

Иванисенко Никита Владимирович

**ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛОК-БЕЛОК ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В
КОМПЛЕКСЕ DISC ВНЕШНЕГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ
ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ МЕТОДАМИ
КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

1.5.8. – Математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в лаборатории компьютерной протеомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель:	Лаврик Инна Николаевна, доктор биологических наук, зав. лабораторией системной биологии программируемой клеточной гибели ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».
Официальные оппоненты:	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 Жарков Дмитрий Олегович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), г. Москва

Защита диссертации состоится «___» _____ 20__ г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу:

пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090, +7 (383) 3634906, факс +7 (383) 3331278.

e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Развитие целого ряда нейродегенеративных и онкозаболеваний ассоциировано с нарушением баланса между регуляцией апоптотических и анти-апоптотических сигнальных путей в процессе активации рецепторов смерти (РС). Состав и структура комплекса DISC, сборка которого происходит в процессе активации РС, имеет решающее значение в активации апоптотических или анти-апоптотических сигнальных путей. Функциональная активность комплекса DISC может регулироваться за счет белок-белковых взаимодействий его ключевых компонент: белков с-FLIP, FADD, прокаспазы-8 и каспазы-8. Однако, многие структурные и количественные характеристики данных процессов на сегодняшний день остаются неизвестными. Ввиду особой важности сигнального пути РС в регуляции программируемой клеточной гибели, нарушения которой связано с развитием целого ряда патологий, исследование данных процессов имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Белки с-FLIP и прокаспазы-8 содержат N- концевые DED (Death Effector Domain; эффекторный домен смерти) домены, необходимые для сборки DED платформы, внутри которой, происходят процессы димеризации C- концевых доменов и образования активной формы каспазы-8, осуществляющей инициацию клеточной гибели. На сегодняшний день, существует целый ряд вопросов о тонких молекулярных механизмах белок-белковых взаимодействий как N- концевых, так и C- концевых доменов в образовании активной формы каспазы-8, а именно (1) какой функциональной активностью обладает гетеродимер с-FLIP_L/каспазы-8, и возможно ли увеличить каталитическую активность данного комплекса с использованием рационально сконструированных химических соединений; (2) какую структуру имеет DED платформа комплекса DISC для различных количественных соотношений между белками с-FLIP, прокаспазы-8 и FADD; (3) способен ли комплекс DISC активировать сигнальный путь выживания NF- κ B за счёт прямого белок-белкового взаимодействия DED1 домена белка с-FLIP с белком NEMO, как это наблюдается для ks-v-FLIP, вирусного гомолога белка с-FLIP; (4) возможно ли количественное описание активации каталитической функции каспазы-8 с учётом знаний, полученных при ответе на вопросы (1)-(3).

При этом для решения данных вопросов на сегодняшний день разработан и может быть применен целый ряд современных методов компьютерного моделирования, которые включают методы дизайна низкомолекулярных химических соединений, направленно воздействующих на заданные сайты в структуре белка-мишени, методы структурного моделирования белковых комплексов, и методы математического моделирования для количественного и временного описания процессов активации комплекса DISC.

Целью работы являлось исследование структурно-функциональной организации макромолекулярного комплекса DISC, ключевой платформы активации

внешнего CD95/TRAIL рецептор-опосредованного сигнального пути программируемой клеточной гибели, с использованием методов молекулярного и математического моделирования, а также рационального дизайна низкомолекулярных и пептидных соединений.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести компьютерный дизайн низкомолекулярных химических соединений, способных специфически взаимодействовать с гетеродимером с-FLIP_L/каспаза-8 в области интерфейса белок-белковых взаимодействий, с целью стабилизации комплекса и аллостерической регуляции активного центра фермента каспазы-8.
2. Провести компьютерную реконструкцию пространственной структуры макромолекулярного комплекса DISC, содержащего в своем составе белки с-FLIP, FADD, прокаспазу-8, каспазу-8 и образуемые ими DED филаменты.
3. Предсказать белок-белковые взаимодействия между белками с-FLIP и NEMO в составе макромолекулярного комплекса DISC.
4. Провести компьютерный дизайн пептидных ингибиторов на основе последовательности белка NEMO, способных связываться с белком с-FLIP и подавлять активацию сигнального пути NF-κB.
5. Построить математическую модель индукции CD95-опосредованного пути программируемой клеточной гибели, описывающую с помощью системы ОДУ динамику состава комплекса DISC и активацию каталитической функции каспазы-8 в присутствии низкомолекулярных химических соединений, аллостерических регуляторов каталитической активности гетеродимера с-FLIP_L/каспаза-8.

Научная новизна: Впервые предсказана структура низкомолекулярного химического соединения, способного связываться с белком с-FLIP в составе гетеродимера с-FLIP_L/каспаза-8, и приводить к активации протеолитической функции каспазы-8 и индукции программируемой клеточной гибели. Впервые построена компьютерная модель пространственной структуры DED филамента, входящего в макромолекулярный комплекс DISC, образованного в результате белок-белковых взаимодействий белков с-FLIP, FADD и прокаспазы-8. Показано, что белок с-FLIP может способствовать кооперативному связыванию комплексов DISC в супрамакромолекулярную структуру за счет взаимодействия между DED филаментами этих комплексов. Впервые предсказана способность DED1 домена белка с-FLIP в составе комплекса DISC взаимодействовать с белком NEMO. Впервые предсказаны структуры пептидов, способных ингибировать взаимодействия белков с-FLIP и NEMO и осуществлять регуляцию сигнального пути NF-κB. Впервые создана математическая модель индукции CD95-опосредованного пути программируемой клеточной гибели, описывающая с помощью системы ОДУ

кинетику активации каспазы-8 в присутствии низкомолекулярного химического соединения FLIPin, аллостерического регулятора каталитической активности гетеродимера c-FLIP_L/каспаза-8, в зависимости от состава комплекса. С использованием математической модели сделано предсказание, что низкомолекулярные химические соединения, которые способны связываться с белком c-FLIP в составе гетеродимера c-FLIP_L/каспаза-8 и приводить к активации протеолитической функции каспазы-8, могут обладать эффективностью для терапии раковых клеток с повышенной экспрессией белка c-FLIP.

Практическая значимость. Полученные низкомолекулярные химические соединения FLIPin являются основой для создания нового класса лекарств, механизм действия которых базируется на активации внешнего сигнального пути программируемой клеточной гибели, через усиление протеолитической активности каспазы-8 в составе комплекса c-FLIP_L/каспаза-8. Полученные пептидные соединения являются основой для создания нового класса лекарств, механизм действия которых базируется на подавлении активации сигнального пути выживания клеток NF-κB, путем ингибирования взаимодействия белков c-FLIP и NEMO. Данные лекарства могут быть использованы для терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний, а также других заболеваний, лечение которых требует активации программируемой клеточной гибели. Полученные малые химические соединения и пептиды могут быть использованы, как молекулярные зонды для проведения исследований инициации внешних сигнальных путей программируемой клеточной гибели.

Методы исследования. Для решения поставленных задач в работе использовались 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.

Положения, выносимые на защиту.

1. Белок c-FLIP (Cellular FLICE inhibitory protein) определяет структуру и стехиометрию макромолекулярного комплекса DISC (Death Inducing Signaling Complex), участвуя в образовании DED (Death Effector Domain) филаментов и их кооперативном связывании.
2. Пептид LAQLQVAYHQLFQEYYNHIKSSRRRRRRRRR, являясь структурным миметиком альфа-спирального участка (K123-Y156) белка NEMO (NF-κB essential modulator), способен связываться с N- терминальным доменом белка c-FLIP и препятствовать его взаимодействию с белком NEMO, что приводит к ингибированию CD95-индуцированной активации сигнального пути NF-κB.

3. Низкомолекулярное химическое соединение 2-[[4-(4-пиридил)бензоил]амино]этил-3-(3-пиридил-метилсульфамоил)бензоат, получившее название FLIPin (с-FLIP interactor), усиливает протеолитическую функцию каспазы-8 и CD95-индуцированную активацию сигнального пути апоптоза, что, согласно компьютерной модели, обусловлено взаимодействием FLIPin с гетеродимерным комплексом с-FLIP/каспаза-8 в области контакта С- терминальных доменов субъединиц.

Личный вклад. Результаты, полученные с использованием различных методов компьютерного моделирования получены автором самостоятельно. Автором разработаны и реализованы компьютерные подходы, лежащие в основе исследования, проведено компьютерное моделирование и обработка, расчет, а также анализ литературных данных и обсуждение полученных результатов. Экспериментальные данные были получены коллективом лаборатории д.б.н. Лаврик И.Н.

Апробация работы. Результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях: 26th Conference of the European Cell Death Organization (Санкт-Петербург, 10 октября – 12 октября 2018 года); Международный конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, 20–22 февраля 2017 года); BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE/SYSTEMS BIOLOGY (Новосибирск, 29 августа – 02 сентября 2016 года); Симпозиум «Системная биология репарации ДНК и программируемой клеточной гибели» в рамках 11 Международной мультikonференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 20–22 августа 2018 года); Мультikonференция "Биотехнология — медицине будущего" (Новосибирск, 29 июня - 02 июля 2019); Беляевские чтения (Новосибирск, 7-10 августа 2017 года); Первая студенческая научно-образовательная школа-конференция по генетике и биотехнологиям (Сочи/Сириус 18-22 августа 2017 года).

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 10 печатных изданиях, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus).

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и одного приложения. Полный объем диссертации составляет 187 страницы, включая 38 рисунков и 10 таблиц. Список литературы содержит 144 наименования.

Содержание работы

Во **введении** обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, приводится обзор научной литературы по изучаемой проблеме, формулируется цель, ставятся задачи работы, излагается научная новизна и практическая значимость представляемой работы.

Глава 1. Обзор литературы

Описаны молекулярные механизмы образования комплекса DISC и активации сигнального пути программируемой клеточной гибели через PC CD95/Fas и TRAIL-R1/2. Описывается структура, функциональная роль и доменная организация основных компонент комплекса DISC, белков c-FLIP, прокаспазы-8/каспазы-8 и FADD (Рис. 1). Представлены механизмы активации каспаз и, в частности, каспазы-8, как основной инициаторной каспазы внешнего пути апоптоза. Кроме того, описана структура эффекторных доменов смерти (DED) и доменов смерти (DD). Обсуждается роль белка c-FLIP в формировании комплекса DISC и активации сигнальных путей выживания NF- κ B. Описываются современные инструменты молекулярного моделирования, включая методы молекулярного докинга, виртуального скрининга и белок-белок докинга.

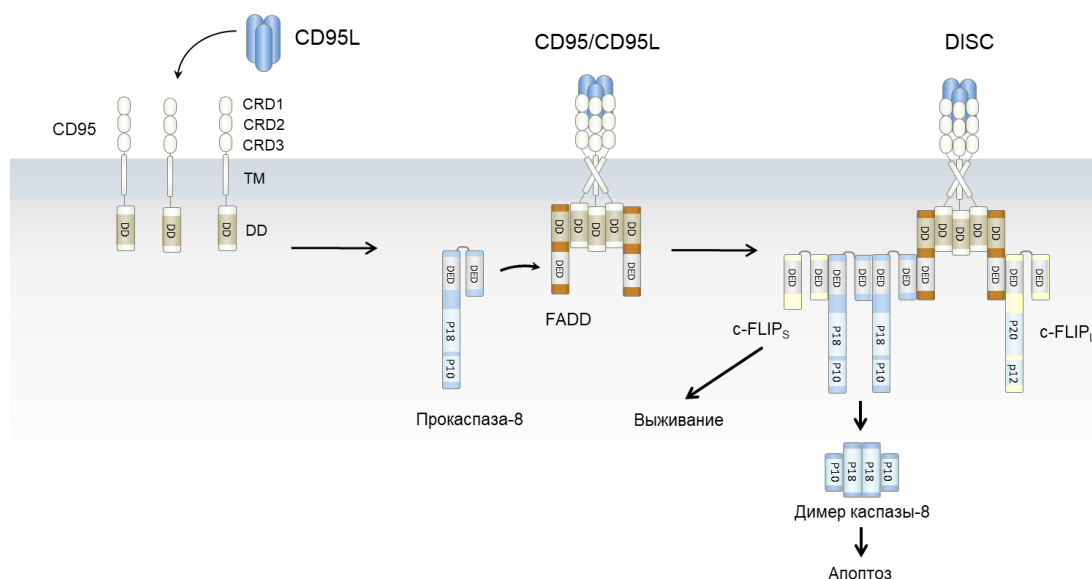


Рисунок 1. Схема активации внешнего сигнального пути программируемой клеточной гибели CD95. Обозначения: эффекторные домены смерти (DED), домены смерти (DD), транс-мембранный домен (TM), цистеин-богатые домены (cysteine rich domains, CRD), сигнальный комплекс индуцирующий смерть (DISC).

Глава 2. Материалы и методы, применяемые для структурного и математического моделирования

Глава 2 посвящена методам и компьютерным подходам, которые применялись для структурного и математического моделирования. Для проведения виртуального скрининга использовался пакет молекулярного докинга Glide Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-1 (Schrödinger, Inc) (Friesner et al., 2004). Структурное моделирование проводилось с использованием пакетов Rosetta, FoldX и Modeller (Leman et al., 2020; Schymkowitz et al., 2005; Webb et al., 2016). Множественное выравнивание осуществлялось с использованием веб-сервера PSI-Coffee (Chang et al., 2012). Детальный протокол Rosetta, который включал оценку эффективности белок-белковых взаимодействий, описан в виде XML файлов и представлен в приложении к диссертации. Моделирование кинетической математической модели проводилось с использованием скрипта, написанного на языке Python и пакета SciPy (www.scipy.org).

Глава 3. Виртуальный скрининг соединений, направленных на гетеродимер c-FLIP_L/каспаза-8

Глава 3 посвящена предсказанию структуры низкомолекулярных химических соединений, способных увеличивать активность комплекса c-FLIP_L/каспаза-8, с использованием подхода виртуального скрининга.

Было предположено, что закрытая конформация нерасщепленной L2 петли прокаспазы-8 в комплексе гетеродимера c-FLIP_L/прокаспазы-8 играет ключевую роль в про-апоптотической функции данного гетеродимера, что связано со стабилизирующими эффектами данной петли на активный центр каспазы-8 (Jeffrey et al., 2009). Протеолитическое расщепление L2 петли в структуре прокаспазы-8 может приводить к переходу из закрытой конформации петли в открытую и потере активности каспазы-8. Для того чтобы проверить данную гипотезу был проведен рациональный дизайн низкомолекулярных химических соединений, направленных на таргетирование комплекса c-FLIP_L/каспаза-8 (Рис. 2).

Структура комплекса c-FLIP_L/каспаза-8 была предсказана на основе двух ранее опубликованных кристаллических структур: кристаллической структуры C-концевой части гетеродимера прокаспазы-8/c-FLIP_L и структуры активных субъединиц каспазы-8 p18 и p10 [PDB ID 4PRZ], в которой наблюдается открытая конформация L2 петли. Комплекс c-FLIP_L/каспаза-8 был предсказан на основе структурного выравнивания субъединиц каспазы-8 [PDB ID 4PRZ] на субъединицу прокаспазы-8 [PDB ID 3H11] (Рис. 2).

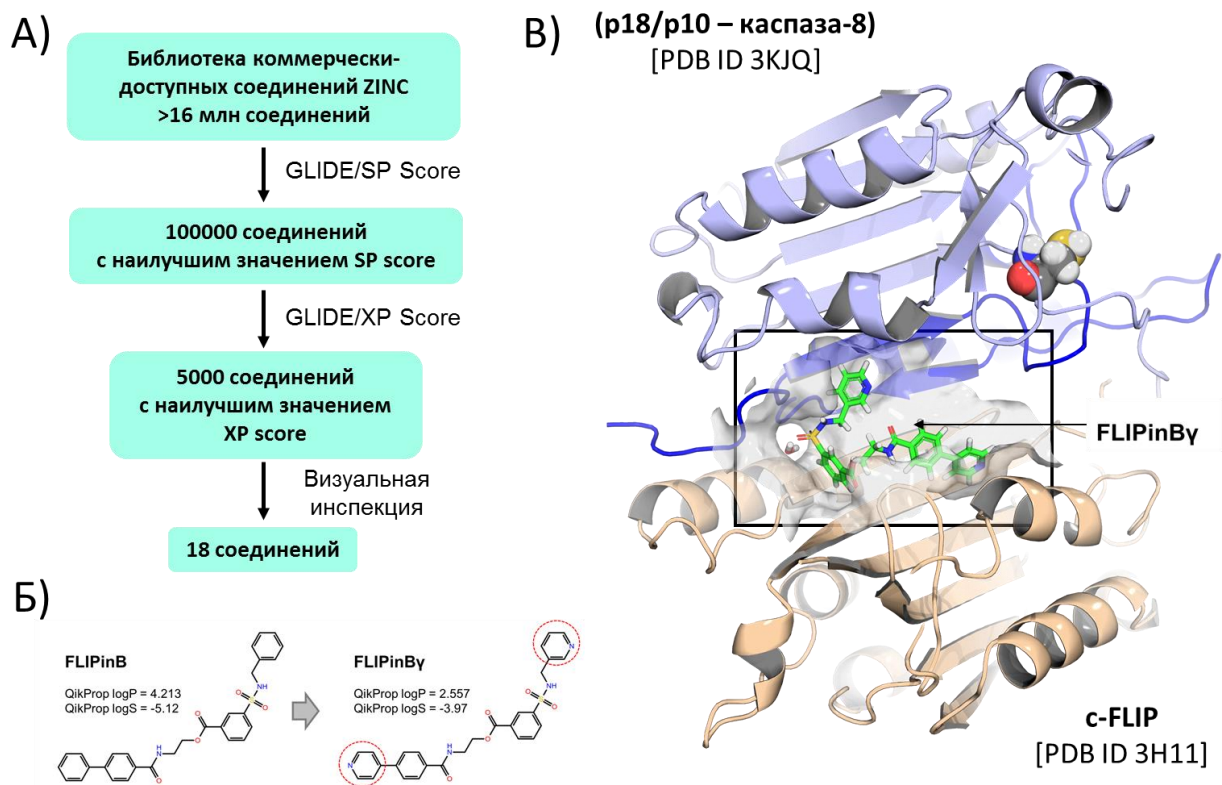


Рисунок 2. Виртуальный скрининг соединений, направленных на гетеродимер с-FLIP_L/каспаза-8. А) протокол виртуального скрининга. Б) Структура оптимизированного соединения FLIPinBy (QikProp LogP – предсказанный коэффициент липофильности, QikProp LogS – коэффициент растворимости в воде). В) Структурная модель каспазы-8 в комплексе с белком с-FLIP_L после расщепления L2 петли, в комплексе с соединением FLIPinBy. Атомы C360 активного сайта каспазы-8 показаны сферами. Указаны PDB идентификаторы, использованные для построения модели.

С использованием метода виртуального скрининга библиотеки химических соединений ZINC (> 16 млн. соединений) было отобрано химическое соединение, направленно воздействующее на структуру комплекса с-FLIP_L/каспаза-8, названное FLIPinB (Рис. 2). В дальнейшем, данное соединение было оптимизировано с целью улучшения его физико-химических свойств. В результате было получено химическое соединение FLIPinBy, которое согласно *in silico* расчётам, способно имитировать действие L2 петли и стабилизировать активную конформацию каталитического сайта каспазы-8. Механизм действия соединения основан на предположении о потере активности гетеродимера с-FLIP_L/каспаза-8 в результате смещения L2 петли после протеолитического расщепления прокаспазы-8.

Независимая экспериментальная проверка показала способность данного соединения имитировать действие L2 петли в закрытой конформации и стабилизировать активную конформацию каталитического центра каспазы-8. А именно, была продемонстрирована способность соединения FLIPinBy связываться с рекомбинантным белком с-FLIP_L, усиливать скорость активации клеточной гибели и потерю жизнеспособности клеток при совместном воздействии FLIPinBy/CD95L или

FLIPinB γ /TRAIL, увеличивать скорость активации каспазы-3, а также скорость активации прокаспазы-8 в комплексе DISC (Hillert et al., 2020).

Глава 4. Структурное моделирование комплекса DISC

В главе 4 проводится структурное моделирование комплекса DISC, содержащего DED белки FADD, c-FLIP, каспазу-8 и прокаспазу-8. В качестве шаблона для построения структурной модели DED филамента, включающей все DED белки, была использована структура DED филамента прокаспазы-8 (PDB ID 5l08). Построение модели включало следующие шаги: (1) предсказание структуры FADD платформы, которая могла бы служить затравкой для роста DED филаментов, включающих в себя прокаспазу-8 и белки c-FLIP; (2) предсказание структуры димеров DED доменов белков c-FLIP/FADD и прокаспазы-8/FADD с последующей оценкой аффинности их взаимодействий; (3) предсказание структуры комплекса DISC, состоящей из DD и DED доменов белков CD95, FADD, c-FLIP, и прокаспазы-8.

Структурная модель FADD платформы, содержащая DD домены белков CD95/FADD и DED домены белка FADD, была получена путем взаимного пространственного выравнивания DED и DD олигомеров. Построенная модель показала, что существует целый ряд конформаций FADD, при которых отсутствуют стерические препятствия для образования DED филаментов, затравкой для роста которых может служить DED домен белка FADD. Более того, данная модель предполагает, что рост филамента DED возможен в трех направлениях от FADD DED, инициированный связыванием белков с FADD DED посредством взаимодействий типа I, II или III. Типы I, II или III взаимодействий DED доменов обеспечивают сборку DED филаментов и основаны на взаимодействиях интерфейсов Ia/Ib, IIa/IIb и IIIa/IIIb (Рис. 3).

Далее в главе 4 проводилась оценка эффективности взаимодействия гетеродимеров FADD/c-FLIP и FADD/прокаспазы-8 для различных интерфейсов DED доменов в составе DED филамента. При этом структура DED домена белка c-FLIP была получена с использованием метода моделирования по гомологии. Оптимизация структур и оценка эффективности взаимодействий проводилась с использованием энергетического функционала и протоколов молекулярного моделирования Rosetta. Проведенные расчеты позволили провести ранжирование интерфейсов FADD DED по их эффективности связывания с DED доменами белков прокаспазы-8 и c-FLIP в составе филаментов DED. При этом количественное сравнение энергий взаимодействий в комплексах c-FLIP/FADD и прокаспазы-8/FADD проводилось только между интерфейсами одного типа ввиду их высокого структурного сходства. Согласно проведенному анализу, интерфейс DED2 Ib белка c-FLIP имел статистически значимо более высокое абсолютное значение энергии связывания с интерфейсом FADD Ia (область $\alpha 1 / \alpha 4$) по сравнению с энергией связывания

соответствующего интерфейса DED2 Ib прокаспазы-8 с тем же участком белка FADD (Рис. 3). Более того, интерфейс DED1 Ia белка с-FLIP имел более низкое абсолютное значение энергии связывания с интерфейсом FADD Ib (область $\alpha 2 / \alpha 5$) по сравнению с соответствующим интерфейсом DED1 Ia прокаспазы-8 (Рис. 3). На основании данных расчетов было сделано предположение о том, что белок FADD содержит два сайта различных сайта связывания с белком с-FLIP и прокаспазой-8.

Полученные предсказания, были использованы для предсказания конфигурации платформы, образованной DED доменами белка FADD. Ядро этой модели инициировано формированием «платформы FADD», состоящей из от 3-х до 5-ти DED доменов белка FADD. Олигомер FADD DED дает возможность инициирования роста трех цепей DED, образованных посредством взаимодействий типа I (цепи «а», «б», «в»). В соответствии с предыдущими работами, соседние цепи связаны друг с другом посредством взаимодействий типа II и III. Предполагалось, что каждая субъединица FADD DED может взаимодействовать с DED1 доменом белка прокаспазы-8 в «прямом» и DED2 доменом белка с-FLIP в «обратном» направлении (Рис. 3). Согласно оценкам энергий связывания, платформа FADD может связываться с прокаспазой-8 DED1 и с-FLIP DED2, которые взаимодействуют с интерфейсами Ib/IIIa и Ia/IIIb FADD DED, соответственно.

Полученная топология модели основывается не только на анализе энергий взаимодействий *in silico*, но и подтверждается независимыми экспериментальными данными, о способности белка с-FLIP связываться в комплекс DISC в клетках, в которых отсутствует каспаза-8, Jurkat-C8 - / - (Hillert et al., 2020), данными количественной масс-спектрометрии (Hillert et al., 2020), а также предыдущими исследованиями, в которых показана важность взаимодействия типа I между DED1-прокаспазы-8/FADD и DED2-с-FLIP/FADD (Majkut et al., 2014; Ueffing et al., 2008). Кроме того, была предсказана дополнительная стабилизация филаментов DED, которая ведет к формированию «кооперативных» сетей DISC. Сборка кооперативных сетей DISC обеспечивается объединением соседних комплексов DISC через взаимодействие DED филаментов.

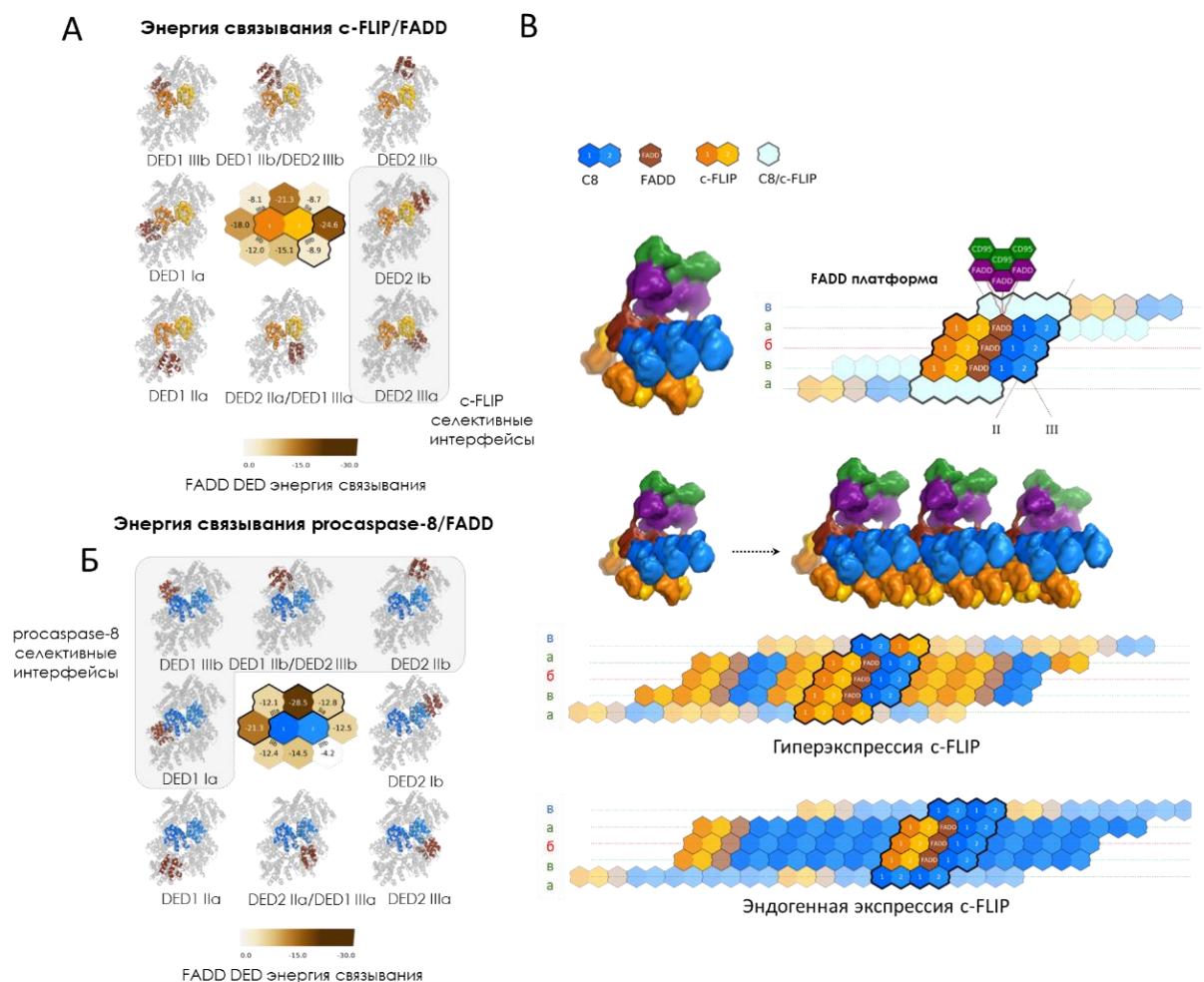


Рисунок 3. Структурные модели гетеродимеров c-FLIP/FADD (А) и прокаспазы-8/FADD (Б), образованные посредством взаимодействий типа I / II / III. Градиент коричневого цвета отображает энергии взаимодействия, оцененные с помощью пакета моделирования Rosetta, от светлого (слабое взаимодействие) к тёмному (сильное взаимодействие). Указаны значения, представленные в энергетических единицах Rosetta. Указаны интерфейсы взаимодействия DED доменов белков c-FLIP или прокаспазы-8 и соответствующие расчетные энергии связывания с белком FADD. Интерфейсы взаимодействия с предсказанной селективностью к белку FADD выделены серым цветом. DED1 и DED2 белка c-FLIP показаны оранжевым и желтым цветами, соответственно. DED1 и DED2 прокаспазы-8 показаны темно-синим и светло-синим цветами, соответственно. Шаблонная структура DED филамента прокаспазы-8 (PDB ID 5l08), используемая для предсказания гетеродимерных комплексов, показана серым цветом. В) Модель кооперативной сборки DED филаментов. Сверху показана схема минимальной платформы FADD DISC, способной инициировать рост DED филамента в комплексе DISC. Три цепи «а», «б» и «в» образуемые за счёт взаимодействий типа I в DED филаменте, обозначены и выделены пунктирными линиями. Места взаимодействия цепей «а» и «в» в DED филаменте обозначены их дублированием прозрачным цветом вверху и внизу диаграммы, что означает сдвиг на -6 и $+6$ положений в цепи DED, соответственно, учитывая спиральную симметрию DED филаментов. Внизу показана модель кооперативной сборки комплекса DISC в клетках при гиперэкспрессии c-FLIP, а также без его гиперэкспрессии. Выделена конфигурация платформы FADD. DED1 и

DED2 домены белка c-FLIP показаны оранжевым и желтым цветами, соответственно. DED1 и DED2 домены прокаспазы-8 показаны темно-синим и голубым цветами, соответственно. FADD DED отображается коричневым цветом. CD95 DD и FADD DD показаны зеленым и фиолетовым цветами, соответственно.

Глава 5. Предсказание структуры пептида на основе последовательности белка NEMO, способного связываться с DED1 доменом белка c-FLIP

В главе 5 было проведено исследование роли белка c-FLIP в CD95-индуцированной активации NF-κB. Для этой цели, были использованы рационально сконструированные пептиды, способные связываться с DED1 доменом белка c-FLIP. Для осуществления компьютерного дизайна пептидов была построена гомологичная модель белка c-FLIP в комплексе с белком NEMO, с использованием опубликованной структуры комплекса ks-v-FLIP/NEMO в качестве шаблона (PDB ID 3CL3).

Известно, что белок c-FLIP входит в состав DED филаментов комплекса DISC. На основе подхода структурного моделирования, было показано, что белок NEMO может связываться с c-FLIP в составе DED филаментов без стерических затруднений. Более того, согласно структурной модели, суперзакрученный домен димера NEMO может одновременно связываться с двумя DED филаментами. Анализ структурной модели позволяет предположить, что одновременное связывание двух филаментов может приводить к дополнительной стабилизации комплекса c-FLIP/NEMO в результате взаимодействия между полярными остатками белка NEMO и DED филаментов (Рис. 4).

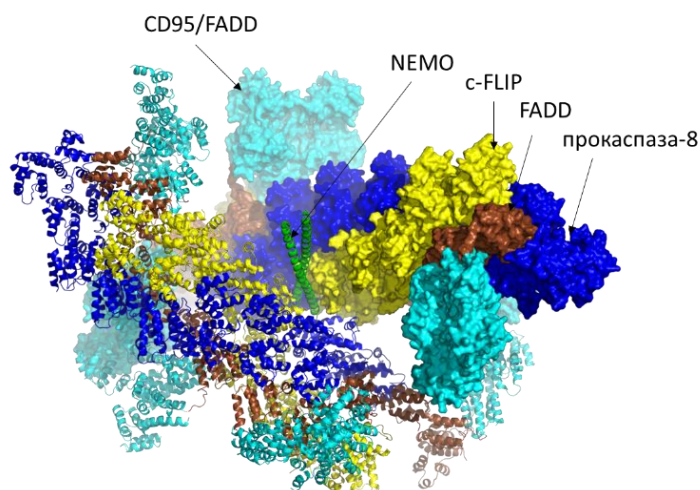


Рисунок 4. Структурная модель комплекса двух кооперативных DED филаментов комплексов DISC, связанных с белком NEMO (показан зеленым цветом). DED домены прокаспазы-8 показаны синим цветом, DED домены белка c-FLIP желтым цветом, DED домены белка FADD коричневым, DD олигомер белков FADD и CD95 показан голубым цветом.

Был проведен дизайн пептидов на основе последовательности участка NEMO (227-248, LAQLQVAYHNQLFQEYDNIHKS), который, как было предположено, на основании гомологичной модели, способен связываться с белком c-FLIP (Рис. 5). Пептид с последовательностью LAQLQVAYHNQLFQEYDNIHKS был назван FNIIP. Интересно, что оценки эффективности связывания с использованием программы FoldX показали, что FNIIP имеет повышенную аффинность связывания с вирусным белком ks-v-FLIP по сравнению с белком c-FLIP. В связи с этим, последовательность пептида FNIIP была оптимизирована. В результате структурного моделирования *in silico* с использованием пакета FoldX была проведена замена D242Y в последовательности LAQLQVAYHNQLFQEYDNIHKS, которая, согласно предсказанию *in silico*, позволяет увеличить гидрофобные взаимодействия и образовать дополнительную водородную связь с аминокислотным остатком E57 белка c-FLIP. К С- концевому участку данного пептида была добавлена последовательность RRRRRRRR для увеличения его способности проникать внутрь клетки. В результате данный пептид был назван superFNIIP. Более того, были сконструированы контрольные пептиды, включая пептид, содержащий, так называемую случайно перемешанную последовательность NEMO (227-248) (scrFNIIP); а также второй контрольный пептид был сконструирован путём внесения двух мутаций, F238A и D242A в последовательность NEMO (227-248) (nosuperFNIIP). На основании структурной модели, было сделано предположение о том, что данные контрольные пептиды должны иметь значительно сниженную аффинность связывания с белком c-FLIP.

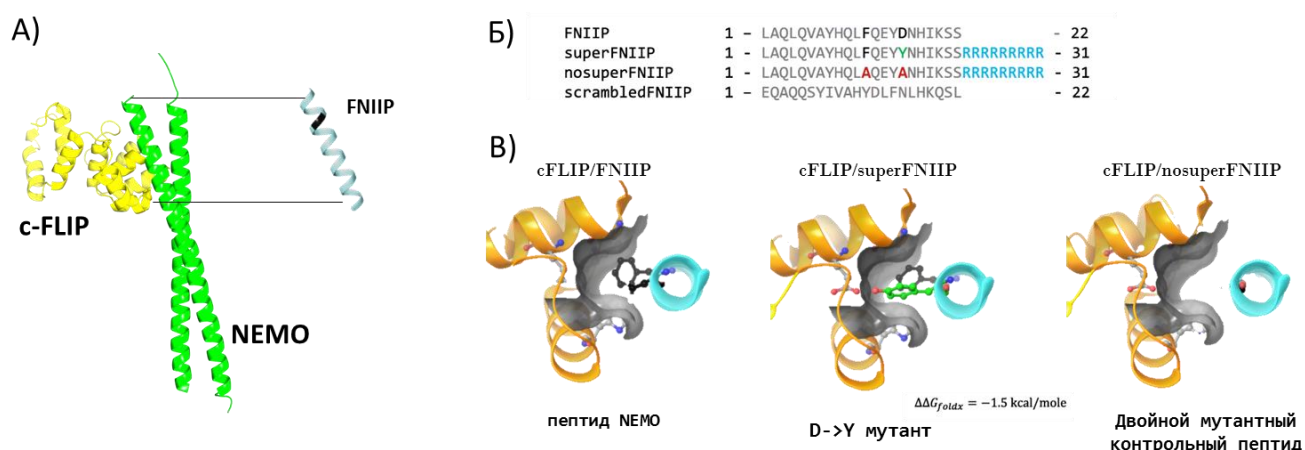


Рисунок 5. Дизайн c-FLIP связывающих (FNIIP и superFNIIP) и контрольных пептидов (nosuperFNIIP, scrambledFNIIP) на основе белка NEMO. А) Показан участок белка NEMO (227-248) в комплексе с белком c-FLIP и пептид FNIIP. Б) Пептидные последовательности. В) Модели комплексов c-FLIP/FNIIP (слева), c-FLIP/superFNIIP (в центре) и c-FLIP/nosuperFNIIP (справа).

В результате экспериментальной проверки была показана способность пептидов связываться с белком c-FLIP (Ivanisenko et al., 2019). Пептиды superFNIP и FNIP показали способность связываться с белками c-FLIP_L и c-FLIP_R, в то время как контрольные пептиды не связывались с белками c-FLIP. Таким образом, тест система показала способность пептидов NEMO взаимодействовать с обеими изоформами белка c-FLIP, что может свидетельствовать о вовлеченности N-концевого участка белков в данный тип взаимодействий. Данное предположение было основано на том, что N-концевой участок, содержащий DED домены, является общим элементом структуры двух данных изоформ белка c-FLIP, что находится в полном согласии с результатами дизайна пептидов. Кроме того, в независимой экспериментальной проверке была продемонстрирована способность пептида superFNIP понижать секрецию IL-8 - маркера активации NF-κB, по сравнению с контрольным пептидом posuperFNIP, что подтверждает эффективность его действия.

Глава 6. Математическое моделирование инициации программируемой клеточной гибели с учётом образования комплекса прокаспазы-8/c-FLIP_L и действия соединения FLIPin

Глава 6 содержит результаты математического моделирования кинетики инициации программируемой клеточной гибели с учётом образования комплекса прокаспазы-8/c-FLIP_L. На основе системы ОДУ была построена математическая модель, которая учитывала основные стадии активации каспазы-8 в комплексе DISC, а также предложенный механизм действия соединения FLIPin (Рис. 6). Параметры данной модели были подобраны на основе анализа литературных данных и подобраны путём решения обратной задачи, используя экспериментальные данные по активности соединения FLIPin.

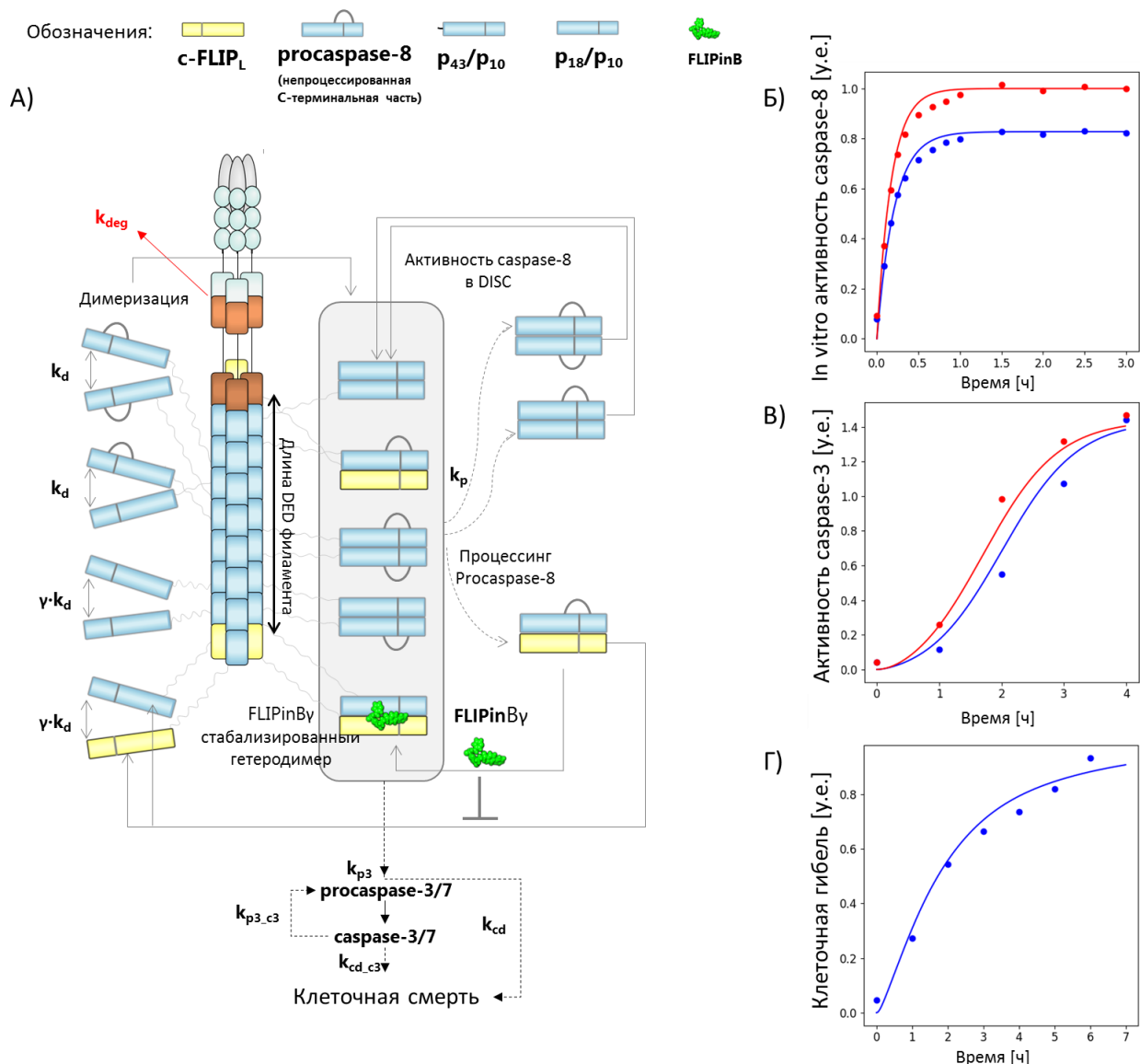


Рисунок 6. Математическая модель активации каспазы-8 (caspase-8) в составе комплекса DISC, учитывающая действие соединения FLIPin. А) Схема модели. Указаны сущности модели и константы взаимодействий. Б-Г) Модельные кинетики и экспериментальные данные, использованные для подбора параметров модели. Б) Активность каспазы-8 (caspase-8) в комплексе DISC. В) Активность каспазы-3/7 (caspase-3/7). Г) Уровень клеточной гибели (проникновение Cytox Red внутрь клетки являлось индикатором клеточной гибели). Линии – модельные данные, точки – экспериментально измеренные значения. Обработка CD95L показана синим цветом, в то время как обработка CD95L/FLIPinB показана красным цветом. Экспериментальные данные получены из (Hillert et al., 2020).

С использованием полученной математической модели было показано, что усиление скорости активации прокаспазы-8 наблюдается преимущественно в начальные моменты времени при добавлении CD95L к клеткам, что способствует более сильной индукции апоптоза (Рис. 7). Последнее может быть объяснено высокой скоростью деградации комплекса DISC, а также лимитирующим скорость процессом олигомеризации прокаспазы-8 с последующим образованием

каталитически активных субъединиц. Действительно, время полужизни комплекса DISC было оценено всего в 1 час, в то время как согласно построенной модели для активации всех молекул прокаспазы-8 в клетке в комплексе DISC требуется значительно больше времени. С использованием математической модели было предсказано, что самая высокая активность соединения FLIPin может наблюдаться при соотношении прокаспазы-8:с-FLIP_L в диапазоне от 2:1 до 3:1 (Рис. 7). Отношение прокаспазы-8:с-FLIP_L, соответствующее 2:1 приводит к наибольшему уровню гибели клеток, тогда как соотношение 3:1 связано с наибольшей активностью каспазы-8 в комплексе DISC. В связи с этим следует подчеркнуть, что некоторые раковые клетки экспрессируют высокие уровни белка с-FLIP_L, которые близки к количествам, предсказываемым математической моделью. Это говорит о том, что соединения, разработанные на основе FLIPin, обладают высоким потенциалом в качестве противораковых лекарств.

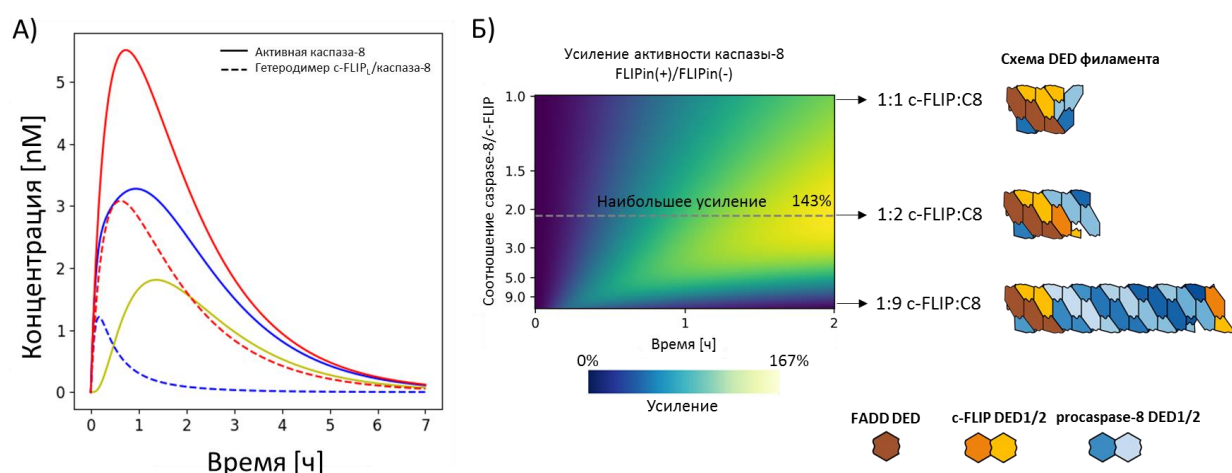


Рисунок 7. Предсказания математической модели. А) Кинетика активации каспазы-8, предсказанная с использованием модели. Сплошная линия – активная форма каспазы-8. Пунктирная линия - активная форма каспазы-8 в составе гетеродимера с-FLIP_L/каспазы-8. Концентрация активной каспазы-8 показана синим цветом при обработке клеток CD95L, и красным - при добавлении CD95L/FLIPin. Желтым цветом показана разница в концентрации активной каспазы-8 при добавлении FLIPin. Б) Относительное увеличение уровня активности каспазы-8 (C8) для различных соотношений с-FLIP:каспазы-8 в DED филаменте, согласно предсказаниям математической модели. Градиент цвета обозначает усиление активности C8 при добавлении соединения FLIPin. Состав DED филамента, соответствующий наиболее высокой активности соединения FLIPin указан пунктирной линией. Показана 3D схема DED филамента, соответствующая указанным соотношениям.

Выводы

1. С использованием метода виртуального скрининга предсказана структура химического соединения FLIPin, способного связываться с гетеродимером с-FLIP_L/каспазы-8 на интерфейсе двух белковых субъединиц, обеспечивая стабилизацию комплекса и аллостерическую регуляцию активного центра каспазы-8. Предсказана и подтверждена экспериментально способность соединения FLIPin усиливать активацию каспазы-8 и индукцию апоптоза.
2. Построена модель пространственной структуры комплекса DISC с использованием экспериментальных данных количественной масс-спектрометрии, оценки энергий взаимодействий DED доменов и методов молекулярного моделирования.
3. На основе анализа структурной модели комплекса DISC выдвинуты предположения: (а) о ключевой роли белка с-FLIP в регуляции длины филамента; (б) об образовании макромолекулярного комплекса DISC за счет кооперативных взаимодействий DED филаментов; (в) о присутствии функционально важного участка белка NEMO, ответственного за инициацию сигнального пути NF-κB, способного связываться одновременно с двумя DED филаментами, содержащими белок с-FLIP.
4. С использованием методов молекулярного моделирования и рационального дизайна на основе последовательности белка NEMO предсказана структура пептида-миметика, способного связываться с белком с-FLIP в составе комплекса DISC, что подтверждено экспериментально.
5. С использованием построенной математической модели, описывающей процессы активации сигнального пути CD95 в присутствии FLIPin, изучены молекулярные механизмы действия соединения FLIPin на количественном уровне и предсказано, что наибольшее усиление индукции программируемой клеточной гибели и активации каспазы-8 наблюдается при соотношении количества белков с-FLIP:прокаспазы-8 в комплексе DISC в диапазоне между 1:2 и 1:3.

Публикации автора 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. (Импакт-фактор 9.867; WoS; Scopus)
2. Seyrek K. #, **Ivanisenko N. V.** #, Richter M., Hillert L.K., König C., Lavrik I.N. Controlling Cell Death through Post-translational Modifications of DED Proteins. // *Trends in Cell Biology*. 2020. № 5(30). С. 354–369. DOI:10.1016/j.tcb.2020.02.006. # - Равный вклад. (Импакт-фактор 20.808; WoS, Scopus)
3. 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. (Импакт-фактор 15.828; WoS; Scopus)
4. **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. (Импакт-фактор 3.969; WoS; Scopus)
5. **Ivanisenko N. V.**, Seyrek K., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. The role of death domain proteins in host response upon SARS-CoV-2 infection: modulation of programmed cell death and translational applications. // *Cell Death Discovery*. 2020. № 1(6). 1234567890c. DOI:10.1038/s41420-020-00331-w. (Импакт-фактор 5.241; WoS; Scopus).
6. **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. (Импакт-фактор 2.487; WoS; Scopus).
7. **Ivanisenko N. V.**, Lavrik I.N. Mechanisms of Procaspase-8 Activation in the Extrinsic Programmed Cell Death Pathway // *Molecular Biology*. 2019. № 5(53). С. 732–738. DOI:10.1134/S0026893319050091. (Импакт-фактор 1.374; WoS; Scopus).
8. **Ivanisenko N. V.**, Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Computer simulation of the spatial structures of MUC1 peptides capable of inhibiting apoptosis // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2016. № 7(6). С. 771–777. DOI:10.1134/S2079059716070042. (Scopus)
9. König C., Hillert-Richter L.K., **Ivanisenko N. V.**, Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. Pharmacological targeting of c-FLIPL and Bcl-2 family members promotes apoptosis in CD95L-resistant cells // *Scientific Reports*. 2020. № 1(10). С. 1–10. DOI:10.1038/s41598-020-76079-1. (Импакт-фактор 4.379; WoS; Scopus).
10. **Ivanisenko N. V.**, Hillert L., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. Design and experimental validation of small-molecule inhibitors of the FADD protein // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2016. № 7(6). С. 778–784. DOI:10.1134/S2079059716070030. (Scopus)