

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу
Алемасова Николая Александровича «КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ СВЯЗИ МЕЖДУ
КОНФОРМАЦИОННЫМИ СВОЙСТВАМИ МУТАНТНЫХ ФОРМ БЕЛКА SOD1 И
БОКОВЫМ АМИОТРОФИЧЕСКИМ СКЛЕРОЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности математическая биология, биоинформатика – 03.01.09

Актуальность.

Боковой амиотрофический склероз – неизлечимое нейродегенеративное заболевание. Одной из наиболее распространенных причин наследственной формы этого заболевания являются мутации в гене SOD1. Одной из гипотез относительно механизма возникновения заболевания на молекулярном уровне является повышенная склонность мутантных форм белка к агрегации.

Большинство работ, посвященных изучению мутантных форм белка SOD1, основаны на экспериментальных данных по изменению термодинамической стабильности и рассматривают ограниченный набор мутаций. Кроме того, на данный момент накоплено большое количество информации о патогенных мутациях, изучению структурных особенностей мутантных форм SOD1 посвящено небольшое количество исследований. В литературе предложено несколько регрессионных моделей для предсказания времени дожития пациентов с мутациями в SOD1, страдающими БАС, но все они рассматривают ограниченный набор мутаций, и основаны на анализе изменений физико-химических свойств (гидрофобности, вторичной структуры, изменения заряда молекулы, термостабильности). Однако в результате недавних экспериментальных исследований не удалось показать однозначной взаимосвязи склонности мутантных вариантов к агрегации с изменением их термостабильности, заряда и т.п. Кроме того, в ходе недавнего сравнения восьми компьютерных подходов к предсказанию на основе информации о аминокислотных заменах в белке SOD1 времени дожития пациентов, страдающих БАС, коэффициент корреляции между предсказанными и наблюдаемыми значениями не превысил 0.5.

На основе анализа большого массива литературных данных и результатов экспериментальных исследований автором убедительно обосновывается важность подробного теоретического изучения сети внутримолекулярных водородных связей и водных мостиков в мутантных формах белка SOD1, связанных с развитием БАС, и необходимость разработки новых регрессионных моделей, связывающих изменения в структурных характеристиках мутантных форм белка SOD1 со временем дожития пациентов, что позволит оценить степень влияния изменений определенных структурных

районов, аминокислотных остатков, стабильности водородных связей и водных мостиков на развитие БАС.

Целью диссертационной работы является компьютерный анализ связи между конформационными свойствами мутантных белков SOD1 и наследственной формой бокового амиотрофического склероза на основе оценки стабильности водородных связей и водных мостиков.

С учетом вышесказанного, актуальность темы диссертационной работы Николая Александровича Алемасова не вызывает сомнения.

Для достижения цели исследования автор сформулировал 3 задачи:

1. Разработка метода расчёта изменения конформационных свойств мутантных форм белка по сравнению с белком дикого типа на основе оценки стабильности внутримолекулярных водородных связей, водородных связей белка с молекулами воды и водных мостиков с использованием метода молекулярной динамики и эластичных сетевых моделей.
2. Построение и исследование регрессионных моделей, связывающих конформационные характеристики мутантных форм белка SOD1, ассоциированных с БАС с дожитием пациентов, являющихся носителями данных мутаций. Предсказание дожития пациентов с мутациями в SOD1, данные по которым отсутствуют в литературе.
3. Анализ распределения ключевых водородных связей и водных мостиков, важных для предсказания дожития пациентов с БАС, в пространственной структуре белка SOD1, направленный на выявление их потенциальной роли в структурно-функциональной организации белка.

Сформулированные задачи полностью соответствуют основной цели исследования.

Научная новизна и практическая значимость. При выполнении диссертации был разработан новый метод предсказания влияния аминокислотных замен на конформационные свойства мутантных форм белка (SOD1), основанный на оценке стабильности водородных связей и водных мостиков. Изучение с помощью разработанного метода массива литературных данных о влиянии ряда патогенных аминокислотных замен на время дожития пациентов с БАС позволило получить следующие новые результаты:

1. Разработаны регрессионные модели, позволяющие предсказывать дожитие пациентов с БАС на основе изменения стабильности водородных связей в мутантных белках SOD1.
2. Показано, что дожитие пациентов с мутациями в SOD1 имеет высокую корреляцию с конформационными свойствами мутантных форм белка, полученными из моделирования молекулярной динамики и эластичных сетей.

3. Показано, что водородные связи, стабильность которых достоверно коррелирует с дожитием пациентов с соответствующими мутациями в SOD1, образуются аминокислотными остатками, участвующими в формировании дисульфидной связи, сайта связывания иона меди, электростатической, дисульфидной и цинк-связывающей петли.
4. Обнаружено, что бóльшая часть аминокислотных остатков белка SOD1 (Гис46, Гис71 и Асп124), которые участвуют в образовании водородных связей со значительным отклонением стабильности в мутантах SOD1 от таковой в белке дикого типа участвует в образовании важного контакта между сайтами связывания ионов металлов.
5. Показано, что существует достоверная положительная корреляция ($R = 0.57$, $p = 2 \times 10^{-14}$) между средней механической жёсткостью позиций в белке и эволюционной консервативностью остатков в данных позициях. На основе анализа механической жёсткости позиций белка сделано предположение о существовании внутримолекулярного взаимодействия между активными центрами обеих субъединиц. Показано, что механическая жёсткость между позициями с изучаемыми мутациями в SOD1 и позицией 46, остаток в которой является частью активного центра белка, достоверно отрицательно коррелирует ($R = -0.41$, $p = 0.02$) с дожитием пациентов с соответствующими мутациями.

Значимость полученных в работе автора результатов.

Разработанные методы могут использоваться не только для оценки влияния ранее неизвестных полиморфизмов, но и для поиска перспективных низкомолекулярных химических соединений, которые могут стать основой потенциальных терапевтических препаратов. Таким образом, помимо фундаментального научного значения – масштабного изучения влияния патогенных мутаций в белке SOD1 на стабильность сети водородных связей и водных мостиков, данная работа имеет и важное прикладное значение.

Обоснованность и публикация результатов. Автором был использован достаточный объем литературных данных для обоснования предложенных методов и моделей, а также тестирования их работоспособности. Полученные выводы подкрепляются результатами статистического анализа. Материалы диссертации в полной мере представлены на 5 российских и международных конференциях, опубликованы в 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и в 5 сборниках тезисов конференций. Все это обосновывает достоверность результатов, выводов, полученных в диссертационной работе, и соответственно положений, выносимых на защиту.

Представление материалов исследования в диссертации.

Представленная автором диссертация построена по общепринятой форме и содержит все разделы, необходимые для полного описания выполненных исследований: введение, обзор литературы по теме исследования (глава 1), описание использованных методов (глава 2) и три главы с описанием полученных результатов, заключение, выводы и два приложения. Полный объём диссертации составляет 151 страницу. Работа содержит 44 рисунка и 5 таблиц. Библиография включает 228 работ.

Использованный автором порядок изложения материалов исследования в работе является последовательным и логичным. Во введении (на 6 стр.) автор обосновывает актуальность, цели и задачи исследования, представляет основные полученные результаты, их научную новизну и практическую значимость, формулирует защищаемые положения, приводит сведения по апробации работы, публикациям и личному вкладу.

Глава 1, объём которой составляет 28 страниц, является литературным обзором, состоящим из 7 разделов и заключения. Автор анализирует 228 источников, при этом следует отметить использование самых свежих сведений, опубликованных в 2017 и 2018 годах. Анализ представленных литературных данных позволил автору показать важность анализа изменений сети водородных связей и водных мостиков под влиянием аминокислотных замен в белке SOD1 для понимания их влияния на развитие БАС, проанализировать сильные и слабые стороны существующих методов предсказания времени дожития пациентов, страдающих БАС, и необходимость разработки новых, более совершенных регрессионных моделей, учитывающих изменение стабильности сети водородных связей и водных мостиков.

В главе 2 (материалы и методы) приводится достаточно подробное описание использованных математических моделей, методических приемов и программного обеспечения. Приведены протоколы исследований и параметры запуска программ и моделей.

Результаты авторских исследований представлены в главах 3-5, изложенных на 100 страницах. В заключении, изложенном на трех страницах, соискатель в сжатом виде изложил основные гипотезы и результаты исследования, что позволило показать целостность исследования и еще раз продемонстрировать значимость сформулированных далее выводов. Завершает работу раздел с благодарностями, библиографический список, список сокращений и приложения.

Диссертация достаточно хорошо написана, однако автору всё же не удалось полностью избежать недоработок, ошибок, неудачных выражений.

Так, например:

Использование черно-белых иллюстраций в печатном варианте диссертации очень затрудняет восприятие информации, как и слишком краткое описание рисунков (например, рисунки 4.5, 4.13 и некоторые другие). Кое-где встречаются пунктуационные ошибки – пропущенные и лишние запятые, пропущенные пробелы.

На стр. 8: «Показано, что дожитие пациентов с мутациями SOD1 имеет высокую корреляцию с конформационными свойствами мутантных форм белка». На стр. 14 не хватает указания количества пациентов в выборке VSM20. В конце абзаца не хватает ссылки на источник. На стр. 15 в конце первого абзаца не хватает информации о молекулярном механизме влияния количества повторов GGGGCC в некодирующем районе C9ORF72 на развитие БАС. Возможные механизмы описываются, в частности, в недавних работах Satoh et al., 2014, DOI:10.4137/JCNSD.S18103, Kumar et al., 2017, DOI:10.3389/fnins.2017.00711 и Selvaraj et al., 2018, DOI:10.1038/s41467-017-02729-0. Несмотря на то, что роль C9ORF72 в развитии БАС не является темой данного исследования, краткое описание предполагаемых молекулярных механизмов можно было бы привести. Иногда наряду с русскими обозначениями мутаций встречаются латинские (например, стр. 19 – E478G). Первый абзац раздела «Современные гипотезы об агрегации белков» не относится напрямую к теме работы, и его можно было бы исключить без ущерба для восприятия (стр. 23, пункт 1.4). На стр. 27 есть фраза «показано, что глобальная стабильность SOD1 не связана с боковым амиотрофическим склерозом, так как известны мутанты белка, стабильность и ферментативная активность которых неотличима от белка дикого типа». Это утверждение справедливо, если эти мутантные формы связаны с развитием БАС. Кроме того, вместо словосочетания «мутанты белка», на мой взгляд, лучше использовать «мутантные формы белка». На стр. 36 в пункте «Механическая жесткость», на мой взгляд, не хватает краткого заключения. На стр. 37 во втором абзаце есть фраза: «В третьей модели в качестве независимой переменной выступала энергия гетеродимеризации ($\Delta\Delta G_{Het}$), и её применение для пяти из шести исследованных мутантов SOD1 позволило объяснить до 98 % дисперсии в дожитии пациентов с соответствующими мутациями», однако не уточняется, что имеется в виду изменение энергии при димеризации мутантной формы SOD1 с белком дикого типа в сравнении с энергией гомодимеризации белков дикого типа (согласно процитированному автором источнику). На рис. 3.4 (стр. 50) показаны траектории молекулярной динамики некоторых мутантных форм белка SOD1, при этом уменьшение структурной стабильности автор отмечает лишь у одной из них (Aсn139Гис). На мой взгляд, можно было бы привести сводную таблицу с результатами анализа (или привести эти данные в приложении). В тексте диссертации автор говорит то о 33, то о 35 изучаемых мутантных формах белка SOD1. В

частности, на странице 51 указано, что было выбрано 35 мутантных форм, а ранее говорилось о 33 мутантных белках. По рис. 3.11 сложно сделать выводы о наличии какой-либо зависимости между временем дожития пациентов и термостабильностью мутантных форм белка, на мой взгляд, данный график напротив свидетельствует об отсутствии прямой взаимосвязи. Кроме того, описание рисунка некорректно – по оси абсцисс отложены нормализованные значения изменения термостабильности мутантных форм белка, а не значения термостабильности. Возможно, график был бы более информативным, если бы содержал информацию о разбросе значений времени дожития и количестве пациентов с соответствующими мутациями. На стр. 63: «выяснилось, что» — слишком сильное утверждение для результатов моделирования. Кроме того, утверждение, высказанное во втором абзаце, является справедливым, только если в виду имеются «общие» водородные связи. На стр. 81 вместо фразы "ошибки самой неудачной модели" лучше было использовать "ошибки случайной модели". На рис. 4.5 (стр. 87) не указано, в чём выражена стабильность водородных связей. Рис. 4.15 (стр. 94) неинформативен – не хватает информации о реальном сроке дожития пациентов. В последнем предложении на стр. 106 используется неудачная формулировка: «влияние мутаций на эволюционно консервативные остатки». Список сокращений и условных обозначений неполон (стр. 114).

Более существенные замечания относятся к построению регрессионных моделей. В частности, при построении моделей с использованием данных большой размерности очень серьезной проблемой является отбор информативных признаков. В данном случае лучше было проводить отбор признаков на тренировочном наборе данных с использованием процедуры скользящего экзамена (cross-validation) или бутстрэп (bootstrap) поскольку, когда отбор признаков проводится на всём наборе данных, то вместе с информативными неизбежно будут выбраны и признаки, коррелирующие с целевой переменной по случайным причинам, что может негативно сказаться на способности построенной модели к генерализации. Однако это замечание справедливо не для всех разработанных в рамках данной работы моделей.

Кроме того, для модели OSCARС суммирование вкладов индивидуальных связей, строго говоря, не является адекватным подходом к снижению числа предикторов, поскольку вместо подбора коэффициентов для индивидуальных предикторов выбирается наилучшая комбинация предикторов на всем массиве данных.

Построение проверочной регрессионной модели лучше было выполнить следующим образом: случайно перемешать значение целевой переменной, а затем провести отбор признаков и построение моделей аналогично тому, как это было сделано для реальных данных.

При построении линейных регрессионных моделей необходимо проводить шкалирование значений признаков, чего автор не делал, однако шкалирование не является необходимым если диапазоны значений признаков сопоставимы.

Кроме того, интересно было бы оценить соответствие между предсказанными и реальными значениями времени дожития пациентов с помощью ранговой корреляции (например, корреляции Спирмена), поскольку корреляция Пирсона чувствительна к выбросам.

Однако сделанные замечания не являются существенными или носят дискуссионный характер и нисколько не снижают научной и практической ценности проделанной работы.

В целом, следует высоко оценить диссертационную работу. Она выполнена на высоком профессиональном уровне и является законченной научно-квалификационной работой. Стоит отметить большой объем проделанных теоретических исследований по изучению влияния аминокислотных замен на структурные особенности мутантных форм белка SOD1. Автор всегда оценивал достоверность полученных результатов с использованием адекватных методов статистического анализа. Данная работа имеет не только теоретическое, но и важное практическое значение. Разработанные методы могут использоваться не только для оценки влияния ранее неизвестных полиморфизмов, но и для поиска перспективных низкомолекулярных химических соединений, которые могут стать основой потенциальных терапевтических препаратов. Разработанный методический подход может оказаться полезным для изучения влияния аминокислотных замен на структурные особенности и других важных белковых молекул.

Таким образом, новизна и значимость представленной работы не вызывают сомнений. Основные результаты и выводы являются обоснованными. Материал диссертации соответствует указанной специальности. Диссертация апробирована на 5 российских и международных научных конференциях. Основные результаты представлены в 9 печатных изданиях, в том числе, в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, адекватно и достаточно полно отражает содержание диссертации. Цели и задачи диссертационной работы полностью соответствуют заявленной теме. Положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют выводам.

Все вышесказанное позволяет заключить, что диссертационная работа Алемасова Николая Александровича «Компьютерный анализ связи между конформационными свойствами мутантных форм белка SOD1 и боковым амиотрофическим склерозом с использованием методов молекулярного моделирования» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного

постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (редакция № 335 от 21.04.2016 г.), а сам автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Официальный оппонент,
старший научный сотрудник
теоретического отдела,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,
кандидат биологических наук



Д.В. Антонец

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека»
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
+7(383)336-60-10
antonec@yandex.ru

Подпись Д.В. Антонца заверяю
ученый секретарь
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,
кандидат биологических наук, доцент



О.А. Плясунова