

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.

**Дослідження родини тирозинфосфатаз в якості мішеней для інгібування
ключових етапів росту мікротрубочок**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності
091 Біологія
ОП «Біоінформатика і структурна біологія»
Зуба Платона Едуардовича

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

Робота виконана під керівництвом наук. спів. відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної Установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», к.б.н Самофалової Д.О.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Зуб П. Е. Дослідження родини тирозинфосфатаз в якості мішеней для інгібування ключових етапів росту мікротрубочок. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика і структурна біологія».

Тирозинфосфатази є ключовими інгібіторами тирозин кіназ, котрі є ініціаторами у формуванні γ -тубулінових комплексів та подальшому утворенні інтерфейсу з α - тубуліном. В той же час, механізми впливу тирозинфосфатаз на регуляцію формування мікротрубочок залишаються недостатньо вивченими.

В ході роботи були визначені чотири тирозинфосфатази, котрі приймають участь у формуванні мікротрубочок. Був здійснений пошук їх повних амінокислотних послідовностей, проведено якісний та кількісний аналіз їх вторинних структур. Проаналізовано доменну будову цільових білків, підтверджена наявність у всіх представників спільного домену. Проводився пошук матричних білкових послідовностей, відбувалася реконструкція повнорозмірних фосфатаз та їх підготовка до подальших маніпуляцій. Відбувався пошук інгібіторних сполук на основі даних отриманих з профільних джерел, формувалися бібліотеки інгібіторів. За допомогою комп'ютерних методів було здійснено гнучкий прямий докінг цільових тирозинфосфатаз з відібраними інгібіторами як в активних сайтах, так і в сайтах зв'язування.

Магістерська робота викладена на 44 сторінках, ілюстрована 12 таблицею та 40 рисунками. Список використаних джерел включає 30 робіт.

Ключові слова: тирозинфосфатази, молекулярний докінг, цитоскелет, тубуліни, інгібітори тирозинфосфатаз.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1 Скелетні структури у клітинах еукаріот та прокаріот.....	6
1.2 Загальна характеристика протеїнфосфатаз.....	10
1.3 Класифікація родини тирозинфосфатаз, їх будова та функції.....	13
1.4 Вплив тирозинфосфатаз на скелетні структури клітини.....	17
1.5 Селективні та неселективні інгібітори тирозинфосфатаз.....	22
 РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
2.1 Біоінформаційний пошук послідовностей тирозинфосфатаз.....	25
2.2 Аналіз доменної архітектури та структури.....	25
2.3 Відбір та аналіз якості матричних структур тирозинфосфатаз.....	25
2.4 Ідентифікація сайтів зв'язування відомих інгібіторів тирозинфосфатаз.....	26
2.5 Відбір та аналіз інгібіторів тирозинфосфатаз.....	27
2.6 Передбачення структури ліганд-білкових комплексів тирозинфосфатаз.....	27
 РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1 Біоінформаційний пошук і аналіз послідовностей тирозинфосфатаз...	28
3.2 Профільний аналіз доменної структури тирозинфосфатаз.....	29
3.3 Дослідження сайтів зв'язування селективних інгібіторів на поверхні молекул тирозинфосфатаз.....	30
3.4 Відбір та перевірка якості просторових структур тирозинфосфатаз....	30
3.5 Створення бібліотек відомих інгібіторів тирозинфосфатаз.....	32
3.6 Гнучкий прямиий докінг інгібіторів тирозинфосфатаз.....	32
 ВИСНОВКИ.....	41
 СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МТ – мікротрубочки

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГДФ – гуанозиндифосфат

GCPs – γ -tubulin complex proteins

Аз – амінокислотний залишок

ВСТУП

Складаючись з тубулінів мікротрубочки відіграють дуже важливу роль у коректному функціонуванні клітин, а отже важливо знати за допомогою яких механізмів, каскадів реакцій клітина регулює процеси збірки цих структурних елементів. Тирозинкінази та протеїнфосфатази, часто, виявляються антагоністами в контролюванні певних реакцій. Тирозинфосфатази є ключовими інгібіторами тирозин кіназ, котрі є ініціаторами у формуванні γ -тубулінових комплексів та подальшому утворенні інтерфейсу з α - тубуліном. В той же час, механізми впливу тирозинфосфатаз на регуляцію формування мікротрубочок залишаються недостатньо вивченими. Тож дослідження процесу інгібування даних фосфатаз може значно спростити подальші з'ясування механізму роботи ферментів.

Метою даної роботи було визначення білок-лігандних взаємодій в активних сайтах та сайтах зв'язування, специфіки взаємодій.

Виходячи з мети були поставлені наступні **завдання**:

- 1) Визначити тирозинфосфатаз людини, які впливають на ключові етапи росту мікротрубочок.
- 2) Провести аналіз білкових послідовностей та їх доменної організації.
- 3) Провести пошук та аналіз матричних структур для побудови повнорозмірних ферментів і їх оптимізації.
- 4) Провести пошук інгібіторів цільових тирозинфосфатаз та встановити особливості їх взаємодії з мішенями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Скелетні структури у клітинах еукаріот та прокаріот

Серед основних структурних елементів цитоскелету, помітними при електронно-мікроскопічних дослідженнях виділяють мікрофіламенти, проміжні філаменти та мікротрубочки. Останні можна назвати найбільшими ниткоподібними компонентами цитоскелету еукаріотів так і прокаріотів та є важливими для кожної клітини, оскільки вони контролюють форму, мітотичні та мейотичні поділи, забезпечують шляхи транспортування, рухливість, а також диференціацію клітини. Мікротрубочки виконують більшість своїх функцій за рахунок утворення специфічних збірок, таких як мітотичне веретено для розділення хромосом під час поділу клітини та аксонома для формування війок і джгутиків. Слід зазначити, що мікротрубочки динамічно збираються з еволюційно висококонсервативних гетеродимерів α - та β -тубуліну [1].

Мікротрубочки можуть функціонально спеціалізуватися, взаємодіючи з різноманітними МТ-асоційованими білками. Ці білки можуть регулювати динаміку вище зазначених елементів цитоскелету, стабілізуючи або дестабілізуючи їх, а також можуть з'єднувати МТ з іншими клітинними структурами, такими як мембрани або інші компоненти цитоскелета [1].

Тубуліни – це не дуже велика родина глобулярних білків. Найчастіше дану групу представляють мономери α -тубуліну та β -тубуліну, котрі є основним матеріалом для побудови мікротрубочок в різних в клітинах різних організмів. Відомо, що α/β -тубуліни існують у різних ізоформах із просторово та тимчасово регульованими виразами та змінюються різними посттрансляційними модифікаціями [9]. Проте до складу тубулінів також слід віднести γ -тубуліни та δ -, ϵ - тубуліни. Формуючи мікротрубочки

мономери α -тубуліну та β -тубуліну повинні зв'язуватися з молекулою ГТФ, котра гідролізується до ГДФ після включення гетеродимеру тубуліну до складу мікротрубочки. Щодо δ -, ϵ - тубулінів, то вони знаходяться в центріолях та приймають участь у формуванні веретена поділу. Збірка мікротрубочок як в часі, так і просторово контролюється за допомогою γ -тубуліну. Він входить перш за все до складу клітинних центрів та полярних тілець веретена поділу, він відіграє важливу роль в початку утворення мікротрубочок [2]. В своїй статті [10] Яна Чумова повідомляє, що різноманітні варіанти заряду γ -тубуліну, виявлені за допомогою 2D-електрофорезу, що свідчать про посттрансляційні модифікації молекули. Також γ -тубулін фосфорилується залежно від клітинного циклу. Роль γ -тубуліну в утворенні мікротрубочок також була продемонстрована в рослинах, де centrosomi відсутні в усіх соматичних і гаметичних клітинах [10].

Відомі також і захворювання, котрі пов'язані з мутаціями в різних ізоформах тубуліну. Наприклад у статті [3] автори показали, що β II-тубулін бере участь у розвитку кількох типів пухлин, таких як нейроепітеліальні пухлини та пухлини мозку, а також рак товстої кишки та передміхурової залози. Регулювання потоків енергії з мітохондрії контролюється β -тубуліном, зв'язаним з VDAC. Автори статті [4] висловили думку, що цитоплазматичний β II-тубулін, не зібраний у мікротрубочки, взаємодіє з вольт-залежним аніонним каналом (VDAC), і було виявлено, що ця взаємодія відіграє біоенергетичну роль у м'язових клітинах, тоді як взаємодія між β III-тубуліном і VDAC вважається відіграють важливу роль у синапсах головного мозку та в ракових клітинах. Також повідомлялося, що надекспресія β III-тубуліну, яку виявили в кількох пухлинах, таких як карциноми прямої кишки та тонкої кишки, рак шлунка та гліоми, була ідентифікована як потенційний маркер агресивних пухлин [7]. Тубулін також відіграє важливу роль у нервовій системі. Епілепсія є ще одним прикладом однієї з важливих тубулінопатій [5]. Був описаний випадок пацієнта з

мікроцефалією, легкими лицьовими дисморфізмами, епілептичними випадками та серйозною затримкою розвитку викликаних мутацією в гені TUBA1A. Тож можна сказати, що мутації в гені α -тубуліну пов'язані з широким спектром неврологічних проблем, які характеризуються специфічними клінічними деталями та нейрорентгенологічними моделями [5].

Щодо γ -тубуліну, що спеціалізується на нуклеації мікротрубочок, то було виявлено, що він надмірно експресується в ракових клітинах, особливо в мультиформній гліобластомі (GBM), і демонструє ядерну локалізацію. Барбора Горжейші та його колеги [8] повідомили, що використовуючи методи імунолокалізації та фракціонування клітин у поєднанні з siRNAi та експресією конструкцій, мічених FLAG, вони отримали докази того, що γ -тубулін також присутній у ядерцях інтерфазних клітин ссавців різного клітинного походження. Імуноелектронна мікроскопія виявила локалізацію γ -тубуліну поза фібрилярними центрами, де відбувається транскрипція рибосомної ДНК. Також γ -тубулін був пов'язаний із залишками ядерця після руйнування ядерної оболонки і міг бути переміщений в ядрця під час мітозу. Імунопреципітація з ядерних екстрактів у поєднанні з мас-спектрометрією виявила зв'язок γ -тубуліну з білком-супресором пухлини C53, розташованим у багатьох субклітинних компартментах, включаючи ядрця. Уявлення про взаємодію між γ -тубуліном та C53 було підтверджено експериментами з послабленням та ко-імунопреципітацією [8].

Регуляція центрів нуклеації, що містять γ -тубулін, для реорганізації мікротрубочок важлива під час активації тучних клітин. Зародження мікротрубочок з центросом опосередковується γ -тубуліновими комплексами, і було припущено, що протеїн-тирозинкінази можуть модулювати зародження мікротрубочок в активованих тучних клітинах. В даній статті [6] повідомляється про регуляцію організації мікротрубочок в тучних клітинах, отриманих з кісткового мозку (ВММС), за допомогою Src гомології 2 (SH2),

що містить домен білка тирозинфосфатази 1 (SHP-1), при впливі на γ -тубулінові комплекси [6].

Основні складові γ -тубулінових комплексів включають γ -тубулін, член сімейства тубулінів, і «білки γ -тубулінового комплексу» (GCP). γ -тубулін спочатку був відкритий у грибі *Aspergillus nidulans* як супресор чутливої до температури мутації β -тубуліну. Висококонсервативні гомологи γ -тубуліну були ідентифіковані невдовзі після цього в різних організмах, і стало зрозуміло, що γ -тубулін буде універсальним компонентом, залученим до зародження та організації мікротрубочок. Два гени, що кодують ізоформи γ -тубуліну, були ідентифіковані у дрозофіли та у хребетних. У мишей було виявлено, що лише одна ізоформа, TUBG1, є необхідною і повсюдно експресується в організмі. GCP вперше були ідентифіковані під час біохімічного очищення мультибілкових комплексів, що містять γ -тубулін, а згодом описані у великій кількості організмів [2]. Міжвидові дослідження показали, що *Alp4/6*, гомологи GCP 2 і 3 в дріжджах, що діляться, можуть бути обмеженою мірою замінені білками людини або гомологами дріжджів, що брунькуються, *Spc97/98* [11]. Це підкреслює високий ступінь функціонального збереження GCP для різних видів.

Аналіз послідовності, кристалографія та передбачення структури показали, що GCP 2, 3, 4, 5 і 6 належать до сімейства структурно споріднених білків. Ці GCP містять два основних консервативних домени, *grip1* і *grip2*. Кожен домен захвату містить кілька пучків α -спіралей, при цьому домен *grip1* бере участь у бічних контактах між GCP, а домен *grip2* опосередковує зв'язування з γ -тубуліном [13].

Слід також згадати про γ -тубулінові кільцеві комплекси (γ TuRC), побудовані з тетрамерних малих комплексів γ -тубуліну (γ TuSCs) та інших специфічних компонентів (таких як білки GCP4-6), служать матрицями для зародження мікротрубочок. Спираючись на дані з попереднього розділу про роль γ -тубуліну в утворенні мікротрубочок в рослинах, припускається, що γ -тубулінові комплекси з GCP створюють зародок у мікротрубочках рослин з

ацентросомальних дисперсних ділянок, локалізованих мембранами, особливо з ядерною оболонкою та з уже існуючими мікротрубочками [10].

1.2 Загальна характеристика протеїнфосфатаз

Білкові фосфатази – це ферменти, які гідролізують фосфоефірні зв'язки, присутні у фосфорильованих білках. Оборотно фосфорилування білка є найбільш поширеною посттрансляційною модифікацією у всіх еукаріотів. Багато подій фосфорилування відіграють ключову регуляторну роль, диктуючи активність, локалізацію або стабільність білка. Але також здатні викликати різні захворювання людини. На відміну від кіназ, каталітичні домени яких здебільшого утворюють одну структурну білкову складку фосфатази демонструють більшу різноманітність структур і каталітичних механізмів [28]. Більшість досліджень передачі сигналу зосереджені на протеїнкіназах, які каталізують перенесення кінцевого фосфату АТФ до гідроксильної групи залишків серину, треоніну та тирозину. Інша відмінність між кіназами та фосфатазами — їх кількість; фосфатази загалом у клітині набагато більше, ніж кінази, і мають довший період напіврозпаду. Крім того, фосфатази більше регулюються зв'язуванням різних субодиниць, тоді як кінази частіше регулюються фосфорилуванням. Еукаріотичні фосфатази спочатку були розділені на сімейства на основі біохімічних властивостей, таких як їхня здатність дефосфорилувати β -субодиницю фосфорилазкінази та їх чутливості до двох невеликих інгібіторів білка. Поява даних про послідовність ДНК з численних геномів разом зі структурною та каталітичною інформацією дає зрозуміти, що класифікація на основі біохімічних властивостей не завжди відображає еволюційні лінії. Три найбільш відомі сімейства протеїнових фосфатаз — це сімейства PPP, PPM і PTP [29].

Надсімейство білкових фосфатаз PPP (фосфопротеїнфосфатази) включає, але не обмежується ними, протеїн-серин/треонінфосфатазу типу 1, типу 2A і кальциневрин (тип 2B). У каталітичному механізмі фосфатаз PPP використовується вода, активована металом, для безпосереднього гідролізу фосфоефірного зв'язку. Ідентичність координованого іона металу варіюється між різними PPP фосфатазами і, у більшості випадків, не була точно визначена. Кальциневрин зв'язує один атом Fe^{2+} і один Zn^{2+} у своєму активному центрі, тоді як вважається, що PP1 зв'язує Mn^{2+} і, можливо, Fe^{2+} . Відмітною ознакою PPP фосфатаз є утворення мультимерних комплексів, що складаються з однієї каталітичної субодиниці та однієї або кількох регуляторних субодиниць, які, як вважають, контролюють каталітичну активність. Специфічність PPP фосфатаз у значній мірі формується через асоціацію з регуляторними субодиницями [29].

Надсімейство PPM (протеїнфосфатаза-залежна від металу) складається з однієї родини Mg^{2+} - (або Mn^{2+} -) залежних білкових фосфатаз. На основі біохімічних властивостей сімейство PPM спочатку було класифіковано як фосфатази типу 2C. Однак тепер ми знаємо, що сімейство PPM є окремою еволюційною сім'єю і не пов'язане з PPP фосфатазами, що робить назву типу 2C дещо оманливою. Крім того, назва сімейства PPM на основі залежності від іонів металу також є невдалим, оскільки інші сімейства фосфатаз, наприклад PPP, також залежать від іонів металів у своїх активних центрах. Як PPP, так і PPM фосфатази використовують іони металів. Фосфатази використовують чотири аспартатних залишки для координації двох іонів Mn^{2+} , які потім активують молекулу води. Каталіз відбувається у два етапи. По-перше, вода, активована іонами металу, діє як нуклеофіл, щоб атакувати фосфор. Потім друга молекула води протонує групу, що йде, і завершує реакцію. При цьому важливо зазначити, що координаційні залишки іонів металу є інваріантними. На відміну від фосфатаз PPP, фосфатази сімейства PPM не стабільно пов'язані з регуляторними субодиницями, які визначають локалізацію та націлювання на субстрат [29].

Третє добре відоме сімейство протеїнових фосфатаз — це сімейство РТР (фосфо-тирозинфосфатаз), яке включає 6 різних фосфатазних доменів, два з яких — тирозинфосфатази та фосфатази подвійної специфічності. Члени сімейства РТР мають загальний каталітичний механізм, відмінний від фосфатаз РРР і РРМ, але не всі можуть належати до однієї еволюційної лінії. Сімейство білкових фосфатаз РТР має різноманітних представників з дуже слабкою ідентичністю послідовності між членами. За межами каталітичного ядра члени сімейства РТР демонструють дуже малу подібність послідовностей і навіть можуть представляти кілька еволюційних ліній. РТР фосфатази мають розширену субстратну специфічність, що включає білки з фосфорильованими залишками серину, треоніну та тирозину. Крім того, члени даного сімейства дуже важливі для полегшення численних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Різноманітність субстратів і ролей всередині клітини може пояснити різноманітність фосфатазних доменів у сімействі протеїн фосфатази РТР. Члени цього сімейства мають загальний каталітичний механізм із збереженим мотивом послідовності, представленим С-х5-R (Рис. 6В). Цей мотив включає інваріантний залишок цистеїну, який служить нуклеофілом у реакції дефосфорилування [29].

Нарешті, два відносно нових сімейства протеїнових фосфатаз також представлені в третє добре відоме сімейство протеїнових фосфатаз — це сімейство РТР (фосфо-тирозинфосфатаз) [29].

Сімейство НАД каталізує дефосфорилування білків і включають додаткові ферменти, які дефосфорилують різноманітні невеликі молекули та нуклеїнові кислоти. Сімейство протеїнових фосфатаз НАД було виявлено, коли була виявлена ідентичність фосфатази, яка діяла на карбокси-кінцевий домен РНК-полімерази II (CTD). Сімейство НАД не пов'язане з іншими сімействами протеїнової фосфатази за послідовністю, а натомість пов'язане з суперсімейством галогенокислотних дегалогеназ. Для членів цієї родини характерний мотив DxDx(T/V), що знаходиться в каталітичному центрі. Члени сімейства НАД зв'язують іон магнію в активному центрі, і активність

фосфатази залежить від присутності цього іона магнію [18]. Крім того, ці фосфатази використовують перший аспартат з мотиву Dx Dx(T/V) (Рис. 7А) як початковий нуклеофіл. Проміжний продукт ковалентного фосфорил-ферменту потім гідролізується водою для вивільнення вільного фосфату та регенерації активного центру[29].

Сімейство RTR1, назване на честь свого члена-засновника, регулятора фосфатази *S. cerevisiae* транскрипції 1, складається з Rtr1 та його паралога Rtr2. Ці фосфатази пов'язані з РНК-полімеразою II як у дріжджів, так і у ссавців і діють як фосфатази С-кінцевого домену [19]. Попередні дослідження *Kluyveromyces lactis* показали, що Rtr1 не містить активного центру або будь-якої каталітичної активності в очищеному білку [20]. Однак нещодавні структурні дослідження *S. cerevisiae* показали інше. Домен цинкового пальця і пара спіралей можуть утворювати кишеню для зв'язування субстрату. Мутагенез залишків у цьому місці різко знизив каталітичну активність, що свідчить про те, що це місце реакції переносу фосфорилу. Сімейство Rtr1 є окремою групою фосфатаз з невеликою схожістю з іншими сімействами протеїн-фосфатази. Наприклад, Rtr1 не схожий на сімейство HAD, оскільки не вимагає присутності йона магнію, а також не має діметалевого активного центру, характерного для сімейства PPP. Сімейство Rtr1 також не має консервативного залишку цистеїну, який би діяв як нуклеофіл. Наявність каталітичної активності в рекомбінантному Rtr1 виключає можливість того, що цей білок діє як каркас у дріжджах для залучення фосфатази до CTD. Таким чином, Rtr1 являє собою нове та нетипове сімейство протеїн-фосфатази. [21].

1.3 Класифікація родини тирозинфосфатаз, їх будова та функції

Геном людини кодує приблизно 100 фосфатаз, які належать до суперсімейства протеїн-тирозинфосфатаз (РТР), субстрати яких варіюються

від білків до фосфоінозитидів та мРНК. Відмінною ознакою цієї надсімейства є послідовність активного сайту C(X)5R, також відома як мотив підпису РТР. РТР є ключовими регуляторними компонентами в шляхах передачі сигналу, і важливість РТР для контролю клітинної сигналізації добре встановлена. Крім того, є вагомні підстави вважати, що інгібітори РТР можуть служити новими лікарськими засобами для лікування різних захворювань. На основі структури та специфічності субстрату суперсімейство РТР поділяється на чотири окремі підродини:

- 1) рТур специфічні РТР,
- 2) фосфатази подвійної специфічності
- 3) Cdc25 фосфатази
- 4) LMW РТРs

РТР мають подібні основні структури, зроблені з центрального паралельного бета-листа з фланкуючими альфа-спіралями, що містять петлю бета-петля-альфа, яка охоплює мотив підпису РТР. Не дивно, що вони використовують загальний хімічний механізм гідролізу фосфатів, незважаючи на відмінності в специфічності субстрату. Незважаючи на збережені структурні та каталітичні властивості, існують також достатні відмінності в кишнях активного центру та його найближчому оточенні серед різних РТР [14].

рТур специфічні РТР включають ~40 членів, усі з ~250 амінокислотним каталітичним доменом (домен РТР) з відносно високим ступенем подібності до РТР1В. Відповідно до їх субклітинної локалізації, специфічні для тирозину РТР можна далі розділити на внутрішньоклітинні та рецептороподібні РТР. Внутрішньоклітинні РТР, прикладом яких є РТР1В, містять один каталітичний домен і різні аміно- або карбоксильні термінальні розширення, включаючи домени SH2, які можуть мати цільові або регуляторні функції. Наприклад, карбоксильні кінцеві 35 залишки в РТР1В є як необхідними, так і достатніми для націлювання РТР1В на

цитоплазматичну поверхню ендоплазматичного ретикулула. Це може лежати в основі здатності РТР1В інактивувати рецепторні РТК під час ендоцитозу та запобігати передчасній активації кіназ до їх кінцевого призначення на цитоплазматичній мембрані. Рецептороподібні РТР, прикладом яких є CD45, як правило, мають позаклітинний, імовірно, що зв'язує ліганд домен, одну трансмембранну область і один або два цитоплазматичні домени РТР. Їх можна далі розділити на щонайменше шість окремих підтипів на основі структурних мотивів у позаклітинних доменах. Позаклітинні структурні мотиви включають домени, що нагадують імуноглобулін, повтор фібронектину III, карбоксилангідразу, домени MAM (Mерgrin-Xенopus A2-Mu) або багаті цистеїном області, які припускають, що рецептороподібні РТР можуть функціонувати в адгезії клітини-клітини або клітинного матриксу [14].

DSP є найбільш структурно та функціонально різноманітними ферментами серед усіх чотирьох підсімейств РТР, які налічують приблизно 50 членів. DSP можна далі розділити на чотири групи: VH1-подібні, Cdc14-подібні, фосфоінозитид-фосфатази та мРНК-5'-трифосфатази. Багато DSP відрізняються своєю здатністю гідролізувати pSer/pThr, а також залишки pTyr. Основоположником VH1-подібних DSP є білок VH1 з вірусу осповакцині [22]. На основі аналізу послідовності та структурного порівняння велику кількість DSP можна класифікувати як VH1-подібні фосфатази, включаючи VHR (для пов'язаних з VH1) і понад 10 MAP кіназних фосфатаз (МКР). VHR був першим DSP, ідентифікованим у людини, і містить один каталітичний домен, який є консервативним серед усіх VH1-подібних DSP. МКР характеризуються високою специфічністю щодо MAP кіназ. Усі вони містять каталітичний домен, який за послідовністю подібний до VHR, і варіабельний N- або C-кінцевий домен, який, здається, регулює їх клітинну локалізацію, а також специфічність щодо різних членів сімейства кіназ MAP [14].

Фосфатази Cdc25 (Cdc25A, B і C) специфічно видаляють інгібіторні фосфати з Thr14 і Tyr15 в циклінзалежних кіназах, що активує кінази і стимулює прогресування через клітинний цикл. І Cdc25A, і Cdc25B є потенційними онкогенами людини, і вони надмірно експресуються в ряді пухлин. Хоча фосфатази Cdc25 виявляють подвійну специфічність щодо білкових субстратів, вони класифікуються як окрема підродина через їх відмінні структурні властивості. Фосфатази Cdc25 більш віддалені від інших членів надсімейства PTP, як на первинному, так і на третинному структурних рівнях. За винятком мотиву PTP, фосфатази Cdc25 не мають значної подібності амінокислотної послідовності з класичними PTP, DSP або LMW PTP. Мотив PTP в Cdc25 фланкований двома доменами SH2 (~25 залишків), а тривимірна структура каталітичного домену в Cdc25 нагадує структуру роданези MAP [14].

LMW PTP - це білки ~18 кДа, які становлять четверту підродину надсімейства PTP. LMW PTPs спочатку були виділені як LMW кислі фосфатази. Це цитозольні ферменти, які зустрічаються у більшості видів від прокариотів до еукаріотів. LMW PTP не мають значної гомології послідовності з іншими членами надсімейства PTP за межами мотиву підпису PTP. Цікаво, що активний центр у LMW PTPs розташований поблизу N-кінця, тоді як він локалізований поблизу C-кінцевого кінця каталітичних доменів у всіх інших PTP і DSP. У людей спостерігали щонайменше дві ізоформи LMW PTP, що, як вважають, є результатом альтернативного сплайсингу одного гена ACP1. Незважаючи на те, що в ACP1 було помічено багато добре відомих поліморфізмів, які корелюють з величезною різноманітністю патогенних станів, точна біологічна роль LMW PTPs *in vivo* недостатньо зрозуміла. Останні дослідження показують, що LMW PTPs регулюють певні рецепторні сигнальні шляхи РТК. Можливо, варто зазначити, що на додаток до гідролізу pTyr, LMW PTPs також володіють надзвичайно сильною активністю щодо 5'-фосфату флавінмононуклеотиду

(FMN), хоча біологічне значення останньої активності залишається невизначеним [14].

1.4 Вплив тирозинфосфатаз на скелетні структури клітини

Дегрануляція тучних клітин відіграє ключову роль у багатьох порушеннях здоров'я людини. Клінічна картина широка, включає респіраторні, неврологічні, травні, серцево-судинні, шкірні та навіть кістково-м'язові симптоми. Тучні клітини наділені широким спектром рецепторів плазматичної мембрани, що дозволяє їм відчувати і реагувати на безліч подразників. Головним рецептором, що запускає дегрануляцію тучних клітин, є високоафінний IgE рецептор FcεRI [30]. Зшивання FcεRI ініціює фосфорилування тирозину β- і γ-субодиниць FcεRI за допомогою нерецепторної кінази Lyn сімейства Src. Після цього відбувається посилення активності тирозинкінази Syk з сімейства Syk/Zap і фосфорилування трансмембранних адаптерів, які організують і координують подальші сигнали, що призводить до Ca²⁺ витікання з ендоплазматичного ретикулума. Фосфорилування тирозином численних субстратів є лише тимчасовим і повертається до базових рівнів через кілька хвилин після запуску рецептора. Важливу роль у цьому процесі відіграють протеїн-тирозинфосфатази [12].

На противагу тирозинфосфатаза SHP-1 утворює комплекси з білками комплексу γ-тубулін GCPs і діє як негативний регулятор зародження мікротрубочок з центросом. Ця регуляція зумовлена змінами в накопиченні γ-тубуліну. Під час антиген-індукованої активації тучних клітин SHP-1 модулює активність кінази Syk і впливає на організацію мікротрубочок. Ці дані свідчать про новий механізм придушення утворення мікротрубочок на пізніх стадіях активації тучних клітин. Отже, SHP-1 може брати участь у просторово-часовій регуляції дегрануляції [2]. Тирозинфосфатаза SHP-1

протистоїть активності Syk; стимуляція NADPH оксидази активацією FcεRI призводить до виробництва окислювачів, які оборотно інгібують SHP-1, посилюючи сигнал від Syk. Активований AMPK може пригнічувати активацію Syk рецептором FcεRI, що, можливо, відображає його здатність фосфорилувати бета-субодиницю FcεRI. Циклічний GMP через протеїнкіназу G II посилює активність SHP-1 шляхом фосфорилування його С-кінцевої області; це може пояснити його інгібуючий вплив на активацію тучних клітин. Домен Src 2 (SHP-1), змінює фосфорилування тирозину, надане Syk на LAT і пов'язаний каркасний білок SLP-76 [16].

Взагалі слід відзначити, що протеїн-тирозинфосфатаза SHP-1 є негативним регулятором множинних шляхів передачі сигналу. Було помічено, що SHP-1 ефективно протидіє Src-залежному фосфорилуванню в клітинах HEK293. Реконбінантний SHP-1 мав підвищену активність після фосфорилування за допомогою Src *in vitro*, і варіанти SHP-1 з мutowаними сайтами фосфорилування на С-кінці, SHP-1 Y538F і SHP-1 Y538F,Y566F були менш активними щодо фосфопротеїнів, що генеруються Src, в інтактних клітинах. Другою причиною ефективного дефосфорилування є селективність субстрату SHP-1. Експерименти з використанням різних злитих білків GST-SHP-1 виявили ефективну взаємодію фосфопротеїнів, що генеруються Src, із каталітичним доменом SHP-1, а не з доменами SH2. Фосфопептиди, які відповідають хорошим субстратам Src, були ефективно дефосфорилувані SHP-1 *in vitro*. Крім того, SHP-1 має здатність активувати кіназу Src шляхом дефосфорилування інгібуючого фосфотирозину на кінці Src C і, таким чином, може стимулювати Src-залежне фосфорилування в певних типах клітин. Автори статті на основі ферментативних даних та досліджень моделювання припускають, що Src і SHP-1 можуть мати комплементарну селективність субстрату. У інтактних клітинах субстрати Src ефективно дефосфорилуються SHP-1. [15].

Щоб краще зрозуміти на молекулярному рівні фізіологічні ролі та регуляцію активності РТРε *in vivo*, автори статті [17] шукали нові взаємодії з

цією фосфатазою. Вони відзначили, що РТРε взаємодіє *in vivo* з мікротрубочками оборотним чином. Зв'язування стабілізується білками, пов'язаними з мікротрубочками (МАР), і регулюється фізіологічними стимулами, такими як специфічне фосфорилування РТРε після активації рецептора епідермального фактора росту (EGFR). Зв'язування з тубуліном пригнічує каталітичну активність РТРε, що свідчить про те, що фізіологічно відповідні сигнальні події можуть знижувати активність РТРε, сприяючи його перехідному зв'язку з мікротрубочками. Дані вказують на те, що тубулін також інгібує РТР1В, але не інгібує RPTPμ, що свідчить про те, що хоча асоціація з тубуліном не є універсальною серед РТР, вона не обмежується лише РТРε. Щоб ідентифікувати білки, які взаємодіють з РТРε в клітинах, дослідники експресували нерцепторну форму фосфатази, *cyt*-РТРε, у 293 клітинах та дослідили білки, які співосаджувалися з нею. Аналіз SDS-PAGE імунопреципітатів D245A *cyt*-РТРε виявив копреципітаційний білок з масою приблизно 55 кДа, який згодом був ідентифікований за допомогою мас-спектрометрії як α-тубулін. Подальші експерименти з імунопреципітації підтвердили, що *cyt*-РТРε, а також RPTPε зв'язують α-тубулін. Зв'язування було специфічним, оскільки неспоріднений білок, DAP4, не зв'язував α-тубулін, і оскільки актин, другий білок цитоскелета, не осаджувався разом з РТРε. Зв'язок між РТРε та α-тубуліном спостерігали також у клітинах HeLa та A431, а також коли експеримент проводили у зворотному порядку шляхом осадження α-тубуліну. Подібні результати були отримані також при дослідженні зв'язування з β-тубуліном. EGFR-опосередковане фосфорилування Y638 змушує *cyt*-РТРε зв'язувати тубулін *in vivo*. Основним місцем-кандидатом для опосередкованого EGFR фосфорилування *cyt*-РТРε є його С-кінцевий Y638, присутність якого підтримує взаємодію РТРε-тубулін. Y638 аналогічний Y695 RPTPε і Y789 спорідненого RPTPα, фосфорилування якого є вирішальним для РТР-опосередкованої активації *c*-Src. EGFR-опосередковане фосфорилування *cyt*-

PTP ϵ є високоспецифічним і впливає на цей один тирозин з числа 22 залишків тирозину, присутніх у цій фосфатазі [17].

Вважається, що протеїнотирозинфосфатаза α (PTP α) з масою \sim 130 кДа фізіологічно дефосфорилує протоонкоген Src на фосфотирозині (pTyr)527, критично негативному регуляторному залишку. Він містить два цитоплазматичних каталітичних домени, D1 і D2, з яких тільки D1 значно активний *in vitro* та *in vivo*. Було показано, що надекспресія PTP α у фібробластах ембріонів щурів активує Src і викликає неопластичну трансформацію, а надекспресія PTP α в клітинах ембріональної карциноми P19 викликає дефосфорилування Tyr527, активацію Src і диференціювання нейронів. pTyr789 в PTP α конститутивно фосфорилується і зв'язує Grb2, взаємодія, яка може інгібувати активність PTP α . Автори статті показали, що це фосфорилування також спеціально дозволяє PTP α дефосфорилувати pTyr527. Мутація Tyr789 \rightarrow Phe скасовує зв'язування PTP α -Src та дефосфорилування pTyr527 (хоча не інших субстратів) і неопластичну трансформацію надмірно експресованим PTP α *in vivo*. В статті також робили припущення, що pTyr789 забезпечує дефосфорилування pTyr527 шляхом пілотного зв'язування з доменом Src SH2, який витісняє внутрішньомолекулярне зв'язування pTyr527-SH2 [23].

PTP1B являє собою нерцепторну протеїн тирозинфосфатазу 50 кДа з N-кінцевим каталітичним доменом з 240 залишків, за яким слідує регуляторна область, що містить мотиви зв'язування SH3, а також C-кінцевий амінокислотний хвіст 35 який націлює фермент на ендоплазматичний ретикулум (ER). Каталітичний домен зв'язаного з ER PTP1B звернений до цитозолу, маючи потенціал для дефосфорилування субстрату по всій розгалуженій і динамічній розгалуженій мережі, зайнятій ER. Поширення ER до периферії клітини дозволяє PTP1B дефосфорилувати субстрати, розташовані на плазматичній мембрані, наприклад Src, EphA3, і білки, пов'язані з комплексами кадгерину та інтегрину. Регуляторна роль PTP1B у клітинній адгезії та рухливості є складною і, очевидно, залежить від типу

клітини та контексту. Було показано, що RTR1B сприяє адгезії та рухливості клітин у фібробластах, нейронах, тромбоцитах, та кількох лініях пухлинних клітин. Інгібуюча роль була описана у фібробластах, первинних гладком'язових клітинах аорти, клітинах раку яєчників, та в інвазії мультиформних пухлинних клітин гліобластоми у мишей. Примітно, що позитивна роль RTR1B у рухливості клітин часто асоціювалася зі стимуляцією інтегрин-залежної передачі сигналів. Навпаки, негативний вплив RTR1B на рухливість клітин був пов'язаний з антагонізмом передачі сигналів від тирозинкіназ рецепторів фактора росту. Біохімічні експерименти, проведені в клітинах COS, показали, що RTR1B може дефосфорилувати α -актинін і сприяти хемотаксису фібронектину. Також було продемонстровано, що RTR1B дефосфорилує α -актинін у спайках, полегшуючи його зв'язування з актином [24].

Відомо, що білок RTRIP51, також відомий як регулятор білка 3 динаміки мікротрубочок, взаємодіє як *in vitro*, так і *in vivo* з RTR1B, протеїн-тирозинфосфатазою, яка бере участь у регуляції клітин. Він був ідентифікований як *in vitro* та *in vivo* партнер взаємодії CGI-99 і Nuf-2. мРНК RTRIP51 експресується на всіх стадіях клітинного циклу. Недавні дослідження виявили білок RTRIP51 на екваторіальній пластині. Також повідомляється про локалізацію комплексу RTRIP51/CGI-99 і RTRIP51/Nuf-2 в екваторіальній області під час мітозу. Крім того, аналізи наближеного лігування Duolink виявили зв'язок RTRIP51 з мікротубулярним цитоскелетом і веретенним апаратом. Під час конфокальної мікроскопії було виявлено високу кількість фосфорильованого RTRIP51, пов'язаного з полюсами веретена. Паралельно спостерігалася сильна взаємодія RTRIP51 з рецептором епідермального фактора росту, який фосфорилує RTRIP51 на залишку тирозину 176. При переході M/G1 був зареєстрований високий рівень взаємодії між RTRIP51 і RTR1B, таким чином відновлюючись взаємодію RTRIP51 і Raf-1, виснажених мітотичними клітинами. Підсумовуючи ці нові факти, автори статті роблять висновок, що RTRIP51 необхідний для

нормальних мітотичних процесів, впливаючи на поділ хромосом і контроль активності шляху MAPK [25].

1.5 Селективні та неселективні інгібітори тирозинфосфатаз

Білкові тирозинфосфатази (ПТФ) мають першорядне значення в процесі дефосфорилювання і каталізують ряд біологічних функцій. Відомо, що аномальна активність РТР призводить до кількох захворювань людини. Отже, існує підвищена потреба в потенційних малих молекулах, які інгібують РТР. Кількість інгібіторів збільшується щодня, але незначна кількість сполук перетворюється на комерційні ліки. [26]. Погана біодоступність є серйозною проблемою для переведення інгібіторів від дослідницьких у терапевтичні засоби, оскільки більшість доступних інгібіторів, спрямованих на активний сайт, мають значні негативні заряди. Субсайти, знайдені поблизу активного центру, що демонструють меншу гомологію між фосфатазами, важливі для розвитку більш селективних і потужних інгібіторів фосфатаз. Націлення на алостеричний сайт, який є неконсервованим і менш полярним, забезпечує альтернативний шлях для розробки селективних інгібіторів із прийнятними фармакологічними властивостями. Більшість сучасних відкриттів лікарських засобів зосереджені на інгібіторах активного центру РТР1В, тоді як дослідження алостеричних інгібіторів неухильно зростають. На додаток до кількох синтетичних сполук було показано, що природні біофлавоноїди (наприклад, аментофлавіон) інгібують РТР1В шляхом зв'язування в алостеричному місці. Стибоглюконат натрію використовується як передовий препарат для лікування лейшманіозу. Він є потужним інгібітором РТР, включаючи гомологічні Src РТР1 (SHP-1), SHP-2 і РТР1В. Ефективність стибоглюконату натрію при мієлодиспластичному синдромі досліджується у дослідженнях

фази I та фази II. Нещодавно було виявлено, що цукрові похідні пурину, триазолу також виявляють хорошу інгібіторну активність фосфатази. На додаток до цього, інгібітори на основі псевдоглікопептидів також досліджуються на активність фосфатази. У 2002 році Lau et al. від Merck Erosst Canada & Co. описав біарилові похідні фосфонової кислоти як потужні інгібітори. Ці похідні корисні при лікуванні діабету, ожиріння та супутніх станів. Пей та інші дослідники від Calfee Halter & Griswold LLP також розробили метод інгібування РТРІВ з використанням нейтрального фосфотирозину. Інгібітори складаються з альдегідної або монокетонно-заміщеної арильної групи. Альдегід або монокетон утворює оборотний іміну або енаміновий аддукт з аргініном активного центру РТР. Арильна група забезпечує спорідненість інгібітора зв'язування з активним центром, а друга заміна на арильній групі взаємодіє з реактивною поверхнею поблизу активного центру за допомогою різних молекулярних взаємодій, таких як електростатична взаємодія, водневий зв'язок, гідрофобна взаємодія та взаємодія Ван-дер-Ваальса. У 2007 році Mjalli et al. і правонаступник Кілпатрик Стоктон створили для терапевтичне використання новий клас заміщених похідних імідазолу. У 2008 році Whitehouse et al. та правонаступник, Institute of Pharmaceutical Discovery LLC, представили винахід, що містить гетероциклічні заміщені карбонові кислоти. Даний винахід відноситься до сполук і фармацевтично прийнятних солей[27].

РТР відіграють ключову роль у багатьох захворюваннях людини, включаючи діабет, рак, аутоімунні захворювання. Протягом останніх двох десятиліть були проведені інтенсивні дослідження РТР та їх інгібіторів. Однак у клінічних випробуваннях було досягнуто дуже мало подібних до ліків молекул. Для досягнення більшої спорідненості під час зв'язування були розроблені інгібітори, які мають високий заряд і більші та великі за розміром, щоб задіяти більшу кількість позитивно заряджених залишків каталітичного сайту. Це призвело до створення негативно зарядженого інгібітора, котрий погано поглинався. Крім того, близька структурна

подібність РТР з їх гомологами створює проблему у розробці селективних інгібіторів. Селективність щодо РТРs необхідна, оскільки інгібування інших фосфатаз може призвести до серйозних побічних ефектів. Наприклад, ТСРТР є найближчим родичем РТР1В з 72% ідентичності або 94%, якщо розглядати залишки каталітичного сайту. Таким чином, важко отримати селективність для РТР1В порівняно з ТСРТР на каталітичному сайті [27].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Біоінформаційний пошук послідовностей тирозинфосфатаз

Для подальшого аналізу та з'ясування структурних механізмів зв'язування було використано нуклеотидні та амінокислотні послідовності тирозинфосфатаз α та ϵ , білка регулятора динаміки мікротрубочок з людського походження (*H. sapiens*).

Для пошуку, аналізу та анотації амінокислотних та нуклеотидних сиквенсів тирозинфосфатаз та інших білків використовувалися різноманітні біоінформаційні та структурно-біологічні бази даних: GenBank, UniProt, RCSB Protein Data Bank, ChEMBL, Zinc Database, PubChem; ряд онлайн інструментів: Pfam.xfam, Pfam.Scan, InterPro, Smart, TMHMM server v2.0, MolProbity, SWISS-MODEL. Також були використані деякі програмні пакети: Gold.

2.2 Аналіз доменної архітектури та структури

Оцінка специфічності, аналіз доменної структури білків та визначення меж каталітичних доменів проводилися за допомогою онлайн інструменту EMBL-EBI, Pfam.xfam, Pfam.Scan, InterPro, TMHMM server v2.0, Smart та спираючись на дані отримані із статей UniProt.

2.3 Відбір та аналіз якості матричних структур тирозинфосфатаз

Грунтуючись на інформації взятої з оглянутої літератури та інтернет джерел був виконаний пошук повних амінокислотних послідовностей цільових білків. Задля уникнення помилок назви білків приводяться у відповідності з назвами їх генів: PTP1B (PTPN1), SHP1 (PTPN6), PTP α (PTPRA).

Матричні білкові моделі відбиралися на основі методу BLAST або FASTA з бази даних RCSB Protein Data Bank. Визначення цільових матриць базувалося на повноті амінокислотної послідовності, ідентичності та якості самої моделі (роздільна здатність, Å).

Проте вибрані матричні білкові моделі не відтворюють повну амінокислотну послідовність досліджуваних тирозинфосфатаз. Тому було використано онлайн інструменти SWISS-MODEL (зазначено вище), AlphaFold для побудови трьохвимірних моделей PTP.

Була проведена оцінка якості моделей за допомогою онлайн інструменту MolProbity, аналізувалися карти Рамачандрана, загальна оцінка згідно серверу MolProbity, відсоток поганих ротаммерів (%), відсоток амінокислотних залишків з поганими зв'язків (%), відсоток амінокислотних залишків, котрі мають погані кути (%). проведена підготовка моделей отриманих з ресурсу AlphaFold для подальших експериментів, шляхом додавання атомів гідрогену до структури білка, Дані маніпуляції були виконані для забезпечення достовірності та точності подальших експериментів. Підготовлені структури тирозинфосфатаз були збережені для подальших експериментів та досліджень молекулярної механіки.

2.4 Ідентифікація сайтів зв'язування відомих інгібіторів тирозинфосфатаз

Визначення активних сайтів та сайтів зв'язування відбувалося за допомогою даних з UniProt та статей, присвячених ортологам.

Для пошуку можливих сайтів зв'язування з тирозинфосфатазами в даній роботі використовували реконструйовані тривимірні моделі тирозинфосфатаз людини різних типів: 1B, α , ϵ і 6.

2.5 Відбір та аналіз інгібіторів тирозинфосфатаз

Ліганди для цільових РТР шукали використовуючи BindingDB, ChEMBL DB, Zinc Database, PubChem. Файли інгібіторів завантажувалися у форматі .csv, надалі конвертувалися у формат smile та далі в .sdf за допомогою програмного пакету Sybyl-X 2.1.1. З лігандами у форматі .sdf вже працювали в програмному пакеті Maestro 12.5.

2.6 Передбачення структури ліганд-білкових комплексів тирозинфосфатаз

Був використаний метод молекулярного докінгу для того, щоб передбачити структури ліганд-тирозинфосфатазних комплексів. Докінг був проведений з урахуванням повної рухливості інгібітора при умові, що амінокислотні залишки мішені статично зафіксовані. Даний алгоритм було реалізовано в програмному пакеті Maestro 12.5.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Біоінформаційний пошук і аналіз послідовностей тирозинфосфатаз

Результати пошуку в базах даних таких як UniProtKB/SwissProt, ProtParam та GenBank. Останній дозволив проаналізувати геномну послідовність, визначити розміщення генів тирозинфосфатаз. Так було визначено, що SHP-1 кодується геном PTPN6, котрий знаходиться в 12 хромосомі у людини (*H. sapiens*), ген PTPN1 – PTP1B як і ген PTPRA – PTP α знаходяться у 20 хромосомі, а ген PTPRE – PTP ϵ , знаходиться в 10 хромосомі. Спираючись на дані UniProtKB/SwissProt та ProtParam були відібрані повні амінокислотні послідовності тирозинфосфатаз та послідовності їх каталітичних доменів.

Таблиця 3.1

Результати аналізу первинної структури PTP.

Назва організму	Тип Gene/UniProtKB №		Довжина сиквенсу	Молекулярна вага	AI	Gravy
<i>H. sapiens</i>	PTPN1	P18031	435	49966.8	71.72	-0.602
	PTPN6	P29350	595	67561.1	74.20	-0.687
	PTPRA	P18433	802	90719.0	79.09	-0.380
	PTPRE	P23469	700	80641.7	84.93	-0.342

Перед побудовою повнорозмірних тирозинфосфатаз була проаналізована їх вторинна структура за допомогою онлайн інструмента SOPMA. Даний інструмент з вірогідністю близько 73% здатен передбачити вторинну структуру білків.

Таблиця 3.2

Результати передбачення вторинної структури РТР.

Назва організму	РТР	α -спіралі (%)	β -складки (%)	β -повороти (%)	Random coil (%)
<i>H. sapiens</i>	РТР1В	37.01	15.17	4.83	42.99
	SHP-1	32.61	18.15	8.40	40.84
	РТР α	30.42	17.21	3.37	49.00
	РТР ϵ	35.86	16.14	4.00	44.00

3.2 Профільний аналіз доменної структури тирозинфосфатаз

Аналіз доменної будови досліджуваних тирозинфосфатаз показав наявність у всіх білках спільного фосфатазного домену – Y_phosphatase (PF00102).

Таблиця 3.3

Результати аналізу доменної структури в досліджуваних РТР.

РТР	Y_phosphatase		Y_phosphatase		SH2		SH2	
	Початок, аз	Кінець, аз	Початок, аз	Кінець, аз	Початок, аз	Кінець, аз	Початок, аз	Кінець, аз
РТР1В	40	275	-	-	-	-	-	-
SHP-1	270	514	-	-	4	79	110	194
РТР α	265	500	558	790	-	-	-	-
РТР ϵ	159	393	451	688	-	-	-	-

Як видно з результатів РТР α та РТР ϵ мають по два домени Y_phosphatase, в той час як SHP-1 має також два домени гомології Src 2. Якщо говорити про результати отримані зі Smart, то РТР1В має трансмембранну ділянку на кінці своєї послідовності, а в РТР ϵ та РТР α (дві трансмембранні ділянки) вони наявні на початку послідовності. Дані трансмембранні елементи були підтверджені за допомогою сервісу TMHMM server v2.0.

3.3 Дослідження сайтів зв'язування селективних інгібіторів на поверхні молекул тирозинфосфатаз

Спираючись на дані отримані з UniProt можемо сказати, що активні сайти цих тирозинфосфатаз знаходяться саме в доменах Y_phosphatase: PTP1B має активний сайт зв'язування в районі 215 цистеїну, SHP-1 – 453 Cys,.Щодо PTP α та PTP ϵ вони мають по два активних сайти зв'язування PTP ϵ біля 335 та 630 цистеїну, PTP α – 442 та 732 Cys. Для кожної з перерахованих PTP було знайдено додаткові сайти зв'язування: PTP1B має сайт зв'язування з субстратом біля 181 аз, а також сайт біля 262 аз; SHP-1 сайти зв'язування біля 419 аз та 500 аз; PTP α сайти зв'язування біля 410 аз, 486 аз та 732 аз; PTP ϵ сайти зв'язування біля 303 аз та 379 аз, проте всі сайти зв'язування були описані у ортологів.

3.4 Відбір та перевірка якості просторових структур тирозинфосфатаз

На початку молекулярного моделювання тирозинфосфатаз у базі даних RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) було зроблено пошук білкових структур-матриць для їх подальшого використання у цілях реконструкції повної структури PTP. Пошук проводився у межах білків людського організму (*H. sapiens*). В результаті було отримано 43 білкові матриці тирозинфосфатази 1 (PTP1B), 13 структур тирозинфосфатази 6 (SHP-1), 1 білкова модель тирозинфосфатази α (PTP α) та 4 моделі тирозинфосфатази ϵ (PTP ϵ). Більшість вище зазначених структур отримані шляхом рентгеноструктурного аналізу (X-ray crystallography). Було проведено аналіз

даних моделей на предмет ідентичності, подібності, наявності дефектів структури, роздільна якість білкової структури показники кутів ψ і ϕ (за даними карт Рамачандрана). На підставі даного аналізу були обрані найбільш оптимальніші білкові матриці для подальшого моделювання. Були вибрані наступні структури.

Таблиця 3.4

Результати аналізу матричних моделей тирозинфосфатаз, відібраних з
RCSB PDB

РТР	Білкова модель (RCSB PDB)	Роздільна здатність, Å	Довжина, аз	Покриття відносно повної посл.	
				З, аз	По, аз
РТР1В	7LFO	1.94	329	1	329
SHP-1	2B3O	2.80	532	1	532
РТР α	6UZT	1.80	601	211	802
РТР ϵ	6D4D	1.76	292	107	398

Для подальшого використання даних моделей у молекулярному докінгу з лігандами було проведено ряд маніпуляцій: видалялися молекули води, додавалися гідрогени, відбувалося утворення дисульфідних зв'язків. При оптимізації використовувався PROPKA параметр та оцінювалося RMSD.

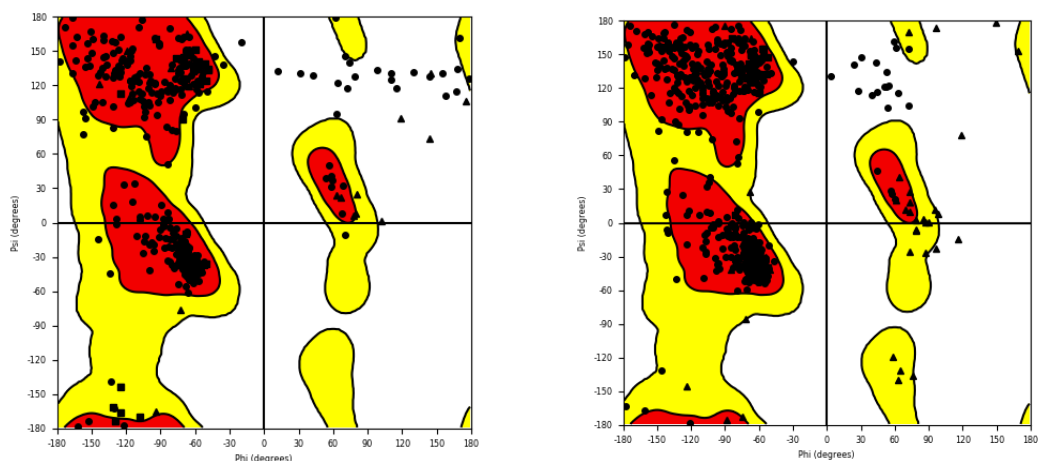


Рис. 3.4.1 Карта Рамачандрана РТР1В Рис. 3.4.2 Карта Рамачандрана SHP-1

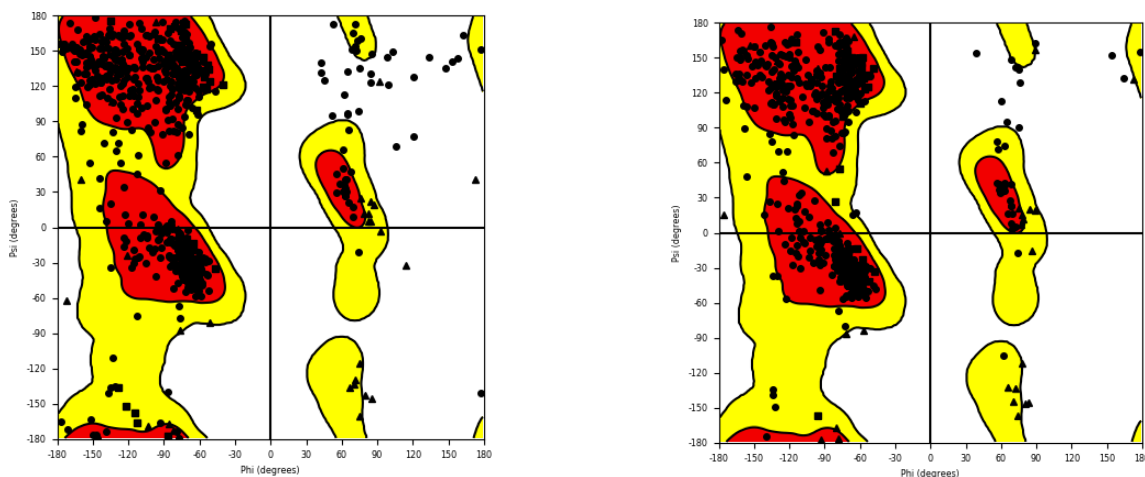


Рис. 3.4.2 Карта Рамачандрана РТР α Рис. 3.4.2 Карта Рамачандрана РТР ϵ

3.5 Створення бібліотек відомих інгібіторів тирозинфосфатаз

Не зважаючи на значну кількість описаних інгібіторів тирозинфосфатаз, вивчення структурно-динамічних механізмів їх взаємодії є актуальною темою.

В результаті пошуку на базі ChEMBL та PubChem були відібрані інгібітори для РТР1b – 18 сполук, для РТР α – 36 сполук, для SHP-1 – 84 сполуки та для РТР ϵ було знайдено всього 6 сполук. Сполуки були завантажені у форматі csv з подальшою конвертацією у формат smile, а потім у формат sdf. Підготовка лігандів відбувалася у силовому полі OPLS3e програмного пакету Maestro 12.5.

3.6 Гнучкий прямиий докінг інгібіторів тирозинфосфатаз

В результаті попередньо описаних маніпуляцій, була отримана можливість провести молекулярний докінг визначених тирозинфосфатаз з відібраними інгібіторами. Досліджували взаємодію всіх відібраних

інгібіторів для конкретної фосфатази. Спочатку зв'язування визначали в активному центрі. Відбиралися три сполуки по найкращому результату.

В результаті проведеного докінгу по активному сайту РТРє біля 335 та 630 аз та сайтам зв'язування: 303 аз, 379 аз, з шістьма інгібіторами ми визначили, що найкращий оцінку докінгу мають ряд наступних сполук представлених нижче.

Таблиця 3.5

Аналіз результатів докінгу РТРє з інгібіторами в активному сайті.

Сполука ChEMBL ID	Сайт з'язування, аз	docking score	glide gscore	glide emodel
ChEMBL518277	335	-5.429	-5.429	-45.846
ChEMBL506661	335	-5.277	-5.334	-46.412
ChEMBL454811	335	-5.132	-5.132	-40.818
ChEMBL454811	630	-5.859	-5.859	-41.758
ChEMBL506661	630	-5.390	-5.447	-44.765
ChEMBL3769851	630	-5.356	-5.356	-44.641

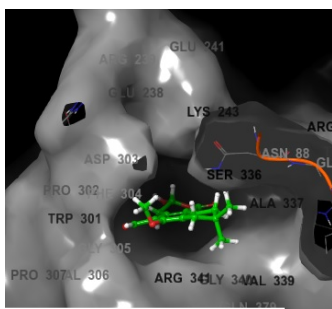


Рис. 3.6.1.

ChEMBL518277

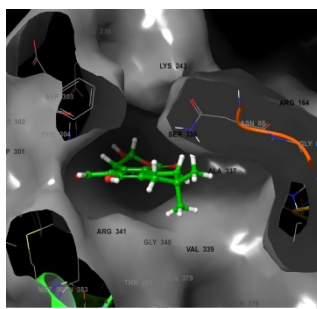


Рис. 3.6.2.

ChEMBL506661

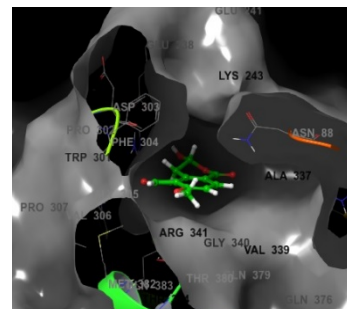


Рис. 3.6.3.

ChEMBL454811

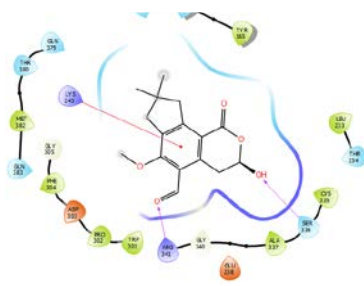


Рис. 3.6.1.

ChEMBL518277

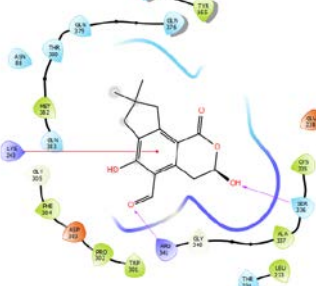


Рис. 3.6.2.

ChEMBL506661

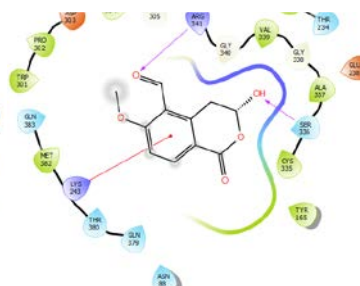


Рис. 3.6.3.

ChEMBL454811

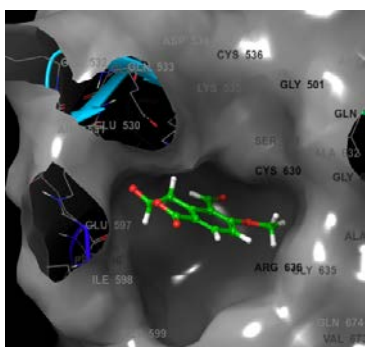


Рис. 3.6.4

CHEMBL454811

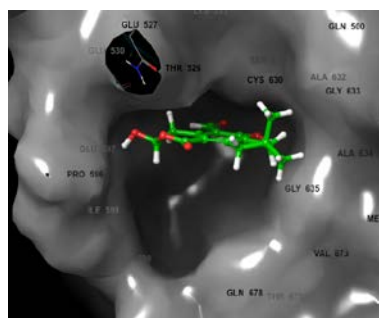


Рис. 3.6.5

CHEMBL506661

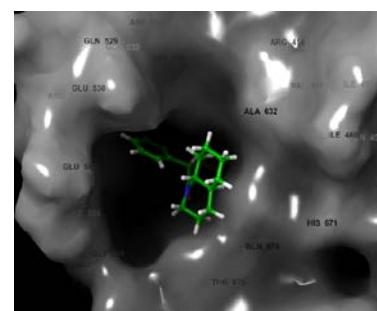
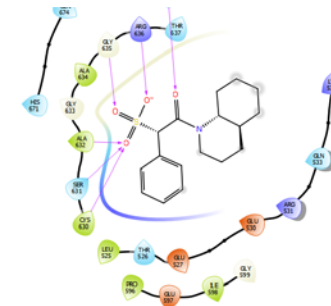
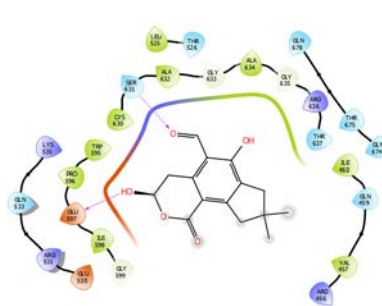
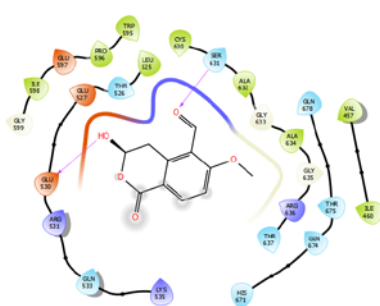


Рис. 3.6.6

CHEMBL3769851



Можна сказати, що інгібітори біля 335 аз взаємодіють циклічними сткруктурами з 243 Lys, а також у взаємодії з білком приймають участь –ОН та –СО групи. Група –SO₃ має гірший ефект зв'язування як біля 335, так і біля 630 аз. Сульфатна група доволі велика і займаючи активний центр не дає змогу циклічним групам взаємодіяти з центром. Біля іншого активного центру переважає зв'язування з –ОН та –СО групами, активну участь в цьому приймає 631 Ser.

Таблиця 3.6

Аналіз результатів докінгу РТРє з інгібіторами в сайтах зв'язування.

Сполука CHEMBL ID	Сайт з'язування, аз	docking score	glide gscore	glide emodel
CHEMBL506661	303	-5.487	-5.545	-46.177
CHEMBL3769851	303	-5.387	-5.387	-54.101
CHEMBL518277	303	-5.317	-5.317	-38.958
CHEMBL3769851	379	-5.679	-5.679	-60.631
CHEMBL454811	379	-5.597	-5.597	-40.779
CHEMBL518277	379	-5.496	-5.496	-46.229

Аналіз результатів докінгу в сайтах зв'язування показав нам ті самі сполуки, котрі зв'язувалися і в активних сайтах, що може говорити про певну універсальність відібраних сполук. Взаємодія відбувається з такими самими бічними групами та циклами.

Докінг РТРа проводився з 36 інгібіторами по активному сайту зв'язування біля 442 та 732 аз і дав наступні результати:

Таблиця 3.7

Аналіз результатів докінгу РТРа з інгібіторами в активному сайті.

Сполука ChEMBL ID	Сайт з'язування, аз	docking score	glide gscore	glide emodel
ChEMBL1823748	442	-6.052	-6.052	-62.306
ChEMBL139049	442	-5.627	-5.627	-50.913
ChEMBL55415	442	-5.382	-5.430	-46.145
ChEMBL139049	732	-5.673	-5.673	-48.958
ChEMBL67666	732	-5.127	-5.127	-70.278
ChEMBL1823750	732	-5.107	-5.107	-60.160

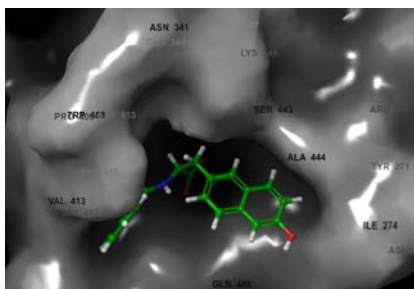


Рис. 3.6.7

ChEMBL1823748

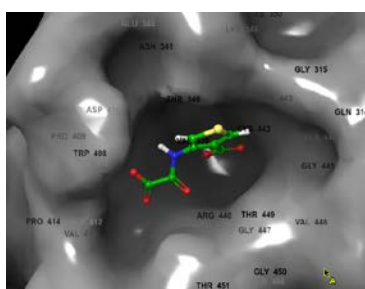


Рис. 3.6.8

ChEMBL139049

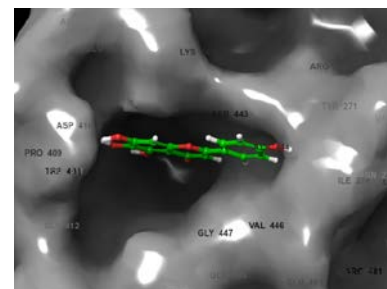


Рис. 3.6.9

ChEMBL55415

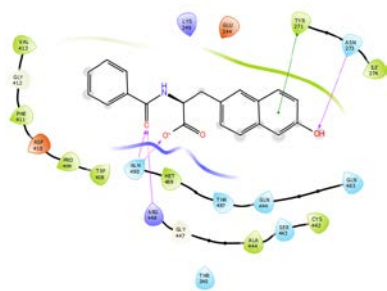


Рис. 3.6.10

ChEMBL1823748

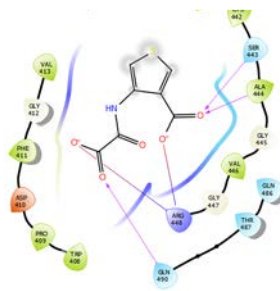


Рис. 3.6.11

ChEMBL139049

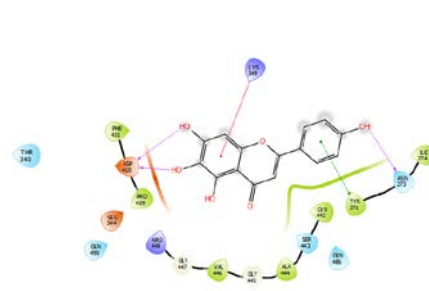


Рис. 3.6.12

ChEMBL55415

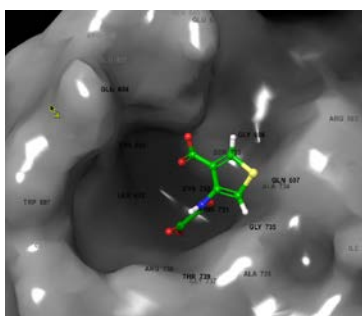


Рис. 3.6.13

CHEMBL139049

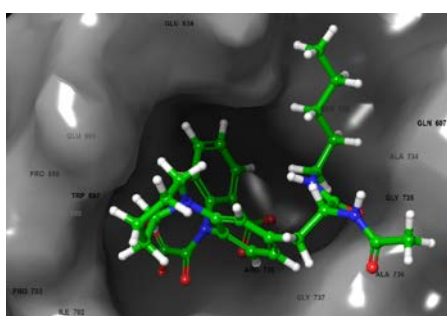


Рис. 3.6.14

CHEMBL67666

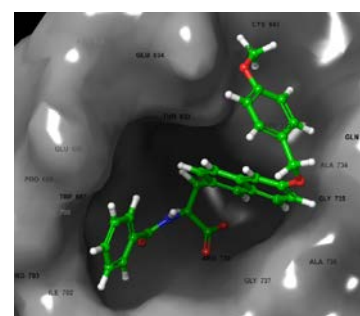


Рис. 3.6.15

CHEMBL1823750

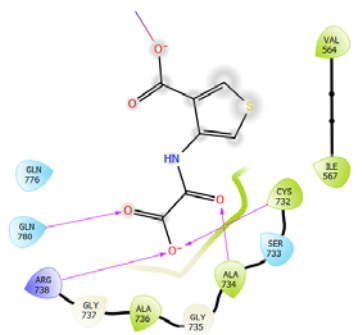


Рис. 3.6.16

CHEMBL139049

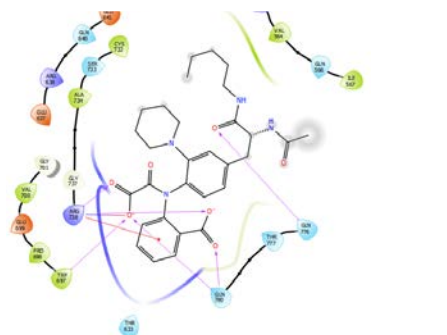


Рис. 3.6.17

CHEMBL67666

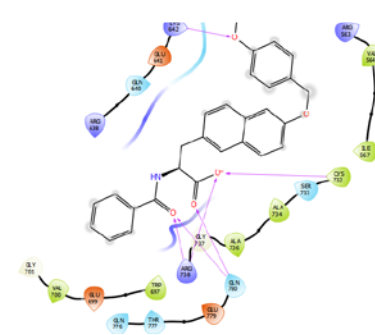


Рис. 3.6.18

CHEMBL1823750

При взаємодії інгібіторів в активному центрі біля 442 аз, активну участь у зв'язуванні беруть 448 Arg та 490 Gln взаємодіючи переважно з –ОН та –COO⁻

Частина інгібіторів, котрі показали гарні результати в сайтах зв'язування гарно взаємодіяли і з активним сайтом, проте є сполуки, які містять по декілька сульфідних груп та нітрогенвмісні цикли.

Докінг РТР1В проводився з 18 інгібіторами по активному сайту зв'язування біля 215 аз, результати наведені в таблиці.

Таблиця 3.9

Аналіз результатів докінгу РТР1В з інгібіторами в активному сайті.

Сполука PubChem CID	Сайт з'язування, аз	docking score	glide gscore	glide emodel
71463486	215	-4.341	-4.820	-39.070
123373962	215	-3.972	-3.972	-46.887
71463483	215	-3.852	-3.852	-28.928

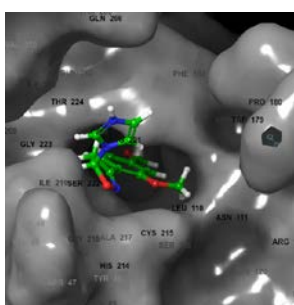


Рис. 3.6.19. 71463486

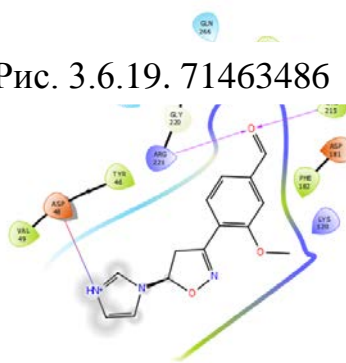


Рис. 3.6.22. 71463486

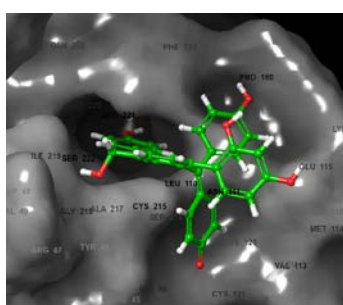


Рис. 3.6.20. 123373962

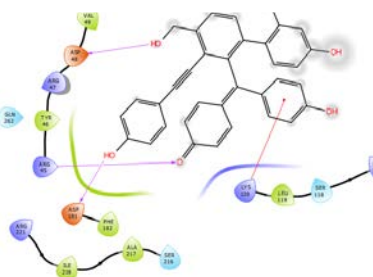


Рис. 3.6.23. 123373962

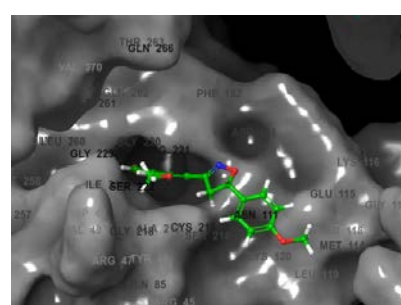


Рис. 3.6.21. 71463483

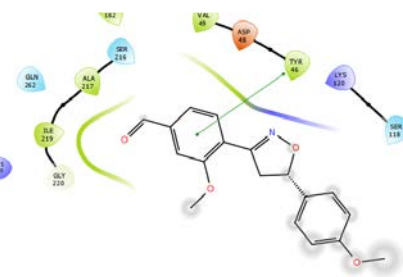


Рис. 3.6.24. 71463483

Варто відмітити, що активний сайт представлений доволі глибокою порожниною порівняно з попередніми тирозинфосфатазами. Ліганди взаємодіють з 48 Asp, 221 Arg та 215 Cys наступними групами: NH^+ , $-\text{OH}$.

Спираючись на спостереження, можна сказати, що бензольні кільця є доволі великими та можуть ввійти в активний сайт.

Таблиця 3.10

Аналіз результатів докінгу РТР1В з інгібіторами в сайтах зв'язування.

Сполука PubChem CID	Сайт з'язування, аз	docking score	glide gscore	glide emodel
4369452	181	-7.693	-8.021	-61.752
123373962	181	-4.943	-4.943	-53.268
71463486	181	-4.670	-5.149	-40.282
4369452	262	-6.888	-7.216	-58.451
71463485	262	-4.466	-4.582	-39.536
57484442	262	-4.317	-4.321	-54.800

Аналізуючи таблицю можна сказати, що 1,2,5-Thiadiazolidin-3-one-1,1-dioxide (PubChem CID: 4369452) разюче відрізняється по якості взаємодії з сайтами зв'язування.

Докінг SHP-1 з підготовленими 84 інгібіторами в активному сайті біля 453 аз дав наступні результати.

Таблиця 3.11

Аналіз результатів докінгу SHP-1 з інгібіторами в активному сайті.

Сполука ChEMBL ID	Сайт з'язування, аз	docking score	glide gscore	glide emodel
ChEMBL55415	453	-5.593	-5.641	-46.154
ChEMBL284616	453	-5.586	-5.588	-64.825
ChEMBL1823963	453	-5.401	-5.401	-69.989

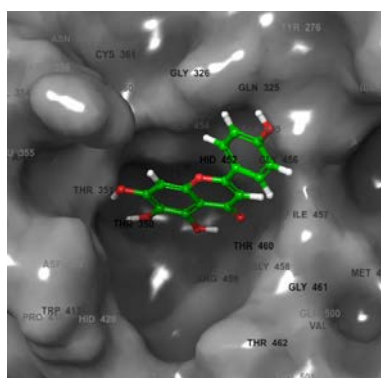


Рис. 3.6.25

ChEMBL55415

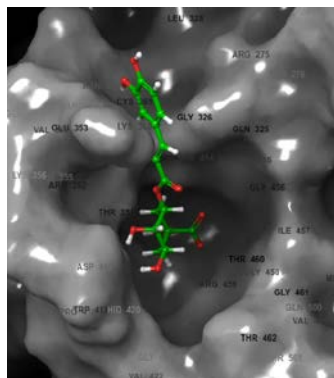


Рис. 3.6.26

ChEMBL284616

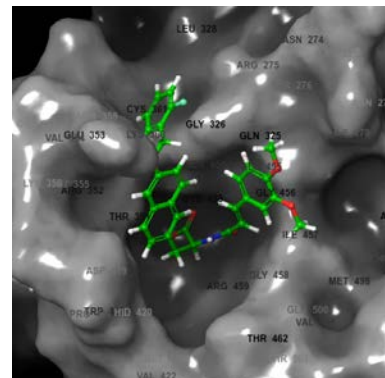


Рис. 3.6.27

ChEMBL1823963

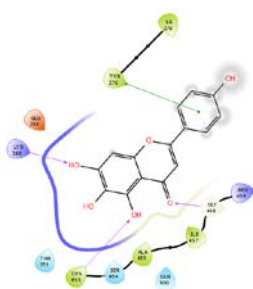


Рис. 3.6.28
CHEMBL55415

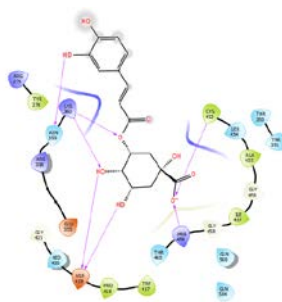


Рис. 3.6.29
CHEMBL284616



Рис. 3.6.30
CHEMBL1823963

Порівняно з попередніми РТР, SHP-1 має відносно великий активний сайт, що може вміщувати більші за розміром та вагою ліганди, такі як хлорогенова кислота. У взаємодії з лігандами беруть участь 459 Arg, 453 Cys 360 Lys та 276 Tyr зв'язуючись з гідроксильними та спиртовими групами інгібіторів. Останні дві амінокислоти також взаємодіють з циклічними структурами.

Таблиця 3.12

Аналіз результатів докінгу SHP-1з інгібіторами в сайтах зв'язування.

Сполука CHEMBL ID	Сайт зв'язування, аз	docking score	glide gscore	glide emodel
CHEMBL284616	419	-7.010	-7.012	-79.136
CHEMBL1823756	419	-5.611	-5.611	-72.538
CHEMBL1823963	419	-5.515	-5.563	-49.125
CHEMBL284616	500	-6.642	-6.645	-73.501
CHEMBL1823756	500	-6.370	-6.370	-84.418
CHEMBL1823749	500	-6.031	-6.031	-70.411

Спираючись на дані з таблиці – найкраща взаємодія в сайті зв'язування відбувається за участі хлорогенової кислоти (CHEMBL284616).

В заключення можна відмітити загальну тенденцію, яка була підтверджена даними з літератури, що чим більша молекула інгібітора, тим гірше вона зв'язується з активним центром. Збільшення молекули інгібітора призводить до більшої специфічності у зв'язуванні, проте також веде до гіршої доступності та прохідності ліганда.

ВИСНОВКИ

1. На основі даних літератури було встановлено, що тирозинфосфатази PTP1B, SHP-1, PTP α , PTP ϵ впливають на ріст мікротрубочок.

2. В результаті біоінформатичного аналізу відібраних PTP, зокрема передбачення їх вторинних структур, доменної організації, сайтів зв'язування було з'ясовано, що всі PTP мають у своєму складі домен Y_phosphatase, характерний для тільки цих тирозинфосфатаз.

3. В результаті аналізу за гомологією сиквенсу було встановлено, що цільові тирозинфосфатази мають просторову структуру встановлену експериментально, тоді як їх ортологи потребують моделювання просторової структури.

4. В результаті аналізу хімічних баз даних було показано наявність близько 2000 інгібіторів тирозинфосфатаз PTP1B, SHP-1, PTP α , PTP ϵ з експериментальною активністю.

5. Проведено молекулярний ліганд-білковий докінг по активним сайтам зв'язування. Загальна тенденція, яка була підтверджена даними з літератури, що чим більша молекула інгібітора, тим гірше вона зв'язується з активним центром. Хоча певні сайти є достатньо великими і можуть вмістити великі ліганди.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sudarshan Gadadhar, Satish Bodakuntla, Kathiresan Natarajan, Carsten Janke. (Published by The Company of Biologists Ltd. – 2017 Apr 15) The tubulin code at a glance. doi: 10.1242/jcs.199471.
2. Pavla Binarová, Jack Tuszynski (Editorial – 2019 Oct 22). Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease. doi: 10.3390/cells8101294.
3. I-Tien Yeh 1, Richard F Ludueña (Cell Motility and the Cytoskeleton – 2004 Feb) The betaII isotype of tubulin is present in the cell nuclei of a variety of cancers. doi: 10.1002/cm.10157.
4. Marju Puurand, Kersti Tepp, Natalja Timohhina, Jekaterina Aid, Igor Shevchuk, Vladimir Chekulayev, Tuuli Kaambre (Cells. Published online – 2019 Mar 13) Tubulin β II and β III Isoforms as the Regulators of VDAC Channel Permeability in Health and Disease. doi: 10.3390/cells8030239.
5. Annalisa Mencarelli, Paolo Prontera, Gabriela Stangoni, Elisabetta Mencaroni, Nicola Principi, and Susanna Esposito (Int J Mol Sci. – 2017 Oct 29) Epileptogenic Brain Malformations and Mutations in Tubulin Genes: A Case Report and Review of the Literature. doi: 10.3390/ijms18112273.
6. Pavel DRABER, Anastasiya Klebanovych, Vladimira Sladkova, Tetyana Sulimenko, Vera Vosecka, Zuzana Rubikova, Eduarda Draberova and Vadym Sulimenko (J Immunol – 2020 May 1) Protein tyrosine phosphatase SHP-1 modulates microtubule organization in later stages of mast cell activation.
7. PATRICK LEBOK,^{1,*} MELIKE ÖZTÜRK,^{1,*} UWE HEILENKÖTTER,² FRITZ JAENICKE,³ VOLKMAR MÜLLER,³ PETER PALUCHOWSKI,⁴ STEFAN GEIST,⁴ CHRISTIAN WILKE,⁵ EICKE BURANDT,¹ ANNETTE LEBEAU,¹ WALDEMAR WILCZAK,¹ TILL KRECH,¹ RONALD SIMON,¹ GUIDO SAUTER,¹ and ALEXANDER QUAAS¹ (Oncol Lett. – 2016 Feb 9.) High levels of class III β -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. doi: 10.3892/ol.2016.4206.

8. Barbora Hořejší 1, Stanislav Vinopal, Vladimíra Sládková, Eduarda Dráberová, Vadym Sulimenko, Tetyana Sulimenko, Věra Vosecká, Anatoly Philimonenko, Pavel Hozák, Christos D Katsetos, Pavel Dráber (J Cell Physiol. – 2012 Jan) Nuclear γ -tubulin associates with nucleoli and interacts with tumor suppressor protein C53. doi: 10.1002/jcp.22772.

9. Carsten Janke (J Cell Biol. – 2014 Aug 18) The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. doi: 10.1083/jcb.201406055.

10. Jana Chumová, Hana Kourová, Lucie Trögelová, Petr Halada, and Pavla Binarová (Cells. – 2019 Mar 19) Microtubular and Nuclear Functions of γ -Tubulin: Are They LINCed. doi: 10.3390/cells8030259.

11. Timothy D Riehlman 1, Zachary T Olmsted, Carmen N Branca, Adam M Winnie, Lan Seo, Leilani O Cruz, Janet L Paluh (J Cell Sci. – 2013 Oct 1) Functional replacement of fission yeast γ -tubulin small complex proteins Alp4 and Alp6 by human GCP2 and GCP3. doi: 10.1242/jcs.128173.

12. Anastasiya Klebanovych, Vladimíra Sládková, Tetyana Sulimenko, Věra Vosecká, Martin Čapek, Eduarda Dráberová, Pavel Dráber, Vadym Sulimenko (Cells. – 2019 Apr 11) Regulation of Microtubule Nucleation in Mouse Bone Marrow-Derived Mast Cells by Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1. doi: 10.3390/cells8040345.

13. Neus Teixidó-Travesa 1, Joan Roig, Jens Lüders (J Cell Sci. – 2012 Oct 1) The where, when and how of microtubule nucleation - one ring to rule them all. doi: 10.1242/jcs.106971.

14. Wei-Qing Wang 1, Jin-Peng Sun, Zhong-Yin Zhang (Curr Top Med Chem. – 2003 Mar 7) An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily. doi: 10.2174/1568026033452302.

15. Carsten Frank 1, Carmen Burkhardt, Diana Imhof, Jens Ringel, Olaf Zschörnig, Karin Wieligmann, Martin Zacharias, Frank-D Böhmer (J Biol Chem. – 2004 Mar 19) Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. doi: 10.1074/jbc.M309096200.

16. Mark F McCarty, Aaron Lerner, James J DiNicolantonio and Carina Benzvi (J Asthma Allergy – 2021 Oct 27) Nutraceutical Aid for Allergies – Strategies for Down-Regulating Mast Cell Degranulation. doi: 10.2147/JAA.S332307.
17. Tal Sines, Shira Granot-Attas, Sabrina Weisman-Welcher, Ari Elson (Mol Cell Biol. – 2007 Oct 27) Association of tyrosine phosphatase epsilon with microtubules inhibits phosphatase activity and is regulated by the epidermal growth factor receptor. doi: 10.1128/MCB.02096-06.
18. Ekaterina Kuznetsova, Boguslaw Nocek, Greg Brown, Kira S. Makarova, Robert Flick, Yuri I. Wolf, Anna Khusnutdinova, Elena Evdokimova, Ke Jin, Kemin Tan, Andrew D. Hanson, Ghulam Hasnain, Rémi Zallot, Valérie de Crécy-Lagard, Mohan Babu, Alexei Savchenko, Andrzej Joachimiak, Aled M. Edwards, Eugene V. Koonin, and Alexander F. Yakunin (J Biol Chem. – 2015 Jul 24) Functional Diversity of Haloacid Dehalogenase Superfamily Phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*. doi: 10.1074/jbc.M115.657916.
19. Sylvain Egloff, Justyna Zaborowska, Clélia Laitem, Tamás Kiss, and Shona Murphy (Mol Cell. – 2012 Jan 13) Ser7 Phosphorylation of the CTD Recruits the RPAP2 Ser5 Phosphatase to snRNA Genes. doi: 10.1016/j.molcel.2011.11.006.
20. Kehui Xiang, James L. Manley, and Liang Tong (Nat Commun. – 2012 Jul 10) The yeast regulator of transcription protein Rtr1 lacks an active site and phosphatase activity. doi: 10.1038/ncomms1947.
21. Seema Irani, S. D. Yogesha, Joshua Mayfield, Mengmeng Zhang, Yong Zhang, Wendy L. Matthews, Grace Nie, Nicholas A. Prescott, and Yan Jessie Zhang (Sci Signal – 2016 Mar 1) Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Rtr1 reveals an active site for an atypical phosphatase. doi: 10.1126/scisignal.aad4805.
22. Guan, K. L.; Broyles, S.; Dixon, J. E. (Nature 1991 Mar 28) A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by *Vaccinia virus*. doi: 10.1038/350359a0.

23. Xin-Min Zheng, Ross J. Resnick, and David Shalloway (EMBO J. – 2000 Mar 1) A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTP α . doi: 10.1093/emboj/19.5.964.
24. Carlos O Arregui, Ángela González, Juan E Burdisso, and Ana E González Wusener (Cell Adh Migr. – 2013 Sep 1) Protein tyrosine phosphatase PTP1B in cell adhesion and migration. doi: 10.4161/cam.26375.
25. Alexander Brobeil,* Michaela Graf, Moritz Eiber, and Monika Wimmer (Biomolecules. – 2012 Mar 23) Interaction of PTPIP51 with Tubulin, CGI-99 and Nuf2 During Cell Cycle Progression. doi: 10.3390/biom2010122.
26. Rallabandi Harikrishna Reddy, Hackyoung Kim, Seungbin Cha, Bongsoo Lee, Young Jun Kim (J Microbiol Biotechnol. – 2017 May 28) Structure-Based Virtual Screening of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors: Significance, Challenges, and Solutions. doi: 10.4014/jmb.1701.01079.
27. Masilamani Elizabeth Sobhia, Stanly Paul ML, Ranajit Shinde, Mrudula Potluri, Venkatesh Gundam, Amandeep Kaur, Thongtinlal Haokip (Expert Opin Ther Pat. – 2012 Feb 22) Protein tyrosine phosphatase inhibitors: a patent review (2002 - 2011). doi: 10.1517/13543776.2012.661414.
28. Mark J. Chen,^{1,2} Jack E. Dixon,³ Gerard Manning¹ (SCIENCE SIGNALING 2017 Apr 11) Genomics and evolution of protein phosphatases. doi: 10.1126/scisignal.aag1796.
29. Sarah R. Offley and Martin C. Schmidt (Curr Genet. – 2019 Feb) Protein Phosphatases of *S. Cerevisiae*. doi: 10.1007/s00294-018-0884-y.
30. Dahlin JS, Maurer M, Metcalfe DD, Pejler G, Sagi-Eisenberg R, Nilsson G. (Allergy Eur J Allergy Clin Immunol. 2021 Jan) The ingenious mast cell: contemporary insights into mast cell behavior and function. doi: 10.1111/all.14881.