


УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
молекулярной биологии им. В.А.

Энгельгардта Российской академии наук
член-корреспондент РАН



 _____ Георгиева С.Г.

«25» октября 2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертационную работу Иванисенко Никиты Владимировича **«Исследование белок-белковых взаимодействий в комплексе DISC внешнего сигнального пути программируемой клеточной гибели методами компьютерного моделирования»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика.

Основные научные результаты и их актуальность для науки и практики

Работа Иванисенко Н.В. посвящена молекулярным механизмам активации внешнего сигнального пути программируемой клеточной гибели (апоптоза), происходящей в результате связывания специфических лигандов с некоторыми из членов семейства рецепторов ФНО, которые называют "рецепторами смерти" (РС). Согласно современным представлениям, основными РС, которые индуцируют апоптоз, являются рецепторы CD95/Fas и TRAIL-R1/R2 (DR4/DR5). Взаимодействие "лигандов смерти" с РС приводит к активации каскада белок-белковых взаимодействий, что приводит к сборке сигнального комплекса, индуцирующего клеточную гибель (англ. Death Inducing Signaling Complex, сокр. DISC). Функциональная активность комплекса DISC может регулироваться за счет изменения уровня белков с-FLIP, FADD и прокаспазы-8 в данном комплексе. Поскольку состав и структура комплекса DISC имеют ключевое значение в активации апоптотических или антиапоптотических сигнальных путей, данный комплекс является центральным объектом исследования в рассматриваемой диссертационной работе. Известно, что нарушение активации РС ассоциировано с целым рядом онкологических и нейродегенеративных заболеваний, а также иммунопатологий, как врожденных, так и приобретенных. В связи с этим исследование процессов активации РС на молекулярном уровне представляет большой фундаментальный и практический интерес.

В работе Иванисенко Н.В. методы молекулярного и математического моделирования применялись для предсказания структуры комплекса DISC, а также для поиска и дизайна соединений, направленно воздействующих на компоненты комплекса DISC. Предсказанные соединения представляют большой интерес в качестве инструментов для исследования молекулярных механизмов сборки комплекса DISC, а также могут являться прототипом для дальнейшей разработки лекарственных соединений на их основе.

Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. На основе результатов работы были спланированы эксперименты, подтвердившие предсказания, сделанные *in silico*.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов

В работе предложено соединение, названное авторами FLIPinB, и его оптимизированная версия FLIPinBy, направленно воздействующие на интерфейс димеризации С-концевых доменов белков c-FLIP_L и каспазы-8. Такая стратегия направленного воздействия на активность белка c-FLIP была предложена впервые. Независимая экспериментальная проверка подтвердила предложенный механизм действия FLIPinBy. С использованием системы дифференциальных уравнений и экспериментальных данных об активности данного соединения была построена математическая модель, описывающая действие соединения FLIPinBy на количественном уровне.

С использованием методов молекулярного моделирования, а также доступных экспериментальных данных количественной масс-спектрометрии, была предложена молекулярная модель платформы, сформированной эффекторными "доменами смерти" DED белков FADD, прокаспазы-8 и c-FLIP. Данная структурная модель предполагает наличие селективных сайтов связывания белков прокаспазы-8 и c-FLIP в структуре DED домена белка FADD, что способствует образованию кооперативных DED филаментов. Образование такой макромолекулярной структуры объясняет наличие активности каспазы-8 даже при гиперэкспрессии белка c-FLIP и было предсказано впервые.

Впервые предсказана способность белка c-FLIP в составе комплекса DISC взаимодействовать с белком NEMO, и как следствие, активировать сигнальный путь NF-κB. Были предсказаны пептиды, способные ингибировать данный тип взаимодействий. Предсказанные пептиды также послужили основой для постановки эксперимента, подтвердившего *in silico* предсказания. Полученные результаты служат основой для дальнейшего поиска высокоактивных ингибиторов взаимодействия белков c-FLIP и NEMO, что представляется перспективной стратегией терапии заболеваний, в патогенезе которых участвуют нарушения апоптоза.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа изложена на 187 страницах, содержит 6 глав, 38 рисунков и 10 таблиц, и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы содержит 144 публикации. Также имеется приложение, содержащее 4 протокола запуска пакета программ Rosetta для моделирования структуры комплексов DED доменов. Работа написана хорошим языком и прекрасно структурирована. Вместо отдельной главы с обсуждением результатов имеется отдельное заключение в каждой из глав, а также компактное заключение по всей работе.

Первая глава, содержащая обзор литературы и убедительно подводящая читателя к постановке задач, дает полное представление о проблематике диссертации и подходах компьютерного моделирования, которые могут использоваться для решения поставленных задач. Литературный обзор содержит детальное описание сигнального пути PC CD95/TRAIL-R1, описание структурной и функциональной роли белков, участвующих в активации PC. Также представлено детальное описание современных подходов, которые применяются в области поиска новых лекарственных соединений и моделирования структур белков.

Вторая глава описывает материалы и методы, используемые в данной работе. Здесь детально описаны инструменты и протоколы, которые используются для решения поставленных задач. Протоколы молекулярного моделирования с использованием

инструмента Rosetta приведены в упомянутом виде приложении в XML формате, что позволяет воспроизвести полученные предсказания.

Третья глава содержит результаты виртуального скрининга большой библиотеки химических соединений с целью поиска соединений, способных связываться с димером каспаза-8/c-FLIP_L на интерфейсе их взаимодействия и осуществлять аллостерическую стабилизацию активного сайта фермента. В главе подробно изложены результаты виртуального скрининга и отбора активных соединений. Представленные результаты сопровождаются хорошим иллюстративным материалом, позволяющим их визуализировать. Глава изложена на 10 страницах и содержит 9 рисунков.

Четвертая глава содержит результаты структурного моделирования DED платформы комплекса DISC. Описаны результаты построения гомологичной модели DED доменов белка c-FLIP и оценки энергий белок-белок взаимодействий DED доменов в комплексах c-FLIP/FADD и прокаспаза-8/FADD. Данные результаты, совместно с полученными независимо экспериментальными данными количественной масс-спектрометрии, позволяют предложить модель кооперативной сборки DED филамента. Глава изложена на 27 страницах и содержит 8 рисунков и 6 таблиц.

Пятая глава использует результаты структурного моделирования, полученные в главе 4, для того чтобы предсказать возможность взаимодействия белков c-FLIP и NEMO. Предсказание молекулярной модели комплекса c-FLIP/NEMO получено с использованием подходов сравнительного моделирования и структурного сходства со структурой ks-v-FLIP/NEMO. На основе последовательности белка NEMO предсказаны пептиды, применение которых позволяет экспериментально подтвердить способность белка c-FLIP взаимодействовать с белком NEMO. Глава изложена на 13 страницах и содержит 4 рисунка.

Шестая глава описывает построение математической модели, для количественного описания активности соединения FLIPin. Данная глава, является логичным продолжением результатов, представленных в главах 3 и 4. В главе детально описан процесс построения математической модели, параметры, используемые при моделировании, решение обратной задачи, а также приведены оценки идентифицируемости параметров. Результаты главы 6 позволяют предсказать *in silico* эффективность действия соединений класса FLIPin в зависимости от уровня экспрессии в клетках белков c-FLIP и прокаспаза-8. Глава изложена на 19 страницах и содержит 6 рисунков и 3 таблицы.

Общее заключение по работе занимает 3 страницы и суммирует полученные результаты, сопоставляя их с данными независимой экспериментальной проверки.

Выводы работы корректно сформулированы и резюмируют как проведенные *in silico* расчеты, так и наличие экспериментальных данных, подтверждающих их.

Автореферат построен по стандартной схеме, отлично оформлен, полностью отражает содержание диссертационной работы и при этом не перегружен иллюстрациями.

Следует отметить **публикации по теме диссертации**: это 4 статьи в отечественных и 6 статей в зарубежных журналах, в том числе в высокоимпактных "Oncogene", "Cell Death and Differentiation", "Trends in Cell Biology". Публикации полностью отражают полученные в работе результаты, а Иванисенко Н.В. во всех статьях, кроме одной, является либо первым автором, либо автором с равным вкладом, что указывает на ключевое значение проведенных им биоинформатических исследований для успеха проекта.

Общие замечания

1. Работа выиграла бы от более тесной связи между материалами и методами и обзором литературы. Так, например, виртуальный скрининг описан в разделах 1.8.3 и 2.2, при этом в разделе 2.2 даны ссылки на пакеты программ Glide и Schrödinger, но не объясняются принципы, используемые ими, а в разделе 1.8.3 объяснены общие принципы виртуального скрининга, но не упомянуты конкретные пакеты программ, да и сокращение "BC" введено только в начале раздела 2.2. В результате технические детали проведенной процедуры понятны специалистам, имеющим опыт работы с данными пакетами, но не менее подготовленным читателям.
2. В главе 5 не обсуждаются возможности дизайна низкомолекулярных ингибиторов с использованием метода виртуального скрининга, способных связываться с интерфейсом взаимодействия с-FLIP/NEMO. Низкомолекулярные химические соединения могут обладать лучшими фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами по сравнению с пептидными, а также в целом обычно более привлекательны для фарминдустрии. Такая работа может являться логическим продолжением тематики исследований, и хотя бы краткое обсуждение перспектив такой работы было бы полезно.
3. Еще одним возможным продолжением тематики исследований, перспективы которого было бы интересно обсудить, представляются расчеты молекулярной динамики, которые могли бы дополнительно подтвердить аллостерическое воздействие на активный сайт каспазы-8.
4. В главе 6 автору стоило бы указать, для каких раковых опухолей или клеточных линий наблюдается оптимальное соотношение между уровнями белков с-FLIP и прокаспазы-8. Полученные предсказания могли бы быть использованы для постановки экспериментов для дополнительной валидации модели, а также для оценки перспективности предложенного соединения в качестве химиотерапии в комбинации с CD95L или TRAIL.
5. В работе обнаруживаются неточности: неудачные формулировки, громоздкие фразы, опечатки, пунктуационные ошибки. Например, при описании научной новизны и практической значимости работы идет речь о "терапии раковых клеток", а полученные в ходе работы соединения с перспективными свойствами называются лекарствами (стр. 15). Количество подобных неточностей невелико, не искажает смысла и не мешает восприятию материала.
6. Некоторые неточности обнаруживаются на рисунках, например на рис. 3.1.5, 3.2.1 и 3.2.2 используется различное цветовое представление одного и того же аминокислотного остатка C360. На рисунках 3.1.5 и 3.2.1 не указаны водородные связи между соединением и белком-мишенью, что усложняет визуальное восприятие комплекса.
7. В списке работ, опубликованных по теме диссертации, следовало бы привести русскоязычные оригиналы статей в журналах "Биохимия", "Молекулярная биология" и "Генетика", а не их переводные варианты.

Вышеуказанные замечания носят рекомендательный характер, не умаляют научных достоинств работы Н.В. Иванисенко, не влияют на достоверность полученных результатов и сделанных выводов, и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Заключение

Диссертация Иванисенко Никиты Владимировича "Исследование белок-белковых взаимодействий в комплексе DISC внешнего сигнального пути программируемой клеточной

гибели методами компьютерного моделирования”, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. - математическая биология, биоинформатика, является самостоятельным научным исследованием, обладающим выраженной научной новизной. Выводы хорошо обоснованы полученными данными, результаты опубликованы в десяти статьях в рецензируемых научных журналах и обсуждены на международных конференциях. Представленная работа по научной новизне, актуальности, теоретической значимости и другим параметрам полностью соответствует п.п. 9-14 “Положения о присуждении ученых степеней” (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.), а ее автор, Иванисенко Никита Владимирович, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика.

Отзыв заслушан и одобрен на объединенном дистанционном семинаре лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии и лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии 20 октября 2021 г.

Отзыв составил главный научный сотрудник, заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, руководитель Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН Купраш Дмитрий Владимирович (специальность 06.03.01 - молекулярная биология), E-mail kuprash@eimb.ru, тел. +79166550098.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32; тел: +74991352311; веб-сайт: <http://www.eimb.ru>; E-mail: isinfo@eimb.ru.

25 октября 2021 г.



Купраш Д.В.

Подпись Купраша Д.В. заверяю
Ученый секретарь ИМБ РАН
канд. ветеринар. наук



Бочаров А.А.