

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 “ ____ ” _____ 2023 р.

**ФОСФОСЕРИНФОСФАТАЗА SERB2 В ЯКОСТІ МІШЕНІ ДЛЯ
РОЗРОБКИ АНТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності
091 Біологія
ОП «Біоінформатика і структурна біологія»
Лисенка Андрія Сергійовича

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

Оцінка захисту роботи

Виконання роботи розпочато в рамках наукового проекту Національного фонду досліджень №0120U104883 та продовжено після його закінчення 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 – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Лисенко А.С. Фосфосеринфосфатаза SerB2 в якості мішені для розробки антитуберкульозних препаратів. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика і структурна біологія».

У даному дослідженні здійснюється пошук інгібіторів білка SerB2, який є фосфатазою НАД-родини та відіграє ключову роль у біосинтезі L-серину у бактерії туберкульозу. Головною метою дослідження є вивчення структури та функції білка SerB2 з метою розробки нових терапевтичних засобів проти туберкульозу. Використання методів молекулярного моделювання та докінгу, механіки та динаміки дозволили встановити особливості взаємодії та функціонування ферменту, а також ідентифікувати потенційні інгібітори SerB2, які можуть послужити основою для подальшої розробки протитуберкульозних препаратів.

Кваліфікаційна робота викладена на 38 сторінках, ілюстрована 1 таблицею та 12 рисунками. Список використаних джерел включає 31 роботу.

Ключові слова: фосфосеринфосфатаза SerB2, мікобактерія туберкульозу, галоакід-дегалогеназа НАД, докінг .

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Родина галоакід дегалогеназ НАD.....	8
1.2. Особливості просторової структури SerB2	8
1.3. Функції фосфосеринфосфатази SerB2.....	9
1.4. Мутації фосфосеринфосфатази SerB2.....	11
1.5. Відомі інгібітори фосфосеринфосфатази SerB2	13
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	16
2.1. Протокол та матеріали дослідження.....	16
2.2. Реконструкція 3D-моделей.....	17
2.3. Верифікація побудованих структурних моделей.....	17
2.4. Структурне вирівнювання моделей білка.....	17
2.5. Підготовка моделей.....	18
2.6. Прогнозування сайтів зв'язування.....	18
2.7. Генерація ґрид-карти.....	18
2.8. Підготовка лігандів.....	19
2.9. Молекулярний докінг.....	19
2.10. Обрахунок ADME дескрипторів.....	19
2.11. Побудова ліганд-білкових комплексів.....	20
2.12. Обчислювальні ресурси.....	20
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	21
3.1. Аналіз цільових білкових мішеней при лікуванні туберкульозу.....	21
3.2. Дослідження функціональних мотивів фосфосеринфосфатази SerB2 та пошук сайтів взаємодії з іншими молекулами на основі гомології сиквенсу.....	22
3.3. Реконструкція та верифікація просторової структури фосфосеринфосфатази SerB2.....	24

3.4. Пошук потенційних сайтів зв'язування “білок-ліганд” на поверхні фосфосеринфосфатази SerB2.....	28
3.5. Докінг та аналіз ADME дескрипторів.....	30
3.6. Побудова ліганд-білкових комплексів.....	32
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	35

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

HAD - родина білків галоакід дегалогеназ

PSP - домен, класична фосфатаза

ACT - регуляторний домен

SerB1 - фосфосеринфосфатаза 1

SerB2 - фосфосеринфосфатаза 2

THP-1- моноцитна лінія клітин людини

CFZ - Клофазамін

RMSD - середньоквадратичне відхилення

ВСТУП

Туберкульоз є поширеною причиною смерті від інфекційних захворювань по всьому світу. Приблизно одна чверть населення світу має латентну форму зараження, а одна з десяти людей хворіє на активний туберкульоз протягом свого життя. Крім того, 20% нових випадків туберкульозу є мультирезистентними до лікарських препаратів.

Мета цього дослідження полягає у виявленні нових інгібіторів, які спричиняють пригнічення ферментативної діяльності цільового білка, специфічного для мікобактерії туберкульозу. Це дослідження має на меті відповісти на актуальну потребу в розробці нових і ефективних методів лікування туберкульозу.

Об'єкт дослідження: фосфосеринфосфатаза SerB2.

Біосинтетичний шлях L-серину зберігається у всіх видів мікобактерій, що свідчить про те, що ферменти, які беруть в ньому участь є незамінними та необхідними для життєздатності та стійкості мікобактерій у господаря. SerB2 є необхідним білком і представляє нову мішень для розробки терапевтичних засобів з новими способами дії.

Основними кроками нашого дослідження є аналіз амінокислотних послідовностей мішені та реконструкція її просторової структури за допомогою множинного вирівнювання та молекулярного моделювання. Подальший пошук та аналіз вже відомих інгібіторів мішені, з використанням наукової літератури. Пошук активних сайтів мішені та аналіз взаємодії з потенційними інгібіторами за допомогою молекулярного докінгу, що може бути корисно при розробці нових таргетних лікарських засобів та дослідженні їх ефективності.

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

1. На основі аналізу родини фосфосеринфосфатаз виконати реконструкцію просторової структури SerB2.
2. Провести аналіз мономерної та димерної форми білка SerB2.
3. Встановити можливі сайти зв'язування на поверхні білка SerB2.
4. Провести молекулярний докінг бібліотеки хімічних сполук з SerB білком.
5. Провести фізико-хімічний аналіз відібраних потенційних інгібіторів фосфосеринфосфатази SerB2.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Родина галоакід дегалогеназ НАД

Родина ферментів галоакід дегалогеназ НАД, до якої відносяться білки фосфосеринфосфатази SerB, відіграє важливу роль у різних метаболічних процесах [1-9]. Мікобактерія туберкульозу містить два типи фосфосеринфосфатаз: SerB1 та SerB2, причому SerB2 є критичним для життєдіяльності патогена, на відміну від першого [10]. Ферменти з родини НАД характеризуються наявністю трьох специфічних мотивів: мотив I, DXDX(T/V); мотив II, (S/T)XX; і мотив III, KX18-30 (G/S) (D/S) XXX (D/N) [3],[11]. Ці ферменти потребують для своєї діяльності присутність дивалентних металів [12-13].

фосфосеринфосфатаза SerB2 - ключовий член біосинтетичного шляху L-серину, який каталізує останній етап, а саме перетворення фосфо-орто L-серину на L-серин. Проявляє специфічність до L-фосфосерину в порівнянні з іншими класичними фосфосериновими фосфатазами [10, 14-16].

1.2. Особливості просторової структури SerB2

Представник родини НАД, SerB1, містить класичний домен фосфосеринової фосфатази PSP, тоді як SerB2 є незвичайним, складається з двох доменів АСТ та класичного фосфатазного домену (**рисунок 1.1**). Домени АСТ є регуляторними доменами білків аспартат кінази і хоризмат мутази і розташовані в тандемі на N-кінці. Кожен домен АСТ складається з приблизно 70-80 амінокислот і має згорнуту форму $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$. Вони відрізняються наявністю інваріантного гліцинового залишку між листом $\beta 1$ і

спіраллю $\alpha 1$, який грає важливу роль у зв'язуванні низькомолекулярних сполук з доменом АСТ. У SerB2 важливі гліцини знаходяться в двох доменах АСТ: G18 та G108 відповідно [2, 17-19].

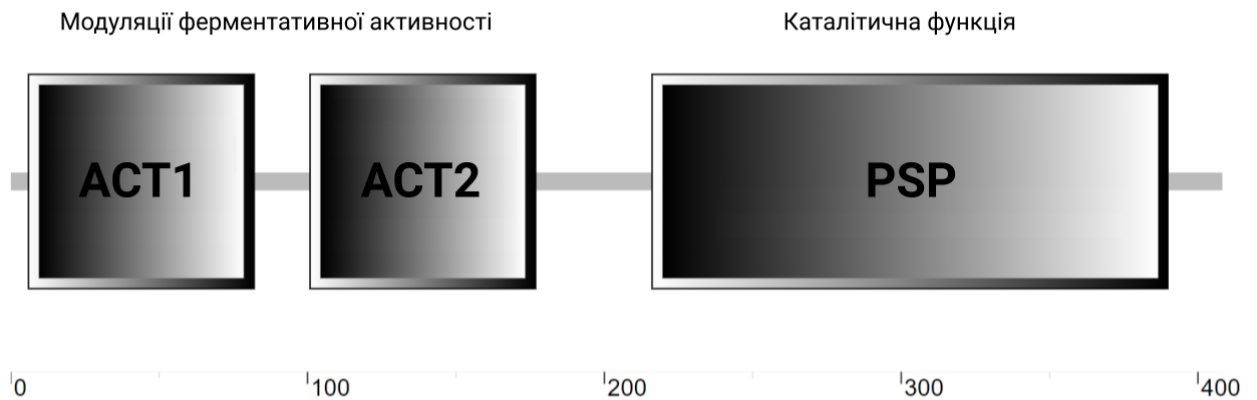


Рисунок 1.1 Схема доменної структури SerB2

Домен АСТ виконує функцію загального регуляторного елемента і відіграє роль у контролі метаболізму, транспорту розчинників та передачі сигналів. Домени АСТ взаємодіють у димері та, насправді, беруть участь у обміні доменами в олігомері. фосфосеринфосфатази SerB2 та SerB1 в цілому подібні на 24%, а їхні PSP-домени мають 29% схожості. В білку SerB2, залишки Asp185 (мотив I), Ser-273 (мотив II) та Lys-318 утворюють кишеню для зв'язування субстрату [1].

1.3. Функції фосфосеринфосфатази SerB2

Фосфосеринові фосфатази є ферментами, які каталізують гідроліз фосфатного ефіру з групою фосфату на О-фосфо-L (або D)-серині, звільняючи фосфат та L (або D)-серин [20].

Експериментальні дослідження показали, що SerB653, фермент, який присутній у *P. gingivalis* і має структурну схожість з SerB2, має важливу роль у процесі інвазії. Цей процес вимагає реорганізації мікрофіламентів і

мікротрубочок у епітеліальних клітинах. Було продемонстровано, що додавання екзогенного білка *P. gingivalis* SerB653 спричиняє перестановки мікротрубочок у HIGK-клітинах (іморталізованих гінгівальних кератиноцитах людини). Ці дослідження підтверджують, що *Porphyromonas gingivalis* SerB653 виступає як інвазивний фактор, здатний впливати на структурні зміни в клітинах [21].

Після інкубації з SerB2, клітини THP-1 проявляють вражаючу реорганізацію мікротрубочок на своїй поверхні. Виявлено, що АСТ-домени майже не спричиняють перегрупування мікротрубочок, в той час як PSP-домени викликає помітні зміни в розташуванні мікротрубочок, хоча ефект менший, ніж при дії повного ферменту SerB2. Це свідчить про те, що білок має нові функції, крім класичної фосфатазної активності [1].

Фермент SerB2 виявляє сильні фізичні взаємодії з кофіліном, актином, a/b тубуліном та cdc42. Додавання SerB2 спричиняє транзиторне дефосфорилування кофіліну, що призводить до деполімеризації та перестановки актинового цитоскелета. Неактивний мутант SerB2, який включає подвійну мутацію D341N / D345N, не здатний до дефосфорилування кофіліну і також не викликає перестановки цитоскелета, що свідчить про важливу роль SerB2 у цих процесах [22].

Ензим SerB2 взаємодіє специфічно з білками хазяїна HSP90, HSP70, HSP27, які блокують апоптотичні шляхи, але не з іншими HSP. Також SerB2 активно дефосфорилує з NF-каппа В p65 та MAPK p38, які відіграють важливу роль у запальних та імунних відповідях. Це в свою чергу призводить до зниження рівня інтерлейкіну 8, хемотактичного та запального цитокіну [23].

SerB2 високо специфічний для L-фосфосерину, порівняно зі субстратами, такими як L-фосфотирозин і L-фосфотреонін, а його активність модулюється АСТ-доменами. Відносна активність для L-фосфосерину становить 100%, тоді як для L-фосфотреоніну - лише приблизно 5%. Цей результат відрізняється від специфічності інших фосфосеринових фосфатаз,

наприклад, ферментів *Homo sapiens* та *Methanocaldococcus jannaschii*, які використовують всі фосфо-амінокислоти, такі як l-фосфосерин, l-фосфотирозин та l-фосфотреонін [1].

Експерименти на активність PSP-домену показали, що сам домен здатний гідролізувати L-фосфосерин, але з значно зменшеною ефективністю. Коефіцієнт обороту зменшується приблизно втричі, порівняно з повною довжиною ферменту.

L-фосфосерин має значно зменшену афінність до PSP-домену сам по собі, і більш високу афінність повної довжини SerB2 до сайтів на відповідних АСТ-доменах. АСТ-домени відіграють важливу роль у моделюванні активності SerB2 [1].

SerB2 є фосфатазою, яка залежить від присутності двовалентного йону металу, що є характерним для інших фосфатаз родини НАД. Вона проявляє високу активність близько до нейтрального рівня рН та фізіологічної температури [12-13].

Додавання натрій флуориду або ЕДТА до реакції фосфатази призводить до зниження активності ферменту. Отримані результати свідчать про те, що, подібно до гомологів у людини та *Methanococcus*, SerB2 залежить від присутності Mg^{2+} . Присутність Mg^{2+} ймовірно компенсує від'ємний заряд каталітичної кишені, яка містить три залишки Asp.

У фосфосеринової фосфатази людини інші металеві катіони, такі як Mn^{2+} і Co^{2+} , також діють як активатори. Однак, у випадку SerB2 всі перевірені двовалентні катіони, такі як Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} і Zn^{2+} , спричиняють його деактивацію [1].

Молекулярне докування та *in vitro* ферментативні аналізи з використанням очищених мутантних білків показали, що амінокислотні залишки Asp-185, Asp-187, Val-186, Ser-273, Lys-318, Glu-214 та Asp-341 є важливими для дефосфорилуючої активності SerB2 [1].

1.4. Мутації фосфосеринфосфатази SerB2

Фосфатази родини HAD мають наступні характеристики мотивів у своєму каталітичному сайті. Перший мотив (DXDX(T/V)) має висококонсервативний аспартат на першій позиції, який, ймовірно, бере участь у формуванні фосфоаспартатного проміжного продукту. Другий мотив, S/TXX, містить важливий залишок серину та треоніну, тоді як третій мотив, K-(X) 18-30-(G/S)(D/S)XXX(D/N), містить важливі залишки лізіна та аспартату [3, 11]. Деякі мутації цих залишків (D185, D187, S273, K318, D341 та D345) спричинили помірне зниження активності, тоді як інші, такі як D185N, D185N / D187N, S273A та D341N / D345N, практично повністю інактивували фермент [1, 24].

Амінокислота D341 приймає участь у зв'язуванні з субстратом. Залишок D185 відіграє критичну роль у формуванні фосфоензимного проміжного стану, адже мутант D185N повністю втрачає активність, тоді як мутація D187N зберігає її.

Присутність гідроксильної групи на S273, здається, особливо важлива, оскільки мутація S273A призводить до повної втрати гідролітичної активності. D341 у третьому мотиві відіграє головну роль у цьому процесі утворення фосфоензиму. Активність мутанта D345N зменшується на 40%, але не припиняється повністю. Однак подвійний мутант D341N / D345N стає неактивним [1].

Мутація Asp187 і Glu214 зменшила активність SerB2 на 50% порівняно з білком дикого типу, хоча мутація цих амінокислот не суттєво змінила складений стан цих мутантних білків. Це може бути пов'язане зі зміненою взаємодією мутантної форми з O-фосфо-L-серином [24].

Активна димерна популяція SerB2 переходить до тетрамера - неактивного олігомеру вищого порядку в присутності високої концентрації l-серину. Мутанти G18A та G108A не зв'язуються з l-серином і, відповідно, олігомерних переходів в присутності l-серину не спостерігається. З іншого

боку, мутант D341N каталітичного сайту проявляє перехід, хоча й слабший, що підтверджує той факт, що АСТ-домени відіграють важливу роль в олігомерному переході [1].

1.5. Відомі Інгібітори фосфосеринфосфатази SerB2

Натрію ванадат і оокадаїнова кислота відомі своєю сильною здатністю інгібувати фосфатази. Проте, в разі фермента SerB2 оокадаїнова кислота не може інгібувати фосфатазну активність. Амінокислоти, зокрема серин, переважно взаємодіють з сайтами на доменах АСТ, тоді як інші інгібітори, наприклад, натрію ванадат та натрію фторид, зв'язуються виключно з доменом PSP [1, 25].

При використанні L-фосфосерину як субстрату, відомі інгібітори впорядковуються за зменшенням потужності наступним чином: L-серин, Хлорпромазин, натрію ванадат, натрію фторид, L-AP3 (L-2-аміно-3-фосфонопропіонат), DL AP3 (DL-2-аміно-3-фосфонопропіонова кислота), α -гліцерофосфорилхолін, Фосфорилхолін. Хлорпромазин гідрохлорид, натрію ванадат та натрію фторид проявили здатність інгібувати PSP-домен [1, 25].

Певні амінокислоти можуть виступати як інгібітори, інші - як активатори, тоді як деякі не впливають на активність ферменту. Наприклад, Ser, Gly та Thr виявляють інгібуючу дію на фермент, тоді як Lys та Phe збільшують його активність. L-серин повинен зв'язуватися з усіма трьома доменами SerB2. Відзначається функціонально значущий зворотний зв'язок між олігомерним станом ферменту та його здатністю зв'язуватися з L-серином. Збільшення концентрації інгібітора спричиняє перехід білка в неактивну, більш високомолекулярну форму тетрамера [1].

Клоробіоцин та розанілін - дві хімічні сполуки, які відзначаються високим терапевтичним індексом (Ti), який перевищує 21 (визначається як

відношення значень TC50/MIC99). Для оцінки їх потенційної терапевтичної ефективності, проводилися дослідження з використанням рідких культур мікобактерій та інфікованих макрофагів. Встановлено, що обидві сполуки мають бактерицидну активність та здатні інгібувати ріст мікобактерій у інфікованих макрофагах, причому ці ефекти залежать від дози сполук [24].

Сполуки NSC693172 та NSC76027 проявили найвищу потужність серед десяти найефективніших інгібіторів фосфосеринфосфатази SerB2 у проведених *in vitro* тестах. Що стосується інгібіторів, які проявили найбільшу активність на клітинному рівні, то NSC227186 та NSC93739 були найефективнішими. Варто зазначити, що NSC93739 та NSC165701 виявилися неспецифічними інгібіторами PSP, які інгібували як HPSP, так і SerB2. Залишаючись в межах дослідження, сполуки NSC227186, NSC71948, NSC76027 та NSC305798 виявилися високо специфічними відносно ферменту SerB2, у порівнянні з HPSP [24].

Залишки Lys-361 і Arg-365 ферменту SerB2 взаємодіють з клоробіоцином через формування водневих зв'язків, а залишки Asp187 і Glu197 були у близькому контакті (відстань 2.2 і 2.8 Å відповідно) з клоробіоцином. Молекулярні докінг-дослідження показали, що NSC71948, NSC93739, NSC76027, NSC305798 та NSC165701 також можуть взаємодіяти з критичними залишками Asp341 та Asp187 білка SerB2. Незважаючи на відсутність структурних схожостей серед цих основних попадань, ці сполуки мають структурні особливості, які добре вписуються в модельований білок SerB2. Амінокислотні залишки Asp20, Asp22, Asp179 та Ala71 фермента HPSP аналогічно можуть взаємодіяти з розаніліном через утворення водневих зв'язків [24].

Останні дослідження передбачили, що клофазамін (CFZ) взаємодіє з PSP-доменом SerB2 та, зокрема, з важливими каталітичними залишками D185, D187, D341, D345 та GLU194 відповідно. Амінокислотні залишки Asp, що знаходяться в каталітичній щілині PSP-домену, специфічно беруть участь у гідролізі фосфату з L-фосфосерину. Виявлено, що CFZ інгібує фосфатазну

активність SerB2 приблизно на 50%. Неактивний мутант SerB2 D341N/D345N не проявляв взаємодію з CFZ, що підтверджує зв'язок лікарського засобу з активним сайтом, як передбачалося. В присутності CFZ SerB2 втрачає здатність взаємодіяти з HSP70, NF-каппа В р65, актином та кофіліном. Крім того, цитоскелетні перестановки в лініях клітин THP-1, які спостерігалися при екзогенному додаванні SerB2, були інгібовані [24].

Останні результати свідчать про те, що можливо інгібувати активність білка за допомогою дизайну інгібіторів, які специфічно зв'язуються з доменами АСТ, а не просто з PSP-доменом [24].

Деякі інгібітори проявляли високу специфічність у відношенні до інгібування ферменту SerB2 порівняно з ферментом HPSP, тому що, незважаючи на наявність гомолога у людини, існують незначні відмінності між вторинними структурами цих двох ферментів. Ці відмінності можуть бути подальше досліджені та використані для виявлення інгібіторів з вищою потужністю та специфічністю до ферменту SerB2 [24].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Протокол та матеріали дослідження

Виконання роботи розпочато в рамках наукового проекту Національного фонду досліджень №0120U104883 "Створення нових ефективних інгібіторів формування Z-кільця з метою отримання нових протитуберкульозних препаратів з антимітотичною дією" та продовжено після його закінчення. Проект був спрямований на широкомасштабне дослідження різних функцій мікроорганізмів та можливостей їхнього пригнічення з метою пошуку нових інгібіторів *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*.

Дослідження включає аналіз білково-білкових взаємодій, встановлення ряду ключових мішеней лікування туберкульозу, огляд родини галоакід-дегалогеназ HAD, обґрунтування вибору мішені фосфосеринфосфатази SerB2, враховуючи її ферментативну активність та незамінність для мікобактерії туберкульозу; реконструкцію просторової структури, оцінку якості моделей і порівняння шляхом структурного вирівнювання; підготовку білка і прогнозування сайту зв'язування з подальшим докінгом і порівнянням результатів, отриманих за трьома різними моделями; моделювання взаємодії хітів в активному сайті.

Для аналізу цільового білка було використано ряд біоінформаційних та структурно-біологічних баз даних (зокрема UniprotKB і PDB), он-лайн інструментів (SMART, Molprobit, Alphafold та I-Tasser) та ряду програмних пакетів (Schrödinger і PyMol).

Для пошуку можливих сайтів зв'язування селективних інгібіторів з фосфосеринфосфатазою SerB2 в роботі було використано реконструйовані

тривимірні моделі двох мономерів та димеру білка (описано в розділі, присвяченому моделюванню просторової структури).

2.2. Реконструкція 3D-моделей

Амінокислотну послідовність було отримано з бази даних UniProtKB (<https://www.uniprot.org>). Було проаналізовано існуючу модель банку PDB (<https://www.rcsb.org/>) і вирішено проводити згортку, використовуючи різні сервіси.

Реконструкцію просторової структури каталітичних субодиниць фосфосеринфосфатази SerB2 здійснювали за допомогою методів гомологічного моделювання в автоматичному режимі з використанням сервісів AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) [26] та I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), який використовує фрагменти еспериментальних результатів різних структурно схожих білків [27].

2.3. Верифікація побудованих структурних моделей

Остаточну верифікацію моделей виконували на підставі значень середньоквадратичних відхилень між атомами моделей, даних карт Рамачандрана, за оцінкою серверу MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), що включали в себе показники:

- відсоток некоректних ротамерів (%),
- відсоток відхилення або збігів (%),
- загальний рейтинг згідно серверу MolProbity,
- відсоток амінокислот, що утворюють некоректні зв'язки (%),
- відсоток амінокислот, що утворюють некоректні кути (%) [28].

2.4. Структурне вирівнювання моделей білка

Структурне вирівнювання реконструйованих моделей мономеру та димеру білка та аналіз відмінностей проводилося за допомогою модуля Alignment програмного забезпечення PyMol (<https://pymol.org/2/>) [29].

2.5. Підготовка моделей

Підготовка моделей ферменту проводилася за допомогою модуля Protein Preparation Wizard програмного забезпечення Schrödinger (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”). Білок було підготовлено з заміною атомів водню, оптимізацією геометрії та мінімізацією енергії з використанням силового поля OPLS3e (Optimized Potentials for Liquid Simulations) [30].

2.6. Прогнозування сайтів зв'язування

Аналіз імовірних сайтів зв'язування потенційних інгібіторів з моделями досліджуваного білка було виконано за допомогою модуля SiteMap програмного забезпечення Schrödinger. Ідентифікація сайтів відбувалася з пошуком мінімум 15 точок для кожного з 5 сайтів.

2.7. Генерація грід-карти

Грід-карту для обраного сайту було згенеровано за допомогою модуля Receptor Grid Generation програмного забезпечення Schrödinger. Рецепторна сітка була створена на основі відомих взаємодій в активному сайті. Розмір комірки сайту варіювався від 10Å до 25Å для різних моделей.

2.8. Підготовка лігандів

Як базу для докінгу було використано відкриті бібліотеки – ChEMBL, ZINC та корпоративні бібліотеки сполук, зокрема Науково-виробничих підприємства “І.Ф.ЛАБ”.

Оптимізація геометрії, мінімізація енергії та підготовка речовин для подальшого молекулярного докінгу була виконана з використанням за допомогою силового поля OPLS3e (Optimized Potentials for Liquid Simulations) в модулі Ligprep.

2.9. Молекулярний докінг

Докінг проводився в режимі SP (Standard precision) за допомогою модуля Glide програмного забезпечення Schrödinger. В ході молекулярного докінгу враховувалась наявність водневих зв'язків, що відіграють ключову роль у формуванні просторових структур макромолекул, а також в утворенні їх зв'язків з низькомолекулярними речовинами.

2.10. Обрахунок ADME дескрипторів

Бібліотеки сполук були проаналізовані за допомогою модуля QikProp програмного забезпечення Schrödinger. Кінцевий перелік інгібіторів було отримано в результаті відбору хімічних речовин, що мають показники ADME дескрипторів в рекомендованих межах [31].

2.11. Побудова ліганд-білкових комплексів

Схеми ліганд-білкових взаємодій було змодельовано за допомогою модуля Ligand Interaction Diagram програмного забезпечення Schrödinger .

2.12. Обчислювальні ресурси

Поставлені завдання були виконані на хмарних ресурсах цитованих у матеріалах і методах сервісах, а також з використанням потужностей Грід-кластеру Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України та віртуальної організації CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid>). Грід-кластер CSLabGrid складається з дев'яти серверів DellPowerEdge 1850 і одного серверу HP ProLiant AV340A (сукупно 72 ядра) та дискового масиву (включно NAS Dell PowerEdge 1800) загальним обсягом 12 TB.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз цільових білкових мішеней при лікуванні туберкульозу

Туберкульоз є добре відомим бактеріальним інфекційним захворюванням, яке поступово набуло всіх ознак соціального статусу як в Україні, так і в усьому світі. З фармакологічної точки зору одним з найкращих підходів є ідентифікація та розробка нових інгібіторів, спрямованих на унікальні білки роду *Mycobacterium*. Такі молекулярні цілі, що є необхідними та консервативними для генію мікобактерій, не мають явних гомологів у людини та тварин, тому очікується обмежені побічні токсичні ефекти для пацієнтів.

В результаті аналізу білково-білкових взаємодій було встановлено ряд ключових мішеней лікування туберкульозу. Аналіз взаємозв'язків та функціональний аналіз відомих білкових мішеней, які вже використовуються у звітних методах лікування туберкульозу наведено на **рисунку 3.1**.

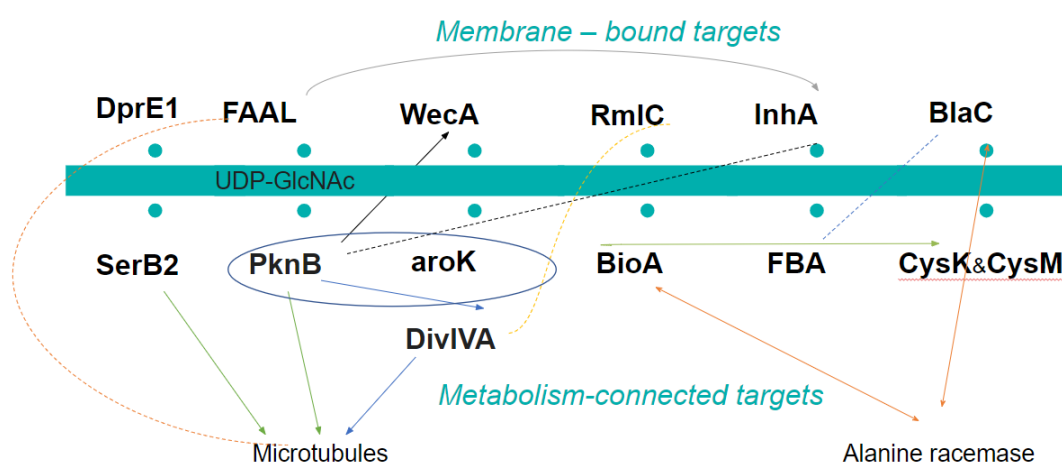


Рисунок 3.1 Результати аналізу білок-білкових взаємодій відомих білкових мішеней, які вже використовуються у світових дослідженнях по лікуванню туберкульозу людини

Зокрема на основі аналізу літератури, патентного пошуку та пошуку за гомологією сиквенсу було встановлено, що фосфосеринфосфатаза SerB2 утворює зв'язки з CysM, GlyA1, GlyA2, SerC, SdaA, а також, що не менш важливо, асоційована з роботою мікротрубочок, що робить її перспективною мішенню для нашого дослідження.

3.2. Дослідження функціональних мотивів фосфосеринфосфатази SerB2 та пошук сайтів взаємодії з іншими молекулами на основі гомології сиквенсу

На основі аналізу доменної архітектури було встановлено, що білок SerB2 включає два домени АСТ, розташовані в тандемі на N-терміналі, після класичного фосфатазного домену PSP. Сам PSP-домен теж проявляє здатність гідролізувати L-фосфосерин, проте з меншою ефективністю.

Домени АСТ відіграють важливу роль у зв'язуванні з амінокислотами та моделюванні ферментативної активності. Кожен з доменів АСТ має структурну конформацію, що складається з $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$, і складається приблизно з 70–80 амінокислот. Характерною особливістю цих доменів є наявність інваріантного гліцинового залишку, розташованого на повороті між β_1 -стрункою та α_1 -спіраллю. Цей гліцин важливий для зв'язування низькомолекулярних сполук з доменом АСТ. В доменах АСТ білка SerB2, важливими гліцинами є Gly18 та Gly108 [2, 17-19]. За даними літератури саме зв'язуючись з доменами АСТ, просто амінокислоти мають різний вплив на активність ферменту: L-серин і L-гліцин діють як інгібітори, тоді як L-лізин, L-тирозин і L-фенілаланін є активаторами.

На **рисунку 3.2** зображені ключові гарно описані функціональні домени ферменту і встановлені нами функціональні амінокислотні залишки важливі для ферментативної активності фосфосеринфосфатази SerB2, які

були використані для профільного вирівнювання та подальшого аналізу потенційних сайтів на поверхні ферменту.

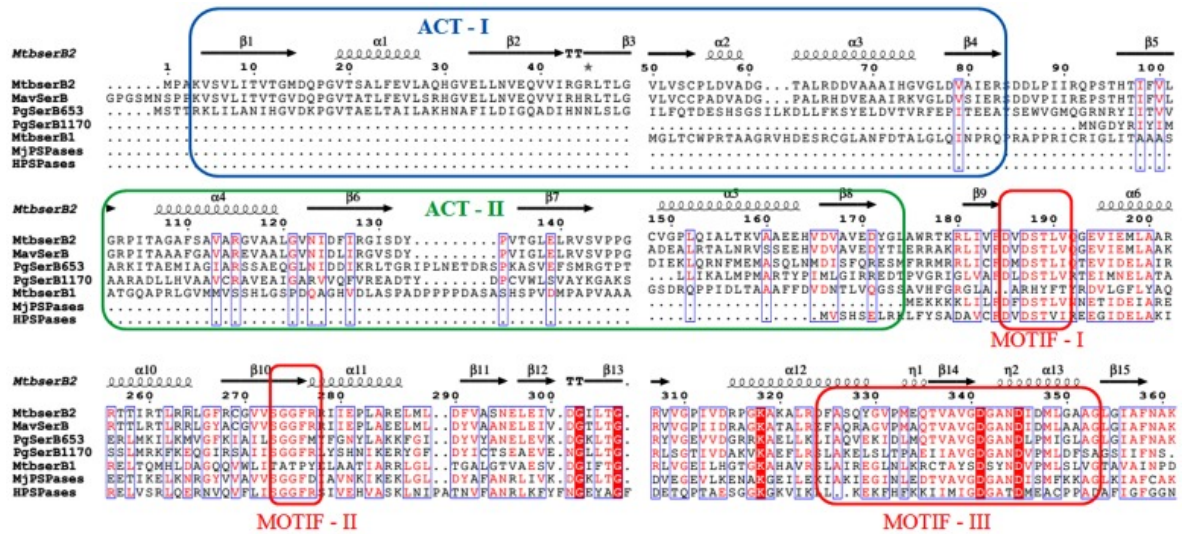


Рисунок 3.2 Аналіз даних доменної архітектури за даними літератури (А) [1] та амінокислотна послідовність із зазначеними функціональними залишками, які беруть участь у формуванні важливих взаємодій (Б)

Для білка SerB2, залишки Asp185 (у мотиві I), Ser273 (у мотиві II) та Lys318 утворюють кишеню, яка є сайтом взаємодії з субстратом. Залишок Asp185 має критичне значення у формуванні фосфоензимного проміжного стану. Крім того, амінокислотні залишки Asp185, Asp187, Val186, Ser273, Lys318, Glu214 та Asp341 є важливими для дефосфорилуючої активності

білка SerB2. Зокрема, залишок Asp341, що розташований у третьому мотиві, відіграє головну роль у процесі формування фосфоензиму [1-2].

Каталітична щілина PSP-домену пов'язана з важливими амінокислотними залишками, такими як Asp185, Asp187, Asp341, Asp345 та Glu194. Ці Asp залишки, розташовані в каталітичній щілині PSP-домену, специфічно беруть участь у гідролізі фосфату з L-фосфосерину. Залишки Lys361 і Arg365 можуть взаємодіяти шляхом формування водневих зв'язків. Особливо важлива є присутність гідроксильної групи на Ser 273 для забезпечення гідролітичної активності [1-2].

3.3. Реконструкція та верифікація просторової структури фосфосеринфосфатази SerB2

Білок SerB2 у формі мономеру, що складається з 409 амінокислотних залишків було реконструйовано за допомогою сервісів Alphafold та I-Tasser та у формі димеру в Alphafold використовуючи додаткові налаштування сервісів.

Якість реконструйованих структур було оцінено на сервері MolProbity та обрано більш вигідні моделі мономеру та димеру для подальшого докінгу. Перед оцінкою були додані атоми водню та оцінена правильність орієнтації залишків Asn, Gln та His. Після додавання атомів водню та виправлення положення атомів залишків (A 73 HIS, A 248 GLN, A 344 ASN, A 359 ASN для мономеру та відповідних амінокислот димеру) було оцінено якість структур. Clashscore всіх атомів становила 2.78 для моделі I-Tasser, що вказує на гарну якість реконструйованої структури. Моделі Alphafold загалом мали хороші показники і незначні відхилення в кутах і зв'язках. Гомодимер мав кращі показники, ніж мономер. На карті Рамачандрана (**Рисунок 3.3**) фінальна структура димеру має такі показники: 97.8% (796/814) всіх залишків перебувають в бажаних (98%) областях; 99.9% (813/814) всіх залишків

перебувають в дозволених ($> 99.8\%$) областях. Відмічено 1 outliers (phi, psi):
В 399 Cys (90.8, 21.6).

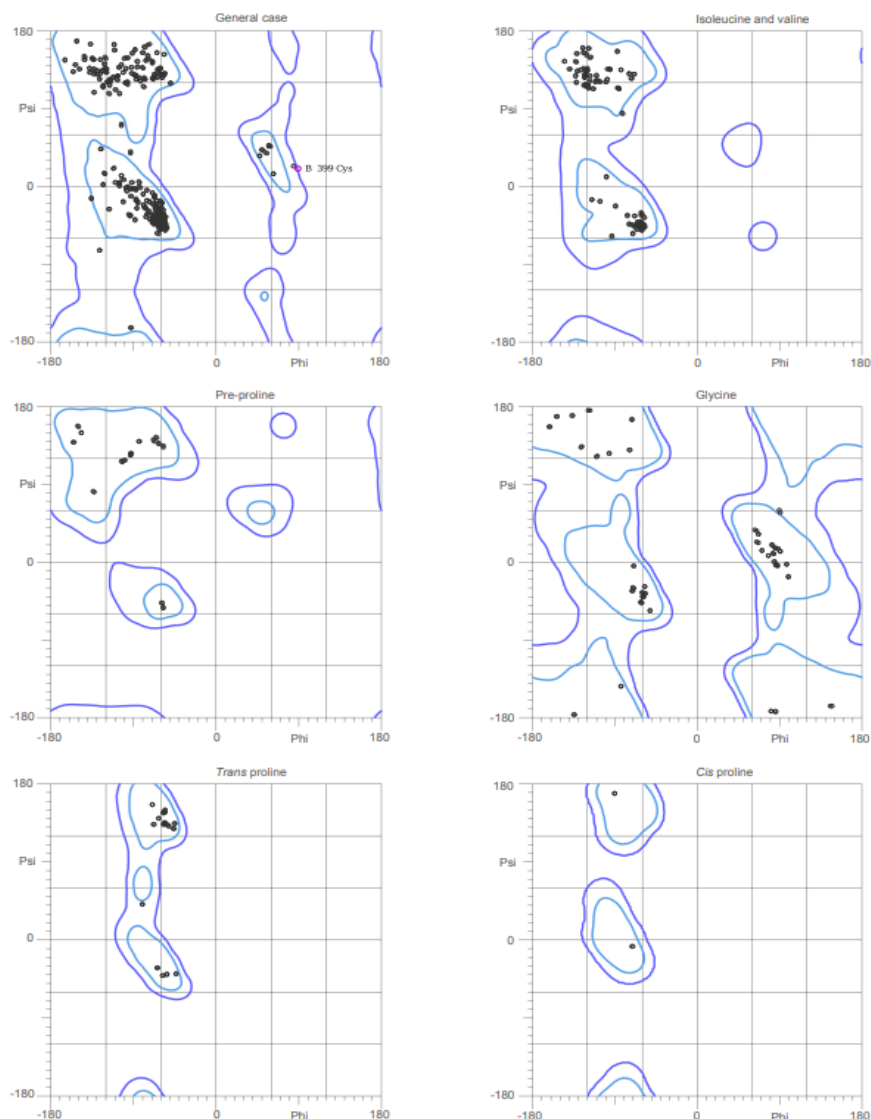


Рисунок 3.3 Карта Рамачандрана реконструйованої структури
гомодимеру

Для мономеру AlphaFold: 97.1% (395/407) всіх залишків перебувають в бажаних (98%) областях; 99.5% (405/407) всіх залишків перебувають в дозволених ($> 99,8\%$) областях (**Рисунок 3.4**). Відмічені зауваження кутів (phi, psi) для наступних амінокислот: 401 Val (29.8, 136.4), 403 Arg (-13.5, 119.3). Результати первинних етапів верифікації додатково свідчать про кращу якість отриманої моделі гомодимеру в порівнянні з мономером.

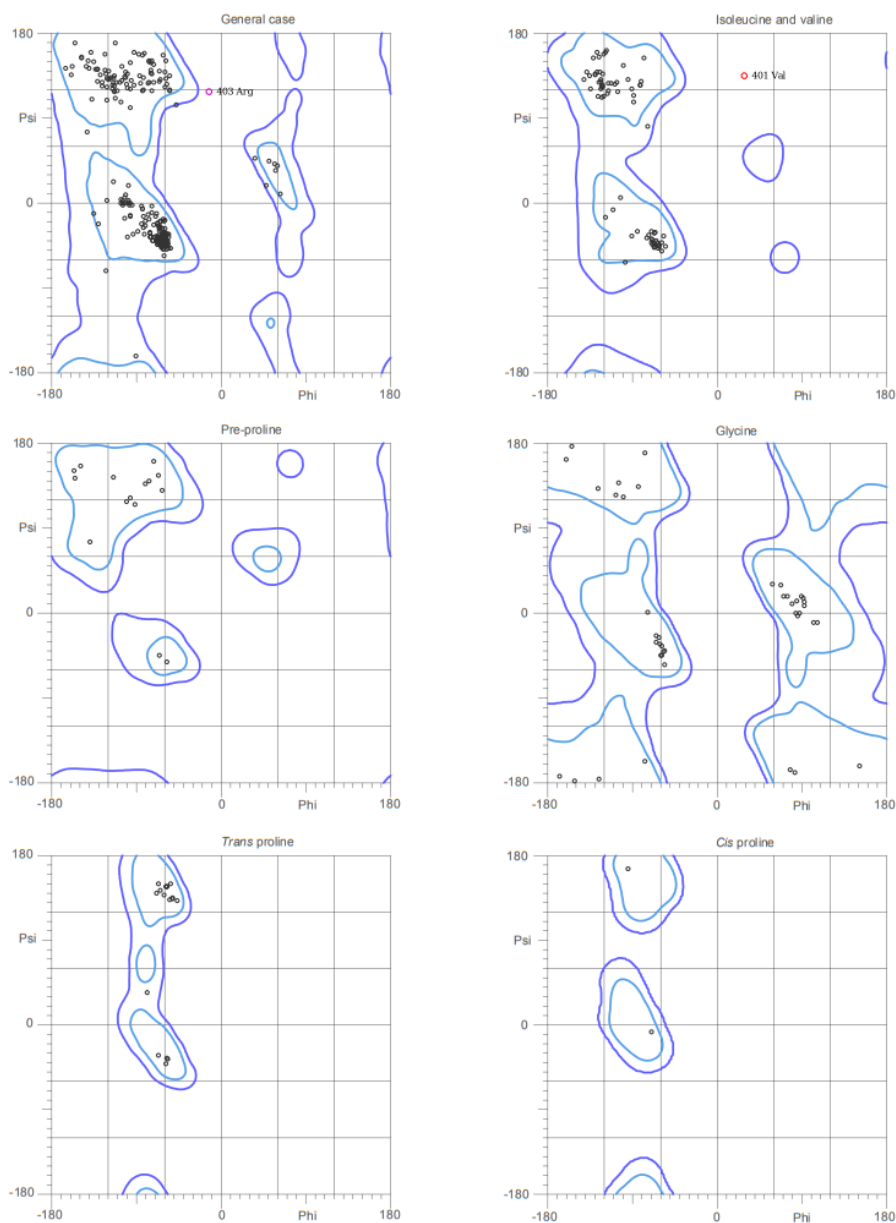


Рисунок 3.4 Карта Рамачандрана реконструйованої структури мономеру AlphaFold

Процес порівняння моделей білка у формі мономеру та димеру був виконаний за допомогою парного просторового вирівнювання та виявив незначні, але функціонально цікаві відмінності в їх структурах, включаючи важливу область активного сайту (**Рисунок 3.5**). Аналіз найближчих гомологів різного походження свідчить про консервативність лише домену PSP, саме тому порівняння обмежено тільки реконструйованим на основі методів гомологічного та математичного моделювання.

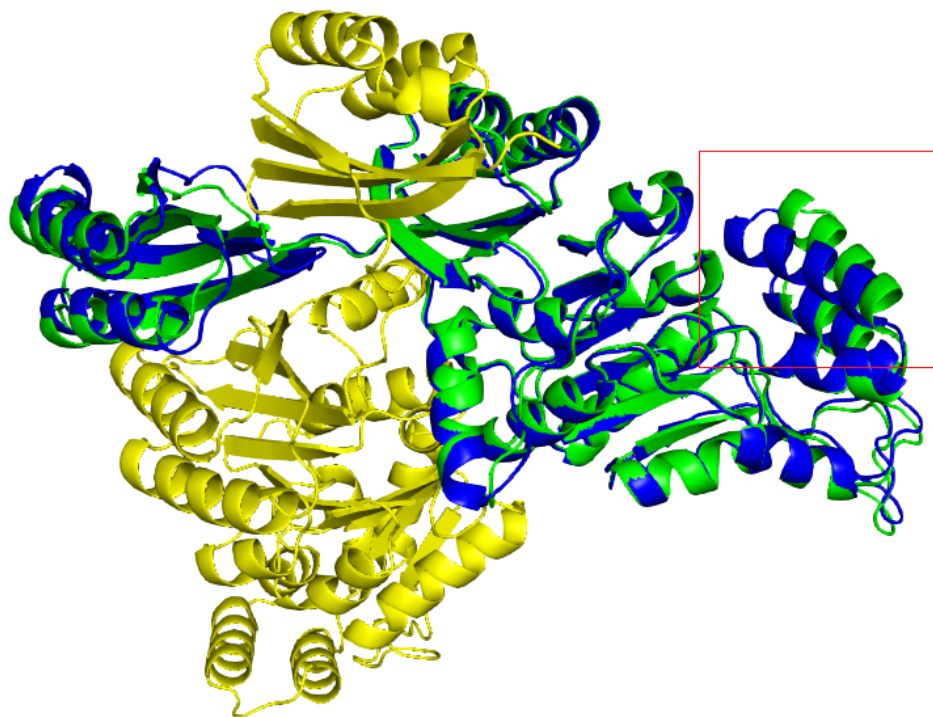


Рисунок 3.5 Просторове вирівнювання структури мономеру та димеру SerB2 (зелений - димер, синій - мономер)

Розрахунки показали, що значення RMSD для порівняння мономерних моделей, отриманих з AlphaFold та I-Tasser, становить 0.553. Однак, коли порівнювався мономер з димером, отриманим з AlphaFold, RMSD збільшилося до 0.700, що свідчить про більш виражені просторові відхилення в структурі димера в порівнянні з мономером. Особливу увагу привертає альфа-спіраль, яка прилягає до активного сайту в структурі димера. Ця спіраль помітно зміщена у димера, що може впливати на доступність та взаємодію з активним сайтом. Структурні порівняння показують, що домени АСТ демонструють широкі взаємодії в димері. Відмінності потенційно можуть пояснювати підвищену активність гомодимера порівняно з мономером, проте рухливість макромолекулярного комплексу ферменту потребує подальшого вивчення. Варто зазначити, що описані в літературі три зв'язувальні кишені, розташовані в доменах АСТІ, АСТІІ та PSP відповідно знаходяться в консервативних регіонах, отже наступні дослідження будуть будуватись на цьому передбаченні.

3.4. Пошук потенційних сайтів зв'язування “білок-ліганд” на поверхні фосфосеринфосфатази SerB2

Після оптимізації та оцінки якості моделей білку, усі три було піддано підготовці, мапуванню та пошуку сайтів зв'язування за допомогою програмного пакету Schrodinger. Для цього було використано один з компонентів програмного забезпечення - SiteMap, який дозволяє моделювати взаємодію лігандів з білками та передбачити енергетично вигідні кишені на поверхні. Під час процесу пошуку були враховані різні параметри, такі як розмір сітки, розмір боксу та тип пошуку. Після завершення мапування, для кожної моделі виявили по 5 сайтів зв'язування, які були проаналізовані за місцем розташування та показниками оціночних функцій (**Рисунки 3.6 та 3.7**).

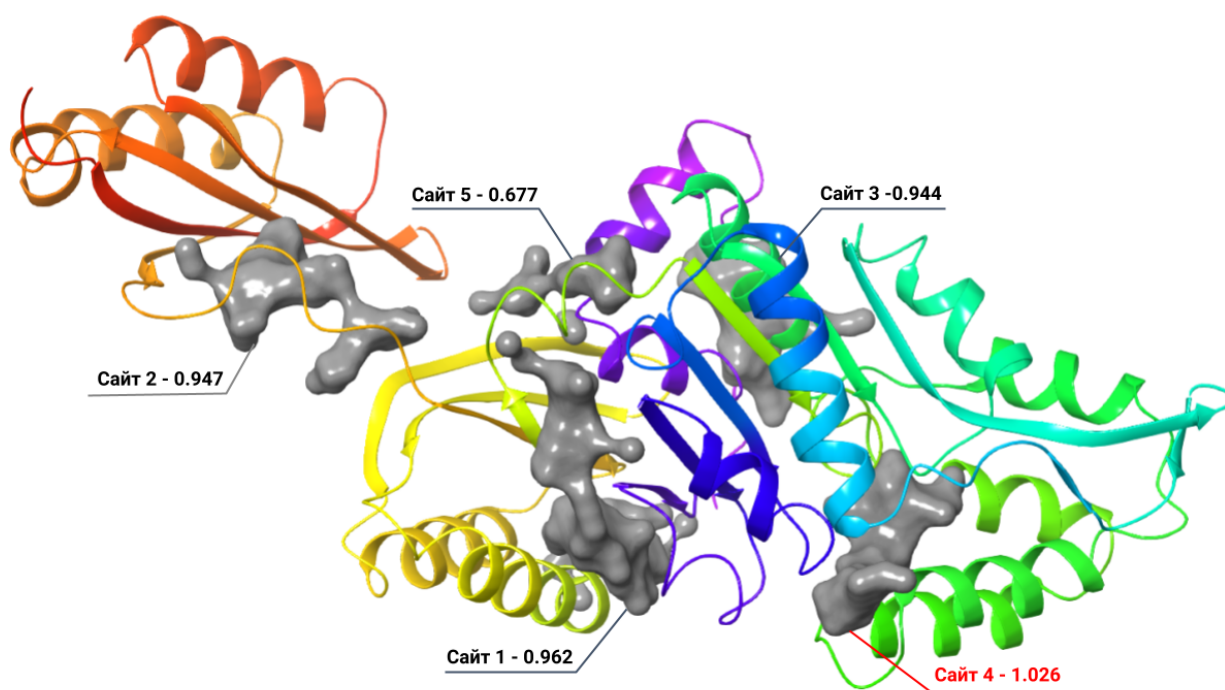


Рисунок 3.6 П'ять сайтів зв'язування і їхні site score, знайдених для моделі мономеру SerB2

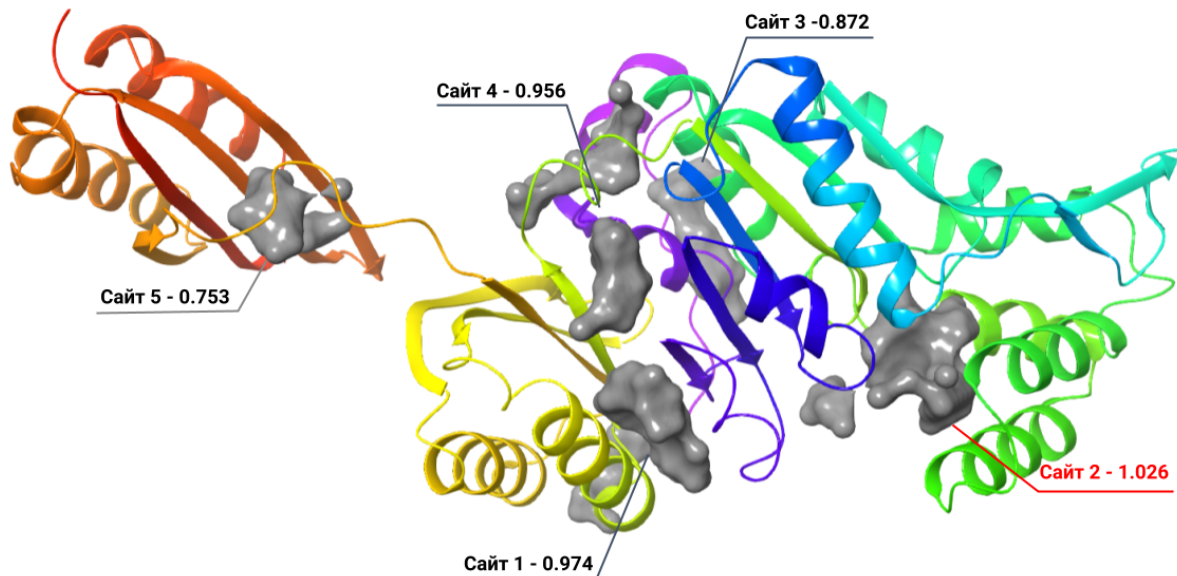


Рисунок 3.7 П'ять сайтів зв'язування і їхні site score, знайдених для моделі гомодимеру SerB2

Далі, для відбору найбільш інтерактивних сайтів зв'язування було використано літературні дані наведені у розділі 3.2. Після аналізу було відібрано по одному сайту зв'язування для кожної моделі, який мав вищі оціночні значення та містив функціонально важливі положення амінокислот, як ключові для взаємодії з лігандами (**Рисунки 3.8 та 3.9**).

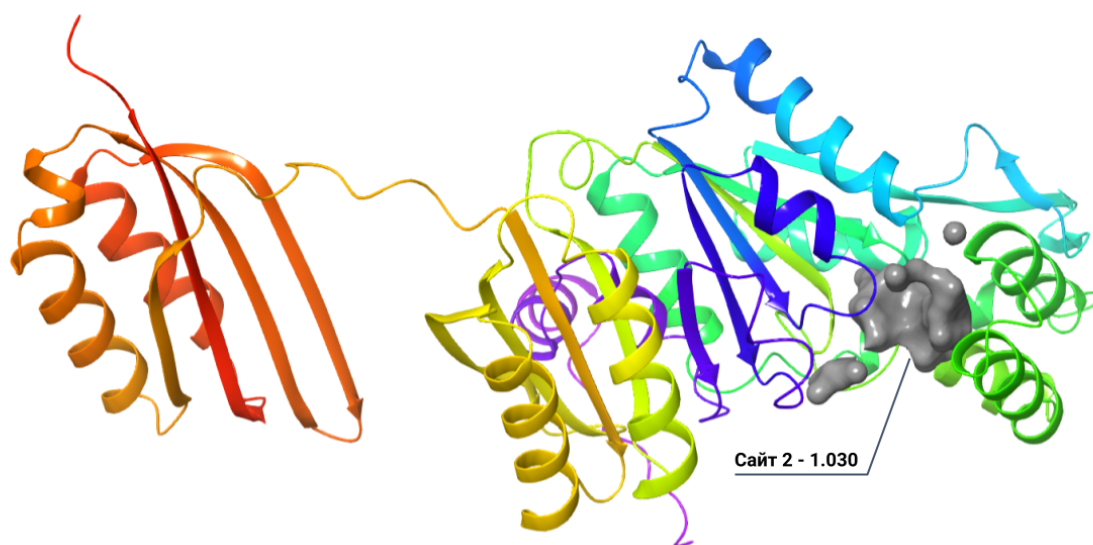


Рисунок 3.8 Обраний сайт мономеру SerB2 і сумарне значення оціночних функцій

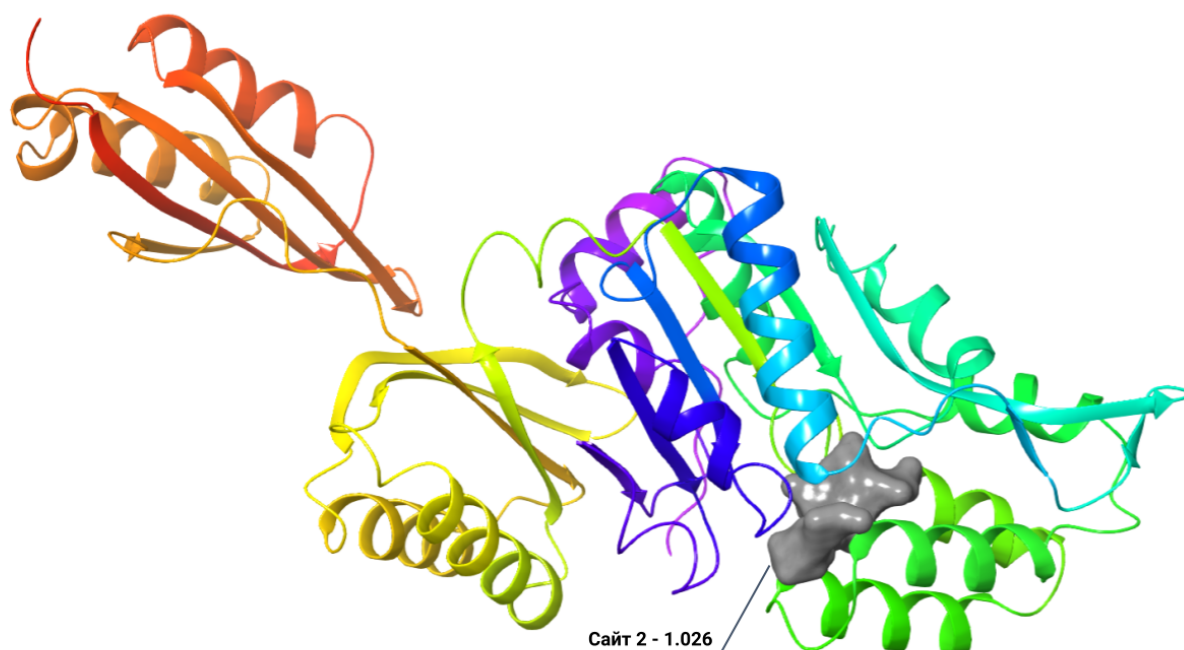


Рисунок 3.9 Обраний сайт гомодимеру SerB2 і сумарне значення оціночних функцій

Крім того, що обрані сайти містять потрібні амінокислотні залишки, вони мають найвищу оцінку сайту серед знайдених, що додатково підтверджує правильність відбору.

Наступним кроком була підготовка отриманих моделей білків з одним відібраним сайтом зв'язування до докінгу. Для цього було використано програмне забезпечення, яке дозволяє створювати ґрид-карту, задаючи межі комірки, в який знаходиться сайт.

3.5. Докінг та аналіз ADME дескрипторів

Бібліотеки сполук отримані після докінгу були проаналізовані за допомогою модуля QikProp. Після фільтрування за рекомендованими межами параметрів ADME дескрипторів QikProp (**Таблиця 3.1**) з докованих лідів

було відібрано 2239 сполук для мономеру I-Tasser, 2019 для мономеру Alphafold та 2634 для гомодимера. Далі були відібрані сполуки, що мали docking score менше -5.6: 634 ліда для моделі мономеру I-Tasser та 1385 лідів моделі гомодимера. Варто зазначити, що сполуки для моделі мономеру Alphafold загалом показали гірші результати і мало сполук пройшли за визначений поріг docking score, тому вони не були включені у фінальну вибірку (**Рисунок 3.10**).

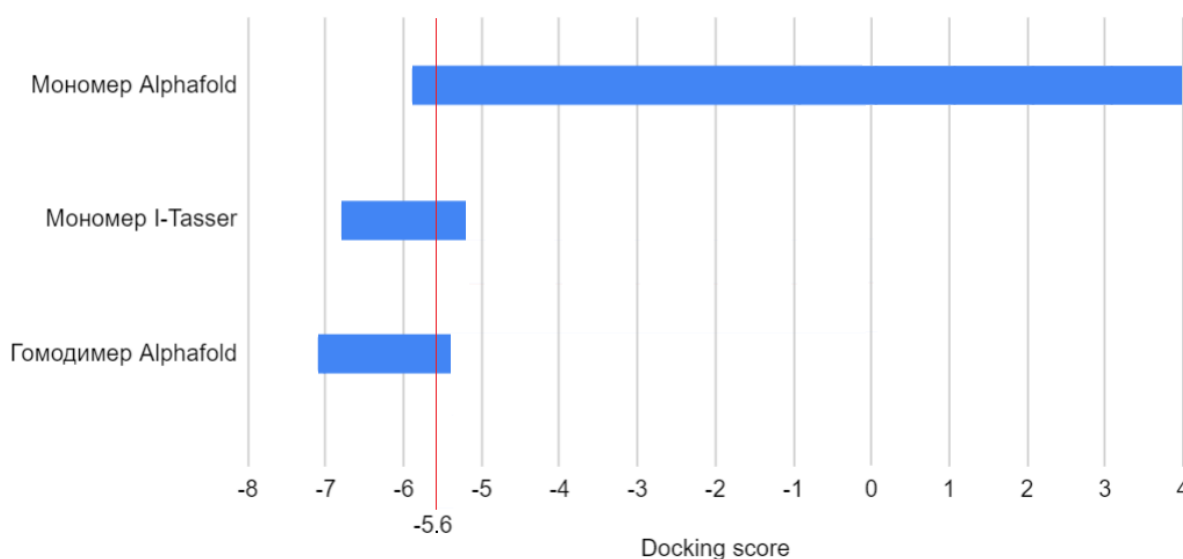


Рисунок 3.10 Діапазон отриманих оціночних значень сполук для трьох моделей білка і його порогове значення для відбору

Також з вибірки були видалені фрагменти, які одночасно мають молекулярну масу до 250 і показник НАС до 20 включно, що дало в результаті 477 лідів для мономеру та 1184 для димеру. Пропорція обраних за однаковими межами параметрів сполук ще раз підтверджує літературні дані про кращу ефективність взаємодії з лігандами димеру у порівнянні з мономером і вказує на доцільність порівняння обох структур в цій роботі. Порівняння результатів для димера і мономера показало наявність невеликої кількості спільних сполук, тому було вирішено об'єднати бібліотеки. Після об'єднання даних для обох моделей і видалення дублікатів залишилося 1625 потенційних інгібіторів фермента.

Таблиця 3.1.

Рекомендовані межі параметрів QikProp та показники сполук з фінальної вибірки

	MW	clogP	TPSA	HAC	Docking score	Glide score	Dipole	SASA
Мах допустиме зн.	725				-5,6		12,5	1000
Міп допустиме зн.	130	3*		20*			1	300
Мах зн.	712	16,53	216,3	54	-5,6	-5,6	18,04	902,3
Міп зн.	250,3	-7,74	8,8	14	-7,1	-7,2	0,33	419,4
Середнє зн.	346,9	1,75	91,6	24,5	-5,8	-5,9	6,87	595,1
	FOSA	FISA	PISA	WPSA	Volume	DonorHB	AccptHB	Dip ² /V
Мах допустиме зн.	750	330	450	175	2000	6	20	0,13
Міп допустиме зн.	0	7	0	0	500	0	2	0
Мах зн.	589,5	255,9	445,4	162,8	1707,1	4,25	15,8	0,3
Міп зн.	0	28,2	0	0	702,4	0	2	0
Середнє зн.	266,2	129,7	171,0	28,3	1059,0	1,64	6,9	0,05
	ACxDN ⁵ /SA	Glob	QPpolrz	QLogPC16	QLogPoct	QLogPw	QLogPo/w	QLogS
Мах допустиме зн.	0,05	0,95	70	18	35	45	6,5	0,5
Міп допустиме зн.	0	0,75	13	4	8	4	-2	-6,5
Мах зн.	0,05	0,93	58,5	18,0	32,0	25,7	4,59	0,14
Міп зн.	0	0,75	21,6	6,3	11,0	4,8	-1,29	-6,43
Середнє зн.	0,01	0,85	35,1	10,7	18,3	12,4	2,02	-3,49
	CIQlogS	QLogHERG	QPPcaco	QLogBB	QPPMDCK	QLogKp	IP(eV)	EA(eV)
Мах допустиме зн.	0,5			1,2		-1	10,5	1,7
Міп допустиме зн.	-6,5	-5	25	-3	25	-8	7,9	0,9
Мах зн.	-0,19	-0,78	5348,1	0,67	7863,7	-1,0	10,2	1,70
Міп зн.	-6,43	-5,00	25,8	-2,65	25,8	-6,4	7,9	-0,89
Середнє зн.	-3,77	-4,13	651,6	-0,81	653,5	-3,1	8,9	0,67
	#metab	QLogKhsa	SAfluorine	SAamideO	PSA	#NandO	Rule of Five	Rule of Three
Мах допустиме зн.	8	-1,5	100	35	200	15	4	3
Міп допустиме зн.	1	-1,5	0	0	7	2		
Мах зн.	9	0,81	98,9	72,5	172,3	11	2	3
Міп зн.	1	-1,48	0	0	25,7	2	0	0
Середнє зн.	3,3	-0,22	6,8	13,4	95,3	6,6	0	0

На основі результатів аналізу ліганд-білкових взаємодій 1625 потенційних інгібіторів можна зробити висновки, що основну роль в комплексі моделі димеру з хітом (docking score -7.1) відіграють водневі зв'язки амінокислотного залишку Asp185, Asp341 та Ala216 з воднями двох амідних груп, Glh194 та Asn344 з оксигенами тих самих амідних груп. Більшість з даних амінокислот описані в літературі, як ключові для зв'язування субстрату. Для мономеру важливими залишками у зв'язуванні хіта (docking score -6.8) виступили Asn295 та Ser294, які мають водневі зв'язки з

гідроксильною групою, а також Asp324, що має зв'язки одразу з двома аміногрупами (**Рисунок 3.11**). Той факт, що в сайті мономеру набір амінокислот, важливих для взаємодії відрізняється від згаданого у літературі можна зробити висновок, що саме модель димера є найбільш актуальною для подальших досліджень.

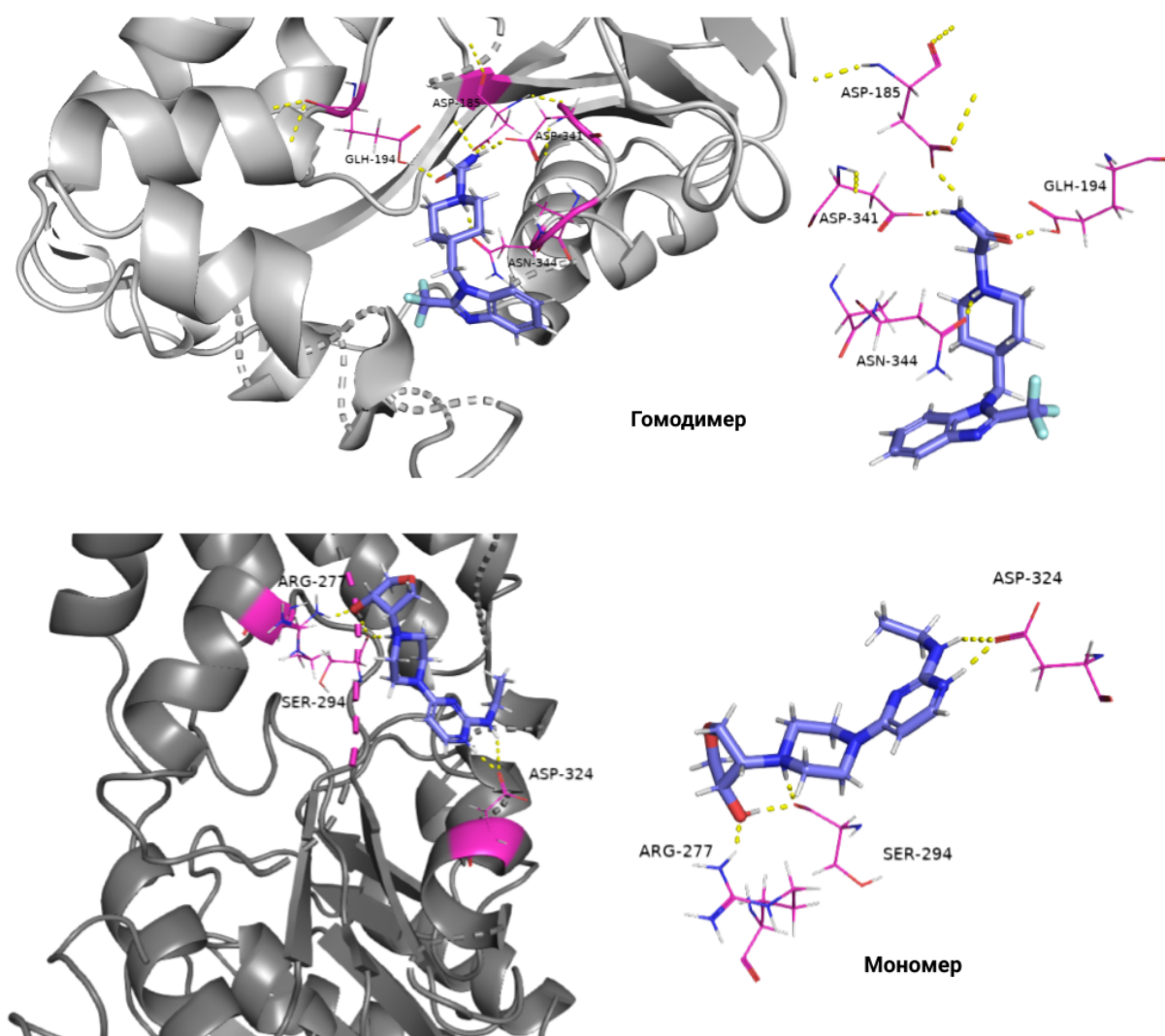


Рисунок 3.11 Приклад комплексів мономеру і димеру SerB2 з потенційними інгібіторами отриманих за допомогою молекулярного докінгу.

Ліганд з моделлю димера повністю занурений в поверхню білка, а ліганд з моделлю мономера знаходиться більшою частиною на поверхні білка. Що додатково свідчить про доцільність використання моделі димеру для подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

Проаналізовано структуру та функції фосфосеринфосфатази SerB2, мутації та перелік амінокислотних залишків, що мають вплив на зв'язування в сайті зв'язування, а також відомі інгібітори даного фермента. Реконструйовано структури мономеру та димеру, що дало можливість встановити відмінності різних олігомерних форм в сайті зв'язування, а також встановити нові потенційні інгібітори SerB2.

1. Результати аналізу реконструкції та верифікації просторової структури SerB2 свідчать про кращу якість отриманої моделі гомодимеру в порівнянні з мономером.

2. Проведений аналіз мономерної та димерної форми білка SerB2 показав більш виражені просторові відхилення в структурі димера в порівнянні з мономером біля активного сайту, що може впливати на доступність для більшості сполук.

3. Результати аналізу 5ти потенційних сайтів на поверхні білка SerB2 корелюють з даними аналізу літератури по функціонально важливим положенням амінокислот, як ключові для взаємодії з лігандами, що дозволяє швидко і точно будувати карту сайту зв'язування.

4. В результаті молекулярного докінгу бібліотеки хімічних сполук (500 тис сполук) з SerB білком було встановлено біля 2 тисяч потенційно активних сполук. Результати для математичної моделі мономеру загалом показали гірші результати, порівняно з структурою SerB2 отриманою шляхом моделювання по гомології. Саме модель димерної форми завдяки структурним особливостям має вищий потенціал для пошуку інгібіторів.

5. Адаптування дескрипторного ADME – аналізу бібліотек хітів, отриманих за трьома моделями дозволило отримати бібліотеку з 1625 потенційних інгібіторів цільового білка. Отримана бібліотека запропонована для подальших досліджень *in vitro* з пошуку нових лікарських засобів проти туберкульозу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yadav GP, Shree S, Maurya R, Rai N, Singh DK, Srivastava KK, Ramachandran R (2014) Characterization of *M. tuberculosis* SerB2, an essential HAD-family phosphatase, reveals novel properties.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115409>
2. Chipman DM, Shaanan B (2001) The ACT domain family.
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00272-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00272-X)
3. Koonin E, and Tatusov, R (1994) Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity: application of an iterative approach to database search.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1711>
4. Savoca R, Ziegler U, Sonderegger P (1995) Effects of L-serine on neurons in vitro.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00038-V](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00038-V)
5. Furuya S, Tabata T, Mitoma J, Yamada K, Yamasaki M, et al. (2000) L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons.
<https://doi.org/10.1073/pnas.200364497>
6. Dunlop DS, Neidle A (1997) The origin and turnover of D-serine in brain.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6724>
7. Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, et al. (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.721>
8. Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, et al. (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65010454.x>

9. Nakano I, Dougherty JD, Kim K, Klement I, Geschwind DH, et al. (2007) Phosphoserine phosphatase is expressed in the neural stem cell niche and regulates neural stem and progenitor cell proliferation.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0046>
10. Sassetti C, Boyd D, and Rubin E (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x>
11. Wang W, Kim R, Jancarik J, Yokota H and Kim S (2001) Crystal structure of phosphoserine phosphatase from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.8 Å resolution.
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00558-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00558-X)
12. Burroughs A, Allen K, Dunaway-Mariano D and Aravind L (2006) Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.049>
13. Cho H, Wang W, Kim R, Yokota H, Damo S, Kim S, Wemmer D, Kustu S and Yan D (2001) BeF₃ acts as a phosphate analog in proteins phosphorylated on aspartate: structure of a BeF₃ complex with phosphoserine phosphatase.
<https://doi.org/10.1073/pnas.131213698>
14. Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S, Eiglmeier K, et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.
<https://doi.org/10.1038/31159>
15. Griffin J, Pandey A, Gilmore S, Mizrahi V, McKinney J, Bertozzi C and Sassetti C (2012) Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.016>

16. Sassetti C and Rubin E (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2134250100>
17. Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L (2001) Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4508>
18. Aravind L, Koonin EV (1999) Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2653>
19. Grant GA (2006) The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element.
<https://doi.org/10.1074/jbc.r600024200>
20. Wang W, Cho HS, Kim R, Jancarik J, Yokota H, et al. (2002) Structural characterization of the reaction pathway in phosphoserine phosphatase: crystallographic “snapshots” of intermediate states.
<https://doi.org/10.3389%2Ffpls.2018.00876>
21. Tribble GD, Mao S, James CE, Lamont RJ (2006) A *Porphyromonas gingivalis* haloacid dehalogenase family phosphatase interacts with human phosphoproteins and is important for invasion.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0509813103>
22. Moffatt CE, Inaba H, Hirano T, Lamont RJ (2012) *Porphyromonas gingivalis* SerB-mediated dephosphorylation of host cell cofilin modulates invasion efficiency.
<https://doi.org/10.1128%2FIAI.00302-15>
23. Shree S, Singh A, Saxena R, Kumar H, Agarwal A, Sharma V, Ramachandran R (2016) The *M. tuberculosis* HAD phosphatase (Rv3042c) interacts with host proteins and is inhibited by Clofazimine.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2177-2>

24. Arora G, Tiwari P, Mandal R S, Gupta A, Sharma D, Saha S and Singh R (2014) High Throughput Screen Identifies Small Molecule Inhibitors Specific for Mycobacterium tuberculosis Phosphoserine Phosphatase.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m114.597682>
25. Hawkinson JE, Acosta-Burrue1 M, Ta ND, Wood PL (1997) Novel phosphoserine phosphatase inhibitors.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)01304-6](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)01304-6)
26. Jumper J, et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
27. Jianyi Y, Renxiang Y, Ambrish R, Dong X, Poisson J, and Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
28. Chen V, Arendall W, Headd J, Keedy D, Immormino R, Kapral G, Murray L, Richardson J and Richardson D (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.
<https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
29. Shuguang Y, et al. (2017) Using PyMOL as a platform for computational drug design.
<https://doi.org/10.1002/wcms.1298>
30. Bhachoo J, Beuming T (2017) Investigating Protein-Peptide Interactions Using the Schrödinger Computational Suite.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6798-8_14
31. Hou T, Xu X (2002) ADME evaluation in drug discovery.
<https://doi.org/10.1007/s00894-002-0101-1>