus*) і дріжджів (*S. cerevisiae*, *S. pombe*), що входять в ключові сигнальні каскади, із застосуванням інструмента STRING 10.5 (<http://string-db.org/>) [239].

### **2.2.2. Кладистичні методи, використані для аналізу протеїнфосфатаз**

Множинні вирівнювання амінокислотних послідовностей були виконані за допомогою програми ClustalX 2.1 ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)) [151] із застосуванням серії матриць BLOSSUM [187]. Положення консервативних залишків і функціонально важливих мотивів оцінювали на підставі порівняння з еталонними послідовностями протеїнфосфатаз людини, анотованими в UniProtKB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), а також за допомогою програмного пакету EMBOSS [196].

Філогенетичний аналіз протеїнфосфатаз здійснювали на підставі кластеризації каталітичних доменів фосфатаз із застосуванням методу зв'язування найближчих сусідів (Neighbor-Joining або NJ) та еволюційного методу (UpGMA) [80, 151, 190]. Візуалізацію, аналіз і визначення кореня древа виконували за допомогою програм Dendroscope 3.5.9 і MEGA7 [109, 110, 145].

## **2.3. Відбір, моделювання просторової структури та оцінка якості побудованих моделей протеїнфосфатаз**

### **2.3.1. Відбір та аналіз якості матричних структур протеїнфосфатаз людини як потенційних матриць для моделювання**

Шаблонні структури протеїнфосфатаз були вибрані на основі методів BLAST або FASTA, тоді як більш дистанційно віддалені послідовності

обирались за допомогою методу PSI-BLAST з бази даних RCSB Protein Data Bank [35, 210]. Відбір потенційних матриць був оснований на повноті структур (порівняно з відповідними амінокислотними послідовностями, взятими з бази даних UniProtKB [29], аналізу сиквенсів PP за трьома показниками: ідентичність, схожість, гепи), якості самої моделі (в Å, визначеної за роздільною здатністю) та особливостях взаємодії з іншими субодинацями протеїнфосфатаз або специфічними інгібіторами, що визначають потенційні сайти зв'язування з інгібіторами [28, 64].

Для подальшого дослідження за допомогою структурно-молекулярних методів (молекулярного моделювання та докінгу) з мультимерних кристалів було залишено всього один гомологічний рослинним протеїнфосфатазам ланцюг при використанні текстового редактора AkelPAd (цей редактор дотримується форматування і не змінює його на формат операційної системи). Наступна підготовка молекули дала можливість перетворити сиру структуру PDB в графічну модель, яка відображала всі атоми молекули і повністю підготувала модель білка, забезпечуючи точність всіх наступних симуляцій молекулярного моделювання. Зокрема, етап підготовки включав у себе видалення всієї води PDB-структур і додавання атомів водню у матричну структуру білка, оцінку стану іонізації для кожної функціональної групи та відбудову бічних радикалів амінокислот, оптимізацію геометрії воднів та визначення водневих зв'язків. Підготовлені структури протеїнфосфатаз були збережені у повноатомному форматі для подальшого використання при дослідженні молекулярної механіки та динаміки комплексів PP-інгібітор, а також нормалізації зображення.

### **2.3.2. Побудова 3-мірних моделей протеїнфосфатаз за допомогою профільного методу реконструкції**

Фізико-хімічні параметри PP, що включали в себе такі розрахункові параметри, як молекулярна вага (M.Wt.), ізoeлектрична точка (pI), індекс

стабільності (I), аліфатичний індекс (AI) та відсоток гідрофільних і гідрофобних амінокислотних залишків (GRAVY) [81], були обчислені з використанням мережевого сервісу ProtParamtool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Вторинну структуру РР передбачали за допомогою методу SOPMA-прогнозування часткової компактизації поліпептидного ланцюга [9, 85]: альфа-спіралей, бета-листів, випадкових спіралей і протяжних ниток, який працює на основі методів нейронних мереж [48, 202]. Реконструкцію просторової структури каталітичних субодиниць рослинних гомологів протеїнфосфатаз тварин здійснювали за допомогою методів профільного моделювання [262] при використанні он-лайн сервісу I-TASSER [276].

### **2.3.3. Оптимізація та верифікація реконструйованих моделей протеїнфосфатаз за допомогою методу короткочасної молекулярної динаміки**

Аналіз тривимірної структури і характер укладання поліпептидного ланцюга протеїнфосфатаз виконували із застосуванням програми Swiss-PdbViewer v.4.1 [121] та інформації, представленої в базі даних класифікації білкових структур SCOP [5]. Оптимізацію геометрії і перевірку стабільності укладання реконструйованих промоделей здійснювали із застосуванням силового поля CHARMM [33] в програмному пакеті GROMACS 4.5 [204].

Оцінку якості моделей проводили на підставі значень середньоквадратичних відхилень між атомами моделей і енергетичних коливань під час молекулярної динаміки, даних карт Рамачандрана, графіків DOPE і ANOLEA [206, 121]. Остаточну верифікацію і відбір моделей виконували за оцінкою серверу MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), що включала в себе показники: відсоток некоректних ротамерів (%), відсоток відхилення або збігів (%), частота атомів вуглецевого скелету з відхиленням  $>0.25\text{Å}$ , загальний рейтинг згідно з сервером MolProbity, відсоток амінокислот,

що утворюють некоректні зв'язки (%), та відсоток амінокислот, що утворюють некоректні кути (%).

## **2.4. Ідентифікація сайтів зв'язування селективних інгібіторів на поверхні молекул протеїнфосфатаз**

### **2.4.1. Відбір та аналіз інгібіторів протеїнфосфатаз**

Інгібітори протеїнфосфатаз було відібрано на підставі даних літератури, результатів патентного пошуку (<https://patents.google.com/>), а також аналізу баз даних ZINC (<http://zinc.docking.org/>), PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), eMolecules (<https://www.emolecules.com>) та ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>) [82, 100, 112, 138].

Порівняння релаксованих і біологічно активних конформацій лігандів [262] з комплексів, депонованих у RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) [210], було виконано з використанням on-line сервісу ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu/>) та програм LigandScout (<http://www.inteligand.com/>) і BIOVIA DSVisualizer (<http://accelrys.com/>) [54, 140].

Отримання файлів топології лігандів виконано за допомогою on-line сервісів PRODRG [223] і Swiss-Param [292]. Оптимізація геометрії та підготовка речовин для подальшого молекулярного докінгу була виконана з використанням силових полів MM+ і CHARMM (Gromacs) [123, 204].

### **2.4.2. Пошук та аналіз сайтів зв'язування лігандів з протеїнфосфатазами на підставі гомології з експериментально підтвердженими комплексами**

Визначення сайтів зв'язування PP з інгібіторами та їх амінокислотного складу було виконано з використанням експериментально встановлених комплексів PP-інгібітор з RCSB Protein Data Bank [210]. Амінокислотні

послідовності РР з *H. sapiens*, *A. thaliana*, *P. patens* було отримано з бази даних UniProtKB [29]. Вибірка мішеней ґрунтувалась на результатах попередніх досліджень [221]. Структури сайтів зв'язування інгібіторів на поверхні молекул досліджуваних протеїнофосфатаз, а також з'ясування ролі молекул води у ліганд-білковій взаємодії було виконано із використанням on-line сервісів PoseView (<http://poseview.zbh.uni-hamburg.de>) і CCDC Relibase (<http://relibase.ccdc.cam.ac.uk>) [99, 235].

#### **2.4.3. Профільна кластеризація емпіричних та експериментально доведених сайтів зв'язування лігандів з протеїнофосфатазами**

Для передбачення сайтів зв'язування відомих інгібіторів з протеїнофосфатазами рослин було виконано множинні та профільні вирівнювання амінокислотних послідовностей протеїнофосфатаз і профілів сайтів зв'язування лігандів за допомогою програми Clustal X [151, 187, 262]. Існування і ступінь консервативності сайтів зв'язування інгібіторів оцінювали за допомогою інструментів програм EMBOSS і LeadIT [154, 196, 209].

Кластеризацію профілів кожної групи РР виконували із застосуванням методу зв'язування найближчих сусідів (Neighbor-Joining) [80, 190, 201]. Візуалізацію та аналіз кладограм було виконано за допомогою програми MEGA 7 [109, 110, 145].

#### **2.5. Використання методу молекулярного докінгу для передбачення структури ліганд-протеїнофосфатазного комплексу**

Докінг здійснювався з урахуванням повної рухливості ліганду за умови статичності амінокислотних залишків мішені на основі генетичного алгоритму, реалізованого в програмі CCDC GOLD Suite 5.3 [97, 263]. У кожному випадку здійснювалось 100 циклів генетичного алгоритму зі збереженням 50-ти кращих фреймів. Остаточний відбір комплексу здійснювався на підставі оціночних функцій програми CCDC GOLD: GoldScore, ChemScore і ASP. Параметри були

використані для обчислення приблизної енергії комплексів і ранжування різних передбачуваних конформацій ліганду в сайті зв'язування на кожному кроці конформаційного пошуку [97, 263]. Під час виконання молекулярного докінгу було враховано наявність водневих зв'язків, що часто відіграють визначальну роль у формуванні структури біологічних макромолекул, а також в утворенні їхніх комплексів з низькомолекулярними речовинами.

## **2.6. Оцінка стабільності ліганд-білкових комплексів у водному оточенні за допомогою методів тривалої молекулярної динаміки**

Стабільність комплексів протеїнфосфатаз тваринного і рослинного походження з інгібіторами оцінювали на підставі розрахунку молекулярної динаміки із застосуванням програмного пакета GROMACS з використанням одноіменного силового поля та повноатомного силового поля CHARMM [33]. Всі розрахунки молекулярної динаміки виконували у водному оточенні (модулі «editconf» і «genbox»). Розміри водного бокса визначалися розмірами досліджуваних комплексів і становили 6,18x5,43x5,73 нм для протеїнфосфатаз типу 1 і 5,90x6,47x5,46 нм – для протеїнфосфатаз типу 2A і PP4. Оптимізацію геометрії моделей здійснювали шляхом мінімізації вільної енергії із застосуванням обчислювальних модулів «grompp» і «mdrun», силового поля ffgmx і алгоритму крутого спуску (steepestdescent) при максимальній кількості кроків 1000 і градієнті 0,1. Розрахунок молекулярної динаміки здійснювали при температурі 300°K протягом 5, 30 чи 100 нс. Файли координат (\*.gro) і топології (\*.itp) молекул лігандів для подальшої оптимізації геометрії і розрахунків молекулярної динаміки комплексів рослинних протеїнфосфатаз з інгібіторами в програмі GROMACS були отримані за допомогою сервера PRODRG (<http://davarpc1.bioch.dundee.ac.uk/program/prodrp>).

Результати розрахунків молекулярної динаміки для протеїнфосфатаз тварин і рослин, комплексів протеїнфосфатаза-інгібітор та інгібіторів у вільному і зв'язаному з білком стані оцінювали на підставі

середньоквадратичного відхилення між атомами (RMSD) і значень конформаційних енергій (енергія ван дер Ваальсових і кулонівських взаємодій, KE) [102, 262].

Візуалізацію поведінки комплексу при проведенні оцінки молекулярної динаміки здійснювали із застосуванням програмного пакета VMD 1.8.6 [108]. Оцінку якості моделей здійснювали на підставі даних карт Рамачандрана [101], значень середньоквадратичних відхилень між атомами матричних структур і оптимізованих моделей рослинних гомологів і виконували за допомогою програмного пакета Swiss-PdbViewer v.4.0.1 [121]. Оцінку консервативності амінокислотного складу сайтів зв'язування, візуалізацію і аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com/>) [54].

## **2.7. Оцінка можливості дизайну нових похідних відомих інгібіторів протеїнфосфатаз**

Пошук гомологів селективного інгібітора РР типу 1 та 2А – окадаїнової кислоти (CID 446512) – було проведено з використанням пошукового інструменту "Structure search" у базі даних PubChem [138].

При відборі речовин для молекулярного докінгу врахували те, що деякі етапи моделювання є достатньо ресурсоемними, тому для їхнього проведення було скорочено об'єм хімічних речовин шляхом фільтрування за ADME параметрами [118, 162]. Для цього використовували програмний пакет з академічною ліцензією JChem (<https://www.chemaxon.com/download/jchem-suite/>), відбираючи речовини за такими параметрами, як молекулярна вага (Mw), розчинність у воді (LogS), показник ліпофільності або гідрофільності речовини, за яким можна судити про її проникність крізь плазматичну мембрану і отримати коефіцієнт розчинності (LogP), наявність акцепторів водню (hb\_a) та обертальних зв'язків (RB). Поетапні розрахунки були застосовані до всієї бази похідних інгібітора – окадаїнової кислоти [118, 162].



Аналіз імовірних сайтів зв'язування потенційних інгібіторів з досліджуваними протеїнофосфатазами виконували за допомогою методу гнучкого молекулярного докінгу в програмі CCDC GOLDSuite 5.3 [97, 263]. При цьому задавали параметри відповідного білка-мішені, ліганда і умови докінгу (атом центру і радіус області для докінгу). Оцінку результатів докінгу здійснювали на підставі штатних функцій програм GoldScore, ChemScore/ASP [97, 263]. Перевірку статусу і властивостей лігандів виконували шляхом аналізу баз даних ZINC, eMolecules і PubChem [82, 100, 112, 138].

Стабільність комплексів протеїнофосфатаз з потенційними інгібіторами оцінювали на підставі розрахунку молекулярної динаміки із застосуванням програмного пакета GROMACS з використанням повноатомного силового поля CHARMM [33].

## **2.8. Обчислювальні ресурси**

Завдання, перераховані у розділах 3.4, 4.2 та 5.3–5.6, було виконано з використанням потужностей Грід-кластеру Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України та віртуальної організації CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/csllabgrid>). Грід-кластер CSLabGrid складається з дев'яти серверів DellPowerEdge 1850 і одного серверу HP ProLiant AV340A (сукупно 72 ядра) та дискового масиву (включно NAS Dell PowerEdge 1800) загальним обсягом 12 ТБ. Також для виконання завдань, наведених у розділах 5.3–5.6, було використано обчислювальний кластер віртуальної лабораторії MolDunGrid ІМБГ НАН України (<http://moldungrid.org>) у зв'язку зі встановленим на ньому необхідним програмним забезпеченням.

### РОЗДІЛ 3

## РЕЗУЛЬТАТИ БІОІНФОРМАЦІЙНОГО ПОРІВНЯННЯ ФОСФАТОМІВ ЛЮДИНИ І ВИЩИХ РОСЛИН

### 3.1. Аналіз первинної структури протеїнофосфатаз за допомогою геномних та протеомних баз даних

Результати аналізу таких он-лайн баз даних, як «UniProtKB/SwissProt» та «UniProtKB/TrEMBL», а також «Nucleotide», TAIR, PlantGDB, Ensembl Plants, Phytozome, PTGBase, дозволили знайти та проаналізувати чисельну групу первинних послідовностей протеїнофосфатаз як прокариотичного, так і еукаріотичного походження. Ґрунтуючись на літературних даних та представлених в розділі «Матеріали і методи дослідження» назвах генів, з баз даних були відібрані відповідні повні амінокислотні послідовності протеїнофосфатаз людини, а також послідовності їх каталітичних доменів за даними статей баз даних. Подальший BLASTp-пошук рослинних гомологів в базі даних UniProtKB був виконаний проти повних амінокислотних послідовностей і послідовностей каталітичних доменів протеїнофосфатаз і охоплював 11 груп протеїнофосфатаз людини (згідно роботі [2], Рис. 3.1).

В результаті проведеного аналізу баз даних було виявлено більше, ніж 680 рослинних гомологів з *P. patens* і *A. thaliana* (Рис. 3.1). Випадки багаторазового депонування виявляли на підставі порівняння координат локусів генів відповідних білків. Відсутні типи гомологів з *P. patens* і *A. thaliana* також було перевірено для типових представників дводольних (*N. tabacum*, *M. sativa*) і однодольних (*O. sativa* subsp. *japonica*, *Z. mays*, *T. aestivum*) рослин.

Вихідну вибірку 600-т амінокислотних послідовностей коригували на підставі ваги вирівнювань, повноти знайденої послідовності, статистичних маркерів баз даних, а також відсоткових показників ідентичності, подібності і наявності гепів, використовуючи можливості інструмента BLASTp.

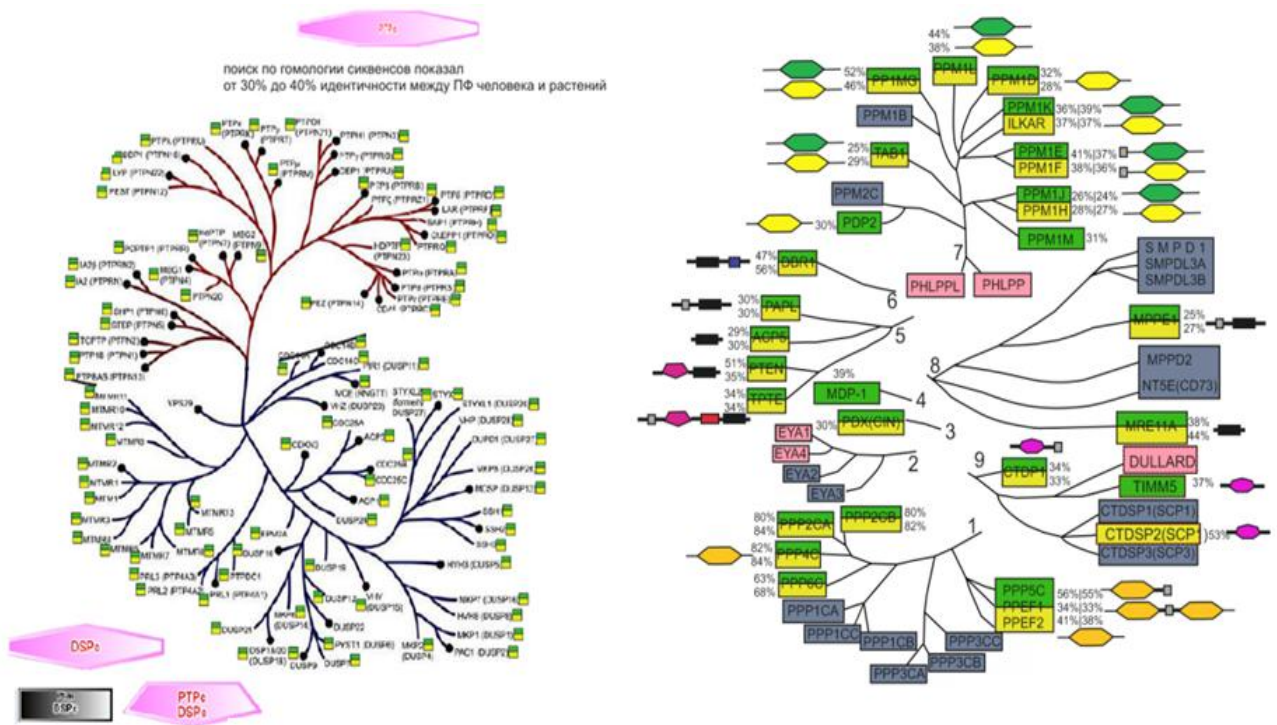


Рис. 3.1. Результати аналізу належності гомологів рослинного походження до протеїнфосфатаз згідно класифікації Almo et. al. [2] на підставі гомології послідовностей і результатів аналізу доменної організації

Примітка: на дендрограмах кольорами відмічено наявність гомологів у рослин (зеленим у *A. thaliana*, жовтим у *P. patens*, рожевим у *Z. mays*, *O. sativa*, сірим – у інших вищих рослин) та їх доменна архітектура (синім – DBR домен, чорним – Metallophos-домен, сірим – визначений за гомологією сиквенсу blast домен, рожевим/червоним – RTP і DSP домени, характерні класичним та дуальним тирозинфосфатазам, жовтим і зеленим відмічено PP2Ac і PP2C/PP2C-SIG домени, притаманні різним класам серин/треонін-специфічних PP, фіолетовим – CTDs каталітичний домен аспартат-специфічних протеїнфосфатаз)

### 3.2. Аналіз доменної архітектури та структури протеїнфосфатаз

Результати аналізу доменного складу та архітектури відібраних рослинних білків підтвердили наявність фосфатазних доменів тільки у 204 рослинних гомологів (29 у *P. patens* і 175 у *A. thaliana*), про що свідчить відповідність існуючим профілям і прихованим моделям Маркова (HMM), складеним на підставі порівняння низки послідовностей експериментально підтверджених еукаріотичних протеїнфосфатаз (Рис. 3.1). Аналіз доменної архітектури рослинних протеїнфосфатаз не тільки підтвердив належність знайдених білків до ферментів певного класу, а був також єдиним варіантом для подальшого кладистичного аналізу. Саме використання каталітичного

домену, а не повної амінокислотної послідовності каталітичної субодиниці, дозволило уникнути хибних результатів кластеризації, оскільки для усіх родин фосфатаз характерна велика гетерогенність амінокислотних послідовностей.

В результаті проведених досліджень було показано, що для представників тирозин-специфічних протеїнофосфатаз характерна наявність чотирьох каталітичних доменів (PTPc (SMART: SM00194), DSPc (SM000195), PTPc / DSPc (SM00012) або Pham DSPc (PF00782, містить 2 мутації)), що підтвердилось наявністю клади класичних тирозинфосфатаз та клади дуальних тирозин фосфатаз на дві великі клади при первинній кластеризації. Результати досліджень свідчать про існування гомологів для всієї родини, але рівень їх ідентичності не перевищував 30-40%.

Дослідження доменної архітектури інших типів протеїнофосфатаз дозволило охарактеризувати групу «нехарактеризованих» ферментів, яка початково включала різні типи серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз, Pten-протеїнофосфатаз зі специфічністю по 3-м залишкам серину, треоніну і тирозину, а також дуальні тирозинфосфатази (для детальної інформації див. розділ 2.2 «Матеріали і методи дослідження»). Результати дозволили підтвердити наявність гомологів майже всіх типів протеїнофосфатаз у рослин, окрім ряду серин/треонін-специфічних (PPP3CC, PPP3CB, PPP3CA, PPP1CB, PPP1CA, PPP1CC, PPM2C, PPM1B) та тирозинспецифічних (EYA3, EYA2, PDX (CIN), SMPD1, SMPDL3A, SMPDL3B, MPPD2, NT5E (CD73), CTDSP1 (SCP1) і CTDSP3 (SCP3)) протеїнофосфатаз. Додатково попередні висновки щодо підтвердження специфічності та функціонального значення рослинних гомологів протеїнофосфатаз було підтвержено на основі сканування відповідних повних послідовностей PP проти бази даних білок-білкових взаємодій ссавців (*H. sapiens*, *M. musculus*) і дріжджів (*S. cerevisiae*, *S. pombe*), виконаного за допомогою сервісу STRING [239]. Таким чином, для подальшої кластеризації каталітичних доменів протеїнофосфатаз нами було відібрано 204 унікальних рослинних білка: 29 з *P. patens* і 175 з *A. thaliana*. Як контроль була використана вибірка з 150-ти каталітичних доменів протеїнофосфатаз людини.

### 3.3. Аналіз результатів множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей протеїнфосфатаз та їх філогенетичний аналіз

Первинним етапом кластеризації вибірки каталітичних доменів протеїнфосфатаз, яка була отримана у попередньому розділі, було проведення множинного вирівнювання 354 амінокислотних послідовностей. Амінокислотні послідовності PP були підготовлені у fasta-форматі, тоді як алгоритм множинного вирівнювання модифікувався в залежності від отриманих результатів. Результати аналізу порівняння рослинних гомологів протеїнфосфатаз з еталонними послідовностями протеїнфосфатаз людини, анотованими в UniProtKB, дозволили встановити функціонально важливі мотиви PP і положення консервативних залишків у каталітичних доменах протеїнфосфатаз. Також було проведено аналіз покриття множинного вирівнювання вибірки каталітичних доменів PP у форматі \*.aln програми ClustalX за допомогою програмного пакету EMBOSS [196]. Саме результати аналізу при комбінуванні різних матриць вирівнювання та кластеризації дозволили врахувати як математичний, так і біологічний сенс вирівнювання каталітичних доменів PP людини з їхніми рослинними гомологами.

Результати спільної NJ-кластеризації каталітичних доменів протеїнфосфатаз людини та їхніх рослинних гомологів свідчать про існування загальних клад для протеїнфосфатаз рослин і тварин, що дозволяє висунути припущення про їхню еволюційну близькість. Це також підтверджується значною схожістю рослинних і тваринних протеїнфосфатаз в порівнянні з відповідними гомологами зі слизовиків (*Mycetozoa*) і грибів (*Fungi*) [63, 133, 184]. Крім того, було виявлено, що в більшості випадків гомологи протеїнфосфатаз з вищого моху *P. patens* займають більш близьке еволюційне положення по відношенню до протеїнфосфатаз людини, ніж PP з *A. thaliana*.

З метою більш детального аналізу було вирішено відійти від поділу всієї групи рослинних протеїнфосфатаз на сімейство тирозинфосфатаз (ТФ класу 1) і 9-ти груп некласифікованих білків [2]. Всі знайдені послідовності рослинних

гомологів (Рис. 3.1) були об'єднані і надалі аналізувалися згідно сформованим кластерам, з урахуванням їхньої потенційної субстратної специфічності (відповідно до результатів профільного аналізу): тирозин-, серин/треонін- і аспарат-специфічні протеїнфосфатази (Табл. 3.1, 3.3 – 3.5).

Таблиця 3.1

**Рослинні гомологи представників тирозин-специфічних протеїнфосфатаз із *A. thaliana***

№	Клас	Депонування в базах даних		Тип / Ізоформа	Статус в UniProt	Найближчий гомолог у людини	Показники схожості (%)		
		GenBank	Uniprot KB				Ident. (%)	Simil. (%)	Gap (%)
<b>Суперродина фосфотирозинфосфатаз (CX<sub>r</sub>R)</b>									
1.	<b>PTPs I (classic)</b>	At1g71860	O82656	PTP1	+	P29350-2_PTPN6	37.4	51.6	5.3
2.		At1g05000	Q9ZVN4	Probable PTP	+	P60484_PTEN	17.3	31.5	20.4
3.	<b>DSPs I (DSPs)</b>	At5g10480	Q8VZB2	PASTICCINO2	+	Q6Y1H2_PTPLB	44.2	65.5	0.6
4.		At3g55270	Q9C5S1	PTP MKP1	+	Q8WTR2_DUSP19	34.3	56.4	0.6
5.		At3g06110	Q9M8K7	DSPTP1B/MKP2	+	Q9H1R2_DUS15	37.1	57.9	2.1
6.		At2g04550	Q84JU4	PTP IBR5	+	P28562_DUSP1	34.3	55.7	5
7.		At3g01510	Q8LCU3	LIKE SEX4 1	+	O95278-8_EPM2A	23.5	35.9	13.1
8.		At3g10940	Q9SRK5	LIKE SEX4 2	+	P51452_DUS3	22.1	42.9	13.6
9.		At3g52180	Q9FEB5	PTPKIS1/DSP4	+	O95278-8_EPM2A	16.3	33.3	13.1
10.		At2g35680	Q9ZQP1	Putative DSP8	+	Q8WUK0_PTPMT1	37.4	55.4	2.9
11.		At5g56610	Q6NKR2	DSP PTP	-	Q8WUK0_PTPMT1	36.7	52.5	2.5
12.	<b>PTEN</b>	At5g39400	Q9FLZ5	CaLB/PTEN-like	-	P60484_PTEN	43.8	60.8	16.2
13.		At3g50110	Q8H106	PTP/TEN3	-	P60484_PTEN	33.6	45	31.3
14.		At3g19420	Q9LT75	PTP-like	-	P60484_PTEN	43.4	62.8	7.8
15.			Q8GZT8	AAO13749.1	-	P60484_PTEN	43.4	62.8	7.8
16.			Q9SN07	CAB62119.1	-	P60484_PTEN	33.6	45	31.3
17.		At3g23610	Q9ZR37	DSPTP1	+	Q8WYL5_SSH1	43.9	58.3	0.0
18.		At5g23720	Q75QN6	DSPTP PHS1	+	Q6B811_DUSP13	40.7	51.7	2.1
19.			Q8L613	AAM20532.1	-	Q6B811_DUSP13	39.3	52	4.7
20.			Q9FJU7	BAB09879.1	-	Q8WUK0_PTPMT1	30.7	43.6	4.3
21.			At2g40570	Q7Y230	AAP37680.1	-	Q16690_DUSP5	19.0	29.6
22.	<b>Myotub-PP</b>	At5g04540	Q9LZ70	CAB85561.1	-	Q13615_MTMR3	35.3	44.9	28.9
23.			Q0WP53	Myotubularin-I	-	Q13615_MTMR3	36.4	45.5	28.3
24.	<b>mRNA capping</b>	At5g01290	Q9SS77	AAD56326.1	-	O75319_DUS11	35	52.6	8.8
25.			Q8GSD7	AAN17417.1	-	O75319_DUS11	33.3	51.4	9.4
26.			Q9LFA7	CAB69857.1	-	O75319_DUS11	32.4	51.5	8.1
27.	<b>PTPsII CDC25</b>	At5g03455	Q8GY31	DSP Cdc25	+	P30307-4_CDC25C	22.2	37.6	8.5
28.	<b>PTPsIII LMWPTP</b>	At3g44620	Q67YE7	PTP	-	P24666_LMW-PTP	39.2	51.9	5.1
29.			F4J355	PTP	-	P24666_LMW-PTP	33.7	45.3	17.7
30.			B7U881	ACJ64855.1	-	P24666_LMW-PTP	38	50.6	9.5
31.			B7U884	ACJ64858.1	-	P24666_LMW-PTP	22.8	31	36.1
32.			B7U885	ACJ64859.1	-	P24666_LMW-PTP	13.3	21.3	51.3
33.			B7U886	ACJ64860.1	-	P24666_LMW-PTP	12	19.3	64.7
34.			B7U887	ACJ64861.1	-	P24666_LMW-PTP	21.2	31.1	36.4
35.			Q9M283	CAB86920.1	-	P24666_LMW-PTP	8	12	73.3
36.			Q9M1P2	PTP-like	-	P24666_LMW-PTP	39.2	51.9	5.1

Примітка: Процентні показники (Ident. -% Ідентичності, Simil. -% Подібності, Gap -% Пропусків) наведені на підставі результатів парного вирівнювання каталітичних доменів протеїнфосфатаз людини і каталітичних доменів відповідних рослинних гомологів.

Додатково було проведено пошук по гомології послідовностей раніше знайдених рослинних протеїнфосфатаз, що дозволило виявити ще 25 унікальних білків, які містили ділянки, відповідні відомим профілям каталітичних доменів протеїнфосфатаз. У підсумку результуюча вибірка була представлена 175-ма послідовностями потенційних протеїнфосфатаз з *A. thaliana* (Табл. 3.1, 3.3 - 3.5) і 29-ма з *P. patens* (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

### Рослинні гомологи представників різних родин протеїнфосфатаз із *P. patens*

№	Депонування в базах даних		Тип / Ізоформа	Статус в UniProt	Найближчий гомолог у людини	Показники схожості (%)		
	GenBANK	UniprotKB				Ident. (%)	Simil. (%)	Gap (%)
<b>Родина серин/треонін фосфопропротеїнфосфатаз (PPP)</b>								
1.	PHYPADRAFT_95594	A9TPW7	Predicted	-	P62140_PP1B	82.0	91.0	0.0
2.	PHYPADRAFT_226377	A9TXC9	Predicted	-	P67775_PP2AA	85.6	95.2	0.0
3.	PHYPADRAFT_169532	A9TE32	Predicted	-	P60510_PP4C	75.7	81.6	10.9
4.	PHYPADRAFT_106477	A9SHX7	Predicted	-	P53041_PPP5	61.7	76.9	0.0
5.	PHYPADRAFT_206051	A9RVI2	Predicted	-	O00743_PPP6	72.4	86.4	0.4
6.	PHYPADRAFT_152342	A9RMR0	Predicted	-	Q5SGD2_PPM1L	37.3	57.4	7.2
7.	PHYPADRAFT_141150	A9T6S2	Predicted	-	Q5SGD2_PPM1L	37.2	54.0	9.6
8.	PHYPADRAFT_92442	A9TGG3	Predicted	-	Q5SGD2_PPM1L	37.3	56.2	7.2
9.	PHYPADRAFT_184828	A9SGX4	Predicted	-	P35813_PPPM1A	30.2	49.3	8.6
10.	PHYPADRAFT_126453	A9S9Z7	Predicted	-	P35813_PPPM1A	33.9	52.5	5.4
11.	PHYPADRAFT_130877	A9SJD8	Predicted	-	P35813_PPPM1A	33.7	53.3	4.7
12.	PHYPADRAFT_225330	A9TTK6	Predicted	-	P35813_PPPM1A	30.4	46.8	16.7
13.	PHYPADRAFT_139554	A9T341	Predicted	-	O15355_PPM1G	29.2	40.9	39.4
14.	PHYPADRAFT_115305	A9RJT1	Predicted	-	O75688_PPM1B	32.3	50.2	14.8
15.	PHYPADRAFT_106079	A9SAC2	Predicted	-	Q5SGD2_PPM1L	33.3	49.6	3.6
16.	PHYPADRAFT_32342	A9TT55	Predicted	-	O75688_PPM1B	33.0	46.4	15.8
17.	PHYPADRAFT_13662	A9SHN9	Predicted	-	O75688_PPM1B	30.6	42.6	15.5
<b>Суперродина фосфотирозинфосфатаз (CX<sub>r</sub>R)</b>								
1.	PHYPADRAFT_179159	A9RXK5	Predicted	-	A6NDG6_PGP	33.0	50.5	16.5
2.	PHYPADRAFT_174353	A9RFS6	Predicted	-	A6NDG6_PGP	33.6	51.4	16.8
3.	PHYPADRAFT_140952	A9T6C0	Predicted	-	P60484_PTEN	10.5	28.6	7.5
4.	PHYPADRAFT_131125	A9SJW3	Predicted	-	P13686_PPA5	30.3	48.9	7.7
5.	PHYPADRAFT_114693	A9RIT6	Predicted	-	P13686_PPA5	29.0	48.5	7.8
6.	PHYPADRAFT_114432	A9RHZ5	Predicted	-	Q6ZNF0_PAPL	29.0	41.6	14.0
7.	PHYPADRAFT_133613	A9SQV9	Predicted	-	Q6ZNF0_PAPL	25.4	40.3	25.4
8.	PHYPADRAFT_133228	A9SPK4	Predicted	-	Q9UK59_DBR1	58.8	74.2	1.7
<b>Родина протеїнфосфатаз на основі каталізу аспарагінової кислоти (DXDXT/V)</b>								
1.	PHYPADRAFT_86918	A9TIQ3	Predicted	-	Q9Y5B0_CTDP1	31.3	49.4	12.0
2.	PHYPADRAFT_74853	A9S5I0	Predicted	-	Q9Y5B0_CTDP1	30.1	49.4	12.0
3.	PHYPADRAFT_198166	A9TTN5	Predicted	-	Q9Y5B0_CTDP1	30.2	51.6	9.4
4.	PHYPADRAFT_152342	A9TXM9	Predicted	-	Q9Y5B0_CTDP1	23.3	46.0	6.0

Примітка: Процентні показники (Ident. -% Ідентичності, Simil. -% Подібності, Gap -% Пропусків) наведені на підставі результатів парного вирівнювання каталітичних доменів протеїнфосфатаз людини і каталітичних доменів відповідних рослинних гомологів.

Враховуючи результати подальшого множинного вирівнювання зведеної групи протеїнфосфатаз людини і рослин, за допомогою методу зв'язування

найближчих сусідів була побудована радіальна філограма. Для визначення кореня дерева було виконано додатковий кладистичний аналіз за допомогою методу UpGMA, що дозволило отримати остаточну інтерпретацію філограми та виявити шість чітко відокремлених гілок (Рис. 3.2).

Результати кладистичного аналізу групи тирозин-специфічних протеїнофосфатаз вказують на існування рослинних гомологів на рівні всієї родини цих білків (Табл. 3.1 для протеїнофосфатаз з *A. thaliana* та у Табл. 3.2 наведено протеїнофосфатази з *P. patens*). Однак слід зазначити, що при порівнянні з повними послідовностями відповідних ТФ тварин рівень їхньої ідентичності становить 30-40% проти 15-45% при порівнянні тільки їхніх каталітичних доменів: РТРС (SMART: SM00194), ДСПС (SM000195), РТРС/ДСПС (SM00012) або Pham ДСПС (PF00782, містить 2 амінокислотні заміни).

Згідно даних кладистичного аналізу, імовірні рослинні гомологи існують для трьох класів тирозинфосфатаз тварин, що підтверджується їхньою спільною кластеризацією з відомими тваринними тирозинфосфатазами у кладах 1, 3 і 5 (Рис. 3.2). Аналіз виконано на основі кластеризації амінокислотних послідовностей каталітичних доменів із застосуванням методу зв'язування найближчих сусідів. Отримана дендрограма містить інформацію про відповідність відомим профільним моделям раніше описаних протеїнофосфатаз людини з відповідними рослинними гомологами, зокрема, клада 1 і 5 представлені тирозин-специфічними РР класу 1, 2 і 3; клада 2 і 6 – класичними та  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -залежними серин/треонін-специфічними протеїнофосфатазами; клада 4 – групою аспартат-специфічних протеїнофосфатаз. Також варто відмітити кладу 3, в неї увійшли - тирозин-специфічні протеїнофосфатази, і вона є місцем вірогідної локалізації кореня зведеної філограми.

Так, перша клада об'єднує тирозин-специфічні протеїнофосфатази першого класу (класичні та дуальні тирозинфосфатази, РТР). Результати профільного аналізу свідчать про те, що для цієї групи характерна наявність моделей одного з каталітичних доменів: РТРС (SMART: SM00194), ДСПС (SM000195), РТРС/ДСПС (SM00012) або Pham ДСПС (PF00782) [268].



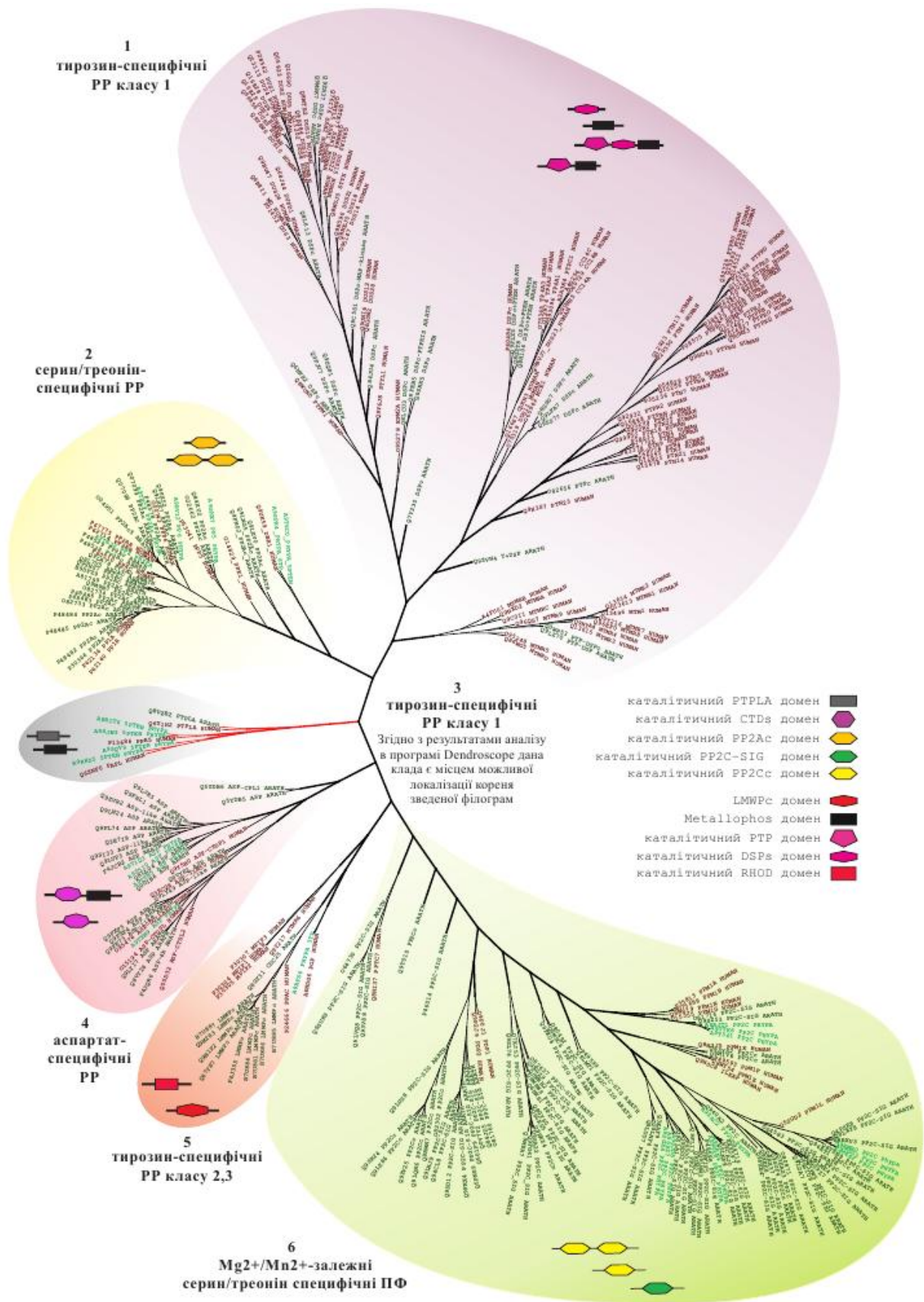


Рис. 3.2. Результати філогенетичного аналізу зведеної групи протеїнофосфатаз людини і потенційних рослинних протеїнофосфатаз з *A. thaliana* і *P. patens*

Клада, яка об'єднала класичні тирозинфосфатази, також включає 25 гомологів з *A. thaliana*. 11 з них відносяться до раніше анотованої класичної фосфатази PTP1 (UniProtKB: O82656), вірогідних PTP (Q9ZVN4), а також до дуальних фосфатаз PTP-MKP1 (Q9C5S1), DSPTP1B/MKP2 (Q9M8K7), PTP IBR5 (Q84JU4), PTP-LSF1 (F4J117), PTP-LSF2 (Q9SRK5), PTP-LSF4 (Q9FEB5), Putative DSP8 (Q9ZQP1), DSPTP1 (Q9ZR37), DSPTP-PHS1 (Q75QN6). Крім того, до цієї групи увійшли 6 раніше не анотованих білків, що несуть різні амінокислотні заміни у каталітичних доменах: Q6NKR2, Q9FLZ5, Q8H106, Q9LT75, Q8GZT8, Q9SN07, Q8L613, Q9FJU7, Q7Y230, Q9LZ70, Q0WP53, Q9SS77, Q8GSD7, Q9LFA7, хоча мають незначну дистанцію між гілками.

Третя кллада, представлена 3-ма тирозинфосфатазами з *H. sapiens*, 4-ма раніше неанотованими білками з *P. patens* (A9RIT6, A9SJW3, A9SQV9, A9RHZ5), а також протеїнфосфатазою PTPLA з *A. thaliana* (Q8VZB2). Тирозинфосфатази людини, що увійшли до цієї групи, містять домени Pham-PTPLA (PF04387) і Metallophos (PF00149), а рівні ідентичності послідовностей їхніх каталітичних доменів коливаються в межах 10,5-40,2%.

П'ята кллада об'єднує 10 гомологів тирозинфосфатаз 2-го і 3-го класу. Для тирозинфосфатази класу 2 CDC25C (P30307-4) гомологом є анотована протеїнфосфатаза Cdc25-PTP (Q8GY31) з *A. thaliana*, ідентична на 22,2% протеїнфосфатазі людини. Вона містить специфічний RHOD-домен (SM000450) і короткий мотив M-inducer-phosp (Pfam DB: PF06617). Всі інші тирозинфосфатази є рослинними гомологами протеїнфосфатаз тваринного походження класу 3 і містять каталітичний LMWPc-домен (SM00226), що є унікальною відмінною ознакою даної групи білків.

Також до цієї групи увійшли: білок A9RFS6 з *P. patens* з раніше невідомими функціями і 9-ть неанотованих протеїнфосфатаз з *A. thaliana* (Q67YE7, F4J355, B7U881, B7U884, B7U885, B7U886, B7U887, Q9M283, Q9M1P2). Ідентичність амінокислотних послідовностей каталітичних доменів в даній групі білків становить від 8 до 39,5%. Також нами була виділена група, що об'єднує послідовності SMPD1 (P21589), SMPDL3A (Q92484), SMPDL3B

(Q92485), MPPD2 (Q15777), NT5E (P21589), які згідно з даними [2] визначаються як потенційні протеїнфосфатази. Проте відповідні рослинні гомологи для даної групи білків нам виявити не вдалось.

Найменш вивченою є група протеїнфосфатаз, що об'єднує дві родини: FCP/SCP і HAD [184, 227], на підставі їхньої здатності дефосфорилювати білки по залишках аспарагінової кислоти, які раніше належали до групи тирозинфосфатаз класу 4 [290]. У досліджуваних видів вищих рослин (*P. patens*, *A. thaliana*) було виявлено 30 гомологів даних протеїнфосфатаз тваринного походження (Табл. 3.2, 3.3).

Для протеїнфосфатаз родини FCP/SCP, які згідно з даними профільного аналізу містять унікальний CPDc-домен (SM000577) [286], нами було виявлено 4-и білка (A9T1Q3, A9S5I0, A9TTN5, A9TXM9) з поки що невідомими функціями з *P. patens* і 23 неанотованих рослинних гомолога (Q5YDB6, Q5YDB5, Q8LL04, Q00IB6, Q3E7I8, Q3ECX9, Q9LUP3, Q9FL74, Q9LN24, Q9SI33, Q9LJR5, F4JCB2, Q9LJN6, Q9ZVR2, Q9FHL1, Q9FXF4, Q9FXF5, Q9LY49, Q9FK73, Q8VY28, F4JQR6, Q9LYI7, Q8VYE2) з *A. thaliana*. Рівень ідентичності білків в межах даної групи становить 25-56%.

Слід також зазначити, що хоча для деяких протеїнфосфатаз тварин (DULLARD) відповідні гомологи у *P. patens* і *A. thaliana* відсутні, вони все ж таки були виявлені в однодольних (*O. sativa*, Uniprot: A6N1L0). Для решти представників даної групи (CTDS1\_Q9GZU7, CNEP1\_O95476) гомологи у вищих рослин виявлені не були. Найближчі гомологи для групи представленої HAD-сімейством протеїнфосфатаз (EYA1\_Q99502, EYA2\_O00167, EYA3\_Q99504, EYA4\_O95677) не виявлені у *P. patens* і *A. thaliana*, але гомологи EYA1, EYA4 були знайдені у таких однодольних, як *O. sativa* і *Z. mays*. При скануванні бази UniProtKB були виявлені потенційні гомологи (O82162, Q8LAU3) типу EYA1 у *A. thaliana*.

Однак, у зв'язку з відсутністю моделей їхньої доменної архітектури, питання про приналежність цих білків до даного типу фосфатаз залишається відкритим і потребує подальшого експериментального підтвердження.

**Рослинні гомологи представників аспартат-специфічних протеїнфосфатаз  
із *A. thaliana***

№	Клас	Депонування в базах даних		Тип / Ізоформа	Статус в UniProt	Найближчий гомолог у людини	Показники схожості (%)		
		GenBANK	Uniprot KB				Ident (%)	Simil (%)	Gap (%)
<b>Родина протеїнфосфатаз на основі дефосфорилювання аспарагінової кислоти (DXDXT/V)</b>									
1.	<b>FCP / FCP-like</b>	At4g21670	Q5YDB6	CTDP-like 1	+	Q9Y5B0_CTDP1	23.2	37.3	16.9
2.		At5g01270	Q5YDB5	CTDP-like 2	+	Q9Y5B0_CTDP1	23.2	37.3	16.9
3.		At2g33540	Q8LL04	CTDP-like 3	+	Q9Y5B0_CTDP1	31.5	53.3	10.9
4.		At5g58003	Q00IB6	CTDP-like 4	+	Q9Y5B0_CTDP1	27.8	50.6	11.1
5.		At1g43600	Q3E7I8	NLI protein	-	Q9Y5B0_CTDP1	31.4	50.6	9.0
6.		At1g43610	Q3ECX9	NLI protein	-	Q9Y5B0_CTDP1	30.8	50.6	9.0
7.		At3g17550	Q9LUP3	MKP6	-	Q9Y5B0_CTDP1	32.0	50.8	6.0
8.		At5g54210	Q9FL74	HDH-like	-	Q9Y5B0_CTDP1	31.2	48.4	9.6
9.		At1g20320	Q9LN24	HDH-like	-	Q9Y5B0_CTDP1	33.3	52.3	7.2
10.		At2g04930	Q9SI33	HDH-like	-	Q9Y5B0_CTDP1	32.5	53.1	11.3
11.		BAB02162	Q9LJR5	K7L4	-	Q9Y5B0_CTDP1	26.6	44.8	7.8
12.		At3g19600	F4JCB2	RNAPII CTD	-	Q9Y5B0_CTDP1	29.9	50.6	13.4
13.		At3g19600	Q9LJN6	MMB12	-	Q9Y5B0_CTDP1	29.9	50.6	13.4
14.		At2g02290	Q9ZVR2	HDH-like	-	Q9Y5B0_CTDP1	26.8	45.2	9.6
15.		At5g23470	Q9FHL1	HDH-like	-	Q9Y5B0_CTDP1	28.7	45.9	9.6
16.		At1g29770	Q9FXF4	HDH-like	-	O15194_CTDSL	42.9	65.3	2.0
17.		At1g29780	Q9FXF5	HDH-like	-	O15194_CTDSL	45.2	69.2	1.4
18.		At3g55960	Q9LY49	HDH-like	-	O15194_CTDSL	30.5	48.2	12.2
19.		At5g45700	Q9FK73	HDH-like	-	O95476_DLRD	42.5	59.5	4.6
20.		At5g46410	Q8VY28	SCP1-like4	-	Q05D32_CTSL2	46.2	64.8	0.0
21.		At4g18140	F4JQR6	SCP1-like 4b	-	Q05D32_CTSL2	45.5	64.8	0.0
22.		At5g11860	Q9LYI7	SCP1-like 5	-	Q05D32_CTSL2	58.6	79.3	0.0
23.		At1g55900	Q8VYE2	TIM50	+	Q3ZCQ8_TIM50	38.8	60.5	0.0
24.	<b>HAD (chronophins)3</b>	At5g36700	Q9LTH1	PGLP1B	-	Q96GD0_PLPP	35.2	52.9	13.8
25.		At5g36790	Q8GY27	PGLP1A	-	Q96GD0_PLPP	33.2	50.0	17.9
26.		At5g47760	Q8GWU0	PGLP2	-	Q96GD0_PLPP	33.0	49.6	18.1

Примітка: Процентні показники (Ident. -% Ідентичності, Simil. -% Подібності, Gap -% Пропусків) наведені на підставі результатів парного вирівнювання каталітичних доменів протеїнфосфатаз людини і каталітичних доменів відповідних рослинних гомологів.

Найбільш велика група протеїнфосфатаз об'єднує серин/треонін-специфічні протеїнфосфатази 1, 2A, 4, 5, 7, BSL і BSU, а також  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -залежні протеїнфосфатази. Результати профільного аналізу їхніх каталітичних доменів вказують на те, що для представників даної групи характерна наявність одного з трьох типів моделей каталітичних доменів: PP2Ac (SM00156), PP2Cc (SM00332) або PP2C-SIG (SM00331).

На загальній філограмі група з серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз людини і 39-ти знайдених рослинних гомологів об'єднані в 2-й кладі (Рис. 3.2, Табл. 3.4).

**Рослинні гомологи представників серин/треонін-специфічних  
протеїнфосфатаз із *A. thaliana***

№	Клас	Депонування в базах даних		Тип / Ізоформа	Стату с в UniProt	Найближчий гомолог у людини	Показники схожості (%)		
		GenBANK	Uniprot KB				Ident (%)	Simil (%)	Gap (%)
<b>Родина серин/треонін фосфопротеїнфосфатаз (PPP)</b>									
1.	<b>PP1</b>	At2g29400	P30366	isoz-1	+	P62140_PP1B	80.8	92.3	0.4
2.		At5g59160	P48482	isoz-2	+	P62136_PP1A	83.8	92.3	0.0
3.		At1g64040	P48483	isoz-3	+	P62136_PP1A	78.6	91.1	0.0
4.		At2g39840	P48484	isoz-4	+	P62136_PP1A	80.8	90.8	0.0
5.		At3g46820	P48485	isoz-5	+	P62136_PP1A	83.0	91.5	0.0
6.		At4g11240	P48486	isoz-6	+	P62136_PP1A	79.7	93.4	0.0
7.		At5g43380	O82733	isoz-7	+	P62140_PP1B	79.3	90.4	0.0
8.		At5g27840	O82734	isoz-8	+	P62136_PP1A	75.3	89.3	0.0
9.		At3g05580	Q9M9W3	isoz-9	+	P62136_PP1A	76.4	89.7	0.0
10.		At2g29400	Q8LBH8	AAM64756.1	-	P62136_PP1A	83.0	91.5	0.0
11.		At5g59160	A8I799	ABV91338.1	-	P62140_PP1B	45.6	62.1	4.9
12.		At1g08420	B9DFZ9	Putative 2A	-	P62140_PP1B	46	62.5	4.9
13.	<b>PP2A</b>	At1g59830	Q07099	isof-1	+	P67775_PP2AA	81.9	93.4	0.0
14.		At1g10430	Q07098	isof-2	+	P67775_PP2AA	81.5	94.1	0.0
15.		At3g58500	P48578	isof-3	+	P62714_PP2AB	82.3	90.8	0.0
16.		At2g42500	Q07100	isof-4	+	P62714_PP2AB	82.3	90.8	0.0
17.		At1g69960	O04951	isof-5	+	P67775_PP2AA	82.3	93.4	0.0
18.		At3g58500	Q8LAT9	AAM65153.1	-	P67775_PP2AA	81.2	89.7	0.0
19.		At2g42500	Q8LAW8	AAM65099.1	-	P67775_PP2AA	81.9	93.4	0.0
20.	<b>PP4/ PPX</b>	At4g26720	P48529	PPX1	+	P60510_PP4C	81.3	90.4	0.4
21.		At5g55260	P48528	PPX2	+	P60510_PP4C	83.8	91.9	0.4
22.		At4g26720	Q8LPF9	AAM20731.1	-	P60510_PP4C	39.0	45.2	48.2
23.	<b>PP5</b>	At2g42810	Q84XU2	PAPP5	+	P53041_PPP5	62.8	78.7	0.0
24.		At2g42810	O22662	AAB84178.1	-	P53041_PPP5	38.6	48.7	36.1
25.	<b>PP6</b>	At1g50370	Q9SX52	FYPP1	+	O00743_PPP6	73.5	86.0	0.4
26.		At3g19980	Q9LHE7	FYPP3	+	O00743_PPP6	73.5	86.0	0.4
27.	<b>PP7</b>	At5g10900	Q9LEV0	inac hom	+	O14829-2_PPE1	21.1	40.8	11.5
28.		At1g48120	Q9LNG5	long f-m	+	O14829-2_PPE1	28.7	43.6	6.7
29.		At5g63870	Q9FN02	PP7	+	O14829-3_PPE1	30.9	46.0	10.4
30.	<b>BSL</b>	At4g03080	Q8L7U5	BSL1	+	P62140_PP1B	47.0	64.2	4.9
31.		At1g08420	Q9SJF0	BSL2	+	P62140_PP1B	46.0	62.5	4.9
32.		At2g27210	Q9SHS7	BSL3	+	P62136_PP1A	46.3	63.2	4.9
33.	<b>BSU</b>	At1g03445 At1g03450	Q9LR78	BSU1	+	P62140_PP1B	44.4	64.0	5.9

Примітка: Процентні показники (Ident. -% Ідентичності, Simil. -% Подібності, Gap -% Пропусків) наведені на підставі результатів парного вирівнювання каталітичних доменів протеїнфосфатаз людини і каталітичних доменів відповідних рослинних гомологів.

Так, для серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз (UniProt: PP2AA\_P67775, PP2AB\_P62714, PP4C\_P60510, PPP6\_O00743, PPE1\_O14829, PPE2\_O14830, PPP5\_P53041) найближчими рослинними гомологами виявилися 5-ть білків з ще невідомою функцією (A9TPW7, A9TXC9, A9TE32, A9RVI2, A9SHX7) з *P. patens* і 34-и протеїнфосфатази (анотовані протеїнфосфатази 1:

P30366, P48482, P48483, P48484, P48485, P48486, O82733, O82734, Q9M9W3; протеїнофосфатази 2A: Q07099, Q07098, P48578, Q07100, O04951; протеїнофосфатази 4: P48529, P48528; протеїнофосфатази 5: Q84XU2; протеїнофосфатази 6: Q9SX52, Q9LHE7; протеїнофосфатази 7: Q9LEV0, Q9LNG5, Q9FN02; протеїнофосфатази BSL: Q8L7U5, Q9SJF0, Q9SHS7; протеїнофосфатази BSU: Q9LR78, а також інші неанотовані протеїнофосфатази: Q8LBH8, A8I799, O22662, Q8LPF9, B9DFZ9, Q8LAT9, Q8LAW8) з *A. thaliana*. При цьому ідентичність послідовностей гомологів тваринного і рослинного походження становить 21-95,2% (Табл. 3.2, 3.4). Одночасно нами не було виявлено рослинних гомологів для протеїнофосфатаз типів PP2BC (P48454), PP2BB (P16298) і PP2BA (Q08209).

Кластеризація 12-ти анотованих  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -залежних протеїнофосфатаз PP2C людини та їхнієї рослинних гомологів дозволила виявити найбільшу групу фосфатаз рослинного походження (Табл. 3.2, 3.5). Так, з 204-х рослинних гомологів 92 білка об'єдналися з  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -залежними протеїнофосфатазами людини і сформували 6-ту кладу загальної філограми (Рис. 3.2).

Для групи протеїнофосфатаз людини, які ввійшли у дану кладу найближчими гомологами виявилися 12-ть білків з невідомою функцією (A9RMR0, A9T6S2, A9TGG3, A9SGX4, A9S9Z7, A9SJD8, A9TTK6, A9T341, A9RJT1, A9SAC2, A9TT55, A9SHN9) з *P. patens* і 5-ть анотованих протеїнофосфатаз (P2C59\_Q8RXV3, P2C08\_Q9LMT1, P2C67\_Q501F9, P2C64\_Q5PNS9, P2C73\_Q0WRB2) з *A. thaliana*. У той же час слід зазначити, що для протеїнофосфатаз типів PDP2 і PPM1M рослинні гомологи виявлені тільки у *A. thaliana*. Решта гомологів з арабідопсису і моху типу 2C були відібрані на основі подібності з іншими представниками даної групи.

Слід зазначити досить високий рівень гетерогенності амінокислотних послідовностей всередині цієї групи, що підтверджується досить низьким відсотком ідентичності (25-52%). На закінчення слід зазначити, що в даній групі відсутні явні рослинні гомологи для 2-х типів протеїнофосфатаз людини: PDP1 (UniProt: Q9P0J1) і PPM1B (UniProt: O75688). Таким чином, результати

порівняльного біоінформаційного аналізу фосфатів людини і вищих рослин (на прикладі *P. patens* і *A. thaliana*) підтверджують існування всього 29-ти потенційних протеїнофосфатаз у *P. patens* і 175-ти індивідуальних протеїнофосфатаз (113 серин/треонін-специфічних, 36 тирозин-специфічних і 26 аспарат-специфічних протеїнофосфатаз) у *A. thaliana*.

Таблиця 3.5

**Рослинні гомологи представників  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -залежних протеїнофосфатаз із *A. thaliana***

№	Клас	Депонування в базах даних		Тип / Ізоформа	Статус в UniProt	Найближчий гомолог у людини	Показники схожості (%)		
		GenBANK	Uniprot KB				Ident (%)	Simil (%)	Gap (%)
<b>Родина серин/треонин фосфопропротеїнофосфатаз (PPP): <math>Mg^{2+}/Mn^{2+}</math>-залежні протеїнофосфатази</b>									
1.	PP2C	At1g03590	Q9LR65	Probable 2C 1	+	Q5SGD2_PPM1L	21.4	37.7	20.1
2.		At1g07160	Q8RX37	Probable 2C 2	+	Q5SGD2_PPM1L	35.4	53.1	12.5
3.		At1g07430	Q9LNW3	2C 3	+	O75688-4_PPM1B	32.9	42.9	21.3
4.		At1g07630	Q9LQN6	Probable 2 C4	+	Q9P2J9_PDP2	19.3	33.5	22.2
5.		At1g09160	O80492	Probable 2C 5	+	Q8NI37_PPTC7	13.9	29.1	5.6
6.		At1g16220	Q9SA22	Probable 2C 6	+	Q8N3J5_PPM1K	24.4	39.5	22.5
7.		At1g17550	Q9LNP9	2C 7	+	O75688-5_PPM1B	29.7	44.8	15.5
8.		At1g18030	Q9LMT1	Probable 2C 8	+	Q9H0C8_ILKAP	32.6	54.1	13.3
9.		At1g22280	Q9LME4	Probable 2C 9	+	P49593_PPM1F	31.4	47.3	4.1
10.		At1g34750	Q9S9Z7	Probable 2C10	+	P49593_PPM1F	32.2	48.6	4.1
11.		At1g43900	Q8VZN9	Probable 2C11	+	Q5SGD2_PPM1L	41.0	59.0	5.6
12.		At1g47380	Q9FX08	Probable 2C12	+	Q8N3J5_PPM1K	25.8	43.6	9.8
13.		At1g48040	Q9LNF4	Probable 2C13	+	Q8WY54-2_PPM1E	33.2	48.5	9.2
14.		At1g67820	Q9FXE4	Probable 2C14	+	Q5SGD2_PPM1L	30.0	45.2	28.2
15.		At1g68410	Q9M9C6	Probable 2C15	+	Q8N3J5_PPM1K	27.0	43.3	9.5
16.		At1g72770	Q9CAJ0	2C 16	+	O75688-5-PPM1B	33.6	46.9	17.1
17.		At1g78200	Q8L7I4	Probable 2C17	+	Q8N3J5_PPM1K	29.9	50.4	7.5
18.		At1g79630	Q8RXZ4	Probable 2C18	+	Q5SGD2_PPM1L	21.3	34.5	27.8
19.		At2g20050	Q9SL76	Probable 2C19	+	Q8N3J5_PPM1K	25.3	41.4	15.1
20.		At2g20630	Q9SIU8	Probable 2C20	+	P35813-2_PPM1A	26.2	43.5	10.4
21.		At2g25070	O81716	Probable 2C21	+	O15355_PPM1G	31.4	42.9	37.9
22.		At2g25620	Q9SLA1	Probable 2C22	+	Q5SGD2_PPM1L	32.1	50.4	12.7
23.		At2g28890	Q9ZV25	Probable 2C23	+	Q9H0C8_ILKAP	16.9	32.1	33.8
24.		At2g29380	Q9ZW21	Probable 2C24	+	P35813-3_PPM1A	30.2	40.2	13.9
25.		At2g30020	O80871	Probable 2C25	+	Q5SGD2_PPM1L	34.4	51.9	12.2
26.		At2g30170	O64730	Probable 2C26	+	Q8NI37_PPTC7	28.9	47.8	18.5
27.		At2g33700	P93006	Probable 2C27	+	O75688-4_PP2CB	31.3	49.1	10.9
28.		At2g34740	O64583	Probable 2C28	+	Q8N3J5_PPM1K	30.2	50.6	9.0
29.		At2g35350	O82302	Probable 2C29	+	Q9P2J9_PPM1G	16.1	31.7	9.3
30.		At2g40180	Q9XEE8	Probable 2C30	+	Q5SGD2_PPM1L	30.1	48.5	12.1
31.		At2g40860	Q940A2	Probable 2C31	+	Q8WY54-2_PPM1E	33.9	51.6	9.1
32.		At2g46920	Q8RWN7	2C 32	+	Q9ULR3_PPM1H	17.3	30.8	17.5
33.		At3g02750	Q9M8R7	Probable 2C33	+	Q5SGD2_PPM1L	21.9	35.9	26.0
34.		At3g05640	Q9M9W9	Probable 2C34	+	Q5SGD2_PPM1L	24.8	41.4	14.8
35.		At3g06270	Q7XJ53	Probable 2C35	+	Q8N3J5_PPM1K	24.9	40.8	17.0
36.		At3g09400	Q9SR24	Probable 2C36	+	Q9P2J9_PDP2	20.7	38.3	21.8
37.		At3g11410	P49598	2C 37	+	O75688-5_PP2CB	32.2	46.3	13.1
38.		At3g12620	Q9LHJ9	Probable 2C38	+	Q9H0C8_ILKAP	24.3	43.0	12.3
39.		At3g15260	Q9LDA7	Probable 2C39	+	Q5SGD2_PPM1L	33.1	50.2	7.2

## Продовж. табл. 3.5

40.	At3g16560	Q9LUS8	Probable 2C40	+	Q9P2J9_PDP2	20.5	37.4	20.8
41.	At3g16800	Q9LRZ4	Probable 2C41	+	Q5SGD2_PPM1L	12.3	26.7	9.9
42.	At3g17090	Q0V7V2	Probable 2C42	+	P49593_PPM1F	24.3	39.2	20.3
43.	At3g17250	Q9LUU7	Probable 2C43	+	O75688-5_PPM1B	27.1	47.0	6.0
44.	At3g23360	Q9LW60	Probable 2C44	+	P49593_PPM1F	26.0	48.3	9.0
45.	At3g27140	Q3EAZ3	2C45-like	+	Q8N819_PPM1N	26.3	39.0	29.0
46.	At3g51370	Q9SD12	Probable 2C46	+	Q9H0C8_ILKAP	23.7	43.7	12.7
47.	At3g51470	Q9SD02	Probable 2C47	+	O75688-5_PPM1B	31.9	51.5	9.2
48.	At3g55050	Q94CL8	Probable 2C48	+	Q9H0C8_ILKAP	23.0	41.7	12.7
49.	At3g62260	Q3EAF9	Probable 2C49	+	P35813-2_PPM1A	33.0	53.8	6.4
50.	At3g63320	Q9M1V8	Putative 2C50	+	Q9H0C8_ILKAP	25.0	37.1	28.6
51.	At3g63340	Q93YS2	Probable 2C51	+	Q8N3J5_PPM1K	25.1	38.3	35.2
52.	At4g03415	Q8GY60	Probable 2C52	+	Q5SGD2_PPM1L	21.3	36.1	20.3
53.	At4g08260	Q9SUF4	Probable 2C53	+	Q5SGD2_PPM1L	29.1	43.7	20.9
54.	At4g11040	Q9T010	Probable 2C54	+	P35813_PPM1A	16.3	33.1	19.8
55.	At4g16580	Q9SUK9	Probable 2C55	+	Q8NI37_PPTC7	38.2	50.8	9.8
56.	At4g26080	P49597	Probable 2C56	+	O75688-5_PP2CB	31.8	46.3	19.3
57.	At4g27800	P49599	Probable 2C57	+	O75688-5_PP2CB	27.0	46.3	11.0
58.	At4g28400	Q93YW5	Probable 2C58	+	Q5SGD2_PPM1L	34.8	51.4	7.9
59.	At4g31750	Q8RXV3	Probable 2C59	+	Q5SGD2_PPM1L	44.2	58.6	5.2
60.	At4g31860	Q9SZ53	Probable 2C60	+	P35813-2_PPM1A	29.7	47.1	18.3
61.	At4g32950	O82637	Probable 2C61	+	P35813-2_PPM1A	25.7	39.9	12.7
62.	At4g33500	Q93V88	Probable 2C62	+	Q8NI37_PPTC7	30.6	48.6	13.7
63.	At4g33920	O81760	Probable 2C63	+	P49593_PPM1F	22.6	38.2	19.3
64.	At4g38520	Q5PNS9	Probable 2C64	+	Q9P0J1_PDP1	23.6	38.5	19.4
65.	At5g01700	Q6NKS1	Probable 2C65	+	O75688-5_PPM1B	24.2	37.5	13.7
66.	At5g02400	Q9LZ86	Probable 2C66	+	Q9P0J1_PDP1	18.6	32.5	37.8
67.	At5g02760	Q501F9	Probable 2C67	+	Q9H0C8_ILKAP	25.2	42.6	11.4
68.	At5g06750	Q84JD5	Probable 2C68	+	Q9H0C8_ILKAP	24.7	41.8	12.8
69.	At5g10740	Q8LAY8	Probable 2C69	+	Q5SGD2_PPM1L	44.6	57.8	5.2
70.	At5g19280	P46014	Probable 2C70	+	Q8N819-2_PPM1N	27.5	39.4	9.7
71.	At5g24940	Q4PSE8	Probable 2C71	+	Q5SGD2_PPM1L	44.6	58.2	5.2
72.	At5g26010	Q9XGZ9	Probable 2C72	+	Q8N3J5_PPM1K	25.1	41.0	15.9
73.	At5g27930	Q0WRB2	Probable 2C73	+	O75688-5_PPM1B	29.4	39.9	15.7
74.	At5g36250	Q9FG61	Probable 2C74	+	Q5SGD2_PPM1L	22.4	38.0	23.1
75.	At5g51760	Q9FLI3	Probable 2C75	+	O75688-5_PPM1B	29.2	44.6	17.4
76.	At5g53140	Q94AT1	Probable 2C76	+	Q5SGD2_PPM1L	37.4	50.0	13.3
77.	At5g57050	O04719	Probable 2C77	+	P35813-2_PPM1A	33.3	46.8	16.3
78.	At5g59220	Q9FIF5	Probable 2C78	+	O75688-5_PPM1B	33.1	44.4	17.4
79.	At5g66080	Q9FKX4	Probable 2C79	+	Q9P2J9_PDP2	21.1	36.1	28.2
80.	At5g66720	Q9LVQ8	Probable 2C80	+	Q8NI37_PPTC7	34.2	47.9	12.5

Примітка: Процентні показники (Ident. –% Ідентичності, Simil. –% Подібності, Gap –% Пропусків) наведені на підставі результатів парного вирівнювання каталітичних доменів протеїнофосфатаз людини і каталітичних доменів відповідних рослинних гомологів.

Слід зазначити, що значна частина рослинних білків, охоплених нашим біоінформаційним дослідженням, до цього часу мають статус неанотованих послідовностей і тому розглянуті вперше як протеїнофосфатази (Табл. 3.1-3.5).

Отже, на прикладі фосфатомів *P. patens* і *A. thaliana* підтверджено існування значних відмінностей у наборі протеїнофосфатаз у вищих рослин і тварин. Крім того, очевидно є наявність значного рівня дивергенції



фосфатомів між різними представниками вищих рослин. Зокрема, гомологи протеїнфосфатаз типу CTDSP2 (SCP1) – тільки у *P. patens*, а гомологи типів PDP2, PPM1M, MDP-1, TIMM5 виявлені нами виключно у *A. thaliana*. Більш того, результати попереднього аналізу свідчать про те, що гомологи протеїнфосфатаз тваринного походження типів PHLPP, PHLPP, EYA1, EYA4 і DULLARD відсутні у *P. patens* і *A. thaliana*, проте з великою часткою імовірності присутні у таких представників однодольних, як *O. sativa* і *Z. mays*. Отримані дані дозволяють припустити існування істотних філогенетичних відмінностей між фосфатомами мохів (*P. patens*) і дводольних (*A. thaliana*) з одного боку та представниками однодольних – з іншого боку.

#### **3.4. Відбір та характеристика протеїнфосфатаз, пов'язаних з регуляцією мікротрубочок у рослин**

Незважаючи на те, що протеїнфосфатази, пов'язані з мікротрубочковим цитоскелетом, залишаються практично не вивченими, попередні дослідження цих ферментів свідчать про їхню важливу роль в регуляції мітотичних процесів [88, 251]. Показано, що збірка мітотичного веретена вимагає точної регуляції динаміки мікротрубочок, що більшою мірою досягається згуртованою роботою різних типів протеїнфосфатаз [137]. Але не дивлячись на те, що серин/треонін-специфічні PP, тирозинфосфатази і дуальні протеїнфосфатази беруть участь у регуляції динаміки мікротрубочок, всі вони мають різні ролі, які не перекриваються [41, 228, 250, 267]. Що стосується ролі протеїнфосфатаз у регуляції мікротрубочок, то згідно експериментальним даним зміну динаміки чи функції найчастіше зв'язують з представниками класу серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз - PP1, PP2A (як каталітична, так і регуляторна субодиниця), PP4 (PPX), PP6 і PP7 [10, 22, 70, 184]. Якщо у випадку з PP1, PP2A і PP4, які потенційно дефосфорилують  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$  тубуліни, є експериментальні підтвердження їхньої участі у регуляції мікротрубочок, то стосовно PP6 і PP7 існують дані тільки про регуляцію мітозу і клітинного циклу

[24, 59, 144, 284]. Також виділяють групу, яка об'єднує класичні та дуальні тирозинфосфатази (PTP1B, CDC25, PTPN1, PTPN11, PTPN13, PTP14, DSP-DEP1, DSP7, DSP14B) [3, 41, 42, 160, 163, 255, 277]. Так, показано, що протеїнфосфатази CDC25a і CDC25b активують циклін-залежні кінази, які контролюють окремі фази клітинного поділу, PTP1B сприяє проліферації, а PTPN11 (SHP2) необхідна для підтримки стабільності хромосом [12, 160, 163, 255, 275]. Дана група тирозинфосфатаз, потенційно залучених до регуляції мікротрубочок, була проаналізована на наявність їх рослинних гомологів з дводольних (*A. thaliana*, *N. tabacum*, *M. sativa*) і однодольних (*O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum*). Відбір базувався на гомології повної послідовності, каталітичного домену, а також наявності консервативних мотивів для рецепторних, нерцепторних та дуальних ТФ (Табл. 3.6).

Таблиця 3.6

**Рослинні гомологи представників серин/треонін- та тирозин-специфічних протеїнфосфатаз, що потенційно пов'язані з регуляцією мікротрубочок**

Type PPs	Organism (UniProtKB Numbers of PPs)					
	<i>A. thaliana</i> *	<i>N. tabacum</i>	<i>O. sativa</i>	<i>M. sativa</i>	<i>Z. mays</i>	<i>T. aestivum</i>
	Ident. homologues Ser/Thr PPs - %					
		95 - 63	94 - 81	80 - 78	94 - 65	94 - 76
PP1	P30366, P30366, P48482, P48483, P48484, P48485, P48486, O82733, Q9M9W3, Q8LBH8, A8I799	O04857, O04856, O04858	Q10NJ4, Q6ZOR3, Q0DWD5, Q6K9Q5, Q5VRS7, B9G188	P48488, O65844, O65845, O65847, O65846	P22198, B4FS28, C0HHP5, K7U0Y8, B6TDT2, B4F7Z0, B4FJL0, B6T5L5, K7VEB1, B4FLQ3	W5EJL6, W5E2N, W5DXV3, W5GAA2, W5GAP6, W4ZVQ0, W5AKP0, W5AB35, W5CLK8, W5D0D0
PP2A	Q07099, Q07099, Q07098, P48578, Q07100, O04951, Q8LAT9, Q8LAW8, B9DFZ9	Q9XGH7, O04860, O04859	Q0DBD3, P48489, Q0E2S4, B7EL47, B9F4A7, B7EPC1, A3C4N5, Q10BT5, B7E5E8, Q10R90, Q8S7U0, B9FBJ0	Q06009	B4FSV7, B4FAL1, B6TLE3, B4FQJ0, B6TQ56, B6TM48, B6T4R7, B4F7Y0, B6TNR3, B6TCD1, B4G1M9, B6TBU7	W5GEB7, W5EWU3, W5FZ19, W5FB99, A5H7F0, W5EW11
PP4/PPX	P48529, P48528, Q8LPP9	O04859	Q6EPR6, B7EPC1	-	C4J0A6	W5FTD6, W5EKI3, W5F1T7
PP6	P48529, P48528, Q8LPP9	O04859	Q6EPR6, B7EPC1	-	C4J0A6	W5FTD6, W5EKI3, W5F1T7
PP7	Q9LEV0, 9LNG5, Q9FN02	-	Q8RZZ3, Q6EPR6	-	C0PAS3, B4FVS0	W5AIT5, W4ZSW9
PTPN1/PTP1B	O82656,	-	Q2QX07	-	C0PAP6	W5BM26
PTPN3/PTPH1	Q8GUI3	-	Q2R9R4	-	B6TAK5	W5EPG1, W5C654
PTPN11/PTP2C	F4IA41	-	B9G9P6	-	B4FVK7	W5EB09
PTPN13/PTP14	Q8GUI3	-	Q53NQ7	-	B6TAK5	W5EPG1
PTPRJ/D-DEP1	Q9C8X3	-	Q2R9R4	-	B4FVK7	W5DVP0
CDC25	Q8GY31	-	B9FAC6	-	B6TQK1	W5AFY4
DUSP7/DSP7	Q9ZR37	Q762M8	Q5VNG7	-	B6SJK1	W5CIR0
DSP14	Q9M8K7	Q762M8	Q5Z8E0	-	B4FPK5	W5DII6

На основі проведеного кладистичного аналізу групи з 13-ти тирозинфосфатаз ссавців і 35 їхніх потенційних рослинних гомологів було показано, що подальший аналіз молекулярної структури рослинних гомологів на даний час можливий лише для PP типів DUSP7, DSP14, CDC25A і B, які утворюють спільну кладу. В той же час специфічність рослинних гомологів рецепторних і нерцепторних PP не точно встановлена та має бути досліджена згодом (Рис. 3.3).

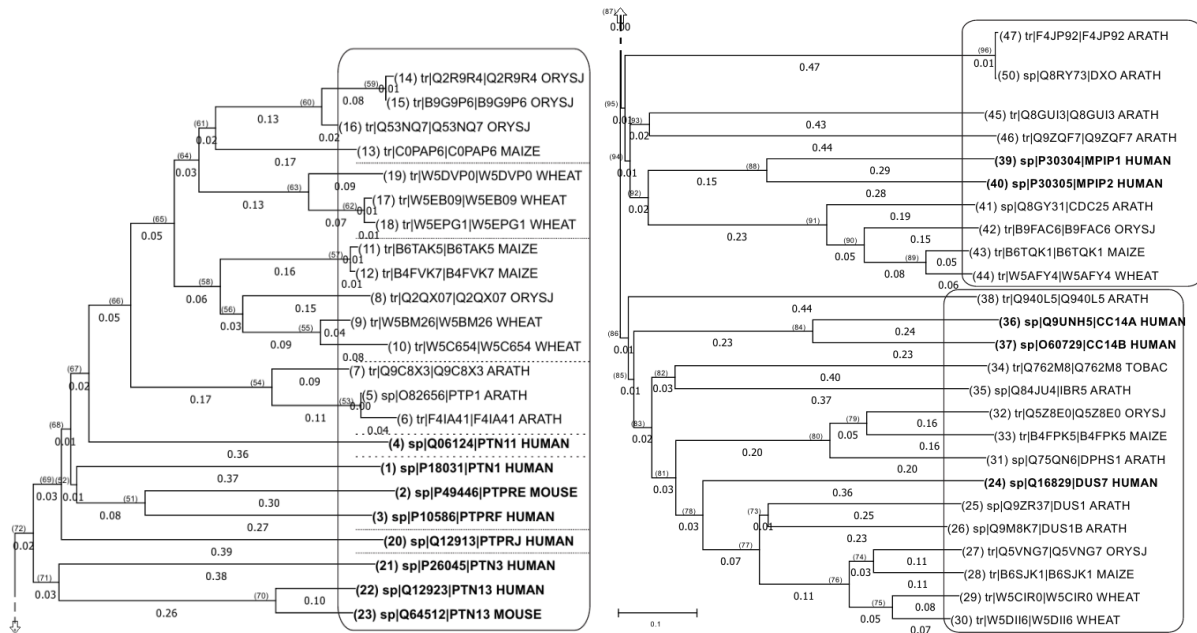


Рис. 3.3. Результати кладистичного аналізу групи тирозин-специфічних протеїнфосфатаз ссавців і потенційних рослинних гомологів, на дендрограмі жирним шрифтом відмічені маркерні PP ссавців (13), рамками – поділ на кледи, сірим шрифтом – рослинні гомологи (35)

У зв'язку з відсутністю інформації про безпосередній вплив на мікротрубочки і експериментально отриманих просторових структур PP6, PP7 і тирозин-специфічних PP, їх аналіз за допомогою методів класичної та структурної біоінформатики поки що є неможливим. Тому досі є актуальним аналіз та характеристика ферментів, що безпосередньо можуть впливати на мікротрубочки.

Частково вибірка, яка описана у розділі 3.1 і складається зі 175-ти протеїнфосфатаз арабідопсису (113 серин/треонін-специфічних, 36 тирозин-

специфічних і 26 аспартат-специфічних протеїнофосфатаз) [220] була використана для подальшої реконструкції просторової структури PP. Так, послідовності PP1 (P30366), PP2A (Q07099) і PP4/PPX (P48529), відібрані в результаті аналізу фосфатому *A. thaliana*, були використані для BLAST-пошуку нових рослинних гомологів представників трьох типів серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз, потенційно здатних дефосфорилувати  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -тубулін. Випадки багаторазового депонування амінокислотних послідовностей в UniProtKB були виявлені на підставі порівняння координат локусів генів відповідних білків, а аналіз консервативних доменів служив підтвердженням їхньої належності до протеїнофосфатаз.

В результаті було відібрано групу потенційних протеїнофосфатаз (всього 151 PP) дводольних: *A. thaliana*, *N. tabacum*, *M. sativa*, і однодольних: *O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum* (Таблиця 3.6, UniProtKB-номер PP з *A. thaliana* відзначено зірочкою (\*) та використано у якості профілю для пошуку гомологів). Результати пошуку підтвердили раніше зроблені висновки про відмінності фосфатомів різних родин *Magnoliophyta*. Так, наприклад, результати пошуку в базах даних за гомологією послідовностей і ключовими словами засвідчили відсутність у люцерни гомологів фосфатаз типу PP4.

Результати порівняння повних амінокислотних послідовностей потенційних серин/треонін-специфічних PP (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP7) дозволяють говорити про досить високі рівні ідентичності – в межах від 76-95%. Аналіз групи гомологів нерцепторних тирозинфосфатаз (RTPN1, RTPN3, RTPN11, RTPN13, RTPRJ) і дуальних PP (CDC25, DUSP7, DSP14) виявив набагато нижчий рівень ідентичності рослинних гомологів – в межах 27-44%, проти 10-35% при порівнянні тільки їх каталітичних доменів, високий рівень гепування і відсутність експериментальних доказів ферментної активності. Також слід зазначити, що у зв'язку з низьким рівнем подібності, відсутністю експериментально отриманих просторових структур та інформації з безпосереднього впливу на мікротрубочки подальший аналіз і реконструкція

PP6, PP7, RTPN1, RTPN3, RTPN11, RTPN13, RTPRJ, CDC25, DUSP7, DSP14 наразі неможливі.

Для подальшого аналізу описаних раніше амінокислотних послідовностей було відібрано 17-ть білків – по одному представнику кожного типу протеїнфосфатаз: 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*; W5EJL6, W5GEB7, W5FTD6 з *T. aestivum*. Множинне вирівнювання каталітичних доменів протеїнфосфатаз цієї групи дозволило виявити залишки, відповідальні за їхні основні функції (ідентичність – 30,5; схожість 54,9 при 0,9% гепів). Результати попередньої перевірки цілісності послідовностей із застосуванням інструмента SMART дозволили з'ясувати, що всі проаналізовані вибірки амінокислотних послідовностей рослинних гомологів вибірки мають доменну архітектуру, відповідну маркерним протеїнфосфатазам: PP1, PP2A і PP4. Амінокислотні залишки, які безпосередньо беруть участь у каталізі та формують активні сайти (H148) і відповідають за зв'язування металів (V108, D109, R110, N137, H186, H260), були визначені на підставі аналізу статей UniProtKB і консервативних мотивів, визначених з аналізу множинного вирівнювання (у таблиці 3.6 для прикладу наведено нумерацію сиквенсу PP1 з *A. thaliana* (P30366)).

Кладистичний аналіз групи потенційних рослинних PP, виконаний за допомогою методу зв'язування найближчих сусідів (NJ), виявив близькість гомологів кожного типу до маркерних ферментів. Гомологи PP утворюють загальні клади з PP1, PP2A і PP4 з *A. thaliana*, що підтверджує подібні функції цих білків (Рис. 3.4). Таким чином, в результаті проведеного відбору та класифікації унікальних протеїнфосфатаз було виділено групу з 151-го рослинного гомолога PP, яка складалася з представників серин/треонін-специфічних (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP7), класичних нерцепторних тирозинфосфатаз (RTPN1, RTPN3, RTPN11, RTPN13, RTPRJ) і дуальних протеїнфосфатаз (CDC25, DUSP7, DSP14).

Попри те, що протеїнофосфатази PTPRJ людини відносяться до рецепторних тирозинфосфатаз, рослинні гомологи цього типу при кластеризації не виділялися окремо від інших представників групи нерцепторних PP.

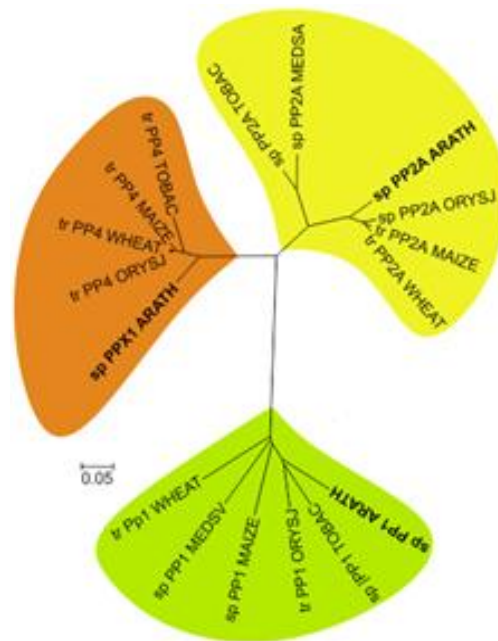


Рис. 3.4. Результати NJ-кластеризації каталітичних доменів потенційних рослинних гомологів та анованих PP з *A. thaliana* (виділено жирним), пов'язаних з регуляцією мікротрубочок

Незважаючи на визначення великої групи протеїнофосфатаз, потенційно здатних регулювати динаміку мікротрубочок, на даний момент неможливо реконструювати просторову структуру більшості з них. Тому подальший аналіз було зосереджено на предстаниках серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз типу 1, 2A і 4, для яких показані експериментальні докази зміни динаміки мікротрубочок і особливості просторової структури, та реконструйовано 17-ть гомологів цієї групи PP: P30366, Q07099, P48529 з *A. thaliana*; O0485, Q9XGH7, O04859 з *N. tabacum*; Q10NJ4, Q6EPR6, Q0DBD3 з *O. sativa*; P48488, Q06009 з *M. sativa*; P22198, B4FSV7, C4J0A6 з *Z. mays*; W5EJ16, W5GEB7, W5FTD6 з *T. aestivum*.

### Висновки до розділу 3

1. На підставі подібності до 150-ти протеїнофосфатаз, що складають фосфатом людини, було виконано біоінформаційне порівняння 680

потенційних гомологів з вищих рослин, що підтвердило існування 175 індивідуальних рослинних протеїнфосфатаз (113 серин/треонін-, 36 тирозин- і 26 аспаратат-специфічних PP) з *A. thaliana* і 29-ти потенційних протеїнфосфатаз з *P. patens*. Встановлено 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  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -тубуліни дводольних (*N. tabacum*, *M. sativa*) і однодольних (*O. sativa*, *Z. mays* і *T. aestivum*) рослин, а також відібрано 151-у протеїнфосфатазу, які потенційно можуть впливати на мікротрубочки вищих рослин.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Samofalova DA, Karpov PA, Raevsky AV, Blume YaB. Protein phosphatases associated with the microtubules regulation: spatial structure reconstruction and analysis. Cell Bio Int. [Preprint] 2017. Available from: doi: 10.1002/cbin.10810.

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

## РОЗДІЛ 4

### ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОСТОРОВОЇ СТРУКТУРИ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ, ПОТЕНЦІЙНО ЗДАТНИХ ДО РЕГУЛЯЦІЇ МІКРОТРУБОЧОК

#### 4.1. Відбір та перевірка якості просторових структур протеїнфосфатаз різного еволюційного походження

На першому етапі молекулярного моделювання протеїнфосфатаз у базі даних RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) було виконано пошук білків-матриць з метою їх подальшого використання для реконструкції просторової структури рослинних гомологів. Всього у базі даних RCSB PDB було знайдено 217 протеїнфосфатаз, зокрема, з них 116 матричних структур серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз і 101 структура класичних та дуальних тирозинфосфатаз (2 – *E. lambda*, 11 – *S. cerevisiae*, 1 – *D. melanogaster*, 12 – *M. musculus*, 6 – *R. norvegicus*, 1 – *Bos taurus* і 184 протеїнфосфатази з *H. sapiens*) (Додаток Б). Проведений аналіз якості існуючих матричних структур, на підставі таких показників, як ідентичність, подібність, наявність дефектів структури, роздільна якість експериментально отриманих структур, показники кутів  $\phi$  і  $\psi$  (за даними карт Рамачандрана), дозволив обрати найбільш якісні та оптимальні шаблони для профільного моделювання. Оскільки більшість структур протеїнфосфатаз отримано за допомогою методу кристалографії та мають тваринне походження, саме тваринні PDB-структури в основному були використані нами при реконструкції структури гомологічних РР рослин.

Для подальшого молекулярного моделювання та докінгу з мультимерних матричних структур протеїнфосфатаз було залишено всього один гомологічний протеїнфосфатазам рослин ланцюг та виконана підготовка молекули. Зокрема, було видалено всю воду, наведену у PDB-структурах, до всієї моделі додано атоми гідрогену, відбудовано бічні радикали амінокислот, проведено оптимізацію геометрії та визначення водневих зв'язків.



В результаті аналізу відібраних PDB-структур та їхньої підготовки для подальшої реконструкції рослинних гомологів були побудовані повні моделі протеїнфосфатаз на основі структур  $\gamma$ -субодиниці протеїнфосфатази PP1G (2O8G (2.50Å), PP1G\_RAT, UniProt: P63088) з *R. norvegicus*, каталітичної  $\beta$ -субодиниці протеїнфосфатази PP1B (PDB: 1S70 (2,7 Å), PP1B\_HUMAN, UniProt:P62140) та  $\gamma$ -субодиниці протеїнфосфатази PP1G (1U32 (2.00 Å), PP1G\_HUMAN, UniProt: P36873) з *H. sapiens* (Рис. 4.1).

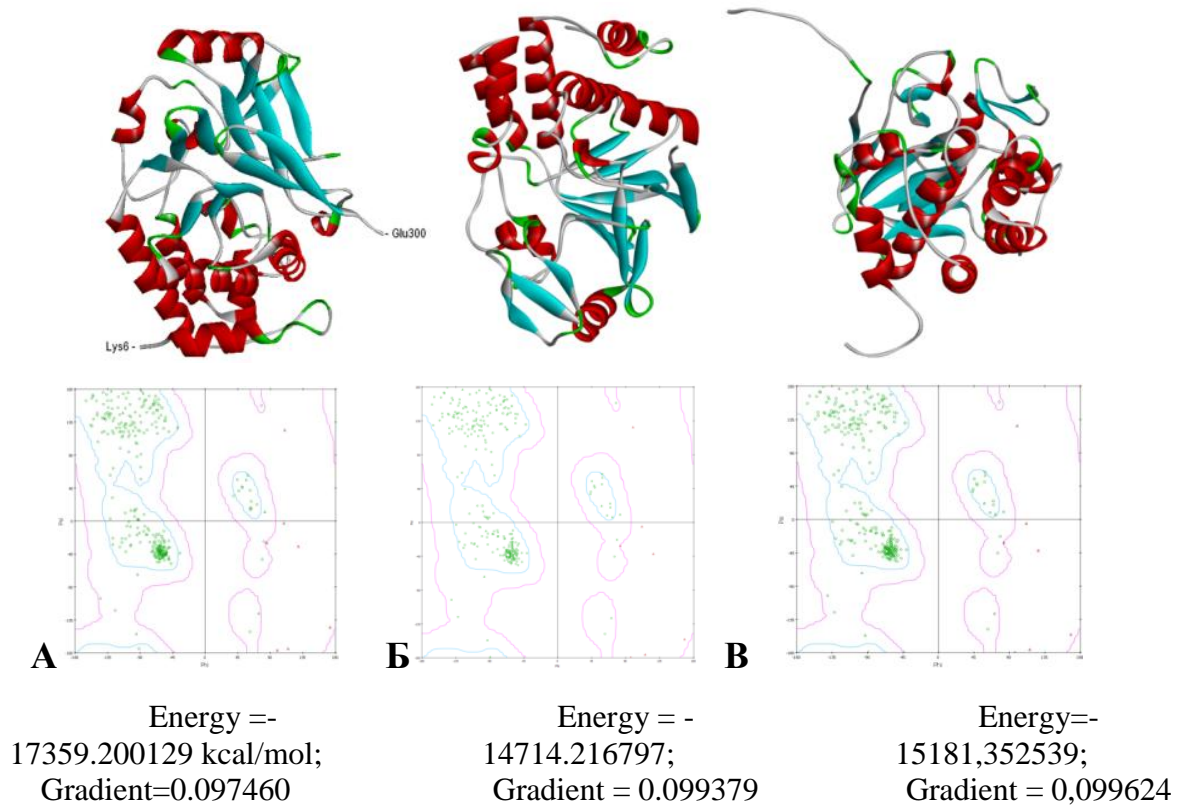


Рис. 4.1. Просторова структура каталітичних субодиниць протеїнфосфатаз типу PP1G (А - 2O8G (2.50Å) з *R. norvegicus*, Б - 1U32 (2.00 Å) з *H. sapiens*, В - 1S70 (2,7 Å) з *H. sapiens*) та результати перевірки їх якості із застосуванням карт Рамачандрана

Так само, як для протеїнфосфатаз типу 1, більшість PDB-структур серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типу 2А належать до *H. sapiens*. Нами були побудовані моделі на основі структур 2NYL (3.80 Å, 2AAA\_HUMAN, P30153), 2IE4 (2.60 Å, 2AAA\_HUMAN, P30153), 3P71 (2.70 Å,

PP2AA\_HUMAN, P67775), 2IE3 (2.80 Å, 2AAA\_HUMAN, P30153), 2NPP (3.30 Å, 2AAA\_HUMAN, P30153) з *H. sapiens* (Рис. 4.2).

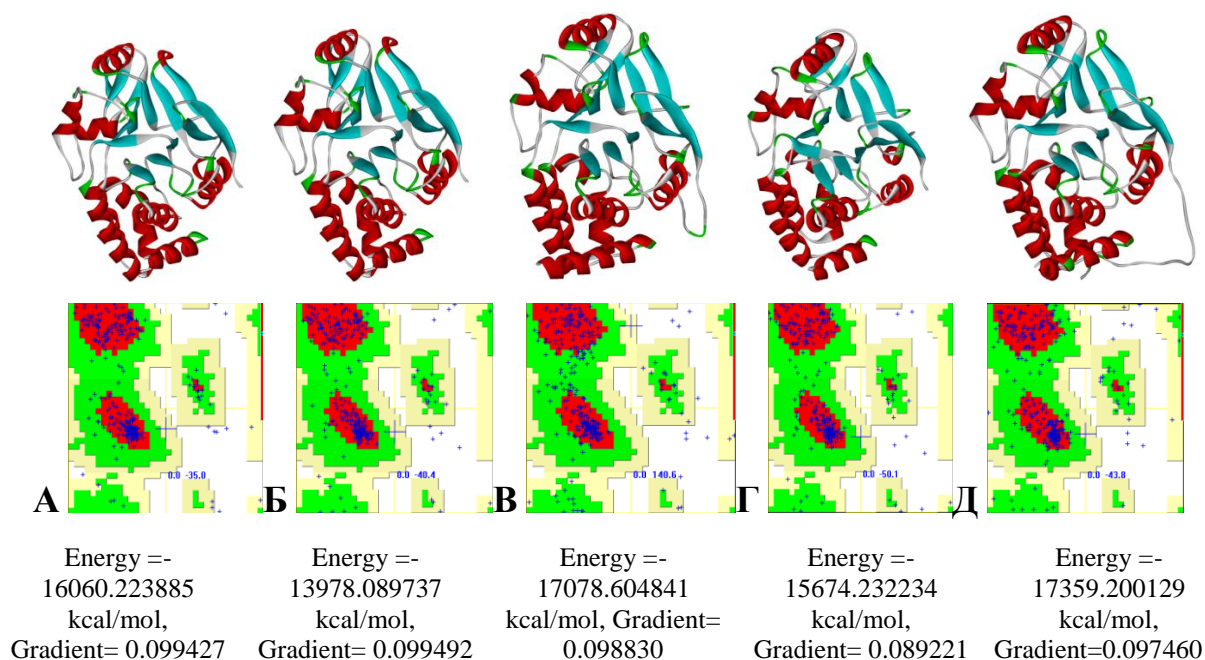


Рис. 4.2. Просторова структура каталітичних субодиниць протеїнфосфатаз типу PP2A (А - 2NYL (3.80 Å), Б - 2IE4 (2.60 Å), В - 3P71 (2.70 Å), Г - 2IE3 (2.80 Å)), Д - 2NPP (3.30 Å)) з *H. sapiens*) та результати перевірки їх якості із застосуванням карт Рамачандрана

Результати аналізу в програмі BIOVIA DS Visualizer підтвердили цілісність обраних шаблонних PDB-структур протеїнфосфатаз PP1 та PP2A, а також їх конформаційну достовірність (на основі аналізу кутів  $\phi$  і  $\psi$  із застосуванням конформаційних карт Рамачандрана). Результати оптимізації геометрії з використанням силового поля Amber3 і алгоритму Полака-Рібера (Polak-Ribiere) також представлені на Рис. 4.1 і 4.2 у вигляді кінцевих показників енергії. Таким чином, було виконано пошук матричних структур протеїнфосфатаз, проаналізовані їхні білкові партнери, амінокислотний склад сайтів зв'язування інгібіторів з протеїнфосфатазами і створена локальна база даних (Додаток Б), яка загалом налічує 63 експериментально підтвержені каталітичні субодиниці протеїнфосфатаз та збережена у повноатомних форматах для нормального прочитання програмами для молекулярного моделювання та докінгу.

#### 4.2. Реконструкція та верифікація просторової структури протеїнфосфатаз, потенційно залучених до регуляції мікротрубочок

В результаті пошуку та аналізу рослинних гомологів представників серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз, пов'язаних з регуляцією мікротрубочок (більш детально див. Розділ 3.4), для подальшої реконструкції просторових структур макромолекул було відібрано 17-ть білків – по одному представнику кожного типу протеїнфосфатаз 1, 2A і 4: 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*.

Відомо, що молекули серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типів 1, 2A і 4 рослин являють собою глобулярні водорозчинні білки [165]. Для подальшого аналізу за допомогою методу молекулярної динаміки і формування mdr-файлів (файлів з параметрами молекулярної динаміки програми Gromacs), для кожного білка була отримана первинна параметризація за допомогою інструмента ProtParam (Табл. 4.1) [81, 91]. Незважаючи на високий рівень гетерогенності первинної структури всередині групи рослинних протеїнфосфатаз, зіставлення фізико-хімічних властивостей протеїнфосфатаз PP1, 2 і 4 показало значну схожість основних показників на рівні всієї групи. Так, менш стабільною за розрахунками (instability index, PI) є PP2A, на відміну від менш вивченої протеїнфосфатази PP4 [70, 185, 188]. А значення ізоелектричних точок (PI) чітко вказують на те, що ці ферменти відносяться до кислих за своєю природою білків [91]. Дуже високий аліфатичний індекс (AI) свідчить про те, що PP даної групи, імовірно, стабільні в широкому діапазоні температур, тоді як дуже низький показник (Gravy) гідрофільності (негативні показники)/гідрофобності (позитивні показники) свідчить про те, що PP1, 2 і 4 добре взаємодіють з водою [70, 185].

Згідно з даними літератури, протеїнфосфатази PP1, 2A і 4 можуть існувати у вигляді як окремих каталітичних субодиниць, так і гетеродимерів,

що складаються з каталітичної і регуляторної субодиниці, або гетеротримерів, що складаються з каталітичної і двох різних регуляторних субодиниць [165, 188]. Для цих типів рослинних РР притаманний тип укладання  $\alpha + \beta$ , ідентичний до їхніх гомологів тваринного походження. Це підтверджується результатами аналізу за допомогою бази структурної класифікації білків SCOP і первинного аналізу структурної організації з використанням інструмента SOPMA (Табл. 4.2) [5, 165, 188].

Таблиця 4.1

**Параметри фізико-хімічних властивостей РР1, 2А і 4 рослинного походження визначені за допомогою статей UniProtKB та он-лайн інструмента ProtParam**

Назва організму	Тип РР/UniProtKB№		Довжина сиквенсу	Молекулярна вага	pI	РІ (%)	AI	Gravy
<i>A. thaliana</i>	PP11	P30366	318	36278.5	5.02	48.74	87.11	-0.233
	PP2A1	Q07099	306	34960.6	4.79	39.95	84.71	-0.30
	PPX1	P48529	305	34737.5	4.98	42.72	83.38	-0.210
<i>N. tabacum</i>	PP12	O04857	310	35434.5	4.91	39.05	89.03	-0.222
	PP2A	9XGH7	312	35639.2	5.08	38.75	77.15	-0.401
	PP4	O04859	302	34459.0	4.92	40.21	81.66	-0.304
<i>O. sativa</i>	PP1	Q10NJ4	322	36166.5	5.03	42.55	88.45	-0.147
	PP2A1	Q0DBD3	306	35113.7	4.84	36.67	81.86	-0.321
	PP4	Q6EPR6	307	34991.9	5.33	41.94	87.92	-0.189
<i>M. sativa</i>	PP1	P48488	321	36248.3	5.64	35.15	85.95	-0.311
	PP2A	Q06009	313	35711.4	5.13	33.76	79.07	-0.326
<i>Z. mays</i>	PP1	P22198	316	35763.0	5.27	42.40	87.34	-0.203
	PP2A	B4FSV7	306	35126.7	4.89	38.27	82.48	-0.335
	PP4	C4J0A6	307	34951.9	5.33	43.69	88.89	-0.175
<i>T. aestivum</i>	PP1	W5EJ16	317	35401.4	5.03	37.38	87.98	-0.140
	PP2A	W5GEB7	306	35099.7	5.03	39.01	81.86	-0.348
	PP4	W5FTD6	277	31563.9	5.39	43.08	87.22	-0.147

У зв'язку з тим, що для досліджуваних білків відсутні експериментально підтвержені моделі, перед реконструкцією РР був використаний метод передбачення вторинної структури SOPMA. За допомогою цього методу з вірогідністю до 73% можна встановити основні елементи первинної компактизації поліпептидного ланцюга білкової молекули:  $\alpha$ -спіралі,  $\beta$ -складки,  $\beta$ -поворот і ділянки з нерегулярною структурою [9, 48, 202]. В результаті цього аналізу виявлено, що N-кінцева ділянка аналізованих білків

варіабельна, тоді як С-кінцева досить консервативна. Всі рослинні РР схильні до формування ряду  $\alpha$ -спіралей різної протяжності, що з'єднуються ділянками з нерегуляторними структурами (Cc), більш короткими  $\beta$ -складками (Ee) у поєднанні з  $\beta$ -поворотами (Tt). Саме унікальна структура  $\alpha$ -петлевого домену характерна для всієї групи серин/треонін-специфічних РР [2].

Таблиця 4.2

**Передбачення утворення елементів вторинної структури,  
використовуючи метод SOPMA**

Назва організму	Тип РР/UniProtKB№	$\alpha$ -спіралі (Hh) (%)	$\beta$ -складки (Ee) (%)	$\beta$ -поворот (Tt) (%)	Неструктуровані ділянки (Cc) (%)
<i>A.thaliana</i>	P30366 PP1	46.86	15.09	12.58	25.47
	Q07099 PP2A1	37.91	17.32	8.17	36.60
	P48529 PPX1	39.02	18.69	11.48	30.82
<i>N.tabacum</i>	O04857 PP12	43.23	15.81	12.26	28.71
	9XGH7 PP2A	34.62	15.71	10.26	39.42
	O04859 PP4	36.09	18.54	8.61	36.75
<i>O.sativa</i> <i>subsp.</i> <i>japonica</i>	Q10NJ4 PP1	41.93	16.15	11.49	30.43
	Q0DBD3 PP2A1	40.85	18.30	8.82	32.03
	Q6EPR6 PP4	35.50	21.50	10.75	32.25
<i>M.sativa</i>	P48488 PP1	47.04	14.64	8.41	29.91
	Q06009 PP2A	38.98	16.29	9.58	35.14
<i>Z.mays</i>	P22198 PP1	45.89	13.92	13.29	26.90
	B4FSV7 PP2A	38.24	16.99	10.13	34.64
	C4J0A6 PP4	35.50	22.48	11.07	30.94
<i>T.aestivum</i>	W5EJI6 PP1	46.69	14.20	13.25	25.87
	W5GEB7 PP2A	39.22	16.67	9.48	34.64
	W5FTD6 PP4	29.96	24.91	11.91	33.21

Подальше моделювання 17-ти досліджуваних протеїнофосфатаз було виконано за допомогою серверу I-TASSER при стандартних налаштуваннях, але з виключенням матриць іншого типу і низької роздільної здатності [211]. Для даної групи були виявлені дуже високі показники схожості з PDB-матрицями протеїнофосфатаз людини. Так, ідентичність амінокислотного сиквенсу становила 85-95%, схожість 90-99%, а відсоток гепів при порівнянні каталітичних доменів рослинних гомологів та протеїнофосфатаз людини з експериментально отриманою просторовою структурою не перевищував 0,4%.

Якість білків PDB-матриць РР, використаних для реконструкції, варіювала. Так, у випадку з гомологами протеїнофосфатаз типу 1 ключовими

матрицями були PP1 людини (PDB: 1S70 (субодиниця – A), 4MOV (A), 1JK7 (A) – з якістю 1,9-2,7 Å), для PP2A (PDB: 2NPP (C), 4I5L (C), 3FGA (C) – при якості 2,4-3,3 Å). Більш складна ситуація була у випадку PP типу 4 у зв'язку з тим, що на даному етапі експериментально отримані структури протеїнофосфатаз цього типу були відсутні у базі даних PDB. У зв'язку з тим, що за гомологією сиквенсу PP4 найбільшу схожість мають до PP2A, було використано лист-обмеження по даному типу протеїнофосфатаз. У результаті цього для реконструкції ядра молекули протеїнофосфатази PP4 використані PP2A людини (2NPP, 4I5L, 3FGA), а інша частина побудована за допомогою PP2B, PP5 і PP2A (4IL1 (A), 4JA7 (A), 4I5L (C) з діапазоном якості від 2-3Å). У всіх випадках неструктуровані N- і C-кінцеві ділянки відібраних моделей протеїнофосфатаз рослин були видалені аж до кордонів каталітичних доменів, що було обгрунтовано відсутністю для вищезазначених фрагментів відповідних експериментально доведених шаблонних структур. Результати моделювання протеїнофосфатаз рослин ранжовані за показниками c-score і i-score, за якими було відібрано по одній моделі PP з 3-5 запропонованих сервером [211].

Оптимізацію геометрії реконструйованих моделей PP та їх стабільність оцінювали із застосуванням методу короткочасної молекулярної динаміки в інтервалі 5 нс в силовому полі CHARMM з явно заданим розчинником і доданими іонами Na та Cl в програмному пакеті GROMACS [61, 127, 128]. Протягом розрахунку динаміки молекул рослинних протеїнофосфатаз 1, 2A, і 4 були відсутні повідомлення про некоректні або неприпустимі значення конформаційних параметрів, що потенційно свідчить про високу якість і стабільність структур PP [232, 262]. Використовуючи перевірену раніше методологію, результати МД аналізували з урахуванням двох критеріїв: середньоквадратичного відхилення між C- $\alpha$ -атомами (конформаційні коливання, RMSD, Рис. 4.3) і конформаційної енергії білка (сумарна енергія Ван дер Ваальсових і кулонівських взаємодій, CE, Рис. 4.4) [221, 232].

Отримані дані свідчать про те, що амплітуда RMSD (Рис. 4.3) і рівень конформаційної енергії (Рис. 4.4) зменшуються у всіх 17-ти типів

досліджуваних протеїнфосфатаз. Сама стабілізація енергетичних і конформаційних коливань відбувалася у всіх випадках дуже швидко – протягом перших 2 нс, а дані про конформаційні коливання підтверджують відомості про необхідність більш тривалого періоду оптимізації геометрії для моделей протеїнфосфатаз з *A. thaliana*, отриманих нами раніше. Використовуючи метод тривалої молекулярної динаміки протягом 100 нс і термодинамічної інтеграції, нами було показано, що період оптимізації геометрії у протеїнфосфатаз типу PP1 може тривати до 4 нс, після чого рівень енергії білків виходить на нормальне енергетичне плато [221, 232].

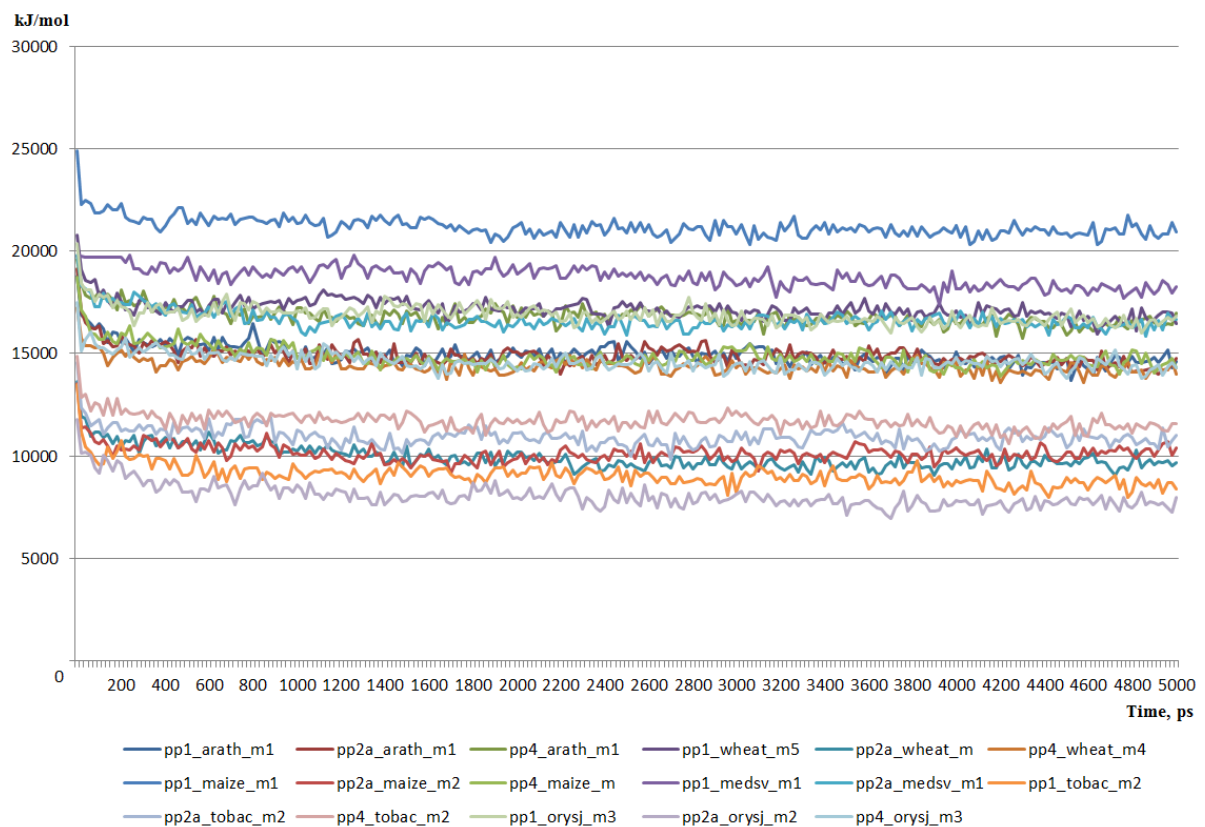


Рис. 4.3. Результати аналізу змін конформаційної енергії для рослинних протеїнфосфатаз

Аналізуючи результати молекулярної динаміки PP, для подальшого отримання усереднених моделей по обраній траєкторії було показано, що зміни конформаційних і енергетичних коливань для рослинних гомологів *N. tabacum*, *O. sativa*, *M. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum* більш виражені, ніж для PP з *A. thaliana*. Слід зазначити, що не дивлячись на конформаційні коливання протеїнфосфатаз

PP1 і PP4 з *A. thaliana* та PP1 з *O. sativa*, енергія білків швидко падає і стабілізується так само, як і у решти моделей, а рівень енергетичного плато для молекул протеїнфосфатаз рослин починався вже з 1 нс і мав в середньому величину 15000 кДж/моль енергії. Подальший аналіз тривимірної структури протеїнфосфатаз був виконаний для усереднених за нормальною енергією моделей (в середньому з 1720-ої по 4920-у пс) із застосуванням внутрішніх інструментів програми Gromacs.

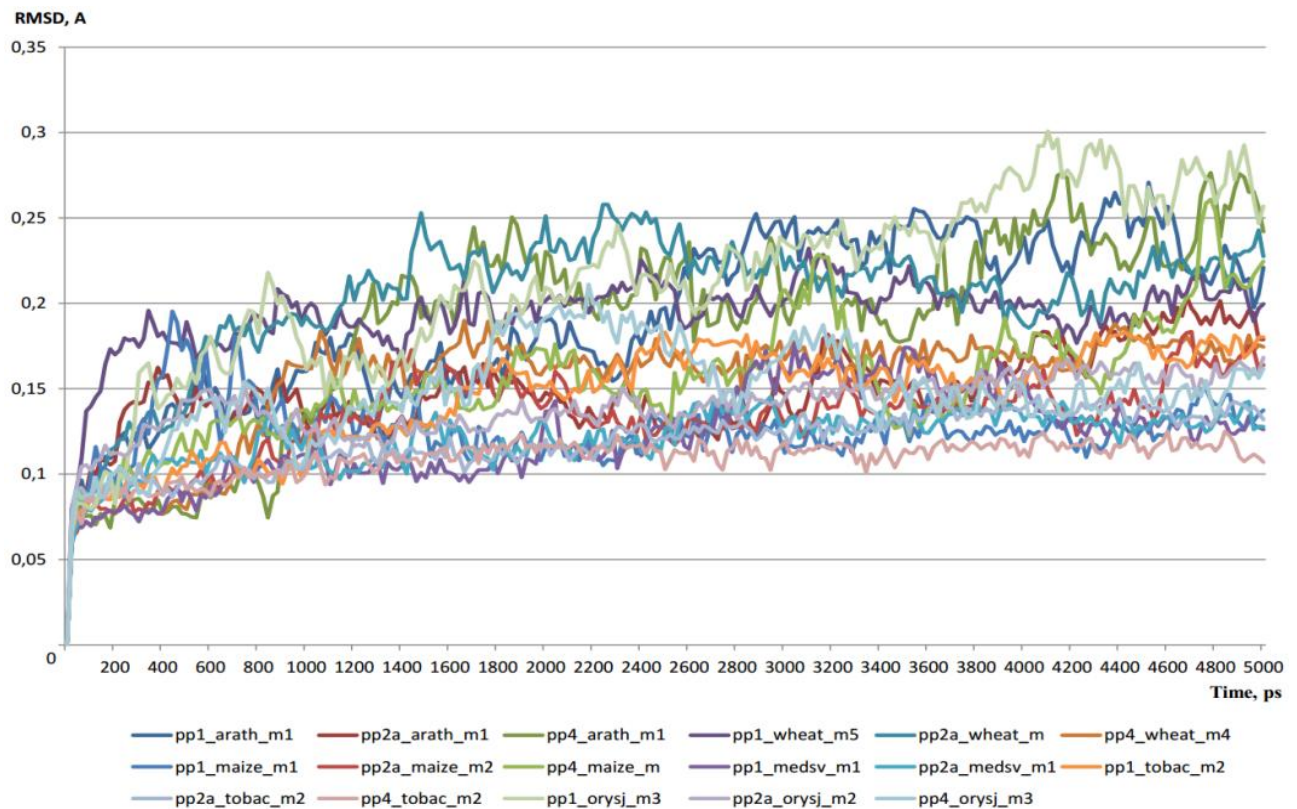


Рис. 4.4. Результати аналізу амплітуди конформаційних коливань для рослинних протеїнфосфатаз

Додаткова верифікація релаксації моделей ґрунтувалася на картах Рамачандрана та конформаційних картах двограних  $\psi$ - і  $\phi$ -кутів між амінокислотними залишками моделей протеїнфосфатаз рослин (Табл. 4.3). Результати проведеного аналізу для протеїнфосфатаз з *A. thaliana* і інших рослин показали, що в середньому 98,2 % амінокислотних залишків протеїнфосфатаз типу 1, 97,9 % залишків протеїнфосфатаз типу 2А і 97,5 % амінокислотних залишків протеїнфосфатаз типу 4 мають оптимальні значення



кутів внутрішнього обертання  $\phi$  і  $\psi$ , що свідчить про їх знаходження в діапазоні дозволених конформацій [179, 206, 262]. У випадку протеїнфосфатази PP1 в забороненій зоні конформаційних карт залишається від 2-х до 8-и залишків, які розташовуються в безпосередній близькості від кордону ділянок з напруженою конформацією, тоді як у разі протеїнфосфатаз 2A у заборонених зонах було показано від 4-х до 9-и амінокислотних залишків. Показники протеїнфосфатаз типу 4 варіювали в середньому від 4-х до 8-и амінокислотних залишків в діапазоні заборонених конформацій для всіх рослинних гомологів протеїнфосфатаз. Отримані дані свідчать про високу якість реконструйованих моделей просторової структури молекул протеїнфосфатаз з *A. thaliana*, *N. tabacum*, *M. sativa*, *O. sativa*, *Z. mays* та *T. aestivum*, а також про високий рівень схожості просторової укладки контрольних протеїнфосфатаз 1, 2A, 4 з *A. thaliana* і їхніх інших рослинних гомологів.

Таблиця 4.3

**Аналіз інформаційних карт двограних кутів між амінокислотними залишками протеїнфосфатаз**

Назва організму	Тип PP/UniProtKB №	Довжина сиквенсу домену	Амінокислотні залишки, включені в заборонену зону, їх кількість, склад та відсоток		
			№	склад	%
<i>A. thaliana</i>	P30366 PP11	271	7	Gly(93,148,188,212,104),Met206,Gly213	2,6
	Q07099 PP2A	272	9	Gly (81,230,212,244,214,125,165,205,70)	3,3
	P48529 PPX1	273	8	Gly (187,67,210,242,78,62,110), Asp82	2,9
<i>Z. mays</i>	P22198 PP1	272	8	Gly (196,77,212,171,88), Phe264, His245,	2,9
	B4FSV7 PP2A	272	5	Asp89	1,8
	C4J0A6 PP4	278	6	Gly (205, 70, 165, 249), Tyr262 Gly (214, 124, 86, 189, 164), Tyr103	2,1
<i>M. sativa</i>	P48488 PP1	272	7	Gly (77,212,88),Asp89,Ser295,His245,	2,5
	Q06009 PP2A	272	4	Val192 Gly (88, 27, 287, 197)	1,4
<i>O. sativa</i>	Q10NJ4 PP1	272	3	Gly (91, 102), Arg107	1,1
	Q0DBD3 PP2	272	6	Gly (165, 244, 205, 214, 81, 90)	2,2
	Q6EPR6 PP4	273	5	Gly (189, 69, 244, 80, 165)	1,8
<i>N. tabacum</i>	O04857 PP12	272	3	Gly (84, 203, 95)	1,1
	9XGH7 PP2A	272	7	Gly (87, 76, 218, 250, 220, 196), Gln245	2,6
	O04859 PP4	270	8	Gly (210, 186, 66, 240, 201, 77), Asn72, Asp53	2,9
<i>T. aestivum</i>	W5EJ16 PP1	272	2	Gly95, Asp68	0,7
	W5GEB7 PP2A	272	4	Gly (212, 166), Arg105, Asp85	1,4
	W5FTD6 PP4	260	8	Gly (49, 38, 93, 213, 174, 183, 133, 158)	3,1

Подальший аналіз було проведено на підставі порівняння з еталонними послідовностями протеїнофосфатаз з *A. thaliana*. За допомогою множинного вирівнювання в програмі ClustalX були виявлені положення консервативних і функціонально важливих амінокислотних залишків в первинній структурі білків. Розташування цих положень в глобулах молекул PP було знайдено і проаналізовано за допомогою програм PyMOL і BIOVIA DS Visualizer. Молекули маркерних протеїнофосфатаз з *A. thaliana* та інших рослинних гомологів розділили за типами 1, 2A і 4 з наступним вирівнюванням і суміщенням їх просторової структури (Рис. 4.5-4.7).

Оскільки каталітичні властивості і функція протеїнофосфатаз визначається не тільки їхнім фолдингом, але й амінокислотним складом функціонально важливих мотивів послідовності і консервативних функціонально важливих амінокислот, нами був виконаний аналіз положень, таких як область зв'язування АТФ, сайтів посадки іонів металів у активному центрі і зв'язування селективних інгібіторів цієї групи серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз: оадаїнової кислоти, мікроцистину, калікуліну, таутоміцину, нодуларину, мотупорину, кантаридину, кантаридинової кислоти і ендоталу, визначені з аналізу PDB-структур: 3H61-3H69, 1U32, 1JK7, 2IE4, 2BCD, 3E7B, 1IT6, 3EGH, 3E7A, 1FJM, 2NYM, 2NYL, 2NPP, 3DW8 (Рис. 4.5-4.7, Додаток А).

Суміщення просторових структур протеїнофосфатаз типу 1, 2A і 4 зображено на рисунках 4.5-4.7, нумерація амінокислот вказана для протеїнофосфатази PP1 з *A. thaliana* (маркеру). З результатів аналізу топології структур досліджуваних білків випливає, що просторове положення всіх функціонально важливих мотивів у рослинних гомологах повністю збігається з просторовим положенням аналогічних областей в протеїнофосфатазах з *A. thaliana*, а просторова топологія амінокислотних залишків повністю підтверджує дані, отримані при вирівнюванні амінокислотних послідовностей даних протеїнофосфатаз (більш детально див. Розділ 3.4, Додаток А).

На прикладі протеїнофосфатаз PP1, PP2A і PP4 з *A. thaliana* проведено аналіз консервативних залишків, відповідальних за зв'язування іонів металів і

АТФ. На рис. 4.5-4.7 показано, що відмінності у глобулах протеїнфосфатаз рослин присутні тільки в топології амінокислот, які входять до петльових доменів релаксованих моделей.

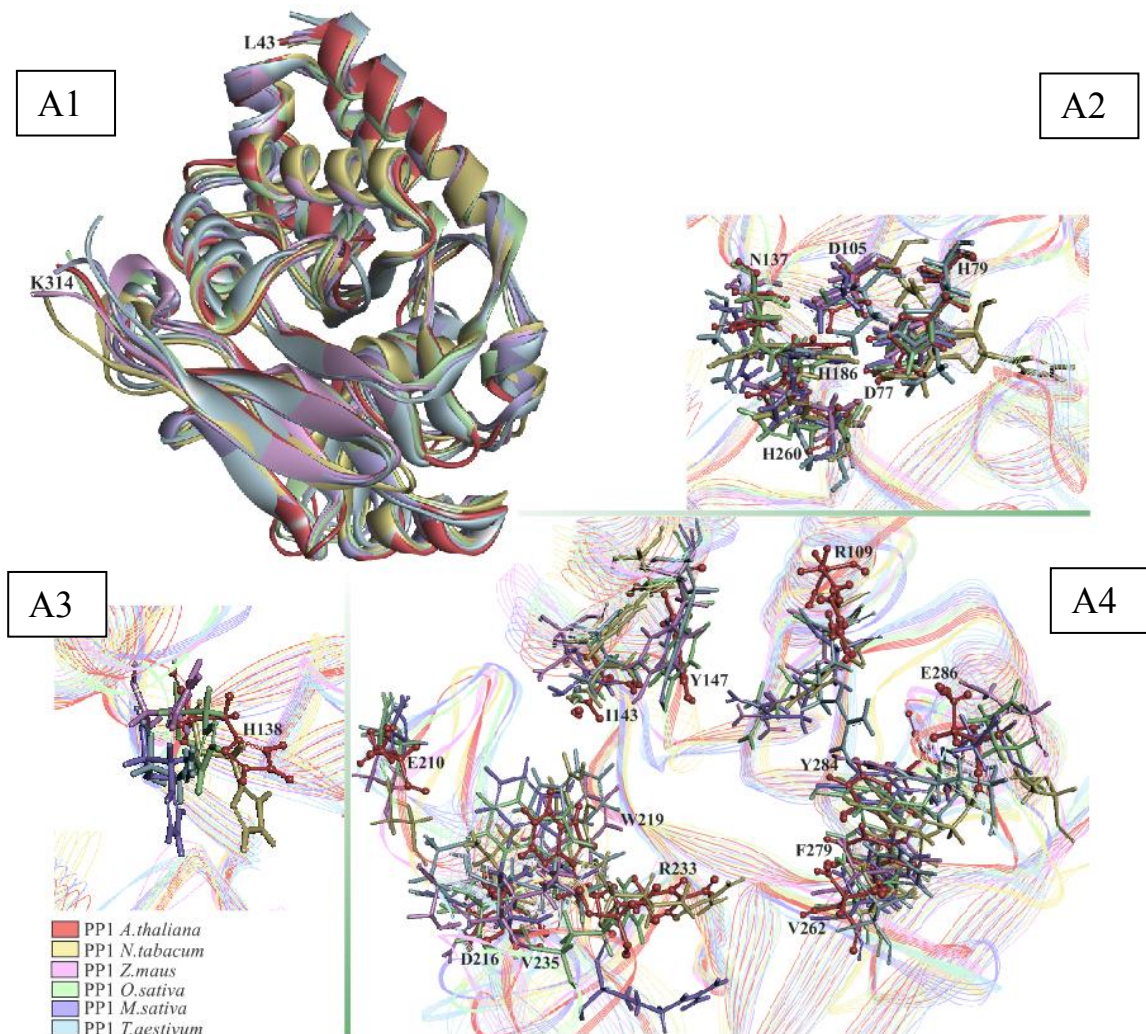


Рис. 4.5. Результати накладання просторової структури фосфатних доменів каталітичних субодиниць протеїнфосфатази типу 1 з *A. thaliana* (UniProtKB: P30366; SMART: SM00156) і структур відповідних рослинних гомологів з *N. tabacum*, *M. sativa*, *O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum*

Примітка: A1 – результати структурного вирівнювання каталітичних доменів PP1 маркеру та інших гомологів, кольори яких позначені в легенді; скелетні структури консервативних амінокислот, відповідальних за зв'язування металів і АТФ, зображені на частині рисунку A2 і A3 відповідно, функціонально важливі амінокислоти, які відповідають за зв'язування селективних інгібіторів, представлені на частині рисунку A4

Зокрема, гістидин, який формує активний сайт ферментів, відповідальний за зв'язування АТФ, потрапляє в короткий петлевий домен у рослинних гомологів PP1 і відрізняється у своєму конформаційному положенні від

маркерної PP1 з *A. thaliana* (Рис. 4.5-А3) та інших типів ферментів (Рис. 4.6-Б3, 4.7-В3). Це корелює з даними про консервативне розташування амінокислот, що формують сайт зв'язування АТФ у різних типів РР, і підтверджує структурну унікальність кишені та дозволяє розглядати АТФ-зв'язуючий сайт як потенційно гарну мішень терапевтичного впливу [95, 126].

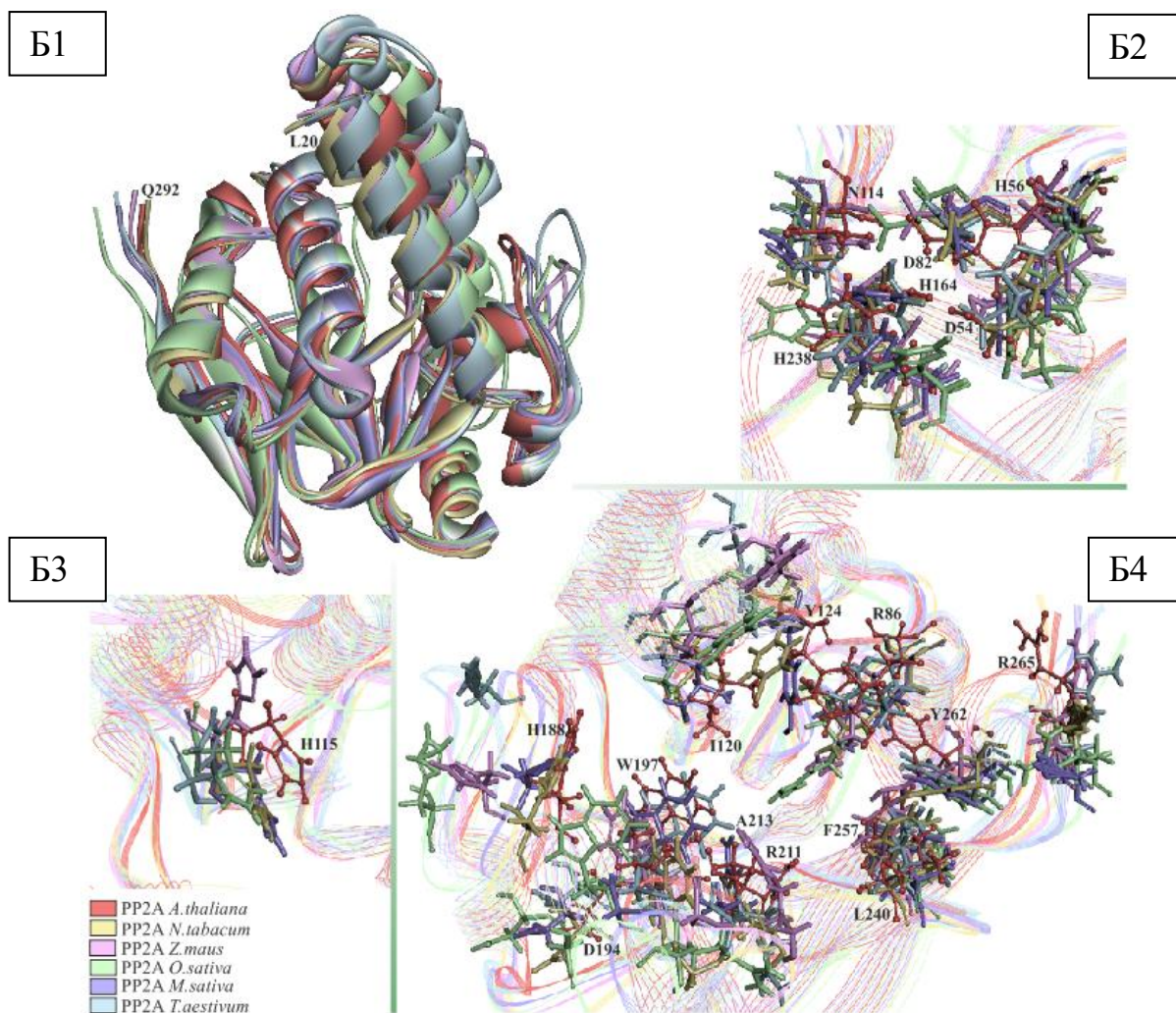


Рис. 4.6. Результати накладання просторової структури фосфатних доменів каталітичних субодиниць протеїнфосфатаз типу 2А з *A. thaliana* (UniProtKB: Q07099; SMART: SM00156) і структур відповідних рослинних гомологів з *N. tabacum*, *M. sativa*, *O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum*

Примітка: Б1 - результати структурного вирівнювання каталітичних доменів РР2А маркеру і гомологів, кольори яких позначені в легенді; також на малюнку представлені скелетні структури амінокислот, що позначають консервативні залишки, відповідальні за зв'язування металів (Б2) і АТФ (Б3), а також функціонально важливі амінокислоти, відповідальні за зв'язування селективних інгібіторів, представлені на частині Б4

Результати аналізу функціонально важливих положень амінокислот, відповідальних за зв'язування селективних інгібіторів на прикладі серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз з *A. thaliana*, виявили поодинокі амінокислотні заміни у гомологів типу 1 і 4 типу з кукурудзи, тютюну та пшениці (ізолейцин на валін у PP1 з *Z. mays*, фенілаланіну замість триптофану у PP4 з *N. tabacum* (Рис. 4.5) і серину замість аргініну у PP4 з *T. aestivum* (Рис. 4.7)).

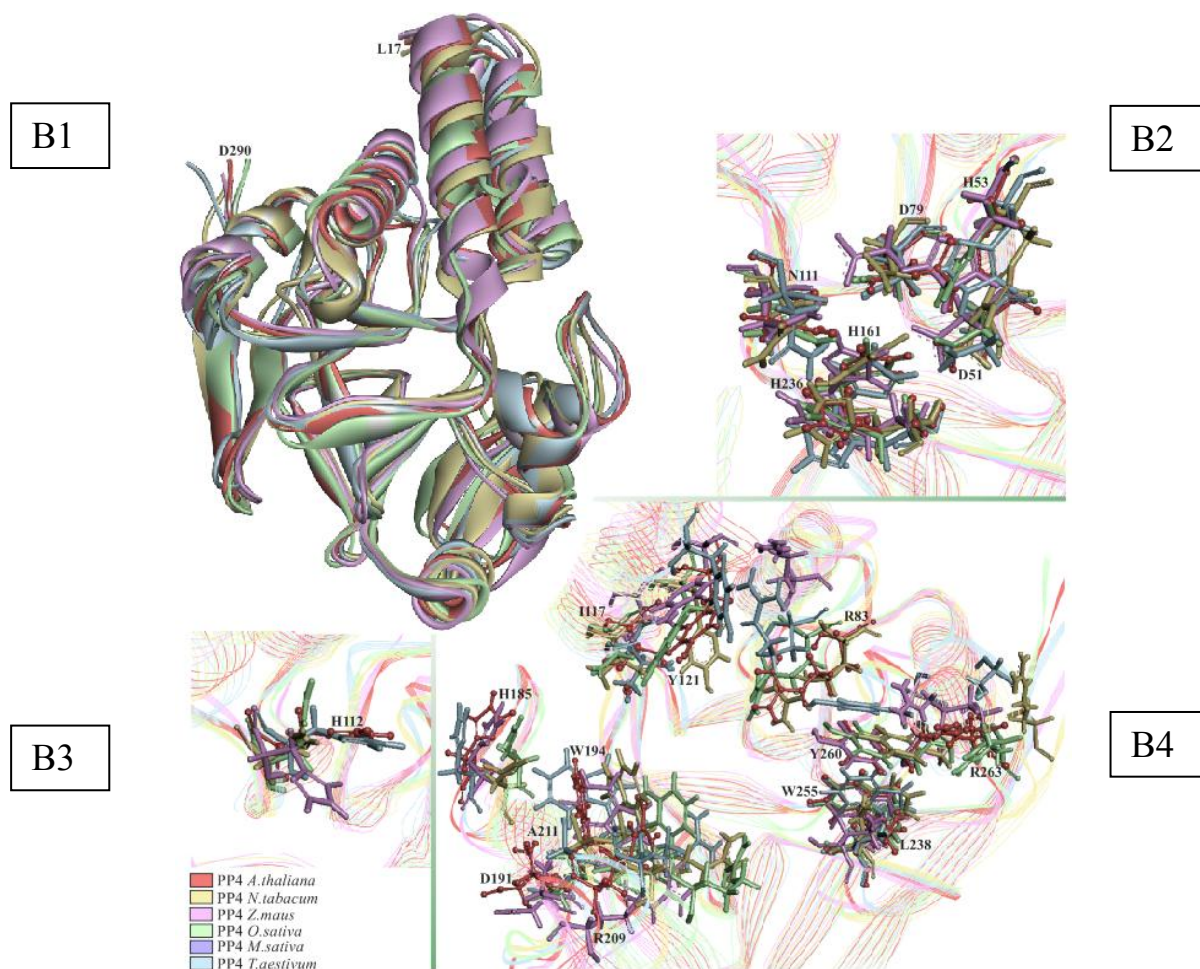


Рис. 4.7. Результати накладання просторової структури фосфатних доменів каталітичних субодиниць протеїнфосфатаз типу 4 з *A. thaliana* (UniProtKB: P48529; SMART: SM00156) і структур відповідних рослинних гомологів з *N. tabacum*, *M. sativa*, *O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum*

Примітка: B1 – результати структурного вирівнювання каталітичних доменів PP4 маркеру і гомологів, кольори яких позначені в легенді; також на рисунку представлені скелетні структури амінокислот, відповідальних за зв'язування металів (B2) і АТФ (B3), а також функціонально важливі амінокислоти, відповідальні за зв'язування селективних інгібіторів (B4)

Отже, проведений аналіз амінокислотних послідовностей, фізико-хімічних властивостей білків, потенційного укладання вторинної структури, реконструкції просторових структур PP1, PP2A, PP4 та уточнення по їх 3-D структурі молекул за допомогою методів SORMA, профільного моделювання, молекулярної динаміки та статистичного аналізу переконливо свідчать про спільності топології даних типів ферментів у тварин і вищих рослин. Надалі саме аналіз PP за допомогою інгібіторів різного ступеня специфічності дасть додаткові критерії для оцінки самих ферментів і дозволить залишити в минулому застосування комплексних препаратів, які тотально впливають на цитоскелет.

#### Висновки до розділу 4

1. Створено локальну базу даних, що включає 60 експериментально встановлених PDB-структур тваринних протеїнофосфатаз, за допомогою якої здійснено профільну реконструкцію 17-ти представників серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз типів 1, 2A і 4 з *A. thaliana*, *N. tabacum*, *O. sativa* subsp. *japonica*, *M. sativa*, *Z. mays* та *T. aestivum*.

2. Результати аналізу амінокислотних послідовностей, фізико-хімічних властивостей, просторових структур та молекулярної динаміки протеїнофосфатаз 1, 2A, 4 переконливо засвідчили подібність їхньої топології у тварин і вищих рослин.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Samofalova DA, Karpov PA, Raevsky AV, Blume Ya.B. Protein phosphatases associated with the microtubules regulation: spatial structure reconstruction and analysis. *Cell Bio Int.* [Preprint] 2017. Available from: doi: 10.1002/cbin.10810.

3. Samofalova DA, Karpov PA, Nyporko AU, Blume YB. Reconstruction of the spatial structure of plant phosphatases types 1 and 2A in complexes with okadaic acid. *Cytol Genet.* 2011;45(3):153–162.

## РОЗДІЛ 5

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ АСПЕКТИ УТВОРЕННЯ КОМПЛЕКСІВ СЕЛЕКТИВНИХ ІНГІБІТОРІВ З ПРОТЕЇНФОСФАТАЗАМИ

#### **5.1. Відбір, аналіз та реконструкція просторової структури відомих селективних інгібіторів протеїнфосфатаз**

Попри велику кількість існуючих інгібіторів протеїнфосфатаз, вивчення структурно-біологічних механізмів їхньої взаємодії з мішенями залишається актуальним [219, 220]. Значний прогрес в напрямку дослідження специфічних інгібіторів PP може бути досягнутий шляхом поєднання методів традиційного дизайну хімічних сполук з методами молекулярного моделювання, структурної біо- і хемоінформатики [129, 130]. Тому завданням цього етапу нашої роботи було провести ревізію відомих інгібіторів протеїнфосфатаз, які можуть бути залучені до регуляції мікротрубочок, та визначити особливості їхньої взаємодії з відповідними ферментами.

За результатами проведеного пошуку в базах даних Google Patents, PubChem, ZINC, eMolecules і ChEMBL було відібрано 231 депоновану біологічно-активну речовину з селективною дією по відношенню до серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз та 5700 речовин, специфічних до тирозинфосфатаз. Зведену групу потенційних інгібіторів було перевірено згідно з правилами конструювання лікарських засобів (drug design rules), а також на наявність певних фрагментів – характерних фармакофорів. Застосовуючи метод пошуку за гомологією (2Д-фінгерпринти, алгоритм Танімото і Тверські з порогом подібності до 85%) до отриманого набору сполук з баз даних, нами було розроблено бібліотеку низькомолекулярних сполук з прогнозованою активністю до відповідних цільових протеїнфосфатаз (1105 речовин, Додаток В), але для подальшого пошуку було відібрано тільки унікальні активні речовини ( $IC_{50} < 1000nM$ ).

## 5.2. Вибір за гомологією та аналіз механізмів взаємодії інгібіторів з тваринними протеїнофосфатазами на підставі експериментально встановлених комплексів

Результати пошуку, наведені у розділі 5.1, дозволили сформувати кінцеву вибірку, яка складалась з 11-ти низькомолекулярних речовин, які мали не тільки біохімічне підтвердження активності, але й встановлений механізм ліганд-білкової взаємодії. За допомогою PDB-BLAST пошуку були виявлені 23 структури серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз з даними інгібіторами (Табл. 5.1). Відповідні ліганди були перевірені на кількість донорів і акцепторів водневих зв'язків, кількість зв'язків, які вільно обертаються, і площу полярної поверхні з використанням on-line сервісу ZINCPharmer та LigandScout. Таким чином, на сьогодні існують експериментальні докази взаємодії протеїнофосфатаз PP1 і PP2A з оокадаїновою кислотою і мікроцистином-LR, PP1 з мікроцистином-LA, калікуліном А, нодуларинами і таутоміцином, PP2A з динофізистоксинами, а також PP5 з кантаридином і ендоталом.

Таблиця 5.1

### Аналіз параметрів зв'язування інгібіторів з відповідними серин/треонін- та тирозин-специфічними протеїнофосфатазами, для яких експериментально доведено утворення комплексів

Інгібітор	PDB		Тип PP	UniProtKB	Кількість молекул води, які беруть участь у взаємодії ліганду з білком	Наявність донорів/акцепторів у структурі інгібітора	Амінокисл. склад сайтів зв'язування лігандів з PP
СЕРИН/ТРЕОНІН-СПЕЦИФІЧНІ ПРОТЕЇНОФОСФАТАЗИ							
1. Кантаридин	3H61	NHC	PPP5	P53041	5	1/8	3
2. Кантаридинова кислота	3H68, 3H63, 3H67, 3H62	NHC	PPP5	P53041	5	1/8	2
3. Ендотал	3H69, 3H64	ENL	PPP5	P53041	5	2/5	1
4. Оокадаїнова кислота	2IE4	OKA	PP2AA	P36873	1	1/5	5
	1U32, 1JK7		PP1G	P62136	1		4
5. Мікроцистин-LR	2NYM, 2NYL, 2NPP	000212	PP2AA	P67775	-	1/6	11
	1FJM, 3DW8		PP1A	P62139			10
6. Дигідромікроцистин	2BDX	000215	PP1G	P36873			12
7. Калікулін А	1IT6	CYU	PP1G	P36873	5	1/6	4
8. Нодуларин-R	3EGH, 3E7A	000214	PP1A	P62136	18	1/6	9
9. Мотупорин	2BCD	000213	PP1G	P36873	4	1/6	5
10. Таутоміцин	3E7B	E7B	PP1A	P62136	15	2/6	6
11. Динофізистоксин 1, 2	3K7V, 3K7W	XT1-2	PP2AA	P67775	1	1/5	5



Встановлено, що більшість інгібіторів мали одну область можливого зв'язування донорів водневих зв'язків, окрім 2-х речовин, які мали декілька таких областей: ендотал – селективний інгібітор протеїнфосфатази PP5, таутоміцин – інгібітор протеїнфосфатази PP1. Дослідження механізмів зв'язування 11-ти відібраних інгібіторів з відповідними типами протеїнфосфатаз дозволило встановити консервативні амінокислотні залишки, які безпосередньо відповідають за зв'язування лігандів на поверхні білків (за допомогою сервісу PoseView) (Табл. 5.1, Рис. 5.1, Додаток Г). Оцінку повноти амінокислотних послідовностей експериментально отриманих РР для правильної нумерації функціональних залишків визначали за допомогою методу парного вирівнювання з оригінальними сиквенсами бази даних UniprotKB (Табл. 5.1) в програмному пакеті ClustalX 2.0 (більш детально див. Додаток Г). Таким чином, були встановлені амінокислотні залишки, відповідальні за зв'язування функціональних груп лігандів. Варіабельні амінокислотні залишки сайтів, що відповідають за підтримку ліганду на поверхні ферментів, було встановлено на підставі аналізу результатів короточасної молекулярної динаміки комплексів, використовуючи силові поля MM+ і CHARMM в 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 марганцем ( $Mn^{2+}$ ), тоді як ендотал також зв'язується з двома молекулами цинку ( $Zn^{2+}$ ), які знаходяться в активному центрі PP5.

Також, завдяки структурному аналізу в on-line сервісі CCDC Relibase, було встановлено, що для взаємодії майже всіх досліджуваних інгібіторів з цільовими протеїнфосфатазами необхідно від 1-ї до 12-ти молекул води (Табл. 5.1), що було використано у подальшому етапі молекулярного докінгу. Виключенням були мікроцистин-LR, дигідромікроцистин і фенілетиленсульфонат, зв'язування яких з білками-мішенями відбувається завдяки ковалентній взаємодії (Табл. 5.1). А за результатами аналізу топології

досліджених лігандів з використанням програми BIOVIA DS Visualizer було створено локальну базу даних, що містить готові для молекулярного докінгу структури інгібіторів (MM+ і CHARMM (Gromacs)), їх детальний опис, файли топології, отримані за допомогою серверу PRODRAG, та посилання на відповідні статті бази даних PubChem.

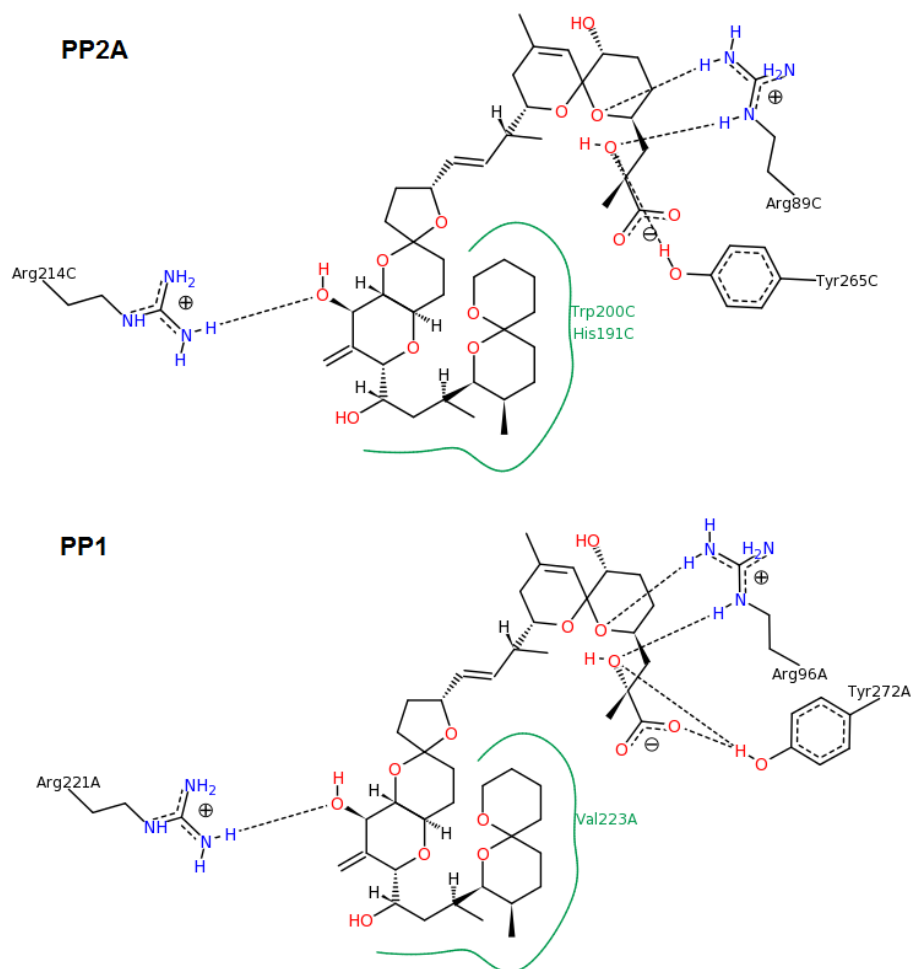


Рис. 5.1. Приклад результатів PDB-пошуку амінокислотних залишків, які беруть участь у зв'язуванні інгібітора на поверхні цільової протеїнфосфатази, за допомогою сервісу PoseView. Зображено схему взаємодії окадаїнової кислоти з протеїнфосфатазами типу PP2AA та PP1G (PDB: 2IE4, 1U32, 1JK7)

Примітка: Показано, що в зв'язуванні ліганду на поверхні молекул PP беруть участь – 5 амінокислот (Arg89, Arg214, His191, Trp200, Tyr265) у випадку PP2AA та 4 амінокислоти (Arg96, Arg221, Val223, Tyr272) для PP1 відповідно. Додатково встановлені 10 амінокислотних залишків, які беруть участь у стабілізації інгібітора у сайті зв'язування та формують його оточення

В результаті даного етапу роботи проведена ревізія відомих інгібіторів протеїнфосфатаз, для яких експериментально встановлена просторова

структура комплексів, що належать до різних типів і потенційно здатні впливати на структуру і динаміку мікротрубочок. Було встановлено амінокислотні залишки, які беруть участь у взаємодії інгібіторів з серин/треонін-специфічними протеїнфосфатазами типу 1, 2A і 5 та тирозинфосфатазами типу PTP1B і уорН. Показано, що ліганд-білкова взаємодія у сайтах зв'язування в більшості випадків відбувається за участі іонів металів та молекул води. Так, у зв'язуванні кантаридинових інгібіторів беруть участь від 1 (Asn303) до 3 (Arg400, His304, Arg275) амінокислот і молекул води, хоча кантаридин і ендотал мають 1-2 донори і до 8-ми акцепторів. Окадаїнова кислота та динофізистоксин типу 1 і 2 зв'язуються з 4-ма амінокислотами (Arg96, Arg221, Val223, Tyr272) на поверхні PP1 і з 5-ма амінокислотними залишками (Arg89, Arg214, His191, Trp200, Tyr265) на поверхні протеїнфосфатаз 2A. В утворенні комплексу бере участь 1 молекула води, один донор і 5 акцепторів. Інгібітори класу мікроцистинів (LR і LA), присутні в комплексах з протеїнфосфатазами 1 і 2A, зв'язуються з ними ковалентно, тобто без участі молекул води, мають шість акцепторів і по одному донору воднів, в зв'язуванні інгібіторів на поверхні PP беруть участь від 10 (Glu243, Cys269, Tyr265, Arg96, Tyr 127, Ile123, Pro190, Val183, Gly215, Asn117) до 12 амінокислотних залишків (Arg89, Tyr127, Ile 123, Val189, His191, Asn117, His118, His191, Gly215, Leu243, Cys269, Arg268). Калікулін зв'язується з 4-ма амінокислотами (Arg96, Ser129, Arg221, Tyr272) в присутності 5-ти молекул води, тоді як для таутоміцину показана наявність 15-ти молекул води у сайті зв'язування і 6 ключових амінокислот (Arg96, Trp206, Arg221, Val223, Val250, Tyr272). Для циклічних інгібіторів нодуларину і мотупорину, які утворюють комплекси з PP1, мають по 1 донору і 8 акцепторів, показане різне оточення. Так, у зв'язуванні нодуларину беруть участь 18 молекул води і 9 амінокислот (Arg96, His125, Ile130, Ser129, Val195, Asn124, Arg221, Tyr272, Cys273), тоді як мотупорин потребує 4-ри молекули води і 5 амінокислот (Arg96, Tyr134, Ile130, Asn125, Tyr270). Більш детально див. додаток Г і таблицю 5.1. Також на підставі пошуку з використанням дескрипторів і аналізу можливих

фармакофорів було створено бібліотеку моделей структур інгібіторів протеїнфосфатаз, що пройшли етап оптимізації геометрії методом короткочасної молекулярної динаміки і підготовлені для подальшого молекулярного докінгу.

### **5.3. Ідентифікація можливих рослинних мішеней відомих інгібіторів серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз за допомогою методів профільного аналізу**

Не зважаючи на те, що досліджена нами група селективних інгібіторів протеїнфосфатаз є перспективними препаратами для лікування багатьох захворювань, а також важливим інструментом дослідження функціональної ролі окремих протеїнфосфатаз в сигнальних каскадах клітини [69, 242, 261, 273], відмінності у фосфатомах обумовили цілком логічне питання відносно селективності інгібіторів тваринних РР під час їх використання на рослинних об'єктах. Для цього на основі результатів аналізу фосфатому людини було проведено профільний аналіз фосфатомів *A. thaliana* і *P. patens* (Розділ 3).

Відправною точкою цього етапу дослідження була інформація, встановлена у попередньому розділі про склад сайтів зв'язування інгібіторів з протеїнфосфатазами (Табл. 5.1). За результатами оцінки консервативності амінокислотного складу їхніх сайтів зв'язування було показано, що ключовими амінокислотами для комплексів протеїнфосфатаз типу 1 з оокадаїновою кислотою, мікроцистином-LR і -LA, калікуліном А, таутоміцином, нодуларином і мотупорином є R96, Y221, Y272, V223, N224, H225; для РР2А з оокадаїновою кислотою, мікроцистином-LR і динофізистоксином типу 1 і 2 – R89, Y272, R214, A216, N217, H218. Тоді як для комплексів РР типу 5 з кантаридином і ендоталом – R275, Y451, R400, V402, N303, H304 (нумерація приведена відповідно до типу PDB-структур РР) (Рис. 5.2).

На наступному етапі, беручи за основу детальний аналіз просторової структури комплексів РР-інгібітор, було складено профілі амінокислот, що

відповідають за зв'язування інгібіторів з відповідними протеїнфосфатазами типів 1, 2A і 5 людини (Рис. 5.3).

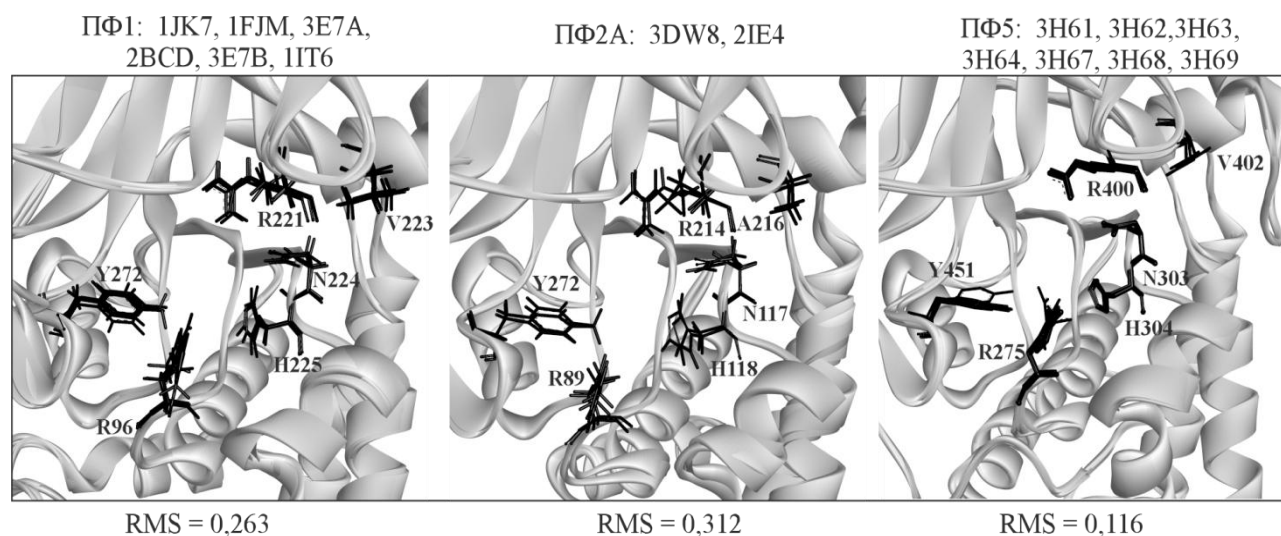


Рис. 5.2. Просторове вирівнювання досліджуваних PDB-структур протеїнфосфатаз типів 1, 2A і 5 людини з визначенням консервативного амінокислотного складу сайтів зв'язування інгібіторів

Примітка: скелетними структурами відмічено консервативні амінокислоти, що приймають участь у зв'язуванні лігандів на поверхні PP, RMS – середньоквадратичне відхилення між атомами структур протеїнфосфатаз, яке було визначено шляхом накладання їхніх просторових структур

Універсальним символом IUPAC-X позначено пропуски між консервативними мотивами. Підкреслені амінокислотні залишки визначені за допомогою інструмента PoseView, а всі інші були визначені в програмі LeadIT 2.1.4. Саме на підставі порівняння структурної топології амінокислотних залишків, відповідальних за зв'язування та утримання лігандів в сайтах зв'язування на поверхні молекул протеїнфосфатаз, було проведено множинне вирівнювання простих профілів амінокислотного складу сайтів зв'язування інгібіторів з протеїнфосфатазами та проаналізовано їх кластеризацію з унікальними профілями.

Обраний профільний метод [56, 201] спочатку було перевірено з використанням зведеної гетерогенної групи протеїнфосфатаз рослин (див. Розділ 3.1) [2, 221]. Використавши профіль сайту зв'язування оокадаїнової кислоти з PP1 і 2A тваринного походження (Табл. 5.1, Рис. 5.3), було виконано тестове профільне множинне вирівнювання, яке дозволило встановити



специфічних (1, 2, 3 класу) і 26 аспартат-специфічних протеїнфосфатаз з *A. thaliana* і 29 потенційних PP усіх трьох груп у *P. patens* (див. Розділ 3.3) [220]. Етапи даного дослідження включали тестовий алгоритм, відпрацьований на профілі зв'язування ооадаїнової кислоти з протеїнфосфатазами 1 і 2А. Було проведено спільне множинне вирівнювання профілів сайтів зв'язування ооадаїнової кислоти, мікроцистину, калікуліну, таутоміцину, нодуларину, мотупорину, кантаридинової кислоти і ендоталу з каталітичними доменами 204 PP, аналіз консервативності функціонально важливих ділянок, профільне вирівнювання отриманих фрагментів і подальша кластеризація з використанням алгоритму зв'язування найближчих сусідів. З метою мінімізації можливих помилок під час вирівнювання PP рослин було згруповано за їхньою субстратною подібністю. В результаті даного етапу роботи було відібрано групи протеїнфосфатаз рослин, які є найбільш вірогідними мішенями для кожного з досліджених інгібіторів (Рис. 5.4). Це припущення було зроблено на підставі об'єднання гомологів PP у спільні клади з контрольними профілями структур PP1, PP2A і PP5 з *H. sapiens* (Рис. 5.3, 5.4).

Так, було встановлено, що зі значною долею імовірності ооадаїнова кислота, мікроцистин-LR, калікулін і таутоміцин можуть діяти на протеїнфосфатази типів 5 (PPP5\_Q84XU2) і 6 (FYPP3\_Q9LHE7) з *A. thaliana* та на потенційні протеїнфосфатази (A9TXC9, A9TE32) з *P. patens*. Крім того, група PP з *A. thaliana* (A8MQN4, B3H7B7, Q9C8M6, Q00IB6, Q8LL04, Q8VYE2, Q94KO1) і *P. patens* (A9U2J5, A9TTN5, A9T1Q3, A9S5I0, A9SPK4, A9TXM9) була визначена як потенційно здатна до взаємодії з цими інгібіторами. Результати аналізу здатності протеїнфосфатаз зв'язувати нодуларин та мотупорин показали, як консервативні інгібітори серин/треонін-специфічних PP типу 1 в рослинних клітинах потенційно можуть інгібувати протеїнфосфатази типів 2А, 4, 5 та фітохром-асоційовані протеїнфосфатази типу 6. Також результати кластеризації сайтів зв'язування селективних інгібіторів протеїнфосфатаз типу 5 – кантаридину та ендоталу з рослинними гомологами даного типу PP (PP5) і контрольними PP з *H. sapiens*, свідчать про

те, що майже всі рослинні серин/треонін-специфічні РР є імовірними мішенями цих сполук. Припускаємо, що кантаридин і його похідні, імовірно, неспецифічні інгібітори більшості серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз.

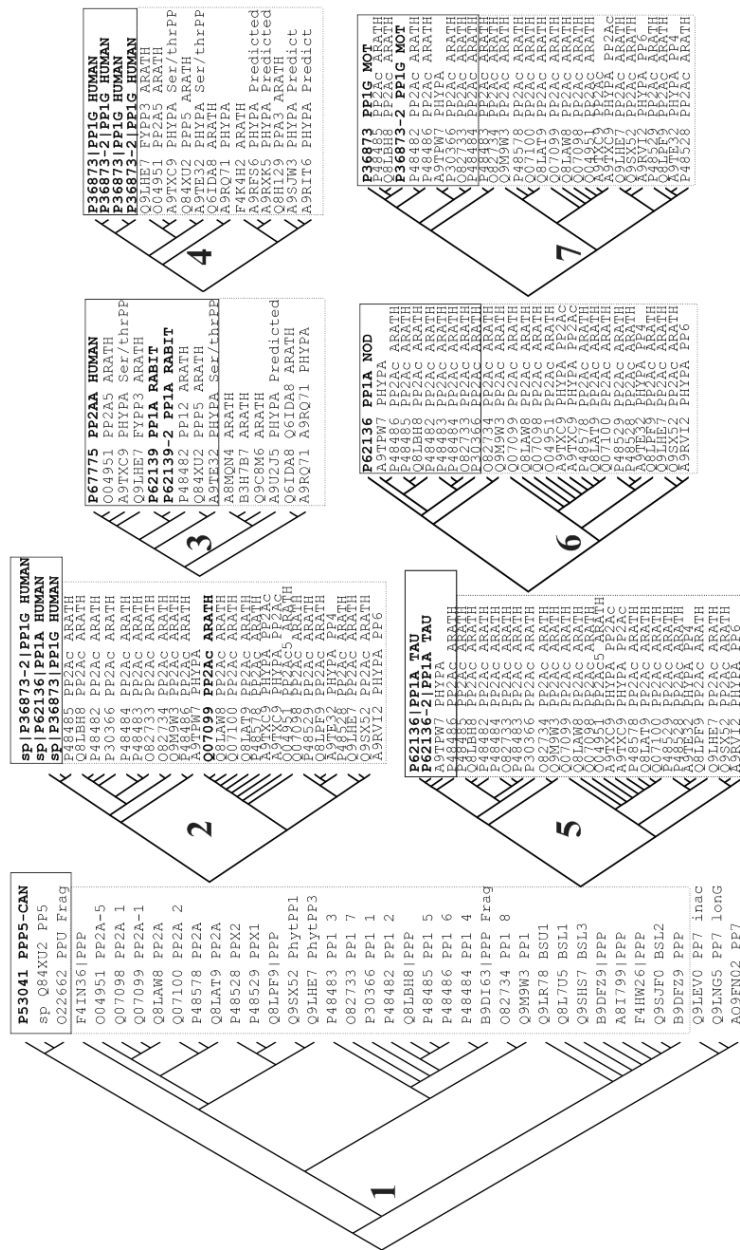


Рис. 5.4. Результати кладистичного аналізу сайтів зв'язування інгібіторів з протеїнфосфатазами *H. sapiens*, *A. thaliana* та *P. patens*: 1 – група профілів кантаридинових інгібіторів, 2 – окадаїнової кислоти, 3 – мікроцистину, 4 – калікуліну, 5 – таутоміцину, 6 – нодуларину, 7 – мотупорину

Таким чином, різна селективність всіх досліджених інгібіторів робить їх важливими інструментами дослідження функціональної ролі окремих протеїнфосфатаз у клітинах тварин і рослин. Варто зазначити, що винятком є



група рослинних протеїнофосфатаз типу 7 (3 ізоформи: Q9LEV0, Q9LNG5, Q9FN02), яка не має сайтів зв'язування з жодним з досліджених інгібіторів, що корелює з даними літератури відносно стійкості PP7 до ооадаїнової кислоти та її похідних [148].

Для перевірки отриманих результатів було здійснено докінг ооадаїнової кислоти на молекулу протеїнофосфатази PP5 (UniProt: Q84XU2) з *A. thaliana*. При цьому у якості контролю зі стійкістю до серин/треонін РР було використано протеїнофосфатазу типу 7 (UniProt: Q9FN02), яка за даними літератури [148] та результатами проведеного кладистичного аналізу [293-297], не зв'язує ооадаїнову кислоту та її похідні. Для реконструкції просторової структури PP5 був визначений найближчий гомолог PP5 людини (P53041) з експериментально встановленою просторовою структурою (PDB: 3H63). Оскільки показники подібності первинної структури мали середні значення – 50% ідентичності при 68% подібності повних послідовностей – для реконструкції 3-D структури рослинного гомолога було обрано лише найбільш консервативну ділянку: з 244 по 520 амінокислотний залишок, яка становить каталітичний домен (SMART: SM000156, 62,8% і 78,7% відповідно, при одночасній відсутності гепів). Для протеїнофосфатаз типу 7 були відсутні гомологи з вирішеною експериментально 3-D структурою, тому для реконструкції моделі з *A. thaliana* було використано декілька матричних структур.

Реконструкція структури обох каталітичних доменів РР була виконана за допомогою мережевого інструмента I-Tasser при використанні стандартних параметрів із застосуванням методу множинного суміщення шаблонних структур. Так, для реконструкції рослинної РР типу 5 були використані такі PDB-структури: PP5 (1WAO, ланцюг – 4), PP5 (1S95\_A), PP1 (1S70\_A), PP2A (3P71\_C), PP2A (2IAE\_C), PP1 (1U32\_A) з *H. sapiens* і PP5 (3ICF\_A) з *S. cerevisiae*, а для РР7 матрицями слугували: PP5 (1WAO, ланцюг – А), PP2A (3P71\_C), PP2B (1AUI\_A), PP2B (4IL1\_A), PP2A (2IAE\_C), PP1 (1U32\_A) людини. Оскільки матричні та реконструйовані структури характеризувалися

високою ідентичністю сиквенсів, сервером було побудовано лише по одній моделі протеїнфосфатаз рослин. Показник якості (C-score) PP5 і PP7 коливався від 0.70 до 1.19, а  $RMSD=2.2\pm 1.7\text{\AA}$ . Підтвердження структури моделей було отримано за результатами аналізу баз даних структурної класифікації SCOP і CATH та он-лайн інструмента SOPMA, а оптимізацію і верифікацію моделей PP5 і 7 виконали шляхом короткочасної молекулярної динаміки в газовій фазі із застосуванням пакета Gromacs.

Гнучкий докінг PP5 і PP7 з оадаїновою кислотою було виконано за допомогою пакета CCDC GOLD за умови центрування по NE2- (HIS125) і радіусі докінгового простору = 20 Å. Під час докінгу була задана повна рухливість ліганду, але за умов ригідності амінокислотних залишків білка. Кращі позиції лігандів були обрані на підставі показників GoldScore, ChemScore і ASP. Значення цих функцій свідчать про спорідненість ліганду до досліджуваного сайту на поверхні білку (більше значення – краще), а також про енергетичну вигідність конформаційного стану (менше значення – краще). Так, було встановлено показники якості молекулярного докінгу за програмою CCDC GOLD для оадаїнової кислоти з PP5, які становили: GoldScore: -268.14 кДж/моль, ChemScore: -296.00 кДж/моль, ASP Score: -257.18 кДж/моль; а також для комплексу PP7 з оадаїновою кислотою - 124.64, 133.48 – GoldScore і ChemScore та 106,93 кДж/моль - ASP Score відповідно, які свідчать про більш імовірну взаємодію оадаїнової кислоти з протеїнфосфатазами типу 5 ніж PP7. Тож високий відсоток ідентичності амінокислотних послідовностей, схожість фолдингу протеїнфосфатаз різного еволюційного походження та оціночні функції докінгу дозволяють зробити висновок про ідентичність топології сайтів зв'язування оадаїнової кислоти з молекулами протеїнфосфатаз типу 5. На користь цього також безпосередньо свідчить великий розмір ліганду і, відповідно, велика поверхня сайту взаємодії оадаїнової кислоти з PP5 рослин.

Отже, аналізуючи результати даного етапу, було підтвержено існування альтернативних мішеней для оадаїнової кислоти, мікроцистинів, калікуліну і таутоміцину, нодуларинів, кантаридину і ендоталу.

### 5.4. Гнучкий докінг відомих селективних інгібіторів серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз у потенційні сайти їх зв'язування

Реалізація етапів наведених у розділах 4 і 5.1-5.3 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 протеїнфосфатаз. 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. 5.5). 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 дослідженні ліганд-білкових інтерфейсів PDB-структур протеїнфосфатаз PP1 і PP2A з представників різних царств.

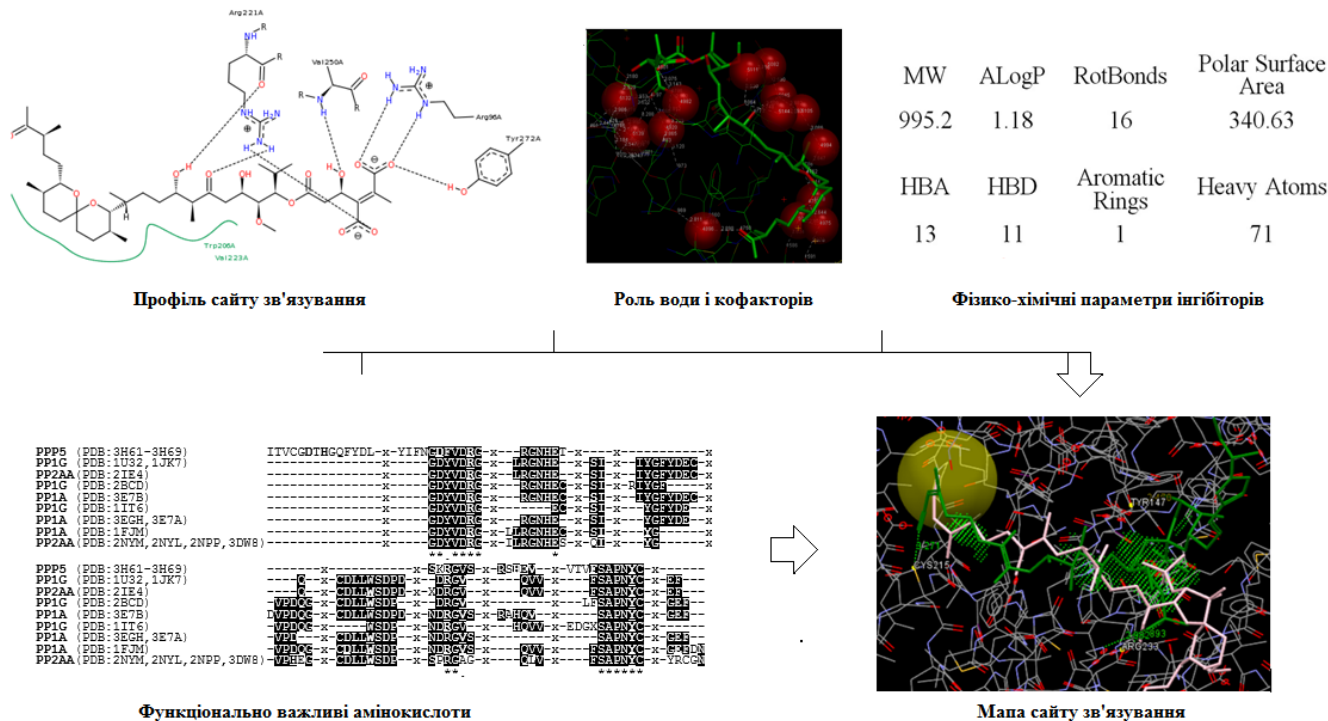


Рис. 5.5. Алгоритм реконструкції структури комплексів відомих селективних інгібіторів з серин/треонін-специфічними протеїнфосфатазами типу 1, 2A та 4 з *A. thaliana*

### 5.4.1. Реконструкція структури комплексів окадаїнової кислоти з протеїнфосфатазами типу 1, 2A, 4 з *A. thaliana*

Попри велику кількість селективних інгібіторів протеїнфосфатаз типів 1 і 2A, саме окадаїнова кислота (Рис.5.6; повна хімічна назва інгібіторів наведена у додатку Ж) являє собою першочерговий об'єкт для дослідження структурно-біологічних механізмів інгібування протеїнфосфатаз, оскільки в даний час експериментально встановлено сайт її зв'язування з протеїнфосфатазами 1 ( $IC_{50}=20-5000nM$ ) і 2A ( $IC_{50}= 0.07-304nM$ ) тваринного походження [98, 172, 193, 273, 274]. У той же час, не дивлячись на значний прогрес в розумінні механізмів функціонування протеїнфосфатаз у рослин [143, 165], особливості взаємодії рослинних гомологів протеїнфосфатаз тварин з окадаїновою кислотою (з урахуванням можливих відмінностей просторової структури) залишаються невивченими. Тому метою цього етапу дослідження було вивчення структурних механізмів специфічної взаємодії окадаїнової кислоти з протеїнфосфатазами рослин і порівняльний аналіз сайтів її зв'язування на поверхні молекул протеїнфосфатаз різного еволюційного походження.

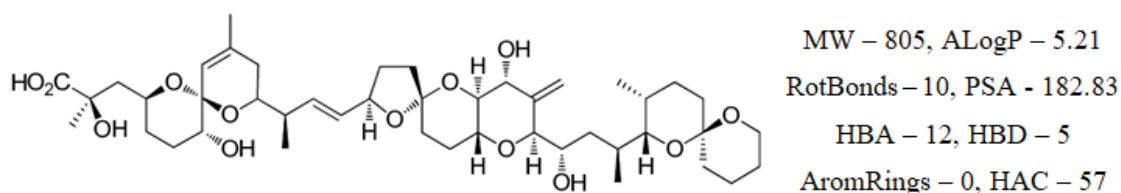
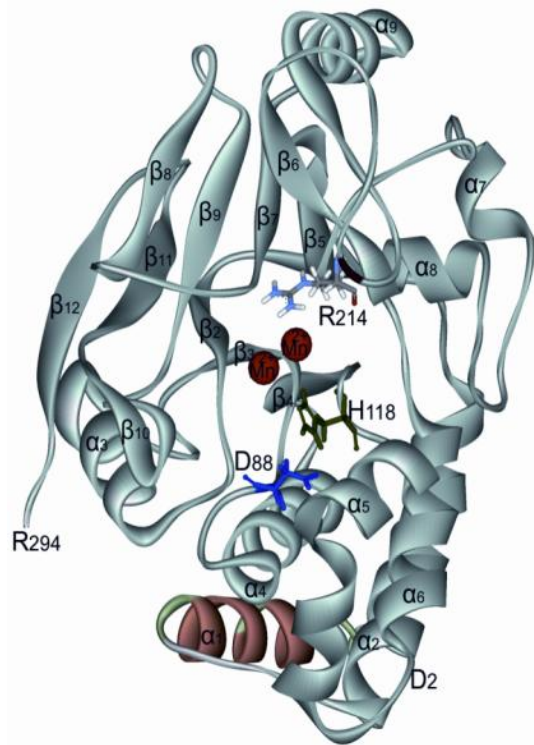


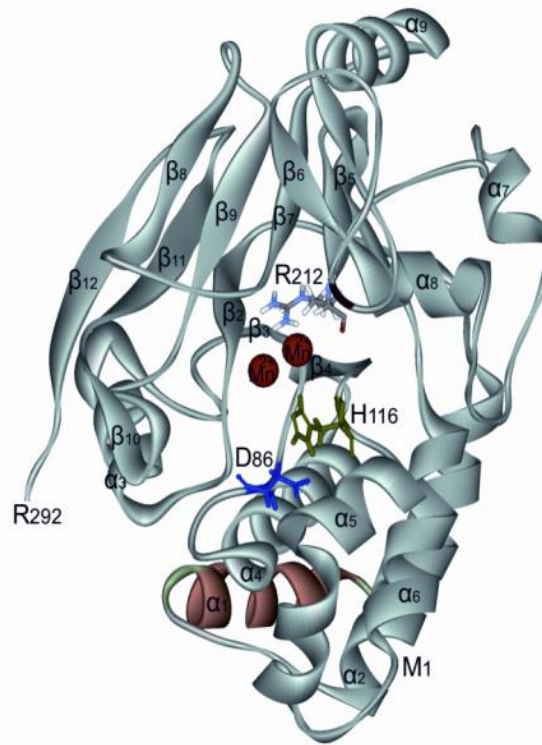
Рис. 5.6. Структурна формула окадаїнової кислоти та розрахунок її фізико-хімічних параметрів за допомогою програми Instant JChem [83]

Подальша реконструкція комплексів рослинних протеїнфосфатаз з окадаїновою кислотою була виконана шляхом профільного моделювання, з використанням експериментально отриманих структур матричних комплексів окадаїнової кислоти і протеїнфосфатаз типу 1 і 2A з *H. sapiens* (PDB: 2IE4 (PP2AA); 1U32, 1JK7 (PP1G)). Високий відсоток ідентичності амінокислотних послідовностей (Рис. 5.7-5.8) і схожість укладання протеїнфосфатаз тваринного і рослинного походження (Рис. 5.9-5.10) дозволяють зробити висновок про

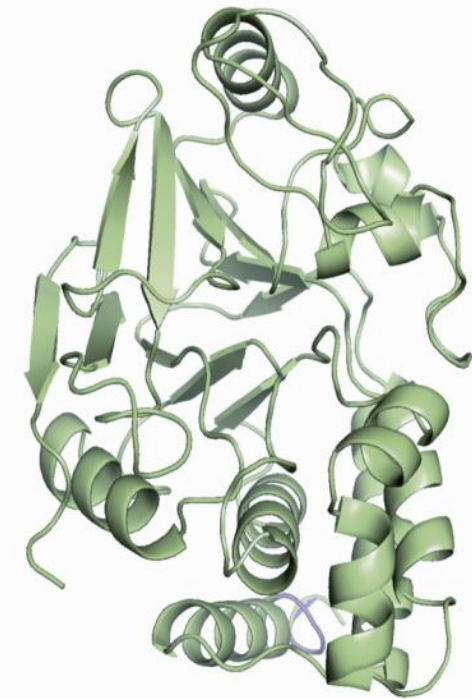




PP2AA *H. sapiens*



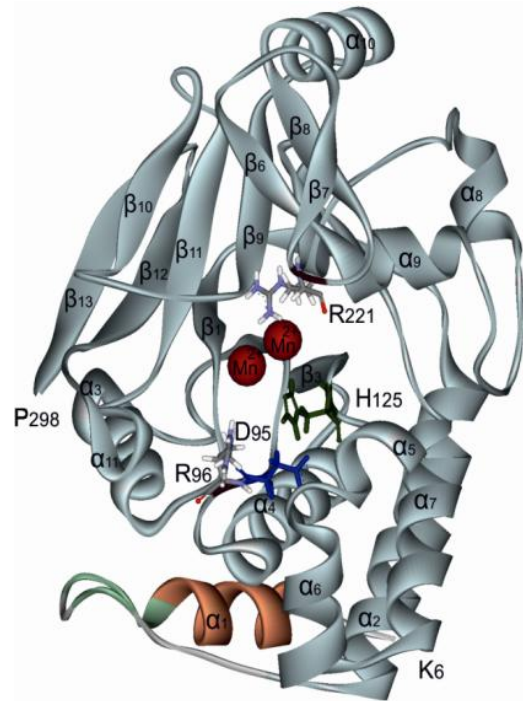
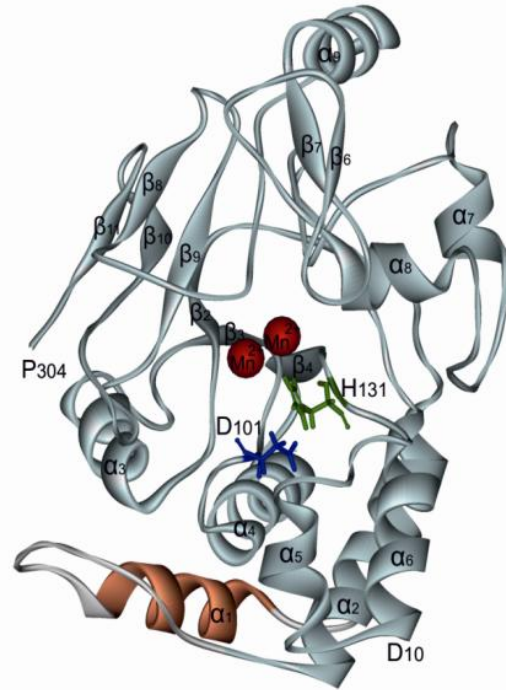
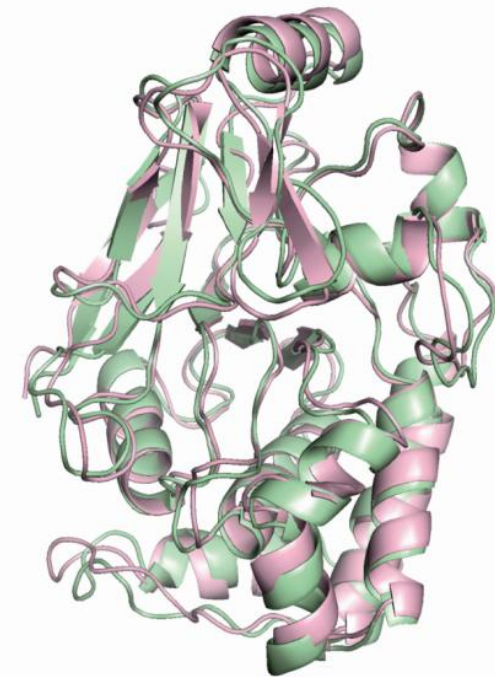
PP2AA *A. thaliana*



Результати молекулярного фітингу

Рис. 5.9. Стрічкові діаграми просторової структури і результати фітингу каталітичних субодиниць молекул протеїнфосфатази PP2AA (PDB: 2NYL, UniProt: P67775) з *H. sapiens* і її рослинного гомолога - PP2A5 (UniProt: O04951) з *A. thaliana*

Примітки:  $\alpha 1$ - $\alpha 11$  і  $\beta 1$ -  $\beta 12$  - елементи вторинної структури; помаранчевим кольором позначена N-кінцева область (область  $\alpha 1$ ), яка не входить до складу каталітичного домену; D88, (*H. sapiens*) і D86 (*A. thaliana*) - консервативні залишки відповідальні за зв'язування металів; H118 (*H. sapiens*) і H116 (*A. thaliana*) - консервативні амінокислоти активного центру, відповідальні за зв'язування залишків фосфорної кислоти; R214 (*H. sapiens*) і R212 (*A. thaliana*) - унікальні для молекули PP2A, відповідальні за утворення водневих зв'язків з окарбіновою кислотою. На рисунку, що описує результати молекулярного фітингу, рожевим кольором позначена структура PP2AA з *H. sapiens*, а зеленим - структура PP2A5 з *A. thaliana*

PP1 *H. sapiens*PP1 *A. thaliana*

Результати молекулярного фітингу

Рис. 5.10. Стрічкові діаграми просторової структури і результати фітингу каталітичних субодиниць молекул протеїнфосфатази PP1G (PDB: 1U32, UniProt: P36873) з *H. sapiens* і її рослинного гомолога - PP12 (UniProt: P48482) з *A. thaliana*

Примітки:  $\alpha 1$ - $\alpha 11$  і  $\beta 1$ - $\beta 13$  - елементи вторинної структури; помаранчевим кольором позначена N-кінцева область (область  $\alpha 1$ ), яка не входить до складу каталітичного домену; D95, (*H. sapiens*) і D101 (*A. thaliana*) - консервативні залишки відповідальні за зв'язування металів [55]; H125 (*H. sapiens*) і H131 (*A. thaliana*) - консервативні амінокислоти активного центру, відповідальні за зв'язування залишків фосфорної кислоти; R96 і R221 - унікальні для молекули PP1G з *H. sapiens* залишки амінокислот, відповідальні за утворення водневих зв'язків з окадаїновою кислотою. На рисунку, що описує результати молекулярного фітингу, рожевим кольором позначена структура PP1G з *H. sapiens*, а зеленим - структура PP12 з *A. thaliana*

Порівняльний аналіз просторової структури комплексів протеїнфосфатаз 1 і 2А з *A. thaliana* і *H. sapiens* (Рис. 5.7 і 5.8) в комплексі з оадаїною кислотою (Рис. 5.9 і 5.10) дозволив ідентифікувати амінокислотний склад сайтів зв'язування: R96-x(18)-H125-x(3)-S129-I130-x-I133-Y134-x(71)-W206-x(13)-D220-R221-G222-V223-x(26)-V250-x(21)-Y272-L273-x-V275-Y276- у випадку протеїнфосфатази 1 з *H. sapiens* і R102-x(18)-H131-x(3)-S135-I136-x-I139-Y140-x(71)-W212-x(13)-D226-R227-G228-V229-x(26)-V257-x(21)-Y278-C279\*-x-E281\*-F282\* (нумерація амінокислотних залишків приведена відповідно до положень вирівнювання, Рис.5.7 і 5.8) - в разі протеїнфосфатази 1 з *A. thaliana*. При цьому були встановлені відмінності за останніми трьома амінокислотними залишками сайтів зв'язування (\*): L273, V275, Y276 (PP1 з *H. sapiens*) і C279, E281, F282 (PP 1 з *A. thaliana*) відповідно (Рис. 5.11).

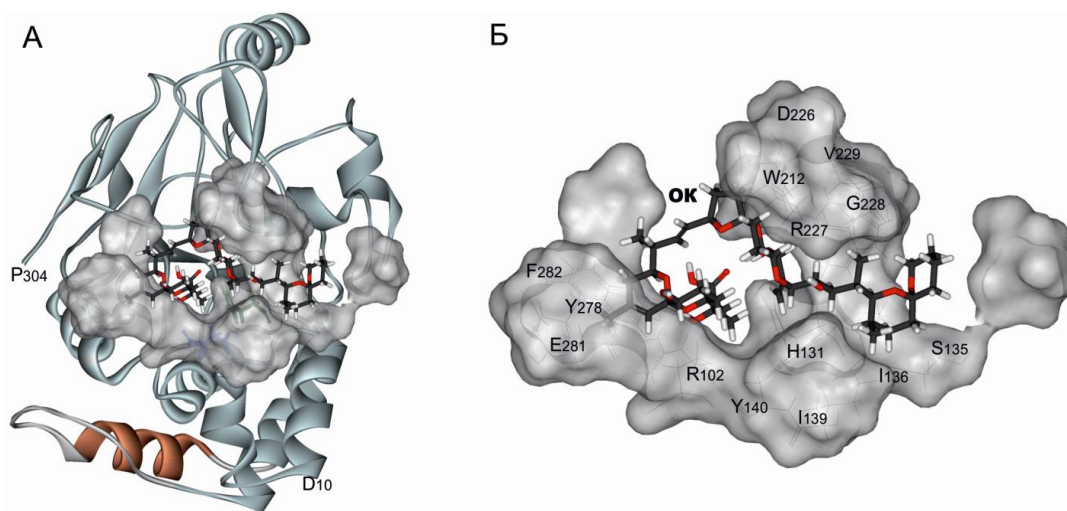


Рис. 5.11. Просторова структура комплексу каталітичної субодиниці протеїнфосфатази типу 1 з *A. thaliana* з молекулою оадаїнової кислоти

Примітки: А-комплекс молекули протеїнфосфатази 1 з оадаїною кислотою; Б – поверхня сайту зв'язування оадаїнової кислоти з амінокислотними залишками, що приймають участь у її зв'язуванні на поверхні протеїнфосфатази

У випадку протеїнфосфатази 2А сайт зв'язування оадаїнової кислоти у гомолога з *A. thaliana* виявився ідентичним за амінокислотним складом структури PP2А з *H. sapiens*: R89-x(27)-N117-H118-x (3)-Q122-I123-x(3)-Y127-x(61)-V189-P190-H191-x (8) -W200-x (12) -P213-R214-G215-A216-x (26) -L243-x (21) -Y265-C266-x -R268-C269, але з кроком зміщення порядку нумерації на два



залишки (Рис. 5.12). Результати парного вирівнювання повних послідовностей гомологічних протеїнфосфатаз 2А з *A. thaliana* і *H. sapiens* виявили їх 79,5%-ву ідентичність при 91,5%-вій схожості амінокислотних залишків. Відповідно, амінокислотний склад протеїнфосфатази 1 виявився ідентичним на 77,5% при 86,6%-вій схожості (Рис.5.7 і 5.8). У той же час, амінокислотний склад сайтів зв'язування окадаїнової кислоти мав 100%-ву ідентичність у випадку протеїнфосфатази 2А і 85,5%-ву ідентичність в разі протеїнфосфатази 1. Виходячи з цих даних, можна говорити про консервативність сайту зв'язування окадаїнової кислоти на поверхні протеїнфосфатаз 1 і 2А з *A. thaliana* і *H.sapiens*.

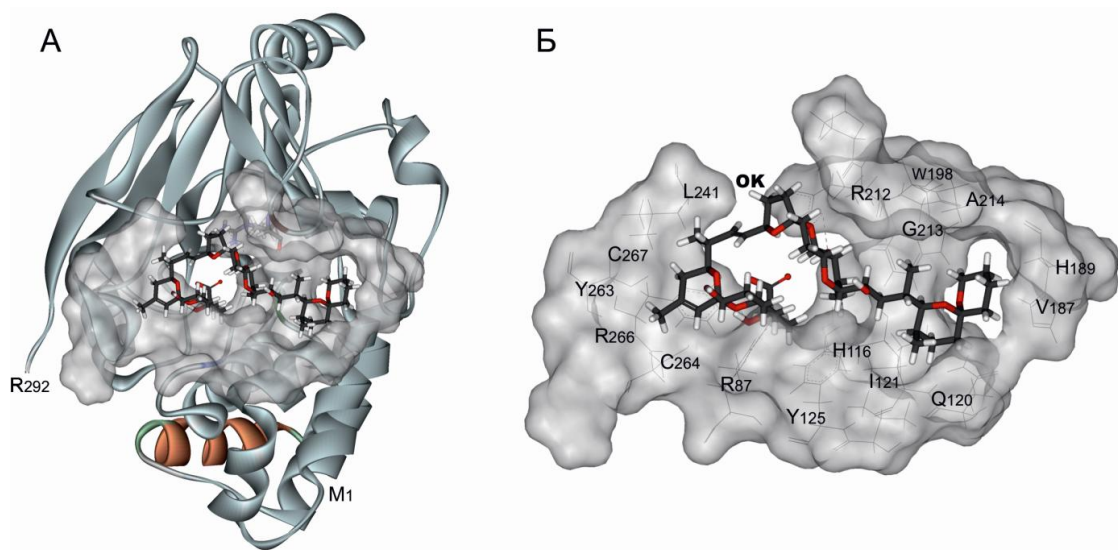


Рис. 5.12. Просторова структура комплексу каталітичної субодиниці протеїнфосфатази типу 2А з *A. thaliana* з молекулою окадаїнової кислоти

Примітки: А-комплекс молекули протеїнфосфатази 2А з окадаїновою кислотою; Б – поверхня сайту зв'язування окадаїнової кислоти з амінокислотними залишками, що приймають участь у її зв'язуванні на поверхні протеїнфосфатази

Для підтвердження локалізації сайтів зв'язування окадаїнової кислоти з протеїнфосфатазами 1 і 2А та реконструкції взаємодії з РР типу 4 використано метод гнучкого молекулярного докінгу. Для цього було проведено аналіз найближчих гомологів і РР2АА (UniProt: P36873, P67775) з *H. sapiens* з експериментально встановленою просторовою структурою та їх множинне вирівнювання з протеїнфосфатазою типу 4 РРХ1 (UniProt: P48529) з *A. thaliana* (Рис. 5.13). Порівняння просторових структур досліджених типів протеїнфосфатаз 1 та 2А, дало основу для аналізу сайту зв'язування окадаїнової



Для докінгу з використанням програми CCDC GoldSuite 5.3 були визначені центр і радіус сайтів зв'язування оокдаїнової кислоти (Рис. 5.15). Так атом центру сайту зв'язування для PP1 встановлений як NE2 (HIS125) при обмеженні радіусу сайту до 15 Å, для PP2A центральним атомом був ND2 (ASN117) при радіусі сайту в 20 Å, а у випадку протеїнфосфатази типу 4 їх поєднання. Як оціночні функції вказувалися параметри GoldScore і ChemScore.

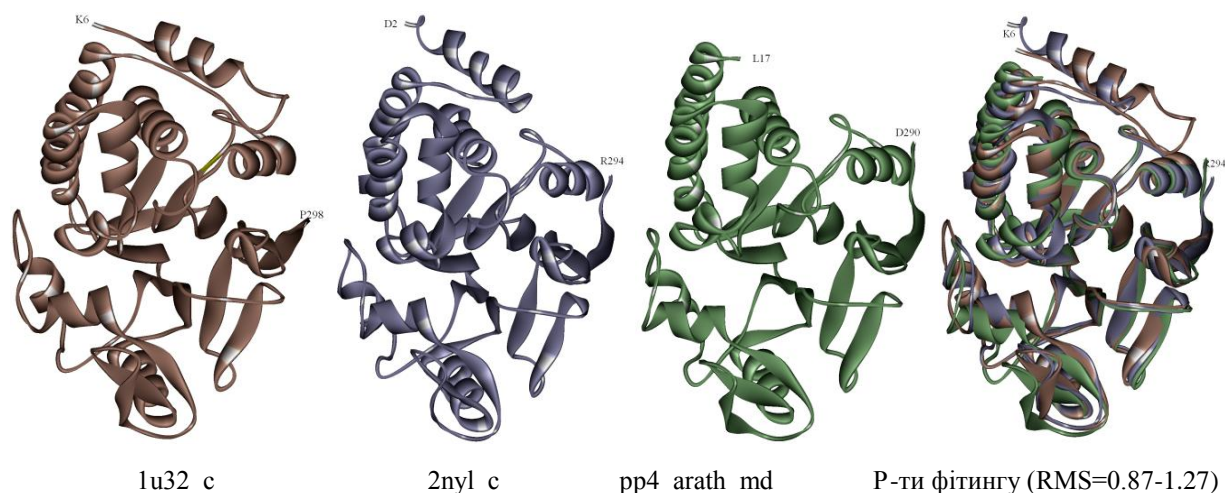


Рис. 5.14. Стрічкові діаграми просторової структури і результати фітингу каталітичних субодиниць молекул протеїнфосфатаз PP1G і PP2AA (UniProt: P36873, P67775) з *H. sapiens* і їх рослинного гомолога – PPX1 (UniProt: P48529) з *A. thaliana*

Результати аналізу структурно-біологічного порівняння просторової структури молекул протеїнфосфатаз PP1, PP2A, і PP4 з *A. thaliana* та їх тваринних гомологів переконливо свідчать про спільні механізми зв'язування оокдаїнової кислоти. Значна ідентичність амінокислотного складу сайтів зв'язування оокдаїнової кислоти у PP1, PP2A, PP4 різного походження підтверджує еволюційну консервативність цього сайту. Водночас, результати аналізу найкращих конформаційних положень ліганду і статистичних показників докінгу підтвердили більш високу спорідненість оокдаїнової кислоти до PP2A, ніж до PP1, а також дозволили визначити механізм її зв'язування з протеїнфосфатазами типу 4.

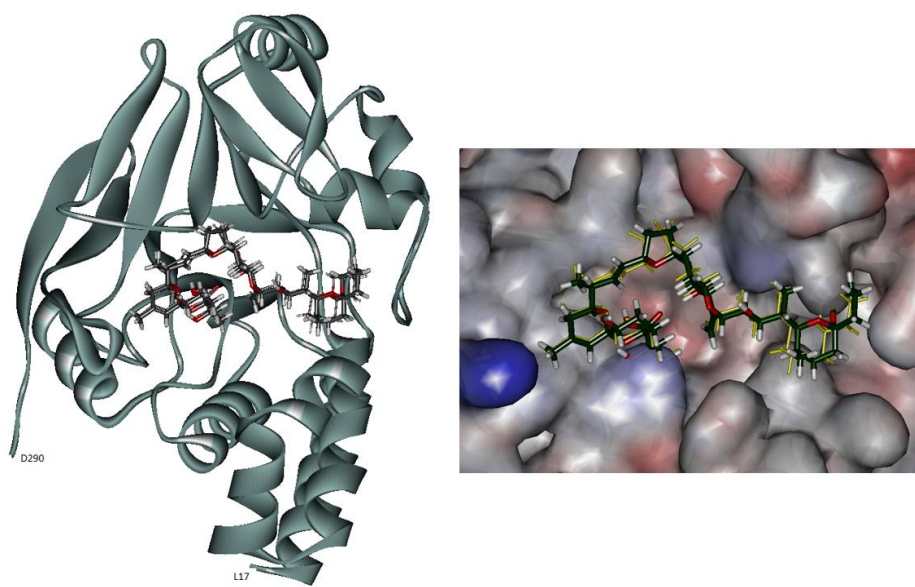


Рис. 5.15. Просторова структура комплексу каталітичної субодиниці протеїнфосфатази типу 4 з *A. thaliana* з молекулою оокадаїнової кислоти

Примітки: А-комплекс молекули протеїнфосфатази 4 з оокадаїновою кислотою; Б – поверхня сайту зв'язування оокадаїнової кислоти (референсне з PDB-структур відмічено жовтим та доковане положення ліганду позначено зеленим) з амінокислотними залишками, що приймають участь у її зв'язуванні на поверхні протеїнфосфатази

Таким чином, отримані результати свідчать про можливість використання оокадаїнової кислоти для диференційованої регуляції активності рослинних PP1, PP2A і PP4, а також для з'ясування їх зв'язку з регуляцією мікротрубочок рослин, що було показано в роботі Sheremet Ya.A. та інші у 2009 році [169, 226].

#### 5.4.2. Реконструкція структури комплексів мікроцистину-LR і мікроцистину-LA з протеїнфосфатазами типу 1, 2A, 4 з *A. thaliana*

Мікроцистин-LR (Рис. 5.16, Додаток Ж) є одним з найбільш поширених і найбільш токсичним з групи мікроцистинів – гептапептидів ціанобактерій [170]. Ліганд-білкова взаємодія мікроцистину-LR з сайтами зв'язування PP в більшості випадків відбувається за участі іонів металів та без молекул води у зв'язку з ковалентним типом взаємодії (Розділ 5.2) [219]. Менш токсичним представником з групи мікроцистинів є мікроцистин-LA, відомий також під більш загальноновживаною назвою ціаногінозин-LA (microcystin-LA;

$C_{46}H_{69}N_7O_{12}$ ; Рис. 5.16, Додаток Ж) [44]. Зокрема, при порівнянні фізико-хімічних властивостей було показано, що на відміну від аналогу, мікроцистин-LA має меншу полярну поверхню і відповідно меншу кількість донорів та акцепторів, але більшу розчинність.

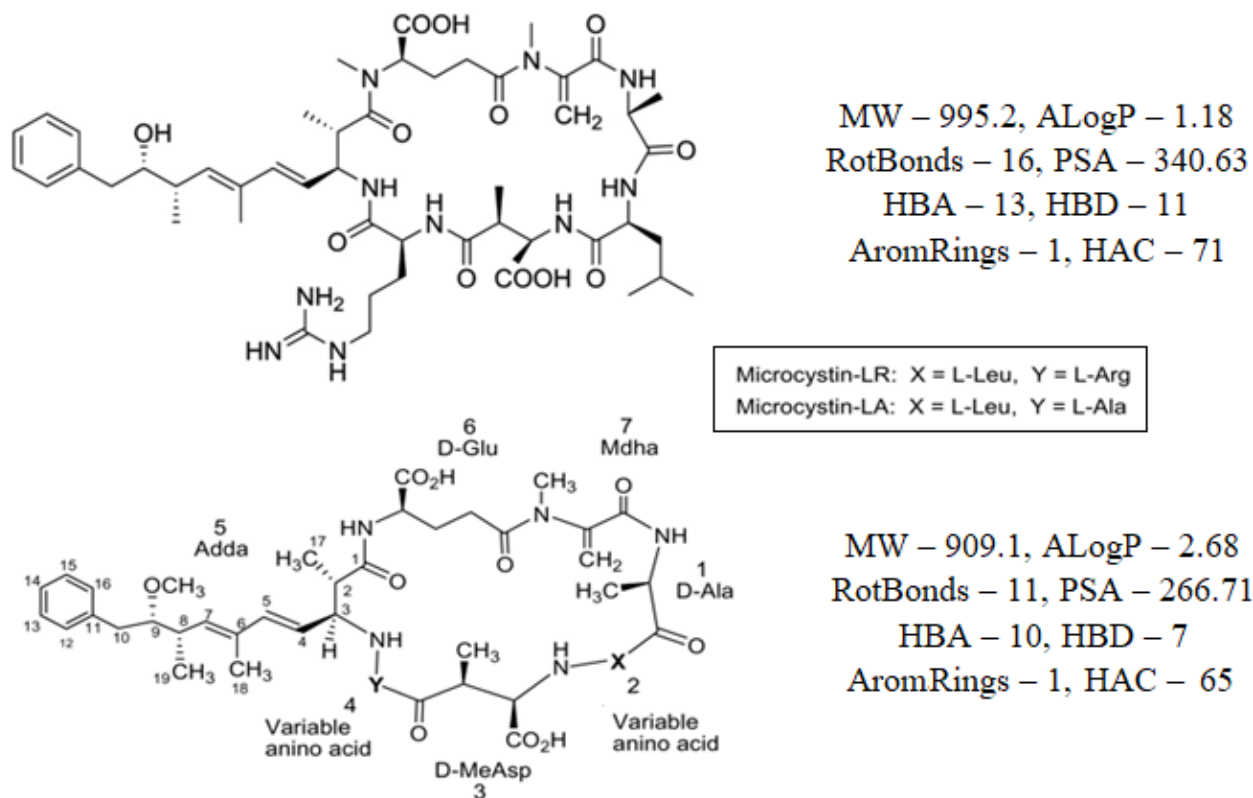


Рис. 5.16. Структурні формули мікроцистину-LR і мікроцистину-LA та розрахунок їх фізико-хімічних параметрів за допомогою програми Instant JChem [104, 167, 172]

Аналіз просторової структури комплексів протеїнфосфатаз 1 і 2A з *H. sapiens* в комплексі з мікроцистином-LR було проведено на основі експериментально отриманих PDB-структур PP1 ( $IC_{50}=0.01-200nM$ ) і PP2A ( $IC_{50}=0.065-3nM$ ) з мікроцистином: PP1A-1FJM та PP2AA-2NYM, 2NPP, 2NYL, 3DW8, 3FGA, 2IAE, 2IE3. Наявність структур для обох типів ферментів з мікроцистином-LR дозволило ідентифікувати амінокислотний склад сайтів зв'язування даного інгібитору з протеїнфосфатазами 1 і 2A: -x-(GDYVDRG)-X-(ILRGNHESXQI)-X-(YG)-X-(VPHEG)-X-(CDLLWSDP)-X-(SPRGAG)-X-(QLV)-X-(FSAPNYCYRCGN)-x – у випадку протеїнфосфатази 2A з *H. sapiens*

(P67775\_PP2AA-MCLR) та -x-(GDYVDRG)-X-(LLRGNHEC)-X-(SI)-X-(YG)-X-(VPDQG)-X-(CDLLWSDP)-X-(NDRGVS)-X-(QVV)-X-(FSAPNYCGEFDN)-x – у разі протеїнфосфатази 1 з *H. sapiens* (P62139\_PP1A\_MCLR). Консервативність амінокислотних залишків було встановлено на підставі результатів множинного вирівнювання (Розділ 5.3, Рис. 5.3, Додаток А). Також було встановлено певні відмінності амінокислотного складу сайтів зв'язування мікроцистину-LR тваринних протеїнфосфатаз та їх рослинних гомологів. Так варіації були відмічені у 3-му (Q), 5-му (H), 7-му (P і R) і у 9-му (C) положенні амінокислот відповідно до мотиву сайту зв'язування протеїнфосфатази 2А людини (Рис. 5.3, 5.11).

PDB-структури PP1 і PP2A (Табл. 5.1), належать до різних організмів, мають різну якість моделей і дату депонування, що впливає на певну невелику розбіжність координат атомів їх просторових структур (RMS=0,34). Водночас, порівняння первинної структури тваринних та рослинних PP1, 2А і 4 доводить їх значну подібність (Рис.5.7 і 5.8, 5.13). Це також підтверджують результати порівняння просторових структур молекул протеїнфосфатаз (Рис. 5.9, 5.10, 5.14). Зокрема, для PP1 середньоквадратичне відхилення дорівнює 1,153 у випадку порівняння з PDB-структурами 1FJM, 3DW8. У випадку PP2A при порівнянні зі структурами 2NYM, 2NPP, 2NYL, 3FGA, 2IAE, 2IE3 - RMS коливається від 0,938 до 1,006. Варто зазначити, що мінімальне значення RMS спостерігалось у випадку порівняння PP2A зі структурою 3FGA. Водночас, результати RMS вирівнювання 3D-структур гомологів PP4 з PP1 - 3DW8 і PP2A - 2NYL були на достатньо високому рівні 0,842. Також результати структурного порівняння підтверджують попереднє припущення стосовно більшої подібності PP4 до PP2A, ніж до протеїнфосфатаз типу 1 (Рис. 5.14).

В результаті для подальшого докінгу мікроцистину-LR було обрано найкращу матричну структуру і положення референсного ліганду для кожного з досліджених типів протеїнфосфатаз 1, 2А і 4 з *A. thaliana*. Так, наприклад, за результатами структурного порівняння найближчими до PP2A виявились структури 2NPP і 3FGA. Було логічно обрати найкращу за якістю PDB-

структуру – 3FGA, але виявилось, що розміщення мікроцистину у даній структурі визначено не для цільової субодиниці (дистанція більше, ніж 4.5 Å), а для регуляторної  $\gamma$ -субодиниці PP2A. Під час наступного етапу підготовки PDB-структур для докінгу за допомогою засобів програми CCDC Hermes було залишено лише один гомологічний ланцюг матричної протеїнофосфатази (мішень), ліганд (мікроцистин-LR), кофактор ( $Mn^{2+}$ ) активного центру, а також функціонально значимі молекули води, тобто ті, що приймають безпосередню участь у зв'язуванні мікроцистину-LR. Так, у випадку комплексу PP1-мікроцистин-LR було залишено 9 молекул води, що утворюють зв'язки з атомами - OD2(Asp64), NE2(His66), OH(Tyr272), OD2(Asp92), O(His248), ND2(Asn124), NE2(His125), N(Val250), NE2(Gln249), O(Arg221). Тоді, як у комплексі PP2A-мікроцистин-LR ліганд зв'язується ковалентно, тож зв'язки з молекулами води були відсутні (Табл. 5.1, Додаток Д).

У випадку PP1 і PP2A докінг проводили у експериментально встановлені сайти зв'язування, тоді як у випадку PP4 – у комбінований (дані експерименту і гомології, Рис. 5.13 і 5.14). 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). На основі результатів просторового суміщення моделей PP було встановлено центр сайту зв'язування мікроцистину-LR, що відповідає центральному залишку сайту у гомологічних PDB-структур: CE1/HE1 (His260) для PP1, OD2 (Asp82) для PP2A і HB2/CB (Asp79) для PP4. Також для перевірки докінгу мікроцистину-LR на поверхню PP4, центром сайту було обрано атом  $Mn^{2+}$ , що обумовлено більш наближеним до контактної поверхні ліганду розташуванням цього атому. Було задано умови повної рухливості ліганду для нативної форми мікроцистину-LR з PDB-структури та вільної форми з бази даних ChEMBL – 444092. Амінокислотні залишки мішені залишалися ригідними. Генетичний алгоритм програми CCDC Gold запускали у 100-кратному повторенні зі збереженням 50-ти кращих положень ліганду. Отримані комплекси нативної та релаксованої форми мікроцистину-LR з мішенню (PP1, PP2A і PP4) були ранжовані згідно

значенням базових оціночних функцій. Так, значення GoldScore, AspScore та ChemScore свідчить про спорідненість ліганду до сайту (більше значення – краще) і про вигідність його конформаційного стану (менше значення – краще). Виконано порівняння результатів докінгу двох форм мікроцистину-LR відносно референсного положення ліганду з обраних PDB-структур (PDB: 3DW8 і 2NYL, Рис. 5.17), що дозволило підтвердити спорідненість мікроцистину-LR до молекул PP1, PP2A, PP4. На підставі аналізу сайтів зв'язування мішеней було обрано найкращі конформації ліганду, а порівняння статистичних параметрів дозволило встановити кореляцію активності мікроцистину-LR. Значення показників GoldScore і AspScore свідчать про краще зв'язування мікроцистину-LR з PP2A, ніж з PP1. Також на підставі порівняння показників AspScore та ChemScore на декількох етапах докінгу було встановлено найвигідніше положення мікроцистину-LR на поверхні сайту зв'язування PP4.

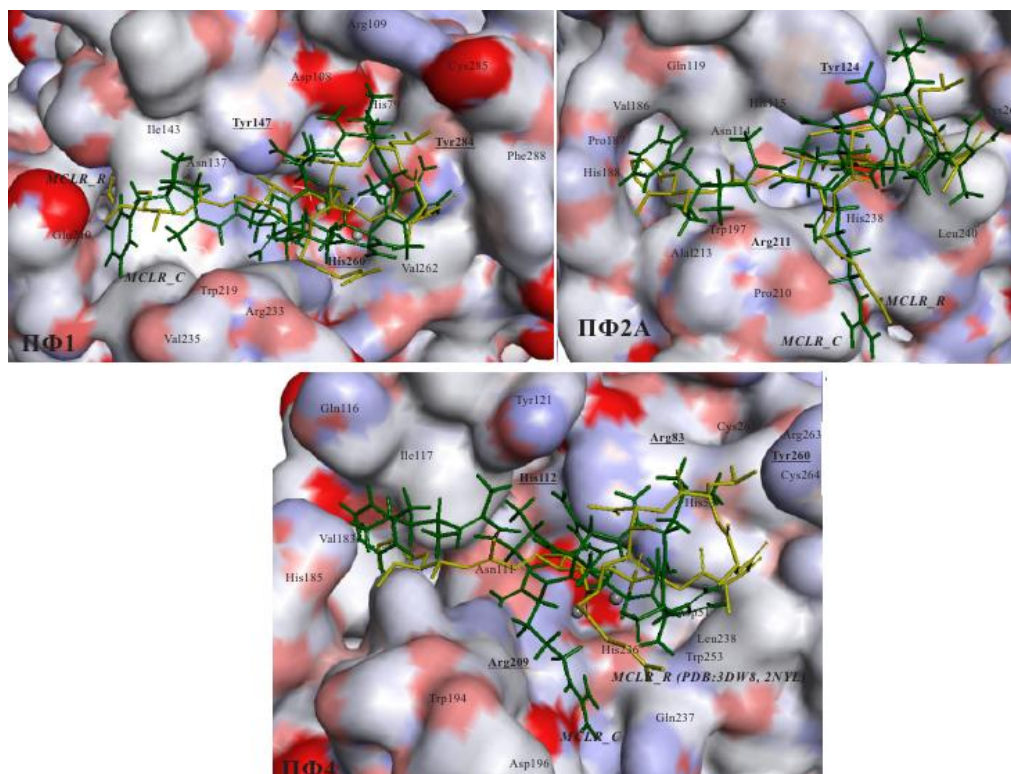


Рис. 5.17. Просторова структура молекул рослинних протеїнфосфатаз 1, 2A і 4 з *A. thaliana* у комплексі з мікроцистином-LR

Примітки: MCLR\_R – референсне положення ліганду, отримане на основі PDB-структур: PP1A - 1FJM, 3DW8; PP2AA - 2NYM, 2NPP, 2NYL, 3FGA, 2IAE, 2IE3; MCLR\_C - конформація ліганду отримана на основі молекулярного докінгу; Arg211 – назви амінокислотних залишків, що формують сайти зв'язування з лігандом; Tyr269 – назви амінокислотних залишків, з якими ліганд утворює водневі зв'язки



На відміну від мікроцистину-LR, аналіз зв'язування другого типу мікроцистину-LA з мішенями базувався на сайті зв'язування, що відомий тільки для PP1 з *H. sapiens* (PDB: 2BDX): (SI)-3x-(YGFYDEC)-79x-(DRGVS)-43x-(SAPNY)-2x-(EF) (Рис. 5.3). Особливістю цього комплексу є також форма інгібітору, так за даними літератури мікроцистин-LA краще зв'язується з рецепторами ніж інші форми ( $IC_{50}=0.3nM$ ) [172]. На основі порівняння амінокислотних послідовностей (Рис. 5.18) та просторової структури PP (Рис. 5.7-5.14) було показано, що показник середньоквадратичного відхилення атомів PDB-структури 2BDX дорівнював 0.881 для PP1, для PP2A – RMS = 0.879, тоді як для протеїнфосфатази типу 4 RMS було показано трохи вищим – 1.092, у зв'язку з більшою структурною схожістю PP4 до PP2A ніж до PP типу 1 (Рис. 5.7-5.10). Це дозволило використання даної структури для реконструкції комплексів мікроцистину-LA з іншими серин/треонін-специфічними PP.

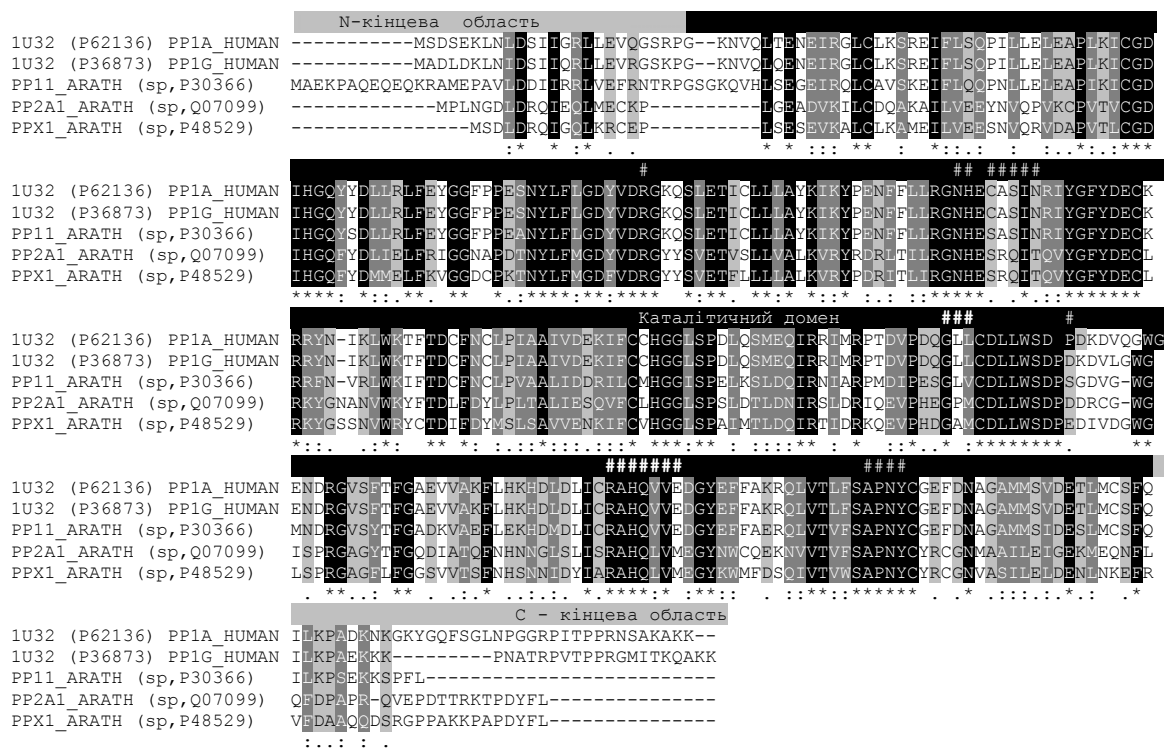


Рис. 5.18. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей матричних структур PP1A і PP1G з *H. sapiens* і їх рослинних гомологів - PP12, PP2A1, PPX1 (UniProt: P30366, Q07099, P48529) з *A. thaliana*

Примітки: універсальним символом IUPAC - X, позначені амінокислотні залишки відсутні у матричних структурах PP1A, PP1G (PDB: 3E7B, 3EGH, 3E7A, 1IT6, 2BCD) і відповідні залишки рослинного гомолога. На рисунку позначені амінокислотні залишки відповідальні за зв'язування селективних інгібіторів мікроцистину-LA, калікуліну, таутоміцину, нодуларину, мотупорину (#)

Для подальшого докінгу з PDB-структури 2BDX було залишено тільки один гомологічний до РР рослин ланцюг, інгібітор - мікроцистин-ЛА, два іони металів у активному центрі і дві молекули води (H<sub>2</sub>O8, H<sub>2</sub>O18; Табл. 5.1., Додаток Д). Центром сайту зв'язування мікроцистину з протеїнфосфатазою типу 1 з *H. sapiens* визначено атом ND1 (His248), тестовий радіус сайту 10-25 Å. Результати накладання просторових структур (Рис. 5.9-5.14) та аналіз множинного вирівнювання (Рис. 5.18) підтвердили відповідність обраних параметрів для інших РР з *A. thaliana*: CD2(His236) для РР4, CE1 (His233) для РР1, і NE2 (His238) для протеїнфосфатази 2А. Для докінгу було використано два конформери мікроцистину-ЛА: один з PDB-структури 2BDX, а другий з бази даних ChEMBL-17738 (було релаксовано його структуру).

Отримані 50-т кращих положень ліганду з РР1, 2А і 4 були ранжовані згідно значенням базових оціночних функцій. Порівняння результатів докінгу мікроцистину-ЛА відносно референсного положення ліганду PDB-структури 2BDX дозволило відібрати оптимальні конформери комплексів (Рис. 5.19).

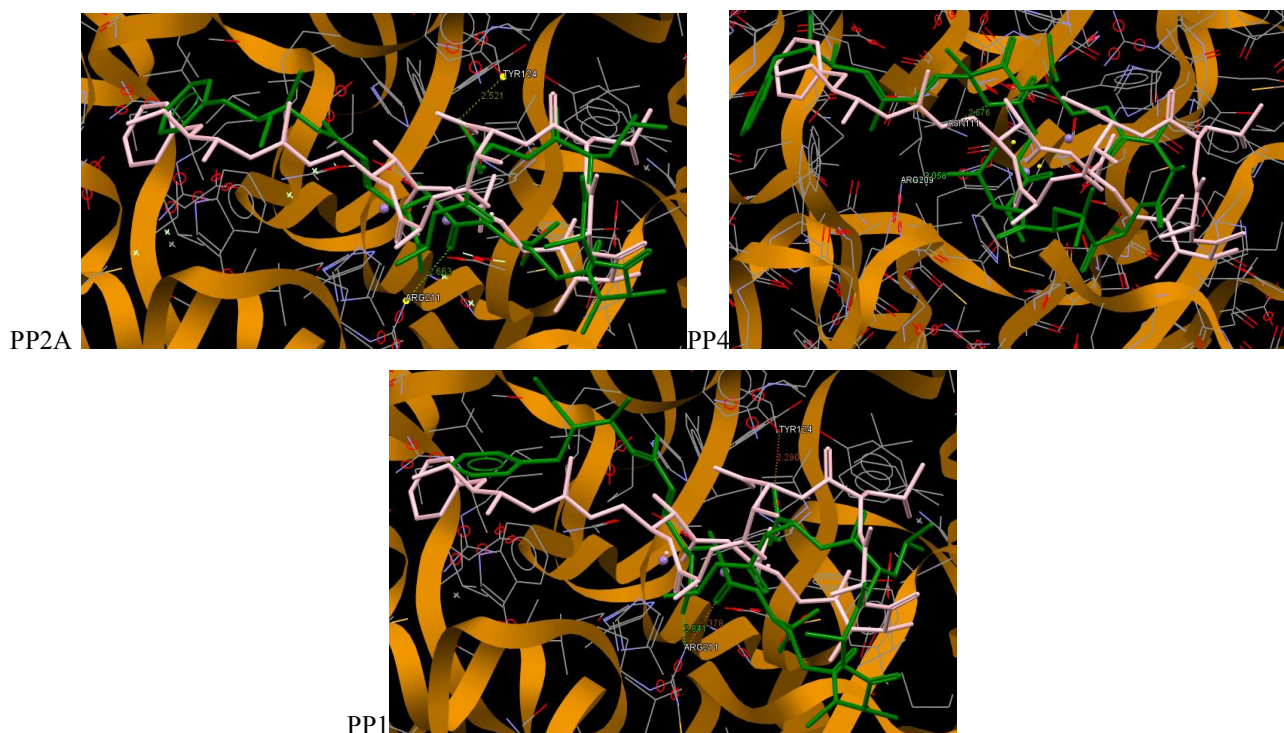


Рис. 5.19. Просторова структура потенційних сайтів зв'язування мікроцистину-ЛА на поверхні рослинних протеїнфосфатаз 1, 2А і 4 з *A. thaliana*

Примітки: референсне положення ліганду, отримане на основі PDB-структури 2BDX відмічено білим; зеленим - конформація ліганду отримана на основі молекулярного докінгу

Так показники GoldScore і AspScore свідчать про краще зв'язування мікроцистину-LA з протеїнфосфатазами 4 і PP2A, ніж з протеїнфосфатазою 1. Отже, результати структурно-біологічного порівняння просторової структури протеїнфосфатаз PP1, PP2A, і PP4 з *A. thaliana* та їх тваринних гомологів переконливо свідчать про їх спільні механізми зв'язування мікроцистину-LR і -LA. Значна ідентичність амінокислотного складу сайтів зв'язування мікроцистинів з PP1, PP2A, PP4 різного походження підтверджує еволюційну консервативність сайту. Водночас, результати аналізу найкращих конформаційних положень ліганду і статистичних показників докінгу підтвердили більш високу спорідненість мікроцистинів до PP2A, ніж до PP1, а також дозволили визначити механізм їх зв'язування з PP4.

Таким чином, отримані результати свідчать про можливість використання мікроцистинів для диференційованої регуляції активності рослинних PP1, PP2A і PP4, а також для з'ясування їх зв'язку з регуляцією мікротрубочок рослин згідно експериментальним даним Dias E. та інш. у 2014 році [62, 75].

#### **5.4.3. Реконструкція структури комплексів нодуларину-R і нодуларину-V з протеїнфосфатазами типу 1, 2A, 4 з *A. thaliana***

На сьогоднішній день відомо більше 10-ти типів нодуларинів і нодуларин-R є більш розповсюдженим з них (Рис. 5.20, Додаток Ж). Всі представники цієї групи являють собою циклічні нерибосомальні пентапептиди і містять кілька незвичайних амінокислот. Таких як, N-метилдидегідроаміномасляна кислота і ADDA бета-амінокислота, які обумовлюють токсичність інгібітору. На молекулярному рівні нодуларин-R пригнічує активність трьох ключових ферментів серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз - безпосередньо PP1 і PP2A ( $K_i=0.09\mu\text{M}$ ) та у меншому ступені PP3, але на відміну від мікроцистинів розглянутих вище, нековалентно зв'язується з протеїнфосфатазами [39, 161, 194, 197]. Також попередні дослідження свідчать, що нодуларин-R імовірно пригнічує активність протеїнфосфатаз типу 4, 5, 6 у рослин (Розділ 5.3) [293].

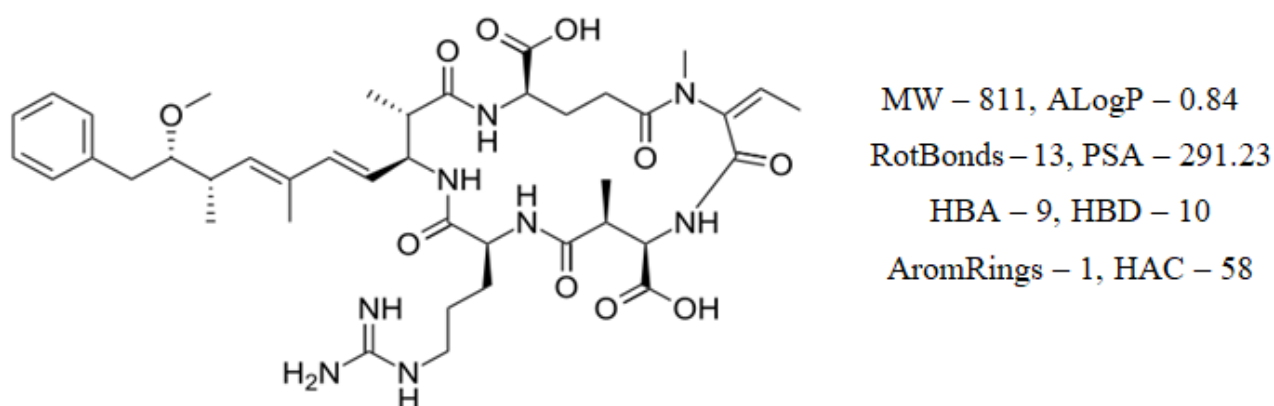


Рис. 5.20. Структурна формула нодуларину-R та розрахунок його фізико-хімічних параметрів за допомогою програми Instant JChem [131]

Результати аналізу експериментально підтвержених комплексів нодуларину-R з протеїнфосфатазами підтвердили наявність двох PDB-структур: PP1A - 3EGH, 3E7A (UniProtKB: P62136, якість 1.63-2 Å, RMS=0.202). На основі яких була отримана інформація про склад та будову сайту зв'язування нодуларину-R з мішенню: (GDYVDRG)-x-(RGNHE)-x-(SI)-x-(YGFYDE)-x-(VPD)-x-(CDLLWSDP)-x-(NDRGVS)-x-(SAPNYCGEF) (Рис. 5.3, 5.18).

Аналіз первинної структури 3EGH і 3E7A з рослинними гомологами підтвердив високий рівень подібності (Рис 5.18). Це також було підтверджено вирівнюванням їх просторової структури: для PP1 середньоквадратичне відхилення дорівнює 0.890, PP2A – RMS = 0.945 і для PP4 RMS = 1.192. Через те, що структура інгібітору у 3E7A була представлена з помилками, молекулу нодуларину-R було відібрано з 3EGH, а також з бази ChEMBL – 573206 з подальшою релаксацією структури. Також для докінгу у PDB-структурі 3EGH було залишено два іони металів у активному центрі і п'ять молекул води (H<sub>2</sub>O344, H<sub>2</sub>O554, H<sub>2</sub>O642, H<sub>2</sub>O410, H<sub>2</sub>O567, Таблиця 5.1., Додаток Д), які утворювали водневі зв'язки з атомами PP OD2 (Asp92), O (His248), ND1 (His248), ND2 (Asn124), NE2 (His125), NE2 (Gln249), OD2 (Asp64), NE2 (His66), OH(Tyr272). Варто зазначити, що тільки для PP1 докінг проводили у експериментально встановлений сайт зв'язування, тоді як сайти зв'язування (їх центр та радіус) нодуларину-R на поверхні молекул протеїнфосфатаз типу 2A

(NE2 – His238) і 4 (CD2 – His236) були визначені шляхом суміщення їх моделей з PDB-структурами комплексів PP1 – 3EGH і 3E7A. Для виключення помилкового заглиблення інгібітору у поверхневу нішу сайту зв'язування, другим центром було обрано атом  $Mn^{2+}$ , який більш наближений до контактної поверхні нодуларину-R у PDB-структурах.

Отримані в результаті докінгу комплекси нативної та релаксованої форми нодуларину-R з відповідними білками-мішенями PP1, PP2A і PP4 були ранжовані згідно значень базових оціночних функцій – GoldScore, AspScore і ChemScore та кількості утворених водневих зв'язків. На основі результатів аналізу було виконано порівняння докінгу двох форм нодуларину-R відносно референсного положення ліганду (Рис. 5.21).

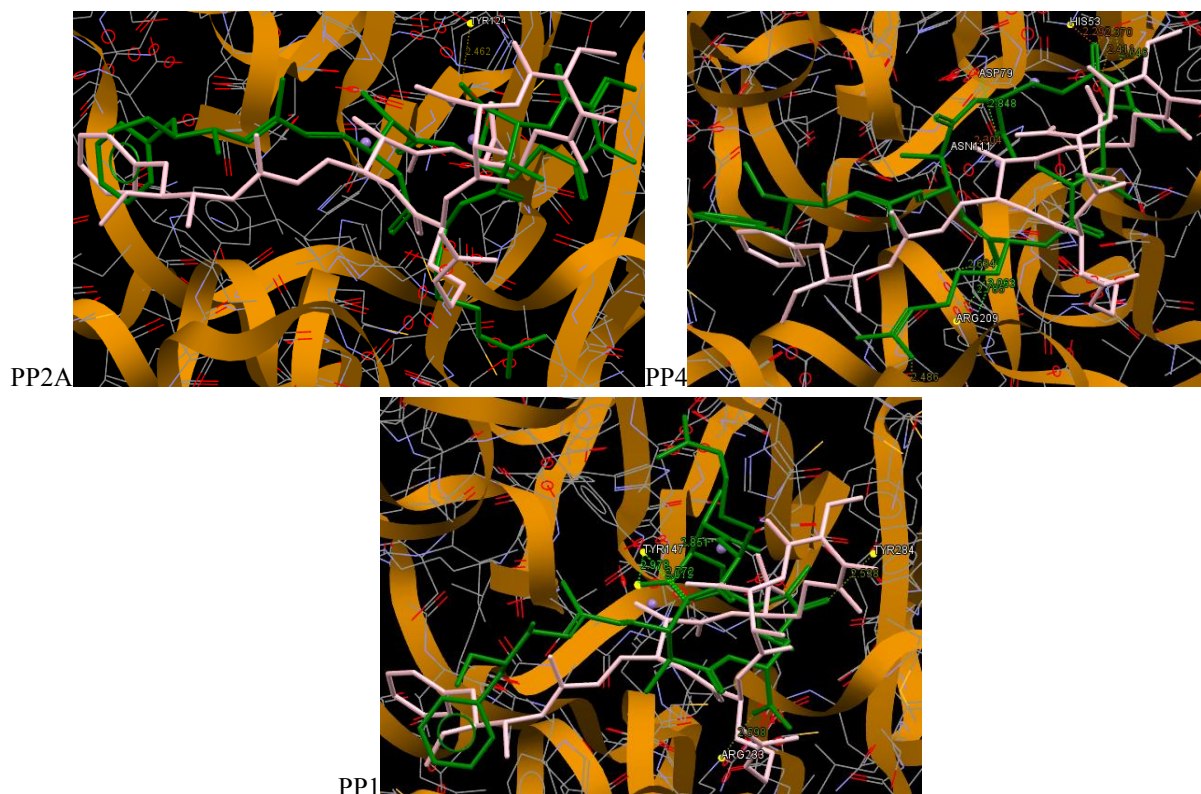


Рис. 5.21. Тривимірна структура поверхні молекул рослинних протеїнфосфатаз 1, 2А, і 4 у комплексі з нодуларином-R

Примітки: референсне положення ліганду, отримане на основі PDB-структури 3EGH відмічено білим; зеленим - конформація ліганду отримана на основі молекулярного докінгу

Даний етап відбору дав можливість встановити гомологічні положення докованих форм інгібітору до референсних з PDB-структур 3EGH і 3E7A і відібрати лідерні конформери нодуларину-R, тоді як порівняння статистичних

параметрів дозволило встановити потенційну активність нодуларину-R окремо до кожної з досліджуваних протеїнфосфатаз. Значення показників GoldScore і AspScore свідчать про краще зв'язування нодуларину-R з протеїнфосфатазами 2A, ніж з PP1 у рослин. Також на підставі порівняння показників AspScore та ChemScore на декількох етапах докінгу було встановлено найвигідніше положення нодуларину-R на поверхні сайту зв'язування PP4, яке також мало більші показники оціночних функцій ніж конформери на поверхні PP1. Водневі зв'язки нодуларин-R на поверхні протеїнфосфатаз 1, 2A і 4 утворював з Arg209, Asn111, Asp79, His53 та Tyr260.

Також було проведено дослідження ще одного представника цієї групи інгібіторів - нодуларину-V (загальноживаний синонім - мотупорин, Рис. 5.22, Додаток Ж) селективного інгібітора протеїнфосфатаз типу 1 ( $IC_{50}=0.03nM$ ), а також за даними профільного аналізу наведеного у Розділі 5.3 потенційно здатного інгібувати протеїнфосфатази 2A, 4, 5, 6 [125, 131]. Порівнюючи схожу скелетну структуру мотупорину з нодуларином-R було визначено зміни у всьому одному положенні радикалу, так N-пропілгуадинін (нодуларину-R) у мотупорині заміщує ізопропіл.

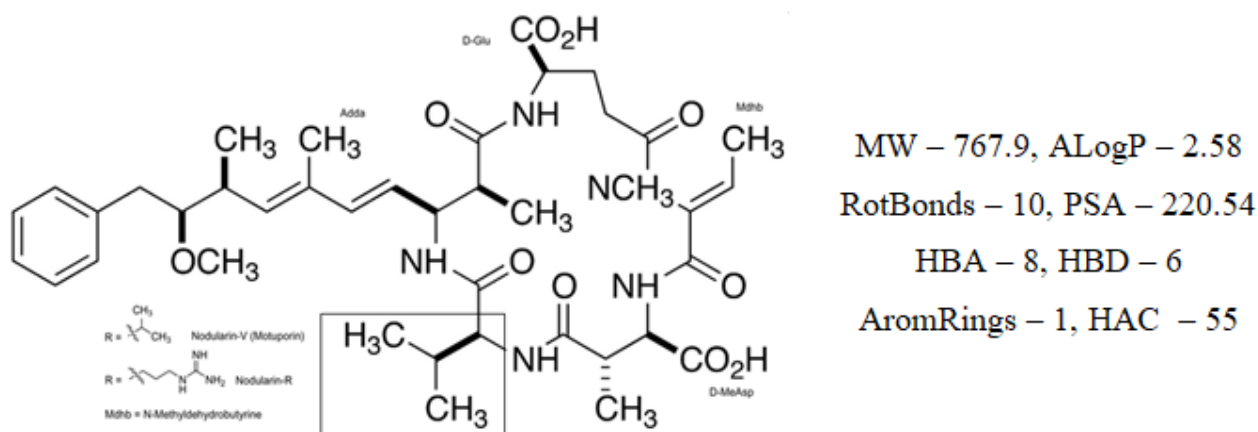


Рис. 5.22. Структурна формула мотупорину та розрахунок його фізико-хімічних параметрів за допомогою програми Instant JChem [58, 172]

Аналіз просторової структури комплексу мотупорину з протеїнфосфатазами 1, 2A і 4 було проведено базуючись на одній відомій PDB-структурі: PP1A - 2BCD (UniprotKB: P36873) та встановлено склад її сайту

зв'язування з інгібітором: (GDYVDRG)-x-(RGNHEC)-x-(SI)-x-(RIYGF)-x-(VPDQG)-x-(CDLLWSDP)-x-(DRGV)-x-(LFSAPNYCGEF) (Рис. 5.3, 5.18). Результати аналізу показали високий рівень подібності PDB-структури до рослинних гомологів (Рис. 5.18). Так для PP1 з *A. thaliana* середньоквадратичне відхилення дорівнює 0.876, PP2A – RMS=0.927 і для PP4 RMS=1.096 відповідно. Для докінгу було залишено тільки один гомологічний рослинним PP ланцюг, інгібітор-мотупорин (з PDB-структури 2BCD та релаксовану форму), два іони металів у активному центрі і сім функціональних молекул води (H<sub>2</sub>O №3, 22, 33, 45, 52, 57, 68; Таблиця 5.1, Додаток Д). Центром сайту було обрано атом Mn<sup>2+</sup> (радіус сайту до 15Å) і задано повну рухливість ліганду відповідно до наявних функціональних груп. Результати докінгу мотупорину з рослинними PP1, PP2A, PP4 були проаналізовані після відбору 50 конформацій за оціночними функціями порівнюючи з референсним положенням ліганду з PDB-структури (Рис. 5.23).

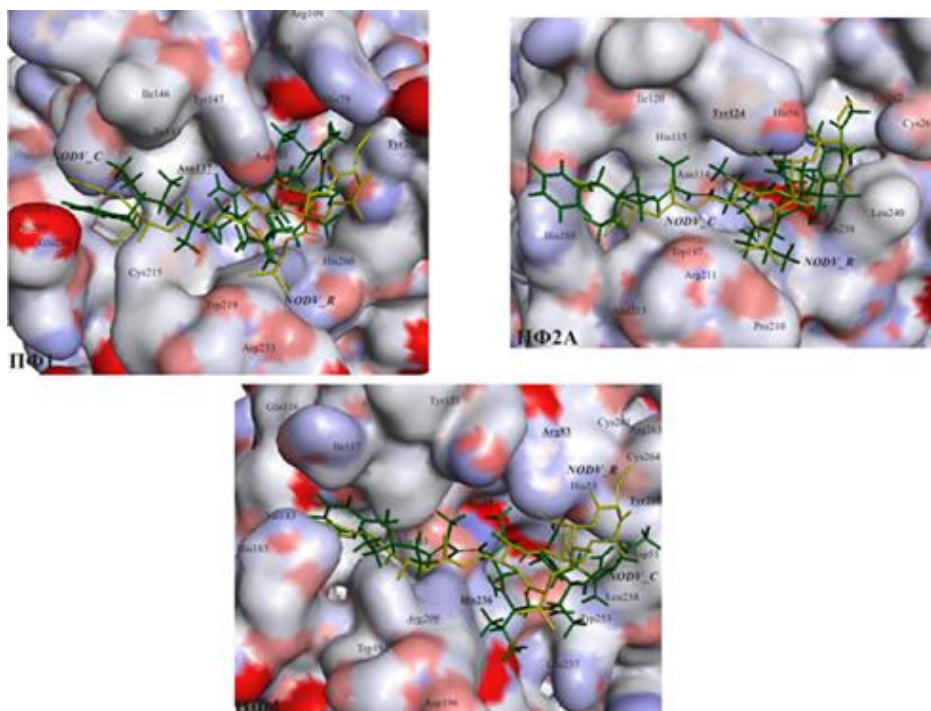


Рис. 5.23. Просторова структура потенційних сайтів зв'язування рослинних протеїнфосфатаз 1, 2A і 4 з *A. thaliana* у комплексі з мотупорином

Примітки: NODV\_R – референсне положення ліганду, отримане з PDB-структури 2BCD; NODV\_C – конформація ліганду отримана на основі молекулярного докінгу; Arg83 – назви амінокислотних залишків, що формують сайти зв'язування з лігандом; Trp124 – назви амінокислотних залишків, з якими ліганд утворює водневі зв'язки

Відібрані в результаті лідерні конформери мотупорину відповідали трьом показникам: більші значення показників GoldScore і AspScore, відповідність просторовій орієнтації референсного положення ліганду та утворення водневих зв'язків з амінокислотами сайту зв'язування. Результати порівняння просторової структури протеїнфосфатаз PP1, PP2A, і PP4 з *A. thaliana* та їх тваринних гомологів переконливо свідчать про їх спільні механізми зв'язування з нодуларином–R і –V, які на відміну від схожих за структурою мікроцистинів нековалентно зв'язуються з протеїнфосфатазами. Водночас, результати аналізу найкращих конформаційних положень лігандів і статистичних показників докінгу підтвердили більш високу спорідненість нодуларинів до PP2A, ніж до PP1, а також дозволили визначити механізм їх зв'язування з PP4. Таким чином, отримані результати підтверджують попередні припущення профільного аналізу наведеного у розділі 5.3 і свідчать про можливість використання нодуларину–R і нодуларину –V для диференційної регуляції активності рослинних PP1, PP2A і PP4. Це припущення корелює з експериментальними даними лабораторії Gehring M. та інш. у 2004 році [83, 171].

#### **5.4.4. Реконструкція структури комплексів калікуліну з протеїнфосфатазами типу 1, 2A, 4 з *A. thaliana***

Калікулін А (Рис. 5.24, Додаток Ж) відноситься до класу цитотоксичних метаболітів і на даний час він позиціонується як інгібітор протеїнфосфатаз більш ефективний, ніж оадаїнова кислота (діюча переважно на фосфатази PP2A) [69, 166, 237]. Даний інгібітор найбільший з лінійних сполук розглянутих у розділі, він здатний в рівній мірі пригнічувати активність протеїнфосфатаз PP1 ( $IC_{50}=0.14-500nM$ ) і PP2A ( $IC_{50}=0.13-9.71nM$ ), а також за попередніми результатами профільного аналізу калікулін А може взаємодіяти з PP3, PP5 і PP6 (Розділ 5.3). Подальша реконструкція комплексів рослинних протеїнфосфатаз 1, 2A і 4 з калікуліном була виконана на основі сайту – R96-



x(32)-S129-x(4)-Y134-x(71)-V195-P196-x(2)-P209-x(9)-N219-D220-R221-x-V223-x(25)-Q249-x(22)-Y272-((GDYVDRG)-x-(ECASI)-x-(YGFYDE)-x-(VPDQG)-x-(WSDP)-x-(NDRGV)-x-(HQVVEDG)-x-(SAPNYC) PDB-структури PP1 з *H. sapiens* (1IT6, P36873 Рис. 5.3, Додаток А). Профіль сайту зв'язування калікуліну А було складено відповідно до положення амінокислот при множинному вирівнюванні послідовностей PP (жирним відмічені консервативні амінокислоти з якими безпосередньо взаємодіє інгібітор утворюючи водневі зв'язки).

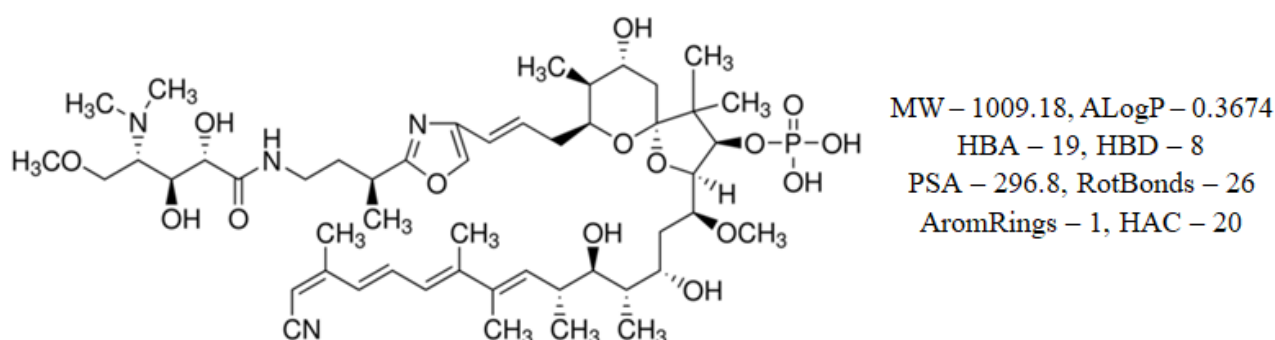


Рис. 5.24. Структурна формула калікуліну та розрахунок його фізико-хімічних параметрів за допомогою програми Instant JChem [264]

Порівняння первинної структури каталітичної субодиниці 1IT6 з молекулами рослинних PP1, 2A і 4 (Рис. 5.18) було підтверджено просторовим вирівнюванням їх молекул. Так для PP1 середньоквадратичне відхилення дорівнює 0.766, PP2A – RMS = 0.896 і для PP4 RMS = 1.039, що підтвердило їх високу схожість і дозволило використовувати для докінгу. Для подальшого докінгу з димеру PDB-структури 1IT6 було залишено тільки гомологічний рослинним протеїнофосфатазам ланцюг А, два іони металів у активному центрі і п'ять молекул води (H<sub>2</sub>O №601, 602, 607, 608, 612, Табл. 5.1, Додаток Д), які взаємодіють з атомами PDB-структури: OD2 (Asp92), O (His248), ND1(His248), OH (Tyr272), N (Val250), NE2 (His125), ND2 (Asn124), NE2 (His125) і приймають участь у зв'язуванні калікуліну з PP1. На основі центру сайту зв'язування (NE2 – His173) калікуліну PDB-структури PP1 (PDB:1IT6, P36873) з

*H. sapiens*, при радіусі відповідного сайту  $25\text{\AA}$  були визначені центр і радіус сайтів зв'язування інгібітору для інших PP, які відповідали центральним залишкам гомологів: NE2 (His173) для PP4, NE2 (His186) для PP1, і CE1 (His164) для PP2A з *A. thaliana*. Великий радіус сайту було вказано у зв'язку з розміром ліганду –  $24,125\text{\AA}$  по крайнім точкам та  $22,933\text{\AA}$  по довжині молекули інгібітору. Молекули калікуліну А були взяті з PDB-структури (1IT6) та бази даних хімічних сполук ChEMBL (430266), але для виключення можливих помилок генетичного алгоритму було проведено перевірку за допомогою програми CCDC Hermes і виправлено структури лігандів, де помилки прочитання програми пов'язані з типом зв'язків між атомами.

Результати докінгу потенційних комплексів калікуліну з PP1, 2A і 4 з *A. thaliana* були відфільтровані за низькими показниками - енергії утворення комплексів (базуючись на ChemScore), показниками спорідненості інгібітору до білків-мішеней та оптимальності конформаційного стану молекул (GoldScore, AspScore). Це дозволило відібрати найкращі конформації калікуліну А та порівняти їх з референсним положенням інгібітору з структури 1IT6 (Рис. 5.25). За показниками GoldScore і AspScore більш оптимальний конформаційний стан та енергію зв'язування з білком мішенню калікулін А має до протеїнфосфатази 2A і 4 ніж до PP1, незважаючи на дані літератури, які свідчать про однакову спорідненість даного інгібітору до протеїнфосфатаз 1 і 2A. Також варто зазначити, що незважаючи на дані літератури, що калікулін добре інгібує PP2A, але в 10 раз краще PP типу 1 [1, 16, 113] для протеїнфосфатази 1 було проведено декілька запусків докінгу, модифікацій параметрів та діапазону оціночних функцій, у зв'язку з великим розміром калікуліну та помилками, що виникали під час роботи генетичного алгоритму, чого не спостерігалось у ході докінгу інгібітору до сайтів інших протеїнфосфатаз. Тільки встановлення карти докінгового сайту, видалення молекул води і перевірка декількома етапами МД дозволили встановити місце посадки на PP1 для калікуліну А. Результати аналізу утворення водневих зв'язків обраних конформерів-лідерів дозволили встановити амінокислоти, що відіграють ключову роль при утримуванні сполук

на поверхні протеїнфосфатаз, це Asp54, Trp197, His56 для PP2A, Asp196, His236, Asp 51 і Ser 114 для PP4 та Arg233, Cys215, Tyr147 для протеїнфосфатази 2A.

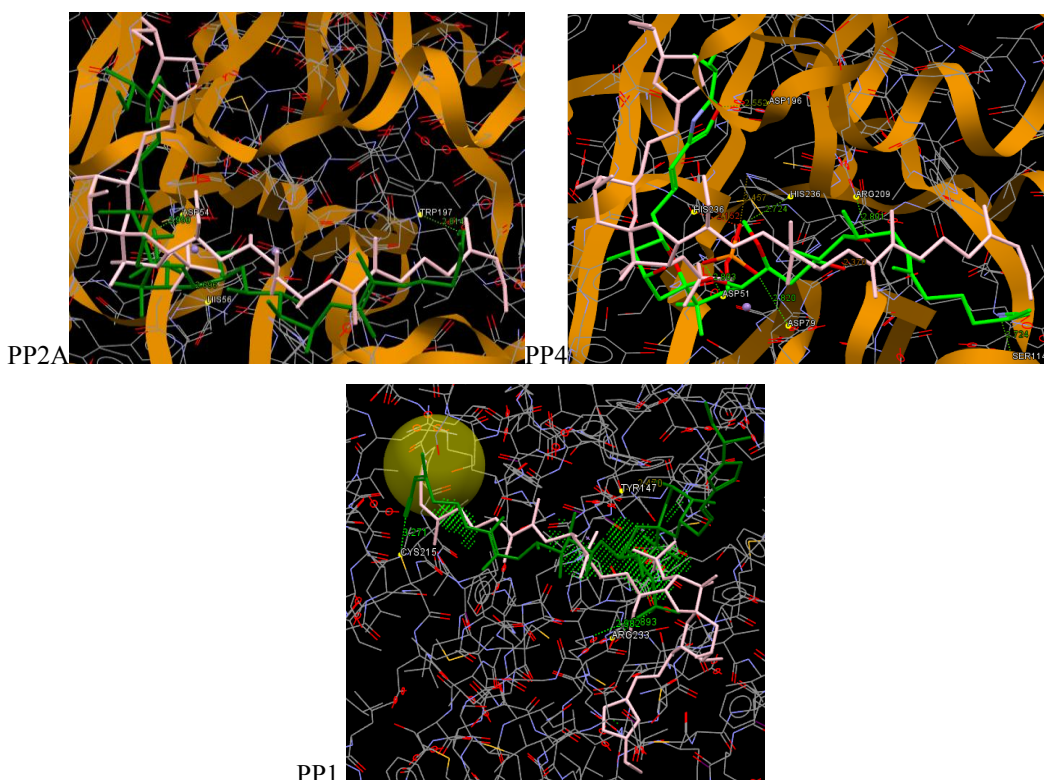


Рис. 5.25. Тривимірна структура поверхні молекул рослинних протеїнфосфатаз 1, 2A, і 4 з *A. thaliana* у комплексі з калікуліном А

Примітки: референсне положення ліганду, отримане на основі PDB-структури 3EGH відмічено білим; зеленим - конформація ліганду отримана на основі молекулярного докінгу

Отримані результати докінгу підтвержують попередні припущення профільного аналізу наведеного у розділі 5.3 і свідчать про можливість використання калікуліну для диференційної регуляції активності рослинних PP1, PP2A і PP4 на пару з оадаїновою кислотою, що підтверджується експериментальними даними [72, 113].

#### 5.4.5. Реконструкція структури комплексів таутоміцину з протеїнфосфатазами типу 1, 2A, 4 з *A. thaliana*

Фізико-хімічні властивості й унікальний інгібіторний профіль таутоміцину (Рис. 5.26, Додаток Ж) роблять таутоміцин корисним

інструментом для того, щоб ідентифікації підтипів протеїнфосфатаз [131, 146, 217, 287]. Також інгібітор має незначний розмір, який серед розглянутих ігібіторів протеїнфосфатаз можна порівняти тільки з окадаїновою кислотою, значну кількість акцепторів та велику контактну полярну площу [72]. Але на відміну від окадаїнової кислоти має протилежну потенційну активність до PP1 і PP2A, він інгібує PP1 при  $K_i=4.5\text{nM}$ , а також PP2 при  $IC_{50}=0.7\text{-}22\text{nM}$  [131, 146].

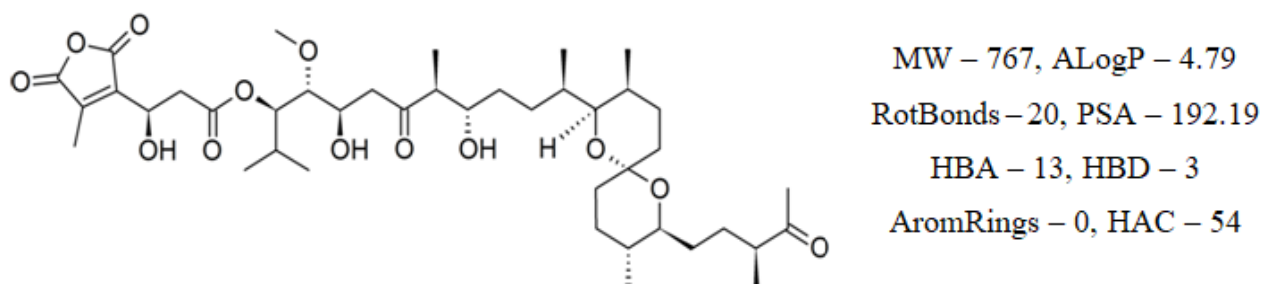


Рис. 5.26. Структурна формула таутоміцину та розрахунок його фізико-хімічних параметрів за допомогою програми Instant JChem [131]

Склад сайту зв'язування було встановлено за допомогою PDB-структури PP1 – 3E7B з *Homo sapiens*: (GDYVDRG)-x-(RGNHECASI)-x-(IYGFYDEC)-x-(DVPDQG)-x-(CDLLWSDPD)-x-(NDRGVS)-x-(RAHQV)-x-(SAPNYCGEF) (послідовність амінокислотних залишків приведена відповідно до положень множинного вирівнювання, Рис. 5.3). Припущення щодо значної гомології PP (Рис. 5.18), підтверджувалось просторовим суміщенням PDB-структури 3E7B з PP типу 1, 2A, 4 з *A. thaliana*, зокрема для PP1 середньоквадратичне відхилення дорівнює 0.825, PP2A – RMS = 0.954 і для PP4 RMS = 1.822.

У підготовлену систему для докінгу було включено один гомологічний ланцюг до PP1, PP2A і PP4 ланцюг димеру PDB-структури 3E7B, два іони металів у активному центрі ферменту і 14-ть функціональних молекул води, що утворюють водневі зв'язки на поверхні сайту зв'язування і приймають участь у зв'язуванні інгібітору ( $\text{H}_2\text{O}$  №516, 540, 595, 602, 731, 702, 665, 725, 614, 688, 692, 752, 759, 764, Додаток Д). Центром сайту було обрано іон марганцю, а враховуючи невеликий розмір таутоміцину порівняно з іншими інгібіторами,

радіус сайту обмежено розміром до 10Å. Молекули інгібітору були взяті з PDB-структури 3E7B та бази даних ChEMBL (505512), з подальшою релаксацією.

Аналіз результатів молекулярного докінгу потенційних комплексів таутоміцину з протеїнфосфатазами 1, 2A і 4 з *A. thaliana* було проведено за показниками – енергії утворення комплексів (ChemScore), показниками спорідненості інгібітору до білків-мішеней та оптимальності конформаційного стану молекул (GoldScore, AspScore), кількості утворених водневих зв'язків між конформерами таутоміцину і відповідними PP1, PP2A і PP4. Це дозволило відібрати за даними оціночних функцій лідерні конформації таутоміцину у сайтах протеїнфосфатаз та порівняти їх з референсним положенням інгібітору, яке було отримане на основі PDB-структури 3E7B шляхом накладання просторових структур моделей протеїнфосфатаз (Рис. 5.27).

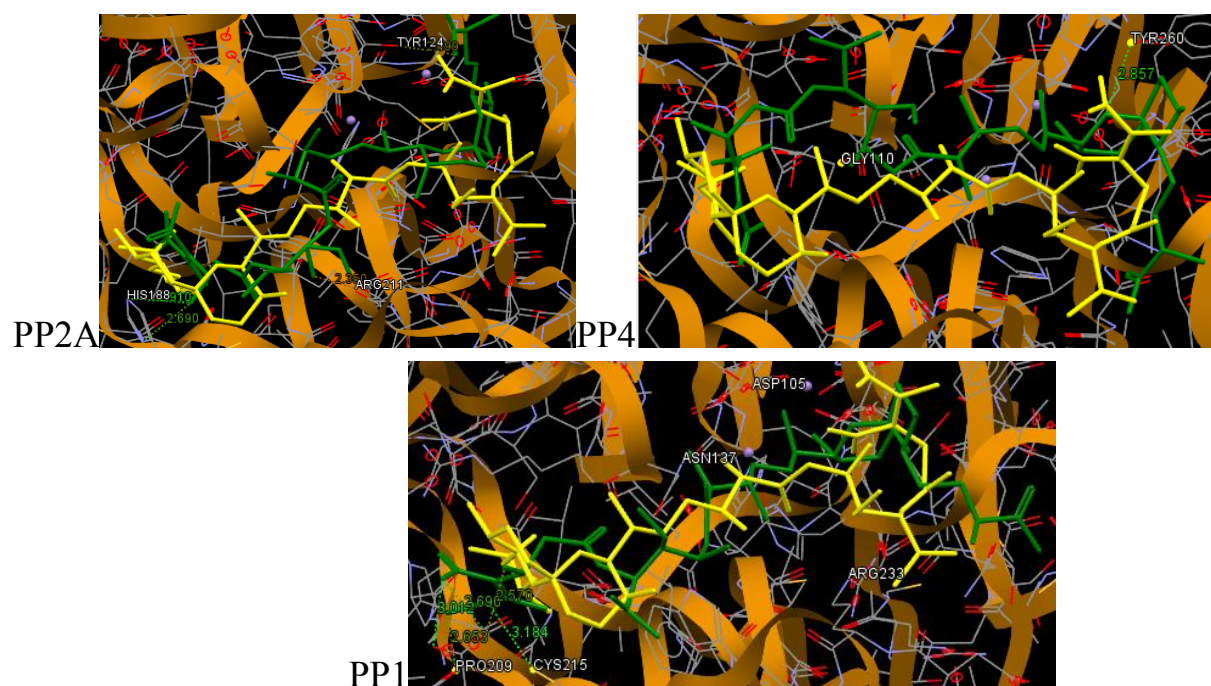


Рис. 5.27. Тривимірна структура поверхні молекули рослинних протеїнфосфатаз 1, 2A, і 4. А у комплексі таутоміцином

Примітки: референсне положення ліганду, отримане на основі PDB-структури 3E7B відмічено білим; зеленим – конформація ліганду отримана на основі молекулярного докінгу.

Так за даними GoldScore і ChemScore більш оптимальний конформаційний стан та енергію зв'язування з білком мішенню таутоміцину має до PP1, нижчий до PP2A, і значно нижчий до PP4 (було відібрано всього два комплекси). Припускаємо, що даний інгібітор можливо використовувати для

регуляції активності рослинних PP1, PP2A і PP4 на пару з калікуліном і нодуларинами, що підтверджується експериментальними даними [131, 146, 167].

#### 5.4.6. Реконструкція структури комплексів динофізистоксинів з протеїнфосфатазами типу 1, 2A, 4 з *A. thaliana*

Динофізистоксини 1 і 2 (Рис. 5.28 – А, Додаток Ж) позиціонуються на ряду з оадаїноювою кислотою, тому що мають однакове природне походження, але мають суттєві відмінності у рівнях токсичності [107]. Структурні відмінності динофізистоксинів 1 і 2 від оадаїноювої кислоти полягають у заміщенні 2- і 3-ї групи радикалів (Рис. 5.28 – Б, В), зокрема положення гідрогену у 2-у і 3-у бічному радикалі оадаїноювої кислоти (Рис. 5.28 – Б, В). В молекулі динофізистоксину 1 заміщені на насичені аліфатичні вуглеводні у обох положеннях, тоді як у динофізистоксину 2 тільки другому радикалі циклогексан має СН<sub>3</sub>-групу.

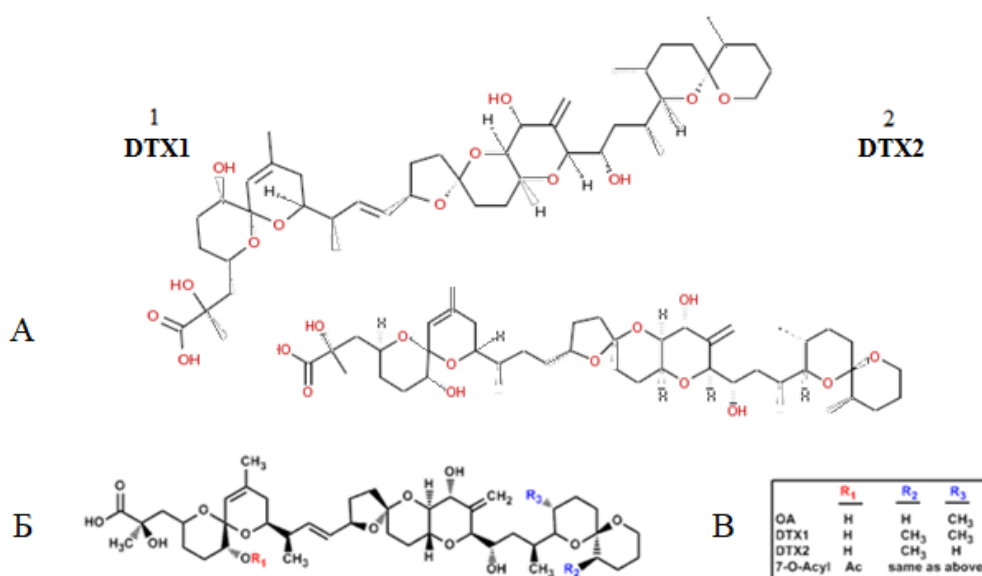


Рис. 5.28. Структурні формули динофізистоксину 1 і 2 (DTX1, DTX2 – А) та загальна схема бічних радикалів на прикладі порівняння з оадаїноювою кислотою (Б, В) [107]

Вихідна інформація про амінокислотний склад сайтів зв'язування динофізистоксинів була отримана на підставі експериментально встановлених комплексів с PP2A (PDB: 3K7V-2.8Å, 3K7W-2.9Å) з *H. sapiens*: (GDYVDRG)-x-

(QI)-x-(VPHEG)-x-(CDLLWSDP)-x-(SPRGAG)-x-(FSAPNYC) (Рис. 5.3, 5.8., 5.13). Результати суміщення їх просторових структур показали незначний рівень  $RMS=0.131$ . Аналіз складу їх сайтів зв'язування дозволив встановити участь однієї молекули води, яка утворює водневі зв'язки з аспарагіною кислотою та гістидином (для DTX 1 –  $H_2O$  № 313 до ND2 (Asn117), NE2 (His118) і для XT2 – 311 до атомів ND2 (Asn124), NE2 (His125)) (Додаток Д), а також те, що у зв'язуванні лігандів на поверхні молекул PP, беруть участь – 5-ть амінокислот: Arg89, Gln122, His191, Arg214, Tyr265 у випадку DTX 1 та 6-ть амінокислот – Arg89, His191, Arg214, Ala216, Trp200, Tyr272 відповідно для DTX 2 (Додаток Г), що дозволило розглядати їх як один комбінований сайт для подальшого докінгу. Порівняння множинного вирівнювання PDB-структур 3K7V і 3K7W з рослинними гомологами показало високий рівень подібності амінокислотних послідовностей (Рис. 5.7, 5.8 і 5.13), що також підтверджується вирівнюванням їх просторової структури. Зокрема, порівнюючи з структурою комплексу PP-DTX1 (3K7V), для PP2A середньоквадратичне відхилення дорівнює 0.968, PP1 –  $RMS=1.106$  і для PP4  $RMS = 0.878$ , тоді як порівняння зі структурою PP – DTX2 (3K7W) показало, що для PP2A середньоквадратичне відхилення дорівнює 1.002, PP1 –  $RMS=1.107$  і для PP4  $RMS=0.865$ . Порівняння структури підтвердило правильність попереднього твердження про більшу схожість структури PP типу 4 до типу 2A, ніж до типу 1, що було використано при побудові параметрів для молекулярного докінгу. Зокрема, також було використано по два конформери інгібіторів кожного з інгібіторів: експериментально отримані структури динофізистоксинів 1 і 2 з PDB-структур DTX1-3K7V; DTX2 -3K7W та релаксовані за допомогою методу молекулярної механіки, моделі з бази даних ChEMBL (DTX1-443145; DTX2-502711).

Результати молекулярного докінгу динофізистоксинів 1 і 2 з протеїнофосфатазами корелюють з аналізом сайту зв'язування оадаїнової кислоти підтверджуючи їх консервативність. Це дозволило встановити лідерні конформери та порівняти їх з референсним положенням інгібіторів на поверхні PP1, PP2A і PP4 (Рис. 5.29). Так молекули динофізистоксинів 1 і 2 утворюють

короткі взаємодії та стійкі водневі зв'язки з Asp51, His53, Arg83 та Tyr260 для PP4 та PP2A (додатково показана взаємодія з глутаміном 237), тоді як для комплексу PP1 з динофізистоксинами рейтинг оціночних функцій та кількості імовірних конформерів був встановлений значно нижчий. Так на поверхні динофізистоксини утворюють стабільні водневі зв'язки з Asp77 та Tyr147.

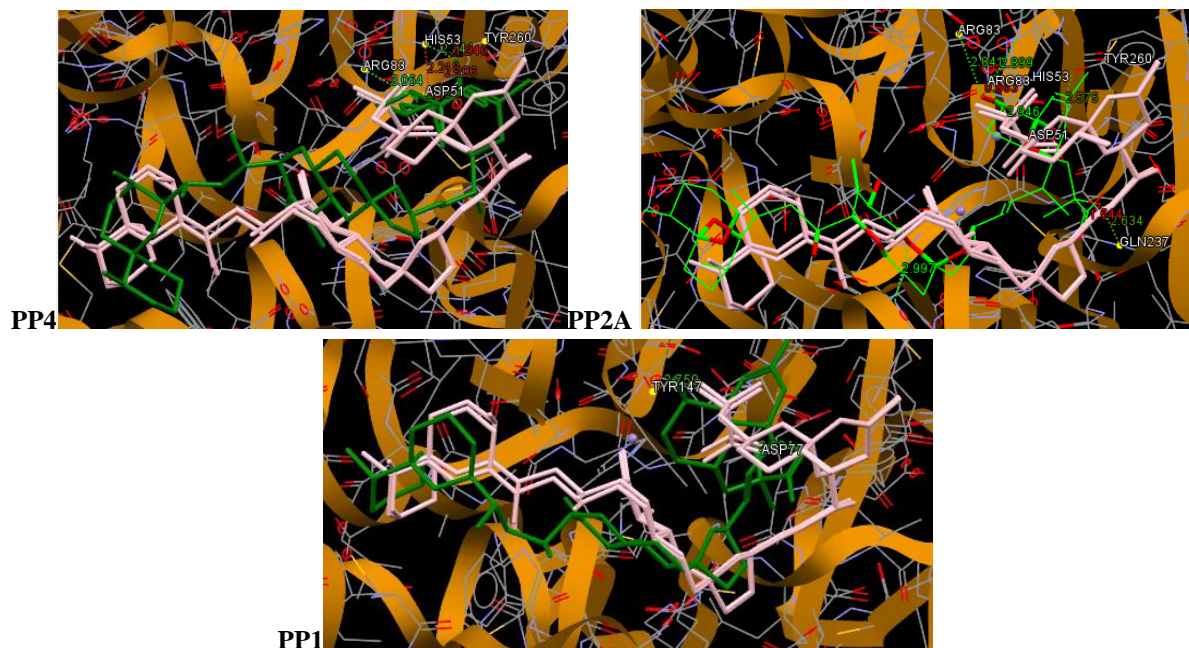


Рис. 5.29. Тривимірна структура поверхні молекули рослинних протеїнфосфатаз 1, 2А, і 4 у комплексі динофізистоксином типу 1 і 2

Примітки: референсне положення ліганду, отримане на основі PDB-структури 3K7V і 3K7W відмічено білим; зеленим – конформація ліганду отримана на основі молекулярного докінгу

Результати молекулярного докінгу підтверджують припущення щодо можливості використання динофізистоксинів на ряду з окадаїновою кислотою і корелюють з експериментальними даними Vale C., Botana L. [261].

#### 5.4.7. Реконструкція структури комплексів кантаридину і ендоталу з протеїнфосфатазами типу 1, 2А, 4 з *A. thaliana*

Серед описаних інгібіторів серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз кантаридин і норкантаридин (Рис. 5.30, Додаток Ж), більш відомий під синонімом ендотал були визначені при очищенні фосфорильованих білків [67]. Кантаридин позиціонується як селективний інгібітор PP2A і PP5, тоді як



ендотал інгібує із середньою силою тільки PP2A [65, 68, 218]. Функціонально сполуки відрізняються тільки наявністю у кантаридину двох метильних груп.

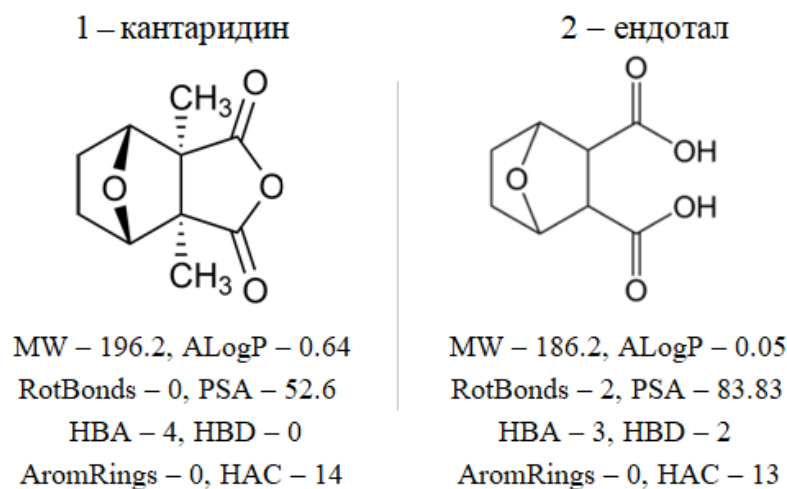


Рис. 5.30. Структурні формули кантаридину і ендоталу та розрахунок їх фізико-хімічних параметрів за допомогою програми Instant JChem [19]

Попередні дослідження на основі профільного пошуку сайтів зв'язування інгібіторів з мішенями свідчать на користь того, що майже всі рослинні серин/треонін-специфічні PP (P48482: 83.8% ідентичності/92.3% подібності з PP людини, PP2A (P48578: 82.3/90.8%), PP4 (P48529: 83.8/90.4%), PP5 (Q84XU2: 62.8/78.7%) і PP6 (Q9SX52: 73.5/86.0%)) є найбільш імовірними мішенями для цієї групи інгібіторів (Розділ 5.3). Група PP 7 була винятком, імовірно активність даного типу PP знижується за рахунок інших сполук, або це може бути обумовлено локалізацією ферменту [295].

Щоб передбачити зв'язування кантаридину і ендоталу з різними типами протеїнфосфатаз рослин було проведено пошук гомологів з експериментально визначеною просторовою структурою та відібрано для подальшого аналізу PDB-структури PP5 (P53041\_PPP5) з кантаридином (синонім – кантаридинова кислота, PDB: 3H68, 3H63, 3H67, 3H62) і норкантаридином (ендоталом – синонім), PDB: 3H61, 3H69, 3H64) з *H.sapiens* (Розділ 5.2). На основі профільного аналізу сайтів зв'язування інгібіторів (Розділ 5.3, Додаток Г) та амінокислотної послідовності, вилученої з PDB-структур було проведено множинне вирівнювання з рослинними PP1, 2A і 4, що дозволило визначити амінокислотний сайт зв'язування кантаридину і ендоталу:



було підготовлено у програмі CCDC Hermes та для докінгу залишено тільки гомологічний ланцюг обраний за допомогою вирівнювання з PP1, 2A і 4 (Рис. 5.31), кантаридин чи ендотал для визначення референсного положення інгібіторів, метали у активному центрі PDB-структур 3H68 і 3H61. За результатами аналізу молекули води у склад сайту зв'язування кантаридинових інгібіторів не входили, тому зайву воду було виключено з структур. Як оціночні функції обрано GoldScore і AspScore програми CCDC Gold.

Результати докінгу свідчать про те, що кантаридин і ендотал краще зв'язуються з PP2A ніж з PP4, та ще менше з PP1. Про що також потенційно свідчить те, що зі 100-та генерацій генетичного алгоритму за порогом значень оціночних функцій, програмою було відібрано тільки 8-ім і 7-ім конформерів кантаридину у сайті PP2A, 6-ть для PP4 і близько чотирьох для PP1. Порівняння результатів докінгу з природніми конформаціями інгібіторів PDB-структур 3H68 і 3H61 дозволило відібрати всього по одній лідерній конформації кантаридину і ендоталу (Рис. 5.32).

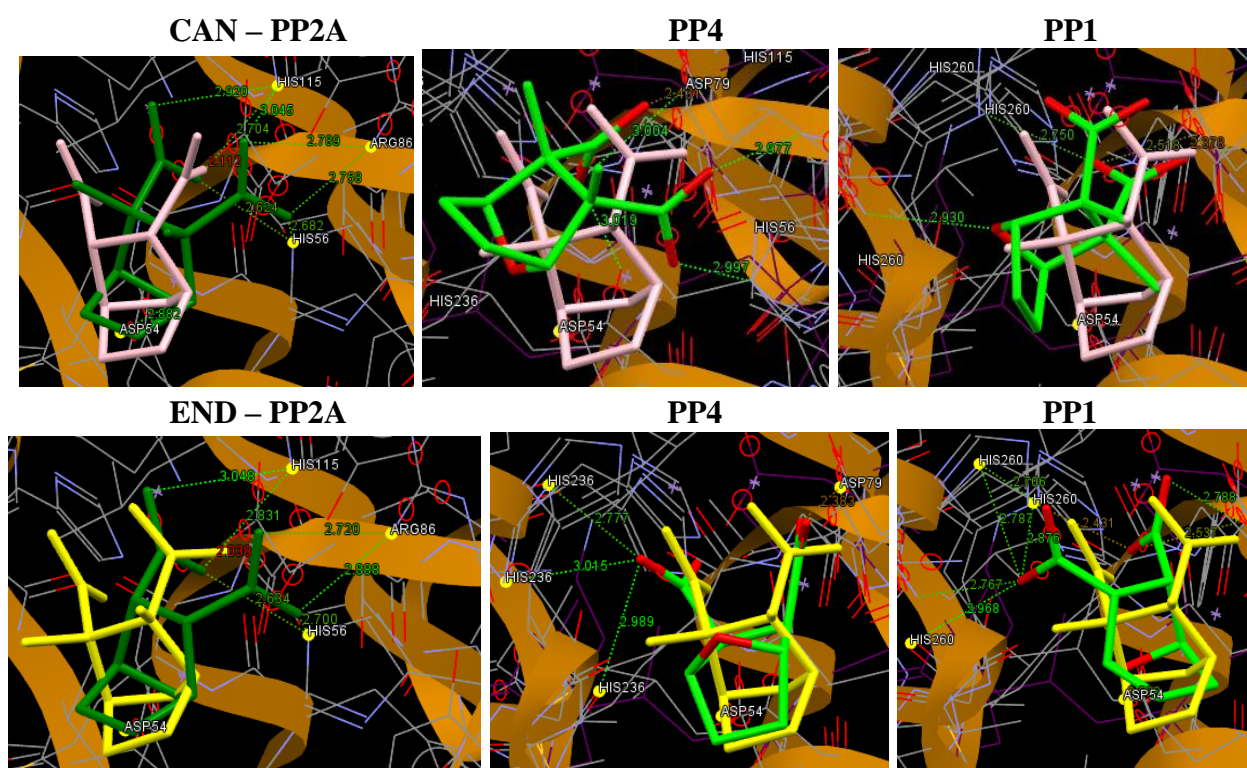


Рис. 5.32. Просторова структура потенційних сайтів зв'язування кантаридину і ендоталу з молекулами рослинних PP1, PP2A, і PP4 з *A. thaliana*

Примітки: референсне положення ліганду (PDB-структури 3H68 і 3H61) – відмічено жовтим; зеленим – конформація ліганду отримана на основі молекулярного докінгу

Але зважаючи на попередні результати профільного аналізу щодо того, що кантаридин і ендотал можуть пригнічувати активність майже всіх представників родини серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз, це не підтвержували результати молекулярного докінгу.

Підсумовуючи результати молекулярного докінгу відомих інгібіторів (Табл. 5.3) з протеїнфосфатазами 1, 2А і 4 з *A. thaliana* та встановивши оптимальні сайти ліганд-білкової взаємодії, можна зробити ряд припущень. Окадаїнова кислота на відміну від її похідних динофізистоксинів типу 1 і 2, має більш високу загальну спорідненість до РР рослин. Щодо диференційної дії, більш значні показники спорідненості вона має до протеїнфосфатази РР2А, ніж до протеїнфосфатаз РР1 та РР4. Калікулін, що має значну подібність до окадаїнової кислоти, займає друге місце за оціночними функціями докінгу і так само відрізняється більшою селективністю до протеїнфосфатази РР2А, ніж до протеїнфосфатази РР1. Так, порівняно зі стандартним протоколом молекулярного докінгу калікуліну і протеїнфосфатази РР4, докінг на поверхню молекули протеїнфосфатази РР1 і перевірка за допомогою методу МД потребували постійної корекції параметрів. Ще трохи нижчі показники оціночних функцій докінгу має таутоміцин. Але він, на відміну від перших двох лідерів, відрізняється більшою селективністю до протеїнфосфатази РР1, ніж до протеїнфосфатаз РР2А і РР4, що цілком співпадає з даними літератури. Варто зазначити, що за даними профільного аналізу, окадаїнова кислота, калікулін і таутоміцин, які є селективними інгібіторами протеїнфосфатаз РР1 та РР2А, також здатні пригнічувати активність рослинних протеїнфосфатаз РР3, 5 і 6. Це також підтверджує аналіз результатів докінгу і наявних даних літератури. Нодуларин і мотупорин, будучи консервативними інгібіторами протеїнфосфатази РР1 в рослинних клітинах, можуть знижувати активність протеїнфосфатази РР2А, до якої мають більшу селективність, ніж до протеїнфосфатаз РР1 і РР4. Порівнюючи сайти зв'язування інгібіторів протеїнфосфатаз за допомогою профільних методів, було встановлено, що вони можуть пригнічувати активність протеїнфосфатаз РР5 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. Отже можна лише зробити припущення, що похідні кантаридину знижують активність протеїнофосфатази PP2A, що співпадає з даними літератури.

Таблиця 5.3

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

	Окадаїнова 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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-

Таким чином, отримані результати підтвержують припущення профільного аналізу та молекулярного докінгу і свідчать про можливість використання майже всіх інгібіторів для диференційної регуляції активності рослинних PP1, PP2A і PP4, імовірно окрім похідних кантаридину.

### **5.5. Перевірка сайтів зв'язування селективних інгібіторів з рослинними протеїнофосфатазами за допомогою молекулярної динаміки**

Стабільність PDB-структур та комплексів протеїнофосфатаз 1, 2A і 4 з інгібіторами отриманих за допомогою молекулярного докінгу оцінювали з використанням методу тривалої молекулярної динаміки в інтервалі 100 нс. При цьому для кожного типу протеїнофосфатаз як контроль використовували результати розрахунків динаміки вільного ліганда, оточеного відповідним водним боксом. Протягом розрахунку динаміки молекул тваринних і рослинних протеїнофосфатаз були відсутні повідомлення про некоректні або неприпустимі значення конформаційних параметрів, що свідчить про високу якість і стабільність молекулярних комплексів інгібіторів з протеїнофосфатаз рослин.

Для тваринних і рослинних комплексів PP з інгібіторами і лігандів у вільному та зв'язаному стані результати молекулярної динаміки аналізували з урахуванням двох критеріїв: конформаційних коливань (середньоквадратичних відхилень між атомами, RMSD) і енергетичних коливань (сума Ван дер Ваальсових і кулонівських взаємодій між атомами, CE). Отримані дані свідчать про те, що рівень конформаційної енергії (Рис. 5.33) та амплітуда RMSD (Рис. 5.34) досліджуваних інгібіторів у більшості випадків зменшується і стабілізується при зв'язуванні з молекулами протеїнофосфатаз 1, 2A і 4. При цьому в комплексах протеїнофосфатаз усіх інгібіторів окрім кантаридину і ендоталу з *A. thaliana* ці зміни більш виражені, ніж у відповідних тваринних комплексах протеїнофосфатаз з інгібіторами. Результати дослідження молекулярної динаміки мікроцистинів і нодуларинів, оокадаїнової кислоти, калікуліну, таутоміцину, динофізистоксину обох типів, кантаридину і ендоталу

в зв'язаному і вільному стані також підтверджують той факт, що стабілізація рівнів енергетичних і конформаційних коливань відбувається у всіх випадках дуже швидко - протягом перших 2 нс.

Відомо, що зниження рівня енергії ліганду (в даному випадку коливань енергії інгібіторів протеїнфосфатаз протягом МД) при перенесенні з водного оточення в певну область білка є достатнім доказом можливості утворення комплексу «білок-ліганд» [206]. З урахуванням цього, зменшення і стабілізація амплітуди RMSD та зниження рівня конформаційної енергії згідно з результатами аналізу результатів молекулярної динаміки свідчить на користь того, що передбачувані області поверхні протеїнфосфатаз 1, 2A і 4 рослин з високою імовірністю є сайтами зв'язування досліджуваних сполук. При цьому амплітуда молекулярних коливань зменшується і стабілізується у випадку протеїнфосфатази 2A, в порівнянні з PP1, що на фізіологічному рівні може означати диференційну чутливість регуляторних шляхів, в яких беруть участь різні типи фосфатаз, до дії вибраних інгібіторів. Це також дозволяє припустити, що всі досліджувані інгібітори окрім ендоталу і кантаридину знижують активність PP4, на рівні з PP2A.

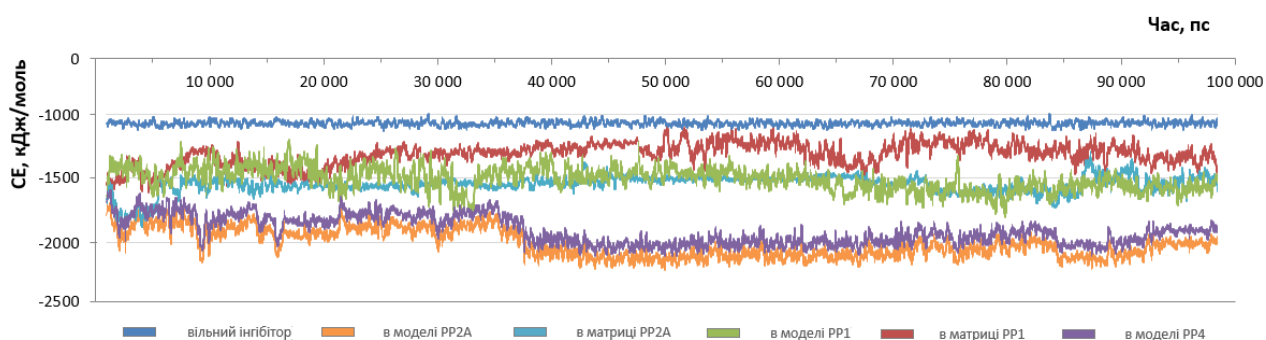


Рис. 5.33. Коливання конформаційної енергії ліганду в різному молекулярному оточенні на прикладі оокадаїнової кислоти у вільному та зв'язаному з протеїнфосфатазами стані

Рівні конформаційної енергії мікроцистинів і нодуларинів, оокадаїнової кислоти, калікуліну, таутоміцину, динофізистоксину обох типів, кантаридину і

ендоталу при перенесенні з водного оточення в сайти зв'язування на поверхні молекул всіх досліджених протеїнофосфатаз істотно зменшувалися (у межах від -240,7 до -684,9 кДж/моль), що свідчить про більшу енергетичну вигідність зв'язаного з PP стану інгібітору порівняно з вільним (Рис. 5.33).

Результати аналізу конформаційних коливань інгібіторів у зв'язаному та вільному стані також підтверджують той факт, що амплітуда коливань інгібіторів у зв'язаному з PP1, 2A і 4 стані зменшується і стабілізується в разі рослинних моделей значно більше порівняно з PDB-структурами комплексів, а у випадку протеїнофосфатаз типу 2A та 4 також більш виражено зниження коливань, ніж у випадку протеїнофосфатаз 1 (Рис. 5.34).

В цілому наші дані щодо структурних механізмів зв'язування мікроцистинів і нодуларинів, оокадаїнової кислоти, калікуліну, таутоміцину, динофізистоксину обох типів, картаридину і ендоталу з протеїнофосфатазами, а також докази того, що зокрема, за даними Шеремет на інш., спорідненість оокадаїнової кислоти до протеїнофосфатази 2A вища, ніж до протеїнофосфатази PP1, дозволяють ще раз підтвердити раніше висловлене припущення про те, що протеїнофосфатаза 2A може відігравати ключову роль в регуляції росту корневих волосків і участі мікротрубочок в цьому процесі [226].

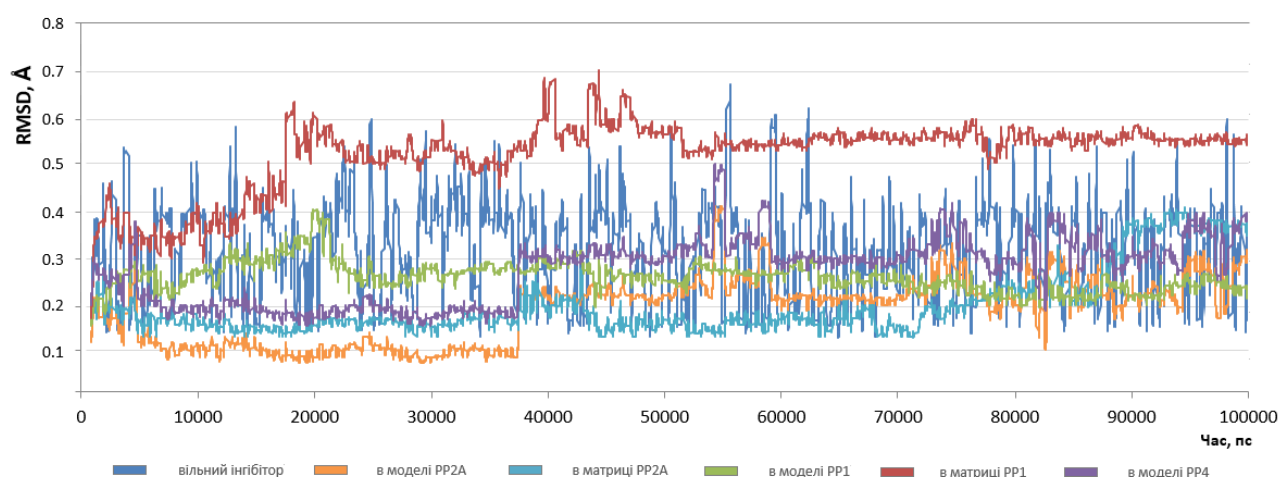


Рис. 5.34. RMSD коливання ліганду в різному молекулярному оточенні на прикладі оокадаїнової кислоти у вільному та зв'язаному з протеїнофосфатазами стані



Таким чином, результати реконструювання просторової структури протеїнфосфатаз з *A. thaliana* переконливо свідчать про спільність структурних механізмів взаємодії даних типів протеїнфосфатаз 1, 2A і 4 з мікроцистинами і нодуларинами, оокадаїновою кислотою, калікуліном, таутоміцином, динофізистоксином обох типів, картаридином і ендоталом у тварин і вищих рослин. Високий рівень ідентичності амінокислотного складу сайтів зв'язування інгібіторів для протеїнфосфатаз типу 1, 2A і 4 різного походження свідчить про високу консервативність цих сайтів в еволюційно віддалених парах серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз з *H. sapiens* і *A. thaliana*. Зв'язування інгібіторів в проаналізованих сайтах призводить до суттєвого зменшення амплітуди їх молекулярних коливань в комплексі як з тваринними, так і з рослинними протеїнфосфатазами, що свідчить про стабілізацію їх просторової структури в зв'язаному стані в порівнянні з вільним [28, 102]. Енергетичні коливання інгібіторів в результаті перенесення з водного оточення в сайти зв'язування на поверхні молекул всіх досліджуваних протеїнфосфатаз істотно зменшуються, що свідчить про більшу енергетичну вигідність зв'язаного стану в порівнянні з вільним. При цьому зменшення і стабілізація молекулярних і енергетичних коливань мікроцистинів і нодуларинів, оокадаїнової кислоти, калікуліну, таутоміцину, динофізистоксину обох типів, картаридину і ендоталу при зв'язуванні з протеїнфосфатазою 2A і 4 відбувається швидше і ефективніше, ніж у відповідному сайті на поверхні молекули протеїнфосфатази 1, що свідчить про потенційно більш високу спорідненість інгібітора до протеїнфосфатази 2A, ніж до протеїнфосфатази 1 [28, 102]. Хоча саме експериментальне визначення порогових значень концентрацій інгібіторів, необхідних для диференційної регуляції активності протеїнфосфатаз типів 1, 2A і 4 у рослин, може бути використано в подальшому як ефективний інструмент для вивчення клітинних процесів, пов'язаних із зворотним фосфорилуванням білків.

## 5.6. Дизайн та аналіз похідних селективних інгібіторів з підвищеною спорідненістю до рослинних протеїнофосфатаз типів 1, 2A і 4

У попередніх розділах 5.3 і 5.4 шляхом профілювання сайтів зв'язування та молекулярного докінгу було показано, що оокадаїнова кислота, мікроцистин, калікулін і таутоміцин, будучи селективними інгібіторами протеїнофосфатаз типів 1 і 2A, також здатні пригнічувати активність серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз рослин типів 4, 5 і 6. Так, будучи консервативними інгібіторами протеїнофосфатази типу 1, в клітинах рослин нодуларин і мотупорин потенційно здатні впливати на активність протеїнофосфатаз 2A і протеїнофосфатаз типу 4, 5 і 6. Виключення складає група кантаридинових інгібіторів, представники якої можуть впливати майже на всі серин/треонін-специфічні протеїнофосфатази, крім типу PP7 [293]. Саме тому, аналізуючи інгібітори даної групи протеїнофосфатаз тваринного походження, метою була розробка алгоритму за допомогою якого можна було б знайти, модифікувати або створити речовини, які б відрізнялись підвищеною селективністю відносно певних типів протеїнофосфатаз рослинного походження.

Результати аналізу шаблонних PDB-структур дозволили відібрати найбільш специфічний і досліджений інгібітор протеїнофосфатаз типу 1 і 2A – оокадаїнову кислоту (((2R)-3- [(2S,5R,6R,8S) -8- [(2R,3E)-4- [(2R,4'aR,5R,6'S,8'R,8'aS) -8'-гідрокси-6'- [(1S,3S) -1- гідрокси-3- [(2S,3R,6S) -3- метил- 1,7-діоксаспіро [5.5] ундекан-2-іл] бутил] -7'- метиліден-гексагідро -3'Н-спіро [оксолан-2,2'-пірано [3,2-b]піран]-5-іл] бут-3-ен-2-іл] -5-гідрокси -10-метил- 1,7-діоксаспіро [5.5] андец-10-ен-2-іл] -2-гідрокси -2- метилпропанова кислота, CID 446512; CAS № 78111178).

З використанням програми LigandScout 3.02 для оокадаїнової кислоти були встановлені області донорно-акцепторних взаємодій з мішенню, особливості топології ліганду і фармакофорні властивості. Використовуючи гетероциклічне ядро оокадаїнової кислоти для запиту, нами був проведений пошук близьких похідних даного інгібітору, депонованих в базах даних PubChem і ZINC.



Високий відсоток ідентичності амінокислотних послідовностей і схожість просторової структури протеїнфосфатаз різного еволюційного походження дозволили зробити висновок про ідентичність топології сайтів зв'язування оадаїнової кислоти з молекулами протеїнфосфатаз 1 і 2A і її спорідненості до мішеней, що підтверджувалося даними експериментів [221]. А результати аналізу значень функцій GoldScore, ChemScore та ASPScore свідчили про спорідненість певного ліганду до даного сайту, вигідність конформаційного стану самого ліганду і дало можливість відібрати п'ять речовин з раніше невідомими властивостями (Рис. 5.35) [296]:

- 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]андека-2-іл]-5,9-дигідрокси-4-метокси-2,8-диметил-7-оксотридекан-3-yl]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<sup>7</sup>.3<sup>5</sup>]] 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]андека-2-іл]-5,9-дигідрокси-4-метокси-2,8-диметил-7-оксотридекан-3-іл] окси-1-гідрокси-3-оксопропіл]-3-метилбут-2-енедиова 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-О-трет-бутил-4-О-[(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-О-етил(Z,3R)-3-гідрокси-1-метилбут-1ен-1,2,4-трикарбоксилат.

Таким чином, створена бібліотека лігандів, відібраних на підставі подібності до гетероциклічного ядра оадаїнової кислоти та проведена перевірка алгоритму хемоінформаційного пошуку і молекулярного докінгу для протеїнфосфатаз з інгібіторами різного ступеня специфічності дали можливість відібрати 5 речовин лідерів, які можуть розглядатись як потенційно перспективні інгібітори протеїнфосфатаз рослин.

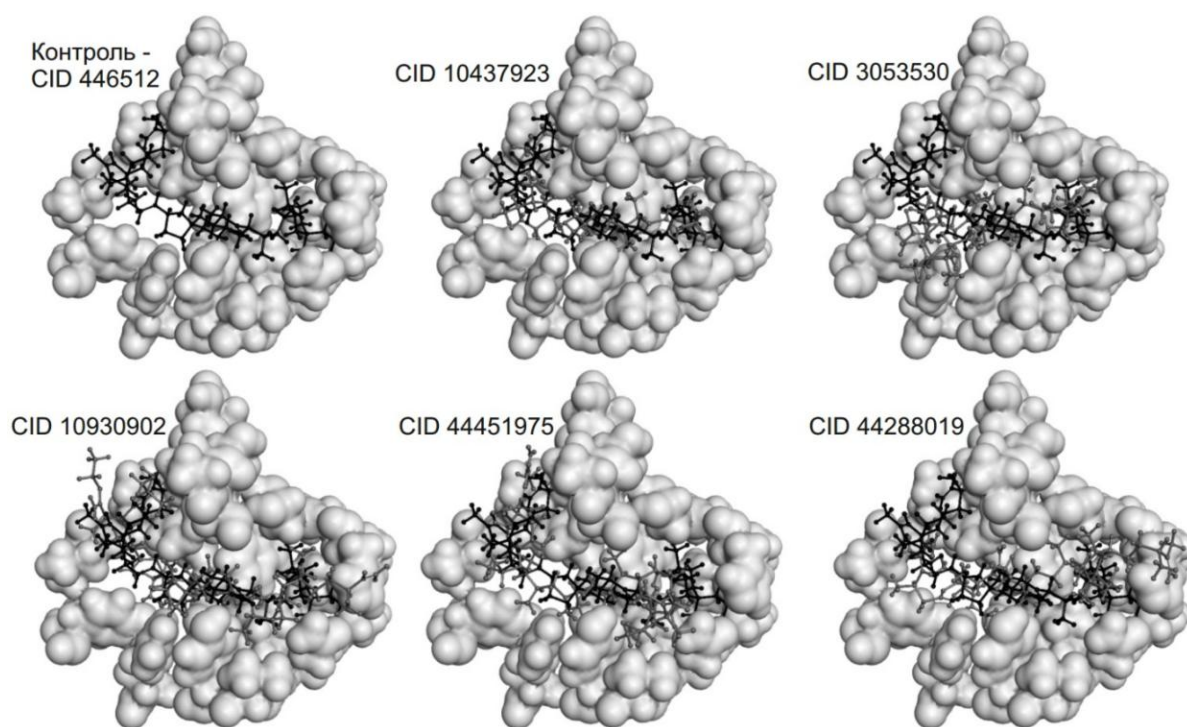


Рис. 5.35. Результати молекулярного докінгу досліджуваних гомологів оокадаїнової кислоти з протеїнфосфатазами 1, 2A і 4 на прикладі фрагменту просторової структури комплексу каталітичного субодиниці протеїнфосфатази PP2A з *A. thaliana* (UniprotKB: Q07099) з референсною сполукою – оокадаїновою кислотою (CID 446512, позначена чорним) та 5-ма сполуками лідерами обраними за результатами молекулярного докінгу (позначені сірим)

## Висновки до розділу 5

1. 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.

2. За результатами пошуку альтернативних мішеней інгібіторів протеїнфосфатаз висунуто припущення, що такі селективні інгібітори протеїнфосфатаз 1 та 2A, як оокадаїнова кислота, мікроцистин, калікулін і

таутоміцин також здатні пригнічувати активність рослинних серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз типів 3, 5 і 6. Нодуларин і мотупорин, які є консервативними інгібіторами серин/треонін-специфічних протеїнофосфатаз типу 1 в рослинних клітинах, також здатні інгібувати активність протеїнофосфатази 2A і протеїнофосфатази типів 4, 5 і 6. Водночас, визначена низька специфічність похідних кантаридину, що передбачає їх вплив майже на всі рослинні серин/треонін-специфічні протеїнофосфатази, окрім PP7.

3. На підставі структурного аналізу властивостей потенційних інгібіторів протеїнофосфатаз 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 протеїнофосфатази PP1, які мають декілька областей зв'язування і більшу площу полярної поверхні та кількість рухливих зв'язків.

4. На підставі результатів молекулярного докінгу доведена ідентичність структурних механізмів ліганд-білкової взаємодії тваринних протеїнофосфатаз і їх рослинних гомологів з окадаїноювою 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.

5. Результати оцінки молекулярної динаміки комплексів рослинних протеїнофосфатаз 1, 2A і 4 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.

6. Спираючись на опорну структуру окадаїноювоювої кислоти та результати біоінформаційного і хемоінформатичного пошуку, створена бібліотека лігандів, подібних за будовою до гетероциклічного ядра окадаїноювоювої кислоти, та відібрано 5-ть речовин (PubChem: CID10437923, CID44288019,

CID3053530, CID10930902, CID44451975), які запропоновано як нові потенційні інгібітори протеїнфосфатаз PP1, PP2A і PP4.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Самофалова ДО, Карпов ПА, Раєвський ОВ, Блюм ЯБ. Реконструкція просторової структури комплексів рослинних протеїнфосфатаз типу 1, 2а, 4 з мікроцистином-LR. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:339-344.

2. Самофалова ДА, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Особливості ліганд-білкової взаємодії інгібіторів протеїнфосфатаз, потенційно пов'язаних з цитоскелетом. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:229-233.

3. Самофалова ДА, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Поиск производных ингибиторов протеинфосфатаз, потенциально связанных с регуляцией цитоскелета растений. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;15:87-91.

4. Самофалова Д, Карпов П, Блюм Я. Пошук рослинних молекулярних мішеней селективних інгібіторів серин-треонін специфічних протеїнфосфатаз. Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. 2014;68:392-404.

5. Samofalova DA, Karpov PA, Nyporko AU, Blum YaB. Reconstruction of the spatial structure of plant phosphatases types 1 and 2A in complexes with okadaic acid. Cytol Genet. 2011;45(3):153–162.

## РОЗДІЛ 6

### УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дисертаційній роботі розглянуто сучасний стан досліджень протеїнфосфатаз. Проаналізовано їх актуальну класифікацію, консервативність і варіабельність окремих фосфатомів, а також еволюційні аспекти походження представників різних класів протеїнфосфатаз [39, 181, 234]. Показано, що вони належать до складної групи ферментів, які виникли на ранніх стадіях еволюції і не мають безпосередніх спільних предків. В результаті проведених досліджень встановлено 680-т анотованих і ще не відомих протеїнфосфатаз рослинного походження. Встановлено, що для потенційних протеїнфосфатаз рослин характерна довжина амінокислотних послідовностей близько 300-т – 320-ти 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. Підтверджено існування 175-ти індивідуальних протеїнфосфатаз (113 серин/треонін-, 36 тирозин- і 26 аспартат-специфічних протеїнфосфатаз) з *A. thaliana* і 29-ти потенційних протеїнфосфатаз з *P. patens*. За допомогою спільної кластеризації тваринних протеїнфосфатаз і їх рослинних гомологів виявлено 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 та існування унікальних PP, знайдених лише у *A. thaliana* (PDP2, PPM1M, MDP1, TIMM5), *P. patens* (CTDSP2(SCP1)) та однодольних *Z. mays* та *O. sativa* (EYA1, EYA4, DULLARD). Слід зазначити, що більша частина рослинних білків, до цього часу має статус неанотованих послідовностей і тому розглянуті вперше як протеїнфосфатази. Встановлені групи протеїнфосфатаз, унікальні за будовою та функціями і характерні для представників окремих царств. В першу чергу це



стосується протеїнфосфатаз, залучених до мітотичних процесів і асоційованих з регуляцією цитоскелету, зокрема мікротрубочок [250]. На основі фосфатому *A. Thaliana*, шляхом профільного пошуку і аналізу даних літератури було визначено групу близько 150-ти 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  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну у дводольних (*N. tabacum*, *M. sativa*) і однодольних (*O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum*) рослин. Проведений аналіз амінокислотних послідовностей, фізико-хімічних властивостей білків, реконструкції просторових структур PP1, PP2A, PP4 та уточнення по їх 3-D структурі молекул за допомогою методів SORMA, молекулярної динаміки та статистичного аналізу, переконливо свідчать про спільності топології даних типів ферментів у тварин і вищих рослин. Для подальших досліджень було відібрано 17-ть білків, 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*; P48488, Q06009 з *M. sativa*; P22198, V4FSV7, C4J0A6 з *Z. mays*; W5EJ16, W5GEB7, W5FTD6 з *T. aestivum*.

Окрему увагу зосереджено на зв'язку структурної організації протеїнфосфатаз та їх функціональної ролі. Для шаблонної реконструкції просторової структури рослинних протеїнфосфатаз PP1, PP2A і PP4 було досліджено 116-ть їх найближчих гомологів з експериментально встановленою просторовою структурою. Моделювання просторових структур повнорозмірних серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз 1, 2A і 4 дозволило виконати порівняння будови їх каталітичних доменів та оцінити подібність функціонально важливих структурних мотивів. Показано, що не зважаючи на високий рівень гетерогенності первинної структури, фізико-хімічні властивості протеїнфосфатаз PP1, PP2 і PP4 співпадають за основними показниками на

рівні всієї групи. Водночас, за розрахунками інструменту ProtParam, протеїнфосфатази PP2A мають значно нижчу стабільність структури у порівнянні з представниками PP4. 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 альфа-спіральных структур, а унікальна структура каталітичного домену характерна для всієї групи серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз.

За допомогою серверу I-TASSER було реконструйовано просторову структуру 17-ти рослинних протеїнфосфатаз (близько 60-ти промоделей). Якість моделей протеїнфосфатаз 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 протеїнфосфатаз 1, 2A, 4 усіх досліджених видів рослин.

Окрім просторової структури, вирішальним фактором структурно-функціональних особливостей протеїнфосфатаз є наявність і амінокислотне оточення відповідних функціонально важливих мотивів. Контрольне порівняння просторових структур підтвердило консервативність топології всіх вищезазначених мотивів у рослинних протеїнфосфатаз PP1, PP2A і PP4. Відмінності у глобулярних фрагментах рослинних протеїнфосфатаз 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. 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 Ile143 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.

Зважаючи на необхідність розширення та вдосконалення підходів дослідження протеїнфосфатаз, як такого тотального регуляторного компоненту клітини, надзвичайно актуальним і доцільним є мати певний набір молекулярних інструментів тонкого контролю активності індивідуальних протеїнфосфатаз. Такими інструментами можуть бути інгібітори протеїнфосфатаз з високим ступенем селективності, які відповідно, можуть використовуватися для дослідження різноманітних клітинних процесів [88, 173, 251, 290]. В результаті дослідження було узагальнено відомі дані, що стосуються механізмів взаємодії протеїнфосфатаз з лігандами і виявлено відсутність інформації щодо сполук, які проявляють специфічну спорідненість до різних представників рослинних протеїнфосфатаз. За результатами аналізу хімічних баз даних було відібрано 231-н 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-ть сполук. Серед контрольного набору лише 11-ть речовин мали не тільки біохімічне підтвердження активності, але й встановлений механізм ліганд-білкової взаємодії.

В результаті аналізу оточення сайтів та фізико-хімічних параметрів речовин було показано, що взаємодія інгібіторів з протеїнфосфатазами відбувається за участі від 1-го до 18-ти 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 оакадаїноювою 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 взаємодіє 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.

Реалізація вищезазначених етапів дозволила 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 протеїнфосфатаз, особливості амінокислотного складу, структури і будову інтерфейсів сайтів зв'язування. 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 дослідженні ліганд-білкових інтерфейсів PDB-структур протеїнфосфатаз PP1 і 2A з представників різних царств.

Так, в результаті молекулярного докінгу відомих інгібіторів 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. Оокадаїнова 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 оокадаїнової кислоти, займає друге місце за оціночними функціями докінгу і так само відрізняється більшою селективністю до протеїнфосфатази PP2A, ніж до протеїнфосфатази PP1. Ще трохи нижчі показники оціночних функцій докінгу має таутоміцин. Але він, на відміну від перших двох лідерів, відрізняється більшою селективністю до протеїнфосфатази PP1, ніж до протеїнфосфатаз PP2A і PP4, що цілком

співпадає з даними літератури. Варто зазначити, що за даними профільного аналізу, оадаїнова кислота, калікулін і таутоміцин, які є селективними інгібіторами протеїнофосфатаз PP1 та PP2A, також здатні пригнічувати активність рослинних PP3, PP5 і PP6. Це також, підтверджують аналіз результатів докінгу і наявних даних літератури. 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 PP5 і протеїнофосфатаз 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 підтвержене тільки за допомогою методів молекулярного моделювання. Зараз можна лише зробити припущення, що похідні кантаридину можуть знижувати активність протеїнофосфатази PP2A, що співпадає з даними літератури.

Верифікація зв'язування інгібіторів в проаналізованих сайтах, при симуляції молекулярної динаміки, свідчить про суттєве зменшення амплітуди їх молекулярних коливань в комплексах, як з тваринними, так і з рослинними протеїнофосфатазами і підтвержує припущення щодо вигідності утворених комплексів в порівнянні з вільним станом ліганду.

Також за результатами комбінації методів хемоінформаційного пошуку і молекулярного докінгу було запропоновано 5-ть перспективних похідних оадаїнової кислоти (CID44288019, CID3053530, CID44451975, CID10437923, CID10930902), як нові потенційні інгібітори протеїнофосфатаз PP1, PP2A і PP4.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі виконано порівняльне дослідження фосфатомів вищих рослин і тварин та встановлено спільні риси і відмінності у складі представників протеїнфосфатаз з різних царств. Відібрано групу протеїнфосфатаз, 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 протеїнфосфатаз, що складають фосфатом людини, було виконано біоінформаційне порівняння 680-х потенційних гомологів з вищих рослин, що підтвердило існування 175 індивідуальних рослинних протеїнфосфатаз (113 серин/треонін-, 36 тирозин- і 26 аспартат-специфічних протеїнфосфатаз) з *A. thaliana* і 29-ти потенційних протеїнфосфатаз з *P. patens*. Встановлено 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 (RTPN1, RTPN3, RTPN11, RTPN13, RTPRJ) і дуальних протеїнфосфатаз (CDC25, DUSP7, DSP14), потенційно здатних дефосфорилувати  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -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 оадаїнова 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 протеїнфосфатази 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 протеїнфосфатаз і їх рослинних гомологів з окадаїновою кислотою, мікроцистином, дигідромікроцистином, калікуліном, нодуларинном, мотупоринном, 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 протеїнфосфатаз 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 окадаїнової кислоти та результати біоінформаційного і хемоінформатичного пошуку, створена бібліотека лігандів, подібних за будовою до гетероциклічного ядра окадаїнової кислоти, та відібрано 5 речовин (PubChem: CID10437923, CID44288019, CID3053530, CID10930902, CID44451975), які запропоновано як нові потенційні інгібітори протеїнфосфатаз PP1, PP2A і PP4.



**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Almasry M, Jemaà M, Mischitelli M, Faggio C, Lang F. Stimulation of suicidal erythrocyte death by phosphatase inhibitor calyculin A. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40(1-2):163-171.
2. Almo SC, Bonanno JB, Sauder JM, Emtage S, Dilorenzo TP, Malashkevich V, Wasserman SR, Swaminathan S, Eswaramoorthy S, Agarwal R, Kumaran D, Madegowda M, Ragumani S, Patskovsky Y, Alvarado J, Ramagopal UA, Faber-Barata J, Chance MR, Sali A, Fiser A, Zhang Z, Lawrence DS, Burley SK. Structural genomics of protein phosphatases. *J Struct Funct Genomics*. 2007;8:121–140.
3. 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):699-711.
4. Andreassen PR, Lacroix FB, Villa-Moruzzi E, Margolis R. Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol*. 1998;141(5):1207-1215.
5. Andreeva A, Howorth D, Chandonia J-M, Brenner SE, Hubbard TJP, Chothia C, Murzin AG. Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:419–425.
6. Andreeva AV, Solov'eva OV, Kakuev DL, Kutuzov MA. Purification of plant protein phosphatase PP7 and evidence for its redox regulation. *Arch, Biochem, Biophys*. 2001;396(1):65-70.
7. Arabaci G, Guo X-C, Beebe KD, Coggeshall KM, Pei D. Alpha-haloacetophenone derivatives as photoreversible covalent inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *J, Am Chem Soc*. 1999;121:5085-5086.
8. Arundhati A, Feiler H, Traas J, Zhang H, Lunness PA, Doonan JH. A novel *Arabidopsis* type 1 protein phosphatase is highly expressed in male and female

tissues and functionally complements a conditional cell cycle mutant of *Aspergillus*. *Plant J.* 1995;7(5):823-834.

9. Ashokan KV, Mundaganur DS, Mundaganur YD. Catalase: phylogenetic characterization to explore protein cluster. *J Res Bioinformatics.* 2010;1:1-8.

10. Awotunde OS, Lechward K, Krajewska K, Zolnierowicz S, Muszyńska G. Interaction of maize (*Zea mays*) protein phosphatase 2A with tubulin. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(1):131-138.

11. Ayaydin F, Vissi E, Mészáros T, Miskolczi P, Kovács I, Fehér A, Dombrádi V, Erdödi F, Gergely P, Dudits D. Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant J.* 2000;23(1):85–96.

12. Baldin V, Cans C, Superti-Furga G, Ducommun B. Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase/ Possible implications for growth control? *Oncogene.* 1997;14(20):2485-2495.

13. Barford D, Das AK, Egloff MP. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998;27:133-164.

14. Barr FA, Elliott PR, Gruneberg U. Protein phosphatases and the regulation of mitosis. *J Cell Sci.* 2011;124(14):2323-2334.

15. Begley MJ, Dixon JE. The structure and regulation of myotubularin phosphatases. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(6):614-620.

16. Bennett PC, Zhao W, Ng KT. Concentration-dependent effects of protein phosphatase (PP) inhibitors implicate PP1 and PP2A in different stages of memory formation. *Neurobiol Learn Mem.* 2001;75(1):91-110.

17. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:36-42.

18. Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E. The *Arabidopsis* information resource: making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome. *Genesis.* 2015;53:474-485.

19. Bertini I, Calderone V, Fragai M, Luchinat C, Talluri E. Structural basis of serine/threonine phosphatase inhibition by the archetypal small molecules cantharidin and norcantharidin. *J Med Chem.* 2009;52(15):4838-4843.
20. Bishop GJ, Koncz C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell.* 2002;14:97–110.
21. Blakeslee JJ, Zhou HW, Heath JT, Skottke KR, Barrios JA, Liu SY, DeLong A. Specificity of RCN1-mediated protein phosphatase 2A regulation in meristem organization and stress response in roots. *Plant Physiol.* 2008;146(2):539-553.
22. Blume YaB, Lloyd CW, Yemets AI. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression, In: Blume YB, Baird WV, Yemets AI, Breviario D. (eds.) *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology.* Dordrecht, Netherland: Springer; 2008. p.145 – 159.
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.
24. Bollen M, Gerlich DW, Lesage B. Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol.* 2009;19:531–541.
25. Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, McGinnis SD, Merezuk Y, Raytselis Y, Sayers EW, Tao T, Ye J, Zaretskaya I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:29-33.
26. Borthwick EB, Zeke T, Prescott AR, Cohen PT. Nuclear localization of protein phosphatase 5 is dependent on the carboxy-terminal region. *FEBS Lett.* 2001;491(3):279-284.
27. Bourgoin S, Grinstein S. Peroxides of vanadate induce activation of phospholipase D in HL-60 cells. Role of tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1992;267(17):11908-11916.

28. Bourne PE, Gu J. *Structural Bioinformatics* (2nd edition). New York: Wiley-Blackwell; 2009. 1064 p.
29. Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bansal P, Bridge AJ, Poux S, Bougueleret L, Xenarios I. UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt knowledgebase: how to use the entry view. *Methods Mol Biol.* 2016;1374:23-54.
30. Boëhmer F, Szedlacsek S, Taberero L, Stman A,O, Hertog J. Protein tyrosine phosphatase structure–function relationships in regulation and pathogenesis. *FEBS J.* 2012;280(2):413-431.
31. Brewis ND, Street AJ, Prescott AR, Cohen PT. PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J.* 1993;12(3):987-996.
32. Briedis KM. *The Distribution and evolution of protein kinase and phosphatase families in the three superkingdoms of life.* Charleston SC, United States: Proquest, Umi Dissertation Publ; 2011.
33. Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoscek M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, Karplus M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem.* 2009;30:1545-1614.
34. Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 $\alpha$  to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol.* 2003;23:1292–1303.
35. Burley SK, Berman HM, Kleywegt GJ, Markley JL, Nakamura H, Velankar S. Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive. *Methods Mol Biol.* 2017;1607:627-641.
36. Camilleri C, Azimzadeh J, Pastuglia M, Bellini C, Grandjean O, Bouchez D. The Arabidopsis TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein

phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell*. 2002;14(4):833-845.

37. Ceulemans H, Vulsteke V, De Maeyer M, Tatchell K, Stalmans W, Bollen M. Binding of the concave surface of the Sds22 superhelix to the alpha 4/alpha 5/alpha 6-triangle of protein phosphatase-1. *J Biol Chem*. 2002;277(49):47331-47337.

38. Charbonneau H, Tonks NK. 1002 protein phosphatases? *Annu Rev Cell Bioi*. 1992;8:463-493.

39. Chen MJ, Dixon JE, Manning G. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal*. 2017;10(474). pii: eaag1796. doi: 10.1126/scisignal.aag1796.

40. Cheng XC, Ubukata M, Isono K. The structure of tautomycetin, a dialkylmaleic anhydride antibiotic. *J Antibiot*. 1990;43(7):890-896.

41. Cho HP, Liu Y, Gomez M, Dunlap J, Tyers M, Wang Y. The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules. *Mol Cell Biol*. 2005;25:4541-4551.

42. Cho SH1, Lee CH, Ahn Y, Kim H, Kim H, Ahn CY, Yang KS, Lee SR. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H<sub>(2)</sub>O<sub>(2)</sub> mediated cell signaling. *FEBS Lett*. 2004;560(1-3):7-13.

43. Cho US, Xu W. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature*. 2006;445:53-57.

44. Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;203(3):264-72.

45. Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, Langeberg LK, Hicks JB, Gallatin WM, Scott JD. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*. 1995;267:108-111.

46. Cohen PTW. Overview of protein serine/threonine phosphatases. In: Arino J, Alexander DR, Hohmann S. (eds.). *Protein Phosphatases. Topics in Current Genetics*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2004. p.1-20.

47. Colucci G, Apone F, Alyeshmerni N, Chalmers D, Chrispeels MJ. GCR1, the putative *Arabidopsis* G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(7):4736-4741.
48. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G. NPS@: network protein sequence analysis. *TIBS*. 2000;291:147-150.
49. Connor JH, Frederick D, Huang Hb, Yang J, Helps NR, Cohen PT, Nairn AC, DePaoli-Roach A, Tatchell K, Shenolikar S. Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J Biol Chem*. 2000;275(25):18670-18675.
50. Contour-Galceran MO, Sidhu A, Prévost G, Bigg D, Ducommun B. What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2007;115(1):1-12.
51. Corum JW, Hartung AJ, Stamey RT, Rundle SJ. Characterization of DNA sequences encoding a novel isoform of the 55 kDa B regulatory subunit of the type 2A protein serine/threonine phosphatase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 1996;31(2):419-427.
52. Dai J, Zhang J, Sun Y, Wu Q, Sun L, Ji C, Gu S, Feng C, Xie Y, Mao Y. Characterization of a novel human protein phosphatase 2C family member, PP2C $\kappa$ . *Int J Mol Med*. 2006;17(6):1117-1123.
53. Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2,0 Å resolution. *EMBO J*. 1996;15(24):6798-6809.
54. Dassault Systèmes BIOVIA. *Discovery studio modeling environment, release 2017*. San Diego: Dassault Systèmes; 2016.
55. Dawson JF, Holmes CF. Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Front Biosci*. 1999;4:646–658.
56. de Graaf C, Vischer HF, de Kloe GE, Kooistra AJ, Nijmeijer S, Kuijjer M, Verheij MH, England PJ, van Muijlwijk-Koezen JE, Leurs R, de Esch IJ. Small

and colorful stones make beautiful mosaics: fragment-based chemogenomics. *Drug Discov Today*. 2013;18(7-8):323-330.

57. de la Fuente van Bentem S, Vossen JH, Vermeer JE, de Vroomen MJ, Gadella TWJr, Haring MA, Cornelissen BJ. The subcellular localization of plant protein phosphatase 5 isoforms is determined by alternative splicing. *Plant Physiol*. 2003;133(2):702-712.

58. 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;33:1561-1564.

59. De Wulf P, Montani F, Visintin R. Protein phosphatases take the mitotic stage. *Curr, Op, Cell Biol*. 2009;21:806–815.

60. DeLong A. Switching the flip: protein phosphatase roles in signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*. 2006;9(5):470–477.

61. Demchuk O, Karpov P, Raspor P, Blume Ya. Molecular modelling of FtsZ proteins based on their homology in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* as the key stage of rational design of new antituberculous compounds. *Acta Biol Slovenica*. 2011;54:13-29.

62. Dias E, Louro H, Pinto M, Santos T, Antunes S, Pereira P, Silva MJ. Genotoxicity of microcystin-LR in *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Biomed Res Int*. 2014;2014:949521. doi: 10.1155/2014/949521.

63. Dickman MB, Yarden O. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*. 1999;26(2):99-117.

64. Diella F, Gould CM, Chica C, Via A, Gibson T. Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites – update. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:240–254.

65. Duke SO, Bajsa J, Pan Z. Omics methods for probing the mode of action of natural and synthetic phytotoxins. *J Chem Ecol*. 2013;39(2):333-347.

66. Durocher D, Jackson SP. The FHA domain. *FEBS Lett*, 2002;513(1):58-66.

67. Eldridge R, Casida JE. Cantharidin effects on protein phosphatases and the phosphorylation state of phosphoproteins in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;130(1):95-100.
68. Erdödi F, Tóth B, Hirano K, Hirano M, Hartshorne DJ, Gergely P. Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A *in vivo*. *Am J Physio.* 1995;269(5Pt 1):1176-1184.
69. 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;8:122-172.
70. Farkas I, Dombrádi V, Miskei M, Szabados L, Koncz C. *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci.* 2007;12:169-176.
71. Fauman EB, Saper MA. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem Sci.* 1996;21(11):413-417.
72. Favre B, Turowski P, Hemmings BA. Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13856-13863.
73. Ferreira PC, Hemerly AS, Van Montagu M, Inzé D. A protein phosphatase 1 from *Arabidopsis thaliana* restores temperature sensitivity of a *Schizosaccharomyces pombe* cdc25ts/wee1- double mutant. *Plant J.* 1993;4(1):81-87.
74. Flores E, Roy G, Patel D, Shaw A, Thomas ML. Nuclear localization of the PEP protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol.* 1994;14:4938–4946.
75. Fontanillo M, Köhn M. Microcystins: Synthesis and structure-activity relationship studies toward PP1 and PP2A. *Bioorg Med Chem.* 2018;26(6):1118-1126.
76. Forrest AR, Ravasi T, Taylor D, Huber T, Hume DA, Grimmond S, RIKEN GER Group, GSL Members. Phosphoregulators: protein kinases and protein phosphatases of mouse. *Genome Res.* 2003;13(6B):1443–1454.
77. Fujiki H, Suganuma M. Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors. *Prog Mol Subcell Biol.* 2009;46:221–254.



78. Garbers C, DeLong A, Deruère J, Bernasconi P, Söll D. A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis*. *EMBO J*. 1996;15(9):2115-2124.
79. Gardiner J, Overall R, Marc J. Plant microtubule cytoskeleton complexity: microtubule arrays as fractals. *J Exp Bot*. 2012;63(2):635-642.
80. Gascuel O, Steel M. Neighbor-joining revealed. *Mol Biol Evol*. 2006;23(11):1997–2000.
81. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM. (ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press; 2005. p.571-607.
82. Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, Chambers J, Davies M, Hersey A, Light Y, McGlinchey S, Michalovich D, Al-Lazikani B, Overington JP. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:1100–1107.
83. Gehringer MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett*. 2004;557(1-3):1-8.
84. Gentry MS, Li Y, Wei H, Syed FF, Patel SH, Hallberg RL, Pallas DC. A novel assay for protein phosphatase 2A (PP2A) complexes *in vivo* reveals differential effects of covalent modifications on different *Saccharomyces cerevisiae* PP2A heterotrimers. *Eukaryot Cell*. 2005;4(6):1029-1040.
85. Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci*. 1995;11(6):681-684.
86. Ghelis T, Bolbach G, Clodic G, Habricot Y, Miginiac E, Sotta B, Jeannette E. Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells. *Plant Physiol*. 2008;48:1668–1680.
87. Gingras AC, Caballero M, Zarske M, Sanchez A, Hazbun TR, Fields S, Sonenberg N, Hafen E, Raught B, Aebersold R. A novel, evolutionarily conserved

protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(11):1725-1740.

88. Gliksman NR, Parsons S. Okadaic acid induces interphase to mitotic-like microtubule dynamic instability by inactivating rescue salmon. *J Cell Biol*. 1992;119:1271-1276.

89. Gohla A, Birkenfeld J, Bokoch GM. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol*. 2005;7(1):21–29.

90. Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*. 1995;376(6543):745-753.

91. Goli S, Burgul M, Shaikh SA. Categorizing phenomenal features of gtpase kras using bioinformatic tools. *Tr Life Sci*. 2013;2(1):15-20.

92. Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:1178-1186.

93. Gordon JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods in Enzymol*. 1991;201:477-482.

94. Greg B, Trinkle–Mulcahy M, Ulke–Leme’e A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:234–244.

95. Guo F, Stanevich V, Wlodarchak N, Sengupta R, Jiang L, Satyshur KA, Xing Y. Structural basis of PP2A activation by PTPA, an ATP-dependent activation chaperone. *Cell Res*. 2014;24(2):190-203.

96. 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;8:2187-2196.

97. Hartshorn MJ, Verdonk ML, Chessari G, Brewerton S, C, Mooij WTM, Mortenson PN, Murray CW. Diverse, high-quality test set for the validation of protein-ligand docking performance. *J Med Chem*. 2007;50:726-741.

98. Hata Y, Timalsina S, Maimaiti S. Okadaic Acid: a tool to study the hippo pathway. *Mar Drugs*. 2013;11(3):896-902.
99. Hendlich M, Bergner A, Günther J, Klebe G. Relibase - design and development of a database for comprehensive analysis of protein-ligand interactions. *J Mol Biol*. 2003;326:607-620.
100. Hersey A, Chambers J, Bellis L, Patrícia Bento A, Gaulton A, Overington JP. Chemical databases: curation or integration by user-defined equivalence? *Drug Discov Today Technol*. 2015;14:17-24.
101. Ho BK, Brasseur R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. *BMC Structural Biology*. 2005;5:14-20.
102. Höltje H-D, Sippl W, Rognan D, Folkers G. *Molecular modeling: basic principles and applications, 3rd Edition*. Hoboken NJ: John Wiley & Sons; 2008.
103. Honkanen RE, Golden T. Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era. *Curr Med Chem*. 2002;22:2055-2075.
104. Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M, Boynton AL. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J Biol Chem*. 1990; 265(32):19401–19404.
105. Hsin JP1, Xiang K1, Manley JL2. Function and control of RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation in vertebrate transcription and RNA processing. *Mol Cell Biol*. 2014;34(13):2488-2498.
106. Huang X, Honkanen RE. Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase PP7, that is homologous to *Drosophila* retinal degeneration C gene product (*rdgC*). *J Biol Chem*. 1998;273(3):1462-1468.
107. Huhn J, Jeffrey PD, Larsen K, Rundberget T, Rise F, Cox NR, Arcus V, Shi Y, Miles CO. A structural basis for the reduced toxicity of dinophysistoxin-2. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(11):1782-1786.
108. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14(1):33-8.

109. Huson D, Linz S. Autumn algorithm – computation of hybridization networks for realistic phylogenetic trees. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 2018;15(2):398-410.
110. Huson DH, Scornavacca C. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic Biology.* 2012;61(6):1061-1067.
111. Imoto M, Takeya H, Sawa T, Hayashi C, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa K. Dephostatins, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces* I. Taxonomy, isolation, and characterization. *J Antibiot.* 1993;46(9):1342-1346.
112. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J Chem Inf Model.* 2012;52(7):1757–1768.
113. Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, Hartshorne DJ. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159(3):871–877.
114. Jacinto E, Guo B, Arndt KT, Schmelzle T, Hall MN. TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell.* 2001;8:1017–1026.
115. Jackson K, Soll D. Mutations in a new *Arabidopsis* cyclophilin disrupt its interaction with protein phosphatase 2A. *Mol Gen Genet.* 1999;262:830–838.
116. Jagiello I, Beullens M, Stalmans W, Bollen M. Subunit structure and regulation of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *J Biol Chem.* 1995;270(29):17257-17263.
117. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling. *Biochem J.* 2001;353(3):417-439.
118. Jayaram B, Singh T, Mukherjee G, Mathur A, Shekhar S, Shekhar V. Sanjeevini: a freely accessible web-server for target directed lead molecule discovery. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:7-14.

119. Jiang Y. Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(2):440–449.
120. Jiang ZX, Zhang ZY. Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(2):263-272.
121. Johansson MU, Zoete V, Michielin O, Guex N. Defining and searching for structural motifs using DeepView/Swiss-PdbViewer. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:173, doi: 10.1186/1471-2105-13-173.
122. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:5-9.
123. Jynsdyttir S, Rasmussen K. The consistent force field. Part 6: an optimized set of potential energy functions for primary amines. *New J Chem.* 2000;24:243–247.
124. Kadota Y, Shirasu K. The HSP90 complex of plants. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(3):689-697.
125. Kalev P, Sablina AA. Protein phosphatase 2A as a potential target for anticancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(1):38-46.
126. Karni R, Mizrachi S, Reiss-Sklan E, Gazit A, Livnah O, Levitzki A. The pp60c-Src inhibitor PP1 is non-competitive against ATP. *FEBS Lett.* 2003;537(1-3):47-52.
127. Karpov PA, Brytsun VM, Rayevsky AV, Demchuk OM, Pydiura NO, Ozheredov SP, Samofalova DA, Spivak SI, Yemets AI, Kalchenko VI, Blume YaB. High-throughput screening of new antimitotic compounds based on potential of virtual organization CSLabGrid. *Nauka innov.* 2015;11(1):92-100.
128. Karpov PA, Nadezhdina ES, Yemets AI, Matusov VG, Nyporko AY, Shashina NYu, Blume YaB. Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases. *BMC Genomics.* 2010;11(1):S14. doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14.
129. 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.

130. 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.

131. Kelker MS, Page R, Peti W. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to nodularin-R and tautomycin: a novel scaffold for structure-based drug design of serine/threonine phosphatase inhibitors. *J Mol Biol.* 2009;385(1):11-21.

132. Kennelly PJ. Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem J.* 2003;370(2):373-389.

133. Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S, Gribskov M. The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2002;129(2):908–925.

134. Kerk D, Templeton G, Moorhead GBG. Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant Physiol.* 2008;146:351–367.

135. Kersey PJ, Allen JE, Armean I, Boddu S, Bolt BJ, Carvalho-Silva D, Christensen M, Davis P, Falin LJ, Grabmueller C, Humphrey J, Kerhornou A, Khobova J, Aranganathan NK, Langridge N, Lowy E, McDowall MD, Maheswari U, Nuhn M, Ong CK, Overduin B, Paulini M, Pedro H, Perry E, Spudich G, Tapanari E, Walts B, Williams G, Tello-Ruiz M, Stein J, Wei S, Ware D4, Bolser DM, Howe KL, Kulesha E, Lawson D, Maslen G, Staines DM. Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. *Nucleic Acids Res.* 2015;44(1):574-580.

136. Kim DH, Kang JG, Yang SS, Chung KS, Song PS, Park CM. A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2002;14:3043-3056.

137. Kim ND, Park ES, Kim YH, Moon SK, Lee SS, Ahn SK, Yu DY, No KT, Kim KH. Structure-based virtual screening of novel tubulin inhibitors and their characterization as anti-mitotic agents. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(19):7092-7100.
138. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH. PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(1):1202-1213.
139. Kim SJ, Ryu SE. Structure and catalytic mechanism of human protein tyrosine phosphatase. *BMB Rep*. 2012;45(12):693–699.
140. Koes DR, Camacho CJ. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:409-414.
141. Koh CG, Oon SH, Brenner S. Serine/threonine phosphatases of the pufferfish, *Fugu rubripes*. *Gene*. 1997;198(1-2):223–228.
142. Kramer IM. Chapter 18. Protein Phosphatases. In: Kramer IM. (eds.). *Signal Transduction (Third Edition)*. Academic Press; 2016. p.935-995.
143. Krzywińska E, Bucholc M, Kulik A, Ciesielski A, Lichocka M, Dębski J, Ludwików A, Dadlez M, Rodriguez PL, Dobrowolska G. Phosphatase ABI1 and okadaic acid-sensitive phosphoprotein phosphatases inhibit salt stress-activated SnRK2.4 kinase. *BMC Plant Biol*. 2016;16(1):136. doi: 10.1186/s12870-016-0817-1.
144. 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;5:6-16.
145. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2015;33(7):1870-1874.
146. Kurisaki T, Magae J, Isono K, Nagai K, Yamasaki M. Effects of tautomycin, a protein phosphatase inhibitor, on recycling of mammalian cell surface molecules. *J Antibiot*. 1992;45(2):252–257.

147. Kutuzov MA, Andreeva AV. Noncompetitive inhibition of plant protein Ser/Thr phosphatase PP7 by phosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283:93–96.
148. Kutuzov MA, Evans DE, Andreeva AV. Expression and characterization of PP7, a novel plant protein Ser/Thr phosphatase distantly related to RdcC/PPEF and PP5. *FEBS Lett.* 1998;440(1-2):147-152.
149. Kwiek NC, Thacker DF, Datto MB, Megosh HB, Haystead TA. PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K. *Cell Signal.* 2006;18(10):1769-1778.
150. Kwon YG, Lee SY, Choi Y, Greengard P, Nairn AC. Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(6):2168-2173.
151. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23:2947–2948.
152. Larsen PB, Cancel JD. Enhanced ethylene responsiveness in the *Arabidopsis eer1* mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A A regulatory subunit, RCN1. *Plant J.* 2003;34:709–718.
153. Lavecchia A, Di Giovanni C, Novellino E. CDC25A and B dual-specificity phosphatase inhibitors: potential agents for cancer therapy. *Curr Med Chem.* 2009;16(15):1831-1849.
154. Lengauer T, Lemmen C, Rarey M, Zimmermann M. Novel technologies for virtual screening. *Drug Discovery Today.* 2004;9:27–34.
155. Lesage B, Beullens M, Ceulemans H, Himpens B, Bollen M. Determinants of the nucleolar targeting of protein phosphatase-1. *FEBS Lett.* 2005;579(25):5626-5630.
156. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* 2014;43:257–260.



157. Li X, Oghi KA, Zhang J, Kronen A, Bush KT, Glass CK, Nigam SK, Aggarwal AK, Maas R, Rose DW, Rosenfeld MG. Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature*. 2003;426(6964):247-254.
158. Li Y, M, Mackintosh C, Casida JE. Protein phosphatase 2A and its [3H]cantharidin/[3H]endothall thioanhydride binding site, Inhibitor specificity of cantharidin and ATP analogues. *Biochem Pharmacol*. 1993;46(8):1435–1443.
159. Lillo C, Kataya A,R, Heidari B, Creighton M,T, Nemie-Feyissa D, Ginbot Z, Jonassen E,M, Protein phosphatases PP2A, PP4 and PP6: mediators and regulators in development and responses to environmental cues. *Plant Cell Environ*. 2014;37(12):2631-248.
160. Lindqvist A, Källström H, Lundgren A, Barsoum E, Rosenthal CK. 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):35-45.
161. Lindvall MK, Pihko PM, Koskinen AM. The binding mode of calyculin A to protein phosphatase-1. A novel spiroketal vector model. *J Biol Chem*. 1997;272(37):23312-23316.
162. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Tod Technol*. 2004;1(4):337-341.
163. Liu X, Zheng H, Qu CK. Protein tyrosine phosphatase Shp2 (Ptpn11) plays an important role in maintenance of chromosome stability. *Cancer Res*. 2012;72(20):5296-5306.
164. Llorian M, Beullens M, Andrés I, Ortiz JM, Bollen M. SIPP1, a novel pre-mRNA splicing factor and interactor of protein phosphatase-1. *Biochem J*. 2004;378(1):229-238.
165. Luan S. Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2003;54:63–92.
166. Luo J, Pato MD, Riordan JR, Hanrahan JW. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am J Physiol*. 1998;274(5 Pt 1):C1397-410.

167. 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):137-140.
168. MacKintosh C, MacKintosh RW. Inhibitors of protein kinases and phosphatases. Trends Biochem, Sci. 1994;19(11):444-448.
169. Mailhes JB, Hilliard C, Fuseler JW, London SN. Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, induces premature separation of sister chromatids during meiosis I and aneuploidy in mouse oocytes *in vitro*. Chromosome Res. 2003;11(6):619-631.
170. 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;16(13):1063-1077.
171. Matsushima R, Yoshizawa S, Watanabe MF, Harada K, Furusawa M, Carmichael WW, Fujiki H. *In vitro* and *in vivo* effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 1990;171(2):867-874.
172. Maynes JT, Luu HA, Cherney MM, Andersen RJ, Williams D, Holmes CF, James MN. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins. J Mol Biol 2006;356(1):111-120.
173. McConnell JL, Wadzinski BE. Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development. Mol Pharmacol. 2009;75(6):1249–1261.
174. McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM. The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. J Biol Chem. 1996;271(36):22081-22089.
175. Meek S, Morrice N, MacKintosh C. Microcystin affinity purification of plant protein phosphatases: PP1C, PP5 and a regulatory A-subunit of PP2A. FEBS Lett. 1999;457(3):494-498.

176. Mehta S, Aye-Han NN, Ganesan A, Oldach L, Gorshkov K, Zhang J. Calmodulin-controlled spatial decoding of oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signals by calcineurin. *eLife*. 2014;3:e03765. doi: 10.7554/eLife.03765.
177. Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev*. 2005;19:1401–1415.
178. Meiselbach H, Sticht H, Enz R. Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: molecular description of binding specificities identifies interacting proteins. *Chem Biol*. 2006;13:49–59.
179. Melo F, Feytmans E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J Mol Biol*. 1998;277:1141–1152.
180. Mikalsen SO, Kaalhus O. Properties of pervanadate and permolybdate connexin43, phosphatase inhibition, and thiol reactivity as model systems. *J Biol Chem*. 1998;273:10036-10045.
181. Miskei M, Ádám C, Kovács L, Karányi Z, Dombrádi V. Molecular evolution of phosphoprotein phosphatases in *Drosophila*. *PLoS One*. 2011;6(7):e22218. doi: 10.1371/journal.pone.0022218.
182. Mitsuhashi S, Shima H, Tanuma N, Matsuura N, Takekawa M, Urano T, Kataoka T, Ubukata M, Kikuchi K. Usage of tautomycin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1), reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in vivo. *J Biol Chem*. 2003;278(1):82-88.
183. Moller SG, Kim YS, Kunkel T, Chua NH. PP7 is a positive regulator of blue light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2003;15(5):1111-1119.
184. Moorhead GB, De Wever V, Templeton G, Kerk D. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J*. 2009;4(172):401–409.
185. Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemée A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):234–244.
186. Mora-Garcia S, Vert G, Yin Y, Caño-Delgado A, Cheong H, Chory J. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 2004;18(4):448-460.

187. Mount DW. Comparison of the PAM and BLOSUM amino acid substitution matrices. *CSH Protoc.* 2008;6:ip59. doi: 10.1101/pdb,ip59.
188. Mumby M, Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev.* 1993;73:673–699.
189. Mumby M. The 3D Structure of protein phosphatase 2A: new insights into a ubiquitous regulator of cell signaling. *ACS Chem Biol.* 2007;2(2):99–103.
190. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000.
191. Nören-Müller A, Reis-Corrêa I,Jr, Prinz H, Rosenbaum C, Saxena K, Schwalbe HJ, Vestweber D, Cagna G, Schunk S, Schwarz O, Schiewe H, Waldmann H. Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(28):10606-10611.
192. Nygren J, Scott JD. Regulation of the phosphatase PP2B by protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(5):1313-1319.
193. Oaks J, Ogretmen B. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. *Front Oncol.* 2015;4:388. doi: 10.3389/fonc.2014.00388.
194. Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, Nishiwaki R, Tatematsu M, Kim SJ, Carmichael WW, Fujiki H. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Res.* 1994;54(24):6402-6406.
195. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 2006;127(3):635-648.
196. Olson SA. EMBOSS opens up sequence analysis, European molecular biology open software suite. *Brief Bioinform.* 2002;3(1):87-91.
197. Oziol L, Bouaïcha N. First evidence of estrogenic potential of the cyanobacterial heptotoxins the nodularin-R and the microcystin-LR in cultured mammalian cells. *J Hazard Mater.* 2010;174(1-3):610-615.

198. País SM, Téllez-Iñón MT, Capiati DA. Serine/threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. *Plant Signal Behav.* 2009;4(11):1013-1015.
199. Parker L, Gross S, Beullens M, Bollen M, Bennett D, Alphey L. Functional interaction between nuclear inhibitor of protein phosphatase type 1 (NIPP1) and protein phosphatase type 1 (PP1) in *Drosophila*: consequences of over-expression of NIPP1 in flies and suppression by co-expression of PP1. *Biochem J.* 2002;368(Pt3):789-797.
200. Pastuglia M, Azimzadeh J, Camilleri C, Bouchez D. Forward and reverse genetics in *Arabidopsis*: isolation of cytoskeletal mutants. *Cell Biol Int.* 2003;27(3):249-250.
201. Peng S, Lin X, Guo Z, Huang N. Identifying multiple-target ligands via computational chemogenomics approaches. *Curr Top Med Chem.* 2012;12:1363–1375.
202. Prashant VT, Uddhav SC, Madura SM, Vishal PD, Renuka RK. Secondary structure prediction and phylogenetic analysis of salt tolerant proteins. *Global J Mol Sci.* 2010;5:30-36.
203. Prickett TD, Brautigan DL. The alpha4 regulatory subunit exerts opposing allosteric effects on protein phosphatases PP6 and PP2A. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30503-30511.
204. Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics.* 2013;29(7):845-54.
205. Pujol G, Baskin TI, Casamayor A, Cortadellas N, Ferrer A, Ariño J. The *Arabidopsis thaliana* PPX/PP4 phosphatases: molecular cloning and structural organization of the genes and immunolocalization of the proteins to plastids. *Plant Mol, Biol.* 2000;44(4):499-511.

206. Ramachandran KI, Deepa G, Namboori K. *Computational chemistry and molecular modeling: principles and application*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2008.
207. Rashotte AM, DeLong A, Muday GK, Kwak JM. Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *Plant Cell*. 2001;13(7):1683-1697.
208. Rayapureddi JP, Kattamuri C, Steinmetz BD, Frankfort BJ, Ostrin EJ, Mardon G, Hegde RS. Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature*. 2003;426(6964):295–298.
209. Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: The european molecular biology open software suite. *Trends in Genetics*. 2000;6:276–277.
210. Rose PW, Prlić A, Altunkaya A, Bi C, Bradley AR, Christie CH, Costanzo LD, Duarte JM, Dutta S, Feng Z, Green RK, Goodsell DS, Hudson B, Kalro T, Lowe R, Peisach E, Randle C, Rose AS, Shao C, Tao YP, Valasatava Y, Voigt M, Westbrook JD, Woo J, Yang H, Young JY, Zardecki C, Berman HM, Burley SK. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(1):271–281.
211. Roy A, Kucukural A, Zhang Y, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 2010;5:725–738.
212. Roy J, Cyert MS. Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal*. 2009;2(10):re9. doi: 10.126/scisignal.2100re9.
213. Roy J, Li H, Hogan PG, Cyert MS. A conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and *in vivo* function. *Mol Cell*. 2007;25:889–901.
214. Ruark E, Snape K, Humburg P, Loveday C, Bajrami I, Brough R, Rodrigues DN, Renwick A, Seal S, Ramsay E, Duarte Sdel V, Rivas MA, Warren-Perry M, Zachariou A, Champion-Flora A, Hanks S, Murray A, Ansari Pour N, Douglas J, Gregory L, Rimmer A, Walker NM, Yang TP, Adlard JW, Barwell J, Berg

J, Brady AF, Brewer C, Brice G, Chapman C, Cook J, Davidson R, Donaldson A, Douglas F, Eccles D, Evans DG, Greenhalgh L, Henderson A, Izatt L, Kumar A, Lalloo F, Miedzybrodzka Z, Morrison PJ, Paterson J, Porteous M, Rogers MT, Shanley S, Walker L, Gore M, Houlston R, Brown MA, Caufield MJ, Deloukas P, McCarthy MI, Todd JA; Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Collaboration; Wellcome Trust Case Control Consortium, Turnbull C, Reis-Filho JS, Ashworth A, Antoniou AC, Lord CJ, Donnelly P, Rahman N. Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature*. 2013;493:406-410.

215. Ryu JS, Kim JI, Kunkel T, Kim BC, Cho DS, Hong SH, Kim SH, Fernández AP, Kim Y, Alonso JM, Ecker JR, Nagy F, Lim PO, Song PS, Schäfer E, Nam HG. Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell*. 2005;120:395-406.

216. Sagara J, Higuchi T, Hattori Y, Moriya M, Sarvotham H, Shima H, Shirato H, Kikuchi K, Taniguchi S. Scapinin, a putative protein phosphatase-1 regulatory subunit associated with the nuclear nonchromatin structure. *J Biol Chem*. 2003;278(46):45611-45619.

217. Saino T, Watson EL. Inhibition of serine/threonine phosphatase enhances arachidonic acid-induced  $[Ca^{2+}]_i$  via protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296(1):88-96.

218. Sakoff JA, Ackland SP, Baldwin ML, Keane MA, McCluskey A. Anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition of a new generation of cantharidin analogues. *Invest New Drugs*. 2002;20(1):1-11.

219. Samofalova DA, Karpov PA, Raevsky AV, Blume YaB. Protein phosphatases associated with the microtubules regulation: spatial structure reconstruction and analysis. *Cell Bio Int*. [Preprint] 2017. Available from: doi: 10.1002/cbin.10810.

220. Samofalova DA, Karpov PA, Blum Ya. Bioinformatic Comparison of Human and Higher Plant Phosphatomes. *Cytol Genet*. 2015;49(4):3-10.

221. 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 Genet.* 2011;45(3):153–162.
222. Sanz P, Alms GR, Haystead TA, Carlson M. Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol.* 2000;20(4):1321-1328.
223. Schüttelkopf AW, van Aalten DM. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004;60:1355–1363.
224. Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Tr Plant Sci.* 2004;9(5):236-243.
225. Shenolikar S. Analysis of protein phosphatases: toolbox for unraveling cell signaling networks. *Methods Mol Biol.* 2007;365:1-8.
226. Sheremet YaA, Yemets AI, Verbelen J-P, Blume YaB. The effect of okadaic acid on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubule organization in its cells. *Cytol Genet.* 2009;43(1):1–8.
227. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell.* 2009;139(3):468–484.
228. Sines T, Granot-Attas S, Weisman-Welcher S, Elson A. Association of tyrosine phosphatase epsilon with microtubules inhibits phosphatase activity and is regulated by the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 2007;27(20):7102-7112.
229. Smith RD, Walker JC. Plant protein phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996;47:101-125.
230. Song Q, Lavin MF. Calyculin A, a potent inhibitor of phosphatases-1 and -2A, prevents apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;190(1):47–55.
231. Spartz AK, Ren H, Park MY, Grandt KN, Lee SH, Murphy AS, Sussman MR, Overvoorde PJ, Gray WM. SAUR Inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2014;26(5):2129-2142.



232. Stacklies W, Seifert C, Graeter F. Implementation of force distribution analysis for molecular dynamics simulations. *BMC Bioinformatics*. 2011;101:1–5.
233. Stefansson B, Brautigan DL. Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets I $\kappa$ B $\epsilon$ . *J Biol Chem*. 2006;281:22624–22634.
234. Stern A, Privman E, Rasis M, Lavi S, Pupko T. Evolution of the metazoan protein phosphatase 2C superfamily. *J Mol Evol*. 2007;64(1):61-70.
235. Stierand K, Rarey M. PoseView -- molecular interaction patterns at a glance. *J Cheminform*. 2010;2(1):50-55.
236. Stubbs MD, Tran HT, Atwell A, Smith CS, Olson D, Moorhead GB. Purification and properties of *Arabidopsis thaliana* type 1 protein phosphatase (PP1). *Biochim Biophys Acta*. 2001;1550(1):52-63.
237. Suganuma M, Fujiki H, Furuya-Suguri H, Yoshizawa S, Yasumoto S, Kato Y, Fusetani N, Sugimura T. Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin. *Cancer Res*. 1990;50(12):3521-3525.
238. Swingle M, Ni L, Honkanen RE. Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol Biol*. 2007;365:23-38.
239. Szklarczyk D, Morris J,H, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:362-368.
240. Takai A, Bialojan C, Troschka M, Rüegg C. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett*. 1987;217(1):81–84.
241. Takemiya A, Kinoshita T, Asanuma M, Shimazaki K. Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(36):13549–13554.

242. Tanti J, Grémeaux T, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases-1 and -2A, on glucose transport and metabolism in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1991;266(4):2099–2103.
243. Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*. 2004;84:137–167.
244. Templeton GW, Nimick M, Morrice N, Campbell D, Goudreault M, Gingras AC, Takemiya A, Shimazaki K, Moorhead GB. Identification and characterization of AtI-2, an *Arabidopsis* homologue of an ancient protein phosphatase 1 (PP1) regulatory subunit. *Biochem J*. 2011;435:73-83.
245. Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominguez R. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*. 2004;429:780–784.
246. Tiganis T, Bennett AM, Ravichandran KS, Tonks NK. Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*. 1998;18:1622–1634.
247. Tillmann U, Wagner J, Boerboom D, Westphal H, Tremblay ML. Nuclear localization and cell cycle regulation of a murine protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*. 1994;14(5):3030-3040.
248. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:833–846.
249. Tootle TL, Silver SJ, Davies EL, Newman V, Latek RR, Mills IA, Selengut JD, Parlikar BE, Rebay I. The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature*. 2003;426(6964):299-302.
250. Tournebize J, Sapin-Minet A, Schneider R, Boudier A, Maincent P, Leroy P. Simple spectrophotometric method for quantitative determination of gold in nanoparticles. *Talanta*. 2011;83(5):1780-1783.
251. Tournebize R, Andersen SSL, Verde F, Dore 'e M, Karsenti E, Hyman AA. Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *EMBO J*. 1997;16:5537–5549.

252. Tran HT, Ulke A, Morrice N, Johannes CJ, Moorhead GB. Proteomic characterization of protein phosphatase complexes of the mammalian nucleus. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3:257-265.
253. Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(6):623-631.
254. Trinkle-Mulcahy L, Sleeman JE, Lamond AI. Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells. *J Cell Sci*. 2001;114(23):4219-4228.
255. Trush VV, Tanchuk VYu, Cherenok SO, Kalchenko VI, Vovk AI. Calix[4]arene  $\alpha$ -hydroxymethylphosphonic acids as potential inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *J Org Pharm Chem*. 2014;45:39-42.
256. Tsou RC, Bence KK. Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. *Front Neurosci*. 2012;6:192. doi: 10.3389/fnins.2012.00192.
257. Uhrig RG, Labandera A-M, Moorhead GB. *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines. *Trends Plant Sci*. 2013;18(9):505–513.
258. Usui H, Inoue R, Tanabe O, Nishito Y, Shimizu M, Hayashi H, Kagamiyama H, Takeda M. Activation of protein phosphatase 2A by cAMP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of the 74-kDa B'' regulatory subunit *in vitro* and identification of the phosphorylation sites. *FEBS Lett*. 1998;430:312-316.
259. Vagnarelli P, Hudson DF, Ribeiro SA, Trinkle-Mulcahy L, Spence JM, Lai F, Farr CJ, Lamond AI, Earnshaw WC. Condensin and Repo-Man-PP1 cooperate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat Cell Biol*. 2006;8(10):1133-1142.
260. Valdiglesias V, Prego-Faraldo MV, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. Okadaic acid: more than a diarrheic toxin. *Mar. Drugs*. 2013;11(11):4328-4349.
261. Vale C, Botana L. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins. *FEBS J*. 2008;275:6060–6066.

262. Venselaar H, Krieger E, Vriend G. Homology modeling. In: Bourne PE, Weissig H. (eds.). *Structural Bioinformatics. Second Edition*. Hoboken NJ: John Wiley & Sons; 2009. p.715-732.
263. Verdonk MLG, Chessari JC, Cole MJ, Hartshorn CW, Murray JWM, Nissink RD, Taylor R. Modeling water molecules in protein-ligand docking using GOLD. *J Med Chem*. 2005;48:6504-6515.
264. Wakimoto T, Egami Y, Abe I. Calyculin: Nature's way of making the sponge-derived cytotoxin. *Nat Prod Rep*. 2016;33(6):751-760.
265. Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*. 2003;278:18817-18823.
266. Wang H, Chevalier D, Larue C, Ki Cho S, Walker JC. The Protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*. 2007;5:e0106.
267. Wang R, Kaul A, Sperry AO. TLRR (Irrc67) interacts with PP1 and is associated with a cytoskeletal complex in the testis. *Biol Cell*. 2010;102(3):173-189.
268. Wang WQ, Sun JP, Zhang ZY. An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily. *Curr Top Med Chem*. 2003;3(7):739-748.
269. 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;56:741-752.
270. Wolstencroft K, Lord P, Taberero L, Brass A, Stevens R. Protein classification using ontology classification. *Bioinformatics*. 2006;22(14):530-538.
271. Wu JQ, Guo JY, Tang W, Yang CS, Freel CD, Chen C, Nairn AC, Kornbluth S. PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(5):644-651.
272. Xing K, Raza A, Löfgren S, Fernando MR, Ho YS, Lou MF. 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):545–555.

273. Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey P, Chao Y, Zheng L, Li Z, Strack S, Stock J, Shi Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor inducing toxins. *Cell*. 2006;127:341–352.

274. Xu Y, Xing Y, Chen Y, Chao Y, Lin Z, Fan E, Yu JW, Strack S, Jeffrey PD, Shi Y. Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*. 2006;127(6):1239-1251.

275. Yang J, Roe SM, Cliff MJ, Williams MA, Ladbury JE, Cohen PT, Barford D. Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *EMBO J*. 2005;24(1):1-10.

276. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*. 2015;12:7-8.

277. Yang Q, Tonks NK. Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4,1, ezrin and talin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(14):5949–5953.

278. Yeo M, Lee SK, Lee B, Ruiz EC, Pfaff SL, Gill GN. Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression. *Science*. 2005;307:596–600.

279. Yeo M, Lin PS, Dahmus ME, Gill GN. A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. *J Biol Chem*. 2003;278(28):26078-26085.

280. Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*. 2005;120(2):249-259.

281. Yu J, Ke T, Tehrim S, Sun F, Liao B, Hua W. PTGBase: an integrated database to study tandem duplicated genes in plants. *Database (Oxford)*. 2015;pii:bav017. doi: 10.1093/database/bav017.

282. Zbell AP., Corden S, Helquist P, Stauffacher CV, Wiest O. Inhibition studies with rationally designed inhibitors of the human low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Bioorg Med Chem.* 2004;12(8):1867-1880.
283. Zeke T, Morrice N, Vázquez-Martin C, Cohen PT. Human protein phosphatase 5 dissociates from heat-shock proteins and is proteolytically activated in response to arachidonic acid and the microtubule-depolymerizing drug nocodazole. *Biochem J.* 2005;385(1):45-56.
284. Zeng K, Bastos RN, Barr FA, 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;191:1315–1332.
285. Zhang M, Cho EJ, Burstein G, Siegel D, Zhang Y. Selective inactivation of a human neuronal silencing phosphatase by a small molecule inhibitor. *ACS Chem Biol.* 2011;6(5):511-519.
286. Zhang M, Liu J, Kim Y, Dixon JE, Pfaff SL, Gill GN, Noel JP, Zhang Y. Structural and functional analysis of the phosphoryl transfer reaction mediated by the human small C-terminal domain phosphatase, Scp1. *Protein Sci.* 2010;19(5):974–986.
287. Zhang M, Yogesha SD, Mayfield JE, Gill GN, Zhang Y. Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers. *FEBS J.* 2013;280(19):4739-4760.
288. Zhang W, Shi L. Evolution of the PPM-family protein phosphatases in *Streptomyces*: duplication of catalytic domain and lateral recruitment of additional sensory domains. *Microbiology.* 2004;150(2):4189-4197.
289. Zhang Y, Kim Y, Genoud N, Gao J, Kelly JW, Pfaff SL, Gill GN, Dixon JE, Noel JP. Determinants for dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by Scp1. *Mol Cell.* 2006;24:759-770.
290. Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:209-234.

291. Zhou HW, Nussbaumer C, Chao Y, DeLong A. Disparate roles for the regulatory A subunit isoforms in *Arabidopsis* protein phosphatase 2A. *Plant Cell*. 2004;16(3):709-722.

292. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O. SwissParam, a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem*. 2011;32(11):2359-2368.

293. Самофалова Д, Карпов П, Блюм Я. Пошук рослинних молекулярних мішеней селективних інгібіторів серин-треонін специфічних протеїнфосфатаз. *Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна*. 2014;68:392-404.

294. Самофалова ДО, Карпов ПА, Раєвський ОВ, Блюм ЯБ. Реконструкція просторової структури комплексів рослинних протеїнфосфатаз типу 1, 2а, 4 з мікроцистином-LR. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:339-344.

295. Самофалова ДА, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Особливості ліганд-білкової взаємодії інгібіторів протеїнфосфатаз, потенційно пов'язаних з цитоскелетом. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:229-233.

296. Самофалова ДА, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Поиск производных ингибиторов протеинфосфатаз, потенциально связанных с регуляцией цитоскелета растений. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;15:87-91.

297. 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.

Додаток А

PP1	ARATH	LSEGEIRQLCAVSK	EIFLQQPNLLE	LEAPTKICGDIHGQ	YSDDLRLFEYGG	FPPEANYLFLGDV	DRGKQSIETICLL	LAYKIKYPENF	FLIRGNHESAS	INRIYGFYDECK	RRFN-VRLWKI	FTDCFNCLPVA	ALID		
PP2A	ARATH	LGEADVKILCDQAK	AILVEEYNVQPV	KCPVTVCGDIHGQ	FYDLIELFRIGG	NAPDTNYLFMGD	VDRGYYSVETV	SLLVALKVRYR	DRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYFTDLFD	YLPPLTALIE		
PPX1	ARATH	LSESEVKALCLKAM	EILVEESNVQR	VDAPVTLCGDIHG	QFYDMMLFKVGG	DCPKTNYLFMGD	FVDRGYYSVET	FLLLALKVRYP	DRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGSSN	VWRYCTDIFD	YMSLSAVVE		
PP2A	MAIZE	LPEAEVKVLCQAK	AILMEEWNVQPV	RCPVTVCGDIHGQ	FYDLIELFRIGG	SDPTNYLFMGD	VDRGYYSVETV	SLLVALKVRYR	DRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYFTDLFD	YLPPLTALIE		
PP2A	WHEAT	LPEAEVKVLCQAK	AILMEEWNVQPV	RCPVTVCGDIHGQ	FYDLIELFRIGG	SDPTNYLFMGD	VDRGYYSVETV	SLLVALKVRYR	DRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYFTDLFD	YLPPLTALIE		
PP2A	ORYSJ	LGEAEVRLCQAKA	ILMEEWNVQPV	RCPVTVCGDIHGQ	FYDLIELFRIGG	SDPTNYLFMGD	VDRGYYSVETV	SLLVALKVRYR	DRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYFTDLFD	YLPPLTALVE		
PP4	TOBAC	LSEAEVKTLCDAQ	AG--YTVRMNVQ	PVKCPVTVCGDIH	DSFYDLIELFRIG	GNA	PD	TNYLFMGD	VDRGYYSVETV	TLLVALKVRYR	DRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	IWKYFTDLFD	YLPPLTALIE
PP2A	TOBAC	LSEQEVRGLCEKA	KEILMEESNVQPV	KSPVTICGDIHGQ	FHDIAELFRIGG	KCPDTNYLFMGD	VDRGYYSVETV	TLLVALKVRYP	QRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYFTDLFD	YFPPLTALVE		
PP2A	MEDSA	LSEQQVKELCEKA	KEILMDESNVQPV	KSPVTICGDIHGQ	FHDIAELFRIGG	KCPDTNYLFMGD	VDRGYYSVETV	TLLVALKVRYP	QRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYFTDLFD	YFPPLTALVE		
PP4	ORYSJ	LTEAEVKALCLKAM	EILVEESNVQR	VDAPVTICGDIHGQ	FYDMKELFKVGG	DCPKTNYLFMGD	VDRGYYSVETV	FLLLALKVRYP	DRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYCTDIFD	YLSLSALIE		
PP4	WHEAT	-----EILVEES	SNVQRVDAPVTI	CGDIHGQFYDMK	ELFKVGGDCPKT	NYLFLGDVDRGF	YSVETFLLLAL	KVRYPDRITILIR	GNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYCTE	IFDYL	SLSALIE	
PP4	MAIZE	LTEAEVKALCLKAM	EILVEESNVQR	VDAPVTICGDIHGQ	FYDMKELFKVGG	DCPKTNYLFMGD	VDRGYYSVETV	FLLLALKVRYP	DRITILIRGNH	SRCITQVYGFYD	ECLRKYGNAV	VWKYCTDIFD	YLSLSALIE		
PP1	TOBAC	LSEAEIRSLCTASK	EIFLHQPNLLE	LEAPTKICGDIHGQ	YDGLRLFEYGG	FPPEANYLFLGDV	DRGKQSIETICLL	LAYKIKYPENF	FLIRGNHESAS	INRIYGFYDECK	RRFN-VRLWKI	FTDCFNCLPVA	ALID		
PP1	ORYSJ	LSEAEIRQLCTVSR	EIFLSQPNLLE	LEAPTKICGDIHGQ	YDGLRLFEYGG	FPPEANYLFLGDV	DRGKQSIETICLL	LAYKIKYPENF	FLIRGNHESAS	INRIYGFYDECK	RRFN-VRLWKI	FTDCFNCLPVA	ALID		
PP1	MAIZE	LSESEIKQLCAAKE	IFLQQPNLLE	LEAPTKICGDIHGQ	YDGLRLFEYGG	FPPEANYLFLGDV	DRGKQSIETICLL	LAYKIKYPENF	FLIRGNHESAS	INRIYGFYDECK	RRFN-VRLWKI	FTDCFNCLPVA	ALID		
PP1	MEDSV	LTEADIRQLCTSAK	EIFLSQPNLLE	LEAPTKICGDIHGQ	YDGLRLFEYGG	FPPEANYLFLGDV	DRGKQSIETICLL	LAYKIKYPENF	FLIRGNHESAS	INRIYGFYDECK	RRFN-VRLWKI	FTDCFNCLPVA	ALVD		
PP1	WHEAT	LLESEIRALCTTAR	EVFLKQPTLLE	LEAPTKICGDIHGQ	YDGLRLFEYGG	FPPEANYLFLGDV	DRGKQSIETICLL	LAYKIKYPENF	FLIRGNHESAS	INRIYGFYDECK	RRFN-VRLWKI	FTDCFNCLPVA	AVVD		

Множинне вирівнювання послідовностей каталітичних доменів протеїнфосфатаз типів 1, 2A і 4 з *A. thaliana* (UniProtKB: P30366, Q07099, P48529; SMART: SM00156-фосфатазної домен каталітичної субодиниці PP) і послідовностей відповідним рослинним гомологів з тютюну, рису, люцерни, кукурудзи і пшениці. На рисунку відзначені: активні сайти (\$), сайти зв'язування металів (&) і амінокислотні залишки відповідальні за зв'язування селективних інгібіторів цієї групи (#)



## Додаток Б

### Анотація тривимірних структур РР з БД RCSB PDB

PDB ID	Назва структури	Якість структур. Å	Якість структур. R-value	Таксономія
Серин/треонін-специфічні протеїнфосфатази				
1G5B	Bacteriophage lambda Ser/Thr protein phosphatase	2.2	0.2	<i>E. lambda</i>
1G5B	Bacteriophage lambda Ser/Thr protein phosphatase	2.2	0.2	<i>E. lambda</i>
2IXN	Crystal structure of the pp2a phosphatase activator ypa2 ptpa2	0.2	2.8	<i>S. cerevisiae</i>
3ICF	Structure of Protein serine/threonine phosphatase from <i>S. Cerevisiae</i> with similarity to human phosphatase PP5	0.2	2.3	<i>S. cerevisiae</i>
2IXO	Crystal structure of the pp2a phosphatase activator ypa1 ptpa1	2.6	0.2	<i>S. cerevisiae</i>
2IXP	Crystal structure of the pp2a phosphatase activator ypa1 ptpa1 in complex with model substrate S/T-protein phosphatase 2a activator 1	2.8	0.2	<i>S. cerevisiae</i>
2IXO	Crystal structure of the pp2a phosphatase activator ypa1 ptpa1	2.6	0.2	<i>S. cerevisiae</i>
2IXP	Crystal structure of the pp2a phosphatase activator ypa1 ptpa1 in complex with model substrate S/T-protein phosphatase 2a activator 1	2.8	0.2	<i>S. cerevisiae</i>
4WSF	Falafel EVH1 domain bound to CENP-C FIM	0.1	1.5	<i>D.melanogaster</i>
2O8G	Rat pp1c gamma complexed with mouse inhibitor-2	0.2	2.5	<i>R. norvegicus</i>
4IL1	Crystal Structure of the Rat Calcineurin	0.2	3.0	<i>R. norvegicus</i>
4JA7	Rat PP5 co-crystallized with P5SA-2	0.2	2.0	<i>R. norvegicus</i>
4JA9	Rat PP5 apo	0.2	2.3	<i>R. norvegicus</i>
2O8A	rat PP1c gamma complexed with mouse inhibitor-2	2.6	0.2	<i>R. norvegicus</i>
2O8A	rat PP1c gamma complexed with mouse inhibitor-2	2.6	0.2	<i>R. norvegicus</i>
2PF4	Crystal structure of the full-length simian virus 40 small t antigen complexed with the protein phosphatase 2A Aalpha subunit	3.1	0.2	<i>M. musculus</i>
2IAE	Crystal structure of a protein phosphatase 2A (PP2A) holoenzyme.	3.5	0.3	<i>M. musculus</i>
2PF4	Crystal structure of the full-length simian virus 40 small t antigen complexed with the protein phosphatase 2A Aalpha subunit	3.1	0.2	<i>M. musculus</i>
2IAE	Crystal structure of a protein phosphatase 2A (PP2A) holoenzyme.	3.5	0.3	<i>M. musculus</i>
1IT6	Crystal structure of the complex between calyculin a and the catalytic subunit of protein phosphatase 1	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
1JK7	Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
1M63	Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes	0.3	2.8	<i>H. sapiens</i>
1S70	Complex between protein ser/thr phosphatase-1 (delta) and the myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1)	0.2	2.7	<i>H. sapiens</i>
1S95	Structure of serine/threonine protein phosphatase 5	0.2	1.6	<i>H. sapiens</i>
1U32	Crystal structure of a Protein Phosphatase-1: Calcineurin Hybrid Bound to Okadaic Acid	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
1WAO	PP5 structure	0.2	2.9	<i>H. sapiens</i>
2BCD	X-ray crystal structure of Protein Phosphatase-1 with the marine toxin motuporin bound	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
2BUG	Solution structure of the TPR domain from Protein phosphatase 5 in complex with Hsp90 derived peptide	0.2	2.9	<i>H. sapiens</i>
2IE4	Structure of the Protein Phosphatase 2A Core Enzyme Bound to okadaic acid	0.3	2.6	<i>H. sapiens</i>
2IXM	Structure of human PTPA	0.2	1.5	<i>H. sapiens</i>
2JAK	Human PP2A regulatory subunit b56g	0.2	2.6	<i>H. sapiens</i>
2JZI	Structure of Calmodulin complexed with the Calmodulin Binding Domain of Calcineurin	0.2	2.8	<i>H. sapiens</i>
2R28	The complex Structure of Calmodulin Bound to a Calcineurin Peptide	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
2W73	High-resolution structure of the complex between calmodulin and a peptide from calcineurin A	0.2	1.5	<i>H. sapiens</i>

			Продовж. дод. Б	
3E7B	Crystal Structure of Protein Phosphatase-1 Bound to the natural toxin inhibitor Tautomycin	0.2	1.7	<i>H. sapiens</i>
3EGG	Crystal structure of a complex between Protein Phosphatase 1 alpha (PP1) and the PP1 binding and PDZ domains of Spinophilin	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
3H60	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Mn <sup>2+</sup> atoms	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
3H61	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Mn <sup>2+</sup> atoms originally soaked with norcantharidin (which is present in the structure in the hydrolyzed form)	0.2	1.5	<i>H. sapiens</i>
3H66	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Zn <sup>2+</sup> atoms	0.2	2.6	<i>H. sapiens</i>
3HVQ	Crystal structure of a complex between Protein Phosphatase 1 alpha (PP1) and the PP1 binding and PDZ domains of Neurabin	0.2	2.2	<i>H. sapiens</i>
3K7V	Protein phosphatase 2A core complex bound to dinophysistoxin-1	0.2	2.9	<i>H. sapiens</i>
3LL8	Crystal Structure of Calcineurin in Complex with AKAP79 Peptide	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
3MXO	Crystal structure of human phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5)	0.2	1.7	<i>H. sapiens</i>
3N5U	Crystal structure of an Rb C-terminal peptide bound to the catalytic subunit of PP1	0.2	3.2	<i>H. sapiens</i>
3O0T	Crystal structure of human phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5) in complex with phosphate	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
3P71	Crystal structure of the complex of LCMT-1 and PP2A	0.2	2.7	<i>H. sapiens</i>
3V4Y	Crystal Structure of the first Nuclear PP1 holoenzyme	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
4G9J	Protein Ser/Thr phosphatase-1 in complex with cell-permeable peptide	0.2	3.1	<i>H. sapiens</i>
4I5J	Pp2a pr70 holoenzyme	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
4I5K	PP2A PR70 Holoenzyme model3_dica_rcsb.pdb bppnat5_extend.mtz	0.2	2.9	<i>H. sapiens</i>
4IYP	Structure of the npp2ac-alpha4 complex	0.2	2.8	<i>H. sapiens</i>
4LAC	Crystal Structure of Protein Phosphatase 2A (PP2A) and PP2A phosphatase activator (PTPA) complex with atpgammas	0.2	2.8	<i>H. sapiens</i>
4MEW	Structure of the core fragment of human PR70	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
4MOV	1.45 A Resolution Crystal Structure of Protein Phosphatase 1	0.2	1.5	<i>H. sapiens</i>
4MOY	Structure of a second nuclear PP1 Holoenzyme crystal form 1	0.2	2.2	<i>H. sapiens</i>
4MP0	Structure of a second nuclear PP1 Holoenzyme crystal form 2	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
4NY3	Human PTPA in complex with peptide	0.2	1.8	<i>H. sapiens</i>
4OR9	Crystal structure of human calcineurin	0.2	2.2	<i>H. sapiens</i>
4Q5U	Structure of calmodulin bound to its recognition site from calcineurin	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
4UT2	X-ray structure of the human PP1 gamma catalytic subunit treated with ascorbate	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
4UT3	X-ray structure of the human PP1 gamma catalytic subunit treated with hydrogen peroxide	0.2	2.2	<i>H. sapiens</i>
4V0U	The crystal structure of ternary PP1G-PPP1R15B and G-actin complex	0.4	7.9	<i>H. sapiens</i>
4V0V	The crystal structure of mouse PP1G in complex with truncated human PPP1R15B (631-660)	0.2	1.6	<i>H. sapiens</i>
4V0W	The crystal structure of mouse PP1G in complex with truncated human PPP1R15B (631-669)	0.2	1.6	<i>H. sapiens</i>
4XPN	Crystal Structure of Protein Phosphate 1 complexed with PP1 binding domain of GADD34	0.2	2.3	<i>H. sapiens</i>
4ZVZ	Co-crystal structures of PP5 in complex with 5-methyl-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane-2,3-dicarboxylic acid	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
4ZX2	Co-crystal structures of PP5 in complex with 5-methyl-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane-2,3-dicarboxylic acid	0.2	1.2	<i>H. sapiens</i>
5C1V	Crystal structure analysis of catalytic subunit of human calcineurin	0.2	3.4	<i>H. sapiens</i>
5HPE	Phosphatase domain of PP5 bound to a phosphomimetic Cdc37 substrate peptide	0.2	2.3	<i>H. sapiens</i>
5INB	Repoman-PP1g (protein phosphatase 1 gamma isoform) holoenzyme complex	0.1	1.3	<i>H. sapiens</i>
5J28	Ki67-PP1g (protein phosphatase 1 gamma isoform) holoenzyme complex	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
5JJA	Crystal structure of a PP2A b56gamma/bubr1 complex	0.2	2.4	<i>H. sapiens</i>

		Продовж. дод. Б	
5K6S	The structure of the PP2A B56 subunit bubr1 complex	0.2	2.8 <i>H. sapiens</i>
5MUF	Crystal structure of human phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5) in its enzymatically active dodecameric form induced by the presence of the N-terminal WDPNWD motif	0.2	3.1 <i>H. sapiens</i>
5SVE	Structure of Calcineurin in complex with nfatc1 lxvp peptide	0.2	2.6 <i>H. sapiens</i>
5SW9	The structure of the PP2A B56 subunit repoman complex	0.2	2.9 <i>H. sapiens</i>
5SWF	The structure of the PP2A B56 subunit double phosphorylated bubr1 complex	0.2	2.8 <i>H. sapiens</i>
5UII	Crystal Structure of Human Protein Phosphatase 5C (PP5C) in complex with a triazole inhibitor	0.2	2.0 <i>H. sapiens</i>
5W0W	Crystal structure of Protein Phosphatase 2A bound to TIPRL	0.2	3.8 <i>H. sapiens</i>
5WG8	Structure of PP5C with LB-100; 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane-2, 3-dicarbonyl	0.2	1.7 <i>H. sapiens</i>
6ALZ	Crystal structure of Protein Phosphatase 1 bound to the natural inhibitor Tautomycin	0.2	2.2 <i>H. sapiens</i>
1A17	Tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5	0.2	2.5 <i>H. sapiens</i>
3PA3	Crystal structure of human phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5) in complex with phosphate	1.9	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H62	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Mn <sup>2+</sup> atoms complexed with cantharidic acid	1.4	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H63	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Mn <sup>2+</sup> atoms originally soaked with cantharidin (which is present in the structure in the hydrolyzed form)	1.3	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H64	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Mn <sup>2+</sup> atoms complexed with endothall	1.9	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H67	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Zn <sup>2+</sup> atoms complexed with cantharidic acid	1.7	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H68	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Zn <sup>2+</sup> atoms originally soaked with cantharidin (which is present in the structure in the hydrolyzed form)	1.5	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H69	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Zn <sup>2+</sup> atoms complexed with endothall	2.1	0.2 <i>H. sapiens</i>
3FGA	Structural Basis of PP2A and Sgo interaction	2.7	0.2 <i>H. sapiens</i>
2PKG	Structure of a complex between the A subunit of protein phosphatase 2A and the small t antigen of SV40	3.3	0.2 <i>H. sapiens</i>
2NPP	Structure of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme	3.3	0.3 <i>H. sapiens</i>
3EGH	Crystal structure of a complex between Protein Phosphatase 1 alpha (PP1), the PP1 binding and PDZ domains of Spinophilin and the small natural molecular toxin Nodularin-R	2.0	0.2 <i>H. sapiens</i>
3K7W	Protein phosphatase 2A core complex bound to dinophysistoxin-2	3.0	0.2 <i>H. sapiens</i>
3E7A	Crystal Structure of Protein Phosphatase-1 Bound to the natural toxin Nodularin-R	1.6	0.1 <i>H. sapiens</i>
2NYL	Crystal structure of Protein Phosphatase 2A (PP2A) holoenzyme with the catalytic subunit carboxyl terminus truncated	3.8	0.3 <i>H. sapiens</i>
2NYM	Crystal Structure of Protein Phosphatase 2A (PP2A) with C-terminus truncated catalytic subunit	3.6	0.3 <i>H. sapiens</i>
2IE3	Structure of the Protein Phosphatase 2A Core Enzyme Bound to Tumor-inducing Toxins	2.8	0.3 <i>H. sapiens</i>
2BDX	X-ray Crystal Structure of dihydromicrocystin-LA bound to Protein Phosphatase-1	2.3	0.2 <i>H. sapiens</i>
3PA3	Crystal structure of human phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5) in complex with phosphate	1.9	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H62	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Mn <sup>2+</sup> atoms complexed with cantharidic acid	1.4	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H63	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Mn <sup>2+</sup> atoms originally soaked with cantharidin (which is present in the structure in the hydrolyzed form)	1.3	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H64	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Mn <sup>2+</sup> atoms complexed with endothall	1.9	0.2 <i>H. sapiens</i>
3H67	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Zn <sup>2+</sup> atoms complexed with cantharidic acid	1.7	0.2 <i>H. sapiens</i>

		Продовж. дод. Б		
3H68	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Zn <sup>2+</sup> atoms originally soaked with cantharidin (which is present in the structure in the hydrolyzed form)	1.5	0.2	<i>H. sapiens</i>
3H69	Catalytic domain of human Serine/Threonine Phosphatase 5 (PP5c) with two Zn <sup>2+</sup> atoms complexed with endothall	2.1	0.2	<i>H. sapiens</i>
3FGA	Structural Basis of PP2A and Sgo interaction	2.7	0.2	<i>H. sapiens</i>
2PKG	Structure of a complex between the A subunit of protein phosphatase 2A and the small t antigen of SV40	3.3	0.2	<i>H. sapiens</i>
2NPP	Structure of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme	3.3	0.3	<i>H. sapiens</i>
3EGH	Crystal structure of a complex between Protein Phosphatase 1 alpha (PP1), the PP1 binding and PDZ domains of Spinophilin and the small natural molecular toxin Nodularin-R	2.0	0.2	<i>H. sapiens</i>
3K7W	Protein phosphatase 2A core complex bound to dinophysistoxin-2	3.0	0.2	<i>H. sapiens</i>
3E7A	Crystal Structure of Protein Phosphatase-1 Bound to the natural toxin Nodularin-R	1.6	0.1	<i>H. sapiens</i>
2NYL	Crystal structure of Protein Phosphatase 2A (PP2A) holoenzyme with the catalytic subunit carboxyl terminus truncated	3.8	0.3	<i>H. sapiens</i>
2NYM	Crystal Structure of Protein Phosphatase 2A (PP2A) with C-terminus truncated catalytic subunit	3.6	0.3	<i>H. sapiens</i>
2IE3	Structure of the Protein Phosphatase 2A Core Enzyme Bound to Tumor-inducing Toxins	2.8	0.3	<i>H. sapiens</i>
2BDX	X-ray Crystal Structure of dihydromicrocystin-LA bound to Protein Phosphatase-1	2.3	0.2	<i>H. sapiens</i>
Тирозин-специфічні протеїнфосфатази				
2B9I	Crystal structure of Fus3 with a docking motif from Msg5	0.2	2.5	<i>S. cerevisiae</i>
4ZJ7	Crystal structure of the karyopherin Kap121p bound to the extreme C-terminus of the protein phosphatase Cdc14p	0.2	2.4	<i>S. cerevisiae</i>
5XW4	Crystal structure of budding yeast Cdc14p (wild type) in the apo state	0.2	1.9	<i>S. cerevisiae</i>
5XW5	Crystal structure of budding yeast Cdc14p (C283S) bound to a Swi6p phosphopeptide	0.2	1.9	<i>S. cerevisiae</i>
6G84	Structure of Cdc14 bound to CBK1 pxl motif	0.2	2.5	<i>S. cerevisiae</i>
3KLD	PTPRG CNTN4 complex	0.2	2.0	<i>M. musculus</i>
3PXH	Tandem Ig domains of tyrosine phosphatase LAR	0.2	2.0	<i>M. musculus</i>
3SR9	Crystal structure of mouse ptpsigma	0.2	2.4	<i>M. musculus</i>
4Y61	Crystal structure of the complex between Slitrk2 LRR1 and PTP delta Ig1-Fn1	0.2	3.4	<i>M. musculus</i>
5XWT	Crystal structure of ptpdelta Ig1-Fn1 in complex with SALM5 LRR-Ig	0.3	4.2	<i>M. musculus</i>
5XWU	Crystal structure of ptpdelta Ig1-Ig3 in complex with SALM2 LRR-Ig	0.2	3.2	<i>M. musculus</i>
5Y32	Crystal structure of PTP delta Ig1-Ig2 in complex with IL1RAPL1	0.2	2.7	<i>M. musculus</i>
6H8S	Crystal structure of the mouse protein tyrosine phosphatase ptpn5 (step) in complex with compound bi-0314	0.2	1.8	<i>M. musculus</i>
1PHR	The crystal structure of a low molecular phosphotyrosine protein phosphatase	0.2	2.1	<i>B. taurus</i>
2AZR	Crystal structure of PTP1B with Bicyclic Thiophene inhibitor	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
2B3O	Crystal structure of human tyrosine phosphatase SHP-1	0.2	2.8	<i>H. sapiens</i>
2B4S	Crystal structure of a complex between PTP1B and the insulin receptor tyrosine kinase	0.2	2.3	<i>H. sapiens</i>
2BIJ	Crystal structure of the human protein tyrosine phosphatase PTPN5 (STEP, striatum enriched enriched Phosphatase)	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
2C9A	Crystal structure of the MAM-Ig module of receptor protein tyrosine phosphatase mu	0.2	2.7	<i>H. sapiens</i>
2CM2	Structure of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (P212121)	0.2	1.5	<i>H. sapiens</i>
2CM7	Structural Basis for Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B by Isothiazolidinone Heterocyclic Phosphonate Mimetics	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
2CNE	Structural Insights into the Design of Nonpeptidic Isothiazolidinone-Containing Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B	0.2	1.8	<i>H. sapiens</i>
2F6T	Protein tyrosine phosphatase 1B with sulfamic acid inhibitors	0.2	1.7	<i>H. sapiens</i>
2FJM	The structure of phosphotyrosine phosphatase 1B in comp-x with compound 2	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
2GJT	Crystal structure of the human receptor phosphatase PTPRO	0.2	2.2	<i>H. sapiens</i>

		Продовж. дод. Б	
2H4G	Crystal structure of PTP1B with monocyclic thiophene inhibitor	0.2	2.5 <i>H. sapiens</i>
2HY3	Crystal structure of the human tyrosine receptor phosphate gamma in complex with vanadate	0.2	2.6 <i>H. sapiens</i>
2I75	Crystal Structure of Human Protein Tyrosine Phosphatase N4 (PTPN4)	0.2	2.5 <i>H. sapiens</i>
2JJD	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, E isoform	0.2	3.2 <i>H. sapiens</i>
2JJS	Structure of human cd47 in complex with human signal regulatory protein (SIRP) alpha	0.2	1.9 <i>H. sapiens</i>
2M0Z	Cis form of a photoswitchable PDZ domain crosslinked with an azobenzene derivative		<i>H. sapiens</i>
2NT7	Crystal structure of PTP1B-inhibitor complex	0.2	2.1 <i>H. sapiens</i>
2NZ6	Crystal structure of the PTPRJ inactivating mutant C1239S	0.2	2.3 <i>H. sapiens</i>
2OC3	Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Protein Tyrosine Phosphatase non-receptor Type 18	0.2	1.5 <i>H. sapiens</i>
2OOQ	Crystal Structure of the Human Receptor Phosphatase PTPRT	0.1	1.8 <i>H. sapiens</i>
2P6X	Crystal structure of human tyrosine phosphatase PTPN22	0.2	1.9 <i>H. sapiens</i>
2PA5	Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase PTPN9	0.2	1.6 <i>H. sapiens</i>
2PBN	Crystal structure of the human tyrosine receptor phosphate gamma	0.2	1.7 <i>H. sapiens</i>
2QBP	Crystal structure of ptp1b-inhibitor complex	0.2	2.5 <i>H. sapiens</i>
2VEV	Crystal structure of protein tyrosine phosphatase 1b in complex with an isothiazolidinone-containing inhibitor	0.2	1.8 <i>H. sapiens</i>
2ZMM	Crystal structure of PTP1B-inhibitor complex	0.2	2.1 <i>H. sapiens</i>
3B7O	Crystal structure of the human tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11) with an accessible active site	0.2	1.6 <i>H. sapiens</i>
3BRH	Protein Tyrosine Phosphatase PTPN-22 (Lyp) bound to the mono-Phosphorylated Lck active site peptide	0.2	2.2 <i>H. sapiens</i>
3CWE	PTP1B in complex with a phosphonic acid inhibitor	0.2	1.6 <i>H. sapiens</i>
3D42	Crystal structure of heptp in complex with a monophosphorylated Erk2 peptide	0.2	2.5 <i>H. sapiens</i>
3D44	Crystal structure of heptp in complex with a dually phosphorylated Erk2 peptide mimetic	0.2	1.9 <i>H. sapiens</i>
3D9C	Crystal Structure PTP1B complex with aryl Seleninic acid	0.2	2.3 <i>H. sapiens</i>
3EAX	Crystal structure PTP1B complex with small molecule compound LZP-6	0.2	1.9 <i>H. sapiens</i>
3EB1	Crystal structure PTP1B complex with small molecule inhibitor LZP-25	0.2	2.4 <i>H. sapiens</i>
3LJ8	Crystal Structure of MKP-4	0.2	2.7 <i>H. sapiens</i>
3N8I	Crystal structure of the A isoform of human cytoplasmic protein tyrosine phosphatase (HCPTP-A) in complex with 1-naphtylacetic acid	0.2	1.5 <i>H. sapiens</i>
3O4U	Crystal Structure of heptp with an Atypically Open WPD Loop	0.2	2.3 <i>H. sapiens</i>
3O5X	Crystal structure of the oncogenic tyrosine phosphatase SHP2 complexed with a salicylic acid-based small molecule inhibitor	0.2	2.0 <i>H. sapiens</i>
3OLR	PTPN22 in complex with consensus phospho-tyrosine peptide 1	0.2	2.5 <i>H. sapiens</i>
3OMH	Crystal structure of PTPN22 in complex with SKAP-HOM ptyr75 peptide	0.2	2.9 <i>H. sapiens</i>
3PS5	Crystal structure of the full-length Human Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1	0.2	3.1 <i>H. sapiens</i>
3QKQ	Protein Tyrosine Phosphatase 1B - W179F mutant bound with vanadate	0.2	2.2 <i>H. sapiens</i>
3S97	PTPRZ CNTN1 complex	0.2	2.3 <i>H. sapiens</i>
3SME	Structure of PTP1B inactivated by H2O2/bicarbonate	0.2	1.7 <i>H. sapiens</i>
3ZMP	Src-derived peptide inhibitor complex of PTP1B	0.2	2.6 <i>H. sapiens</i>
3ZMQ	Src-derived mutant peptide inhibitor complex of PTP1B	0.2	3.3 <i>H. sapiens</i>
3ZV2	Human protein-tyrosine phosphatase 1b C215A, S216A mutant	0.2	2.8 <i>H. sapiens</i>
4BJO	Nitrate in the active site of PTP1b is a putative mimetic of the transition state	0.2	2.1 <i>H. sapiens</i>
4BPC	Structure of the Catalytic Domain of Protein Tyrosine Phosphatase Sigma in the Sulfenic Acid Form	0.2	2.1 <i>H. sapiens</i>
4GE2	Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase PTPN9 (MEG2) complex with compound 3	0.2	1.8 <i>H. sapiens</i>

			Продовж. дод. Б	
4GE5	Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase PTPN9 (MEG2) complex with compound 5	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
4GE6	Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase PTPN9 (MEG2) complex with compound 7	0.2	1.4	<i>H. sapiens</i>
4H34	Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2 with Q506P mutation	0.2	2.7	<i>H. sapiens</i>
4NND	Structural basis of PTPN18 fingerprint on distinct HER2 tyrosine phosphorylation sites	0.3	2.5	<i>H. sapiens</i>
4OHD	LEOPARD Syndrome-Associated SHP2/A461T mutant	0.2	2.7	<i>H. sapiens</i>
4RCA	Crystal structure of human ptpdelta and human Slitrk1 complex	0.3	3.0	<i>H. sapiens</i>
4RDD	Co-crystal structure of SHP2 in complex with a Cefsulodin derivative	0.2	1.6	<i>H. sapiens</i>
4RH5	Crystal structure of PTPN3 (PTPH1) in complex with Eps15 ptyr849 peptide	0.2	1.6	<i>H. sapiens</i>
4Y14	Structure of protein tyrosine phosphatase 1B complexed with inhibitor (PTP1B:CPT157633)	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
4Z9A	Crystal structure of Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase isoform A complexed with phenylmethanesulfonic acid	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
4Z9B	Crystal structure of Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase isoform A complexed with benzylphosphonic acid	0.2	2.4	<i>H. sapiens</i>
4ZRT	PTP1BC215S bound to Nephhrin peptide substrate	0.2	1.7	<i>H. sapiens</i>
5EHP	Non-receptor Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 in Complex with Allosteric Inhibitor SHP836	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
5EHR	Non-receptor Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 in Complex with Allosteric Inhibitor SHP099	0.2	1.7	<i>H. sapiens</i>
5JNR	Crystal structure of human low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMPTP) type A	0.2	2.0	<i>H. sapiens</i>
5K9V	Protein Tyrosine Phosphatase 1B (1-301), open state	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
5KAD	Protein Tyrosine Phosphatase 1B N193A mutant in complex with TCS401, closed state	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
5KQG	Co-crystal structure of LMW-PTP in complex with 2-(benzothiazol-2-ylamino)-2-oxo-1-phenylethanesulfonic acid	0.2	1.5	<i>H. sapiens</i>
5KQL	Co-crystal structure of LMW-PTP in complex with 2-oxo-1-phenyl-2-(phenylamino)ethanesulfonic acid	0.2	1.5	<i>H. sapiens</i>
5KQM	Co-crystal structure of LMW-PTP in complex with MES	0.2	1.9	<i>H. sapiens</i>
5KQP	Crystal structure of Apo-form LMW-PTP	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
5LM1	Crystal Structure of HD-PTP phosphatase in complex with UBAP1	0.2	2.6	<i>H. sapiens</i>
5QDE	Pandda analysis group deposition -- Crystal structure of PTP1B in complex with compound_FMOPL000740a	0.2	1.8	<i>H. sapiens</i>
5T19	Structure of PTP1B complexed with N-(3'-(1,1-dioxido-4-oxo-1,2,5-thiadiazolidin-2-yl)-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetamide	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
5WY8	Crystal structure of PTP delta Ig1-Ig3 in complex with IL1RAPL1 Ig1-Ig3	0.2	3.1	<i>H. sapiens</i>
5XNP	Crystal structures of human SALM5 in complex with human ptpdelta	0.2	3.7	<i>H. sapiens</i>
5XZR	The atomic structure of SHP2 E76A mutant in complex with allosteric inhibitor 9b	0.2	2.8	<i>H. sapiens</i>
6ATD	Oxidized SHP2 forms a disulfide bond between Cys367 and Cys459	0.2	2.5	<i>H. sapiens</i>
6BIT	Sirpalha antibody complex	0.2	2.2	<i>H. sapiens</i>
6BMY	Non-receptor Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 in Complex with Allosteric Inhibitors SHP099 and SHP844	0.2	2.1	<i>H. sapiens</i>
6BN5	Non-receptor Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 F285S in Complex with Allosteric Inhibitor JLR-2	0.2	2.2	<i>H. sapiens</i>
6CMS	Closed structure of active SHP2 mutant E76K bound to SHP099 inhibitor	0.2	2.7	<i>H. sapiens</i>
6CRF	Crystal Structure of Shp2 E76K GOF Mutant in the Open Conformation	0.2	2.6	<i>H. sapiens</i>
6CRG	Crystal Structure of Shp2 E76K GOF Mutant in complex with SHP099	0.2	2.8	<i>H. sapiens</i>
6CWU	Protein Tyrosine Phosphatase 1B F135Y mutant	0.3	2.1	<i>H. sapiens</i>
6H8R	Crystal structure of the human protein tyrosine phosphatase ptpn5 (step) in complex with compound 2	0.2	1.7	<i>H. sapiens</i>

## Додаток В

**Локальна база даних інгібіторів ПФ з в базах даних Google Patents,  
PubChem, ZINC, eMolecules і ChEMBL**

IDNUMBER	Analog of ChEMBL	Similarity	MW	Rot. Bonds	HD	HA	IDNUMBER	Analog of ChEMBL	Similarity	MW	Rot. Bonds	HD	HA
F2724-1127	CHEMBL1523808	1.00	374.19	4	1	5	F1414-0001	CHEMBL1773168	0.88	400.45	4	2	4
F3110-0837	CHEMBL1439640	1.00	345.44	6	1	4	F1191-0103	CHEMBL1569991	0.88	381.49	7	3	4
F2508-0044	CHEMBL1464805	1.00	379.80	4	1	5	F3260-0832	CHEMBL1569991	0.88	387.46	6	3	4
F0863-0049	CHEMBL1500890	1.00	336.41	10	2	4	F3260-0837	CHEMBL1569991	0.88	402.51	8	2	4
F0646-1302	CHEMBL1349451	1.00	354.38	5	1	6	F0753-0015	CHEMBL1305391	0.88	409.52	10	2	5
F1316-0149	CHEMBL1568683	1.00	412.92	5	2	4	F0646-4150	CHEMBL1349451	0.88	342.35	4	1	5
F2020-0624	CHEMBL1892801	1.00	398.46	4	1	6	F3226-0847	CHEMBL1425797	0.88	416.43	7	1	6
F1605-0992	CHEMBL1362650	1.00	458.54	6	2	5	F1607-0405	CHEMBL1305050	0.88	485.57	5	1	4
F0884-0032	CHEMBL1773168	1.00	380.46	6	2	4	F1608-0304	CHEMBL1305050	0.88	477.94	5	1	4
F0653-0683	CHEMBL1418840	1.00	495.60	8	1	4	F1605-0989	CHEMBL1487831	0.88	399.88	4	1	3
F3226-1275	CHEMBL1425797	1.00	422.43	7	1	7	F0486-2888	CHEMBL3238183	0.88	461.34	5	2	2
F3225-6369	CHEMBL1478082	0.99	304.30	1	0	4	F0818-0033	CHEMBL560074	0.88	419.47	7	0	4
F1605-0918	CHEMBL1362650	0.99	458.54	6	2	5	F1191-0135	CHEMBL1569991	0.88	415.51	6	3	4
F3226-1273	CHEMBL1425797	0.99	408.40	6	1	7	F0372-0953	CHEMBL1569991	0.88	358.46	6	2	3
F0646-1307	CHEMBL1349451	0.99	324.36	4	1	5	F3382-0887	CHEMBL1505300	0.88	346.77	1	2	2
F3382-0880	CHEMBL1505300	0.99	336.41	1	2	2	F0373-1220	CHEMBL1569991	0.88	372.48	6	2	3
F0823-0018	CHEMBL1569991	0.99	413.54	7	3	3	F2730-0050	CHEMBL2159933	0.88	390.93	3	1	2
F1605-0205	CHEMBL1305050	0.98	487.50	6	1	6	F0646-1825	CHEMBL1882430	0.88	346.77	3	1	4
F3226-1266	CHEMBL1425797	0.98	420.41	7	1	7	F3168-1402	CHEMBL1487831	0.88	345.44	5	1	3
F0646-1301	CHEMBL1349451	0.98	354.38	5	1	6	F3222-2048	CHEMBL1505300	0.88	469.56	4	3	3
F3226-1403	CHEMBL1425797	0.98	394.38	5	1	7	F1608-0115	CHEMBL1305050	0.88	467.58	5	1	4
F3382-0240	CHEMBL1505300	0.98	336.41	1	2	2	F3225-6365	CHEMBL1478082	0.88	384.36	2	0	4
F0463-0018	CHEMBL1329781	0.98	414.43	3	2	5	F3168-1361	CHEMBL1487831	0.88	331.41	6	1	3
F0653-0489	CHEMBL1418840	0.98	481.57	7	1	4	F0373-1142	CHEMBL1569991	0.88	296.39	6	2	3
F0646-1820	CHEMBL1882430	0.98	342.35	4	1	5	F3382-0265	CHEMBL1515727	0.88	390.36	3	2	4
F0359-0151	CHEMBL2159933	0.98	358.87	2	1	2	F0372-0459	CHEMBL1569991	0.88	344.43	5	2	3
F3382-0235	CHEMBL1505300	0.98	308.36	1	2	2	F3382-0242	CHEMBL1505300	0.88	380.42	4	2	4
F3225-6445	CHEMBL1478082	0.98	348.35	2	0	5	F0381-3174	CHEMBL1569991	0.88	324.44	8	2	3
F3226-1274	CHEMBL1425797	0.98	394.38	5	1	7	F3226-0845	CHEMBL1425797	0.88	390.39	5	1	6
F5127-0798	CHEMBL2349147	0.97	384.43	5	2	5	F3226-0918	CHEMBL1425797	0.88	390.39	5	1	6
F3225-6455	CHEMBL1478082	0.97	346.38	3	0	4	F3226-1369	CHEMBL1425797	0.88	404.42	5	1	6
F0653-0392	CHEMBL1418840	0.97	481.57	7	1	4	F3226-0923	CHEMBL1425797	0.88	404.42	5	1	6
F3226-2003	CHEMBL1425797	0.97	406.39	7	1	7	F0808-1656	CHEMBL1773168	0.88	352.41	3	2	4
F0646-1304	CHEMBL1349451	0.97	384.41	6	1	7	F0653-0674	CHEMBL1418840	0.88	447.55	8	1	4
F3323-0273	CHEMBL1425797	0.97	438.43	7	1	8	F1607-0202	CHEMBL1305050	0.88	439.53	5	1	4
F2508-0155	CHEMBL1464805	0.97	379.80	4	1	5	F1604-0443	CHEMBL1305050	0.88	453.56	5	1	4
F0725-0505	CHEMBL1329781	0.97	398.43	3	1	4	F1602-0868	CHEMBL1305050	0.88	487.55	7	1	5
F3225-6359	CHEMBL1478082	0.97	334.33	2	0	5	F3260-0621	CHEMBL1569991	0.88	330.40	4	2	3
F0375-0284	CHEMBL1608180	0.97	411.48	4	2	4	F3260-0618	CHEMBL1569991	0.88	358.41	5	2	4
F1525-1604	CHEMBL1425797	0.97	380.35	5	1	7	F0373-1068	CHEMBL1569991	0.88	316.38	4	2	3
F3382-0247	CHEMBL1505300	0.97	336.41	1	2	2	F3398-2961	CHEMBL1505300	0.88	409.46	6	3	4
F2724-1291	CHEMBL1523808	0.96	388.22	5	1	5	F3296-0038	CHEMBL1398814	0.88	325.32	4	1	5

													Продовж. дод. В	
F3168-1379	CHEMBL1362650	0.96	478.95	6	2	5	F2665-0128	CHEMBL3693894	0.88	431.94	3	1	4	
F3226-3018	CHEMBL1425797	0.96	424.40	6	1	8	F3139-0714	CHEMBL2159045	0.88	312.32	3	2	5	
F3382-0241	CHEMBL1505300	0.96	322.38	1	2	2	F0008-0019	CHEMBL1313195	0.88	468.50	6	2	4	
F0359-0158	CHEMBL2159933	0.96	344.84	2	1	2	F1167-0083	CHEMBL1569991	0.88	420.53	6	1	3	
F3226-1263	CHEMBL1425797	0.96	394.38	5	1	7	F0808-1663	CHEMBL1773168	0.88	352.41	3	2	4	
F3225-6446	CHEMBL1478082	0.96	362.38	3	0	5	F2019-0051	CHEMBL2159933	0.88	444.01	7	1	2	
F1607-0193	CHEMBL1362650	0.96	523.41	6	2	5	F1605-0203	CHEMBL1305050	0.88	477.94	5	1	4	
F1316-0147	CHEMBL1568683	0.96	378.47	5	2	4	F0653-0493	CHEMBL1418840	0.88	469.56	7	2	4	
F0381-2946	CHEMBL1569991	0.95	344.43	6	2	3	F1604-0104	CHEMBL1305050	0.88	499.58	8	1	6	
F3394-0717	CHEMBL1568683	0.95	426.94	5	2	4	F0653-0695	CHEMBL1418840	0.88	497.61	9	2	4	
F1191-0123	CHEMBL1569991	0.95	429.54	8	3	4	F0372-0055	CHEMBL1569991	0.88	344.43	5	2	3	
F3382-0455	CHEMBL1505300	0.95	342.80	1	2	2	F0381-4928	CHEMBL1569991	0.88	358.46	5	2	3	
F3226-0567	CHEMBL1425797	0.95	410.38	6	1	8	F3260-0838	CHEMBL1569991	0.88	388.48	7	2	4	
F0266-0262	CHEMBL1414990	0.95	270.24	4	0	5	F0808-2048	CHEMBL1731009	0.88	207.25	1	1	2	
F0372-0193	CHEMBL1569991	0.95	358.46	7	2	3	F0381-4901	CHEMBL1569991	0.88	338.47	9	2	3	
F0381-2952	CHEMBL1569991	0.95	386.51	9	2	3	F3222-3862	CHEMBL1505300	0.88	380.42	4	2	4	
F0816-0641	CHEMBL1329781	0.95	398.43	3	1	4	F0196-0030	CHEMBL2159045	0.88	252.26	2	0	3	
F3225-6448	CHEMBL1478082	0.95	376.41	4	0	5	F3168-0282	CHEMBL1515727	0.88	471.53	6	3	4	
F3225-6370	CHEMBL1478082	0.95	332.35	2	0	4	F0373-0963	CHEMBL1569991	0.88	426.92	6	2	3	
F0646-1299	CHEMBL1349451	0.95	342.35	4	1	5	F1603-0091	CHEMBL1487831	0.88	385.85	4	1	3	
F0646-1306	CHEMBL1349451	0.95	358.80	4	1	5	F1605-0476	CHEMBL1305050	0.88	483.58	6	1	5	
F1191-0156	CHEMBL1569991	0.95	399.51	6	3	3	F1607-0940	CHEMBL1305050	0.88	497.61	6	1	5	
F0823-0016	CHEMBL1569991	0.95	413.54	6	3	3	F0372-0458	CHEMBL1569991	0.88	330.40	4	2	3	
F0372-0195	CHEMBL1569991	0.95	372.48	8	2	3	F1901-0012	CHEMBL2373418	0.88	214.26	3	0	4	
F0359-0165	CHEMBL2159933	0.95	358.87	2	1	2	F0373-1144	CHEMBL1569991	0.88	310.42	7	2	3	
F0646-3641	CHEMBL1349451	0.95	354.38	5	1	6	F0526-0313	CHEMBL137989	0.88	388.48	8	2	4	
F1602-0177	CHEMBL1305050	0.95	483.54	6	1	6	F0526-0700	CHEMBL137989	0.88	388.48	7	2	4	
F0646-1300	CHEMBL1349451	0.95	354.38	5	1	6	F1167-0091	CHEMBL1569991	0.88	402.47	8	1	5	
F1605-1239	CHEMBL1362650	0.95	462.50	6	2	5	F0796-0070	CHEMBL1305391	0.88	306.45	4	0	2	
F1607-0210	CHEMBL1305050	0.95	483.54	6	1	6	F0291-0191	CHEMBL1424996	0.88	310.41	2	2	2	
F0372-0194	CHEMBL1569991	0.95	358.46	6	2	3	F3226-1290	CHEMBL1425797	0.88	434.44	6	1	7	
F3382-0881	CHEMBL1505300	0.94	356.83	1	2	2	F0600-0377	CHEMBL2159933	0.88	362.83	2	1	2	
F1607-0931	CHEMBL1305050	0.94	499.54	7	1	7	F1606-0013	CHEMBL1305050	0.88	467.58	5	1	4	
F3222-2075	CHEMBL1505300	0.94	336.41	2	2	2	F3168-1395	CHEMBL1487831	0.88	365.43	4	1	3	
F1759-0081	CHEMBL2349147	0.94	409.48	5	2	4	F1605-0903	CHEMBL1487831	0.88	379.46	4	1	3	
F0412-0230	CHEMBL1398814	0.94	299.71	2	1	3	F3168-1412	CHEMBL1487831	0.88	331.41	5	1	3	
F0359-0155	CHEMBL2159933	0.94	394.90	2	1	2	F3168-1396	CHEMBL1487831	0.88	345.44	6	1	3	
F3226-3025	CHEMBL1425797	0.94	444.44	6	1	7	F0820-0402	CHEMBL556847	0.88	552.44	8	0	6	
F1191-0136	CHEMBL1569991	0.94	413.54	6	3	3	F3260-0616	CHEMBL1569991	0.88	344.39	5	2	4	
F3382-0884	CHEMBL1505300	0.94	356.83	1	2	2	F3349-0176	CHEMBL3693894	0.88	413.49	5	0	4	
F1525-1602	CHEMBL1425797	0.94	410.38	6	1	8	F2034-0067	CHEMBL3693903	0.88	473.97	4	0	4	
F0646-1819	CHEMBL1882430	0.94	342.35	4	1	5	F3226-0911	CHEMBL1425797	0.88	434.44	6	1	7	
F3382-0550	CHEMBL1505300	0.94	356.83	1	2	2	F1174-3150	CHEMBL1467625	0.88	329.37	4	1	2	
F1607-0401	CHEMBL1305050	0.94	483.54	6	1	6	F1602-0186	CHEMBL1305050	0.88	477.94	5	1	4	
F3382-0245	CHEMBL1505300	0.94	387.25	1	2	2	F3226-0798	CHEMBL1425797	0.88	446.45	8	1	7	
F0372-0196	CHEMBL1569991	0.94	372.48	7	2	3	F1607-0412	CHEMBL1305050	0.88	497.61	6	1	5	
F0372-0197	CHEMBL1569991	0.94	372.48	7	2	3	F1604-0102	CHEMBL1305050	0.88	483.58	7	1	5	
F3228-0134	CHEMBL2159045	0.94	282.29	2	1	4	F1605-1342	CHEMBL1305050	0.88	499.58	8	1	6	



## Додаток Г

## Джерело та контроль інформації про амінокислоти, які беруть участь у зв'язуванні інгібіторів, визначених за допомогою сервісу PoseView

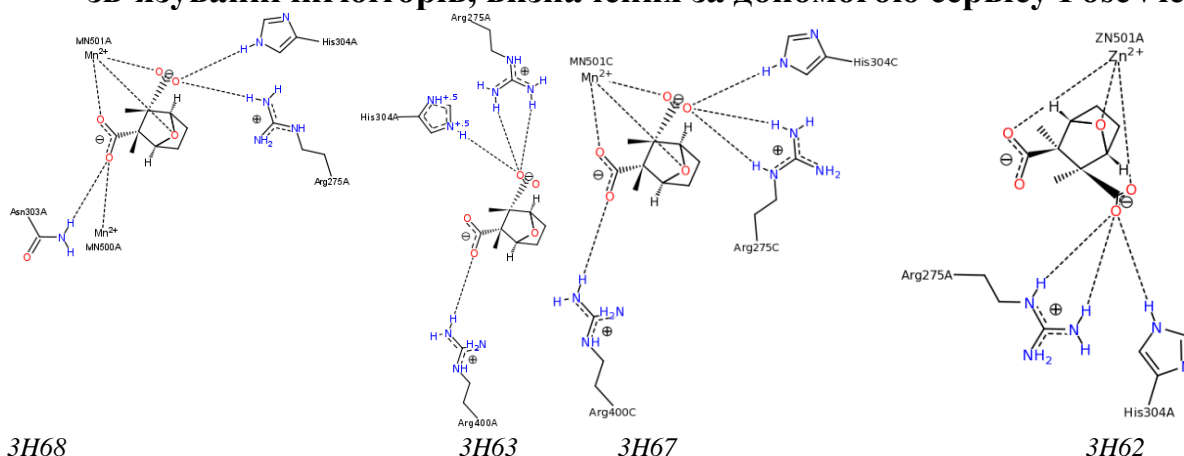


Рис 1. PDB - пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні інгібітору – кантаридинової к-ти з PP типу 5 (PDB: 3N68, 3N63, 3N67, 3N62). Показано, що в зв'язуванні ліганду на поверхні молекул PP, беруть участь - 3 амінокислоти (His304, Asn303, Arg275) і (Arg400, His304, Arg275). Також показано, що в зв'язуванні інгібітору беруть участь 9 амінокислотних залишків. Повноту амінокислотної послідовності експериментально отриманих PP, визначали методом парного вирівнювання с оригінальним сиквенсом (Uniprot: P53041) в програмному пакеті ClustalX 2.0.

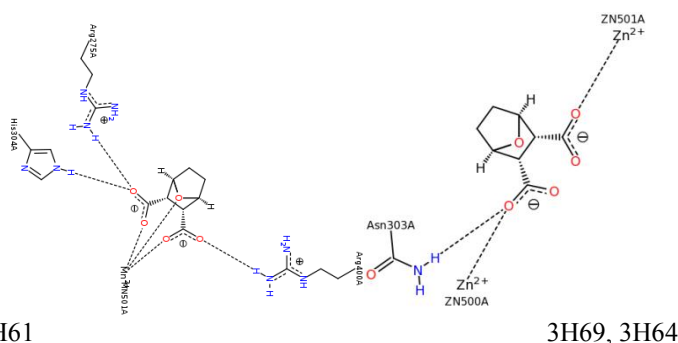


Рис 2. PDB - пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні інгібітору - норкантаридину з (ендоталу) PP типу 5 (PDB: 3N61, 3N69, 3N64). Показано, що в зв'язуванні ліганду на поверхні молекул PP, беруть участь - 3 амінокислоти (Arg400, His304, Arg275). Також показано, що в зв'язуванні інгібітору беруть участь 9 амінокислотних залишків. Повноту амінокислотної послідовності експериментально отриманих PP, визначали методом парного вирівнювання с оригінальним сиквенсом (Uniprot: P53041).

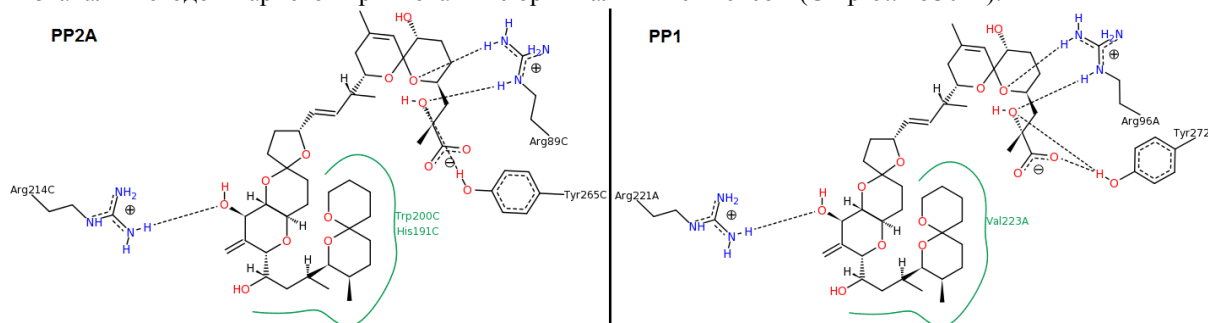


Рис 3. PDB - пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні інгібітору – окадаїнової к-ти з PP типу PP2AA та PP1G (PDB: 2IE4, 1U32, 1JK7). Показано, що в зв'язуванні ліганду на поверхні молекул PP, беруть участь - 5 амінокислот (Arg89, Arg214, His191, Trp200, Tyr265) у випадку PP2AA та 4 амінокислоти (Arg96, Arg221, Val223, Tyr272) для PP1 відповідно. Також показано, що в зв'язуванні та стабілізації інгібітору на поверхності протеїнфосфатази оберуть участь 10 амінокислотних залишків. Повноту амінокислотної послідовності експериментально отриманих PP, визначали методом парного вирівнювання с оригінальними сиквенсами (Uniprot: P36873, P62136) в програмному пакеті ClustalX 2.0.

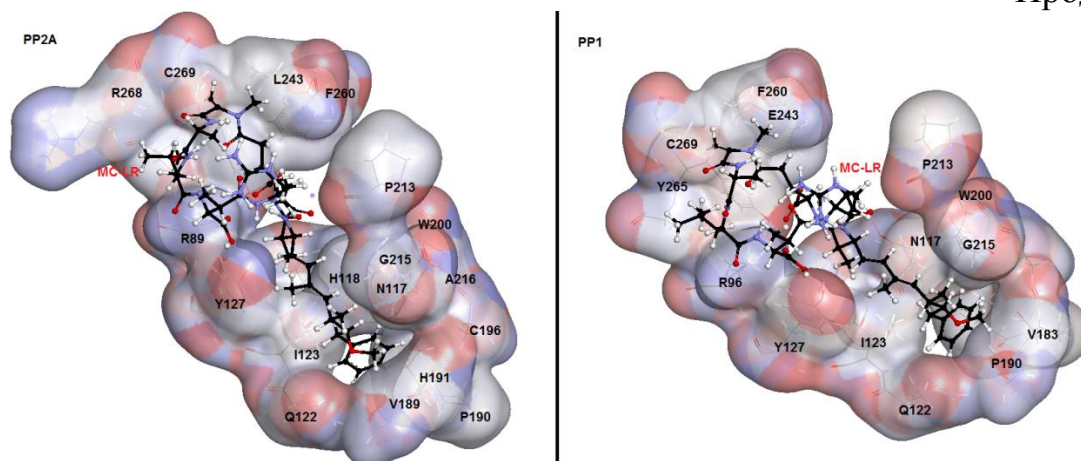


Рис 4. PDB - пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні інгібітору – мікроцистину з PP типу PP2AA та PP1G (PDB: 2NYM, 2NYL, 2NPP, 1FJM, 3DW8). Оцінка консервативності амінокислотного складу сайтів зв'язування, оточення і аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми DS Visualizer 2.5. Показали, що в зв'язуванні і стабілізації інгібітора також беруть участь 21 та 20 амінокислотних залишків відповідно. Повноту амінокислотної послідовності експериментально отриманих PP, визначали методом парного вирівнювання с оригінальними сиквенсами (Uniprot: P67775, P62139) в програмному пакеті ClustalX 2.0.

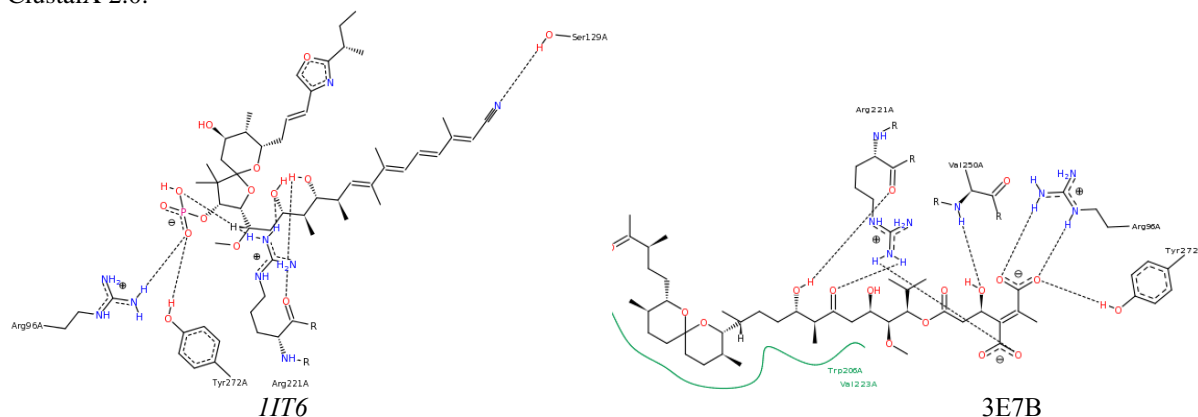


Рис 5. PDB - пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні інгібіторів – калікуліну та таумоцидну з PP1G (PDB: 1IT6, 3E7B). Показано, що в зв'язуванні ліганду на поверхні молекул PP, беруть участь - 4 амінокислоти (Arg96, Ser129, Arg221, Tyr272) та - 6 амінокислот (Arg96, Trp206, Arg221, Val223, Val250, Tyr272) відповідно. Також показано, що в зв'язуванні калікуліну беруть участь 8 амінокислотних залишків, тоді як у зв'язуванні таумоцидну беруть участь 14 амінокислотних залишків. Повноту амінокислотної послідовності експериментально отриманих PP, визначали методом парного вирівнювання с оригінальним сиквенсом (Uniprot: P36873, P62136) в програмному пакеті ClustalX 2.0.

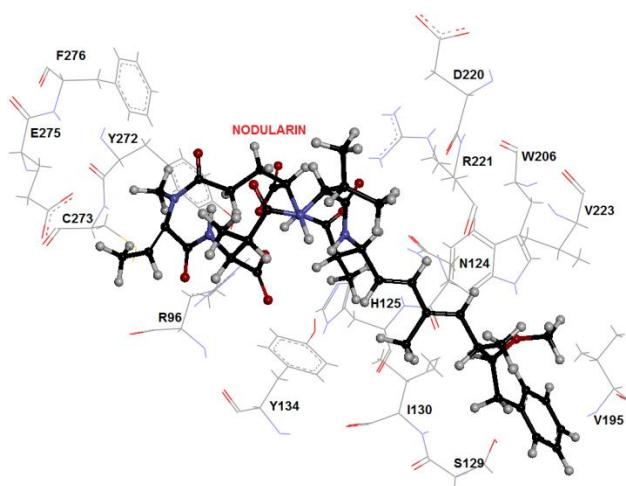
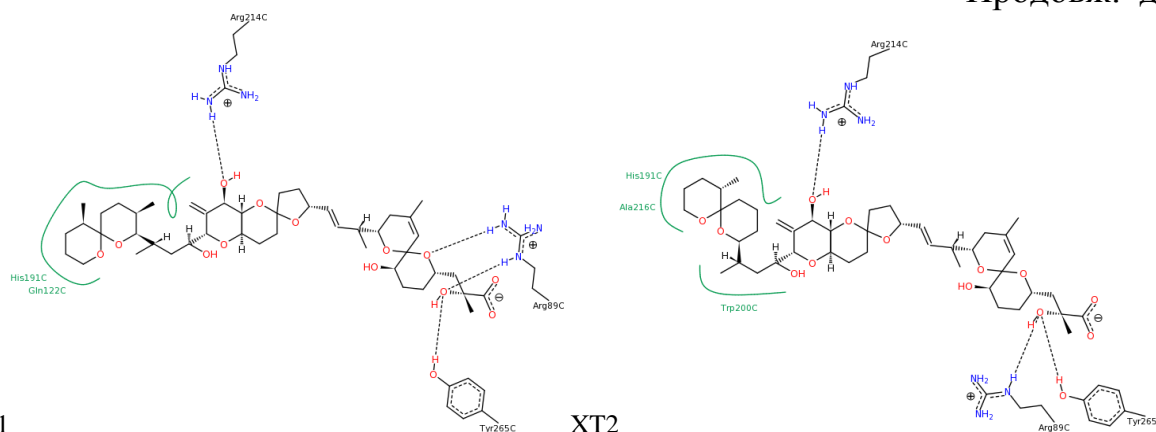


Рис.6. PDB - пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні інгібіторів – нодуларину (Nodularin –R) та мотупорину (Nodularin-A) з PP типу PP1G та PP1A (PDB: 3EGH, 3E7A, 2BCD). Оцінка консервативності амінокислотного складу сайтів зв'язування, оточення і аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми DS Visualizer 2.5. Показали, що в зв'язуванні і стабілізації інгібітора також беруть участь 18 та 10 амінокислотних залишків відповідно. Повноту амінокислотної послідовності експериментально отриманих PP, визначали методом парного вирівнювання с оригінальними сиквенсами (Uniprot: P62136, P36873) в програмному пакеті ClustalX 2.0.



XT1

XT2

Рис. 7. PDB - пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні інгібіторів динофізистоксину 1 (DTX 1) і динофізистоксину 2 (DTX 2) з PP типу PP2AA (PDB: 3K7V, 3K7W). Показано, що в зв'язуванні лігандів на поверхні молекул PP, беруть участь - 5 амінокислот (Arg89, Gln122, His191, Arg214, Tyr265) у випадку DTX 1 та 6 амінокислоти (Arg89, His191, Arg214, Ala216, Trp200, Tyr272) для DTX 2 відповідно. Повноту амінокислотної послідовності експериментально отриманих PP, визначали методом парного вирівнювання с оригінальними сиквенсами (Uniprot: P67775) в ClustalX 2.0.

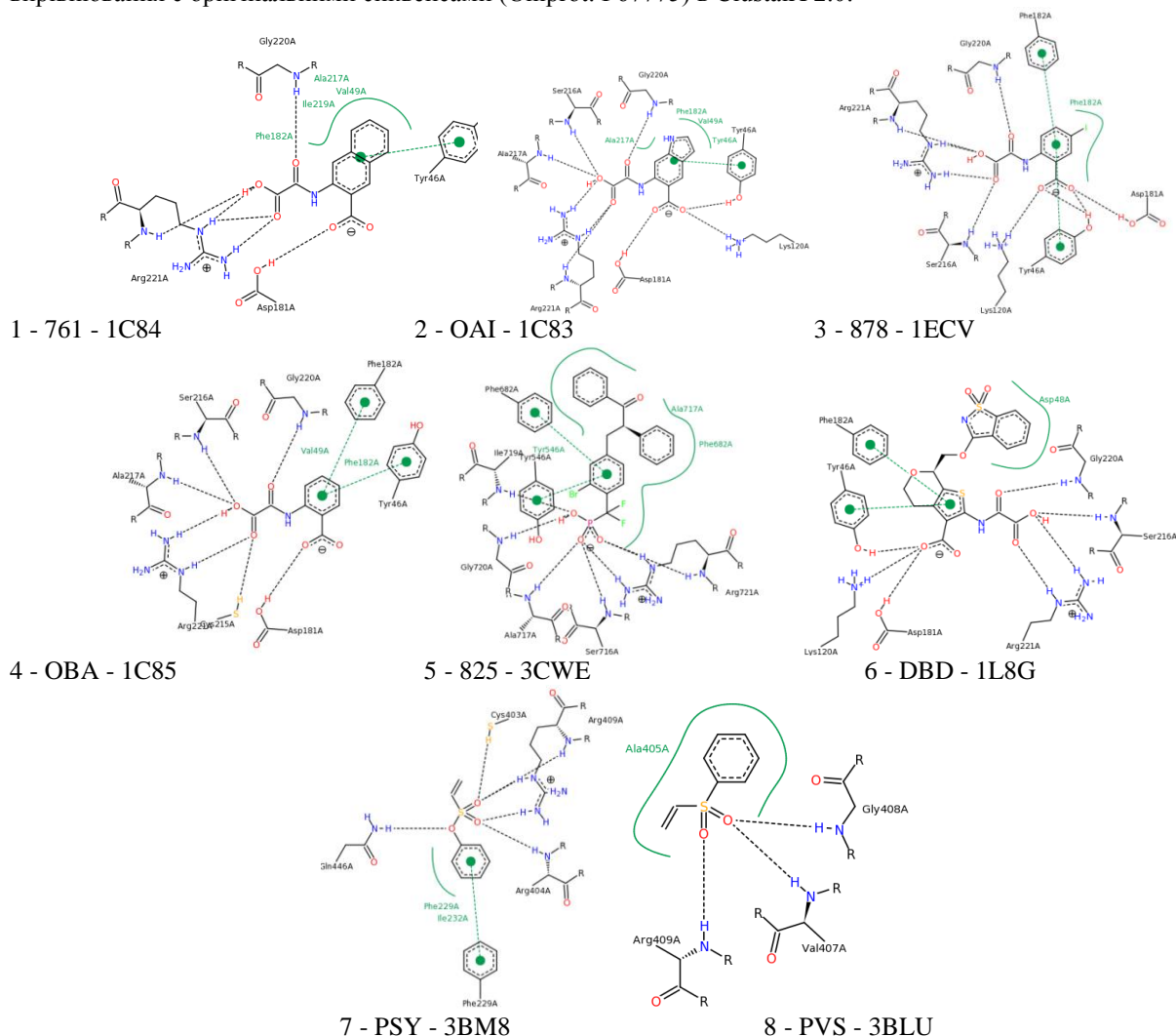


Рис. 8. PDB - пошук амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні інгібіторів з тирозин-специфічними PP (PDB: 1C84, 1C83, 1ECV, 1C85, 3CWE, 1L8G, 3BM8, 3D9C, 3BLU). Показано, що в зв'язуванні лігандів на поверхні молекул PP, приймають участь - від 3х до 11 амінокислот . Повноту амінокислотних послідовностей експериментально отриманих PP, визначали методом парного вирівнювання с оригінальним сиквенсом (Uniprot: 1-6 - P18031, 7-8 - P15273) в програмному пакеті ClustalX 2.0.

## Додаток Д

## Результати аналізу ролі води у формуванні ліганд-білкових комплексів для інгібіторів окадаїнової кислоти та мікроцистину з PP 1 та 2A

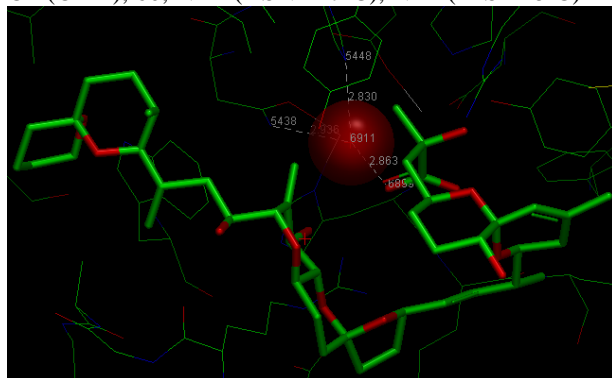
## Окадаїнова кислота (OKADAIC ACID)

9,10-DEEPIHTHIO-9,10-DIDENHYDROACANTHIFOLICIN

Ligand OKA\_401 (PDB: 2ie4 ) PP2A

Ligand Water Protein

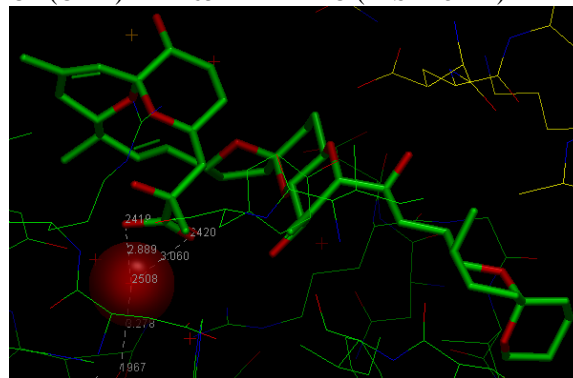
O2 (OKA), 60, ND2 (ASN 117-C), NE2 (HIS 118-C)



Ligand OKA\_501 (PDB: 1u32 ) PP1

Ligand Water Protein

O2 (OKA) 65 O (HIS 248 - A)



## Мікроцистин - LR (MCLR)

3-METHYL-ASPARTIC ACID;2,6,8-TRIMETHYL-3-AMINO-9-BENZYL-9-METHOXYNONANOIC ACID;4-CARBOXY-4-AMINO BUTANAL;N-METHYLALANINE;D-ALANINE

Ligand XRXXXXL\_1-M (PDB: 1fjm)

Ligand ACB-ARG-ADD-XXXL\_401-I  
(PDB: 2ie3, 2nym, 2nyl)

Ліганд ковалентно пов'язаний з білком, вода відсутня

Ligand Water Protein

O1 (XRXXXXL), 1, OD2(ASP64-A), NE2(HIS66-A), OH(TYR272-A)

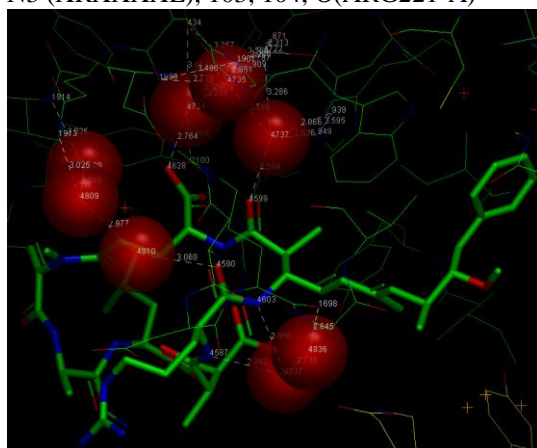
O1 (XRXXXXL), 2, 4, OD2(ASP92-A), O(HIS248-A), ND1(HIS248-A)

O1 (XRXXXXL), 4, ND2(ASN124-A), NE2(HIS125-A)

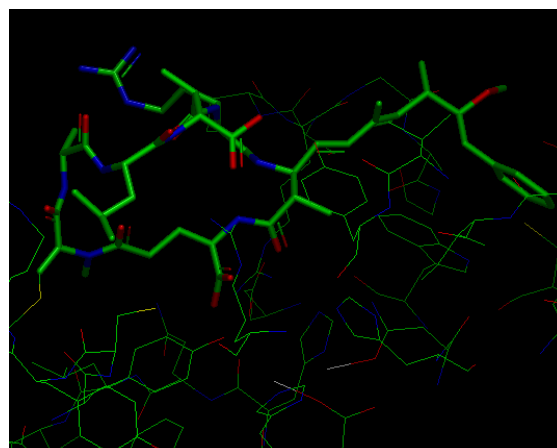
O (XRXXXXL), 75, 76, 77, N(VAL250-A)

O (XRXXXXL), 76 77, NE2(GLN249-A)

N3 (XRXXXXL), 103, 104, O(ARG221-A)



271-274



3fga - 91

## Результати аналізу ролі води у формуванні ліганд-білкового комплексу для інгібіторів данофізистоксину 1 та 2 з PP2A

### 18 Динофізистоксин (Dinophysistoxin-1, 2)

(2r)-3-[(2s,5r,6r,8s)-8-[(1r,2e)-3-[(2r,4a'r,5r,6's 8'r,8a's)-6'-[(1s,3s)-3-[(2s,3r,6r,11r)-3,11-dimethyl 1,7-dioxaspiro[5.5]undec-2-yl]-1-hydroxybutyl]-8 hydroxy-7'-methylideneoctahydro-3h,3'h-spiro[furan-2 2'-pyrano[3,2-b]pyran]-5-yl]-1-methylprop-2-en-1-yl]-5-hydroxy-10-methyl-1,7-dioxaspiro[5.5]undec-10-en-2 yl]-2-hydroxy-2-methylpropanoic acid

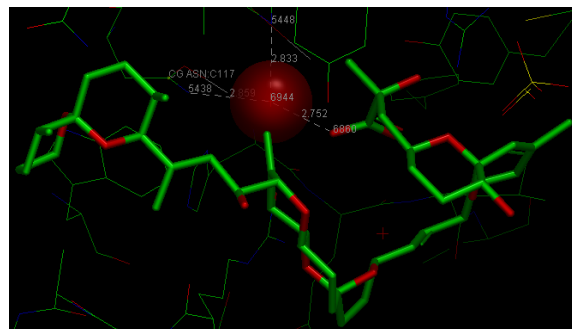
Ligand XT1\_401-C (PDB: 3k7v ) PP2A

O2 (XT1), 313, ND2 (ASN 117 - C), NE2 (HIS 118 - C)

(2R)-2-hydroxy-3-[(2S,5R,6R,8S)-5-hydroxy- 8-[(1R,2E)-3-[(2R,4a'R,5R,6'S,8'R,8a'S)-8'-hydroxy-6'-[(1S,3S)-1-hydroxy-3-[(2S,6R,11S)- 11-methyl-1,7-dioxaspiro[5.5]undec-2-yl]butyl]-7'-methylideneoctahydro-3H,3'H-spiro[furan- 2,2'-pyrano[3,2-b]pyran]-5-yl]-1-methylprop- 2-en-1-yl]-10-methyl-1,7-dioxaspiro[5.5]undec-10-en-2-yl]-2-methylpropanoic acid

Ligand XT1\_401-C (PDB: 3k7w ) PP2A

O2 (XT2), 311, ND2 (ASN 124 - C), NE2 (HIS 125 - C)



## Результати аналізу ролі води у формуванні ліганд-білкових комплексів для інгібіторів дигідромікроцистину, калікуліну А, нодуларину, мотупорину і таутоміцину з PP 1

### 8,18 Дигідромікроцистин (Dihydromicrocystin-LA)

(2S,5R,8S,11R,12S,15S,18S,19S,22R)-18-[(1E,3E,5S,6S)-6-methoxy-3,5-dimethyl-7-phenyl-hepta-1,3-dienyl]-1,2,5,12,15,19-hexamethyl-8-(2-methylpropyl)-3,6,9,13,16,20,25-heptakis(oxidanylidene)-1,4,7,10,14,17,21-heptazacyclopentacosane-11,22-dicarboxylic acid

Ligand DLQ\_500 (PDB entry 2bdx )

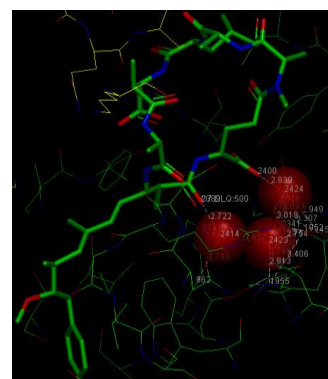
Ligand, Water, Protein

O7 (DLQ), 8, ND2 (ASN 124 - A), NE2 (HIS 125 - A)

O7 (DLQ), 17, 8, OD2 (ASP 92-A), O(HIS 248-A), ND1(HIS248-A)

O11 (DLQ), 17, 18, OD2 (ASP92-A), O(HIS248-A), ND1(HIS248-A)

O11 (DLQ), 18, OD2 (ASP 64 - A), NE2 (HIS 66 - A)



### 1,2,5,6,8,Калікулін А (CALYCULIN A)

[(2R,3R,5R,7S,8S,9R)-2-[(1S,3S,4S,5R,6R,7E,9E,11E,13Z)-14-cyano-3,5-dihydroxy-1-methoxy-4,6,8,9,13-pentamethyl-tetradeca-7,9,11,13-tetraenyl]-7-[(E)-3-[2-[(2S)-4-[[[(2S,3S,4S)-4-dimethylamino-2,3-dihydroxy-5-methoxy-pentanoyl]amino]butan-2-yl]-1,3-oxazol-4-yl]prop-2-enyl]-9-hydroxy-4,4,8-trimethyl-1,6-dioxaspiro[4.5]decan-3-yl]dihydrogen phosphate

Ligand CYU\_501 (PDB entry 1it6 )

Ligand, Water, Protein

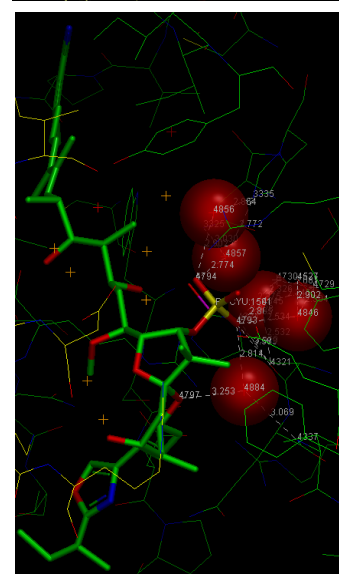
O6 (CYU), 601, OD2(ASP92-A), O(HIS248-A), ND1(HIS248-A)

O6 (CYU), 602, OH (TYR 272 - A)

O6 (CYU), 607, N (VAL 250 - A)

O7 (CYU), 608, NE2 (HIS 125 - A)

O7 (CYU), 612, ND2 (ASN 124 - A), NE2 (HIS 125 - A)



**8, 477-479, Нодуларин (NODULARIN-R)**

amino[(3-{{2z,5s,6s,9r,12s,13r,16r}-5,16-dicarboxy-2 ethylidene-12-[(1e,3e,5s,6r)-6-methoxy-3,5-dimethyl-7 phenylhepta-1,3-dien-1-yl]-1,6,13-trimethyl-3,7,10,14 19-pentaoxo-1,4,8,11,15-pentazacyclononadecan-9 yl)propyl)amino]methaniminium

Ligand X9A\_331-A (PDB entry 3egh )

Ligand, Water, Protein

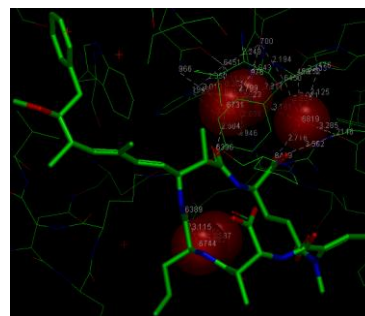
O11 (X9A), 344,554, OD2(ASP92-A),O(HIS248-A), ND1(HIS248-A)

O4 (X9A), 344,642, OD2(ASP92-A), O(HIS248-A), ND1(HIS248-A)

O11 (X9A), 554, ND2 (ASN 124 - A), NE2 (HIS 125 - A)

O3 (X9A), 410,567, NE2 (GLN 249 - A)

O4 (X9A), 642, OD2(ASP 64-A), NE2(HIS66-A), OH(TYR272-A)

**11,35,90,97,109,160,230,247, Таутоміцин (Tautomycin)**

(2z)-2-[(1r)-3-[[1r,2s,3r,6s,7s,10r)-10-[(2s,3s,6r 8s,9r)-3,9-dimethyl-8-[(3s)-3-methyl-4-oxopentyl]-1,7 dioxaspiro[5.5]undec-2-yl]-3,7-dihydroxy-2-methoxy-6 methyl-1-(1-methylethyl)-5-oxoundecyl] oxy]-1-hydroxy 3-oxopropyl]-3-methylbut-2-enedioic acid

Ligand E7B\_500-A (PDB entry 3e7b )

Ligand, Water, Protein

O3 (E7B), 516, O (ASN 124 - A), NE1 (TRP 206 - A)

O9 (E7B), 540, ND2 (ASN 124 - A), NE2 (HIS 125 - A)

O2 (E7B), 595 OD1 (ASP 197 - A)

O10 (E7B), 602 NE2 (HIS 125 - A)

O1 (E7B), 731 702 665 725 614 OH (TYR 134 - A)

O2 (E7B), 688 692 595 O (GLY 222 - A)

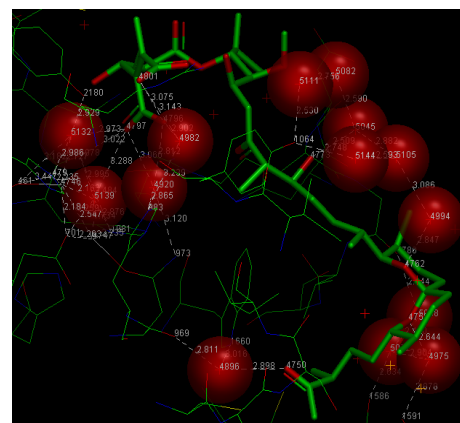
O2 (E7B), 692 595 O (ASP 197 - A)

O4 (E7B), 731 702 665 OH (TYR 134 - A)

O9 (E7B), 752, OD2(ASP 64 - A)NE2 (HIS 66 - A)OH (TYR 272 - A)

O9 (E7B), 759, OD2 (ASP92 - A) O (HIS 248 - A) ND1 (HIS 248 - A)

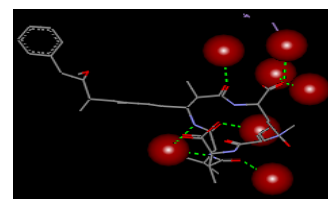
O1 (E7B), 764 725 614 665OH (TYR 134 - A)

**Мотупорин (Motuporin = Nodularin V)**

(2Z,5R,6S,9S,12S,13S,16R)-2-ethylidene-12-[(1E,3E,5S,6S)-6-methoxy-3,5-dimethyl-7-phenyl-hepta-1,3-dienyl]-1,6,13-trimethyl-3,7,10,14, 19-pentakis(oxidanylidene)-9-propan-2-yl-1,4,8,11,15-pentazacyclononadecane-5,16-dicarboxylic acid

Ligand PRD\_000213\_301-A (PDB: 2bcd)

Water № 3, 22, 33, 45, 52, 57, 68



## Додаток Е

**Похідні окадаїнової кислоти відібрані за допомогою різноманітних  
дескрипторів з бази даних PubChem**

PubChem №	Хімічна назва
1. CID65452 Narasin	(2R)-2-[(2R,3S,5S,6R)-6-[(2S,3S,4S,6R)-6-[(3S,5S,7R,9S,10S,12R,15R)-3-[(2R,5R,6S)-5-ethyl-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]-15-hydroxy-3,10,12-trimethyl-4,6,8-trioxadispiro[4.1.5 <sup>^</sup> {7}.3 <sup>^</sup> {5}]]pentadec-13-en-9-yl]-3-hydroxy-4-methyl-5-oxooctan-2-yl]-3,5-dimethyloxan-2-yl]butanoic acid
2. CID72370 Salinomycine	(2R)-2-[(5S,6R)-6-[(2S,3S,4S,6R)-6-[(3S,5R,7S,9S,10S,12R,15R)-3-[(2R,5R,6S)-5-ethyl-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]-15-hydroxy-3,10,12-trimethyl-4,6,8-trioxadispiro[4.1.5 <sup>^</sup> {7}.3 <sup>^</sup> {5}]]pentadec-13-en-9-yl]-3-hydroxy-4-methyl-5-oxooctan-2-yl]-5-methyloxan-2-yl]butanoic acid
3. CID197168 Dihydrodrubratoin B	CCCCCCC(C1C(C2=C(CC(CC3=C1C(=O)OC3=O)C(C4CCCC(=O)O4)O)C(=O)OC2=O)O)O
4. CID44288019	(E,4R)-6-[(3R,4S,5R,8S,9S,12R)-12-[(2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-dimethyl-8-[(3S)-3-methyl-4-oxopentyl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-2-yl]-5,9-dihydroxy-4-methoxy-2,8-dimethyl-7-oxotridecan-3-yl]oxy-4-hydroxy-2-methyl-6-oxohex-2-enoic acid
5. CID44451975 tautomycin diacid	(Z)-2-[(1R)-3-[(3R,4S,5R,8S,9S,12R)-12-[(2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-dimethyl-8-[(3S)-3-methyl-4-oxopentyl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-2-yl]-5,9-dihydroxy-4-methoxy-2,8-dimethyl-7-oxotridecan-3-yl]oxy-1-hydroxy-3-oxopropyl]-3-methylbut-2-enedioic acid
6. CID6441186 Milbemycin B	28-deoxy-6,28-epoxy-22-hydroxy-26-((2-methyl-1-oxo-2-butenyl)oxy)-25-(1-methyl-1-propenyl)-
7. CID6442282 Didemnaketol A	methyl (E)-7-acetyloxy-11-[2-(1-hydroxy-2-oxopropyl)-4,10-dimethyl-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-8-yl]-2,6,10-trimethyl-8,11-bis(3-methylbutanoyloxy)-5-propanoyloxyundec-2-enoate
8. CID9852385	CCC1C(CCC2(O1)CC3CC(O2)CC=C(CC(C=CC=C4COC5C4(C(C=C(C5O)COC(=O)C=C(C)C)C(=O)O3)O)C)C)C
9. CID9917197	CC1CCC2(CC3CC(O2)CC=C(CC(C=CC=C4COC5C4(C(C=C(C5O)COC(=O)C=C(C)C)C(=O)O3)O)C)C)O C1C
10. CID10259037	CC=C(C)C1C(CC(C2(O1)CC3CC(O2)CC=C(CC(C=CC=C4COC5C4(C(C=C(C5O)COC(=O)C=C(C)C)C(=O)O3)O)C)C)O)C
11. CID133001	1-[3-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]propyl]benzotriazole
12. CID10437923	(E,3R,4S,8S,9S,12R)-12-[(2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-dimethyl-8-[(3S)-3-methyl-4-oxopentyl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-2-yl]-3,9-dihydroxy-4-methoxy-2,8-dimethyltridec-5-en-7-one
13. CID10440900	methyl (E)-7-acetyloxy-11-[(2R,4S,6R,8R,10R)-2-[(E)-1-hydroxy-8-methoxy-2,6-dimethyl-8-oxooct-2-enyl]-4,10-dimethyl-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-8-yl]-2,6,10-trimethyl-8,11-bis(3-methylbutanoyloxy)-5-propanoyloxyundec-2-enoate
14. CID10581662	4-O-[(3R,4S,5R,8S,9S,12R)-12-[(2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-dimethyl-8-[(3S)-3-methyl-4-oxopentyl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-2-yl]-5,9-dihydroxy-4-methoxy-2,8-dimethyl-7-oxotridecan-3-yl] 1-O,2-O-bis(trimethylsilyl) (Z,3R)-3-hydroxy-1-methylbut-1-ene-1,2,4-tricarboxylate
15. CID9810184	(3R,4S,5S,6R,7R,9R,11R,12R,13S,14R)-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-4-[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-6-[[2S,3R,6R)-3-hydroxy-6-methyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]oxy]-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-oxacyclotetradecane-2,10-dione
16. CID10887444	(3E,5E,7S,8S,11E,13E,15S,16S)-8-[(2S,3R,4S)-4-[(2R,4R,5R,6R)-4-[(2R,4S,5S,6S)-4,5-dihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-5-ethyl-2-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]-3-hydroxypentan-2-yl]-16-[(E,2S,3R,4S,8S,9R)-8-ethyl-3,9-dihydroxy-4-methyl-5-oxodec-6-en-2-yl]-7,15-dimethyl-1,9-dioxacyclohexadeca-3,5,11,13-tetraene-2,10-dione
17. CID10052192	[(3R,4S,5R,8S,9S,12R)-5,9-dihydroxy-4-methoxy-2,8,12-trimethyl-7-oxotetradecan-3-yl] (3R)-3-hydroxy-3-(4-methyl-2,5-dioxofuran-3-yl)propanoate
18. CID3053530 Deoxy-epi-narasin	2-[6-[6-[3-(5-ethyl-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl)-3,10,12-trimethyl-4,6,8-trioxadispiro[4.1.5 <sup>^</sup> {7}.3 <sup>^</sup> {5}]]pentadec-13-en-9-yl]-3-hydroxy-4-methyl-5-oxooctan-2-yl]-3,5-dimethyloxan-2-yl]butanoic acid
19. CID6426775	(2R)-2-[(2R,3S,5S,6R)-6-[(2S,3S,4S,6R)-6-[(3S,5S,7R,9S,10S,12R,15R)-3-[(2R,5R)-5-ethyl-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]-15-hydroxy-3,10,12-trimethyl-4,6,8-trioxadispiro[4.1.5 <sup>^</sup> {7}.3 <sup>^</sup> {5}]]pentadec-13-en-9-yl]-3-hydroxy-4-methyl-5-oxooctan-2-yl]-3,5-dimethyloxan-2-yl]butanoate
20. CID10930148	CC1CCC2(CC3CC(O2)CC=C(CC(C=CC=C(C4(C(C=C(C(C4O)OC)C)C(=O)O3)O)C(=O)OC)C)C)OC1C(C)C
21. CID10930902	2-O-tert-butyl 4-O-[(3R,4S,5R,8S,9S,12R)-12-[(2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-dimethyl-8-[(3S)-3-methylpent-4-enyl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-2-yl]-5,9-dihydroxy-4-methoxy-2,8-dimethyl-7-oxotridecan-3-yl] 1-O-ethyl (Z,3R)-3-hydroxy-1-methylbut-1-ene-1,2,4-tricarboxylate
22. CID11039953	(2R)-2-[(2R,5S,6R)-6-[(2S,3S,4S,6R)-6-[(3S,5R,7S,9S,10S,12R)-3-[(2R,5R,6S)-5-ethyl-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]-3,10,12-trimethyl-15-oxo-4,6,8-trioxadispiro[4.1.5 <sup>^</sup> {7}.3 <sup>^</sup> {5}]]pentadec-13-en-9-yl]-3-hydroxy-4-methyl-5-oxooctan-2-yl]-5-methyloxan-2-yl]butanoic acid
23. CID11320304	CC(C1CC2C3C(=CC(=O)O3)CC(O2)C(C=CC4CC(=CC(=O)OC)CC(O4)CC5(C(C(C(C(O5)CC(CC(=O)O1)O)OC(=O)C(C)C)C)C)O)C)C)O
24. CID11331514	(5E,17E)-10,11,13,15-tetrahydroxy-6'--(2-hydroxybutyl)-5',10,14,16,25-pentamethyl-4-(2-methylpropyl)spiro[20,24-dioxabicyclo[19.3.1]pentacosa-5,17-diene-23,2'-oxane]-3,19-dione
25. CID21775564	CC1CC(=O)C=C(CC2C=C(C3CC(C(C1(O3)O)O)C(=C)C)C(=O)O2)C
26. CID23228641	CC1CC(=O)C=C(CC2C=C(C3CC(C(C1(O3)O)O)C(=C)C)C(=O)O2)C

## Додаток Ж

**Хімічні назви селективних інгібіторів протеїнфосфатаз використаних  
для молекулярного докінгу**

Окадаїнова кислота Okadaic acid; C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>	(2R)-3-[(2S,5R,6R,8S)-8-[(2R,3E)-4-[(2R,4'aR,5R,6'S,8'R,8'aS)-8'-гідрокси-6'-[(1S,3S)-1-гідрокси-3-[(2S,3R,6S)-3-метил-1,7-діоксаспіро[5.5]ундекан-2-іл]бутил]-7'-метиліден-гексагідро-3'H-спіро[оксолан-2,2'-пірано[3,2-b]піран]-5-іл]бут-3-ен-2-іл]-5-гідрокси-10-метил-1,7-діоксаспіро[5.5]андец-10-ен-2-іл]-2-гідрокси-2-метилпропанова кислота;
Мікроцистин-LR Microcystin-LR; C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	азаніл-[3-[(5R,8S,11R,12S,15S,18S,19S,22R)-11,22-дикарбокси-18-[(1E,3E,5S,6S)-6-метокси-3,5-диметил-7-феніл-гепта-1,3-дієніл]-1,5,12,19-тетраметил-2-метиліден-8-(2-метилпропіл)-3,6,9,13,16,20,25-гептакіс (оксиданіліден)-1,4,7,10,14,17,21- гептазациклопентакос -15-yl]пропіламіно] метиліден]азаніум
Мікроцистин-LA Microcystin-LA; C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	(2S,5R,8S,11R,12S,15S,18S,19S,22R)-18-[(1E,3E,5S,6S)-6-метокси-3,5-диметил-7-феніл-гепта-1,3-дієніл]-1,2,5,12,15, 19-гексаметил-8-(2-метилпропіл)-3,6,9,13,16,20,25-гептакіс(оксиданіліден)-1,4, 7,10,14,17,21- гептазациклопентакосан-11,22- дикарбонова кислота
Нодуларин-R Nodularin-R; C <sub>41</sub> H <sub>61</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub>	[азаніл-[3-[(2Z,5R,6S,9S,12S,13S,16R)-5,16-дикарбокси-2-етиліден-12-[(1E,3E,5S,6S)-6-метокси-3,5-диметил-7-феніл-гепта-1,3-дієніл]-1,6,13-триметил-3,7,10,14,19-пентакіс(оксиданіліден)-1,4,8,11,15-пентаза циклонанадек-9-іл]пропіламіно] метиліден]азаніум
Мотупорин Nodularin V; C <sub>40</sub> H <sub>57</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	(2Z,5R,6S,9S,12S,13S,16R)-2-етиліден-12-[(1E,3E,5S,6S)-6-метокси-3,5-диметил-7-феніл-гепта-1,3-дієніл]-1,6,13-триметил-3,7,10,14, 19-пентакіс(оксиданіліден)-9-пропан-2-іл-1,4,8,11,15-пентазациклонадекан-5,16- дикарбонова кислота
Калікулін А Calyculin A; C <sub>50</sub> H <sub>81</sub> N <sub>4</sub> O <sub>15</sub> P	[(2R,3R,5R,7S,8S,9R)-2-[(1S,3S,4S,5R,6R,7E,9E,11E,13Z)-14-ціано-3,5-дигідрокси-1-метокси-4,6,8,9,13-пентаметил-тетрадека-7,9,11,13-тетраєніл]-7-[(E)-3-[2-[(2S)-4-[(2S,3S,4S)-4-диметиламіно-2,3-дигідрокси-5-метокси-пентаноїл]аміно]бутан-2-іл]-1,3-оксазол-4-іл] проп-2-єніл]-9-гідрокси-4,4,8-триметил-1,6-діоксаспіро[4.5]декан-3-іл] дигідрофосфат
Таутоміцину Tautomycin; C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> O <sub>14</sub>	(2Z)-2-[(1R)-3-[(1R,2S,3R,6S,7S,10R)-10- {(2S,3S,6R,8S,9R)-3,9-диметил-8-[(3S)-3- метил-4-оксопентил]-1,7-діоксаспіро[5.5]андец- 2-іл]-3,7-дигідрокси-2-метокси-6-метил-1- (1-метилетил)-5-оксоандецил]окси}-1-гідрокси- 3-оксопропіл]-3-метилбут-2-єнедіова кислота
Динофізистоксин 1 Dinophysistoxin-1; C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	2R)-3-[(2S,5R,6R,8S)-8-[(1R,2E)-3-[(2R,4a'R,5R,6'S,8'R,8a'S)- 6'-{(1S,3S)-3-[(2S,3R,6R,11R)-3,11-диметил- 1,7-діоксаспіро[5.5]андец-2-ил]-1-гідроксибутил}- 8'-гідрокси-7'-метиліденоктагідро-3H,3'H- спіро[фуран-2,2'-пірано[3,2-b]піран]-5-іл]- 1-метилпроп-2-ен-1-іл]-5-гідрокси-10-метил- 1,7-діоксаспіро[5.5]андец-10-ен-2-іл]-2-гідрокси- 2-метилпропанова кислота
Динофізистоксин 2 Dinophysistoxin-2; C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>	(2R)-2-гідрокси-3-[(2S,5R,6R,8S)-5-гідрокси- 8-[(1R,2E)-3-[(2R,4a'R,5R,6'S,8'R,8a'S)-8'- гідрокси-6'-{(1S,3S)-1-гідрокси-3-[(2S,6R,11S)-11-метил-1,7-діоксаспіро[5.5]андец-2-ил]бутил}- 7'-метиліденоктагідро-3H,3'H-спіро[фуран- 2,2'-пірано[3,2-b]піран]-5-іл]-1-метилпроп-2-ен-1-іл]-10-метил-1,7-діоксаспіро [5.5]андец- 10-ен-2-іл]-2- метилпропанова кислота
Кантаридин Cantharidin CID 2544	(1R,2S,3R,4S)-2,3-диметил-7- оксабіцикло [2.2.1] гептан- 2,3- дикарбонова кислота
Ендотал Norcantharidin/endothall	(1R,2S,3R,4S)-7- оксабіцикло [2.2.1] гептан - 2,3- дикарбонова кислота



## Додаток И

## Список публікацій здобувача

Статті:

1. Samofalova DA, Karpov P.A., Raevsky A.V., Blume Ya.B. Protein phosphatases associated with the microtubules regulation: spatial structure reconstruction and analysis. Cell Bio Int. [Preprint] 2017. Available from: doi: 10.1002/cbin.10810. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, постановка експериментів, участь у написанні статті)*
2. 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)*
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, Blum Ya. Bioinformatic Comparison of Human and Higher Plant Phosphatomes. Cytol Genet. 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)*

Продовж. дод. И

6. Самофалова Д, Карпов П, Блюм Я. Пошук рослинних молекулярних мішеней селективних інгібіторів серин-треонін специфічних протеїнфосфатаз. Вісник Львівського ун-ту. 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 Genet. 2011;45(3):153–162. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті*)

Тези:

8. Самофалова ДО, Карпов ПА. Дослідження протеїнфосфатаз 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. (Очна участь)

9. Самофалова ДА, Карпов ПА. Анализ взаимодействия кантаридиновых ингибиторов с растительными протеинфосфатазами. *Друга конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія», 2013, 23-24 грудня, Київ, Україна.* с.36. (Очна участь)

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. (Заочна участь)

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

Продовж. дод. И

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. (Заочна участь)

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. (Очна участь)

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. (Заочна участь)

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. (Очна участь)

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. (Заочна участь)

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. (Заочна участь)

Продовж. дод. И

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, 04-07 May, Istanbul, Turkey.* p.90.

(Заочна участь)

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.

(Очна участь)

20. Самофалова ДА, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Результаты сравнительного биоинформационного анализа серин-треонин специфичных протеинфосфатаз из животных и высших растений. *I конференция молодых ученых ИПБГ «Биология растений и биотехнология», 2011, 5-7 июня, Белая Церковь, Украина.* с.71. (Очна участь)

21. Samofalova DA, Nyporko AYU, Blume YaB. Structural peculiarities of plant protein phosphatase interaction with okadaic acid. *The 7 International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, 2010, 20–27 June, Novosibirsk, Russia.* p.254. (Заочна участь)

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.

(Заочна участь)

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. (Заочна участь)

Додаток К  
Акти впровадження

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
ННЦ «Інститут біології»  
Кафедра загальної та  
молекулярної генетики  
спеціалізація клітинна біологія  
та генетична інженерія

Укладачі: ст. наук, співр. Карпов П.А., аси. Самофалова Д.О.

**БІОІНФОРМАТИКА**  
**РОБОЧА НАВЧАЛЬНА ПРОГРАМА**  
Для студентів спеціальності 7.07047 - “генетика”  
(заочна форма навчання)

Затверджено  
На засіданні кафедри  
Протокол № 12  
Від “29” червня 2011 р.  
Зав. кафедри

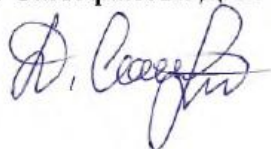
  
Демидов С.В.  
Директор ННЦ «Інститут біології»



Робоча навчальна програма з дисципліни “Біоінформатика”.

Укладачі: к.б.н., ст. наук. співр. Карпов Павло Андрійович,

асп. Самофалова Д.О.



Лектор: к.б.н., ст. наук. співр. Карпов П. А.



Погоджено  
З науково-методичною комісією  
«28» червня 2011 р.



Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
ННЦ «Інститут біології»

Кафедра загальної та  
молекулярної генетики  
спеціалізація клітинна біологія  
та генетична інженерія

Укладачі: ст. наук, співр. Карпов П.А., аси. Самофалова Д.О., асп.  
Раєвський О.В., мол. наук, співр. Демчук О.М.

**СТРУКТУРНА БІОІНФОРМАТИКА**  
**РОБОЧА НАВЧАЛЬНА ПРОГРАМА**

Для студентів спеціальності 7.070407 - "генетика"

Затверджено

На засіданні кафедри

Протокол № 12

Від "29" червня 2011 р.

Зав. кафедри

Демидов С.В.

Директор ННЦ «Інститут біології»



Робоча навчальна програма з дисципліни “Структурна біоінформатика”

Укладачі: к.б.н., ст. наук. співр. Карпов Павло Андрійович, асп. Самофалова

Дарія Олексіївна, асп. Раєвський Олексій Володимирович, мол. наук. співр.

Демчук Олег Миколайович.

Лектор: к.б.н., ст. наук. співр. Карпов П. А.

**Погоджено**

З науково-методичною  
комісією

«30» червня 2011 р.

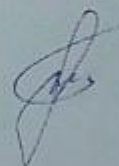


## А К Т

впровадження результатів досліджень, викладених у дисертаційній роботі  
Самофалової Д.О., у навчальний процес

Матеріали дисертаційної роботи Самофалової Дарії Олексіївни по темі: „Реконструкція просторової структури протеїнфосфатаз, задіяних в регуляції цитоскелету у рослин, та структурно-біологічні механізми їх взаємодії зі специфічними інгібіторами” поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія дійсно використовуються у навчальному процесі кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України) у викладанні дисципліни «Біохімія» для студентів факультету захисту рослин, біотехнологій та екології, спеціальності «Біотехнологія» (ОС Бакалавр).

Завідувач кафедри фізіології,  
біохімії рослин та біоенергетики  
к.б.н., доцент



Бойко О. А.

Декан факультету захисту рослин,  
біотехнологій та екології  
д.с.-г.н., професор,  
член-кореспондент НААН України



Доля М. М.