

## **Тема работы: In silico дизайн низкомолекулярных ингибиторов и активаторов апоптоза**

### **Состав коллектива:**

Иванисенко Н.В., НГУ, ИЦИГ, м.н.с.

Ищенко А.С., НГУ, ИЦИГ, студент

Иванисенко В.А., ИЦИГ, к.б.н.

### **Постановка задачи и современное состояние проблемы.**

Рецептор CD95 является одним из наиболее изученных представителей семейства рецепторов смерти. Его активация ведет к запуску апоптоза – программы программируемой клеточной гибели через образование комплекса DISC (Death-Inducing Signaling Complex – комплекс, индуцирующий смерть). Основным структурным звеном комплекса CD95 DISC является адаптерный белок FADD (Fas-Associated Death Domain – Fas-ассоциированный домен смерти), олигомеризация которого необходима для последующей активации прокаспазы-8 в рецепторном комплексе. Белок FADD характеризуется наличием домена смерти и домена DED (Death Effector Domain – эффекторный домен смерти). Домен смерти рецептора CD95 связывается с соответствующим доменом белка-адаптера FADD, а за счет связывания доменов DED происходит образование комплекса с участием прокаспазы-8, 10 и белка c-FLIP. Поиск ингибиторов взаимодействия белка FADD и других ключевых компонент комплекса DISC представляет огромный интерес для исследования структурно-функциональной организации данного комплекса, молекулярных механизмов клеточной гибели и лечения нейродегенеративных заболеваний. В работе был проведен *in silico* виртуальный скрининг с использованием методов молекулярного докинга низкомолекулярных ингибиторов, направленных на FADD.

Известно, что одним из природных белков-ингибиторов FADD является белок mucin-type гликопротеин (MUC1). В частности, было установлено, что два пептида из первичной структуры цитоплазматического домена MUC1 (MUC1-CD), также способны ингибировать связывание caspase-8 с FADD. Однако, пространственная структура белка MUC1-CD до сих пор не расшифрована, что существенно усложняет рациональное конструирование потенциальных лекарств на основе данных пептидов. В связи с этим, в настоящей работе было проведено компьютерное моделирование пространственных структур пептидов MUC1-CD, соответствующих фрагментам белка (1-20 и 46-72), а также анализ их конформационных свойств.

### **Материалы и методы**

#### **Виртуальный скрининг**

Молекулярный докинг лигандов (соединений FADDin) проводился с использованием программы Glide (Schrodinger, Inc.) (Halgren et al., 2004; Friesner et al., 2004; 2006). Данная программа использует модифицированную версию функции ChemScore для оценки энергии взаимодействий «белок – лиганд». Виртуальный скрининг проводился с использованием режима стандартной точности (SP), а также режима экстраточности (XP). Для проведения виртуального скрининга использовались библиотеки коммерчески доступных химических соединений, подготовленных для молекулярного докинга: ZINC NCI Diversity Set, включающая около 1,9 тыс. соединений, а также библиотека, состоящая из >3,5 млн соединений (Irwin et al., 2012). Подготовка белка для виртуального скрининга осуществлялась с использованием модуля Protein Preparation, входящего в состав пакета Schrodinger (Sastry et al., 2013). Перед началом процедуры молекулярного докинга проводились предварительная замена Y25F, а также минимизация состояния белка с ограничением на среднеквадратичное отклонение атомов не более 0,3 Е.

#### **Молекулярная динамика**

Моделирование молекулярной динамики (МД) с неявным представлением воды проводили с помощью модуля `pmemd.cuda` пакета программ Amber 14 (Case et al., 2015) на графических картах NVIDIA Tesla M 2090 в комбинации с моделью неявной воды GB-Neck2 (Nguyen et al., 2013) с использованием атомных радиусов `mbondi3` и силового поля `ff14SBonlysc`. Начальные структуры пептидов генерировали с использованием модуля `cpptraj` (AmberTools 14), затем структуры минимизировали и уравнивали в три шага: 1 000 циклов минимизации, нагрев от 0 до 300 K в течение первых 100 пс, эквilibрация в течение первых 10 нс. Ковалентные связи, включающие атомы водорода, ограничивали с использованием алгоритма SHAKE с точностью 0,00001. Температуру контролировали с использованием термостата Лангевина с частотой столкновений  $\gamma = 1,0 \text{ пс}^{-1}$ . Конечное моделирование структур проводили при температуре 300 K в течение 1 мкс с шагом по времени 2 фс.

## Результаты

### **In silico виртуальный скрининг.**

Анализ структуры белка показал расположение потенциальной полости для связывания низкомолекулярных соединений вблизи альфа-спиралей  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и петли, соединяющей спирали  $\alpha 3$  и  $\alpha 4$ , что и послужило предпосылкой для проведения скрининга *in silico*. Для того чтобы выбрать конформацию белка FADD, которая наиболее эффективно позволяла бы связывать низкомолекулярные соединения с выбранным участком этого белка, был проведен виртуальный скрининг библиотеки NCI Diversity Set, состоящей из ~1,9 тыс. соединений, для всех 25 конформаций белка. Конформации № 2, 11, 13, 23 и 25 имели наибольшее среднее значение так называемой оценочной функции в режиме стандартной точности (SP Score) и были использованы для последующего виртуального скрининга большой библиотеки соединений.

В результате из коммерчески доступных соединений ZINC (>3,5 млн соединений) с использованием режима SP для каждой из указанных выше конформаций были отобраны 1 000 соединений с наилучшим значением оценочной функции SP Score. Для полученного набора соединений был проведен дополнительный молекулярный докинг с использованием режима XP. Были отобраны 100 соединений, имеющих наибольшее значение оценочной функции XP Score для всех анализируемых конформаций белка. Из полученного набора с использованием визуального анализа (Bissantz et al., 2010) были выбраны шесть соединений для последующей экспериментальной проверки *in vitro*. На рис. 1 показаны конформации со связанными потенциальными низкомолекулярными ингибиторами, использованные для молекулярного докинга.

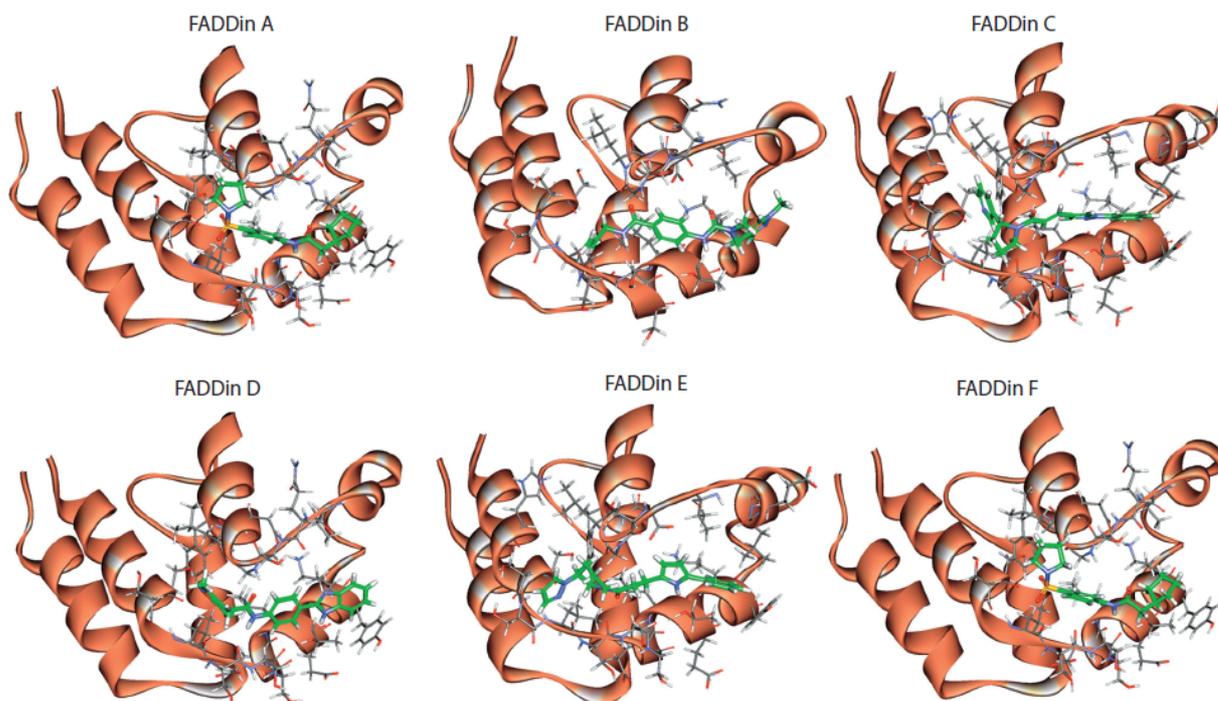
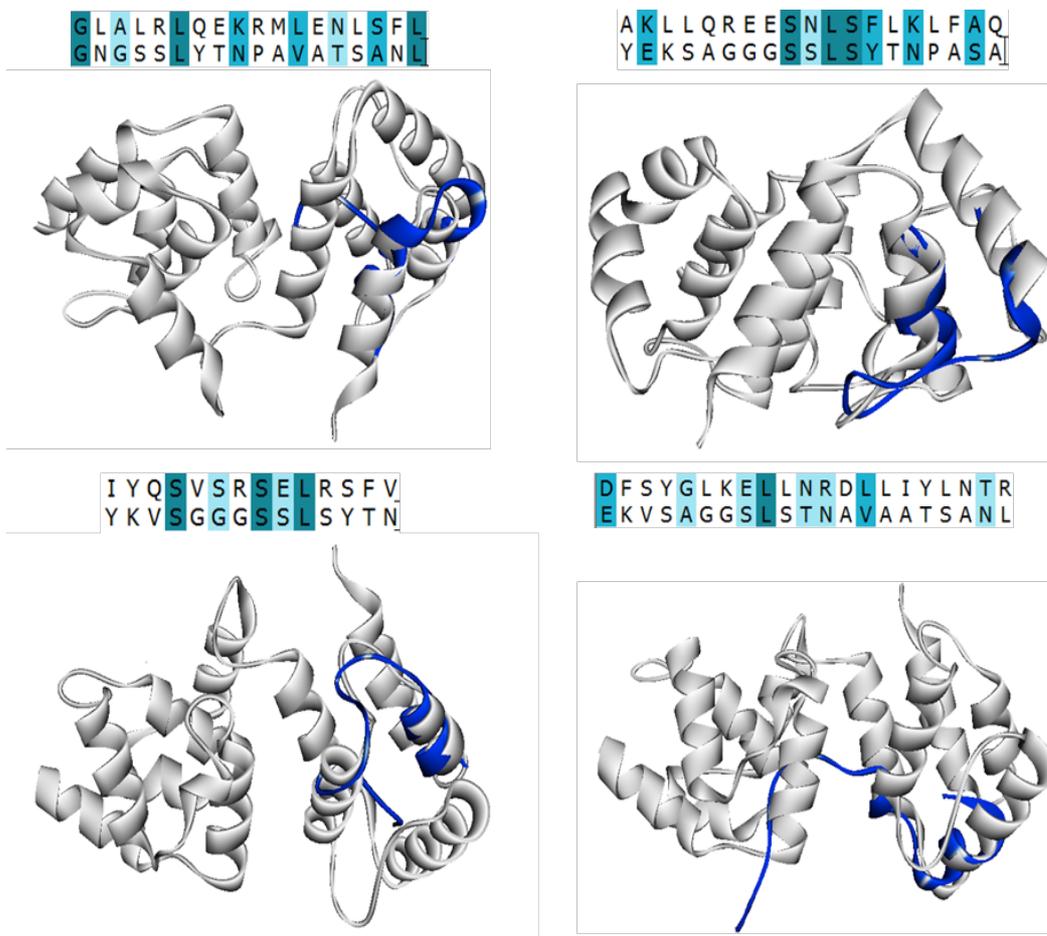


Рис. 1. Положение связывания лучших лигандов, отобранных для трех различных конформаций ЯМР белка FADD

#### **Анализ конформаций пептидов из MUC1.**

Согласно полученным результатам большая часть последовательности пептидов принимала неупорядоченную третичную структуру, однако N-конец пептида MUC1-CD (1–20) имел тенденцию образовывать альфа-спирали. На основе анализа рассчитанных траекторий молекулярной динамики (МД) было показано, что пептид MUC1-CD (46–72) обладает конформацией, сходной с таковой ряда участков домена DED2 белка каспазы-8, имеющих сходство аминокислотных остатков с рассматриваемым пептидом. Всего было найдено не менее четырех участков белка каспазы 8, пространственную структуру которых может принимать пептид MUC1-CD (46–72). Полученные результаты подтверждают, что молекулярный механизм ингибирующей активности данного пептида состоит во взаимодействии с белком FADD в тех участках, которые связываются с доменом DED каспазы-8 и, таким образом, пептид может конкурировать с каспазой-8 за связывание с белком FADD.



**Рис. 2.** Найденные конформации пептида MUC1-2, способные имитировать конформацию участков DED2 домена каспазы-8. Тёмным цветом показан пептид MUC1-2. На рисунке указано выравнивание последовательностей для последующего пространственного наложения, полученное программой MultiProt.

#### **Эффект от использования кластера в достижении целей работы.**

Для проведения виртуального скрининга больших баз данных химических соединений требуется порядка недели расчета с использованием от 50 до 100 ядер. Кластер ИВЦ НГУ позволил провести такие расчеты. Молекулярная динамика в неявной воде может быть эффективно распараллеливана с использованием графических карт (CUDA) кластера НГУ. Скорость расчета достигала до 100 нс траектории молекулярной динамики в день.

#### **Перечень публикаций, содержащих результаты работы.**

Иванисенко, Н. В., Хиллерт, Л., Иванисенко, В. А., & Лаврик, И. Н. (2015). design and experimental validation of the action of small molecule-based inhibitors of the fadd protein. Вавиловский журнал генетики и селекции. 19(6):724-730 (импакт фактора нет)

Н.В. Иванисенко, И.Н. Лаврик, В.А. Иванисенко (2015) Компьютерное моделирование пространственных структур пептидов из MUC1, способных ингибировать апоптоз, Вавиловский журнал генетики и селекции. 19(6):731-737 (импакт фактора нет)

#### **Ваши впечатления от работы вычислительной системы и деятельности ИВЦ НГУ, а также Ваши предложения по их совершенствованию.**

Впечатления положительные, пока есть всё необходимое.

