

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
доцент, к.б.н. Нипорко Олексій Юрійович  
Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри  
від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2022 р.

**ГІСТОНДЕАЦЕТИЛАЗА ТИПУ 6 В ЯКОСТІ МІШЕНІ ДЛЯ  
ІНГІБУВАННЯ ЗБУДЛИВОСТІ ПЕРВИННИХ НОЦЦЕПТИВНИХ  
НЕЙРОНІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студента спеціальності  
091 Біологія  
ОП «Біоінформатика і структурна біологія»  
**Стихиляс Марії Михайлівни**

Науковий керівник від кафедри  
доцент кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
к.б.н. **Самофалова Дарія Олексіївна**

Оцінка захисту роботи  
\_\_\_\_\_

Робота виконана в рамках наукового проекту Національного фонду досліджень №0120U104883 під керівництвом наук. спів. відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної Установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», к.б.н Самофалової Д.О.

Київ – 2022 р.

## АНОТАЦІЯ

Стихилияс М.М. Гістондеацетилаза типу 6 у якості мішені для інгібування збудливості первинних ноцицептивних нейронів периферичної нервової системи. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика і структурна біологія».

У роботі проведено аналіз структури та функцій гістондеацетилази типу 6, обґрунтовано участь у регуляції ноцицептивних каскадів за участі апарату цитоскелету, проаналізовано відомі селективні та неселективні інгібітори, проведено філогенетичний аналіз гістондеацетилаз різного походження, проаналізовано можливі мутантні форми, реконструйовано просторову структуру, побудовано карту сайту зв'язування, згенеровано дві фармакофорні моделі за рецептором і за лігандом, проведено порівняння цих двох моделей, виконано високопропускний віртуальний скринінг, комп'ютерний ADMED-аналіз, верифікація отриманих комплексів за допомогою моделювання молекулярної динаміки. Гістондеацетилази *Arabidopsis thaliana* та *Oryza sativa* класифіковано за їх філогенетичною спорідненістю до гістондеацетилаз людини. Встановлено, що мутації впливають на конформаційні зміни просторової структури в області петель, при цьому каталітичний домен залишається консервативним. Показано, що фармакофорна модель за рецептором дозволяє вдвічі скоротити вибірку хітів при проведенні високопропускного віртуального скринінгу, а схожість двох вибірок становить 46.34%. Молекулярно-динамічне моделювання верифікувало утворені ліганд-білкові комплекси, а також наглядно підтвердило необхідність проведення комп'ютерного ADMED-аналізу хітів. При підтвердженні результатів, вони зможуть бути використані для розробки нових знеболювальних препаратів, а також для збагачення фундаментальних наукових знань.

**Ключові слова:** HDAC6, високопропускний віртуальний скринінг, комп'ютерний ADMED-аналіз, моделювання молекулярної динаміки.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК</b>	<b>УМОВНИХ</b>
<b>СКОРОЧЕНЬ</b> .....	<b>3</b>
<b>ВСТУП</b> .....	<b>6</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	<b>8</b>
1.1. Сучасний стан таргетного лікування при хронічних больових станах різної етіології.....	8
1.2. Загальна характеристика родини гістондеацетилаз .....	9
1.3. Особливості просторової структури HDAC6 .....	14
1.4. Основні функції HDAC6.....	17
1.5. Селективні та неселективні інгібітори HDAC6 .....	17
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ</b> .....	<b>19</b>
2.1. Протокол дослідження .....	19
2.2. Філогенетичний аналіз гістондеацетилаз різного походження.....	19
2.3. Реконструкція 3D-моделей молекул гістондеацетилаз типу 6.....	20
2.4. Верифікація побудованої структурної моделі білка.....	20

2.5. Структурне вирівнювання нативної структури гістондеацетилази типу 6 та двох структур мутантів.....	21
2.6. Порівняння сайтів зв'язування гістондеацетилаз типу 6.....	21
2.7. Побудова та аналіз фармакофорних моделей .....	22
2.8. Віртуальний скринінг до фармакофорних моделей сайту .....	22
2.9. Молекулярний докінг відібраних хітів.....	23
2.10. Комп'ютерний ADMED - аналіз .....	23
2.11. Оптимізація геометрії ліганд-білкових комплексів.....	23
2.12. Аналіз результатів молекулярної динаміки.....	24
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....</b>	<b>26</b>
3.1. Аналіз та класифікація гістондеацетилаз різного еволюційного походження .....	26
3.2. Аналіз представників родини гістондеацетилаз та відбір мішені для подальшої роботи.....	29
3.3. Реконструкція просторової структури гістонової деацетилази типу 6.....	31
3.4. Порівняння нативної структури та двох структур мутантів.....	32
3.5. Аналіз особливостей ліганд-білкових взаємодій та побудова карти сайту зв'язування.....	34
3.6. Побудова фармакофорних моделей та їх порівняння.....	37

3.7. Високопропускний віртуальний скринінг, аналіз хітів та побудова ліганд-білкових комплексів за допомогою молекулярного докінгу.....	40
3.8. Оцінка фармацевтичних властивостей потенційних інгібіторів .....	41
3.9. Верифікація ліганд-білкових комплексів HDAC6 з потенційними інгібіторами за допомогою молекулярної динаміки.....	42
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>52</b>
<b>СПИСОК</b>	<b>ВИКОРИСТАНОЇ</b>
<b>ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>54</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>70</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

HDAC – гістондеацетилази

ADMED – дескриптори, що характеризують всмоктування, розподіл, метаболізм та виведення з організму

ПТМ – посттрансляційні модифікації

ПНС – периферична нервова система

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я

СНІД – синдром набутого імунодефіциту

МТ – мікротрубочки

НАТ – гістоноацилтрансферази

MEF2 – міоцит-специфічний енхансерний фактор 2A

CaMK – кальцій/кальмодулін-залежна протеїнкіназа

PRC2 – полікомбрепресивний комплекс 2

SIRT – сіртуїни

ВІЛ – вірус імунодефіциту людини

## ВСТУП

На сьогоднішній день не існує достатньо безпечних та ефективних знеболювальних препаратів. Основними препаратами, які застосовуються при хронічних нестерпних болях є опіоїди, які викликають звикання та можуть вводитись лише медичними працівниками. Іншою групою знеболювальних препаратів широкого застосування є нестероїдні протизапальні засоби, які є значно менш ефективними та мають низку побічних ефектів. Таким чином, актуальним є пошук нових більш ефективних та безпечних анальгетиків.

Кваліфікаційна робота магістра була виконана в рамках наукового проекту Національного фонду досліджень України №0120U104883 «Ензими посттрансляційних модифікацій білків мікротрубочок, в якості мішеней для інгібування збудливості первинних ноціцептивних нейронів периферійної нервової системи».

**Об'єкт** дослідження: гістонова деацетилаза типу 6 (HDAC6).

**Основна мета** роботи полягає у визначенні ролі HDAC6 в посттрансляційних модифікаціях (ПТМ) елементів мікротрубочок, у модуляції ними іонних каналів збудливих клітин периферійної нервової системи (ПНС) та пошуку фармакологічних засобів впливу на дану молекулярну мішень. Можливість регулювати активність HDAC6 може використовуватись для інноваційної корекції порушень, що виникають при хронічних больових станах різної етіології.

Відповідно до мети були поставлені наступні **завдання** до виконання магістерської кваліфікаційної дипломної роботи:

1) Охарактеризувати гістонову деацетилазу типу 6 та її участь у регуляції ноціцептивних каскадів за участі апарату цитоскелету.

2) Виконати порівняльне дослідження гістондеацетилаз різного еволюційного походження.

- 3) Реконструювати просторову структуру гістонової деацетилази типу 6.
- 4) Проаналізувати можливі мутації гістондеацетилази типу 6 та їх вплив на зв'язування в активному сайті каталітичного деацетилазного домена.
- 5) Побудувати фармакофорні моделі за рецептором та лігандом, та виконати їх подальше порівняння шляхом аналізу вибірок хітів.
- 6) Виконати пошук інгібіторів цільового ензиму шляхом віртуального скринінгу із подальшою перевіркою ефекту за допомогою молекулярної динаміки.
- 7) Обґрунтувати необхідність проведення комп'ютерного ADMED-аналізу.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Сучасний стан таргетного лікування при хронічних больових станах різної етіології

Біль є одним із головних компонентів захисної системи організму. Це найважливіший сигнал про пошкодження тканини та розвиток патологічного процесу, постійно діючий регулятор гомеостатичних реакцій, включаючи їх вищі поведінкові форми. Однак за певних умов біль сам стає частиною патологічного процесу, нерідко більш небезпечного, ніж той, що викликав його появу. Згідно даних МОЗ, в Україні щороку помирає від хронічних невиліковних хвороб (онкологія, серцево-судинні захворювання, СНІД, цукровий діабет та ін.) близько 800 тис. людей, між тим забезпеченість сучасними знеболювальними опіоїдними анальгетиками, з яких використовується, як правило, тільки ін'єкційний морфін, не перевищує 5-10%, в результаті чого сотні тисяч хворих змушені переносити нестерпні болі через обмежений доступ до ефективних знеболюючих. Безперечні успіхи анестезіології за останні десятиліття на цей час передбачають широке застосування місцевих анестетиків при достатньо великому переліку оперативних втручань, особливо в амбулаторній хірургічній практиці, так і відносно нових (пластична і трансплантологічна хірургія). Крім того, місцеві анальгетики успішно застосовуються насамперед у терапії гострого болю, коли ж біль стає хронічним, то виникає необхідність застосування нестероїдних протизапальних препаратів (ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен, кеторолаку трометамін, та ін.), і навіть антиконвульсантів та опіоїдів. Не дивлячись на відносну легкість застосування та дешевизну їх тривале застосування не рекомендується з огляду на величезну кількість побічних ефектів [1]. Саме тому, пошук нових протибольових агентів є

нагальною проблемою сучасної фармакології. Сучасні дослідження переконливо вказують на те, що вкрай перспективною мішенню для таких фармакологічних агентів є мікротрубочки (МТ) цитоскелету, що здатні ефективно регулювати активність іонних каналів, задіяних у процесах ноцицепції [2]. Ці високодинамічні структури складаються з  $\alpha$ - та  $\beta$ -тубулінів та мають важливе значення для багатьох процесів, в тому числі везикулярного транспорту клітини. Функціональна регуляція тубулінів відбувається за рахунок багатьох посттрансляційних модифікацій [3], переважно в полімеризованому стані [4]. Серед найбільш відомих є ацетилювання лізину  $\alpha$ -тубулінів на внутрішній поверхні мікротрубочки, детирозинація/тирозинація С-кінця та поліглутамілювання як  $\alpha$ -, так і  $\beta$ -тубулінів [5]. Ці модифікації впливають на взаємодію між мікротрубочками та молекулярними двигунами (зокрема, динеїн та кінезин), включаючи трафік іонних каналів. Останні дослідження свідчать, що різні посттрансляційні модифікації, які впливають на окремі кластери мікротрубочок, можуть стосуватися конкретних клітинних напрямків ПНС ссавців. Так, білок HDAC6 з класу гістонових деацетилаз ІІВ підкласу експресується на багатьох рівнях ноцицептивного шляху та взаємодіє з  $\alpha$ - та  $\beta$ -тубулінами [6]. Фармакологічне інгібування HDAC6 полегшує симптоми пошкодження периферичного нерва та периферичного запалення [7], одночасно зменшуючи експресію реполяризовуючих  $K^+$  каналів, тим самим збільшуючи тривалість потенціалу дії.

## **1.2. Загальна характеристика родини гістондеацетилаз**

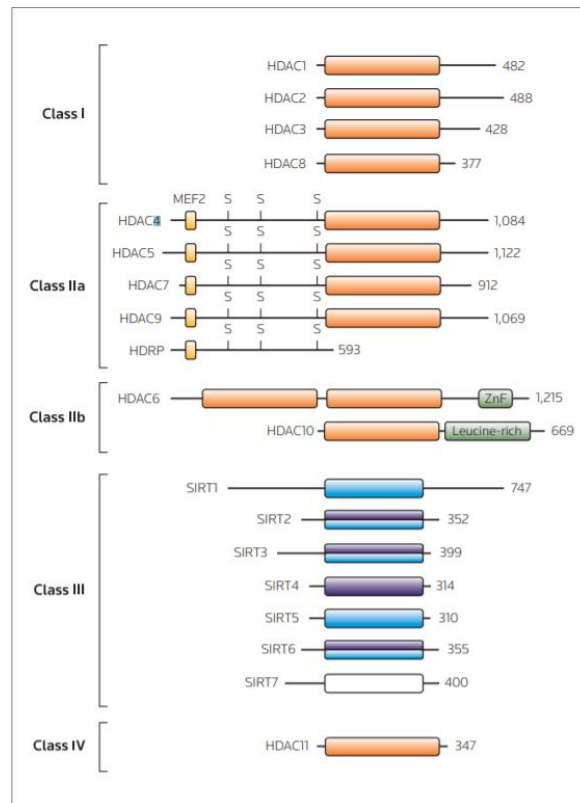
Гістондеацетилази (HDAC) — це родина ферментів, які відіграють важливу роль у регуляції транскрипції, а також функції різноманітних клітинних білків. HDAC спочатку були ідентифіковані за їх здатністю

видаляти ацетильну групу із залишків лізину в хвостах гістонів. Ефект HDAC скасовується іншою родиною ферментів, які називаються гістоноацетилтрансферазами (НАТ), які ацетилують гістони. Ацетилування хвостів гістонів нейтралізує їх позитивний заряд, тим самим сприяючи утворенню розслабленої структури хроматину, яка є більш доступною для факторів транскрипції, і, таким чином, сприяє активації транскрипції. І навпаки, деацетилування гістонів сприяє репресії транскрипції, викликаючи ущільнення хроматину. Баланс між діями НАТ і HDAC служить ключовим регуляторним механізмом для експресії генів, контролюючи різноманітні фізіологічні процеси. Зараз відомо, що НАТ і HDAC також діють на велику кількість негістонових субстратів як у ядрі, так і в цитоплазмі. До них належать фактори транскрипції, гормональні рецептори, шаперони та білки цитоскелета. Ацетилування/деацетилування цих білків може вплинути на їх функціональну активність, стабільність, внутрішньоклітинну локалізацію та асоціації з іншими білками, що призведе до впливу на ріст, виживання та диференціювання клітин, а також на динаміку цитоскелета, ендоцитоз та енергетичний метаболізм.

Порушення балансу між активністю НАТ і HDAC стає важливою подією в патогенезі ряду розладів. Вперше це було помічено при дослідженнях раку, багато форм якого пов'язані з підвищеною експресією та активністю HDAC [8-12]. Було виявлено, що підвищена активність деацетилази призводить до пригнічення транскрипції ряду генів, що в основному беруть участь у сприянні диференціації або загибелі клітин. Лікування фармакологічними інгібіторами HDAC скасовує епігенетичне приглушення і надає протипухлинний ефект у культурах тканин і тваринних моделях пухлиногенезу. Отже, різноманітні інгібітори HDAC в даний час тестуються в клінічних випробуваннях для лікування раку. Пізніше було виявлено, що ці інгібітори можуть мати терапевтичну корисність і при інших захворюваннях людини, що призвело до вибуху інтересу до їх розробки та тестування [13-16].

Ссавці експресують 18 білків HDAC, які були згруповані в чотири класи на основі їх гомології з білками деацетилази дріжджів [17, 18]. HDAC класу I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 і HDAC8) є гомологами дріжджового білка RPD3. Ці HDAC експресуються у всіх тканинах і органах, локалізовані переважно в ядрі (за винятком HDAC3, який також можна знайти і в цитоплазмі) та мають високу ферментативну активність. HDAC1 і HDAC2 структурно дуже схожі і всередині клітин, виявлено у комплексі з корепресорами, такими як парний білок амфіпатичної спіралі у ссавців Sin3 і білок CoREST, а також з полікомбрепресивним комплексом 2 (PRC2) і комплексом ремоделювання нуклеосом і деацетилювання гістонів (NuRD). HDAC3 асоціюється з різними комплексами, такими як комплекс N-CoR/SMRT. HDAC8 не функціонує як частина білкового комплексу [17, 18].

HDAC класу II гомологічні білку HDA1 дріжджів і поділяються на HDAC класу IIa (HDAC4, -5, -7 і -9) і класу IIb (HDAC6 і -10). HDAC класу IIa характеризуються великим N-термінальним розширенням із консервативними ділянками зв'язування для транскрипційного фактора міоцит-специфічного енхансерного фактора 2A (MEF2) та білка 14-3-3 η і можуть переміщатися між ядром і цитоплазмою залежно від фосфорилування (**Рисунок 1.1**). Фосфорилування опосередковується кіназами, такими як кальцій/кальмодулін-залежна протеїнкіназа (CaMK) і протеїнкіназа D при консервативних залишках серину в N-термінальній області цих білків. HDAC класу IIa також відображають обмежений шаблон експресії. Наприклад, HDAC4, -5 і -9 високо експресуються в мозку, серці та скелетних м'язах, тоді як HDAC7 у великій кількості міститься в ендотеліальних клітинах і тимоцитах. HDAC класу IIb відсутні N-термінальні розширення, але мають два каталітичні домени в тандемі. HDAC6 локалізується виключно в цитоплазмі, де вони фізично пов'язані з тубуліном. Повідомлялося про деацетилювання тубуліну, а також інших цитоскелетних і трансмембранних білків HDAC6. Відносно мало відомо про внутрішньоклітинну локалізацію, модель експресії або функції HDAC10.



**Рисунок 1.1.** Родина білків гістондеацетилаз (HDAC). Консервативний деацетилазний домен класичних HDAC (помаранчеві прямокутники), деацетилазний домен сиртуїнів (сині прямокутники) та каталітичний домен АДФ-рибозилтрансферази (фіолетові прямокутники). Протеїн, пов'язаний з HDAC (HDRP), також званий MITR, є зрізаною формою HDAC9, що утворюється шляхом альтернативного сплайсингу. SIRT2, SIRT3 і SIRT6 мають як деацетилазну, так і АДФ-рибозилтрансферазну активність. Про каталітичну активність SIRT7 не повідомлялося. Місце зв'язування міоцит-специфічного енхансерного фактора 2A (MEF2) позначено синім квадратом, а розташування ключових залишків серину, які фосфорилуються, позначено «S». Позначено також багатий лейцином регіон у HDAC10 та С-термінальний цинковий палець (ZnF) [19].

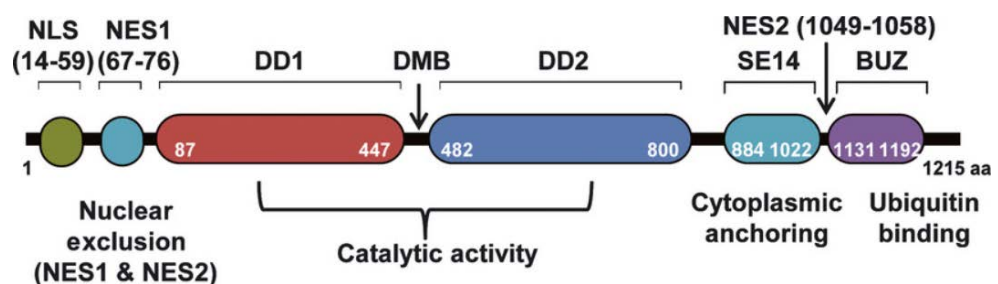
HDAC11 має спільні ділянки збереження послідовності як з RPD3, так і з HDA1, і тому виділяється в окремий клас IV. Найбільша його експресія в мозку, серці, яєчках і нирках. Мало що відомо про ферментативну активність

білка, його субстрати або білки, з якими він асоціюється. HDAC класів I, II і IV – це цинкзалежні ферменти, які іноді називають «класичними HDAC». Натомість, HDAC класу III потребує нікотинамідаденіндинуклеотид-іону (NAD<sup>+</sup>) і за їх каталітичною активністю гомологічні NAD-залежному дріжджовому білку SIR2 [20]. Ці білки, які називаються сиртуїнами, не мають схожості послідовності або структурної подібності з класичними HDAC і деацетилюють білки за механізмом, відмінним від механізму гідролізу ацетил-лізину, який використовується класичними HDAC [21]. Підклас сиртуїнів складається з 7 членів (SIRT1–7), які мають спільний консервативний каталітичний домен ядра з приблизно 275 амінокислот, але відрізняються за своїми N- і C-кінцевими білковими послідовностями, що фланкують це ядро [20, 22, 23] (**Рисунок 1.1**). У той час як SIRT1 і SIRT5 є деацетилазами, SIRT2 і SIRT3 мають як деацетилазну, так і моно-АДФ-рибозилтрансферазну активність. Вважається, що SIRT4 володіє лише АДФ-рибозилтрансферазною активністю. SIRT6 також володіє активністю гістондеацетилази [24]. Ферментативна активність SIRT7 ще не встановлена. Сиртуїни також мають відмінності в їх субклітинній локалізації. SIRT1, який має найбільшу подібність послідовності до дріжджів SIR2, зазвичай є ядерним, де він деацетилює гістони H3 і H4, а також фактори транскрипції, такі як ядерний фактор NF-κB, пухлинний супресор p53, білок O (FOXO), Ku70 і PGC-1-α [23]. Описувався також нуклеоцитоплазматичний перехід SIRT1 у відповідь на окислювальний стрес [25]. SIRT2 є переважно цитоплазматичним, де він асоціюється з мікротрубочками та деацетилює альфатубулін [26, 27]. SIRT2 також може деацетилювати гістон H4, коли ядерна мембрана розбирається під час мітозу [28]. Повідомляється, що SIRT3, SIRT4 і SIRT5 є мітохондріальними білками [29], хоча SIRT5 локалізується також і в ядрі та цитоплазмі нейронів [30]. У мітохондріях ці SIRT локалізовані в різних компартментах, що передбачає різні функції [31]. SIRT5 локалізується в мітохондріальному матриксі, де він деацетилює та активує карбамоїл-фосфатсинтетазу I (CPS1), фермент, що каталізує перший

етап циклу Кребса для детоксикації аміаку [32]. Ці автори виявили, що за умов голодування миші, які вибивають SIRT5, не можуть підвищити активність CPS1, що призводить до підвищення рівня аміаку в крові. Гепатоцити з дефіцитом SIRT5 також демонструють знижену життєздатність у середовищі, збідненої поживними речовинами, що імітує голодування у тварин [32]. Подібно SIRT1, SIRT6 і SIRT7 є ядерними білками, хоча ці три білки демонструють чіткі структури суб'ядерної локалізації; SIRT6 асоціюється з гетерохроматином, SIRT7 локалізується в ядерцях, а SIRT1 значною мірою асоціюється з еухроматином всередині ядра [29].

### 1.3. Особливості просторової структури HDAC6

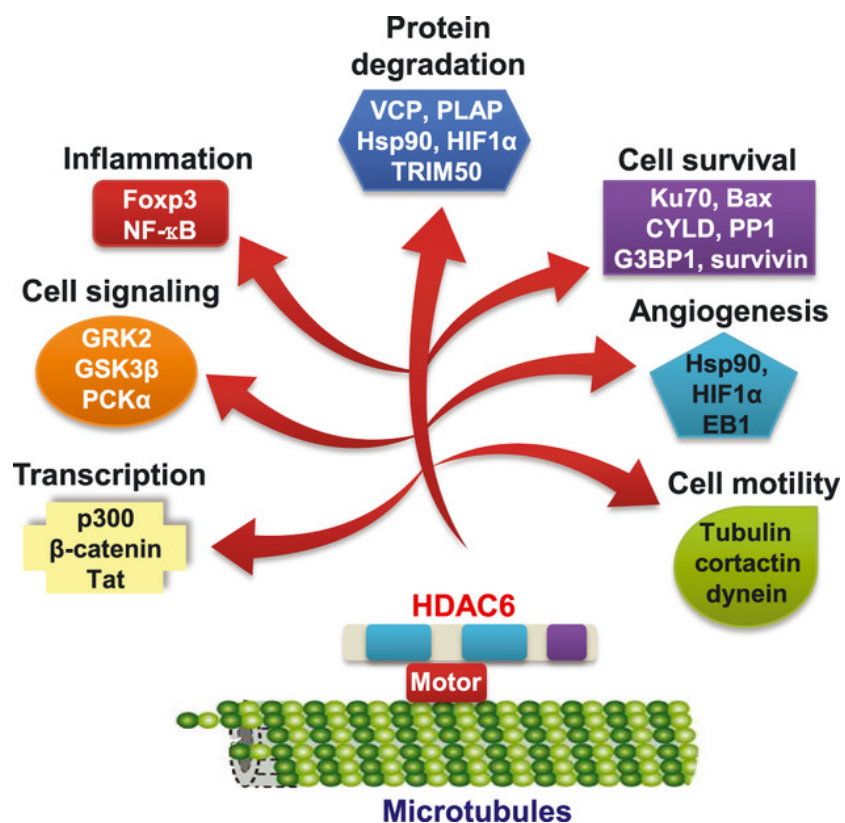
Повна структура гістон деацетилази 6 показана на **Рисунку 1.2**. HDAC6 складається з п'яти доменів: NES, DD1, DD2, SE14, ZnF-UBP. HDAC6 – єдиний член родини гістондеацетилаз, що має в своєму складі два тандемні каталітичні домени (DD1 та DD2 / CD1 та CD2), що проявляють деацетилазну активність до таких субстратів: альфа-тубуліну та HSP90. Консервативний сигнал ядерного експорту (NES), у N-кінцевій частині білка, опосередковує активний експорт білка з ядра. SE14 стабільно закріплює білок у цитоплазмі. В С-кінцевій частині білка домен ZnF-UBP складає високоафінний убіквітин-зв'язуючий мотив [33]. Довжина послідовності: 1215 амінокислотні залишки. Кофактор: Zn<sup>2+</sup>. Зв'язує по три іони Zn<sup>2+</sup> на субодиницю.



**Рисунок 1.2.** Схематичне зображення та функціональні домени HDAC6 людини [34].

HDAC6 переважно виявляється в цитоплазмі в результаті ядерного експортного сигналу і мотиву SE14 (**Рисунок 1.2**) [35, 36], і, коли проліферація клітин зупинена, частина білка переміщається в ядро в результаті його ядерного сигналу локалізації на N-кінці [37]. Лінкер (моторне зв'язування динеїну, DMB) між обома САТ може зв'язуватися з динеїном і високоафінним убіквітин-зв'язуючим доменом цинкового пальця (BUZ) [34].

В цитоплазмі виявлено багато субстратів і взаємодіючих білків. Серед них такі, що беруть участь у міграції клітин, імунній відповіді, транскрипції, проліферації та смерті клітин, деградації неправильно згорнутих білків і шляхах реакції на стрес (**Рисунок 1.3**). Такі інтерактори HDAC6 беруть участь у встановленні специфічних позначок на ядерних білках, а також на білках цитоплазми, і кожен може брати участь у ключових біологічних регуляціях. Отже, ідентифікація білків, що взаємодіють з HDAC6, дає підказки про їхню роль у механізмах патології, а також у фізіології [34].



**Рисунок 1.3.** Деацетилазозалежні та -незалежні функції HDAC6 [34].

Першим ідентифікованим субстратом HDAC6 є тубулін. Стосовно HDAC6, тубуліндеацетилази, було показано, що оборотне ацетилювання регулює інші важливі біологічні процеси, а також модифікацію гістонів і транскрипцію генів [38, 39].  $\beta$ -тубулін взаємодіє з HDAC6 у дріжджовому двогібридному аналізі та *in vitro*. Зворотне ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну бере участь у регулюванні стабільності та функції МТ [38-40]. Надмірна експресія HDAC6 в клітинах ссавців призводить до гіпоацетилювання тубуліну і сприяє хемотаксичному переміщенню клітин [38, 41]. HDAC6-опосередковане деацетилювання регулює МТ-залежну рухливість клітин. Навпаки, інгібування функції HDAC6 двома незалежними фармакологічними або генетичними методами призводить до гіперацетилювання тубуліну та МТs та збільшення накопичення вогнищевої адгезії та запобігає рухливості фібробластів [42-44]. На додаток до взаємодії з тубуліном, HDAC6 переміщується на збагачені актином мембранні р'яби, де він взаємодіє з F-актин-зв'язуючим білком кортактином як субстратом [45]. Надмірна експресія HDAC6 призводить до гіпоацетилювання кортактину, тоді як пригнічення активності HDAC6 призводить до гіперацетилювання кортактину, запобігає його транслокації на периферію клітини, блокує будь-яку асоціацію з F-актином і погіршує рухливість клітин. Таким чином, HDAC6 регулює рухливість клітин, змінюючи здатність кортактину зв'язувати F-актин шляхом ацетилювання кортактину. В остеобластах HDAC6 регулює морфологію та дозрівання клітин шляхом формування та стабілізації пояса подосом, спеціалізованої структури, пов'язаної з процесом резорбції кісткового матриксу [46]. Цей процес вимагає ацетилювання МТ шляхом інгібування HDAC6 та опосередкованого RhoA інгібування mDia. Комплекс RhoA-effector-mDia пов'язаний з HDAC6 і може активувати його тубуліндеацетилазну активність. У сукупності HDAC6 модулює актин-

залежний і МТ-залежний рух клітин, змінюючи статус ацетилювання кортактину і тубуліну.

#### **1.4. Основні функції HDAC6**

Гістонова деацетилаза типу 6 (Q9UBN7, HDAC6\_HUMAN) з класу гістонових деацетилаз ІІВ відповідає за деацетилювання залишків лізину в N-кінцевій частині основних гістонів (H2A, H2B, H3 та H4) [47]. Деацетилювання гістонів дає тег для епігенетичної репресії і грає важливу роль в регуляції транскрипції, клітинному циклі та розвитку [47]. Гістонові деацетилази діють за допомогою утворення великих мультибілкових комплексів [47]. Крім гістонів, деацетилює інші білки: грає центральну роль в залежній від мікротрубочок рухливості клітин, опосередковуючи деацетилювання тубуліну [38, 48]. Сприяє деацетилюванню CTTN, що призводить до полімеризації актину, сприяє злиттю аутофагосом і лізосом і завершенню аутофагії [49]. Бере участь в MTA1-опосередкованій епігенетичній регуляції експресії ESR1 при раку грудей [50]. Крім активності протеїн-деацетилази, грає ключову роль в деградації неправильно згорнутих білків: коли неправильно згорнуті білки занадто численні для розкладання системою рефолдингу шаперона і убіквітин-протеосомою, він опосередковує транспорт неправильно згорнутих білків до цитоплазматичної навколоядерної структури, що називається агросомою [51]. Ймовірно, діє як адаптер, який розпізнає поліубіквітиновані неправильно згорнуті білки і направляє їх на агросому, полегшуючи їх видалення за допомогою аутофагії [51].

#### **1.5. Селективні та неселективні інгібітори HDAC6**

Більшість відомих інгібіторів деацетилази є pan-HDACIs або інгібіторами класу I [52]. Типова структура HDACIs характеризується трьома основними доменами: цинк-зв'язуючі групи (гідроксамової кислоти, тіолу, карбонової кислоти, кетону або заміщеного аніліну), лінкерний регіон та кеп група [53-55]. HDACI проявляє свою інгібуючу дію шляхом хелатування кофактора цинку в активному центрі ферменту. Специфічність HDACI виникає внаслідок взаємодії із залишками в кеп області, яка прилягає до каталітичного сайту [54]. На даний момент існує лише обмежена кількість HDACI-селективних інгібіторів. Хоча більшість відомих інгібіторів належать до класу гідроксамових кислот, також були розроблені похідні негідроксамової кислоти.

HDAC6-специфічний інгібітор вперше був виділений за допомогою багатовимірного хімічного генетичного скринінгу з 7392 малих молекул і аналізів на основі клітин [43]. Цей інгібітор відомий як тубацин і специфічно пригнічує деацетилювання  $\alpha$ -тубуліну в клітинах ссавців. Інгібітор запобігає активності деацетилази HDAC6 шляхом хелатування катіону  $Zn^{2+}$  подібний до інших HDACI і може змінювати утворення комплексів HDAC6 з іншими взаємодіючими партнерами. HDAC6-специфічні інгібітори можуть бути ефективними в якості знеболюючих засобів, при ВІЛ, для лікування різних видів раку, нейродегенеративних захворювань і запальних розладів. Ці інгібітори діють на клітини, не змінюючи епігенетичні процеси, що залежать від ацетилювання гістонів, шляхом ацетилювання цитоплазматичних білків, таких як  $\alpha$ -тубулін, кортактин і HSP. Завдяки функції цитоплазматичної деацетилази HDAC6 приділяється підвищена увага як до потенційної терапевтичної мішені при широкому спектрі захворювань. Останнім часом були виявлені та вивчені більш ефективні але не селективні інгібітори HDAC6, такі як: ворінонат [56], трихостатин А [57, 58], панобінонат [57], белінонат [59]. Єдиним специфічним інгібітором до HDAC6 на сьогоднішній день все ще залишається тубацин.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1. Протокол дослідження

Огляд родини гістондеацетилаз та їх рослинних гомологів. Обґрунтування вибору мішені. Реконструкція просторової структури та оцінка якості. Аналіз мутантних форм досліджуваного фермента. Аналіз сайту зв'язування, розробка фармакофорних моделей та високопропускний віртуальний скринінг. Докінг хітів в активний сайт білка. Фінальний відбір сполук потенційних інгібіторів для подальших досліджень *in vitro*, на основі результатів докінгу та оцінки показників біодоступності, здатності адсорбуватися та виводитися з організму, токсичності, а також визначення здатності інгібувати ізоформи цитохрому P450. Верифікація ліганд-білкових комплексів з потенційними інгібіторами за допомогою молекулярної динаміки. Порівняння результатів, отриманих за двома фармакофорними моделями.

#### 2.2. Філогенетичний аналіз гістондеацетилаз різного походження

Амінокислотні послідовності відомих гістондеацетилаз людини та рослин *Arabidopsis thaliana* і *Oryza sativa* було відібрано з бази даних UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Для відбору подібних до людських HDAC у рослин було використано інструмент пошуку базового локального вирівнювання BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Множинне вирівнювання послідовностей було виконано в програмному пакеті MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) з використанням алгоритму ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) [60]. Реконструкція філогенетичного дерева

гістондеацетилаз була проведена в програмному пакеті MEGA за методом UPGMA [61].

### **2.3. Реконструкція 3D-моделей молекул гістондеацетилаз типу 6**

Амінокислотні послідовності було отримано з бази даних UniProtKB (<https://www.uniprot.org>). Реконструкція моделей просторової структури молекули гістондеацетилази типу 6 здійснювалась за методом гомологічного моделювання [62]. Згортка моделей здійснювалась у автоматичному режимі за допомогою сервісу «SwissModel Automatic Modelling Mode» (<https://swissmodel.expasy.org/>) [63].

### **2.4. Верифікація побудованої структурної моделі білка**

Верифікація моделей здійснювалась за допомогою сервісу MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Враховувалась статистика зв'язків ("all atoms Clashscore"), внутрішня геометрія (Poor rotamers, Ramachandran outliers, Ramachandran favored, Residues with bad bonds, Residues with bad angles), а також показники C $\beta$  deviations >0.25Å та MolProbity score у порівнянні із показниками "ідеальних моделей" [64].

Також враховувалась оцінка якості моделей (Local Model Quality Estimation) за показниками Raw-score та Z-score серверу «SWISS-MODEL Workspace» [10.1186/1472-6807-9-35], функція QMEAN6 (Composite scoring function for model quality estimation) і "Global Model Quality Estimation" згідно показнику DFire [65].

## **2.5. Структурне вирівнювання нативної структури гістондеацетилази типу 6 та двох структур мутантів**

Структурне вирівнювання реконструйованої моделі гістондеацетилази типу 6 та двох реконструйованих моделей її мутантів здійснювалося за допомогою програми STAMP плагіна MultiSeq в VMD (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) [66].

## **2.6. Аналіз сайтів зв'язування гістондеацетилаз типу 6**

Визначення амінокислотного складу сайтів зв'язування лігандів було виконано на підставі літератури [56-58] і комплексу з RCSB Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) [67]. Особливості ліганд-білкових взаємодій оцінювались із використанням безкоштовної версії програмного пакету BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer/>) [68]. Структури сайтів, а також з'ясування ролі молекул води у ліганд-білковій взаємодії було виконано за допомогою on-line сервісів PoseView ([poseview.zbh.uni-hamburg.de](http://poseview.zbh.uni-hamburg.de)) [69] і CCDC Relibase ([relibase.ccdc.cam.ac.uk](http://relibase.ccdc.cam.ac.uk)) [70]. А також бази даних sc-PDB (<http://bioinfo-pharma.u-strasbg.fr/scPDB/>) [71]. Для прогнозування сайтів зв'язування було застосовано множинні та профільні вирівнювання амінокислотних послідовностей і профілів сайтів зв'язування лігандів, виконували онлайн ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) [72] із застосуванням методу зв'язування найближчих сусідів (<http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/embassy/phylipnew/>) [73]. Існування і ступень консервативності сайтів зв'язування інгібіторів оцінювали за допомогою інструментів програм EMBOSS ([bioinformatics.nl/emboss-explorer/](http://bioinformatics.nl/emboss-explorer/)) [74].

## 2.7. Побудова та аналіз фармакофорних моделей

Фармакофорну модель було згенеровано за допомогою модуля Phase програмного пакету Schrödinger (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”) [75]. В Phase є шість вбудованих фармакологічних характеристик, а саме рецептор водневого зв'язку (A), донор водневого зв'язку (D), гідрофобна група (H), негативно іонізована (N), позитивно іонізована (P) і ароматичне кільце (R). Фармакофорні вектори обиралися з урахуванням результатів попереднього докінгу.

Попередній докінг проводився за допомогою модуля Glide програмного забезпечення Schrödinger (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”) [76]. Відомі ліганди до HDAC6 людини було відібрано з баз даних ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) та DrugBank (<https://go.drugbank.com/>). Енергія малих молекул була мінімізована за допомогою силового поля OPLS3e (Optimized Potentials for Liquid Simulations) в модулі Ligprep. Рецептор було підготовлено з заміною атомів водню, оптимізацією геометрії та мінімізацією енергії за допомогою модулю Protein preparation wizard з використанням силового поля OPLS3e. Рецепторна сітка була створена на основі відомих взаємодій в активному сайті за допомогою модулю Receptor grid generation.

## 2.8. Віртуальний скринінг до фармакофорних моделей сайту

Як базу для високопропускнуго віртуального та хімічного скринінгу було використано відкриті бібліотеки – ChEMBL, Zinc та корпоративні бібліотеки сполук Науково-виробничих підприємств “І.Ф.ЛАБ”, “Снамін” та “УКРОРГСИНТЕЗ”. Скринінг проводився за допомогою програмного забезпечення Schrödinger модуля Phase (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”) [77].

## **2.9. Молекулярний докінг відібраних хітів**

Докінг проводився за допомогою модуля Glide програмного забезпечення Schrödinger (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”) [76]. Мінімізація енергії відібраних хітів проводилась за допомогою силового поля OPLS3e (Optimized Potentials for Liquid Simulations) в модулі Ligprep.

## **2.10. Комп’ютерний ADMED-аналіз**

Аналіз ADME дескрипторів, показників адсорбції та виведення з організму, а також перевірка потенційної токсичності, відібраних від час докінгу хітів було проведено за допомогою сервісу SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) [78].

## **2.11. Оптимізація геометрії ліганд-білкових комплексів**

Релаксація геометрії реконструйованих ліганд-білкових комплексів здійснювалась шляхом симуляції короткострокової молекулярної динаміки з використанням програмного пакету молекулярної динаміки Gromacs 2020 (кластер BO CSLabGrid). За допомогою сервісу SwissParam (<http://swissparam.ch/>) [79] було отримано файли топології і координат лігандів у форматі \*.pdb з врахуванням силового поля charmm36 [80].

Отримані комплекси занурювались у водне середовище, при цьому, електростатичні взаємодії визначались за методом PME (Particle Mesh Ewald). Нейтралізація систем до стану фізіологічного розчину коригувалась шляхом автоматичного заміщення молекул води іонами натрію та хлору (0,15 Моль/літр). Мінімізація потенційної енергії здійснювалась за допомогою модулів «grompp» та «mdrun» пакету Gromacs [81, 82].

Первинна оптимізація геометрії комплексів здійснювалась шляхом мінімізації потенційної енергії за допомогою модулів «grompp» та «mdrun» за стандартних умов алгоритму крутого спуску (steepest descent): 1000 кроків, градієнти = 0,1, charmm36. Наступна процедура обмеженої молекулярної динаміки (молекулярного рестрейнінгу) виконувалась з використанням зазначених модулів, за умов: температура = 310 К, тривалість = 0,2 пс. Результиуюча симуляція молекулярної динаміки (90 нс) також здійснювався із використанням модулів «grompp» та «mdrun». Для імітації розчинника було застосовано періодичні граничні умови. Температура системи була на рівні 310 К (термостату Берендсена, час взаємодії = 0,1 пс). Постійний тиск підтримувався за допомогою зовнішнього баростату [82].

## **2.12. Аналіз результатів молекулярної динаміки**

Результиуюча молекулярна динаміка в Gromacs здійснювалась із використанням поля charmm36 [83, 84]. Занурення структури у бокс (ромбічний додекаедр, TIP3P, відстань від границі  $\geq 1.1$  нм, NaCl = 150 мМ) виконувалось за допомогою команд: `editconf > solvate`. Мінімізація енергії виконувалась в два етапи: 1) за методом крутого спуску, і 2) методу спряженого градієнта (cg). Інтегрування здійснювалося кроком у 2 (4) фс за допомогою методу позмінного випередження, еквівалентного алгоритму Верле. Координати атомів записувалися із кроком = 10 пс. Довжину зв'язків підтримували постійно за допомогою алгоритму LINKS. Електростатичну взаємодію враховували за методом PME (Particle-Mesh Ewald sum). Параметр відсічення (cutoff) було виставлено в 1.2 нм для всіх типів взаємодій. Температура системи (310 К) і тиск (1 атм) підтримували постійно, використовуючи алгоритми `v-rescale` і `parrinello-rahman`, відповідно [82].

Конвертація траєкторій здійснювалась за допомогою програми `trjconv`. Середньоквадратичні відхилення C $\alpha$ -атомів розраховували на підставі

показників  $rms$  і  $rmsf$ . Обчислення енергій було виконано за допомогою застосунку `energy`. Енергія зв'язування визначалась як сума енергій ван-дер-ваальсових взаємодій (описано потенціалом Ленард-Джонса) та енергії електростатичних взаємодій (описано за законом Кулона). Аналіз Н-зв'язків виконувався за допомогою скрипту `hbond`. Для визначення наявності Н-зв'язків, було використано наступні обмеження:  $r \leq r_{\text{HB}} = 0,35 \text{ нм}$ ;  $\alpha \leq \alpha_{\text{HB}} = 30^\circ$ . Програми Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.3) [85], BIOVIA Discovery Studio Visualizer [86] та PyMol [Schrödinger & DeLano, 2020] було використано для аналізу і візуалізації траєкторій та окремих фреймів молекулярної динаміки. Побудова графіків здійснювалась в програмі QtGrace (<https://sourceforge.net/projects/qtgrace/>) [86].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Аналіз та класифікація гістондеацетилаз різного еволюційного походження

Гістондеацетилази відіграють ключову роль в регуляції експресії генів, контролі різноманітних фізіологічних процесів як в організмі людини, так і у рослин. У рослин HDA регулюють гени ідентичності квіткових органів [87], беруть участь у негативній регуляції реакції на сольовий стрес [88], передачі сигналів абсцизової кислоти [89], часу цвітіння [90, 91], механізмів формування клітинного патерну епідермісу коренів [92, 93], пригнічують біосинтез хлорофілу та фотосинтез у темряві [94], беруть участь у фотоморфогенезі [95], пригніченні реакції рослин на підвищену температуру навколишнього середовища [96] та ін. Було розглянуто відомі гістондеацетилази *Arabidopsis thaliana* та *Oryza sativa* з метою дослідити та класифікувати за їх гомологією до гістондеацетилаз людини.

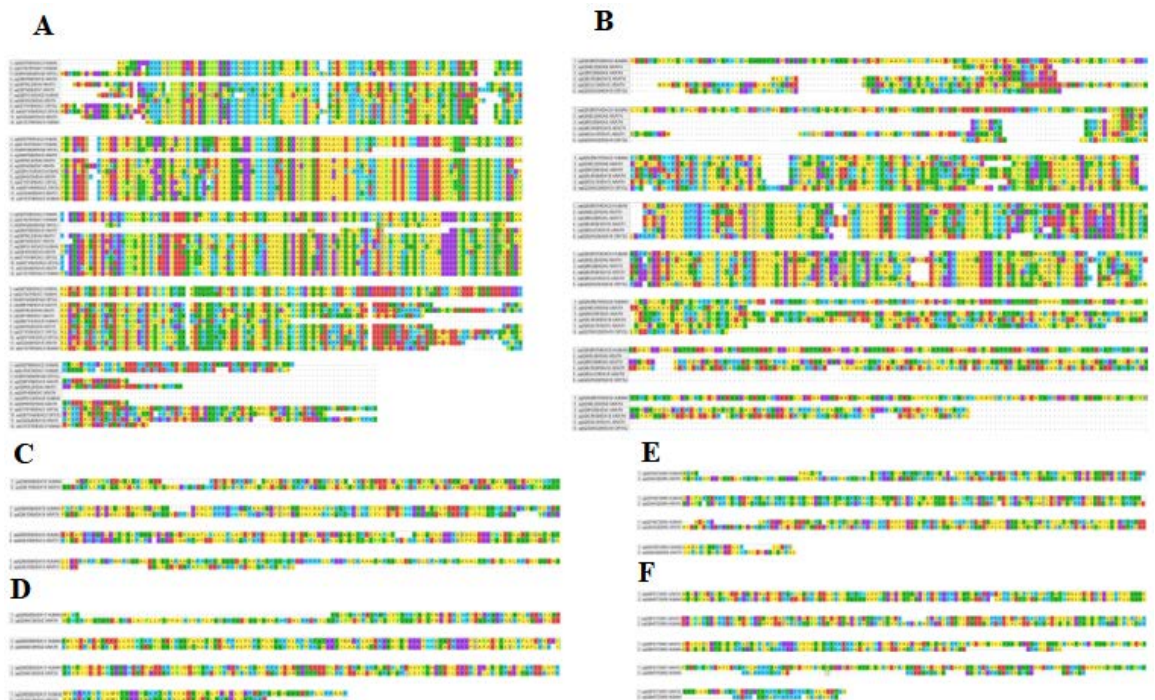
З Розділу 1 відомо, що ссавці експресують класичні гістондеацетилази: HDAC класу I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 і HDAC8), HDAC класу IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 і HDAC9) і класу IIb (HDAC6 і HDAC10), HDAC класу IV (HDAC11); та сиртуїни: HDAC класу III (SIRT1–7), що не мають структурної подібності до класичних гістондеацетилаз.

Відомо сімнадцять гістондеацетилаз *Arabidopsis thaliana*, які поділяють на три типи: тип I (RPD3-подібна суперродина), тип II (HD-туїни) та тип III (сиртуїни). У HDA типу I виділяють три класи: клас I (HDA19, HDA6, HDA7, HDA9), клас II (HDA5, HDA15, HDA18), клас III (HDA), та некласифіковані (HDA8, HDA10, HDA14) [97]. За даними UniProt на сьогоднішній день відомо лише чотири гістондеацетилази *Oryza sativa* (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC10).

За допомогою Blast-пошуку було виявлено наявність гомологічних послідовностей серед HDAC людини до відомих HDA *Arabidopsis thaliana* та HDAC *Oryza sativa*. *Arabidopsis thaliana*: HDA6 (Q9FML2): HDAC1 (Q13547) - 58.9%, HDAC2 (Q92769) - 59.4%, HDAC3 (O15379) - 56.1%, HDAC8 (Q9BY41) - 43.9%; HDA19 (O22446): HDAC1 (Q13547) - 59.3%, HDAC2 (Q92769) - 56.1%, HDAC3 (O15379) - 56.6%, HDAC8 (Q9BY41) - 43.8%; HDA7 (Q9FH09): HDAC1 (Q13547) - 52.3%, HDAC2 (Q92769) - 52.7%, HDAC3 (O15379) - 40.0%, HDAC8 (Q9BY41) - 40.6%; HDA9 (Q8H0W2): HDAC1 (Q13547) - 60.1%, HDAC2 (Q92769) - 60.0%, HDAC3 (O15379) - 57.8%, HDAC8 (Q9BY41) - 40.0%; HDA5 (Q8RX28): HDAC6 (Q9UBN7) - 43.6%; HDA15 (Q8GXJ1): HDAC6 (Q9UBN7) - 41.4%; HDA18 (Q8LRK8): HDAC6 (Q9UBN7) - 41.9%; HDA2 (Q944K3): HDAC11 (Q96DB2) - 58.9%; HDA8 (Q94EJ2): HDAC6 (Q9UBN7) - 31.6%; HDA14 (Q941D6): HDAC10 (Q969S8) - 35.3%; HDA10 (Q9M1N8): HDAC1 (Q13547) - 44.9%, HDAC2 (Q92769) - 43.9%, HDAC3 (O15379) - 38.1%, HDAC8 (Q9BY41) - 35.6%; SIR1 (Q9FE17): SIRT6 (Q8N6T7) - 50.9%; SRT2/SIR4 (Q94AQ6): SIRT4 (Q9Y6E7) - 42.8%, HD-туїни не мають гомологів серед гістондеацетилаз людини, а найближчим подібним до них білком є нуклеолін. *Oryza sativa*: HDAC2 (Q6YV04): HDAC1 (Q13547) - 59.4%, HDAC2 (Q92769) - 60.7%, HDAC3 (O15379) - 57.0%, HDAC8 (Q9BY41) - 43.9%; HDAC1 (Q7Y0Y8): HDAC1 (Q13547) - 61.7%, HDAC2 (Q92769) - 59.8%, HDAC3 (O15379) - 59.5%, HDAC8 (Q9BY41) - 44.1%; HDAC3 (Q69VQ0): HDAC1 (Q13547) - 63.2%, HDAC2 (Q92769) - 61.3%, HDAC3 (O15379) - 59.6%, HDAC8 (Q9BY41) - 40.3%; HDAC10 (Q2QWU2): HDAC6 (Q9UBN7) - 35.3%. Множинне вирівнювання послідовностей за гомологією наведено на **Рисунку 3.1**. Вирівнювання підтверджує результати Blast та дає змогу зробити припущення про консервативність каталітичних доменів HDAC людини та їх рослинних гомологів.

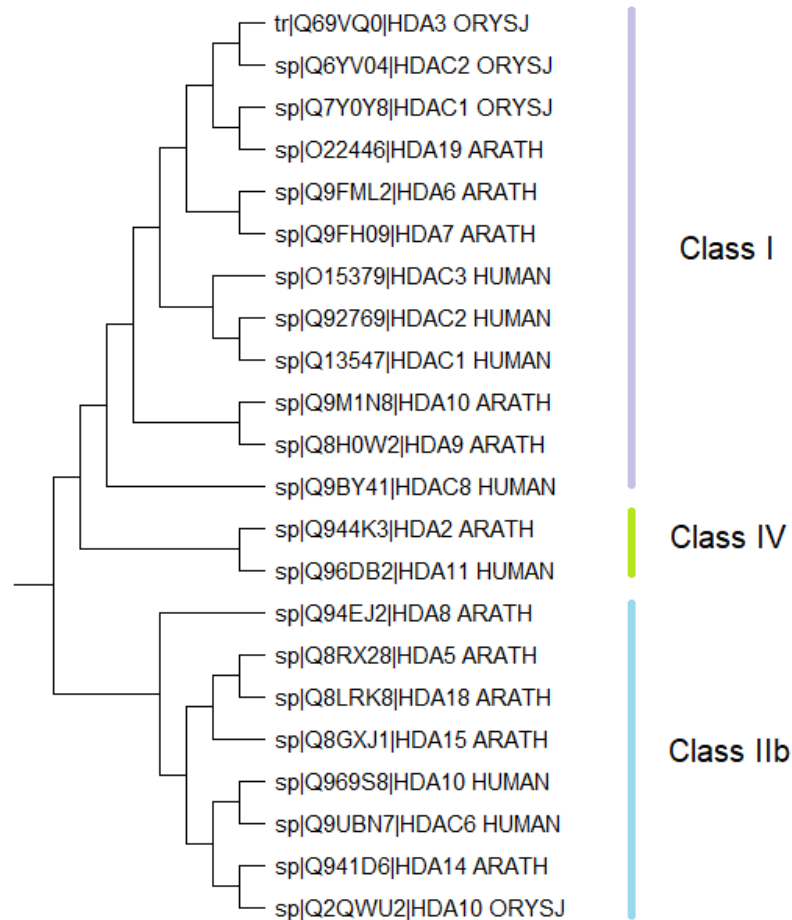
Для класичних гістондеацетилаз було побудовано філогенетичне дерево (**Рисунок 3.2**), на основі якого можна зробити висновки про

філогенетичну спорідненість гістондеацетилаз *Arabidopsis thaliana* та *Oryza sativa* з трьома класами HDAC людини: I, IV і IIb. До гістондеацетилаз класу I людини (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) філогенетично спорідненими є гістондеацетилази *Arabidopsis thaliana* (HDA19, HDA6, HDA7, HDA10, HDA9) та *Oryza sativa* (HDAC1, HDAC2, HDAC3). До єдиної гістондеацетилази людини класу IV (HDAC11) філогенетично спорідненою є HDA2 *Arabidopsis thaliana*. До гістондеацетилаз людини класу IIb (HDAC6, HDAC10) філогенетично спорідненими є гістондеацетилази *Arabidopsis thaliana* (HDA8, HDA5, HDA18, HDA15, HDA14) та *Oryza sativa* (HDAC10).



**Рисунок 3.1.** Множинне вирівнювання послідовностей HDAC людини та рослин *Arabidopsis thaliana* та *Oryza sativa*. (A) послідовності HDAC людини класу I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 та HDAC8), *Arabidopsis thaliana*: HDA6, HDA19, HDA7, HDA9, HDA10, *Oryza sativa*: HDAC1, HDAC2 та HDAC3. (B) послідовності HDAC6 людини, *Arabidopsis thaliana*: HDA5, HDA15, HDA18, HDA8, *Oryza sativa*: HDAC6. (C) послідовності HDAC10 людини та HDA14 *Arabidopsis thaliana*. (D) послідовності HDAC11 людини

та HDA14 (E) послідовності SIRT4 людини та SRT2 *Arabidopsis thaliana*. (F)  
 послідовності SIRT6 людини та SRT1 *Arabidopsis thaliana*.



**Рисунок 3.2.** Філогенетичне дерево класичних гістондеацетилаз *Arabidopsis thaliana* та *Oryza sativa*, споріднених до трьох класів гістондеацетилаз людини.

### 3.2. Аналіз представників родини гістондеацетилаз та відбір мішені для подальшої роботи

За даними літератури, розглянутими в **Розділі 1**, ссавці експресують 18 білків HDAC. Для 17 з них встановлено локалізацію та основні функції (для всіх, крім HDAC10). HDAC6 – єдина гістондеацетилаза, що локалізована виключно в цитоплазмі, де вона фізично пов’язана з тубуліном.

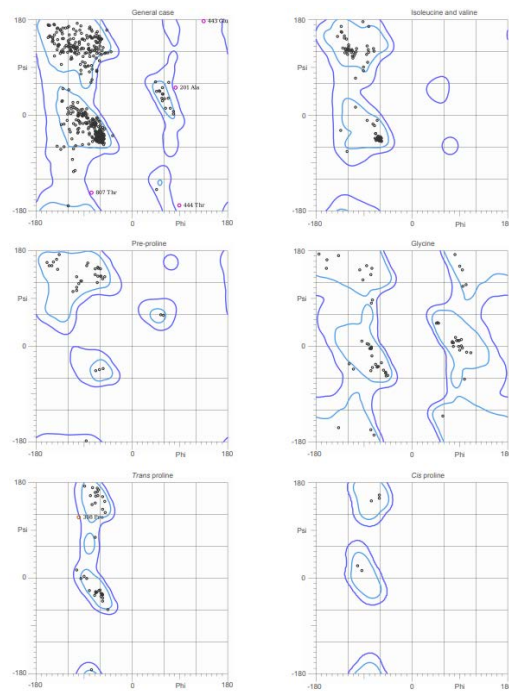
Всі представники класу III (сиртуїни), крім SIRT4, мають експериментально встановлену просторову структуру каталітичних доменів. HDAC1 має експериментально встановлені повноатомні PDB-структури (4BKX, 6Z2J, 6Z2K, 7AO8, 7AO9, 7AOA) та одну неповноатомну структуру (5ICN). Найбільш якісною за розрішенням в анстремах є 4BKX (3.00 Å). HDAC2 має 27 експериментально встановлених неповноатомних структур. З них найякіснішою за розрішенням в анстремах є 7KBG (1.26 Å). HDAC3 має одну експериментально встановлену неповноатомну PDB-структуру 4A69 (2.06 Å). HDAC4 має 17 експериментально встановлених неповноатомних структур. З них 15 включають каталітичний домен. Найякіснішою за розрішенням в анстремах є 3V31 (1.57 Å). HDAC5 має лише одну експериментально встановлену PDB-структуру, що не включає каталітичний домен, 5UWI (2.14 Å). HDAC6 має 17 експериментально встановлених неповноатомних PDB-структур. З них лише одна включає деацетилазний домен, 5EDU (2.79 Å). Інші 16 структур відповідають убіквітинзв'язуючому домену. HDAC7 має 5 неповноатомних експериментально встановлених PDB-структур каталітичного домену (3C0Y, 3C0Z, 3C10, 3ZNR, 3ZNS). З них найбільш якісною за розрішенням в анстремах є 3C10 (2.00 Å). HDAC8 має 53 експериментально встановлені просторові структури. З них 52 – повноатомні. З них найнижче розрішення мають неповноатомна (1.24 Å) та повноатомна 5DC8 (1.30 Å). HDAC9, HDAC10 та HDAC11 не мають експериментально встановлених просторових структур.

Так як HDAC6 є єдиною з родини гістондеацетилаз, субстратом якої є тубулін, і таким чином може опосередковано впливати на іонні канали, призводячи до інгібування збудливості первинних ноціцептивних нейронів периферійної нервової системи, може слугувати молекулярною мішенню для розробки анальгетиків пролонгованої дії.

### 3.3. Реконструкція просторової структури гістонової деацетилази типу 6

Фрагмент білку Q9UBN7 з активним сайтом було реконструйовано на сервері SWISS-MODEL. Реконструйований фрагмент складається з 764 амінокислотних залишків та 1 іону  $Zn^{++}$  (інші гетатоми зі структури було видалено).

Якість реконструйованої структури було оцінено на сервері MolProbity. Там же були додані атоми гідрогену та оцінена правильність орієнтації залишків Asp, Gln та His. В результаті His400, His500 та His764 були перевернуті у більш коректні положення. Після додавання атомів гідрогену та виправлення положення атомів гістидину якість структури було повторно оцінено. Clashscore всіх атомів становила 2,32, що вказує на гарну якість реконструйованої структури. Кількість Poor rotamers збільшилась з 1,76% до 1,92% (цільовий показник - до 0,3%). Інші показники залишилися без змін. Мінімізація енергії проводилася в програмному пакеті MOE з застосуванням силового поля CHARMM27. Після чого якість структури було повторно оцінено на сервері MolProbity. Кількість Poor rotamers знизилась з 1,92% до 0,47% (цільовий показник - до 0,3%). Показник CA Geometry outliers знизився з 1,18% до 0,92% (цільовий показник - до 0,5%). Інші показники зазнали не значної кореляції. На карті Рамачандрана (**Рисунок 3.4**) фінальна структура має такі показники: 94,8% (722/762) всіх залишків перебувають в бажаних (98%) областях; 99,3% (757/762) всіх залишків перебувають в дозволених (> 99,8%) областях. Відмічено 5 outliers (phi, psi): Ala201 (82,1, 53,9), Pro308 (-101,9, 116,1), Glu443 (135,5, 179,6), 444 Thr (89,5, -170,4), 807 Thr (-77,1, -146,7).



**Рисунок 3.4.** Карта Рамачандрана реконструйованої структури HDAC6 після мінімізації енергії.

### 3.4. Порівняння нативної структури та двох структур мутантів

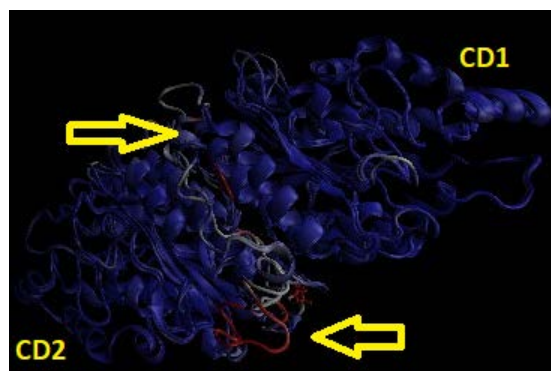
З бази даних UniProt відомо, що існує дві мутантні форми HDAC6, які мають знижену деацетилазну активність в порівнянні з немутантною формою HDAC6.

HDAC6 має два незалежно активні каталітичні домени. Залишки H216 та H611 в активних сайтах мають вирішальне значення для деацетилазної активності кожного з доменів. При заміні відповідних залишків гістидину в кожному каталітичному домені HDAC6 на аланін з отриманням одиночних мутантів H216A і H611A та подвійних мутантів H216/611A, мутантні білки HDAC6 експресували і аналізували на деацетилювання гістонів *in vitro*, було показано, що заміна H216 або H611 на аланін призводить до невеликого зниження активності HDAC, а одночасна мутація обох сайтів повністю скасовує цю активність [47].

Мутанти також використовувалися при дослідженні зв'язування HDAC6 з поліубіквітином. В результаті було встановлено, що нативна та мутантні форми взаємодіють з поліубіквітином та не взаємодіють з моноубіквітином. Взаємодія відбувається через С-кінцевий цинковий палець, але є можливою й без його участі [98].

Фрагмент білку HDAC6 з наявними каталітичними доменами (немутантна форма: 76 – 839 залишки, мутантні форми H216A та H611A: 80 – 836 залишки) було реконструйовано на сервері SWISS-MODEL. Якість реконструйованих структур було оцінено за допомогою сервісу MolProbity. Енергія структур була мінімізована в програмному пакеті MOE з використанням силових полів CHARMM27. Якість структур була повторно оцінена за допомогою сервісу MolProbity після додавання атомів гідрогену та мінімізації енергії. Кількість Poor rotamers після мінімізації була знижена: для нативного білка – до 0% з 1,76%, для мутантів – до 0,47% з 1,78% (цільовий показник - до 0,3%). Інші показники мали не значну кореляцію.

В результаті структурного вирівнювання (**Рисунок 3.3**) було встановлено, що ідентичність структур мутантів та нормальної структури становить 92.12% (QH: 0.8689 та QH: 0.8678).



**Рисунок 3.3.** Просторове вирівнювання нативної структури HDAC6 та двох структур мутантів.

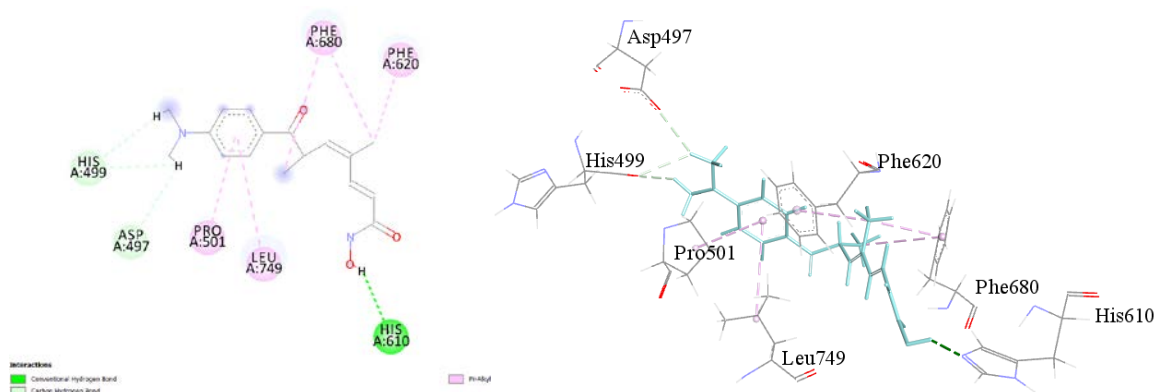
Найбільш сильно структури просторово відрізняються в області петель, а саме в таких залишках (червоним кольором): 435W, 446E, 448D, 449N,

453D, 454N, 455V – 464W, 467P, 475P, 476V. Ці залишки не входять до активних сайтів, описаних в статтях [57, 58, 99], а знаходяться між каталітичними доменами, формуючи петлі. Повністю структурно-ідентичні області позначені синім кольором; структури пофарбовані за Qres.

### **3.5. Аналіз особливостей ліганд-білкових взаємодій та побудова карти сайту зв'язування**

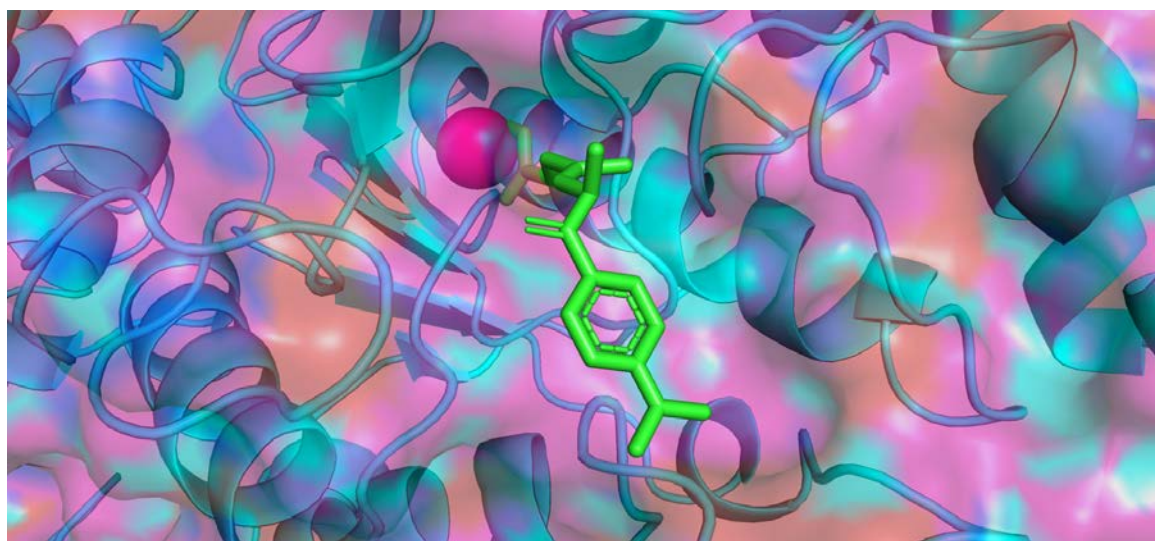
Кристалічна структура CD2 HDAC6 людини у комплексі з трихостатином А (PDB ID: 5EDU) [67] була завантажена з Protein Data Bank. Були розглянуті також і інші структури HDAC6 у комплексах з інгібіторами: 6MR5, 5EFB, 5EEN, 6DVL, 6CW8, 6CSS, 5W5K, 5WGM, 7JOM, 6V7A, 6UOB, 6UOC, 6WIQ, 6UO3, 5GOI, 1C35, 5EF8, 5BWZ. 5EDU була відібрана, як єдина кристалічна структура HDAC6 з інгібітором, оригінальна (auth) послідовність якої відповідає досліджуваній.

Проведено накладання двох структур: структури 5EDU та нашої реконструйованої структури. Вирівнювання послідовностей було проведено з урахуванням їх тотожної ділянки: 389 – 745 амінокислотний залишок в структурі з бази даних відповідають 479 – 835 залишкам реконструйованої структури. Ці залишки включають домен CD2, який знаходиться в позиції від 482 по 800 амінокислотний залишок сіквенсу Q9UBN7. RMSD накладених структур становив 0,983. Було визначено, що сім амінокислотних залишків беруть участь у формуванні взаємодій в активному сайті (**Рисунок 3.5**): Asp497, His499, Pro501, His610, Phe620, Phe680 та Leu749. His610 виступає акцептором при утворенні водневого зв'язку з гідроксильною групою ліганду. Pro501, Phe620, Phe680 та Leu749 формують Pi-Alkyl зв'язки з ароматичною, метильною та кетогрупою ліганду. Asp497 та His499 беруть участь в утворенні слабких карбон-водневих зв'язків.



**Рисунок 3.5.** Взаємодії в активному сайті реконструйованої моделі HDAC6, накладеному з кристалічної структури 5EDU.

Сайт зв'язування був накладений на реконструйовану сполуку. RMSD накладання сайту зв'язування становив 0,7514. Діаграма взаємодії з лігандом в точності повторює описані вище взаємодії. Реконструйовану структуру з накладеним лігандом було також візуалізовано (**Рисунок 3.6**).



**Рисунок 3.6.** Візуалізація сайту зв'язування реконструйованої структури з накладеним лігандом.

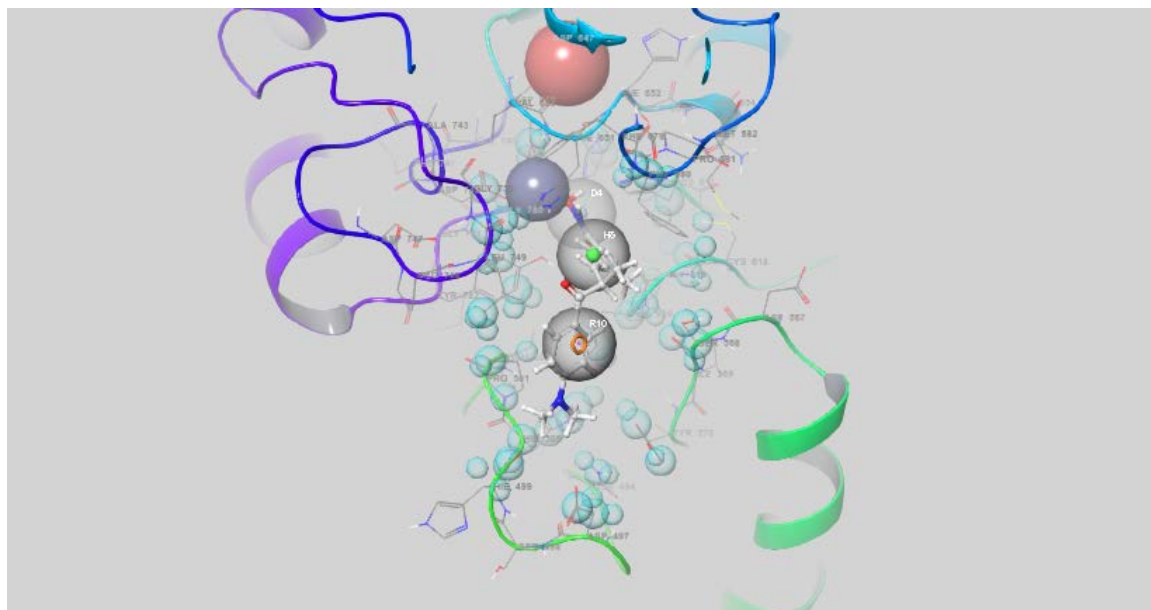
Подальшу інформацію щодо сайтів зв'язування HDAC6 з інгібіторами шукали в статтях. Амінокислотні залишки, що беруть участь у взаємодії з інгібіторами, описаними в публікаціях, було нанесено на робочу послідовність (**Рисунок 3.7**) у такому порядку: octanedioic acid hydroxyamide



в утворенні водневих зв'язків. Вони були задані як констрейни. Було вибрано 30 гідроксильних груп, що знаходяться у межах сайту зв'язування та близько до місць прогнозованої посадки лігандів, яким було дозволено обертання. Це гідроксильні групи біля залишків: Tyr485, Cys493, Ser498, Cys539, Tyr544, Ser563, Ser564, Ser568, Tyr570, Cys572, Thr575, Thr583, Cys618, Cys621, Ser625, Thr656, Tyr668, Ser670, Tyr674, Thr678, Ser688, Tyr715, Ser738, Cys752, Ser755, Tyr759, Tyr782, Ser786, Ser790, Thr823.

### **3.6. Побудова фармакофорних моделей та їх порівняння**

З метою скорочення вибірки речовин кандидатів було створено дві фармакофорні моделі та проведено їх порівняння, щоб зрозуміти плюси та мінуси кожної з моделей. Перша фармакофорна модель (**Рисунок 3.8**) створена на основі сайту зв'язування у кристалі 5EDU. Для цього структура кристалу була накладена на реконструйовану HDAC6, ліганд (трихостатин А) та іони перенесені до реконструйованої структури. Дана модель побудована в автоматичному режимі. Фармакофорна модель включає три фармакофорні вектори: D4 (донор водневого зв'язку), H8 (гідрофобний вектор) та R10 (ароматичне кільце).

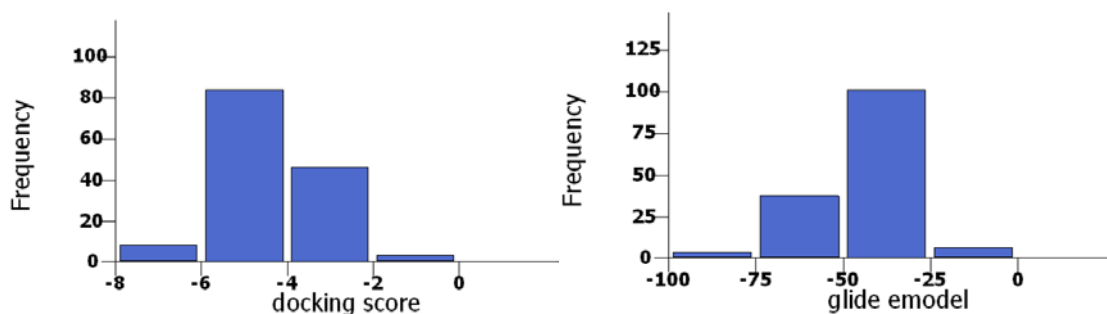


**Рисунок 3.8.** Фармакофорна модель за лігандом, створена в автоматичному режимі.

Для тестування моделі була взята вибірка інгібіторів, що сіла за результатами попереднього докінгу. В результаті скринінгу фармакофорної моделі з 147 інгібіторів залишилось 74, тобто вибірку було скорочено майже вдвоє.

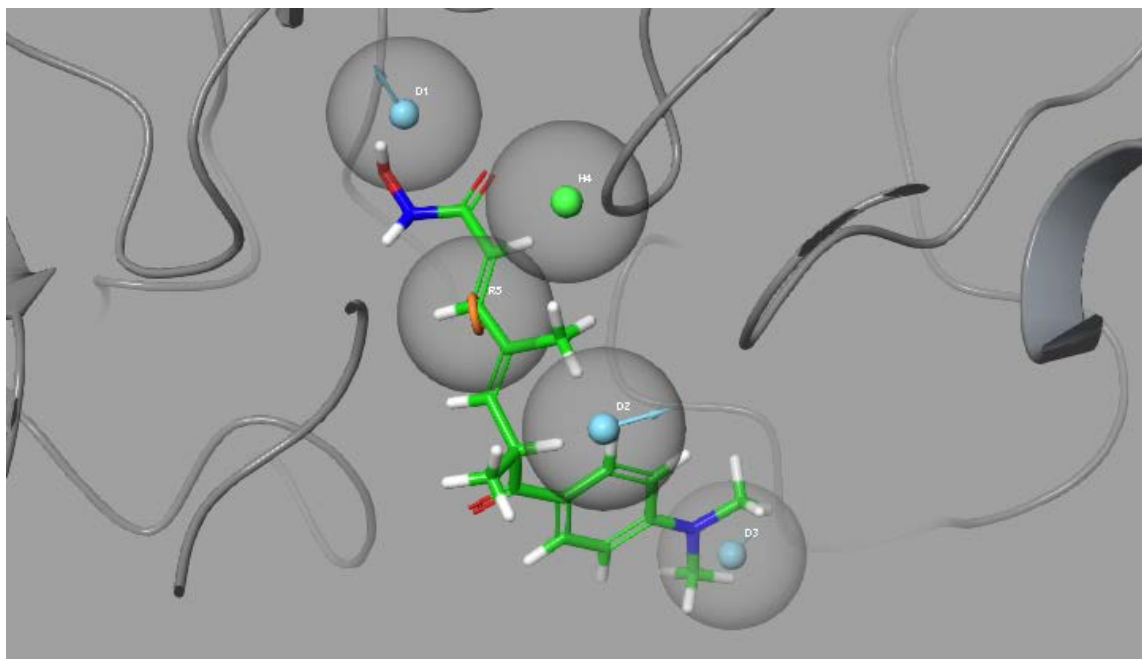
Друга фармакофорна модель (**Рисунок 3.10**) була створена в ручному режимі на основі результатів попереднього докінгу до активного сайту. Для цього з баз даних попередньо було відібрано 240 інгібіторів з підтверженою активністю, з них згенеровано 1299 таутомерів. В результаті докінгу 147 сполук інгібіторів сіли в сайт зв'язування. Взаємодії в активному сайті наведено з цими лігандами наведено в **Додатку 1**.

Також було оцінено показники docking score та glide emodel (**Рисунок 3.9**).



**Рисунок 3.9.** Оцінка docking score та glide emodel сполук інгібіторів при попередньому докінгу.

Згенерована з урахуванням результатів попереднього докінгу в активний сайт реконструйованої просторої структури гістондеацетилази типу б фармакофорна модель (**Рисунок 3.10**) включає в себе п'ять фармакофорних векторів, що за результатами докінгу в активний сайт найчастіше взаємодіють з амінокислотними залишками рецептора: D1 – донор водневого зв'язку, взаємодіє з His610, D2 (донор водневого зв'язку) – Ser568, D3 (донор водневого зв'язку) – His499, H4 – гідрофобний вектор біля Gly619 (поблизу залишків Cys621, Phe623), R5 (ароматичне кільце) – Thr583. Всі амінокислотні залишки, крім Thr583 були такими, що найчастіше вступали у взаємодії за результатами докінгу докінгу. Ароматичний вектор було вирішено додати, як такий, що може бути потенційно важливим, та з метою скорочення вибірки для пошуку нових актуальних сполук.



**Рисунок 3.10.** Фармакофорна модель за рецептором, створена в ручному режимі.

Модель верифіковано на вибірці попереднього докінгу. В результаті скринінгу фармакофорної моделі з 147 інгібіторів отримано 53 хіти, тобто вибірку було скорочено майже втричі, і цей результат є майже в півтора рази меншим за результат попередньої моделі, що дозволяє припустити, що друга модель дасть меншу вибірку, але таку, що міститиме більше малих молекул відмінних за структурою від відомих інгібіторів.

### **3.7. Високопропускний віртуальний скринінг, аналіз хітів та побудова ліганд-білкових комплексів за допомогою молекулярного докінгу**

На даному етапі було розглянуто два підходи до побудови фармакофорних моделей, проведено порівняння класичного підходу до створення фармакофорних моделей за лігандом на основі кристалічної

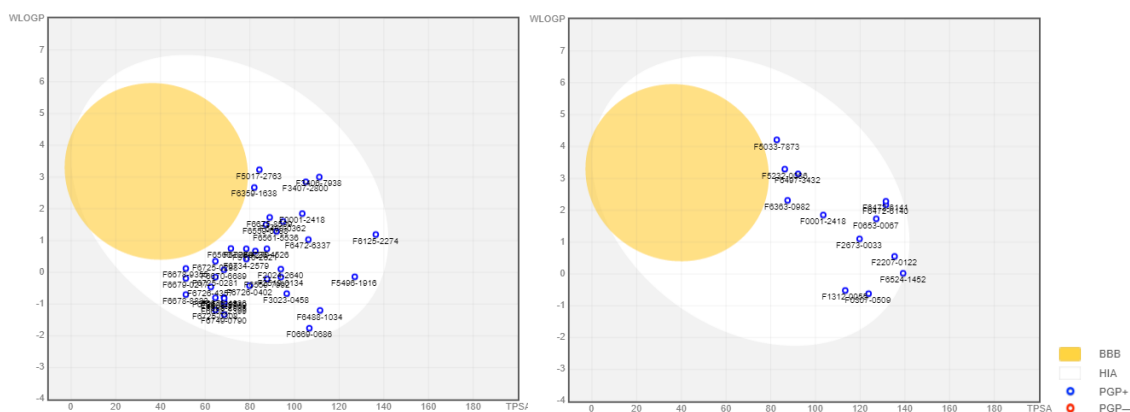
структури та за рецептором на основі аналізу результатів попереднього докінгу.

Перша фармакофорна модель (за лігандом) згенерована автоматично на основі кристалічної структури PDB ID: 5EDU (ліганд трихостатин А). Друга фармакофорна модель (за рецептором) побудована в ручному режимі на основі результатів попереднього докінгу. Високопропускний віртуальний скринінг фармакофорних моделей HDAC6 був проведений на бібліотеці Life Chemicals, що включає 500к сполук малих молекул. В результаті скринінгу першої моделі було відібрано 2441 конформер (1491 сполуку без дублікатів), другої моделі - 1209 конформерів (731 сполуки). Отримані хіти було доковано до активного сайту HDAC6. За обома моделями більшість докованих хітів мала показник docking score від -6 до -4, але у вибірці за другою моделлю показник більше -4 мало в тричі менше хітів. Таким чином фармакофорна модель на основі попереднього докінгу до активного сайту дозволяє скоротити вибірку удвічі, при цьому зменшивши відсоток потенційно неактивних лігандів. Варіабельність першої вибірки за індексом Танімото складає 16.77%, другої – 14.19%. Схожість обох вибірок між собою становить 46.34%.

### **3.8. Оцінка фармацевтичних властивостей потенційних інгібіторів**

З докованих хітів було відібрано сполуки, що мали docking score менше -4: 1189 лідів за першою фармакофорною моделлю та 586 лідів за другою фармакофорною моделлю. Дані ліди було перевірено на біодоступність та безпечність для людини. Враховувалися ліпофільність (LIPO), розмір (SIZE), полярність (POLAR), розчинність (INSOLU), насиченість (INSATU) кількість обертальних груп (FLEX) (дані наведено в Додатках 4 та 5). Сполуки також було перевірено на токсичність, здатністю адсорбуватися, проникати через гематоенцефалічний бар'єр та бути субстратом P-gp (тобто виводитися з

організму). В результаті за першою фармакофорною моделлю відібрано 38, за другою – 13 сполук потенційних інгібіторів гістондеацетилази типу 6 (їх структурні формули та робочі індекси наведено в **Додатках 2 та 3**). На **Рисунку 3.11** наведені відібрані для подальшої перевірки *in vitro* малі молекули та показана їх здатність адсорбуватися та виводитися з організму. Також було розглянуто здатність до інгібування ізоформ цитохрому P450 (дані наведено в **Додатках 6 та 7**).

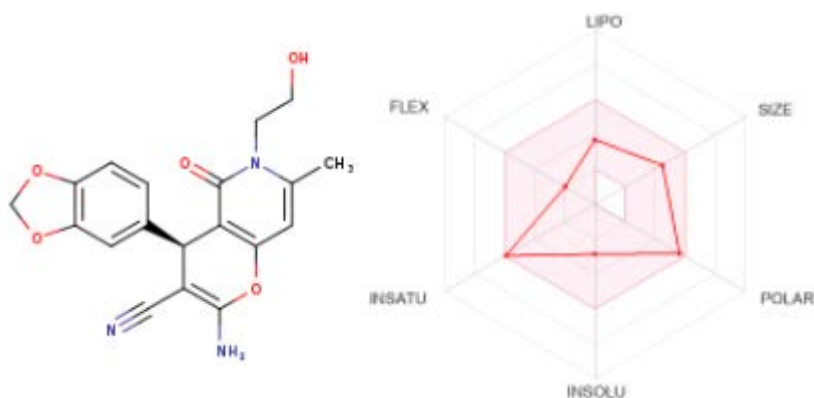


**Рисунок 3.11.** BOILED-Egg відібраних сполук потенційних лігандів за першою фармакофорною моделлю (зліва) та за другою фармакофорною моделлю (справа).

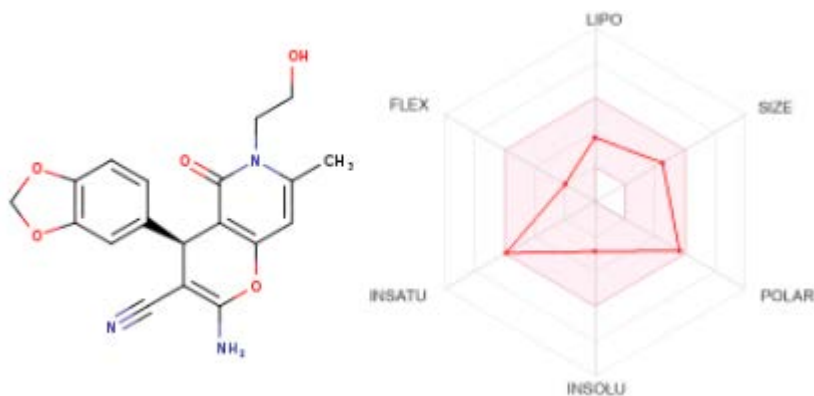
### 3.9. Верифікація ліганд-білкових комплексів HDAC6 з потенційними інгібіторами за допомогою молекулярної динаміки

З вибірки хітів скринінгу за другою фармакофорною моделлю (за рецептором) було взято сполуку F2673-0033, що мала найнижчі показники docking score з тих, що задовільняли за показниками ADMED. Її docking score становив -5.704. Щоб показати необхідність врахування ADMED показників за першою фармакофорною моделлю (за лігандом) було взято сполуку з найкращими показниками докінгу, F5857-1085, без урахування її ADMED показників. За ADMED сполука була такою, що не є субстратом P-gp, тобто

не виводиться з організму, та мала відхилення за показником насиченості, тобто долі вуглецю в  $sp^3$ -гібридизації (Fraction C $_{sp^3}$  = 0.19, при нормі до 0.25 – 1). Docking score даної сполуки становив -6.687. На **Рисунках 3.12** та **3.13** наведено відібрані для молекулярної динаміки хіти та їх радар біодоступності.



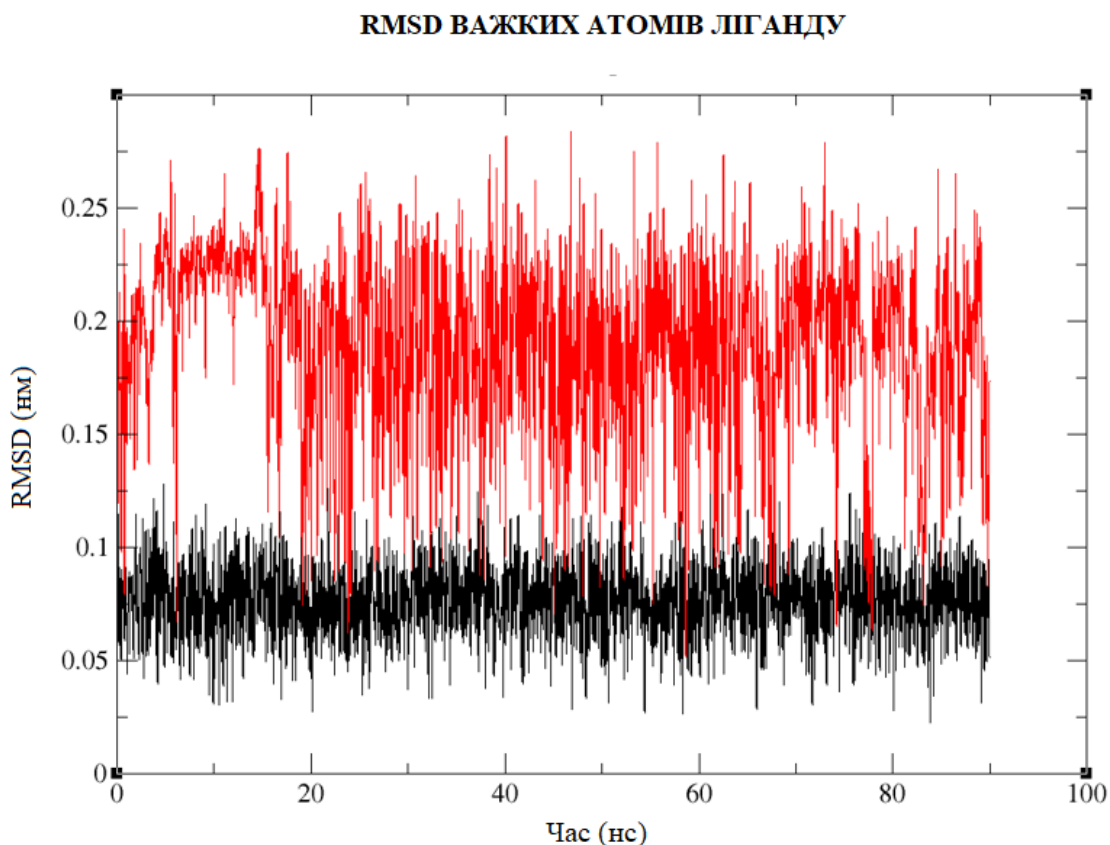
**Рисунок 3.12.** Сполука F2673-0033, відібрана за фармакофорною моделлю за рецептором.



**Рисунок 3.13.** Сполука F5857-1085, відібрана за фармакофорною моделлю за лігандом.

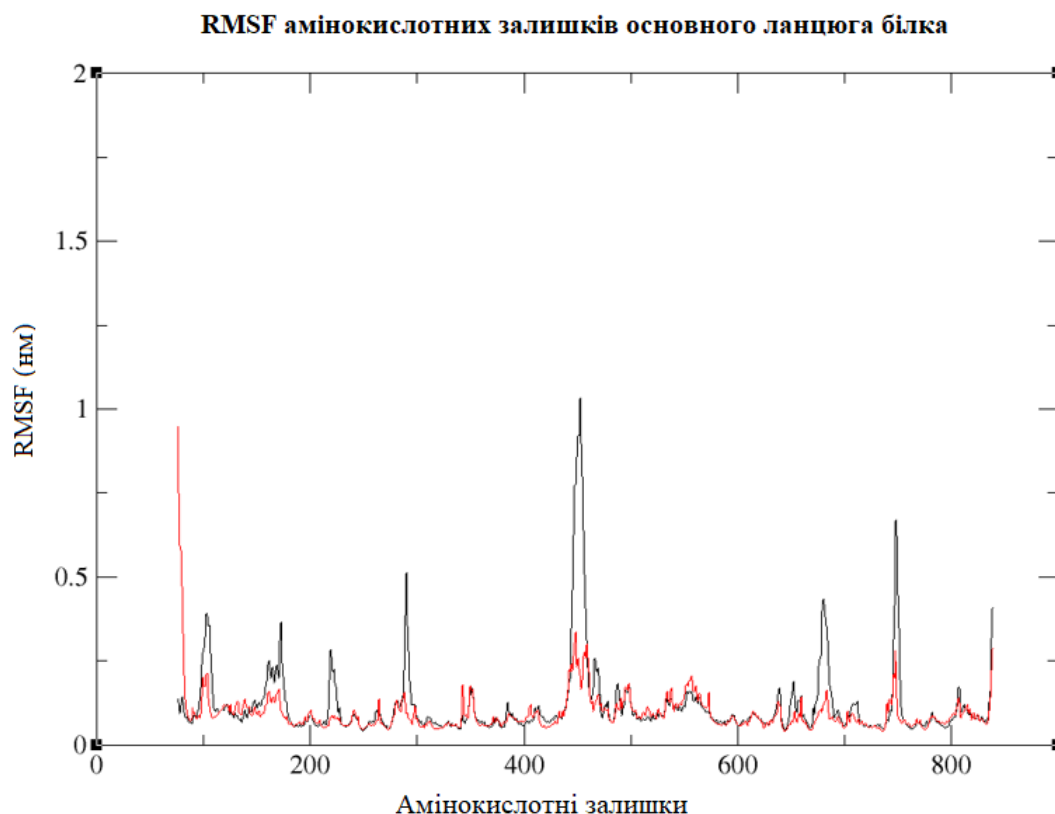
Молекулярно-динамічне моделювання тривалістю 90нс для кожного з двох комплексів було виконано для перевірки стабільності комплексів в часі. Моделювання було проаналізовано для оцінки афінності зв'язування кінцевих сполук лігандів з гістондеацетилазою типу 6. Конформаційна стабільність досліджувалася шляхом розрахунку середньоквадратичного

відхилення (RMSD) важких атомів ліганду (Рисунок 3.14) та середньоквадратичних флуктуацій (RMSF) амінокислотних залишків основного ланцюга фермента (Рисунок 3.15).



**Рисунок 3.14.** RMSD важких атомів ліганду. Чорним – для комплексу за другою фармакофорною моделлю, червоним – для комплексу за першою фармакофорною моделлю.

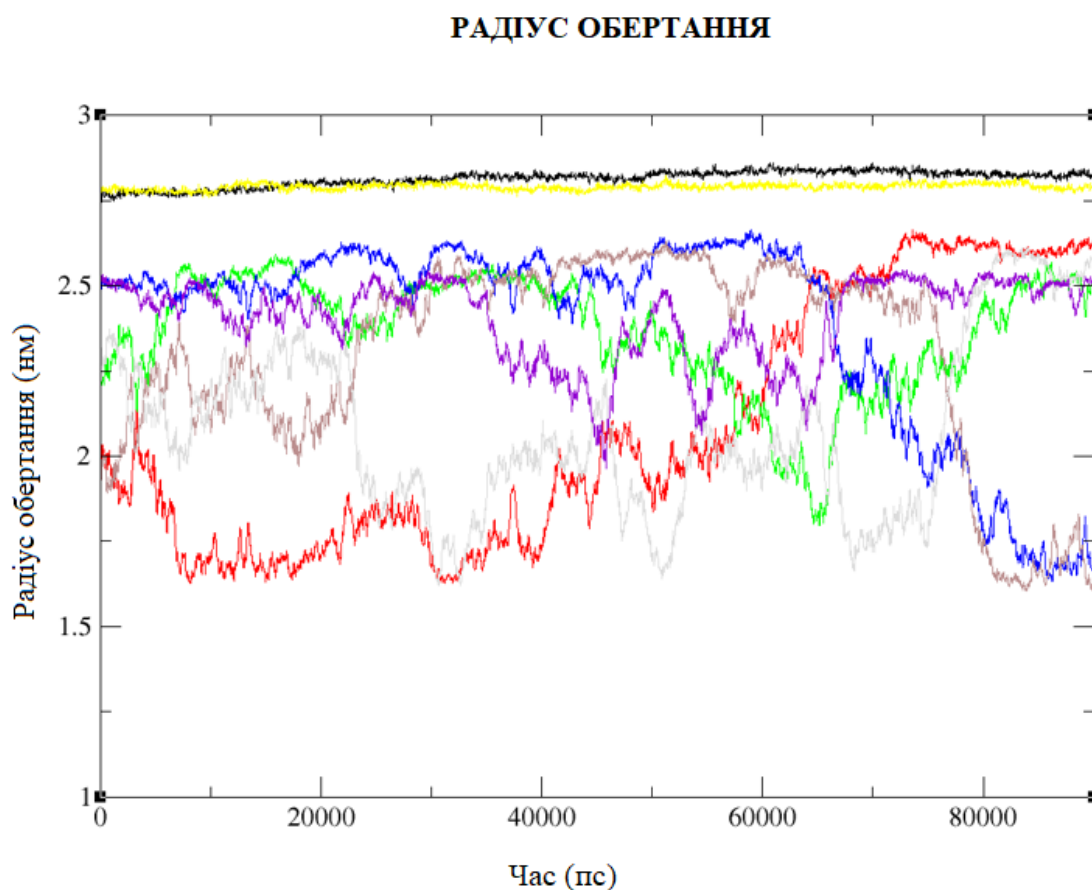
RMSD важких атомів ліганду характеризує наскільки положення ліганду змінилося по відношенню до білка, що демонструє наскільки добре поза зв'язування ліганду була збережена під час моделювання. RMSD за другою фармакофорною моделлю в середньому не перевищує 1 Å, що вказує на дуже незначні зміни в положенні ліганду. В той час як RMSD сполуки відібраної за першою фармакофорною моделлю перевищує 2 Å.



**Рисунок 3.15.** RMSF амінокислотних залишків основного ланцюга HDAC6. Чорним – для комплексу за другою фармакофорною моделлю, червоним – для комплексу за першою фармакофорною моделлю.

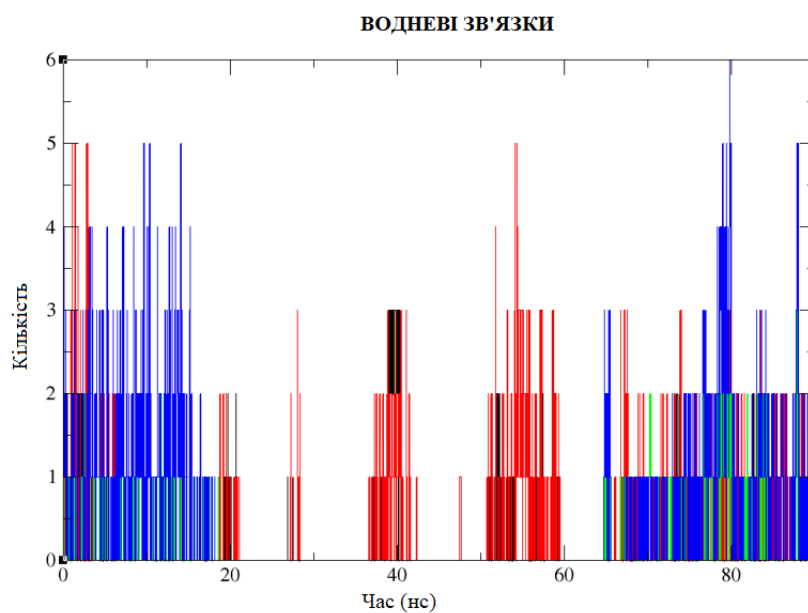
RMSF були нижчими для першої фармакофорної моделі. Найбільші флуктуації спостерігалися в ділянці петель (435 – 476 амінокислотний залишок), де за другою фармакофорною моделлю вони сягали 1 нм. В той час як коливання в області активного сайту (497 – 784 амінокислотний залишок) не перевищували 0.5 нм, а в середньому становили 0.2 нм, що свідчить про стабільність каталітичної ділянки під час моделювання.

Компактність гістондеацетилази типу 6 в присутності хітових сполук оцінювали шляхом розрахунку радіусу обертання (**Рисунок 3.16**). Значення загального радіусу обертання (від 2.7 нм до 2.82 нм) HDAC6 вказує на її компактність під час моделювання завдяки стабільності поведінки вторинних структур.

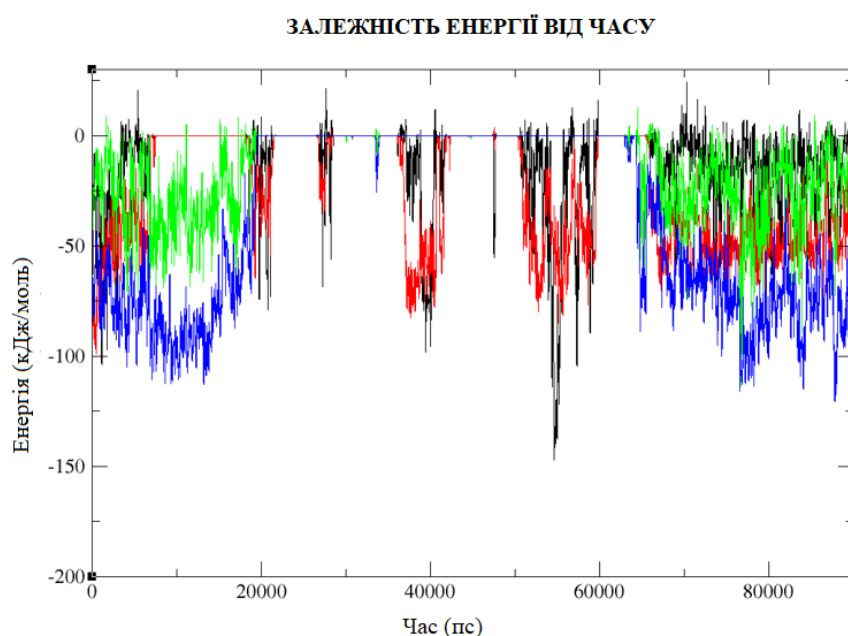


**Рисунок 3.16.** Радіус обертання HDAC6. Для комплексу за другою фармакофорною моделлю: чорним – загальний радіус обертання; червоним, зеленим та синім – радіус обертання навколо осей x, y та z відповідно. Для комплексу за першою фармакофорною моделлю: жовтим – загальний радіус обертання; коричневим, сірим та фіолетовим – радіус обертання навколо осей x, y та z відповідно.

Коливання кількості водневих зв'язків (**Рисунок 3.17**) для комплексу за другою фармакофорною моделлю є більш стабільним, ніж для комплексу за першою. Ту ж залежність бачимо і на графіку енергії (**Рисунок 3.18**). Це можна пояснити тим, що сполука в комплексі за першою фармакофорною моделлю має вдвічі вищу долю вуглецю в  $sp^3$ -гібридації, що, як видно з **Рисунку 3.14**, викликає значні конформаційні зміни в положенні ліганду, і таким чином перешкоджає формуванню стабільного комплексу.



**Рисунок 3.17.** Зміна кількості водневих зв'язків у часі для групи білок-ліганд. Для комплексу за другою фармакофорною моделлю: чорним – водневі зв'язки, червоним – пари в межах 0.35 нм. Для комплексу за першою фармакофорною моделлю: зеленим – водневі зв'язки, синім – пари в межах 0.35 нм.



**Рисунок 3.18.** Залежність показників енергії від часу. Для комплексу за другою фармакофорною моделлю: чорним – кулонівська енергія, червоним – енергія Леннарда-Джонса. Для комплексу за першою фармакофорною моделлю: зеленим – кулонівська енергія, синім – енергія Леннарда-Джонса.

В Таблицях 3.1 та 3.2 наведено показники кулонівської енергії та енергії Леннарда-Джонса для комплексів з хітами за двома фармакофорними моделями.

Таблиця 3.1.

Показники кулонівської енергії та енергії Леннарда-Джонса для системи з лігандом за другою фармакофорною моделлю.

Енергія	Середній показник	Err.Est.	RMSD	Tot-Drift	Одиниці вимірювання
Кулонівська	-11.0752	2.3	20.8375	-6.52932	кДж/моль
Леннарда-Джонса	-24.8198	6.8	25.5107	-33.6811	кДж/моль

Таблиця 3.2.

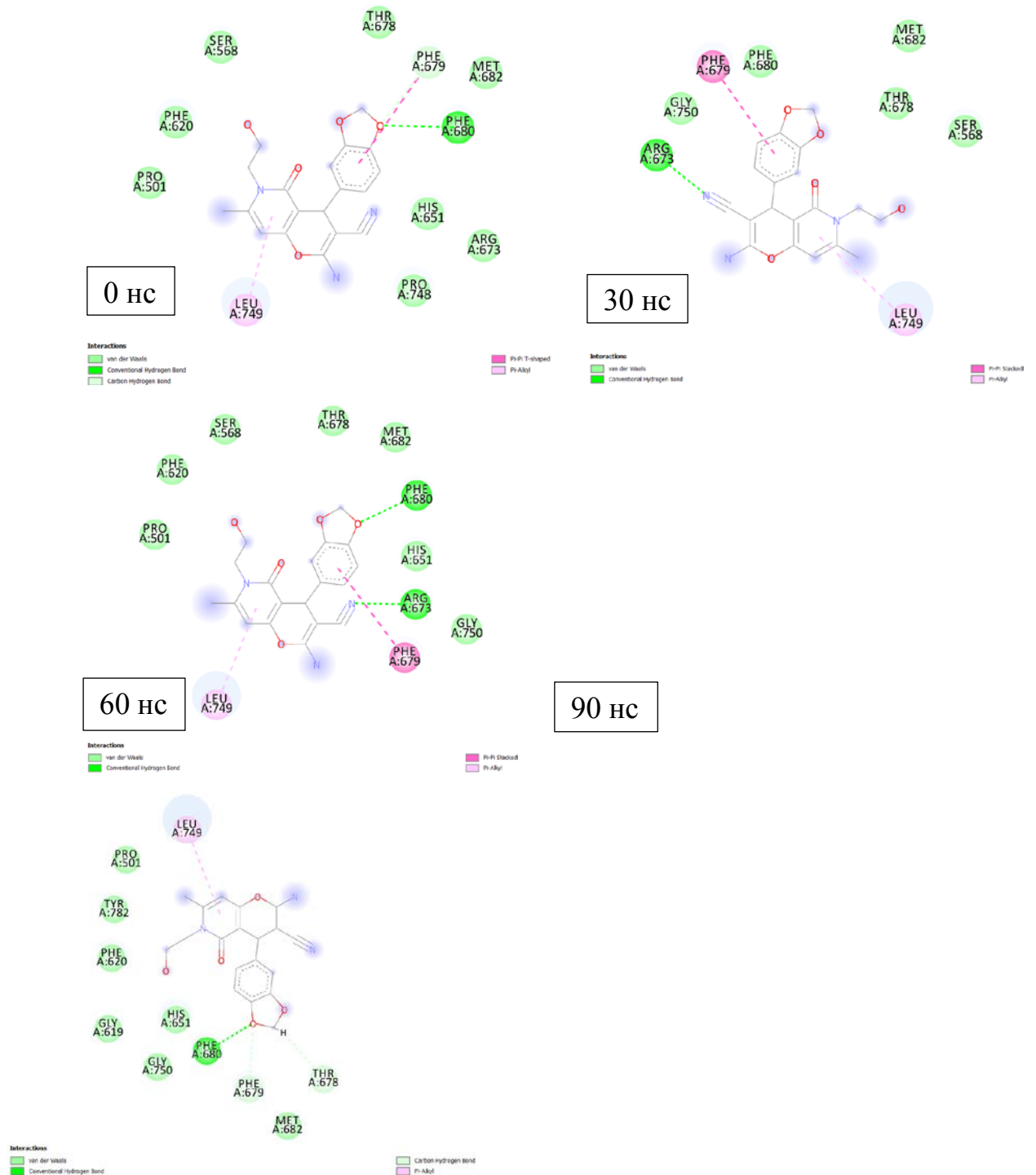
Показники кулонівської енергії та енергії Леннарда-Джонса для системи з лігандом за першою фармакофорною моделлю.

Енергія	Середній показник	Err.Est.	RMSD	Tot-Drift	Одиниці вимірювання
Кулонівська	-13.2937	6.4	18.4461	-1.50861	кДж/моль
Леннарда-Джонса	-36.7396	17	38.9645	-9.58651	кДж/моль

На основі середніх величин кулонівської енергії та енергії Леннарда-Джонса після поширення похибки за стандартною формулою для додавання двох величин можна порахувати повну енергію взаємодії. Повна енергія взаємодії для комплексу з лігандом за другою фармакофорною моделлю становитиме  $-35.9 \pm 32.9$  кДж/моль, за першою фармакофорною моделлю -  $50.0 \pm 43.1$  кДж/моль. Таким чином для комплексу з лігандом за першою

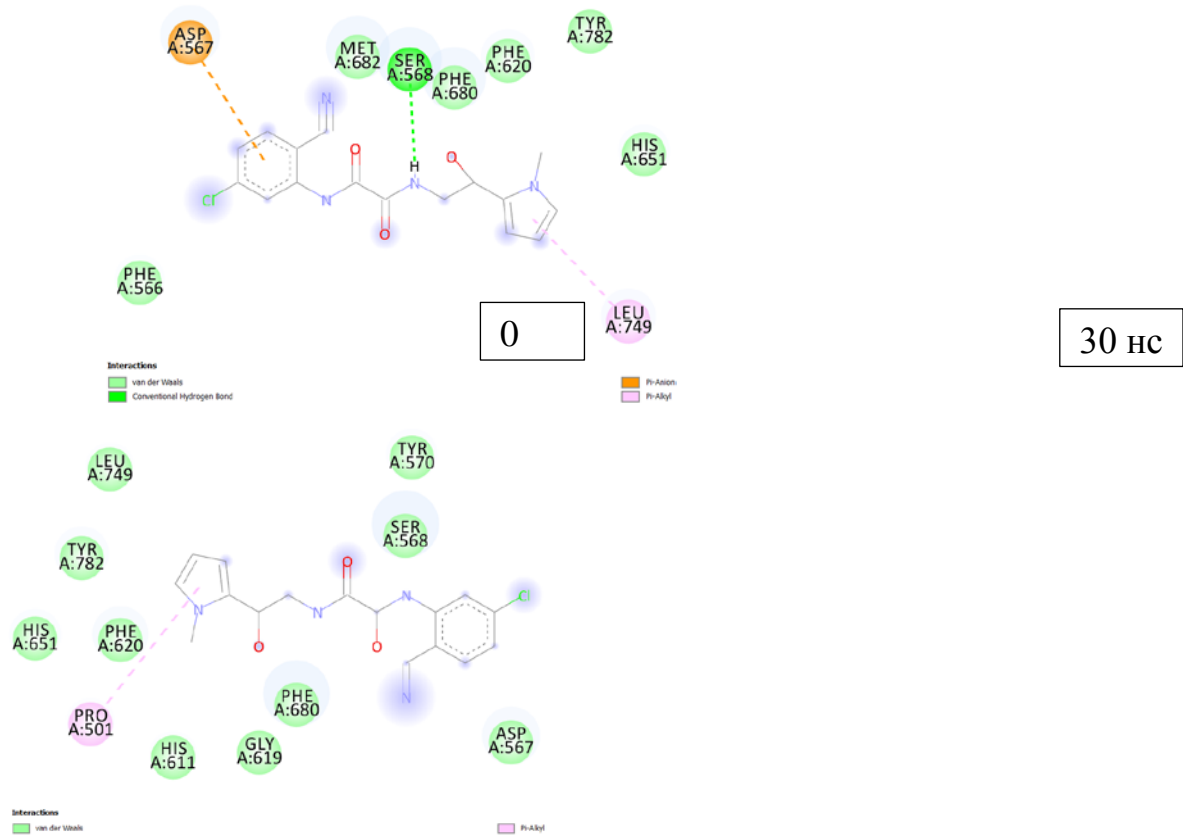
фармакофорною моделлю показники повної енергії взаємодії будуть нижчими, не дивлячись на конформаційну рухливість ліганду.

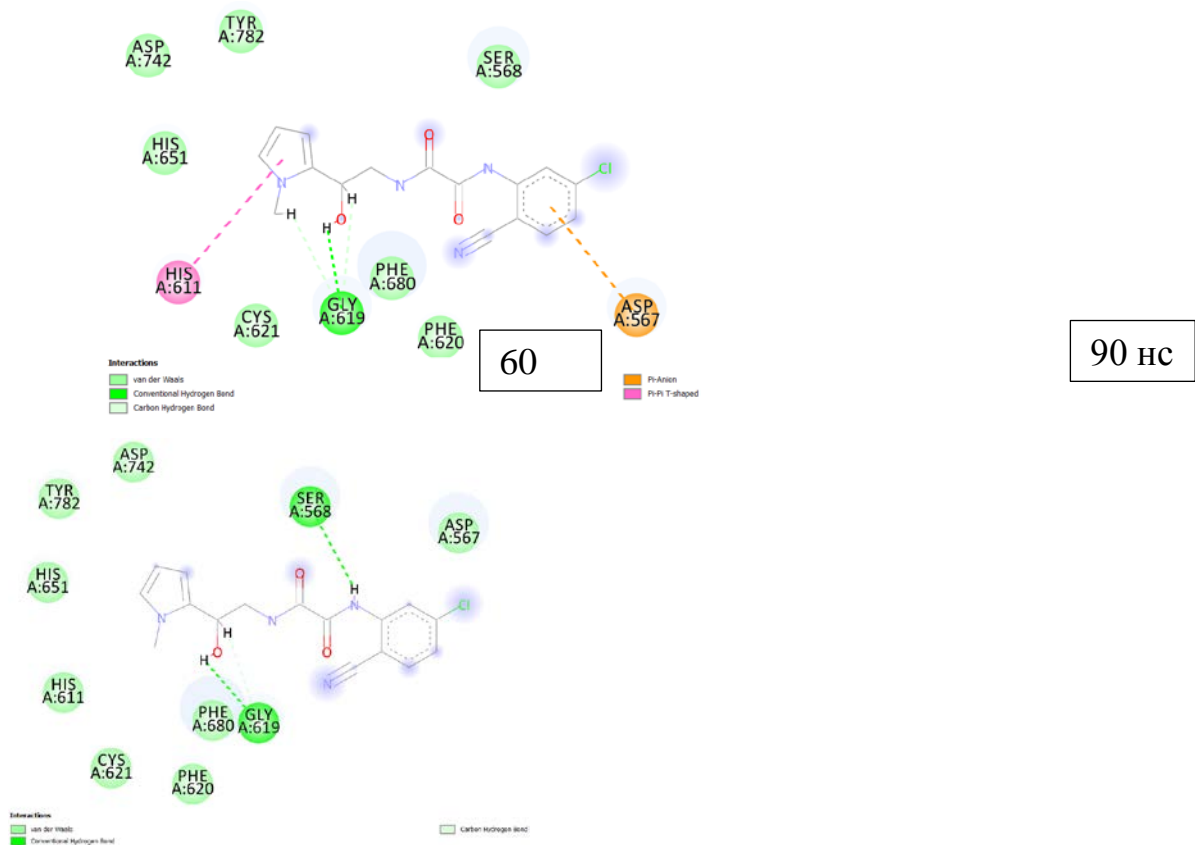
На **Рисунках 3.19** та **3.20** наведено діаграми зв'язування хітів за двома фармакофорними моделями в активному сайті рецептора на початок динаміки, 30 нс, 60 нс та 90 нс.



**Рисунок 3.19.** Взаємодії в активному сайті з хітом за другою фармакофорною моделлю на початок динаміки, 30 нс, 60 нс та 90 нс.

Ключову роль в комплексі за другою фармакофорною моделлю відіграють водневі зв'язки амінокислотного залишку Arg673 з нітрогрупою ліганду та Phe680 з альдегідною групою в п'ятичленному циклі ліганду. Стабільним є Pi-Alkyl зв'язок Leu749 з ароматичною групою ліганду. На 30 нс та 60 нс зафіксовані також Pi-Pi Stacked взаємодії між Phe679 та бензольним кільцем ліганду. Варто також відмітити від чотирьох до дев'яти некласичних водневих зв'язків, які є важливими в стабілізації комплексів білок-ліганд.

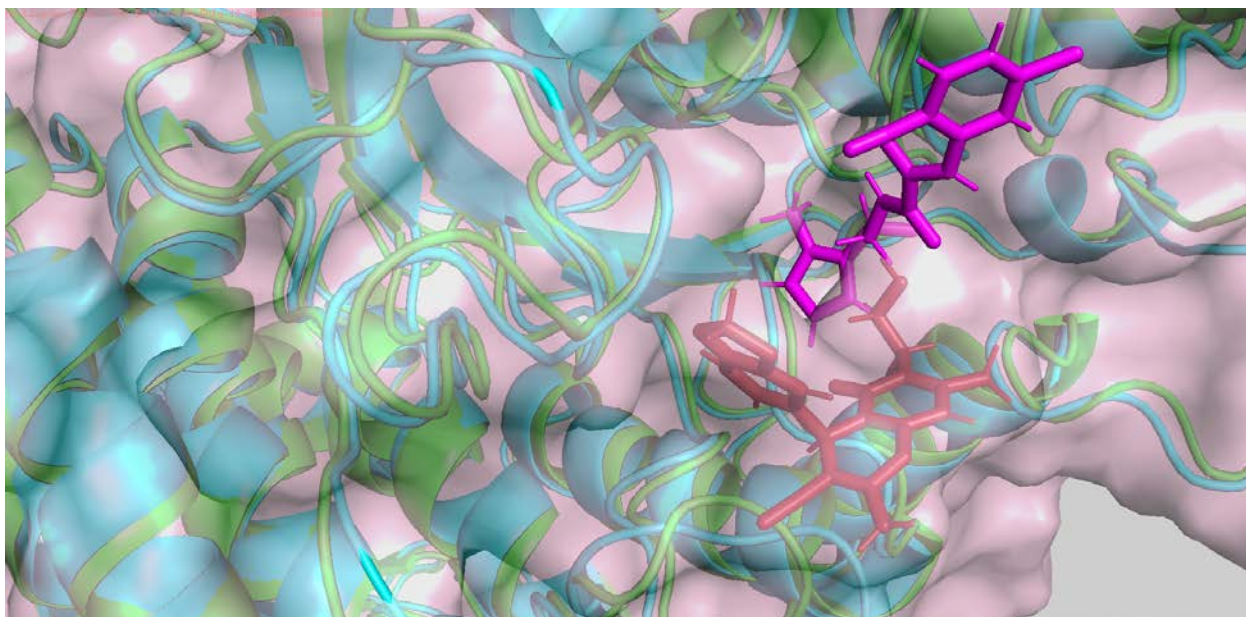




**Рисунок 3.20.** Взаємодії в активному сайті з хітом за першою фармакофорною моделлю на початок динаміки, 30 нс, 60 нс та 90 нс.

Як видно з **Рисунку 3.20** на 30 нс комплекс взагалі не утворює водневих зв'язків, що відповідає даним на **Рисунку 3.17**. Інші зв'язки, такі як: Pi-Anion, Pi-Alkyl та Pi-Pi T-shaped, - є нестійкими, що відповідає іншим вищенаведеним даним молекулярно-динамічного моделювання, та пояснюється високою конформаційною мінливістю даного ліганду.

На **Рисунку 3.21** візуалізовано накладені комплекси гістондеацетилази типу 6 з обома лігандами під кінець молекулярної динаміки. Ліганд за другою фармакофорною моделлю повністю занурений в поверхню білка, а ліганд за першою фармакофорною моделлю знаходиться більшою частиною на поверхні білка.



**Рисунок 3.21.** Візуалізація накладених комплексів HDAC6 на кінець молекулярно-динамічного моделювання. Зеленим кольором позначена HDAC6 в комплексі з хітом за другою моделлю (червоним кольором). Блакитним кольором позначена HDAC6 в комплексі з хітом за першою моделлю (фіолетовим кольором).

## ВИСНОВКИ

Виконано порівняльне дослідження гістондеацетилаз різного еволюційного походження, що дозволило встановити спільні риси та відмінності у представників тваринного та рослинного царства. На основі результатів аналізу та класифікації гістондеацетилаз різного еволюційного походження було встановлено, що до гістондеацетилаз людини класу I філогенетично спорідненими є гістондеацетилази *Arabidopsis thaliana* (HDA19, HDA6, HDA7, HDA10, HDA9) та *Oryza sativa* (HDAC1, HDAC2, HDAC3), класу IV – HDA2 *Arabidopsis thaliana*, класу IIb – гістондеацетилази *Arabidopsis thaliana* (HDA8, HDA5, HDA18, HDA15, HDA14) та *Oryza sativa* (HDAC10).

На підставі аналізу кристалографічно доведених структур було встановлено особливості просторової структури гістон деацетилази типу 6, зокрема будову її каталітичного домена, на основі якого проведено реконструкцію просторової структури HDAC6. Враховуючи також дані літератури було охарактеризовано взаємодії в активному сайті деацетилазного домена.

Проаналізовано відомі мутації гістондеацетилази типу 6 та їх можливий вплив на зв'язування в активному сайті. Реконструйовано структури мутантних форм та проведено структурне вирівнювання, що дало можливість встановити збереження стабільності каталітичного домена при мутаціях та зміну в просторовій структурі ділянок петель.

На основі реконструйованих фармакоформних моделей, високопропускнуго віртуального скринінгу і оцінки фармацевтичних властивостей сполук було отримано бібліотеку потенційних інгібіторів та встановлено особливості зв'язування молекул.

Проведено порівняння бібліотек хітів, отриманих за двома фармакоформними моделями. Було показано скорочення вибірки хітів в фармакоформній моделі за рецептором з урахуванням попереднього докінгу, в

порівнянні з моделлю за лігандом. При цьому відсотковий склад хітів з достатньо низькими показниками docking score було збережено.

В результаті верифікації ліганд-білкових комплексів HDAC6 з потенційними інгібіторами за допомогою молекулярної динаміки було показано, що комплекс за фармакофорною гіпотезою за рецептором є більш стабільним завдяки врахуванню результатів комп'ютерного ADMED-аналізу.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Current world literature. Drugs in anaesthesia. (2003). *Current opinion in anaesthesiology*, 16(4), 429–436.  
<https://doi.org/10.1097/01.aco.0000084472.59960.ce>
2. Steele, D. F., & Fedida, D. (2014). Cytoskeletal roles in cardiac ion channel expression. *Biochimica et biophysica acta*, 1838(2), 665–673.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.001>
3. Hammond, J. W., Cai, D., & Verhey, K. J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Current opinion in cell biology*, 20(1), 71–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.cecb.2007.11.010>
4. Westermann, S., & Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(12), 938–947.  
<https://doi.org/10.1038/nrm1260>
5. Magiera, M. M., Bodakuntla, S., Žiak, J., Lacomme, S., Marques Sousa, P., Leboucher, S., Hausrat, T. J., Bosc, C., Andrieux, A., Kneussel, M., Landry, M., Calas, A., Balastik, M., & Janke, C. (2018). Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. *The EMBO journal*, 37(23), e100440.  
<https://doi.org/10.15252/emj.2018100440>
6. Liu, N., Xiong, Y., Li, S., Ren, Y., He, Q., Gao, S., Zhou, J., & Shui, W. (2015). New HDAC6-mediated deacetylation sites of tubulin in the mouse brain identified by quantitative mass spectrometry. *Scientific reports*, 5, 16869.  
<https://doi.org/10.1038/srep16869>
7. Sakloth, F., Manouras, L., Avrampou, K., Mitsi, V., Serafini, R. A., Pryce, K. D., Cogliani, V., Berton, O., Jarpe, M., & Zachariou, V. (2020). HDAC6-selective inhibitors decrease nerve-injury and inflammation-associated

- mechanical hypersensitivity in mice. *Psychopharmacology*, 237(7), 2139–2149.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-020-05525-9>
8. Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., & Robson, C. N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*, 59(2), 177–189.  
<https://doi.org/10.1002/pros.20022>
  9. Wilson, A. J., Byun, D. S., Popova, N., Murray, L. B., L'Italien, K., Sowa, Y., Arango, D., Velcich, A., Augenlicht, L. H., & Mariadason, J. M. (2006). Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *The Journal of biological chemistry*, 281(19), 13548–13558.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M510023200>
  10. Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S., & Iwase, H. (2005). Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast\*. *Breast cancer research and treatment*, 94(1), 11–16.  
<https://doi.org/10.1007/s10549-005-6001-1>
  11. Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S., & Iwase, H. (2004). HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(20), 6962–6968.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0455>
  12. Weichert W. (2009). HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer letters*, 280(2), 168–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.047>
  13. Abel, T., & Zukin, R. S. (2008). Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Current opinion in pharmacology*, 8(1), 57–64.

- <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.12.002>
14. Carew, J. S., Giles, F. J., & Nawrocki, S. T. (2008). Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer letters*, *269*(1), 7–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.037>
15. Sleiman, S. F., Basso, M., Mahishi, L., Kozikowski, A. P., Donohoe, M. E., Langley, B., & Ratan, R. R. (2009). Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and challenges of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions. *Expert opinion on investigational drugs*, *18*(5), 573–584.  
<https://doi.org/10.1517/13543780902810345>
16. Kazantsev, A. G., & Thompson, L. M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature reviews. Drug discovery*, *7*(10), 854–868.  
<https://doi.org/10.1038/nrd2681>
17. Haberland, M., Montgomery, R. L., & Olson, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews. Genetics*, *10*(1), 32–42.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2485>
18. Yang, X. J., & Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *9*(3), 206–218.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2346>
19. D'Mello, S.R. (2009). Histone deacetylases as targets for the treatment of human neurodegenerative diseases. *Drug News & Perspectives*, *22*(9):513.  
<https://doi.org/10.1358/dnp.2009.22.9.1437959>
20. Gan, L., & Mucke, L. (2008). Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron*, *58*(1), 10–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.015>

21. Smith, B. C., Hallows, W. C., & Denu, J. M. (2008). Mechanisms and molecular probes of sirtuins. *Chemistry & biology*, *15*(10), 1002–1013.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.09.009>
22. Taylor, D. M., Maxwell, M. M., Luthi-Carter, R., & Kazantsev, A. G. (2008). Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *65*(24), 4000–4018.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8357-y>
23. Saunders, L., Verdin, E. (2007). Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, *26*, 5489–5504.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210616>
24. Michishita, E., McCord, R. A., Berber, E., Kioi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., Cheung, P., Kusumoto, R., Kawahara, T. L., Barrett, J. C., Chang, H. Y., Bohr, V. A., Ried, T., Gozani, O., & Chua, K. F. (2008). SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, *452*(7186), 492–496.  
<https://doi.org/10.1038/nature06736>
25. Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., & Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *The Journal of biological chemistry*, *282*(9), 6823–6832.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M609554200>
26. North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., & Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Molecular cell*, *11*(2), 437–444.  
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00038-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00038-8)
27. Hisahara, S., Chiba, S., Matsumoto, H., Tanno, M., Yagi, H., Shimohama, S., Sato, M., & Horio, Y. (2008). Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(40), 15599–15604.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0800612105>
28. Vaquero, A., Scher, M. B., Lee, D. H., Sutton, A., Cheng, H. L., Alt, F. W., Serrano, L., Sternglanz, R., & Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes & development*, *20*(10), 1256–1261.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1412706>
29. Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C., & Horikawa, I. (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular biology of the cell*, *16*(10), 4623–4635.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e05-01-0033>
30. Pfister, J. A., Ma, C., Morrison, B. E., & D'Mello, S. R. (2008). Opposing effects of sirtuins on neuronal survival: SIRT1-mediated neuroprotection is independent of its deacetylase activity. *PloS one*, *3*(12), e4090.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004090>
31. Nakamura, Y., Ogura, M., Tanaka, D., & Inagaki, N. (2008). Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. *Biochemical and biophysical research communications*, *366*(1), 174–179.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.122>
32. Nakagawa, T., Lomb, D. J., Haigis, M. C., & Guarente, L. (2009). SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*, *137*(3), 560–570.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.026>
33. Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., & Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, *26*(37), 5468–5476.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210614>

34. Li, Y., Shin, D., & Kwon, S. H. (2013). Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *The FEBS journal*, *280*(3), 775–793.  
<https://doi.org/10.1111/febs.12079>
35. Bertos, N. R., Gilquin, B., Chan, G. K., Yen, T. J., Khochbin, S., & Yang, X. J. (2004). Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *The Journal of biological chemistry*, *279*(46), 48246–48254.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M408583200>
36. de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal*, *370*(Pt 3), 737–749.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20021321>
37. Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M. P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., & Khochbin, S. (2000). Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Current biology : CB*, *10*(12), 747–749.  
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00542-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00542-x)
38. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., & Yao, T. P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, *417*(6887), 455–458.  
<https://doi.org/10.1038/417455a>
39. Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., & Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO journal*, *22*(5), 1168–1179.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg115>
40. Piperno, G., LeDizet, M., & Chang, X. J. (1987). Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *The Journal of cell biology*, *104*(2), 289–302.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.104.2.289>

41. Cabrero, J. R., Serrador, J. M., Barreiro, O., Mittelbrunn, M., Naranjo-Suárez, S., Martín-Cófreces, N., Vicente-Manzanares, M., Mazitschek, R., Bradner, J. E., Avila, J., Valenzuela-Fernández, A., & Sánchez-Madrid, F. (2006). Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Molecular biology of the cell*, *17*(8), 3435–3445.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0008>
42. Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H. L., Chua, K., Lombard, D., Mizeracki, A., Matthias, G., Alt, F. W., Khochbin, S., & Matthias, P. (2008). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Molecular and cellular biology*, *28*(5), 1688–1701.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.01154-06>
43. Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., & Schreiber, S. L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(8), 4389–4394.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0430973100>
44. Tran, A. D., Marmo, T. P., Salam, A. A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H. S., Mazitschek, R., Hubbert, C., Kawaguchi, Y., Sheetz, M. P., Yao, T. P., & Bulinski, J. C. (2007). HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *Journal of cell science*, *120*(Pt 8), 1469–1479.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.03431>
45. Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J. T., Yang, X. J., Dent, S. R., Yao, T. P., Lane, W. S., & Seto, E. (2007). HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Molecular cell*, *27*(2), 197–213.

- <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.033>
46. Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S., & Jurdic, P. (2005). A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *Journal of cell science*, *118*(Pt 13), 2901–2911.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.02425>
47. Grozinger, C. M., Hassig, C. A., & Schreiber, S. L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(9), 4868–4873.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4868>
48. Tokési, N., Lehotzky, A., Horváth, I., Szabó, B., Oláh, J., Lau, P., & Ovádi, J. (2010). TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6. *The Journal of biological chemistry*, *285*(23), 17896–17906.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096578>
49. Wang, R., Tan, J., Chen, T., Han, H., Tian, R., Tan, Y., Wu, Y., Cui, J., Chen, F., Li, J., Lv, L., Guan, X., Shang, S., Lu, J., & Zhang, Z. (2019). ATP13A2 facilitates HDAC6 recruitment to lysosome to promote autophagosome-lysosome fusion. *The Journal of cell biology*, *218*(1), 267–284.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.201804165>
50. Kang, H. J., Lee, M. H., Kang, H. L., Kim, S. H., Ahn, J. R., Na, H., Na, T. Y., Kim, Y. N., Seong, J. K., & Lee, M. O. (2014). Differential regulation of estrogen receptor  $\alpha$  expression in breast cancer cells by metastasis-associated protein 1. *Cancer research*, *74*(5), 1484–1494.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2020>
51. Olzmann, J. A., Li, L., Chudaeu, M. V., Chen, J., Perez, F. A., Palmiter, R. D., & Chin, L. S. (2007). Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *The Journal of cell biology*, *178*(6), 1025–1038.

- <https://doi.org/10.1083/jcb.200611128>
52. Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer letters*, 277(1), 8–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.016>
53. Butler, K. V., & Kozikowski, A. P. (2008). Chemical origins of isoform selectivity in histone deacetylase inhibitors. *Current pharmaceutical design*, 14(6), 505–528.  
<https://doi.org/10.2174/138161208783885353>
54. Dallavalle, S., Pisano, C., & Zunino, F. (2012). Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochemical pharmacology*, 84(6), 756–765.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.06.014>
55. Suzuki T. (2009). Explorative study on isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 57(9), 897–906.  
<https://doi.org/10.1248/cpb.57.897>
56. Roldán-Carmona, C., Malinkiewicz, O., Soriano, A., Espallargas, G. M., Garcia, A., Reinecke, P., Kroyer, T., Dar, I., Nazeeruddine, M. K., & Bolink, H., J. (2014). Flexible high efficiency perovskite solar cells. *Energy & Environmental Science*, 7(3), 994-997.  
<https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>
57. Uba, A. I., & Yelekçi, K. (2018). Pharmacophore-based virtual screening for identification of potential selective inhibitors of human histone deacetylase 6. *Computational biology and chemistry*, 77, 318–330.  
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.10.016>
58. Simoben, C. V., Robaa, D., Chakrabarti, A., Schmidtkunz, K., Marek, M., Lancelot, J., Kannan, S., Melesina, J., Shaik, T. B., Pierce, R. J., Romier, C., Jung, M., & Sippl, W. (2018). A Novel Class of Schistosoma mansoni Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibitors Identified by Structure-Based Virtual Screening and In Vitro Testing. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3), 566.

<https://doi.org/10.3390/molecules23030566>

59. Lechner, M., Scharinger, V. H., Steele, C. D., Nei, W. L., Ooft, M. L., Schreiber, L. M., Pipinikas, C. P., Chung, G. T., Chan, Y. Y., Wu, F., To, K. F., Tsang, C. M., Pearce, W., Morelli, D., Philpott, M., Masterson, L., Nibhani, R., Wells, G., Bell, C. G., Koller, J., ... Lund, V. J. (2021). Somatostatin receptor 2 expression in nasopharyngeal cancer is induced by Epstein Barr virus infection: impact on prognosis, imaging and therapy. *Nature communications*, *12*(1), 117.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20308-8>
60. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022–3027.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
61. Hua, G. J., Hung, C. L., Lin, C. Y., Wu, F. C., Chan, Y. W., & Tang, C. Y. (2017). MGUPGMA: A Fast UPGMA Algorithm With Multiple Graphics Processing Units Using NCCL. *Evolutionary bioinformatics online*, *13*, 1176934317734220.  
<https://doi.org/10.1177/1176934317734220>
62. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, *46*(W1), W296–W303.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
63. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, *31*(13), 3381–3385.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>
64. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular

- crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 1), 12–21.  
<https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
65. Zhou, H., & Zhou, Y. (2002). Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure selection and stability prediction. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 11(11), 2714–2726.  
<https://doi.org/10.1110/ps.0217002>
66. Roberts, E., Eargle, J., Wright, D., & Luthey-Schulten, Z. (2006). MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC bioinformatics*, 7, 382.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-382>
67. Hai, Y., & Christianson, D. W. (2016). Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nature chemical biology*, 12(9), 741–747.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2134>
68. Šudomová, M., Hassan, S., Khan, H., Rasekhian, M., & Nabavi, S. M. (2019). A Multi-Biochemical and In Silico Study on Anti-Enzymatic Actions of Pyroglutamic Acid against PDE-5, ACE, and Urease Using Various Analytical Techniques: Unexplored Pharmacological Properties and Cytotoxicity Evaluation. *Biomolecules*, 9(9), 392.  
<https://doi.org/10.3390/biom9090392>
69. Stierand, K., & Rarey, M. (2010). Drawing the PDB: Protein-Ligand Complexes in Two Dimensions. *ACS medicinal chemistry letters*, 1(9), 540–545.  
<https://doi.org/10.1021/ml100164p>
70. Bergner, A., Günther, J., Hendlich, M., Klebe, G., & Verdonk, M. (2001). Use of Relibase for retrieving complex three-dimensional interaction patterns including crystallographic packing effects. *Biopolymers*, 61(2), 99–110.

- [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001/2002\)61:2<99::AID-BIP10075>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001/2002)61:2<99::AID-BIP10075>3.0.CO;2-8)
71. Desaphy, J., Bret, G., Rognan, D., & Kellenberger, E. (2015). sc-PDB: a 3D-database of ligandable binding sites--10 years on. *Nucleic acids research*, *43*(Database issue), D399–D404.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gku928>
72. Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, *47*(W1), W636–W641.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
73. Damkliang, K., Tandayya, P., Sangket, U., & Pasomsub, E. (2016). Integrated Automatic Workflow for Phylogenetic Tree Analysis Using Public Access and Local Web Services. *Journal of integrative bioinformatics*, *13*(1), 287.  
<https://doi.org/10.2390/biecoll-jib-2016-287>
74. Mullan, L. J., & Bleasby, A. J. (2002). Short EMBOSS User Guide. European Molecular Biology Open Software Suite. *Briefings in bioinformatics*, *3*(1), 92–94.  
<https://doi.org/10.1093/bib/3.1.92>
75. Rajeswari, M., Santhi, N., & Bhuvaneshwari, V. (2014). Pharmacophore and Virtual Screening of JAK3 inhibitors. *Bioinformation*, *10*(3), 157–163.  
<https://doi.org/10.6026/97320630010157>
76. Kumar, B. K., Faheem, Sekhar, K., Ojha, R., Prajapati, V. K., Pai, A., & Murugesan, S. (2022). Pharmacophore based virtual screening, molecular docking, molecular dynamics and MM-GBSA approach for identification of prospective SARS-CoV-2 inhibitor from natural product databases. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, *40*(3), 1363–1386.  
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1824814>

- 77.Fan, F., Toledo Warshaviak, D., Hamadeh, H. K., & Dunn, R. T., 2nd (2019). The integration of pharmacophore-based 3D QSAR modeling and virtual screening in safety profiling: A case study to identify antagonistic activities against adenosine receptor, A2A, using 1,897 known drugs. *PLoS one*, *14*(1), e0204378.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204378>
- 78.Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, *7*, 42717.  
<https://doi.org/10.1038/srep42717>
- 79.Zoete, V., Cuendet, M. A., Grosdidier, A., & Michielin, O. (2011). SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of computational chemistry*, *32*(11), 2359–2368.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.21816>
- 80.Huang, J., & MacKerell, A. D., Jr (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *Journal of computational chemistry*, *34*(25), 2135–2145.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- 81.Abraham, M., J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J., C., Hess, B., Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, *2*(7), 19-25.  
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- 82.Lindahl, Abraham, Hess & van der Spoel (2020). GROMACS 2020 Manual (Version 2020). Zenodo.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3562512>
- 83.Al-Karmalawy, A. A., Dahab, M. A., Metwaly, A. M., Elhady, S. S., Elkaeed, E. B., Eissa, I. H., & Darwish, K. M. (2021). Molecular Docking and Dynamics Simulation Revealed the Potential Inhibitory Activity of

- ACEIs Against SARS-CoV-2 Targeting the hACE2 Receptor. *Frontiers in chemistry*, 9, 661230.  
<https://doi.org/10.3389/fchem.2021.661230>
84. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*, 65(3), 712–725.  
<https://doi.org/10.1002/prot.21123>
85. Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33–28.  
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
86. Boreak N. (2021). Small Molecule "Silmitasertib" Repurposed as Inhibitor of Transforming Growth Factor Beta 1 for the Development of Therapeutics for Oral Submucous Fibrosis. *BioMed research international*, 2021, 6631848.  
<https://doi.org/10.1155/2021/6631848>
87. Krogan, N. T., Hogan, K., & Long, J. A. (2012). APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in Arabidopsis by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. *Development (Cambridge, England)*, 139(22), 4180–4190.  
<https://doi.org/10.1242/dev.085407>
88. Ueda, M., Matsui, A., Tanaka, M., Nakamura, T., Abe, T., Sako, K., Sasaki, T., Kim, J. M., Ito, A., Nishino, N., Shimada, H., Yoshida, M., & Seki, M. (2017). The Distinct Roles of Class I and II RPD3-Like Histone Deacetylases in Salinity Stress Response. *Plant physiology*, 175(4), 1760–1773.  
<https://doi.org/10.1104/pp.17.01332>
89. Lee, H. G., & Seo, P. J. (2019). MYB96 recruits the HDA15 protein to suppress negative regulators of ABA signaling in Arabidopsis. *Nature communications*, 10(1), 1713.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09417-1>

90. Luo, M., Yu, C. W., Chen, F. F., Zhao, L., Tian, G., Liu, X., Cui, Y., Yang, J. Y., & Wu, K. (2012). Histone deacetylase HDA6 is functionally associated with AS1 in repression of KNOX genes in Arabidopsis. *PLoS genetics*, 8(12), e1003114.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003114>
91. Yu, C. W., Liu, X., Luo, M., Chen, C., Lin, X., Tian, G., Lu, Q., Cui, Y., & Wu, K. (2011). HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in Arabidopsis. *Plant physiology*, 156(1), 173–184.  
<https://doi.org/10.1104/pp.111.174417>
92. Luo, M., Tai, R., Yu, C. W., Yang, S., Chen, C. Y., Lin, W. D., Schmidt, W., & Wu, K. (2015). Regulation of flowering time by the histone deacetylase HDA5 in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 82(6), 925–936.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12868>
93. Xu, C. R., Liu, C., Wang, Y. L., Li, L. C., Chen, W. Q., Xu, Z. H., & Bai, S. N. (2005). Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the Arabidopsis root epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14469–14474.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503143102>
94. Liu, C., Li, L. C., Chen, W. Q., Chen, X., Xu, Z. H., & Bai, S. N. (2013). HDA18 affects cell fate in Arabidopsis root epidermis via histone acetylation at four kinase genes. *The Plant cell*, 25(1), 257–269.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.107045>
95. Liu, X., Chen, C. Y., Wang, K. C., Luo, M., Tai, R., Yuan, L., Zhao, M., Yang, S., Tian, G., Cui, Y., Hsieh, H. L., & Wu, K. (2013). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 associates with the histone deacetylase HDA15 in repression of chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in etiolated Arabidopsis seedlings. *The Plant cell*, 25(4), 1258–1273.

<https://doi.org/10.1105/tpc.113.109710>

96. Zhao, L., Peng, T., Chen, C. Y., Ji, R., Gu, D., Li, T., Zhang, D., Tu, Y. T., Wu, K., & Liu, X. (2019). HY5 Interacts with the Histone Deacetylase HDA15 to Repress Hypocotyl Cell Elongation in Photomorphogenesis. *Plant physiology*, *180*(3), 1450–1466.

<https://doi.org/10.1104/pp.19.00055>

97. Hollender, C., & Liu, Z. (2008). Histone deacetylase genes in Arabidopsis development. *Journal of integrative plant biology*, *50*(7), 875–885.

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00704.x>

98. Hook, S. S., Orian, A., Cowley, S. M., & Eisenman, R. N. (2002). Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(21), 13425–13430.

<https://doi.org/10.1073/pnas.172511699>

99. Tang, C., Du, Y., Liang, Q., Cheng, Z., & Jie Tian. (2019). A selenium-containing selective histone deacetylase 6 inhibitor for targeted in vivo breast tumor imaging and therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, *7*(9), 3528–3536.

<https://doi.org/10.1039/C9TB00383E>

## ДОДАТКИ

## Додаток 1.

Взаємодії між рецептором та 147 інгібіторами за результатами докінгу.

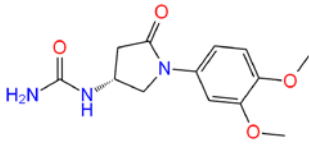
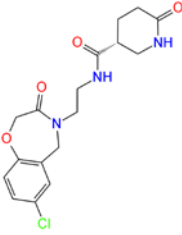
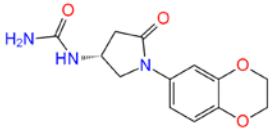
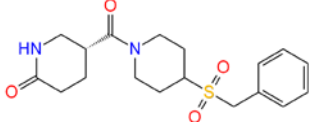
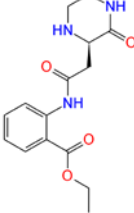
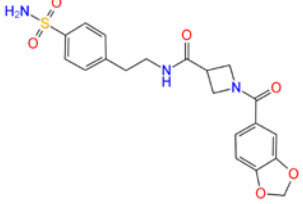
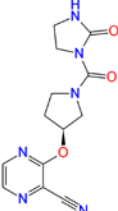
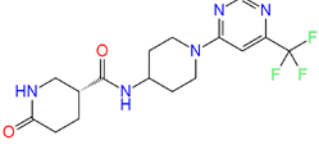
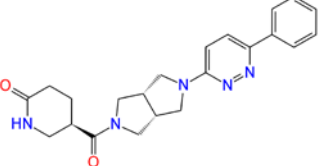
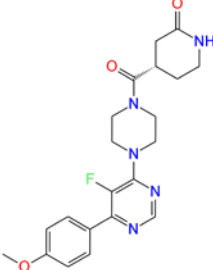
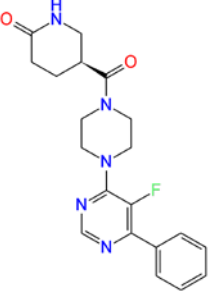
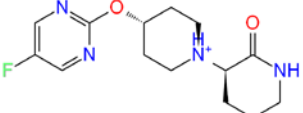
Амінокислотний залишок HDAC6	Тип зв'язку	Група ліганду
Asp497	Акцептор водневого зв'язку	-OH, -NH, NH <sub>2</sub>
	Соляний міст	З атомом нітрогену в NH <sup>+</sup> -групі
Ser498	Акцептор водневого зв'язку	-OH
His499	Акцептор водневого зв'язку	-NH
His500	Акцептор водневого зв'язку	-NH
Pro501	Акцептор водневого зв'язку	-NH
Ser563	Акцептор водневого зв'язку	-OH
Ser564	Акцептор водневого зв'язку	-OH, -NH
Asn565	Акцептор водневого зв'язку	-OH
Phe566	Акцептор водневого зв'язку	-NH
Asp567	Акцептор водневого зв'язку	-NH
Ser568	Акцептор водневого зв'язку	-NH, -OH
	Донор водневого зв'язку	Кетогрупа
Leu569	Донор водневого зв'язку	-OH
Tyr570	Донор водневого зв'язку	Кетогрупа, -OH
	Галогенний зв'язок	-Br
	Pi-Pi Stacked взаємодії	Ароматичні групи
His610	Акцептор водневого зв'язку	-OH
His611	Акцептор водневого зв'язку	-OH
Phe620	Pi-Pi Stacked взаємодії	Ароматичні групи
His651	Pi-cation взаємодії	-NH <sup>+</sup>
	Pi-Pi Stacked взаємодії	Ароматичні групи
	Галогенний зв'язок	-Br, -Cl
	Донор водневого зв'язку	Кетогрупа, -OH, =O <sup>-</sup> , атомом нітрогену біля подвійного або потрійного зв'язку

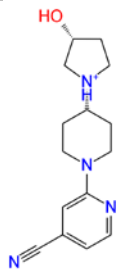
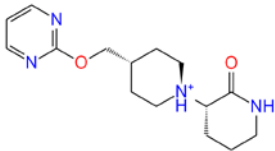
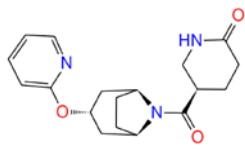
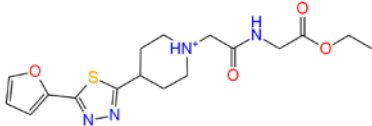
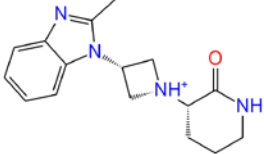
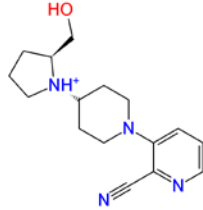
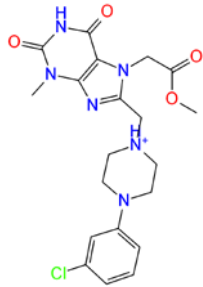
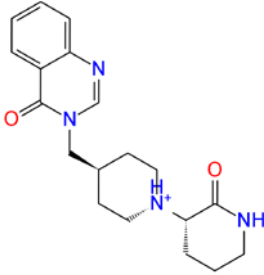
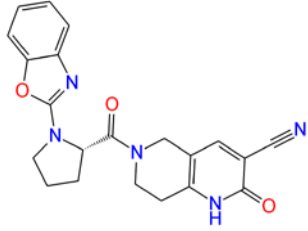
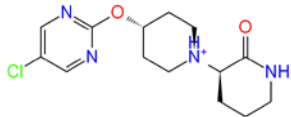
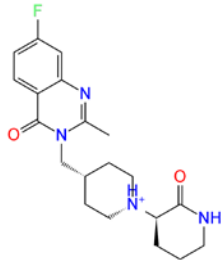
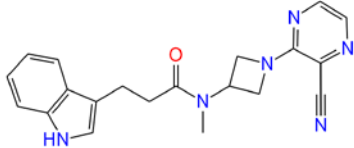
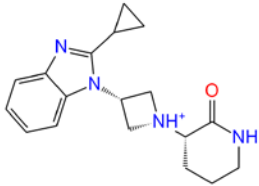
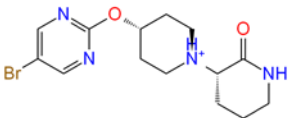
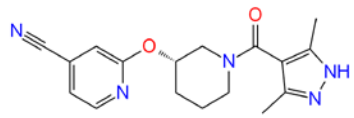
Arg673	Донор водневого зв'язку	Кетогрупа, -ОН, атомом нітрогену біля подвійного або потрійного зв'язку
	Соляний міст	-O <sup>-</sup>
Asp675	Акцептор водневого зв'язку	-ОН, -NH
Thr678	Акцептор водневого зв'язку	-ОН, -NH
Phe679	Pi-Pi Stacked взаємодії	Ароматичні групи
Phe680	Pi-Pi Stacked взаємодії	Ароматичні групи
	Донор водневого зв'язку	Кетогрупа, альдегідна група, -ОН
	Pi-cation взаємодії	-NH <sup>+</sup>
	Галогенний зв'язок	-Br
Pro681	Донор водневого зв'язку	-NH <sup>+</sup>
Gly683	Галогенний зв'язок	-Br
Arg709	Pi-cation взаємодії	Ароматичні групи
	Донор водневого зв'язку	Кетогрупа, -ОН, атомом нітрогену біля подвійного або потрійного зв'язку
	Соляний міст	-O <sup>-</sup>
	Галогенний зв'язок	-Cl
Pro748	Акцептор водневого зв'язку	-ОН, -NH
Leu749	Акцептор водневого зв'язку	-ОН, -NH
Gly751	Акцептор водневого зв'язку	-ОН
Tyr782	Акцептор водневого зв'язку	-ОН, -NH
Asn783	Донор водневого зв'язку	-ОН
Leu784	Донор водневого зв'язку	-ОН

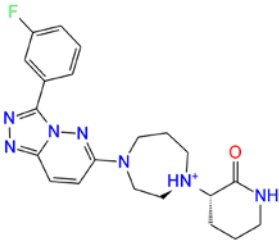
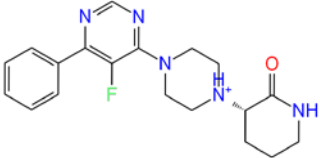
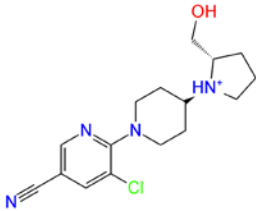
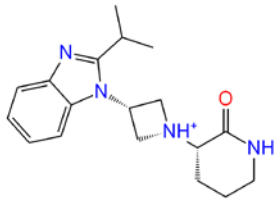
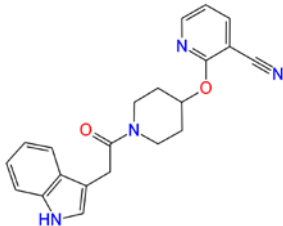
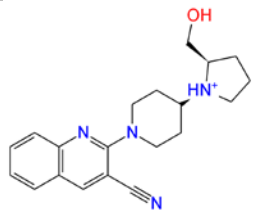
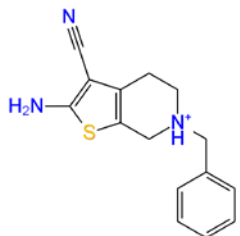
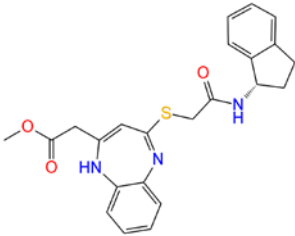
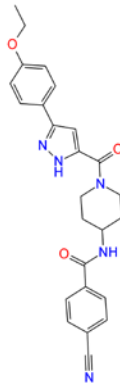
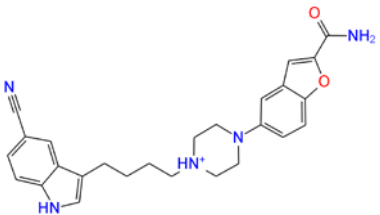
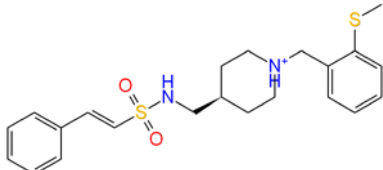
Іон Zn<sup>2+</sup> утворює координаційні зв'язки з кетогрупою.

## Додаток 2.

Сполуки потенційних інгібіторів, що відібрані за показником docking score та даними ADME/Tox, отримані при скринінгу фармакофornoї моделі за лігандом.

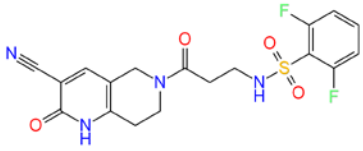
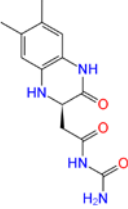
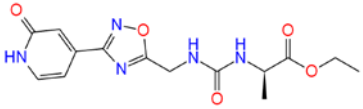
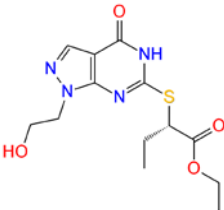
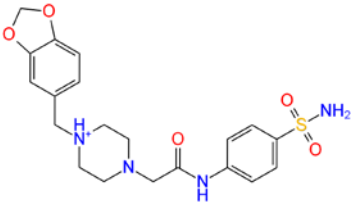
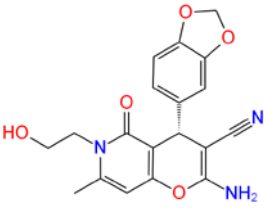
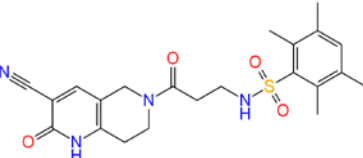
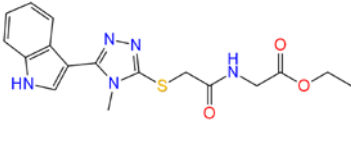
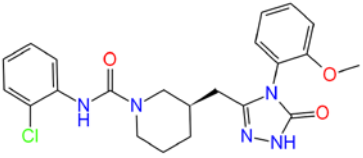
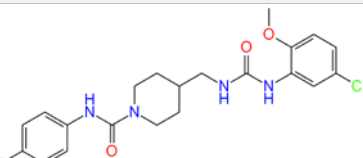
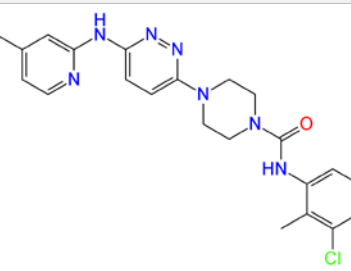
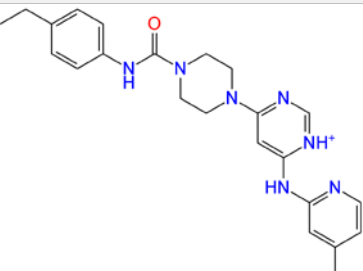
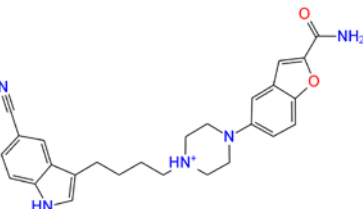
		
F2024-2640	F6559-7992	F2519-0134
		
F6561-5536	F3023-0458	F6125-2274
		
F6488-1034	F6559-6788	F6734-2579
		
F6726-4526	F6726-4270	F6608-2399

		
F6725-0308	F6749-0790	F6560-0369
		
F5496-1916	F6678-8883	F6725-0295
		
F0669-0686	F6670-4836	F6472-6337
		
F6608-2906	F6670-6689	F6675-8599
		
F6679-0217	F6608-2760	F6480-0362

		
F6726-0402	F6726-4357	F6725-0281
		
F6678-9355	F6359-1638	F6725-0288
		
F3110-2621	F3407-2800	F3406-7938
		
F0001-2418	F5017-2763	

## Додаток 3.

Сполуки потенційних інгібіторів, що відібрані за показником docking score та даними ADME/Tox, отримані при скринінгу фармакофornoї моделі за рецептором.

		
F6472-6140	F1312-0055	F6524-1452
		
F2207-0122	F0307-0509	F2673-0033
		
F6472-6141	F0653-0067	F6497-3432
		
F5033-7873	F5232-0086	F6363-0982
		
F0001-2418		

## Додаток 4.

Характеристика основних показників біодоступності потенційних інгібіторів за фармакофорною моделлю за лігандом.

Робочий індекс	LIPO (-0.7 – 5.0)	SIZE (150 – 500 g/mol)	POLAR (20 – 130 Å <sup>2</sup> )	INSOLU	INSATU (0.25 – 1)	FLEX (0 – 9)
<b>F2024-2640</b>	-0.26	279.29	93.89	Very soluble	0.38	5
<b>F6559-7992</b>	0.28	365.81	87.74	Soluble	0.47	5
<b>F2519-0134</b>	-0.49	277.28	93.89	Very soluble	0.38	3
<b>F6561-5536</b>	0.50	364.46	91.93	Soluble	0.56	5
<b>F3023-0458</b>	0.53	305.33	96.53	Very soluble	0.40	7
<b>F6125-2274</b>	0.77	431.46	136.41	Soluble	0.30	8
<b>F6488-1034</b>	-0.77	302.29	111.45	Very soluble	0.46	4
<b>F6559-6788</b>	0.80	371.36	87.22	Soluble	0.62	5
<b>F6734-2579</b>	0.87	391.47	78.43	Soluble	0.45	4
<b>F6726-4526</b>	1.01	413.45	87.66	Soluble	0.43	5
<b>F6726-4270</b>	1.04	383.42	78.43	Soluble	0.40	4
<b>F6608-2399</b>	1.07	295.33	68.55	Soluble	0.64	3
<b>F6725-0308</b>	1.13	273.35	64.59	Soluble	0.60	2
<b>F6749-0790</b>	1.16	291.37	68.55	Soluble	0.67	4
<b>F6560-0369</b>	1.18	329.39	71.53	Soluble	0.61	4
<b>F5496-1916</b>	1.38	379.45	127.00	Soluble	0.53	9
<b>F6678-8883</b>	1.49	285.36	51.36	Soluble	0.50	2
<b>F6725-0295</b>	1.49	287.38	64.59	Soluble	0.62	3
<b>F0669-0686</b>	1.50	447.90	106.66	Soluble	0.40	6
<b>F6670-4836</b>	1.54	341.43	68.43	Soluble	0.53	3
<b>F6472-6337</b>	1.57	389.41	106.23	Soluble	0.33	3
<b>F6608-2906</b>	1.60	311.79	68.55	Soluble	0.64	3
<b>F6670-6689</b>	1.63	373.44	68.43	Soluble	0.55	3
<b>F6675-8599</b>	1.64	360.41	88.91	Soluble	0.30	6
<b>F6679-0217</b>	1.66	311.40	51.36	Soluble	0.56	3
<b>F6608-2760</b>	1.66	356.24	68.55	Soluble	0.64	3
<b>F6480-0362</b>	1.68	325.37	94.90	Soluble	0.41	4
<b>F6726-0402</b>	1.99	410.47	79.86	Soluble	0.43	3
<b>F6726-4357</b>	2.10	356.42	62.56	Soluble	0.42	3
<b>F6725-0281</b>	2.12	321.83	64.59	Soluble	0.62	3
<b>F6678-9355</b>	2.25	313.42	51.36	Soluble	0.56	3
<b>F6359-1638</b>	2.46	360.41	82.01	Soluble	0.29	5

<b>F6725-0288</b>	3.18	337.44	64.59	Soluble	0.50	3
<b>F3110-2621</b>	2.49	270.37	82.49	Soluble	0.27	2
<b>F3407-2800</b>	2.86	421.51	105.09	Moderately soluble	0.26	8
<b>F3406-7938</b>	3.12	443.50	111.11	Moderately soluble	0.28	8
<b>F0001-2418</b>	3.57	442.53	103.49	Moderately soluble	0.31	7
<b>F5017-2763</b>	3.44	417.61	84.29	Moderately soluble	0.36	8

## Додаток 5.

Характеристика основних показників біодоступності потенційних інгібіторів за фармакофорною моделлю за рецептором.

Робочий індекс	LIPO (-0.7 – 5.0)	SIZE (150 – 500 g/mol)	POLAR (20 – 130 Å <sup>2</sup> )	INSOLU	INSATU (0.25 – 1)	FLEX (0 – 9)
<b>F6472-6140</b>	-0.18	422.41	131.51	Soluble	0.28	6
<b>F1312-0055</b>	0.66	276.29	113.32	Very soluble	0.31	4
<b>F6524-1452</b>	-0.70	335.32	139.21	Very soluble	0.36	9
<b>F2207-0122</b>	0.75	326.37	135.40	Soluble	0.54	8
<b>F0307-0509</b>	0.85	433.50	123.78	Soluble	0.35	7
<b>F2673-0033</b>	0.99	367.36	119.73	Soluble	0.26	3
<b>F6472-6141</b>	1.08	442.53	131.51	Soluble	0.41	6
<b>F0653-0067</b>	1.69	373.43	127.20	Soluble	0.29	9
<b>F6497-3432</b>	3.10	441.91	92.25	Moderately soluble	0.32	7
<b>F5033-7873</b>	3.26	434.89	82.70	Moderately soluble	0.33	9
<b>F5232-0086</b>	3.45	437.93	86.28	Moderately soluble	0.27	6
<b>F6363-0982</b>	3.62	418.51	87.53	Moderately soluble	0.30	7
<b>F0001-2418</b>	3.98	442.53	103.49	Moderately soluble	0.31	7
<b>F6472-6140</b>	-0.18	422.41	131.51	Soluble	0.28	6
<b>F1312-0055</b>	0.66	276.29	113.32	Very soluble	0.31	4

## Додаток 6.

Здатність до інгібування ізоформ цитохрому P450 сполуками,  
відібраними за фармакофорною моделлю за лігандом.

Робочий індекс	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor
F2024-2640	No	No	No	No	No
F6559-7992	No	No	No	No	No
F2519-0134	No	No	No	No	No
F6561-5536	No	No	No	No	No
F3023-0458	No	No	No	No	No
F6125-2274	No	No	No	No	Yes
F6488-1034	No	No	No	No	No
F6559-6788	No	No	No	No	No
F6734-2579	No	No	No	Yes	Yes
F6726-4526	No	No	No	Yes	Yes
F6726-4270	No	No	No	Yes	Yes
F6608-2399	No	No	No	No	No
F6725-0308	No	No	No	No	No
F6749-0790	No	No	No	No	No
F6560-0369	No	No	No	No	No
F5496-1916	No	No	No	No	No
F6678-8883	No	No	No	No	No
F6725-0295	No	No	No	No	No
F0669-0686	No	No	No	No	Yes
F6670-4836	No	No	No	No	No
F6472-6337	No	No	Yes	Yes	Yes
F6608-2906	No	No	No	No	No
F6670-6689	No	No	No	No	No
F6675-8599	No	Yes	Yes	Yes	Yes
F6679-0217	No	No	No	No	No
F6608-2760	No	No	No	No	No
F6480-0362	No	No	No	No	No
F6726-0402	Yes	No	No	No	Yes
F6726-4357	No	No	No	No	No
F6725-0281	No	No	No	No	No
F6678-9355	No	No	No	No	No
F6359-1638	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

<b>F6725-0288</b>	No	No	No	No	No
<b>F3110-2621</b>	No	No	Yes	No	No
<b>F3407-2800</b>	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>F3406-7938</b>	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>F0001-2418</b>	Yes	Yes	Yes	No	No
<b>F5017-2763</b>	No	Yes	Yes	No	Yes

## Додаток 7.

Здатність до інгібування ізоформ цитохрому Р450 сполуками,  
відібраними за фармакофорною моделлю за рецептором.

Робочий індекс	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor
F6472-6140	No	No	No	No	No
F1312-0055	No	No	No	No	No
F6524-1452	No	No	No	No	No
F2207-0122	No	No	No	No	No
F0307-0509	No	No	No	No	No
F2673-0033	No	No	No	No	No
F6472-6141	No	No	No	No	No
F0653-0067	No	No	No	No	Yes
F6497-3432	No	Yes	Yes	No	Yes
F5033-7873	No	Yes	Yes	Yes	Yes
F5232-0086	No	Yes	Yes	No	Yes
F6363-0982	No	No	Yes	Yes	Yes
F0001-2418	Yes	Yes	Yes	No	No
F6472-6140	No	No	No	No	No
F1312-0055	No	No	No	No	No