

## STRESZCZENIE

Odwracalna reakcja fosforylacji jest jedną z kluczowych modyfikacji potranslacyjnych, zaangażowanych w regulację procesów komórkowych. U *Arabidopsis* zidentyfikowano 76 białek przypisanych do rodziny fosfataz białkowych typu 2C (PP2C), które ze względu na podobieństwo sekwencji oraz budowę subdomeny fosfatazowej zostały podzielone na 10 grup. Dotychczasowe wyniki badań wykazują, że przedstawiciele PP2C z grupy A (ABI1, ABI2, HAB1, HAB2, HAI2, HAI2, HAI3 oraz PP2CA/AGH3 i AHG1) są ważnymi komponentami regulacji szlaku sygnalizacji kwasu absycynowego (ABA). Grupa A fosfataz białkowych PP2C wraz z kinazami białkowymi SnRK2.6 oraz rodziną białek START takich jak: PYL/ PYR/ RCAR (receptory ABA), definiują rdzeń szlaku sygnałowego ABA. Celem tej pracy jest identyfikacja potencjalnych inhibitorów roślinnych fosfataz białkowych z grupy A. Do badań użyto komputerowego przeszukiwania baz związków małowcząsteczkowych, a potencjał inhibitorowy wyselekcjonowanych związków chemicznych analizowano biochemicznie z użyciem testów aktywności fosfatazowej. Podczas analiz dokowania molekularnego użyto ponad dwudziestu dwóch milionów związków chemicznych pochodzących z niekomercyjnej bazy ZINC12 oraz kilkuset ligandów od komercyjnych dostawców. Precyzja obliczeń została zwiększona poprzez użycie trzystopniowego algorytmu dokowania molekularnego oraz metod służących estymacji swobodnej energii wiązania (MM-GBSA). Najwyżej ocenione związki zostały zweryfikowane za pomocą analizy *in vitro* aktywności fosfatazowej. W efekcie prowadzonych analiz zidentyfikowano kilka związków chemicznych o potencjalnie hamującym, w tym jedną cząsteczkę, która hamuje aktywność fosfatazy ABI1 o 91% przy stężeniu 100  $\mu$ m. W pracy badano specyficzność wyselekcjonowanych potencjalnych inhibitorów w obrębie rodziny fosfataz białkowych badając aktywność inhibitorową w kompleksie z fosfatazami z rodzin PP1, PP2A oraz PP2C. Dodatkowo w celu określenia potencjalnej orientacji wiązania wybranych inhibitorów do białka ABI1, przeprowadzono ukierunkowaną mutagenezę fosfatazy białkowej ABI1 oraz analizę jej aktywności fosfatazowej w obecności wybranych związków chemicznych. Reszty aminokwasowe, które zostały poddane mutagenезie wybrano na podstawie symulacji dynamiki molekularnej modeli inhibitor – białko ABI1 oraz analizie PIE wykonaną metodą FMO. Otrzymane wyniki realizacji projektu doktorskiego umożliwią projektowanie nowych inhibitorów fosfataz białkowych 2C u roślin z grupy ABI1 oraz podobnych fosfataz białkowych z grupy 2C, które mogłyby być stosowane w rolnictwie do ochrony upraw przed stresem suszy.

## ABSTRACT

The reversible phosphorylation reaction is one of the key modifications involved in the regulation of numerous cellular processes. In *Arabidopsis*, 76 members of the protein phosphatase 2C (PP2C) family were identified, which were divided into 10 groups due to sequence similarity and subdomain structure. Recent studies show that PP2C members from group A (ABI1, ABI2, HAB1, HAB2, HAI2, HAI3, and PP2CA / AGH3 and AHG1) are important components in the regulation of the abscisic acid (ABA) signaling pathway. Group A of PP2C protein phosphatases together with SnRK2.6 protein kinases and the START family of proteins such as PYL / PYR / RCAR (ABA receptors) consist the core the ABA signaling pathway. As part of the identification of potential inhibitors, a computer search of databases of small molecule compounds was used, combined with the validation of selected chemical compounds by means of *in vitro* analyzes. During molecular docking analyzes, over twenty-two million chemical compounds from the non-commercial ZINC12 database and several hundred ligands from commercial suppliers were used. The precision of the calculations was increased by the use of the three-stage molecular docking algorithm and the methods for estimating the free energy of binding (MM-GBSA). The highest rated compounds were verified by the analysis of phosphatase activity. Studies have identified several compounds with potential inhibitory potential, including one molecule that inhibits ABI1 phosphatase activity by 91% at a concentration of 100  $\mu$ m. Selected chemical compounds have also been tested *in vitro* as part of the family of protein phosphatases (PP1, PP2A and PP2C). Additionally, to determine the potential orientation of the selected inhibitors, ABI1 targeted mutagenesis and analysis of phosphatase activity were performed. The amino acid residues that were mutated were selected on the basis of molecular dynamics simulation of inhibitor-ABI1 protein models and PIE analysis by FMO. The obtained results of the doctoral project should support the design of new inhibitors with increased biological activity against ABI1 and other PP2C proteins that could be used in agriculture to protect crops from drought stress.