

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Иванисенко Никиты Владимировича

«Исследование белок-белковых взаимодействий в комплексе DISC внешнего сигнального пути программируемой клеточной гибели методами компьютерного моделирования»

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.8 – математическая биология, биоинформатика

Диссертационная работа Иванисенко Н. В. посвящена анализу процесса активации пути программируемой клеточной гибели (апоптоза), индуцированной связыванием «рецепторов смерти» (DR) с лигандами на поверхности клетки.

Сигнальный комплекс DISC, индуцирующий рецепторзависимый апоптоз, состоит из одного из DR, белков FADD, c-FLIP и каспазы-8. Сборка этого комплекса индуцируется связыванием DR с соответствующим лигандом с последующей олигомеризацией DR. Недавно было выяснено, что в дальнейшем процессе прокаспазы 8 образует филаменты, в которых и происходит ее активация. Многие аспекты этого важного процесса остаются слабо изученными, во многом из-за недостаточности экспериментально определенных структур комплекса DISC. Однако развитие методов молекулярного моделирования структур полипептидов в настоящее время позволяет генерировать гипотезы для последующей экспериментальной проверки на основе моделей высокого качества. Таким образом, работа Иванисенко Н. В., в которой реализован этот подход, вписывается в контекст мировых исследований, и ее актуальность не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Иванисенко Н. В. состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения (разделенных на 4 отдельные главы), общего заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 144 наименования. В работе имеется приложение, описывающие протоколы оптимизации белковых структур и докинга в среде молекулярного моделирования Rosetta.

Введение отличается значительным объемом по сравнению с многими другими диссертационными работами. Фактически, во введении автор дублирует часть обзора литературы для обоснования актуальности и практической значимости работы. Хотя право диссертанта на это не вызывает сомнений, подробное изложение механизмов апоптоза на 7 страницах во введении представляется излишним.

Обзор литературы дает подробную информацию о внешнем пути апоптоза. В обзоре можно выделить две части: в первой освещаются механизмы активации прокаспазы-8, организация комплекса DISC и филаментов, образуемых белками, несущими домены DED, и

дальнейшие процессы, протекающие после образования активной каспазы-8. Во второй части обзора дано описание подходов к компьютерному моделированию структур белков, их взаимодействиям друг с другом и с низкомолекулярными лигандами, а также к численному моделированию сигнальных путей при инициации апоптоза. В целом литературный обзор полностью отвечает поставленным задачам.

Глава «Материалы и методы» содержит описание вычислительных методов, использованных в работе. Поскольку работа носит исключительно расчетный характер, следовало бы назвать ее просто «Методы». Глава отличается предельной краткостью, по объему она даже меньше введения к диссертации. В принципе нельзя назвать это значительным недостатком, поскольку все методы, необходимые для понимания работы, описаны, однако можно было бы привести в этом разделе информацию о настройках параметров использованных программ, если они, как часто бывает, отличаются от настроек по умолчанию.

Результаты работы и их обсуждение оформлены в виде 4 отдельных глав (главы 3–6). В главе 3 описан скрининг и дальнейшая оптимизация низкомолекулярных лигандов, способных связываться с $\beta 6/\alpha 3$ -полостью белка c-FLIP и нарушать таким образом его взаимодействие с прокаспазой-8. Глава 4 посвящена построению модели комплекса DISC на основе известных экспериментально определенных структур отдельных его компонентов и моделей, построенных с применением разных методов гомологичного моделирования и белок-белкового докинга. В главе 5 эти структурные модели использованы для получения пептидов, связывающихся с комплексом DISC, на основе «лейциновой застежки» белка NEMO – регуляторной субъединицы протеинкиназного комплекса I κ B, также связывающейся с одним из доменов DED белка c-FLIP. Наконец, в главе 6 автор использует полученные представления о структуре и функциях DED-филаментов для построения кинетической модели инициации апоптоза в комплексе DISC.

В ходе работы соискателем было показано, что организация комплекса DISC определяется прежде всего образованием DED-филаментов белком c-FLIP. Был открыт низкомолекулярный лиганд 2-[[4-(4-пиридил)бензоил]амино]этил-3-(3-пиридилметилсульфамоил)бензоат, усиливающий протеолитическую функцию каспазы-8 и CD95-индуцированную активацию сигнального пути апоптоза при взаимодействии с гетеродимером c-FLIP/каспаза-8. Был разработан пептидный миметик α -спирального участка белка NEMO, способный конкурировать с полноразмерным белком NEMO за связывание с c-FLIP и таким образом ингибировать CD95-индуцированную активацию сигнального пути NF- κ B. Во всех случаях расчеты, выполненные диссертантом, послужили основой для предсказаний, которые были проверены экспериментально соавторами работ.

К работе можно сделать ряд замечаний. Прежде всего, при всем значительном числе построенных структурных и кинетических моделей, какие-либо оценки их качества можно найти только в главе 6, где приведены профили правдоподобия для параметров кинетической модели. Прочие же главы проиллюстрированы исключительно структурами, и остается непонятным качество полученных структурных моделей. Как пример, в главе 3 автор начинает с виртуального скрининга > 16 млн соединений, и использует показатели качества SP Score и XP Score для оценки их взаимодействия с комплексом c-FLIP/каспаза-8. Следовало бы привести статистику этих показателей – их общее распределение и положение в нем отобранных соединений. Отдельно стоит заметить, что последний этап этого отбора описывается как «визуальная инспекция», что при итоговом выборе 18 соединений из 5000 вызывает ощущение некоторой произвольности выбора. Какую-то статистику качества построенных моделей белков тоже хотелось бы видеть; например, в качестве такого показателя часто используют сравнение конформационных нарушений в модели по сравнению с белками сходного размера в базе данных PDB. В главе 6 можно задать много вопросов к использованной математической модели. К примеру, автором не обосновывается выполнимость критерия избыточности и однородности распределения реагирующих молекул, необходимого для применения подхода обыкновенных дифференциальных уравнений в противовес стохастическим моделям. При рассмотрении значений параметров в табл. 6.1.2 некоторые из них находятся весьма далеко от значений, характерных для биологических молекул: так, константа k_d скорости димеризации каспазы-8/прокаспазы-8 рассматривалась в области $10^{-3} \text{ ч}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1}$ (т. е., в более привычных единицах, $\sim 300 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), в то время как обычно константы скорости ассоциации при образовании белок-белковых комплексов выше на 3–4 порядка. Более того, поскольку предполагается, что часть реакций протекает на поверхности DED-филамента, правильнее было бы описывать их не уравнениями для реакции в растворе, а уравнениями для молекул, адсорбированных на поверхности. Наконец, автор ссылается на опубликованные с его участием работы, когда говорит об экспериментальном подтверждении результатов расчетов. Включение в диссертацию – разумеется, с надлежащей атрибуцией – иллюстративного материала, описывающего результаты экспериментов, помогло бы читателю оценить надежность этих подтверждений.

Сделанные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Иванисенко Н. В. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данной теме.

Работа Иванисенко Н. В. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления структурных особенностей процесса рецепторзависимой активации апоптоза под влиянием внеклеточных сигналов, имеющая существенное значение для важнейшего направления биологии — выявления механизмов регуляции программируемой клеточной гибели.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, установленным п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, в редакции постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Иванисенко Никита Владимирович, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 – математическая биология, биоинформатика.

Заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, член-корреспондент РАН

Жарков Дмитрий Олегович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Телефон: (383) 363-51-50

Факс: (383) 363-51-53

Эл. адрес: niboch@niboch.nsc.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю.

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к. х. н.



Пестряков П. Е.

25 октября 2021 г.