

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Иванисенко Никиты Владимировича
на тему: «Исследование белок-белковых взаимодействий в комплексе DISC внешнего
сигнального пути программируемой клеточной гибели
методами компьютерного моделирования»
по специальности 1.5.8. – «математическая биология, биоинформатика»

Диссертационная работа Иванисенко Н.В. посвящена исследованию с помощью методов молекулярного и математического компьютерного моделирования взаимодействий ряда сигнальных белков, играющих ключевую роль в программируемой клеточной смерти – апоптозе. Цель работы – выявление структурно-функциональной организации макромолекулярного комплекса DISC (Death Inducing Signaling Complex), вызывающего клеточную гибель посредством запуска внешнего CD95/TRAIL рецептор-опосредованного сигнального пути апоптоза. Несмотря на предпринимаемые сейчас в мире большие усилия по изучению фундаментальных основ апоптоза, молекулярные аспекты указанных белок-белковых взаимодействий и их взаимосвязь с другими компонентами сигнальных каскадов клеточной смерти во многом остаются не расшифрованными. Это, несомненно, свидетельствует об актуальности темы диссертации и ее научной значимости.

Диссертация построена по классической схеме, состоит из Введения, обзора современного состояния проблемы (Глава 1), Раздела «Материалы и методы» (Глава 2), четырех глав (главы 3-6) с описанием результатов исследований, Заключения, Выводов, Списка сокращений и одного приложения (Раздел «Дополнительные материалы»). Текущая версия диссертационной работы изложена на 187 страницах, включает 38 рисунков и 10 таблиц. Список литературы содержит 144 источник. Во Введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, описаны научная новизна и практическая значимость работы, а также изложены положения, выносимые на защиту. степень достоверности результатов. Кроме того, представлены сведения об апробации диссертационной работы, о публикациях соискателя и о его личном вкладе в настоящее исследование. Глава 1 представляет собой литературный обзор, который затрагивает следующие основные тематики: 1) Программируемая клеточная гибель: внутренний и внешний сигнальные пути (Раздел 1.1); 2) Сигнальный путь программируемой клеточной гибели, опосредуемый CD95L/FasL и TRAIL (Раздел 1.2); 3) Про- и анти-апоптотическая функция белка c-FLIP в регуляции программируемой клеточной гибели (Раздел 1.3); 4) Молекулярные механизмы активации проаксазы-8 белком c-FLIPL (Раздел 1.4); 5) Роль белка c-FLIP в инициация сигнального пути NF-кВ (Раздел 1.5); 6) Модели связывания DED белков в комплексе DISC (Раздел 1.6); 7) Математические модели инициации

программируемой клеточной гибели (Раздел 1.7); 8) Методы молекулярного моделирования структур белков (Раздел 1.8). Из обзора литературы следует, что, несмотря на большой интерес к структурной организации, динамическому поведению и взаимодействию белков в сигнальных комплексах – участниках апоптоза, - число работ, посвященных применению методов компьютерного моделирования к их изучению, все еще ограничено. Это означает, что рассматриваемая проблема остается очень актуальной. Одной из серьезных задач является выбор адекватных физических моделей изучаемых систем и математических методов их анализа в вычислительном эксперименте. В первую очередь – для обеспечения адекватного исследования конфигурационного фазового пространства этих мезоскопических систем, поскольку экспериментальных данных, которые могут быть применены в качестве структурных ограничений при моделировании, недостаточно. Поскольку решение поставленных в работе задач 1 невозможно без привлечения данных экспериментов, большое внимание в обзоре литературы также удалено совместному использованию численного моделирования и экспериментальных методов структурной биологии.

Изложенный в Главе 1 материал непосредственно связан с тематикой работы и четко изложен. Это, несомненно, является хорошим подспорьем для студентов и аспирантов, начинающих работать в данной области, а также для специалистов, желающих ознакомиться с современным состоянием дел в ней. Отмечу, что для раскрытия темы автор привлекает свежий библиографический материал – в Списке литературы много источников последних лет. Изложенная в обзоре литературы информация подводит читателя к логически обоснованным выводам относительно целей диссертационной работы и формулировке конкретных задач, которые необходимо решить.

Глава 2 («Материалы и методы, применяемые для структурного и математического моделирования») посвящена описанию используемых автором вычислительных протоколов, математических моделей и компьютерных программ. В большинстве случаев материал изложен четко и дает наглядное представление об использованных подходах. В то же время, у меня есть замечания, касающиеся подробности изложения ряда технических деталей вычислений (см. далее), – слишком краткое подчас их описание может затруднить заинтересованным исследователям самостоятельное воспроизведение изложенных в работе результатов.

Представленные в диссертационной работе научные результаты разбиты на четыре раздела (Главы 3-6) – они относятся к проведению виртуального скрининга соединений,

потенциально способных действовать на гетеродимер белков с-FLIPL/каспаза-8 (Глава 3), структурному моделированию комплекса DISC (Глава 4), предсказанию на основе последовательности белка NEMO структуры пептида, способного связываться с DED1 доменом белка с-FLIP (Глава 5) и математическому моделированию кинетики инициации программируемой клеточной гибели с учётом образования комплекса прокаспаза-8/с-FLIP (Глава 6). В ходе выполнения работы автором были получены следующие основные научные результаты:

1. С помощью методов молекулярного моделирования и с применением данных количественной масс-спектрометрии построена модель пространственной структуры комплекса DISC, на основе анализа которой сделаны предположения о ключевой роли белка с-FLIP в регуляции длины филамента, о важности кооперативных взаимодействий DED филаментов для формирования DISC, а также о присутствии функционально важного участка белка NEMO, ответственного за инициацию сигнального пути NF-кВ.
2. На основе аминокислотной последовательности белка NEMO предсказана структура пептида-миметика, потенциально способного связываться с белком с-FLIP в составе комплекса DISC и подавлять активацию сигнального пути NF-кВ.
3. С использованием метода виртуального скрининга предсказана структура химического соединения FLIPin, способного связываться с гетеродимером с-FLIPL/каспаза-8 на интерфейсе двух белковых субъединиц, обеспечивая стабилизацию комплекса и аллостерическую регуляцию активного центра каспазы-8. Предсказана способность соединения FLIPin усиливать активацию каспазы-8 и индукцию апоптоза.
4. Предложена оригинальная математическая модель, описывающая действие разработанного автором низкомолекулярного химического соединения FLIPin при активации сигнального пути рецептора CD95, изучены молекулярные механизмы действия соединения FLIPin на количественном уровне и определено оптимальное соотношение между белками с-FLIP и каспазой-8, при котором наблюдается наибольшая индукция программируемой клеточной гибели.

Важно, что, несмотря на сложность и громоздкость объектов исследования – полноатомных моделей белок-белковых комплексов – автору удалось в целом воспроизвести в некоторых случаях имеющиеся (немногочисленные!) экспериментальные наблюдения. Более того, проведенный на основе предложенных белковых комплексов рациональный компьютерный дизайн низкомолекулярного соединения и пептидо-миметика показал свою эффективность – активность созданных молекул была

подтверждена экспериментально. Учитывая имеющиеся в настоящее время сложности получения в прямых биофизических экспериментах структурной информации о белок-белковых комплексах, вовлеченных в работу многоуровневых сигнальных каскадов клетки и, как следствие, крайнюю ограниченность таких данных, большое значение приобретает возможность применения вычислительных подходов. Это позволяет создавать молекулярные модели таких комплексов, а на их основе – новые перспективные биологически активные соединения, способные направленным образом регулировать работу этих сложнейших белковых машин. Ряд таких подходов был создан и применен в диссертационной работе.

Важно, что автор обсуждает проблему применимости и ограничений использованных методов моделирования. Отмечу, что многие (хотя и не все – см. замечания ниже) из перечисленных результатов опубликованы автором. Считаю, что цель и задачи, сформулированные в работе, достигнуты в ходе её выполнения. Выводы и заключения, представленные автором, логически обоснованы и убедительно показывают новизну и применимость разработанного метода. Важнейший показатель высокого научного уровня диссертационной работы – список публикаций автора по данной теме. Основные результаты по теме диссертации изложены в 10 печатных изданиях, все из которых входят в список ВАК, большинство из них реферируется в международных базах данных Web of Science / Scopus. Соискатель имеет статьи в высокорейтинговых профильных журналах, включая Cell Death and Differentiation, Trends in Cell Biology, Oncogene, Scientific Reports и др. Важно также, что во многих статьях Иванисенко Н.В. является первым автором, что свидетельствует о его решающем личном вкладе в эти исследования. Таким образом, все основные результаты работы прошли тщательное рецензирование и, я уверен, обсуждение с редакторами и анонимными рецензентами. Выносимые на защиту результаты неоднократно докладывались на российских и международных научных конференциях. Поэтому у меня нет сомнений в значимости и корректности опубликованных результатов.

По материалам диссертации считаю необходимым сформулировать ряд вопросов и замечаний.

1. В Главе 3, при конструировании низкомолекулярного соединения FLIPin, имитирующего по своей способности связываться с комплексом с-FLIPL/каспаза-8 петлю L2 в закрытой конформации, автор использовал виртуальный скрининг обширной базы соединений (около 100 тысяч молекул), причем протокол отбора включал трудоемкие

«ручные» стадии. Не пробовал ли автор в качестве такого соединения использовать пептид (или пептидо-миметик) на основе последовательности самой петли L2, возможно, с некоторыми модификациями (D-аминокислоты, точечные замены для оптимизации и пр.)?

2. В ходе компьютерного моделирования пространственной структуры и особенностей поведения сложнейших белок-белковых сигнальных ансамблей, обладающих к тому же способностью к тонкой регуляции своей работы в клетке в зависимости от условий окружения, автор применяет большой набор доступных программных средств (Rosetta, FoldX, MODELLER и др.). Но при этом указанные программы применяются в протоколах «по умолчанию», без тщательной калибровки параметров и проверки эффективности/корректности их работы. (По крайней мере, эти аспекты в работе не обсуждаются.) Безусловно, каждый из этих пакетов прошел проверку в исследованиях их создателей и других пользователей, но реализованные в них подходы, как и любая эмпирическая модель, нуждаются в строгих доказательствах применимости к конкретному классу объектов. Поскольку в работе автора речь идет об изучении белков и их комплексов, для которых нет экспериментальных структурных данных, этот вопрос приобретает особую важность. Считаю, что автору следует в дальнейшем уделить вопросу анализа адекватности и качества моделей самое пристальное внимание, ведь от этого критическим образом зависит результат прогноза механизмов функционирования соответствующих белков. На мой взгляд, это особенно явно видно в случае моделирования FADD платформы комплекса DISC (Глава 4), в рамках которого было сделано много произвольных («на глаз») структурных преобразований при построении моделей DED филаментов.

Технические вопросы и замечания:

3. При создании моделей пространственной структуры как отдельных белков, так и их комплексов автор активно применял замены остатков / модификацию их ротамерных состояний на интерфейсе и в сайте связывания лиганда, что также могло вносить искажения в модели. Как именно автор решал вопрос об их адекватности? Отмечу, что это – нетривиальная задача, которая пока не имеет решения в общем случае.

4. В работе нет сведений о том, как учитывали эффекты среды – за исключением того, что в ряде случаев при манипуляциях с белком в его структуре оставляли молекулы воды, присутствующие в кристаллической структуре.

5. Значения энергии связывания (Табл. 4.3.1 – 4.3.5), рассчитанные для отличающихся по химическому составу систем с использованием силового поля, нельзя сравнивать между собой. Физический смысл имеет лишь сравнение значений свободной энергии связывания.
6. Как принимали во внимание конформационную подвижность взаимодействующих белков и/или лигандов при решении задач молекулярного докинга? Как при этом осуществляли выбор оценочной функции при ранжировании решений?

Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают моей высокой оценки работы Иваниенко Н.В. Высказанные замечания носят рекомендательный характер и служат для того, чтобы подчеркнуть сложность поставленной задачи, которая была успешно решена автором. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные, хорошо оформлена и легко читается. Полученные автором результаты, наряду с богатым справочным материалом, несомненно, будут полезны не только исследователям, занимающимся и структурной биологией и биоинформатикой белков, включая белок-белковые комплексы (в т.ч. филаменты), но и специалистам в других областях – молекулярной биофизике, медицинской химии, биоинженерии. Подобные лаборатории и группы существуют в ВУЗах и научно-исследовательских организациях – на ряде естественнонаучных факультетов МГУ им. М.В. Ломоносова, СПбГУ и др., в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, в Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН и др.

Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

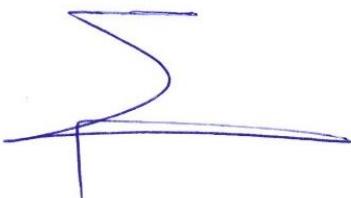
Заключение. Диссертационная работа на тему «Исследование белок белковых взаимодействий в комплексе DISC внешнего сигнального пути программируемой клеточной гибели методами компьютерного моделирования» соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.8. – «математическая биология, биоинформатика» (по

биологическим наукам), а ее автор Иваниенко Никита Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – «Математическая биология, биоинформатика».

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук, профессор,
главный научный сотрудник
Лаборатории моделирования биомолекулярных систем
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

ЕФРЕМОВ Роман Гербертович



25 октября 2021 г.

Контактные данные:

тел.: 7(903)7431656, e-mail: r-efremov@yandex.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.01.02 – «биофизика»

Адрес места работы:

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН),
Лаборатория моделирования биомолекулярных систем
Тел.: 7(495)3305874; e-mail: efremov@nmr.ru

Подпись проф. Р.Г. Ефремова удостоверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН

д.ф.-м.н.

В.А. Олейников

25.10.2021 г.

