

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.239.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 17 ноября 2021 г. № 25

О присуждении Иванисенко Никите Владимировичу (гражданин РФ)
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Иванисенко Н.В. «Исследование белок-белковых взаимодействий в комплексе DISC внешнего сигнального пути программируемой клеточной гибели методами компьютерного моделирования» по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика, принята к защите 14.09.2021 г, протокол №20, Диссертационным советом 24.1.239.01 (Д 003.011.01), созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет 24.1.239.01 (Д 003.011.01) утвержден ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Иванисенко Никита Владимирович, 5 апреля 1989 года рождения, в 2012 году окончил Физический Факультет Новосибирского государственного университета, с присуждением степени магистра по направлению подготовки «химическая и биологическая физика». В 2016 году окончил очную аспирантуру ИЦиГ СО РАН по направлению подготовки «06.06.01 Биологические науки». В настоящее время работает научным сотрудником в лаборатории компьютерной протеомики ИЦиГ СО РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории компьютерной протеомики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель – доктор биологических наук, Лаврик Инна Николаевна, зав. лаб. системной биологии программируемой клеточной гибели Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. Ефремов Роман Гербертович, доктор физико-математических наук, профессор, зав. лабораторией моделирования биомолекулярных систем ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», г. Москва
2. Жарков Дмитрий Олегович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, доцент, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), г. Москва в своём положительном отзыве, подписанном главным научным сотрудником, заведующим лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, руководителем Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, доктором биологических наук, профессором РАН, член-корреспондент РАН Купраш Д. В. и утвержденным директором Института, д.б.н. Георгиевой С.Г. указала, что «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 ученой 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.»

Соискатель имеет всего 45 опубликованных работы, в том числе по теме диссертации опубликовано 10 работ, общим объемом 95 стр, в рецензируемых научных изданиях (Wos, Scopus). Во всех опубликованных работах личный вклад автора был определяющий. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Основные публикации по теме диссертации:

1. #Hillert L.K., #**Ivanisenko N. V.**, Espe J., König C., Ivanisenko V.A., Kähne T., Lavrik I.N. Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly // *Oncogene*. 2020. № 8(39). С. 1756–1772. DOI:10.1038/s41388-019-1100-3. # - Равный вклад
2. #Hillert L.K., #**Ivanisenko N. V.**, Busse D., Espe J., König C., Peltek S.E., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer // *Cell Death and Differentiation*. 2020. № 7(27). С. 2117–2130. DOI:10.1038/s41418-020-0489-0. # - Равный вклад
3. **Ivanisenko N. V.**, Buchbinder J.H., Espe J., Richter M., Bollmann M., Hillert L.K., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. Delineating the role of c-FLIP/NEMO interaction in the CD95 network via rational design of molecular probes // *BMC Genomics*. 2019. № S3(20). С. 293. DOI:10.1186/s12864-019-5539-y.
4. **Ivanisenko N. V.**, Lavrik I.N. Mathematical Modeling Reveals the Importance of the DED Filament Composition in the Effects of Small Molecules Targeting Caspase-8/c-FLIPL Heterodimer // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. № 10(85). С. 1134–1144. DOI:10.1134/S0006297920100028.

На диссертацию и автореферат поступило 6 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

- 1) Донцова О.А. - Академик РАН, профессор, д.х.н., зав. кафедрой Химии природных соединений, Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова (г. Москва)
- 2) Коваль О.А. - д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. (г. Новосибирск)
- 3) Козлов К.Н. - к.б.н., доцент, высшая школа прикладной математики и вычислительной физики, ФизМех, Федеральное Государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого”. (г. Санкт-Петербург)

“Незначительные замечания, не влияющие на общую высокую оценку работы, заключаются в отсутствии обсуждения стохастичности при получении выводов об увеличении скорости протекания реакций в гл.6, а также в отсутствии оценки погрешности полученных в результате подбора параметров: как измерялась точность, что было сделано для исключения переобучения модели. Также автору стоило дать расшифровку аббревиатуры DISC в начале текста.»
- 4) Захаренко А.Л. - к.х.н, с.н.с. лаборатории биоорганической химии ферментов Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. (г. Новосибирск)
- 5) Рогачев А.Д. - к.х.н., с.н.с. Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН. (г. Новосибирск)

“После ознакомления с авторефератом возникли следующие вопросы и замечания:1) Ряд аббревиатур (DISC, ОДУ) следовало расшифровать при их первом упоминании в тексте. 2) В цели работы упоминаются дизайн низкомолекулярных и пептидных соединений,

однако не поясняется, какими свойствами должны обладать эти соединения. Эта информация приведена далее в задачах исследования, однако, на мой взгляд, следовало хотя бы в общих чертах описать искомые свойства и в цели работы. 3) В тексте автореферата приводится ряд ссылок на публикации без участия автора, однако не даны полные библиографические данные (например, в разделе «Глава 2. Материалы и методы»). 4) На рисунке 2 автореферата приведены структуры соединений, называющихся FLIPinB и FLIPinB γ , предложенные в качестве лигандов гетеродимера c-FLIP1/каспазы-8. При этом в Положении 3, выносимом на защиту, предлагается название FLIPin, что не соответствует данным рисунка.”

- б) Покровский А.Г. - д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор Института медицины и психологии В.Зельмана НГУ, Заведующий кафедрой фундаментальной медицины НГУ. (г. Новосибирск)

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оба оппонента являются компетентными специалистами в области математической биологии и биоинформатики, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация занимает передовые позиции в области исследования молекулярных механизмов активации программируемой клеточной гибели в системе РАН, сотрудники которого имеют большой опыт разработки и применения биоинформатических методов в области компьютерной протеомики, что позволяет произвести экспертную оценку полученных в диссертационной работе результатов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказано, что белок c-FLIP (Cellular FLICE inhibitory proteins) играет ключевую роль в определении

пространственной структуры и стехиометрии макромолекулярного комплекса DISC (Death Inducing Signaling Complex), обеспечивающего процесс активации внешнего сигнального пути апоптоза через образование активной формы каспазы-8.

Доказана возможность направленного воздействия на белок c-FLIP в составе комплекса DISC с помощью низкомолекулярного химического соединения, названного FLIPin, и пептида – миметика белка NEMO, влияющих на индукцию апоптических или антиапоптических сигнальных путей в процессе активации рецепторов смерти.

Высказана оригинальная гипотеза о ключевой роли взаимодействия N-терминального домена белка c-FLIP с белком NEMO (nuclear factor (NF)- κ B essential modulator) в регуляции активации сигнального пути выживания клеток NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell) и доказана ее правомочность.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые изучена функциональная роль белка c-FLIP в составе комплекса DISC в регуляции внешнего сигнального пути апоптоза через CD95 (кластер дифференцировки CD95/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) рецептор и NF- κ B сигнального пути выживания клеток с использованием предсказанных и рационально сконструированных соединений: низкомолекулярного химического соединения FLIPin (2-[[4-(4-пиридил)бензоил]амино]этил-3-(3-пиридил-метилсульфамоил)бензоат), и пептида LAQLQVA $\text{YHQLFQEY\text{Y}N\text{H}\text{KSSRRRRRRRRR}$, миметика белка NEMO.

Доказано, что химическое соединение FLIPin способно связываться с гетеродимером c-FLIP/каспаза-8 в области интерфейса белок-белковых взаимодействий и обеспечивать стабилизацию активного центра фермента каспазы-8. С помощью математической модели **показано**, что наибольшее усиление активации каспазы-8 и индукции клеточной гибели наблюдается

в присутствии соединения FLIPin при соотношении количества белков с-FLIP:прокаспаза-8 в комплексе DISC в диапазоне между 1:2 и 1:3.

Впервые показано, что DED1 (Death effector domain, эффекторный домен смерти) домен белка с-FLIP в составе комплекса DISC способен связываться с NEMO и осуществлять регуляцию сигнального пути выживания клеток NF-κB.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработаны и сконструированы два соединения: низкомолекулярное химическое соединение 2-[[4-(4-пиридил)бензоил]амино]этил-3-(3-пиридил-метилсульфамойл)бензоат (FLIPin), и пептид LAQLQVAYHQLFQEYYNHIKSSRRRRRRRRR, миметик белка NEMO, способные влиять через взаимодействие с белком с-FLIP на активность сигнальных путей программируемой клеточной гибели, определяющих течение и тяжесть онкологических заболеваний.

Химическое соединение FLIPin может являться прототипом лекарственного препарата и представляет интерес для разработки нового класса лекарств для терапии онкологических заболеваний, ассоциированных с нарушением регуляции сигнальных путей программируемой клеточной гибели.

Пептид-миметик белка NEMO, способный связываться с белком с-FLIP, может служить основой для разработки нового класса лекарств, механизм действия которых базируется на подавлении активации сигнального пути выживания клеток NF-κB.

Результаты диссертационной работы представляют интерес для научно-исследовательских организаций медико-биологического профиля, изучающих различные аспекты онкогенеза, и могут быть использованы как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях, в том числе направленных на разработку новых лекарств для терапии онкологических заболеваний, а также в образовательном процессе на биологических и

медицинских факультетах высших учебных заведений.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы методы молекулярного докинга, виртуального скрининга, методы структурного моделирования, включая белок-белковый докинг, реализованные в пакетах программ FoldX и Rosetta, а также методы кинетического математического моделирования с использованием систем обыкновенных дифференциальных уравнений, что позволило предсказать структуру компонентов макромолекулярной платформы DISC, предсказать низкомолекулярные и пептидные соединения, способные регулировать функциональную активность DISC путем взаимодействия с белком c-FLIP, и описать данные процессы на количественном уровне.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что предсказанные молекулярные механизмы действия соединения FLIPin и пептида, полученного на основе последовательности белка NEMO, на скорость активации программируемой клеточной гибели и подавление сигнального пути NF- κ B, соответственно, подтверждаются независимой экспериментальной проверкой. Разработанные модели структурной организации комплекса DISC и активации сигнального пути программируемой клеточной гибели, не противоречат, но дополняют известные модели, путём учёта особенностей трехмерной организации DED филамента и дополнительных сущностей, таких как гетеродимер c-FLIP/каспаза-8 и соединение FLIPin.

Личный вклад автора заключается в разработке и реализации компьютерных подходов, лежащих в основе исследования, проведении компьютерного моделирования, расчетов и анализа данных, а также в обсуждении полученных результатов и написании публикаций.

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Соискатель Иванисенко Н.В. аргументировано ответил на все задаваемые ему в ходе заседания вопросы.

На заседании 17 ноября 2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Иванисенко Н.В. учёную степень кандидата биологических наук за **решение научной задачи**, связанной с исследованием молекулярных механизмов белок-белок взаимодействий в комплексе DISC с использованием методов компьютерного моделирования, **имеющей значение для развития** новых подходов к терапии онкологических заболеваний и понимания фундаментальных механизмов активации процессов программируемой клеточной гибели рецепторами смерти.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 8 докторов наук по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 21, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель
диссертационного совета,
Академик РАН



В.К. Шумный

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

17.11.2021 г