

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРЕННИХ ПОЛОСТЕЙ, ТУННЕЛЕЙ И ПОР В МОЛЕКУЛАХ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

М.Г. Холявка<sup>1,2</sup>, Т.В. Краюшкина<sup>1</sup>, Н.А. Балбеков<sup>1</sup>, А.А. Михайлова<sup>1</sup>,  
О.В. Путинцева<sup>1</sup>, В.Г. Артюхов<sup>1</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

2 – ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 31.01.2024 г.

**Аннотация.** Щелочные фосфатазы – группа ферментов, содержащихся практически во всех тканях живого организма, с преимущественной локализацией в печени, костях и плаценте. Фосфатазы в клетках участвуют в реакциях отщепления остатка фосфорной кислоты от органических соединений.

Активность щелочной фосфатазы в организме повышается при многих заболеваниях, сопровождающихся повреждением тканей печени, костей, почек и других органов. Фосфатазы присутствуют в организмах всех животных и играют важную роль в клеточном метаболизме углеводов, нуклеотидов и фосфолипидов, а также в формировании костной ткани. Изменение активности некоторых фосфатаз в крови является важным диагностическим показателем многих заболеваний. Генетически обусловленные нарушения синтеза щелочной фосфатазы или функциональной активности фермента являются одной из причин серьезных наследственных заболеваний.

Известно, что функционирование ферментов как в мономерной, так и в олигомерной формах во многом определяется их пространственной структурой. В связи с этим изучение структурной организации щелочных фосфатаз, а также закономерностей ее изменения в ходе формирования олигомерных комплексов во многом способствует совершенствованию путей регуляции их активности. Туннели, внутренние полости и поры являются элементами пространственной структуры молекул, влияют на термостабильность фермента, позволяют выяснить механизмы функционирования и особенности пространственной организации щелочных фосфатаз.

В настоящей работе исследованы молекулы щелочных фосфатаз из *Thermus thermophilus* (PDB ID: 7KWD), *Halobacterium salinarum R1* (PDB ID: 2X98), *Escherichia coli* (PDB ID: 1ANJ) и *Antarctic bacterium TAB5* (PDB ID: 2W5V). Изучены локализация и строение их внутренних пространственных структур, таких как полости, поры и туннели.

**Ключевые слова:** щелочная фосфатаза, пространственная структура, внутренние полости, туннели, поры

Щелочная фосфатаза – фермент, впервые описанный Suzuki et al. (1907). Он широко распространен в природе и содержится во многих тканях человеческого тела, таких как печень, почки, кости и клетки крови. Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) представляет собой мембранно-связанный гликопротеин с сиаловой кислотой в качестве гликозидного фрагмента, относится к фосфомоноэстеразам, катализирует гидролиз сложных моноэфиров фосфорной кислоты (при щелочных значениях pH среды) с образованием фосфата и соответствующего

спирта [1]. Природа и важность этого фермента в биологических системах сделали оценку активности щелочной фосфатазы одним из наиболее часто выполняемых ферментативных тестов [2].

Несмотря на то, что щелочные фосфатазы присутствуют во многих тканях млекопитающих и были достаточно хорошо изучены за последние несколько лет, о них все еще далеко не все известно. Костный изофермент может участвовать в кальцификации костей млекопитающих. Считается, что изофермент кишечника играет роль в транспорте фосфата в эпителиальные клетки кишечника [3, 4]. Щелочная фосфатаза относится к группе суперсемейства металлоферментов со сходными

металлосодержащими участками и структурой активного центра. Щелочная фосфатаза удивительно гетерогенна, что обусловлено как генетически, так и частично посттрансляционными модификациями. Первые структурные и иммунологические исследования показали, что три различных типа щелочной фосфатазы (печеночно-костно-почечная, кишечная и плацентарная) кодируются тремя разными генными локусами [5]. Впоследствии было высказано предположение о том, что щелочная фосфатаза человека кодируется четырьмя основными генами, что коррелирует с названием ткани, в которой в основном присутствует фермент [6]. В настоящее время у щелочной фосфатазы человека выделяют пять изоферментов: плацентарный, костный, печеночный, кишечный и почечный [7]. У млекопитающих активность щелочной фосфатазы обнаружена в широком спектре тканей и органов, и этот фермент локализован и прикреплен к клеточным мембранам через молекулы гликозилфосфатидилинозитола.

Целью данной работы было изучение пространственной организации и выявление особенностей в структуре щелочных фосфатаз из различных источников.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали щелочные фосфатазы из *Thermus thermophilus* (PDB ID: 7KWD) [8], *Halobacterium salinarum* R1 (PDB ID: 2X98) [9], *Escherichia coli* (PDB ID: 1ANJ) [10] и *Antarctic bacterium* (PDB ID: 2W5V) [11].

Параметры пор, туннелей и полостей были рассчитаны с помощью программы Mole 2.5.17.4.24 (<http://mole.chemi.muni.cz>) [12-14]. Под «полостью» понимали свободное замкнутое пространство внутри молекулы фермента, которое не контактировало с поверхностью глобулы. «Порой» считали свободное пространство внутри молекулы белка, которое сообщалось с поверхностью только через одно отверстие, то есть углубление на поверхности молекулы или в ее толще. «Туннель» означал локализацию сквозного отверстия в белковой глобуле, то есть свободное пространство внутри молекулы, связанное с поверхностью молекулы через два или более отверстий [15, 16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. Исследование молекулы щелочной фосфатазы из *Thermus thermophilus*

В исследуемой модели щелочной фосфатазы из *Thermus thermophilus* нами было обнаружено 19

внутренних полостей (рис. 1), суммарный объем которых составил 3193,25 Å<sup>3</sup>. Отчетливо видно, что фермент из *T. thermophilus* состоит из двух субъединиц. По пространственной структуре и аминокислотному составу данные субъединицы сходны. Внутренние полости расположены симметрично в двух субъединицах. Самая крупная внутренняя полость выявлена на стыке этих двух субъединиц.

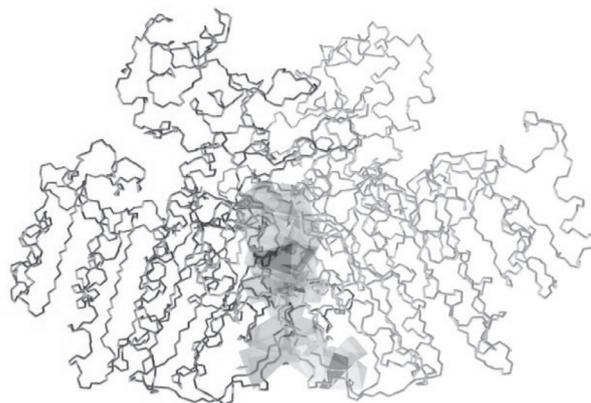


Рис. 1. Внутренние полости в молекуле щелочной фосфатазы из *Thermus thermophilus* (PDB ID: 7KWD)

В данной модели обнаружено также 7 туннелей. На рис. 2 можно заметить небольшие отклонения от их симметричного расположения. Так, например, туннель под номером 1 симметричен туннелю под номером 2, а туннель под номером 3 – четвертому. Если обратить внимание на оставшиеся три туннеля, то можно заметить, что они расположены не симметрично, различаются по пространственной организации и находятся в одной субъединице. Отсюда можно сделать вывод о том, что нами были выявлены туннели, присутствующие в одной субъединице и отсутствующие в другой («уникальные туннели»), что может указывать на некоторые различия в конформации субъединиц. Возможно, это

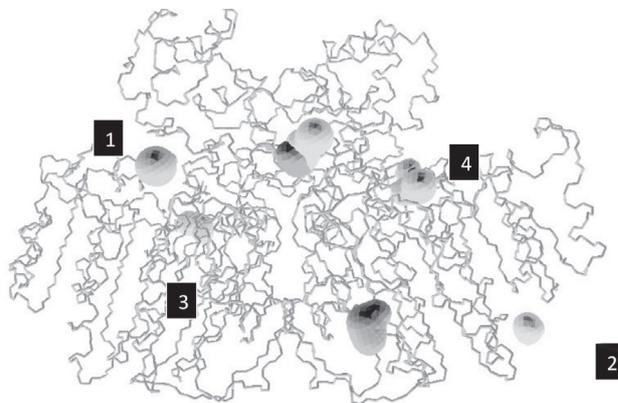


Рис. 2. Туннели в молекуле щелочной фосфатазы из *Thermus thermophilus* (PDB ID: 7KWD)

связано с тем, что данные субъединицы выполняют различные функции при катализе.

При изучении модели щелочной фосфатазы из *Thermus thermophilus* была обнаружена одна пора. Ее локализацию можно увидеть на рис. 3.

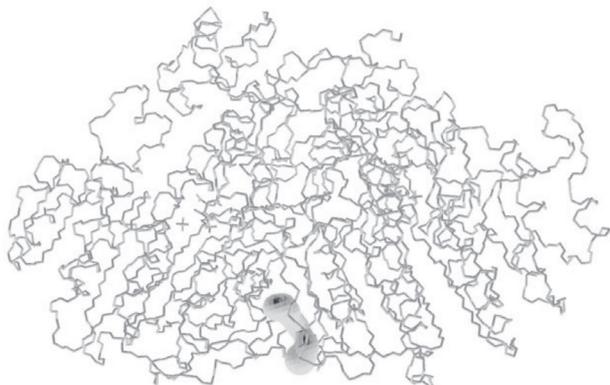


Рис. 3. Пора в молекуле щелочной фосфатазы из *Thermus thermophilus* (PDB ID: 7KWD)

#### 2. Исследование молекулы щелочной фосфатазы из *Halobacterium salinarum* R1

В составе фосфатазы *Halobacterium salinarum* R1 было выявлено 12 внутренних полостей (рис. 4). Их суммарный объем составил 2602,21 Å<sup>3</sup>.

По пространственной структуре и аминокислотному составу субъединицы фермента сходны, как и у модели из *Thermus thermophilus*. Однако было замечено, что внутренние полости не симметричны друг другу ни внутри одной субъединицы, ни относительно противоположной. Их количество внутри двух субъединиц также различается. Эту асимметрию можно наблюдать на рис. 4.

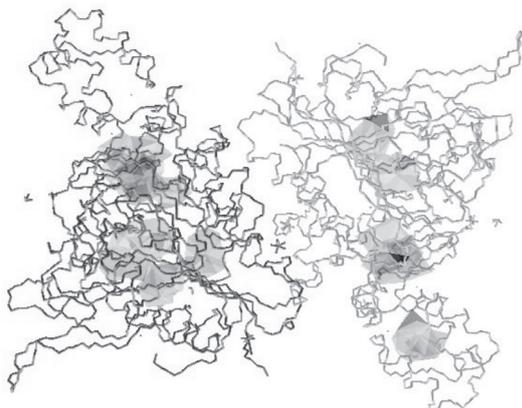


Рис. 4. Внутренние полости в молекуле щелочной фосфатазы из *Halobacterium salinarum* R1 (PDB ID: 2X98)

В молекуле данного фермента нами было обнаружено 11 туннелей. Их локализация представлена на рис. 5. Туннели отличаются друг от друга

по пространственной организации и количеству в двух субъединицах. Некоторые туннели сливаются, образуя один большой туннель. Можно отметить, что туннели по номерам 1, 2, 3 и 4, находящиеся на стыке субъединиц и образующие более крупные туннели, симметричны друг другу.

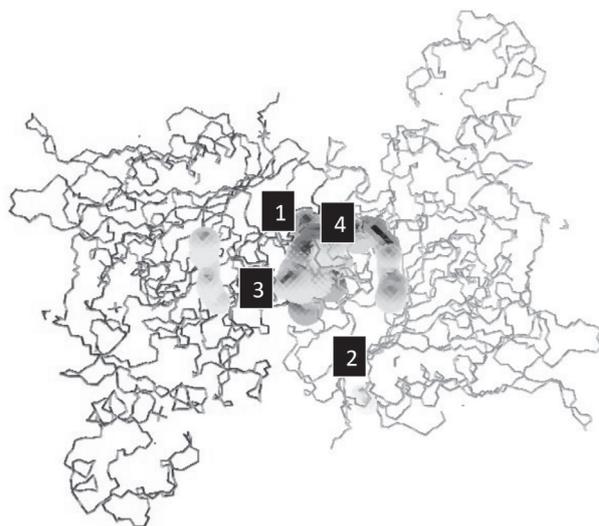


Рис. 5. Туннели в молекуле щелочной фосфатазы из *Halobacterium salinarum* R1 (PDB ID: 2X98)

В молекуле фосфатазы из *Halobacterium salinarum* R1 было обнаружено 7 пор (рис. 6). Все они находятся на стыке двух субъединиц и перекрываются между собой, кроме одной, находящейся под номером 1. Строение данных пор сходное.

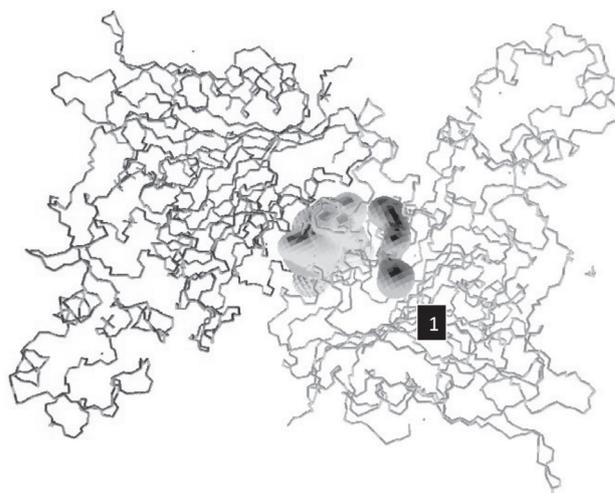


Рис. 6. Поры в молекуле щелочной фосфатазы из *Halobacterium salinarum* R1 (PDB ID: 2X98)

#### 3. Исследование молекулы щелочной фосфатазы из *Escherichia coli*

В модели щелочной фосфатазы из *Escherichia coli* нами было обнаружено 19 внутренних полостей (рис. 7), суммарный объем которых составил

3563,21 Å<sup>3</sup>. Фермент, выделенный из *E. coli*, состоит из двух субъединиц. Пространственная структура и аминокислотный состав данных субъединиц незначительно различаются. Отсюда следует асимметричное расположение внутренних полостей, которое можно видеть на рис. 7. В основном все полости расположены на стыке субъединиц.

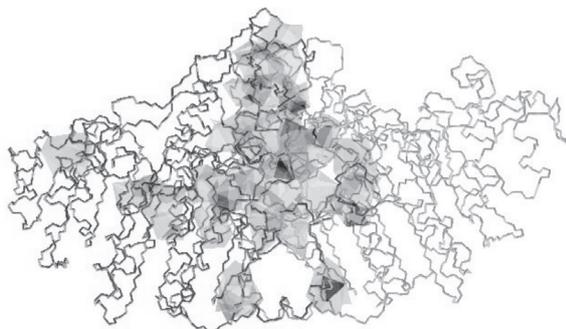


Рис. 7. Внутренние полости в молекуле щелочной фосфатазы из *Escherichia coli* (PDB ID: 1ANJ)

В молекуле данного фермента нами было обнаружено 2 туннеля. Их локализация и структура представлены на рис. 8. Туннели располагаются в разных субъединицах, отличаются по строению и, вероятно, функциям, выполняемым при катализе.

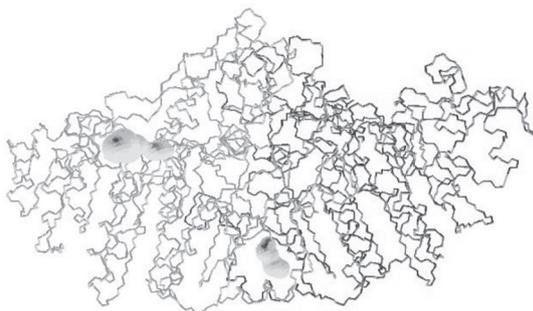


Рис. 8. Туннели в молекуле щелочной фосфатазы из *Escherichia coli* (PDB ID: 1ANJ)

В модели фосфатазы из *Escherichia coli* была выявлена одна пора. Ее локализацию относительно двух субъединиц можно увидеть на рис. 9.

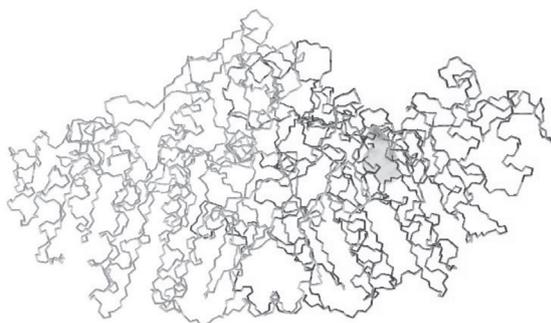


Рис. 9. Пора в молекуле щелочной фосфатазы из *Escherichia coli* (PDB ID: 1ANJ)

#### 4. Исследование молекулы щелочной фосфатазы из *Antarctic bacterium* TAB5

В составе фосфатазы *A. bacterium* было выявлено 14 внутренних полостей (рис. 10). Их сум-

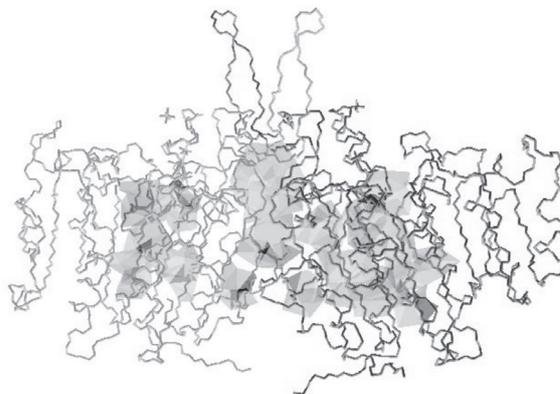


Рис. 10. Внутренние полости в молекуле щелочной фосфатазы из *Antarctic bacterium* TAB5 (PDB ID: 2W5V)

марный объем их составил 2561,41 Å<sup>3</sup>.

Щелочная фосфатаза из *A. bacterium* состоит из двух сходных по пространственной структуре и аминокислотному составу субъединиц. Из рис. 10 следует, что внутренние полости расположены симметрично. Однако у фосфатазы *Antarctic bacterium* наблюдается некоторая асимметрия в количестве полостей: в одной из субъединиц их количество больше. Самые крупные внутренние полости выявлены на стыке двух субъединиц.

В молекуле данного фермента нами было обнаружено 3 туннеля. Их структура и локализация представлены на рис. 11. Два крайних туннеля симметричны друг другу, а центральный находится

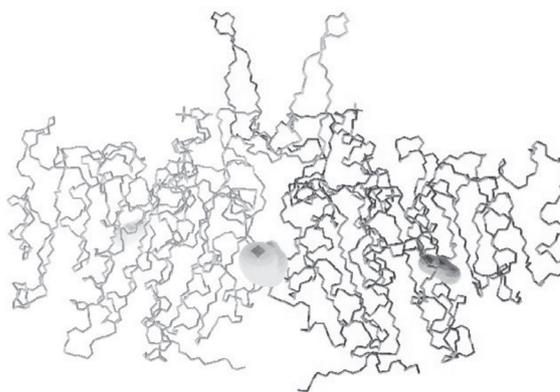


Рис. 11. Туннели в молекуле щелочной фосфатазы из *Antarctic bacterium* TAB5 (PDB ID: 2W5V)

ся на стыке двух субъединиц.

В молекуле фосфатазы из *A. bacterium* поры

отсутствуют.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что пространственная структура белков содержит множество элементов, таких как: туннели, полости и поры [17, 18], которые могут иметь различные функции в составе молекул фосфатаз. В связи с этим возникает необходимость в изучении особенностей их локализации и строения в зависимости от функциональной активности фермента [19, 20]. Нами были выявлены особенности состава, структуры и локализации внутренних полостей, туннелей и пор в составе молекул щелочных фосфатаз из *Thermus thermophilus*, *Halobacterium salinarum* R1, *Escherichia coli* и *Antarctic bacterium*. Установлено, что самые крупные внутренние полости возникают на стыке субъединиц. Показано, что полости будут симметричны относительно друг друга, если субъединицы имеют одинаковую пространственную организацию и аминокислотный состав.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 г., проект № FZGU-2023-0009.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Tang Z. Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects / Z. Tang, H. Chen, H. He, C. Ma // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 113. – P. 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.019>
2. Sharma U. Alkaline Phosphatase: An Overview / U. Sharma, D. Pal, R. Prasad // *Ind J Clin Biochem*. – 2014. – Vol. 29. – P. 269-278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
3. Makris K. Alkaline Phosphatases: Biochemistry, Functions, and Measurement / K. Makris, C. Mousa, E. Cavalier // *Calcif Tissue Int*. – 2023. – Vol. 112. – P. 233-242. <https://doi.org/10.1007/s00223-022-01048-x>
4. Cannalire G. Alkaline phosphatase in clinical practice in childhood: Focus on rickets. / G. Cannalire, S. Piloni, S. Esposito, G. Biasucci, A. Di Franco, M.E. Street // *Front. Endocrinol*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1111445. doi:10.3389/fendo.2023.1111445
5. Murray E. Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity / E. Murray, D. Provvedini, D. Curran, B. Catherwood, H. Sussman, S. Manolagas // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 1987. – Vol. 2. – № 3. – P. 231-238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020310>
6. Binda C. A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure / C. Binda, A. Coda, R. Angelini, R. Federico, P. Ascenzi, A. Mattevi // *Structure*. – 1999. – Vol. 7. – № 3. – P. 265-276.
7. Lee S. M. Antineoplastic effect of a novel chemopreventive agent, neokestose, on the Caco-2 cell line via inhibition of expression of nuclear factor-κB and cyclooxygenase-2 / S. M. Lee, J. Y. Chang, J. S. Wu, D. C. Sheu // *Molecular medicine reports*. – 2015. – Vol. 12. – № 1. – P. 1114-1118.
8. Zaher D. M. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors / D. M. Zaher, M. I. El-Gamal, H. A. Omar, S. N. Aljareh, S. A. Al-Shamma, A. J. Ali, S. Zaib, J. Iqbal // *Arch Pharm*. – 2020. – Vol. 353. – № 5. – P. e2000011. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000011>
9. Borges B. Dynamic cross correlation analysis of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase and determinants of thermostability / B. Borges, G. Gallo, C. Coelho, N. Negri, F. Maiello, L. Hardy, M. Wurtele // *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. – 2021. – Vol. 1865. – № 7. – P. 129895.
10. Wende A. Structural and biochemical characterization of a halophilic archaeal alkaline phosphatase / A. Wende, P. Johansson, R. Vollrath, M. Dyal-Smith, D. Oesterhelt, M. Grininger // *J Mol Biol*. – 2010. – Vol. 400. – № 1. – P. 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.057>
11. Murphy J. E. Mutations at positions 153 and 328 in *Escherichia coli* alkaline phosphatase provide insight towards the structure and function of mammalian and yeast alkaline phosphatases / J. E. Murphy, T. T. Tibbitts, E. R. Kantrowitz // *J Mol Biol*. – 1995. – Vol. 253. – № 4. – P. 604-617.
12. Koutsioulis D. Coordination sphere of the third metal site is essential to the activity and metal selectivity of alkaline phosphatases / D. Koutsioulis, A. Lyskowski, S. Maki, E. Guthrie, G. Feller, V. Bouriotis, P. Heikinheimo // *Protein Sci*. – 2010. – Vol. 19. – № 1. – P. 75-84.
13. Холявка М.Г. Изучение *in silico* особенностей и механизмов адсорбции целлюлазы из *Aspergillus niger* на синтетических полимерах / М.Г. Холявка, Д.Ю. Богомолов, М.А. Албет, В.Г. Артюхов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2022. – Т. 22. – № 5. – С. 760-773. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10695>
14. Холявка М.Г. *In silico* анализ особенностей пространственной организации молекул амилаз различного происхождения / М.Г. Холявка, Д.Ю. Богомолов, В.Г. Артюхов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.

Овчинникова. – 2023. – Т. 19. – № 3. – С. 71-80.

15. Макин С.М. Особенности взаимодействия экзотинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с моно- и полисахаридами / С.М. Макин, А.Н. Дубовицкая, Д.Ю. Богомолов, М.С. Кондратьев, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2023. – Т. 19. – № 4. – С. 57-65.

16. Stank A. Protein binding pocket dynamics / A. Stank, D. B. Kokh, J. C. Fuller, R. C. Wade // Acc Chem Res. – 2016. – Vol. 49. – № 5. – P. 809-815. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00516>.

17. Brezovsky J. Software tools for identification, visualization and analysis of protein tunnels and channels / J. Brezovsky, E. Chovancova, A. Gora, A. Pavelka, L. Biedermannova, J. Damborsky // Biotechnology Advances. – 2013. – Vol. 31. – № 1. – P. 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.002>

18. Сакибаев Ф.А. Особенности пространственных структур молекул растительных протеаз –

бромелина, фицина и папаина / Ф.А. Сакибаев, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2020. – № 3. – С. 57-62.

19. Богомолов Д.Ю. Изучение *in silico* структурных особенностей липаз из различных продуцентов / Д.Ю. Богомолов, Ф.А. Сакибаев, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, В.Ф. Селеменев // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2021. – Т. 21. – № 4. – С. 555-567.

20. Сакибаев Ф.А. *In silico* исследование состава и структуры внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле папаина при связывании с различными лигандами / Ф.А. Сакибаев, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2021. – № 1. – С. 61-65.

21. Сакибаев Ф.А. *In silico* исследование состава и структуры внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле бромелина при связывании с различными лигандами / Ф.А. Сакибаев, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2021. – № 2. – С. 50-54.

*Воронежский государственный университет*

*\*Холявка Марина Геннадьевна, д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета, профессор кафедры «Физика», ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет*

*E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Voronezh State University*

*Holyavka Marina G., DSci., professor of Biophysics and biotechnology department, Professor of the Department of Physics, Sevastopol State University*

*E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Краюшкина Татьяна Владимировна, студентка кафедры биофизики и биотехнологии*

*Krayushkina Tatyana V., student of Biophysics and biotechnology department*

*Балбеков Никита Александрович, студент кафедры физической химии*

*E-mail: balbekov.nikita@yandex.ru*

*Balbekov Nikita A., student of Physical Chemistry Department*

*E-mail: balbekov.nikita@yandex.ru*

*Михайлова Анастасия Алексеевна, студентка кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии*

*E-mail: minas36@yandex.ru*

*Mikhailova Anastasya A., student of high molecular compounds and colloidal chemistry department*

*E-mail: minas36@yandex.ru*

*Путинцева Ольга Васильевна, д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии*

*E-mail: o.v.putintseva@gmail.com*

*Putintseva Olga V., DSci., Professor of Biophysics and biotechnology department*

*E-mail: o.v.putintseva@gmail.com*

*Артюхов Валерий Григорьевич, д.б.н., проф., заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета*

*E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Artyukhov Valery G., DSci., Full Professor, Head of Biophysics and biotechnology department*

*E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

## STUDY OF INTERNAL CAVITIES, TUNNELS AND PORES IN ALKALINE PHOSPHATASE MOLECULES OF VARIOUS ORIGINS

M.G. Holyavka<sup>1,2</sup>, T.V. Krayushkina<sup>1</sup>, N.A. Balbekov<sup>1</sup>, A.A. Mikhailova<sup>1</sup>,  
O.V. Putintseva<sup>1</sup>, V.G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University

<sup>2</sup>Sevastopol State University

**Abstract.** Alkaline phosphatases are a group of enzymes found in almost all tissues of a living organism, with a predominant localization in the liver, bones and placenta. Phosphatases in cells participate in the reactions of cleavage of phosphoric acid residues from organic compounds.

The activity of alkaline phosphatase in the body increases in many diseases accompanied by damage to the tissues of the liver, bones, kidneys and other organs. Phosphatases are present in all animals and play an important role in the cellular metabolism of carbohydrates, nucleotides and phospholipids, as well as in the formation of bone tissue. Changes in the activity of some phosphatases in the blood are an important diagnostic indicator of many diseases. Genetically determined disorders of the synthesis of alkaline phosphatase or the functional activity of the enzyme are one of the causes of serious hereditary diseases.

It is known that the functioning of enzymes in both monomeric and oligomeric forms is largely determined by their spatial structure. In this regard, studying the structural organization of alkaline phosphatases, as well as the patterns of its changes during the formation of oligomeric complexes, largely contributes to improving the ways of regulating their activity. Tunnels, internal cavities and pores are elements of the spatial structure of molecules, affect the thermal stability of the enzyme, and make it possible to elucidate the functioning mechanisms and features of the spatial organization of alkaline phosphatases.

In this work, molecules of alkaline phosphatases from *Thermus thermophilus* (PDB ID: 7KWD), *Halobacterium salinarum* R1 (PDB ID: 2X98), *Escherichia coli* (PDB ID: 1ANJ) and *Antarctic bacterium* TAB5 (PDB ID: 2W5V) were studied. The localization and structure of their internal spatial structures, such as cavities, pores and tunnels, have been examined.

**Keywords:** alkaline phosphatase, spatial structure, internal cavities, tunnels, pores

### REFERENCES

1. Tang Z. Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects / Z. Tang, H. Chen, H. He, C. Ma // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 113. – P. 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.019>
2. Sharma U. Alkaline Phosphatase: An Overview / U. Sharma, D. Pal, R. Prasad // *Ind J Clin Biochem*. – 2014. – Vol. 29. – P. 269-278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
3. Makris K. Alkaline Phosphatases: Biochemistry, Functions, and Measurement / K. Makris, C. Mousa, E. Cavalier // *Calcif Tissue Int*. – 2023. – Vol. 112. – P. 233-242. <https://doi.org/10.1007/s00223-022-01048-x>
4. Cannalire G. Alkaline phosphatase in clinical practice in childhood: Focus on rickets. / G. Cannalire, S. Pilloni, S. Esposito, G. Biasucci, A. Di Franco, M.E. Street // *Front. Endocrinol*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1111445. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1111445>
5. Murray E. Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity / E. Murray, D. Provvedini, D. Curran, B. Catherwood, H. Sussman, S. Manolagas // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 1987. – Vol. 2. – № 3. – P. 231-238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020310>
6. Binda C. A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure / C. Binda, A. Coda, R. Angelini, R. Federico, P. Ascenzi, A. Mattevi // *Structure*. – 1999. – Vol. 7. – № 3. – P. 265-276.
7. Lee S. M. Antineoplastic effect of a novel chemopreventive agent, neokestose, on the Caco-2 cell line via inhibition of expression of nuclear factor-κB and cyclooxygenase-2 / S. M. Lee, J. Y. Chang, J. S. Wu, D. C. Sheu // *Molecular medicine reports*. – 2015. – Vol. 12. – № 1. – P. 1114-1118.
8. Zaher D. M. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors / D. M. Zaher, M. I. El-Gamal, H. A. Omar, S. N. Aljareh, S. A. Al-Shamma, A. J. Ali, S. Zaib, J. Iqbal // *Arch*

Pharm. – 2020. – Vol. 353. – № 5. – P. e2000011. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000011>

9. Borges B. Dynamic cross correlation analysis of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase and determinants of thermostability / B. Borges, G. Gallo, C. Coelho, N. Negri, F. Maiello, L. Hardy, M. Wurtele // *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* – 2021. – Vol. 1865. – № 7. – P. 129895.

10. Wende A. Structural and biochemical characterization of a halophilic archaeal alkaline phosphatase / A. Wende, P. Johansson, R. Vollrath, M. Dyll-Smith, D. Oesterhelt, M. Grninger // *J Mol Biol.* – 2010. – Vol. 400. – № 1. – P. 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.057>

11. Murphy J. E. Mutations at positions 153 and 328 in *Escherichia coli* alkaline phosphatase provide insight towards the structure and function of mammalian and yeast alkaline phosphatases / J. E. Murphy, T. T. Tibbitts, E. R. Kantrowitz // *J Mol Biol.* – 1995. – Vol. 253. – № 4. – P. 604-617.

12. Koutsioulis D. Coordination sphere of the third metal site is essential to the activity and metal selectivity of alkaline phosphatases / D. Koutsioulis, A. Lyskowski, S. Maki, E. Guthrie, G. Feller, V. Bouriotis, P. Heikinheimo // *Protein Sci.* – 2010. – Vol. 19. – № 1. – P. 75-84.

13. Holyavka M.G. Izuchenie *in silico* osobennostej i mekhanizmov adsorbicii cellyulazy iz *Aspergillus niger* na sinteticheskikh polimerah / M.G. Holyavka, D.Yu. Bogomolov, M.A. Albet, V.G. Artyuhov // *Sorbcionnye i hromatograficheskie processy.* – 2022. – T. 22. – № 5. – S. 760-773. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10695>

14. Holyavka M.G. *In silico* analiz osobennostej prostranstvennoj organizacii molekul amilaz razlichnogo proiskhozhdeniya / M.G. Holyavka, D.Yu. Bogomolov, V.G. Artyuhov // *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. YU.A. Ovchinnikova.* – 2023. – T. 19. – № 3. – S. 71-80.

15. Makin S.M. Osobennosti vzaimodejstviya ekzoinulinyazy iz *Kluyveromyces marxianus* s mono- i polisaharidami / S.M. Makin, A.N. Dubovickaya, D.Yu. Bogomolov, M.S. Kondrat'ev, M.G. Holyavka, V.G. Artyuhov // *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova.* – 2023. – T. 19. – № 4. – S. 57-65.

16. Stank A. Protein binding pocket dynamics / A. Stank, D. B. Kokh, J. C. Fuller, R. C. Wade // *Acc Chem Res.* – 2016. – Vol. 49. – № 5. – P. 809-815. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00516>.

17. Brezovsky J. Software tools for identification, visualization and analysis of protein tunnels and channels / J. Brezovsky, E. Chovancova, A. Gora, A. Pavelka, L. Biedermannova, J. Damborsky // *Biotechnology Advances.* – 2013. – Vol. 31. – № 1. – P. 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.002>

18. Sakibaev F.A. Osobennosti prostranstvennyh struktur molekul rastitel'nyh proteaz – bromelina, ficina i papaina / F.A. Sakibaev, M.G. Holyavka, V.G. Artyuhov // *Vestnik VGU. Seriya «Himiya. Biologiya. Farmaciya».* – 2020. – № 3. – S. 57-62.

19. Bogomolov D.Yu. Izuchenie *in silico* strukturnykh osobennostej lipaz iz razlichnykh producentov / D.Yu. Bogomolov, F.A. Sakibaev, M.G. Holyavka, V.G. Artyuhov, V.F. Selemenev // *Sorbcionnye i hromatograficheskie processy.* – 2021. – T. 21. – № 4. – S. 555-567.

20. Sakibaev F.A. *In silico* issledovanie sostava i struktury vnutrennih polostej, tunnelej i por v molekule papaina pri svyazyvanii s razlichnymi ligandami / F.A. Sakibaev, M.G. Holyavka, V.G. Artyuhov // *Vestnik VGU. Seriya «Himiya. Biologiya. Farmaciya».* – 2021. – № 1. – S. 61-65.

21. Sakibaev F.A. *In silico* issledovanie sostava i struktury vnutrennih polostej, tunnelej i por v molekule bromelina pri svyazyvanii s razlichnymi ligandami / F.A. Sakibaev, M.G. Holyavka, V.G. Artyuhov // *Vestnik VGU. Seriya «Himiya. Biologiya. Farmaciya».* – 2021. – № 2. – S. 50-54.