

Тема работы:

Структурное моделирование сигнального комплекса, индуцирующего программируемую клеточную гибель.

Аннотация:

С использованием методов структурного моделирования была предсказана структура филаментов, состоящих из эффекторных доменов смерти (DED) белков c-FLIP, прокаспазы-8 и FADD. Для этого была проведена сравнительная оценка энергии взаимодействия всех комбинаций интерфейсов эффекторных доменов смерти белков c-FLIP и каспазы-8 с FADD с использованием методов белок-белок докинга высокого разрешения. В результате было предсказано наличие селективных сайтов связывания c-FLIP и каспазы-8 с FADD, а так же получена модель FADD платформы, инициирующей рост DED филамента. Предсказанная модель имела хорошее согласие с экспериментальными данными и позволила предположить новую роль белка c-FLIP в регуляции сборки комплекса DISC.

Состав коллектива:

Иванисенко Никита Владимирович, м.н.с., НГУ, ФИЦ ИЦиГ СО РАН

Научное содержание работы:

1. Постановка задачи.

С использованием методов белок-белок докинга, а также подходов структурного моделирования проводится предсказание структуры комплекса DISC, содержащего в своём составе белки c-FLIP, FADD и прокаспазы-8.

2. Современное состояние проблемы.

CD95/Fas является одним из наиболее изученных рецепторов смерти (DR), которые запускают внешний путь апоптоза. Связывание лигандов смерти CD95L с рецептором CD95 инициирует сборку комплекса, индуцирующего программируемую клеточную гибель (DISC, Death-Inducing Signaling Complex)). Основными компонентами комплекса DISC являются белки FADD, c-FLIP, прокаспазы-8, содержащие DED (death effector domain) домены. DED домены участвуют в сборке олигомерных структур, называемых DED филаментами, которые являются платформой для процессинга и активации прокаспазы-8 - ключевой стадии запуска программируемой клеточной гибели. Однако на сегодняшний день расшифрована только структура DED филамента прокаспазы-8, а так же структуры мономеров белков, входящих в комплекс DISC. Известно, что активация прокаспазы-8 в DED филаментах контролируется короткими и длинными изоформами c-FLIP. Несмотря на очевидный прогресс в понимании механизмов сборки CD95-активированных платформ и DED филаментов, детальный молекулярный механизм участия белка c-FLIP в активации платформы DISC остаётся неясным. В связи с этим, большой интерес представляет структурное моделирование комплекса DISC, содержащего в своём составе ключевые белки c-FLIP, FADD и прокаспазы-8.

DED филаменты образуются за счёт трёх типов взаимодействия ассиметричных интерфейсов отдельных DED доменов ((Рис. 1А), I, II и III тип взаимодействий). За взаимодействие первого типа отвечают интерфейсы Ia и Ib, за счёт взаимодействия II - IIa и IIb, III тип взаимодействий – IIIa и IIIb. В результате данных типов взаимодействий образуется

олигомерная структура со спиральной симметрией и правосторонним вращением. Известно, что белок FADD содержит 1 DED домен, и 1 DD (домен смерти). В свою очередь белки с-FLIP и прокаспаза-8 содержат в своём составе два DED домена, DED1 и DED2. Структуры DED доменов белка прокаспаза-8 и FADD доступны в базе данных PDB (PDB коды 5L08 и 1A1W). В то время, как для белка с-FLIP структура DED домена является неизвестной.

3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.

На первом этапе была предсказана структура DED доменов белка с-FLIP с использованием методов моделирования по гомологии. Для каждого из DED доменов белка с-FLIP был проведен независимый поиск гомологов среди кристаллизованных DED белков, включая FADD (идентификатор PDB 1A1W), ks-v-FLIP (идентификатор PDB 3CL3), MC159 (Идентификатор PDB 2BBR) и прокаспаза-8 (идентификатор PDB 5L08). Множественное выравнивание последовательностей было получено с использованием веб-сервера PSI-Coffee. В результате анализа сходства последовательностей в качестве шаблонов, были отобраны структуры DED1 домена ks-v-FLIP для предсказания структуры DED1 белка с-FLIP. Для домена DED2 был отобран шаблон DED1 домена каспазы-8. Выравнивания аминокислотных последовательностей были использованы для предсказания структуры с-FLIP с использованием пакета Modeller.

Для того что бы оценить способность DED доменов с-FLIP и прокаспаза-8 взаимодействовать с DED FADD, были предсказаны и проанализированы энергии связывания всех комбинаций интерфейсов взаимодействия DED с-FLIP и прокаспаза-8 с DED FADD. В частности, были рассмотрены различные типы взаимодействий DED, например, тип I, II и III. Для этого была использована гомологичная модель с-FLIP, ЯМР-структура FADD-домена F25Y (PDB 1A1W) и субъединица каспазы-8 из структуры DED филамента (PDB 5L08). Обратную мутацию Y25F в структуре FADD DED вводили вручную путем удаления кислорода боковой цепи и переименования остатка.

На первом этапе для того что бы улучшить качество анализируемых структур мономеров, а также предсказать возможные конформационные изменения, опосредованные белок-белковыми взаимодействиями, был использован метод белок-белок докинга, реализованного в пакете Rosetta, для ансамбля конформаций взаимодействующих субъединиц. Для этого для каждой из субъединиц был получен набор из 100 конформаций с использованием протокола Rosetta FastRelax. Среди них были отобраны 30 структур с наилучшей оценочной функцией Rosetta. Гетеродимерные комплексы были получены путем структурного выравнивания конформаций мономеров на субъединицы DED каспазы-8. Таким образом, для каждой пары взаимодействующих белков, было получено 900 структур. Они включали, белок FADD, связанный с Ia-DED1, IIa-DED1, IIIb-DED1 и IIa-DED1 / IIIa-DED1 из DED1, IIb-DED2 / IIIb-DED2, IIa-DED2 и IIIb-DED2 интерфейсами прокаспаза-8 или с-FLIP. Для каждого полученного набора комплексов был проведен один раунд переупаковки, включающий релаксацию боковых остатков, в результате чего для каждой пары были отобраны 30 комплексов с RMSD <2.0 Å, полученных из исходного шаблона и показавшим наилучшие значения оценочной функции. Далее в каждом комплексе проводилось восстановление N-концевого метионина с использованием Rosetta и последующей оптимизацией структуры с использованием протокола FastRelax. Этот этап был использован из-за отсутствия N-концевого остатка прокаспаза-8 в структуре крио-ЭМ и для учета повышенной гибкости N-концевых областей, которые участвуют во взаимодействии типа I.

Полученные комплексы использовали в качестве входных структур для стадии проведения белок-белок докинга высокого разрешения, которое включало небольшие вращательные (0.5 Å) и поступательные (0.1°) возмущения с оптимизацией ротамеров боковых остатков цепей с целью поиска конформации с наилучшей энергией взаимодействия с использованием метода Монте-Карло. На каждом этапе использовалась оценочная функция Ref2015 с

дополнительным штрафом налагаемым за наличие необразованных водородных связей на интерфейсе взаимодействия, а так же дополнительная поправка HBNet, содействующая образованию сетей водородных связей между боковыми остатками. Для каждой пары взаимодействующих гетеродимеров было сгенерировано 900 моделей белок-белок комплексов, среди которых были отобраны наилучшие 5% для расчета средней энергии связи с использованием InterfaceAnalyzer пакета Rosetta.

4. Полученные результаты.

В результате полученных оценок с использованием метода моделирования по гомологии, и белок-белок докинга высокого разрешения была построена структурная модель комплекса DISC c-FLIP:C8:FADD, содержащая в своём составе DED филамент каспазы-8. Построенная модель (Рис. 1Б-Г), основывалась на оценках энергии взаимодействия с использованием Rosetta. Согласно полученным предсказаниям, интерфейсы взаимодействия Ia/IIIb имеют большую афинность к c-FLIP, в то время как интерфейсы Ib/IIIa способны более эффективно связываться с каспазой-8. Более того, анализ DD олигомеров, образованных DD доменами белка FADD, участвующих в связывании с DD CD95 не создают стерических затруднений роста DED филамента ((Рис. 1Б-Г) Hillert, Ivanisenko et al., 2019). Данное предположение создает гипотезу о возможности роста DED филамента в обоих, направлениях.

Таким образом, полученные *in silico* предсказания совместно с широким набором экспериментальных данных, в частности, включавших данные о количественной масс-спектрометрии комплекса DISC, полученные в лаборатории проф. Лаврик И.Н. (университет Магдебург, ИЦиГ) позволили выявить новую роль белка c-FLIP в регуляции комплекса DISC (Hillert, Ivanisenko et al., 2019). Согласно полученным данным белок c-FLIP может участвовать в инициации клеточной гибели, за счёт связывания с белком FADD, а так же терминирует рост DED филамента каспазы-8, за счёт связывания с белком каспаза-8, а не FADD. Более того, взаимное взаимодействие коротких DED филаментов, может приводить к образованию длинных кросс-связанных DED филаментов. Такая кооперативная модель сборки комплекса DISC может являться более эффективным способом активации прокаспазы-8.

5. Иллюстрации, визуализация результатов.

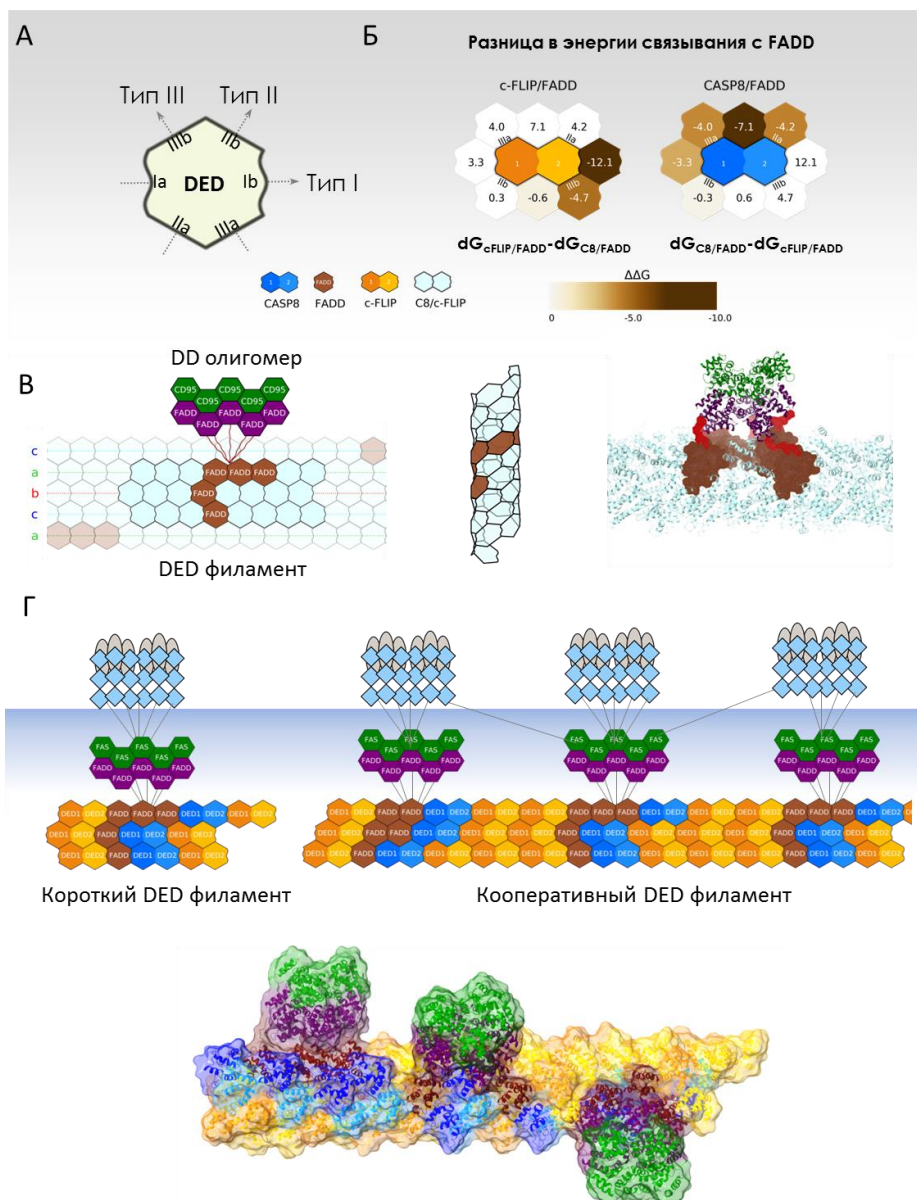


Рис. 1 Предсказанная модель комплекса DISC. А) схематичная структура DED доменов. Обозначены интерфейсы взаимодействия и типы взаимодействий указаны стрелками Б) Рассчитанная разница в энергии взаимодействия FADD с белком с-FLIP и прокаспазы-8. Значения разницы энергии связывания показаны градиентом коричневого цвета. В) Модель FADD платформы, инициирующей рост DED филамента. Показаны 2D схематичная модель (слева), 3D схематичная модель (центр) и структурная модель (справа). Г) Модель комплекса DISC, содержащего с-FLIP, FADD и прокаспазу-8. Показаны двумерные схематичные модели короткого филамента (слева) и кооперативного филамента (справа), а так же структурная модель DISC (снизу).

6. Эффект от использования кластера в достижении целей работы.

Проведение расчетов с использованием Rosetta требует запуска большого числа задач, которые могут рассчитываться независимо и параллельно. Все соответствующие расчеты были проведены на кластере ИВЦ НГУ.

7. Перечень публикаций, содержащих результаты работы.

Hillert LK, Ivanisenko NV, Espe J, König C, Ivanisenko VA, Kähne T, Lavrik IN. Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly. *Oncogene*. 2019 Nov 18:1-7. (Импакт фактор 6.634)