

**Відгук**  
офіційного опонента на дисертаційну роботу  
Таніна Володимира Олександровича  
**"Нові підходи до *in silico* дослідження інгібіторів  
протеїнтирозинфосфатази 1B",**

представленої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія

Дисертаційна робота Таніна В.О. присвячена розробці нових підходів до пошуку інгібіторів протеїнфосфатази 1B і ґрунтуються на модифікації існуючих оціночних функцій молекулярного докінга, а саме: AutoDock, AutoDock Vina і RF-score. Зокрема, **метою роботи** було встановлення нових підходів до *in silico* дослідження малих органічних молекул як інгібіторів протеїнтирозинфосфатази 1B.

Для втілення поставленої задачі здобувачу було необхідно вирішити ряд питань, а саме: оцінити рухливість амінокислотних залишків і конформаційні зміни у сайті зв'язування, оцінити можливість використання отриманої інформації для поліпшення молекулярного докінгу засобами програми AutoDock, а також побудувати QSAR-моделі для прогнозування активності потенційних інгібіторів. Поєднуючи методи молекулярного докінгу і QSAR, провести пошук потенційних інгібіторів PTP1B серед значної за об'ємом бібліотеки лігандів і, ґрунтуючись на отриманих результатах, розробити нові оціночні функції, спрямовані на максимальне наближення результатів молекулярного докінгу до експериментально встановлених комплексів.

Розробка інгібіторів протеїнфосфатаз є важливим напрямом сучасної біомедичної та біоорганічної хімії. Ефективні та специфічні інгібітори протеїнкіназ і протеїнфосфатаз є важливим інструментом дослідження ролі ферментів у мережі сигнальних каскадів клітини і, водночас, відкривають нові перспективи в галузі розробки інноваційних фармацевтичних препаратів.

Без сумніву, серед відомих молекулярних мішеней протеїнтирозинфосфатаза 1B (PTP1B) займає особливе місце. Відомо, що вона

каталізує дефосфорилування залишків фосфотирозину інсулінового і лептинового рецепторів, що, відповідно, пригнічує інсулінові та лептинові сигнали. РТР1В розглядається як одна із перспективних мішеней терапії діабету другого типу та ожиріння. Існують данні стосовно участі РТР1В в контролі кардіоритму, її причетності до нейродегенеративних розладів і порушень процесів пам'яті. Крім того, в останні роки РТР1В розглядається як перспективна мішень для лікування ряду онкологічних захворювань. Тому розробка нових підходів до пошуку і комп'ютерного моделювання активності таких органічних сполук, як інгібітори РТР1В, є перспективним і актуальним завданням біоорганічної хімії.

Сполуки, що здатні інгібувати РТР1В, були ідентифіковані серед похідних карбонових, фосфонових, сульфонових кислот, різноманітних гетероциклічних сполук. Більшість з цих речовин було ідентифіковано за тісної взаємодії експериментальних і обчислювальних методів, з яких найчастіше використовується саме молекулярний докінг.

У зв'язку з цим, слід зазначити, що результативність ліганд-білкового докінгу і розрахунків біологічної активності сполук на основі хімічної структури ліганду або білку-мішені все ще залишається досить низькою. Тим не менш, завдяки стрімкому наповненню баз даних експериментально встановленими структурами цільових білків та їх комплексами з різноманітними лігандами, з'являється підґрунтя для розробки більш акуратних алгоритмів і інструментів біоінформаційного пошуку.

Так, у випадку протеїнфосфатази 1В лише в RCSB Protein Data Bank зараз депоновано 91-у просторову структуру, що були розшифровані на підставі даних x-Ray. Загалом, вищезгадані структурі містять інформацію стосовно будови 102-х активних центрів. Цього цілком достатньо для дослідження конфірмаційних відмінностей активного центру, і це дає можливість для кластеризації конформацій поверхні сайту зв'язування та дослідження рухливості залишків амінокислот і функціонально-важливих петель.

Тому, без жодного сумніву, мета, методи і задачі, що були поставлені та

вирішені здобувачем, є актуальними і підтверджують необхідність і обґрунтованість дисертаційних досліджень Таніна В.О.

**Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.** Робота відповідає планам науково-дослідних робіт Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, і виконувалась в рамках декількох бюджетних тематик: "Пошук і модельні дослідження потенційно біоактивних сполук" (№ 0110U000375); "Розвиток методів синтезу, дослідження властивостей та механізмів дії нових потенційно біоактивних сполук" (№ 012 U002657); "Молекулярний дизайн, синтез і дослідження інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз як потенційних лікарських засобів проти цукрового діабету та інших захворювань" (№ 0113U005097).

**Наукова новизна дослідження та одержаних результатів, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Дисертаційна робота Таніна В.О. була виконана на сучасному науковому та методичному рівні і ґрунтується на значному матеріалі оригінальних досліджень. Усі експерименти та розробки були виконані автором особисто або за його безпосередньої участі. За допомогою методів структурної біоінформатики і створеного за його безпосередньої участі програмного забезпечення, здобувачем було виконано аналіз 102-х активних сайтів з 91-ї структури РТР1В, що на момент дослідження були депоновані в RCSB Protein Data Bank.

На підставі результатів аналізу експериментально підтверджених комплексів РТР1В з інгібіторами автором було встановлено ступінь конфірмаційної рухливості в області сайтів зв'язування лігандів. Ґрунтуючись на отриманій інформації здобувачем було виконано кластеризацію структур за подібністю вищезгаданих сайтів. Подібне порівняння конформацій згідно даних PDB-файлів для характеристики ліганд-зв'язувальних центрів (поділ на кластери) та рухливості залишків амінокислот у випадку РТР1В було виконано вперше.

Автором встановлено, що сформовані кластери відрізняються за конформацією WPD-петлі, а також Arg47, YRD-петлі, залишку Arg24 зі вторинного арилфосфатного центру зв'язування та залишку Lys120, що входить до складу рухливої петлі 110-121. Центроїди кластерів було запропоновано автором як репрезентативні структури PTP1B для проведення розрахунків методом молекулярного докінгу та наступного аналізу одержаних результатів.

У свою чергу, отримані Таніним В.О. результати лягли в основу оригінального багатофакторного алгоритму АСТРДВСМР (Active Part of PDB Comparison), що об'єднав етапи валідації структур, попарного порівняння, кластерного аналізу та визначення рухливості усіх амінокислотних залишків, що входили до складу сайту.

Таким чином, автором було зроблено особистий внесок в методологію молекулярного докінгу, яка, у свою чергу, знайшла реалізацію у вигляді модифікованої версії програми AutoDock. Зроблена модифікація дозволяє покращати результати молекулярного докінгу лігандів та здійснювати більш швидкий та надійний віртуальний скринінг.

Із залученням оригінальної навчальної бази, що містить більш ніж 2000 індивідуальних сполук, здобувачем, було побудовано три нові моделі QSAR для оцінювання активності інгібіторів PTP1B. Оригінальні QSAR моделі було побудовано на базі 2D-, 3D- та 2D/3D-дескрипторів.

Використовуючи побудовану фармакофорну модель, з бібліотеки, що наховувала більш ніж 64000 сполук, автором було відібрано 740 сполук-лідерів. Наступний віртуальний скринінг відібраних сполук із використанням QSAR і молекулярного докінгу, дозволив автору створити відповідні рейтинги досліджених сполук. Експериментальна перевірка окремих сполук-лідерів *in vitro* підтвердила їх активність на рівні, що виявився наближеним до прогнозованого методами *in silico*. Таким чином, з набору з понад 64000 сполук було відібрано нові інгібітори PTP1B, що діють в мікромольному діапазоні концентрацій.

Для покращення молекулярного докінгу автором було розроблено нові

гібридні оціночні функції H1 та RFL, що ґрунтуються на базових функціях оцінки результатів докінгу AutoDock і AutoDock Vina, а також RF Score. Розроблені оціночні функції показали високу ефективність для більшості комплексів РТР1В і переважають за ефективністю штатні функції вищезгаданих програм.

На підставі результатів тестових обрахунків здобувачем було остаточно обґрунтовано та опрацьовано застосування розроблених ним підходів до *in silico* пошуку та дослідження інгібіторів протеїнтирозинфосфатази 1В

### **Практичне значення одержаних результатів.**

На основі запропонованих підходів було створено нове програмне забезпечення для встановлення репрезентативних конформацій ензиму, прийнятних для моделювання комплексів з потенційними інгібіторами. Це надає можливість використання ряду типових структур для віртуального скринінгу. Проведення комп'ютерних досліджень із використанням модифікованої версії AutoDock може забезпечувати результати з прогнозованими значеннями констант інгібування, що відповідають експериментальним даним. Здобувачем були запропоновані нові гібридні оціночні функції на основі AutoDock та AutoDock Vina, а також RF Score, що можуть мати практичне застосування для молекулярного докінгу у випадку дослідження інших ферментів. Рейтинговий метод оцінки великого масиву сполук з урахуванням різноманіття конформації білкової мішені та одночасним використанням QSAR і функцій AutoDock може бути використаний для розробки і подальшої оптимізації структур інгібіторів РТР1В та інших протеїнтирозинфосфатаз.

Відібрані під час дослідження сполуки-лідери безсумнівно знайдуть застосування не лише як нові інгібітори протеїнфосфатази 1В, а також вони мають потенціал як засоби лікування діабету, ожиріння, порушень кардіоритму, нейродегенеративних розладів та онкологічних захворювань.

### **Особистий внесок здобувача**

Викладені в дисертації результати було отримано автором особисто

або за його безпосередньої участі.

### **Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.**

За матеріалами дисертації опубліковано 12 робіт, з них 6 статей у фахових наукових журналах і 6 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій.

### **Структура дисертації**

Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів, висновків і списку літератури (165 найменувань). Дисертаційна робота налічує 152 сторінки друкованого тексту, проілюстрована 15 таблицями та 33 рисунками. Розділ 1 є оглядом літератури, а в наступних розділах дисертації викладено основний зміст роботи.

У роботі чітко сформульовано мету і завдання дослідження. Матеріали і методи дослідження відповідають сучасному світовому рівню і цілком відповідають завданням дослідження. Висновки логічні, цілком відповідають поставленій меті і завданням дисертаційного дослідження.

### **Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.**

Опонент не має принципових зауважень до роботи. Декілька запитань для дискусії та зауважень технічного характеру наведено нижче:

1. Дуже великий і необґрунтовано перевантажений список умовних скорочень. Наприклад, трибуквене написання амінокислот (Ala, Arg, Asn ...) є сталим і використовується відповідно до загальноприйнятої номенклатури і на мою думку не потребує додаткового розшифрування.

2. Часто відсутні легенди до рисунків (1.7, 1.8 тощо). Відповідна інформація включена в основний текст, що ускладнює її сприйняття.

3. Розділ 2.1.2. *Алгоритм порівняння і кластеризації конформацій РТР1В*. Розділ присвячено ретельному опису розробленого алгоритму, але, на мій погляд, при викладенні подібної інформації має бути приведена структура алгоритму із використанням загально прийнятої форми блок-схем.

4. Автором було виконано два дослідження із використанням кластеризації активних центрів РТР1В. Як зрозуміло із тексту, одна,

використовувалась для проведення молекулярного докінгу і створення об'єднаного рейтингу інгібіторів з використанням результатів докінгу і QSAR. Не зовсім зрозуміле призначення іншої кластеризації, що була виконана із врахуванням залишків амінокислот петлі 110-120.

5. Як було підкреслено дисертантом на стор. 42, нумерація залишків в PDB-файлі може бути зміщеною відносно послідовності. З опису алгоритму не зовсім зрозуміло, як саме автор остаточно вирішив цю проблему: ґрунтуючись на вирівнюванні послідовностей, або на структурному вирівнюванні? Роз'яснення з'являється але значно пізніше у розділі 2.2.1. Тобто, вже після описання відповідного алгоритму.

6. На мою думку, при формуванні первинної вибірки PDB-структур РТР1В замість використання пошуку за ключовим запитом - 'РТР1В' (наприклад, стор. 46), було б більш правильно використати пошук за амінокислотною послідовністю з використанням інструменту PDB-blast. Це відразу виключило б помилкові структури.

7. Вважаю, що роботі не вистачає порівняння конформаційної рухливості петель, що була б встановлена не лише за результатами аналізу даних Protein Data Bank, а також за результатами молекулярної динаміки. Я не впевнений, що 120 PDB-структур в повній мірі відображають рухливість елементів дослідженого сайту. РТР1В це скоріше виключення з правил стосовно кількості депонованих структур. У випадку більшості білків кількість депонувань значно менша. Це дуже скорочує можливості застосування відпрацьованого алгоритму дослідження до інших молекулярних мішеней.

Проте, вважаю, що вищевказані зауваження носять скоріше дискусійний і рекомендаційний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

**Висновок:** Враховуючи все вищесказане, вважаю, що дисертаційна робота Таніна В.О. «Нові підходи до *in silico* дослідження інгібіторів протеїнтирозинфосфатази 1В» представляє собою завершену наукову працю, присвячену важливій науковій і практично значимій проблемі. За структурою,

актуальністю задач, теоретичним та методичним рівнем, новизною, фундаментальним та практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота цілком відповідає вимогам ДАК України до кандидатських дисертацій, а її автор - Танін Володимир Олександрович, без жодного сумніву заслуговує на присудження наукового ступеня - кандидат хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

**Офіційний опонент,**

Завідувач лабораторії біоінформатики та структурної біології,  
Відділу геноміки та молекулярної біотехнології,  
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки  
Національної академії наук України»  
кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Карпов П.А.

Підпис зав. лабораторії біоінформатики та структурної біології,  
к.б.н., с.н.с. Карпова П.А.  
ЗАСВІДЧУЮ

**Вчений секретар**

ДУ «Інститут харчової біотехнології  
та геноміки НАН України»,  
к.б.н.

Пірко Я.В.

