

Компьютерное моделирование пространственных структур пептидов из MUC1, способных ингибировать апоптоз

Н.В. Иванисенко^{1,2}, И.Н. Лаврик^{1,3}, В.А. Иванисенко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия ² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия ³ Факультет прикладных исследований воспалительных процессов, Институт экспериментальной внутренней медицины, Университет Отто фон Гюрике, Магдебург, Германия

Поиск эффективных ингибиторов апоптоза является актуальной задачей при создании лекарственных препаратов, в том числе направленных на лечение нейродегенеративных заболеваний. Инициация апоптоза осуществляется через образование макромолекулярных комплексов, в которых происходит активация каспаз – основных ферментов, ответственных за гибель клетки. Одним из таких макромолекулярных комплексов является комплекс DiSc (Death-inducing Signaling complex – комплекс, индуцирующий смерть), который играет ключевую роль при индукции так называемого внешнего пути апоптоза, в формировании которого центральное место занимает белок-адаптер FADD (Fas-Associated Death Domain – Fas-ассоциированный домен смерти). Поэтому ингибиторы белка FADD, препятствующие выполнению его функций в составе комплекса DiSc, могут быть потенциальными лекарствами, подавляющими запуск апоптоза, а изучение молекулярного механизма их действия представляет высокий интерес для понимания функционирования путей передачи сигнала апоптоза. Известно, что одним из природных белков-ингибиторов FADD является протеогликан MUC1 из группы муцинов. В частности, было установлено, что два пептида из первичной структуры цитоплазматического домена MUC1 (MUC1-cD, MUC1-cytoplasmic domain) также способны ингибировать связывание каспазы-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 целью настоящей работы были компьютерное моделирование пространственных структур пептидов MUC1-cD, соответствующих фрагментам этого белка (1–20 и 46–72), а также анализ их конформационных свойств. Основное внимание в работе было уделено пептиду MUC1-CD (46–72), который способен связываться с FADD. С использованием метода молекулярной динамики в неявной воде было показано, что пептид MUC1-CD (46–72) обладает конформацией, сходной с таковой у ряда участков домена DED (Death Effector Domain – эффекторный домен смерти) белка каспазы-8. Было обнаружено как минимум 4 участка белка каспазы-8, пространственную структуру которых может принимать пептид MUC1-CD (46–72). Полученные результаты показывают, что молекулярный механизм ингибирующей активности данного пептида может заключаться в конкурентном связывании с FADD за счет структурного и конформационного сходства с белок-связывающими участками домена DED каспазы-8.

Ключевые слова: апоптоз; программируемая клеточная гибель; FADD; MUC1; каспаза-8; молекулярная динамика; неявная вода; обобщенная модель Борна; предсказание структуры белка.

Computer simulation of the spatial structure of MUC1 peptides capable of inhibiting apoptosis

N.V. Ivanisenko^{1,2}, I.N. Lavrik^{1,3}, V.A. Ivanisenko¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
³ Department of Translational Inflammation, Institute of Experimental Internal Medicine, Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany

Identification of new effective inhibitors of apoptosis is an important task for drug development for treatment of a number of diseases including neurodegenerative diseases. Initiation of apoptosis occurs via the formation of macromolecular protein complexes. In these complexes, activation of key enzymes in apoptosis, caspases, takes place. One of those macromolecular complexes is DiSc (death-inducing signaling complex) playing a central role in the induction of the extrinsic apoptosis pathway. The adaptor protein FADD has a major role in the formation of the DiSc. Therefore, inhibitors of FADD, preventing its function in the DiSc, can act as potential drugs inhibiting apoptosis. Furthermore, the study of the mechanisms of action of these inhibitors is of great interest for understanding the mechanisms of the signal transduction pathways of apoptosis. It has been reported that a natural protein inhibitor of FADD is mucin-type 1 glycoprotein (MUC1). In particular, two fragments of the primary structure of the cytoplasmic domain of MUC1 (MUC1-cD) are capable of inhibiting the binding of caspase-8 to FADD. However, the three-dimensional structure of MUC1 has not been obtained yet. It complicates significantly the rational design of potential drugs on the basis of these peptides. In this context, the aim of the present study was *in silico* prediction of three-dimensional structures of MUC1-cD peptides corresponding to protein fragments (1-20 and 46-72), as well as analysis of their conformational properties. The main focus of the work was given to the peptide MUC1-CD (46-72), which is capable of binding to FADD. Using the methods of molecular dynamics in the implicit water it was shown that the peptide MUC1-cD (46-72) can take conformations similar to the conformations of a number of fragments of the caspase-8 DED domain. It was found that the structure of the peptide MUC1-cD (46-72) is similar to the spatial structure of at least four fragments of caspase-8. These results indicate that the molecular mechanism of the inhibitory activity of the peptide can be explained by competitive binding with FADD due to the structural and conformational similarity with the fragments of the caspase-8 DED domain.

Key words: apoptosis; programmed cell death; FADD; MUC1; caspase-8; molecular dynamics; implicit salvation; Generalized Born model; protein structure prediction.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

ivanisenko n.V., I avrik i.n., ivanisenko V.A. computer simulation of the spatial structure of MUC1 peptides capable of inhibiting apoptosis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(6):731-737. Doi 10.18699/VJ15.101

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Иванисенко Н.В., лаврик И.Н., Иванисенко В.А. Компьютерное моделирование пространственных структур пептидов из MUC1, способных ингибировать апоптоз. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(6):731-737. Doi 10.18699/VJ15.101

Апoptоз – регулируемый процесс программируемой клеточной гибели – вызывается внешними либо внутренними сигналами, которые активируют каскад цистеиновых протеаз, называемых каспазами. Пути передачи внешних сигналов апоптоза осуществляются с участием так называемых рецепторов клеточной смерти, включая рецептор фактора некроза опухоли 1-го типа (TNF-R1), а также рецепторы FAS (CD95), TRAIL-R1 и TRAIL-R2. Взаимодействие CD95 с лигандом CD95L, а также между TRAIL-R1/2 и TRAIL приводит к образованию комплекса DISC (Death-Inducing Signaling Complex – комплекс, индуцирующий смерть), в формировании которого важнейшую роль играет белок FADD (Fas-Associated Death Domain, Fas-ассоциированный домен смерти). В свою очередь, связывание каспазы-8 с FADD, которое осуществляется с помощью домена DED (Death Effector Domains – эффекторный домен смерти), сопровождается разрезанием междимерной субъединицы с образованием активной формы каспазы-8 (фрагмент p18/p10) и запуском сигнала апоптоза. Таким образом, белок FADD является ключевым звеном в пути передачи сигнала, обеспечивающим активацию каспазы-8. Ингибиторы белка FADD, препятствующие выполнению его функций в составе комплекса DISC, представляют огромный интерес для исследования молекулярных механизмов передачи сигнала апоптоза. Известно, что одним из природных белков-ингибиторов FADD является белок mucin-type гликопротеин (MUC1). Человеческий белок MUC1 экспрессируется в апикальной плазматической мембране нормальных секреторных эпителиальных клеток (Kufe et al., 1984). В работе Agata с коллегами (2008) было показано, что MUC1 сверхэкспрессируется в клетках карциномы и представлен на всей поверхности этих клеток. Незрелая форма белка MUC1 подвергается посттрансляционному автопротеолизу, в результате которого образуются две субъединицы, MUC1-N и MUC1-C (Ligtenberg et al., 1992; Levitin et al., 2005; Masao et al., 2006). MUC1-C состоит из межклеточного домена длиной 58 а. о., а также трансмембранного (28 а. о.) и цитоплазматического (MUC1-CD, 75 а. о.) доменов. Цитоплазматический домен MUC1-CD является субстратом киназ c-Src (Li et al., 2001), GSK 3b (Huang et al., 2005), Cd (Ren et al., 2002) и c-Abl (Raina et al., 2006). MUC1-CD так же напрямую взаимодействует

с ключевыми для клеточной пролиферации белками, включая Wnt/ β -катенин (Huang et al., 2005), p53 (Wei et al., 2005), I κ B киназы (IKK- β и IKK- γ) и т. д. (Wei et al., 2005). В работе (Agata et al., 2008) было показано, что MUC1-C может напрямую связываться с каспазой-8 и доменом DED белка FADD. Эти взаимодействия MUC1-CD способны блокировать связывание FADD с каспазой-8 и тем самым препятствовать активации апоптоза. Более того, авторы определили два пептида в последовательности MUC1-CD, которые ингибировали связывание каспазы-8 с FADD. Один из этих пептидов, MUC1-CD (1–20), способен образовывать комплекс с доменом p18 каспазы-8, в то время как другой пептид, MUC1-CD (46–72), способен напрямую связываться с доменом DED белка FADD.

Последовательности этих пептидов могут быть использованы для разработки низкомолекулярных соединений ингибиторов FADD, обладающих антиапоптотическими свойствами. Однако на сегодняшний день пространственная структура MUC1-CD остается неизвестной, что существенно усложняет рациональный дизайн препаратов на основе данных пептидов. В связи с этим целью настоящей работы были компьютерное моделирование пространственных структур пептидов MUC1-CD (1–20 и 46–72) и анализ их конформационных свойств. Основное внимание было направлено на исследование конформационных свойств пептида MUC1-CD (46–72), который способен связываться с белком FADD *in vitro*.

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 DED2 каспазы-8 и, таким обра-

зом, пептид может конкурировать с каспазой-8 за связывание с белком FADD.

Материалы и методы

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 `srptraj` (AmberTools 14), затем структуры минимизировали и уравнивали в три шага: 1000 циклов минимизации, нагрев от 0 до 300 К 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 К в течение 1 мкс с шагом по времени 2 фс.

анализ траектории молекулярной динамики

Кластеризацию конформаций пептида проводили с использованием алгоритма ближайшего соседа, реализованного в инструменте MaxCluster (Herbert, Sternberg, 2014). Всего кластеризацию проводили по 3 тыс. конформаций пептида с использованием координат $C\alpha$ атомов пептидов.

Структурное выравнивание пептидов проводили с помощью инструмента MultiProt (Shatsky et al., 2004), качество выравнивания характеризовалось по значениям среднеквадратичного отклонения RMSD (Root Mean Square Deviation, среднеквадратичное отклонение) и оценочной функции, учитывающей качество выравнивания первичной структуры. Расчет RMSD проводили с использованием модуля `srptraj` (AmberTools 14), расчет вторичной структуры – методом DSSP (Defined

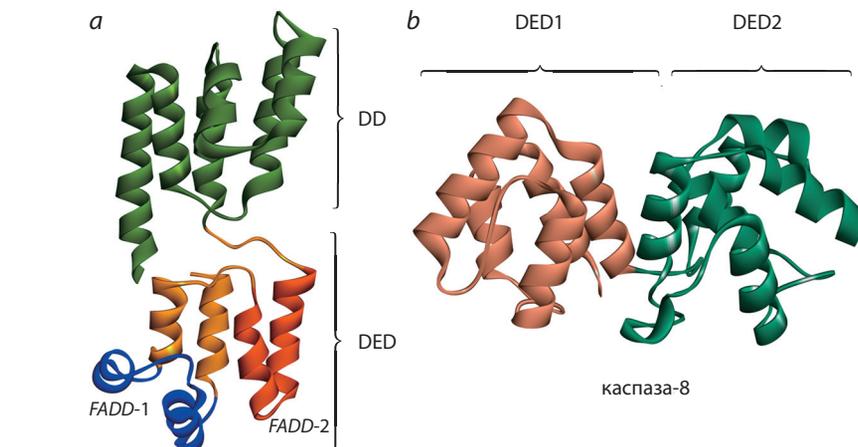


Fig. 1. Structures of FADD (pdb: 2GF5) and caspase 8 (pdb: 4ZBw) proteins.

(a) FADD consists of two domains: Death Domain (DD) and Death Effector Domain (DED), (b) caspase 8 domains: DED1 and DED2.

Secondary Structure of Proteins) (Kabsch et al., 1983), реализованным в модуле `srptraj` (AmberTools 14).

результаты и обсуждение

Валидация метода на примере пептидов, полученных из Fa DD

В последнее время для *in silico* предсказания третичной структуры белков и пептидов широкое распространение получили методы, использующие длинные траектории МД в неявной воде (в приближении обобщенной модели Борна). Однако, несмотря на то что метод моделирования фолдинга белков с использованием МД в неявной воде показал хорошие результаты для целого ряда белков (Nguyen et al., 2013), возможность этого подхода предсказывать конформации коротких пептидов остается не до конца изученной. Для того чтобы проверить применимость данного метода к семейству белков, содержащих домены DED, мы использовали этот подход для двух пептидов, входящих в состав домена DED белка FADD (Carrington et al., 2006). Моделирование проводилось на длительном интервале времени, равном 1 мкс. Принимая во внимание низкую вязкость растворителя при использовании моделей неявной воды (Zagrovic et al., 2003), мы предположили, что для идентификации наиболее стабильных конформаций пептида такой длины траектории будет достаточно. Идентификация всего конформационного ансамбля пептидов не являлась целью текущего исследования.

Последовательности этих пептидов, получивших название FADD-1 и FADD-2, соответствовали участкам 1–25 и 60–85 белка FADD (рис. 1). Данные участки FADD принимают вторичную структуру альфа-спираль – петля – альфа-спираль. В качестве начальной структуры этих пептидов бралась развернутая цепь. Наблюдаемые в ходе МД вторичные структуры этих пептидов после проведенного уравнивания (100 нс) показаны на рис. 2. В ходе моделирования оба пептида принимали конформации с вторичной структурой альфа-спираль – петля – альфа-спираль, аналогичной той, которая наблюдается в составе белка. При этом для пептида FADD-2 данная вторичная структура являлась основной в траектории молекулярной динамики. С-конец пептида FADD-1 в ходе моделирования оказался наименее упорядоченным. Одной из причин может являться то, что конформация этого пептида в составе белка в значительной степени стабилизирована за счет взаимодействий между пептидом и остальной частью белка, а взаимодействия между аминокислотными остатками внутри пептида вносят меньший вклад в его стабилизацию. Стоит отметить, что в силу возможных недостатков моделирования молекулярной

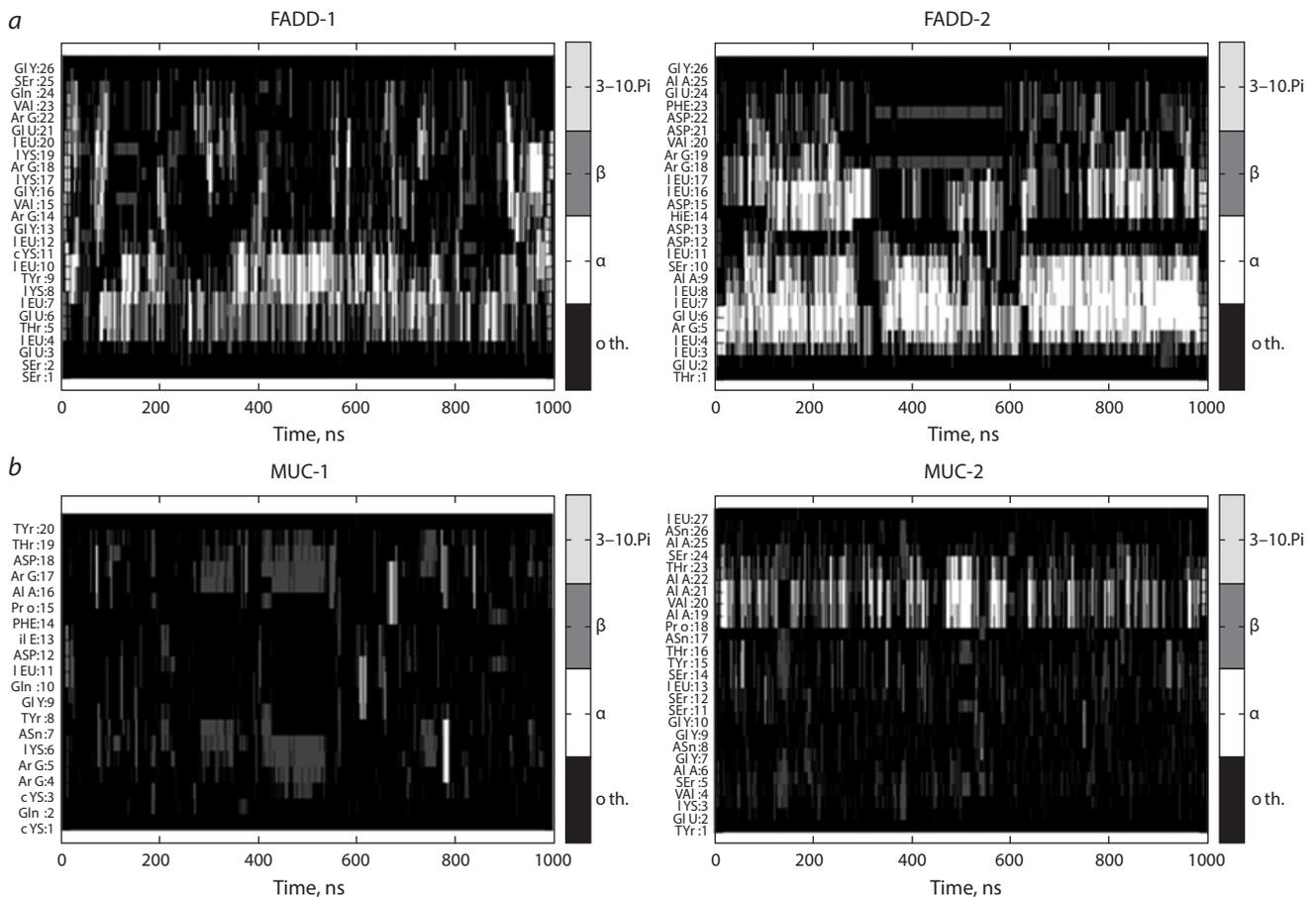


Fig. 2. Time variation of the secondary structures of peptides during molecular dynamics simulation.

(a) changes in the secondary structures of the FADD-1 and FADD-2 peptides. (b) changes in the secondary structures of the MUC-1 and MUC1-2. white bars: alpha helix; light-gray: 3–10, Pi; dark-gray: beta sheet; black: disorder or turn.

динамики в невяной воде данное утверждение требует дополнительной валидации, например, с использованием метода ЯМР (ядерный магнитный резонанс).

Для сравнения пространственных структур изолированных пептидов и соответствующих им участков полно-размерного белка был проведен расчет RMSD отклонения этих структур по координатам $C\alpha$ атомов (рис. 3). При расчете RMSD не учитывали три начальных аминокислотных остатка на N- и C-концах пептидов, предполагая, что они являются неупорядоченными в растворе. Было обнаружено, что пептид FADD-1 находился в заданной конформации с $RMSD < 2 \text{ \AA}$ примерно в 0,1 % точек траектории МД. При этом примерно для 2 % точек структура этого изолированного пептида имела отличие от его структуры в составе белка с $RMSD < 3 \text{ \AA}$. Для пептида FADD-2 наблюдались конформации, при которых $RMSD < 2 \text{ \AA}$ в более чем 5 % точек МД и в более чем 30 % точек $RMSD$ оставались меньше 3 \AA . Таким образом, из проведенного анализа следует, что наиболее часто наблюдаемая в траектории МД третичная структура пептида FADD-2 имеет конформацию ($RMSD < 3 \text{ \AA}$), схожую с таковой данного пептида в составе полноразмерного белка. Это позволяет предположить, что пептид FADD-2 может являться структурным миметиком данного участка белка FADD.

Заметим, что, хотя конформация пептида FADD-1 в составе белка не являлась доминирующей в процессе МД, метод молекулярной динамики в невяной воде позволил ее идентифицировать на относительно протяженных районах траектории МД. Принимая во внимание тот факт, что моделирование структуры изолированных пептидов проводилось *de novo* из развернутой цепи, можно заключить, что предлагаемый подход может быть эффективно использован для решения задач предсказания конформаций пептидов. В частности, мы предполагаем, что он может быть применен для анализа структур пептидов, полученных из последовательности MUC1-CD.

анализ конформаций пептидов Mu C1-1 и Mu C1-2

Согласно работе (Agata et al., 2008), пептид MUC1-CD из района последовательности 1–20 (MUC1-1, CQCR KNYGQLDIFPARDTY) связывается с участком p18 белка каспазы-8, в то время как пептид из участка 46–72 (MUC1-2, YEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL) способен связываться с доменом DED белка FADD. Одна из гипотез связывания MUC1-2 с доменом DED белка FADD может заключаться в том, что пептид способен принимать конформацию участка связывания белка каспазы-8 и, таким образом, ингибировать взаимодействие

между доменами DED белков FADD и каспазы-8.

Отметим, что MUC1-CD представляет домен белка MUC1, имеющий неупорядоченную третичную структуру (Raina et al., 2015). Можно ожидать, что пептиды MUC1-1 и MUC1-2 также не имеют единой третичной структуры и могут принимать множество конформаций. В связи с этим для изучения конформационных особенностей таких пептидов наиболее адекватными могут оказаться методы *de novo* предсказания структур белков из развернутой цепи, включая моделирование молекулярной динамики в неявной воде (Nguyen et al., 2013).

Как видно из рис. 2, в ходе МД пептид MUC1-1 большую часть времени находился в неупорядоченном состоянии либо в состоянии с наличием бета-складок. В то же время С-конец пептида MUC1-2 часто оставался в состоянии альфа-спирали. Таким образом, основываясь на данных моделирования МД в неявной воде, можно предположить, что для связывания с участком p18 белка каспазы-8 не требуется образования альфа-спиральных конформаций пептидов.

Проведенный кластерный анализ конформаций пептида MUC1-2 позволил выявить ряд конформаций, наблюдаемых в ходе молекулярной динамики. На рис. 4 показаны центры наиболее крупных, различных по структуре кластеров конформеров. Отметим, что кластеры с фиксированной упаковкой пептида наблюдались лишь в коротком промежутке времени моделирования. Среди них можно выделить три конформации со следующими типами вторичной структуры: антипараллельные бета-складки, альфа-спираль – петля – альфа-спираль – петля, а также альфа-спираль – бета-складка (рис. 4). Наиболее часто наблюдаемая в ходе молекулярной динамики конформация пептида представляет собой стабильную структуру альфа-спирали на С-конце и неупорядоченный участок на N-конце. Принимая это во внимание, мы рассматривали пространственные структуры пептида с данным типом упаковки как основного кандидата на связывание с белком FADD.

Следующим шагом нашего анализа было структурное выравнивание всех

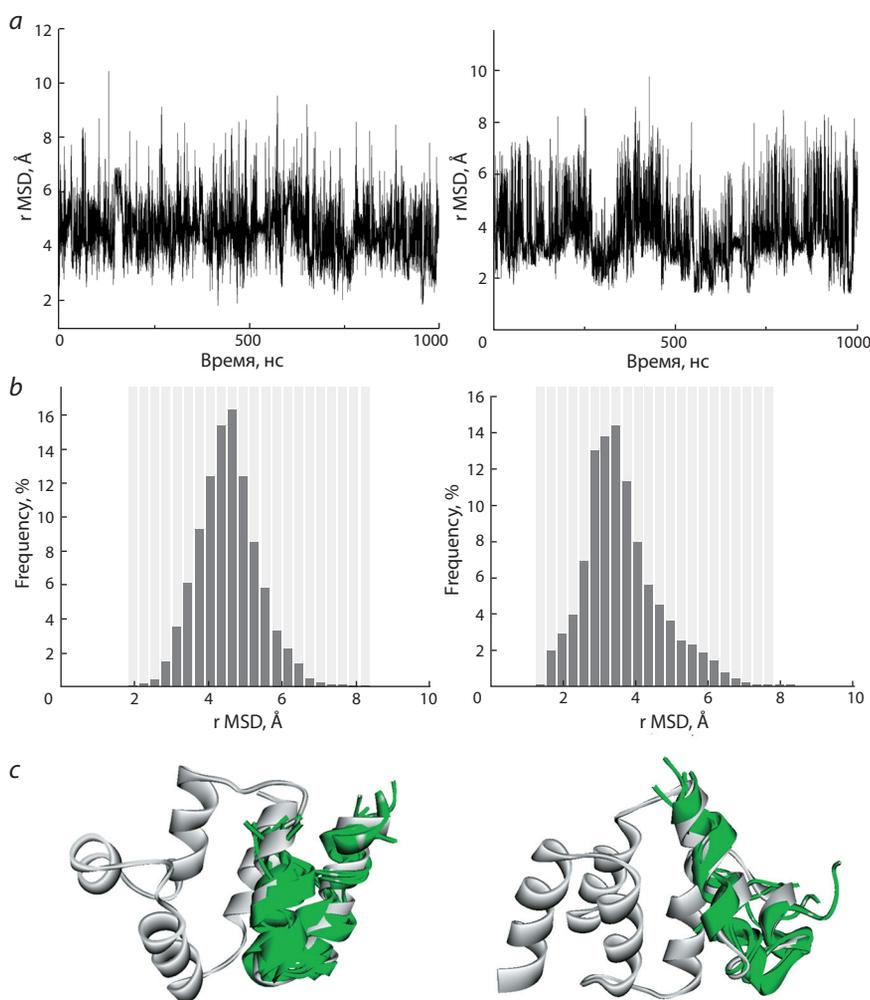


Fig. 3. identification of FADD-1 and FADD-2 conformations corresponding to those observed in the full-length FADD protein: (a), root-mean square deviation of α atoms of a peptide from the conformation in full-length FADD; (b), the frequency of occurrence of conformations with a given $rMSD$ throughout 1- μ s molecular dynamics trajectory; (c), superimposition of peptide conformations with $rMSD < 2 \text{ \AA}$ on the DED domain of FADD. The first and last three amino acid residues of peptide were omitted from the calculation of $rMSD$, as they were assumed to be disordered.

конформаций пептида MUC1-2 с доменом DED2 каспазы-8 (pdb: 4ZBW) (Shen et al., 2015) для выяснения того, какие из них обладают большей способностью имитировать конформацию белка каспазы-8. Поскольку неупорядоченный домен пептида MUC1-2 мог принимать большой набор конформаций, то при сравнении, помимо рассмотрения отклонений между структурами пептида и участками белка по координатам α атомов, также учитывали и сходство аминокислотных последовательностей. В результате структурного выравнивания были отобраны конформации пептида, удовлетворяющие следующим условиям: пространственные структуры пептида и какого-либо участка белка имеют отличия $RMSD < 2 \text{ \AA}$, а в выравнивании их последовательностей имеются не менее трех идентичных остатков. Таким образом, было отобрано около 1% всех конформаций. Неожиданным для нас оказалось, что практически все конформации пептида, удовлетворяющие заданным условиям, принадлежат кластеру 1, содержащему наиболее стабильные из них. Примеры суперпозиции пространственных структур пептидов MUC1-2 из кластера 1 и домена DED2 каспазы-8 показаны на рис. 5. Следует заметить, что большинство пептидов имели структурное сходство с участками домена DED2 каспазы-8, что согла-

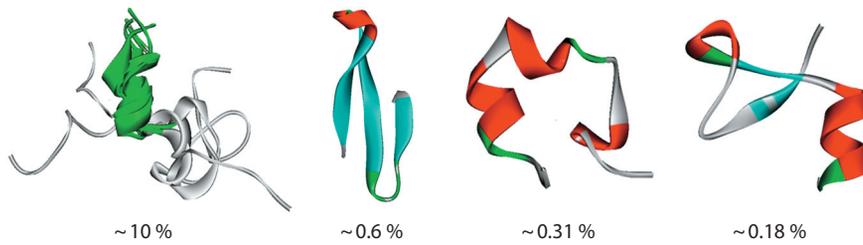


Fig. 4. c clustering of the MUC1-2 peptide conformations obtained in the course of MD. c conformations representing centers of the four largest clusters and their occurrence frequencies are shown.

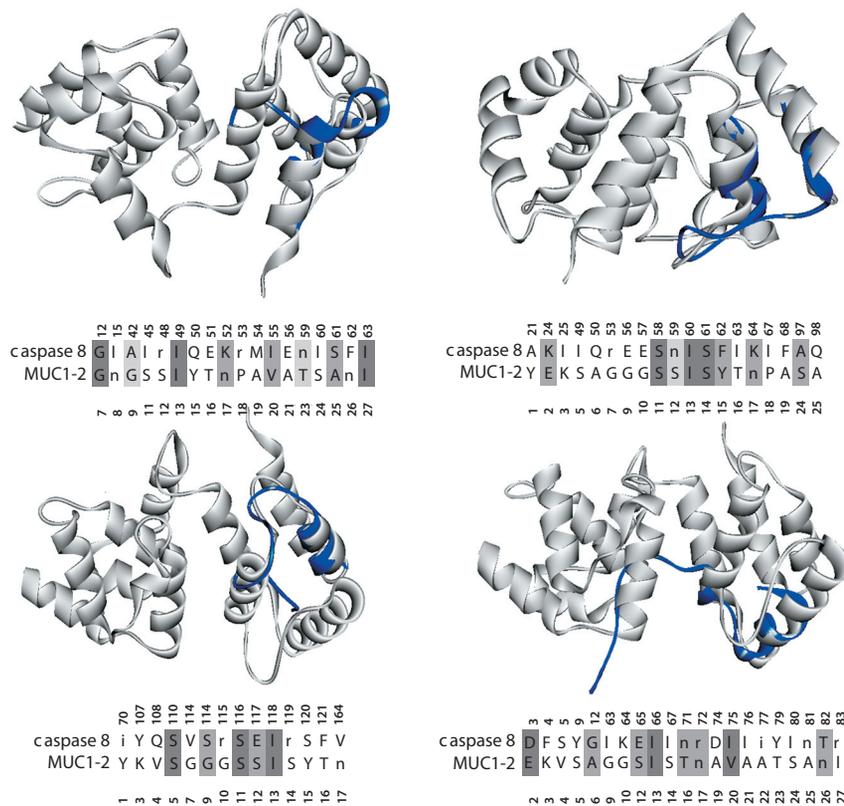


Fig. 5. identified conformations of the MUC1-2 peptide able to mimic conformations of portions of the DED2 domain of caspase 8. MUC1-2 is shown in blue. The alignments of sequences used in spatial superimposition by MultiProt program and positions corresponding to the alignments are shown.

соединяется с работами (Yang et al., 2005; Dickens et al., 2012; Schleich et al., 2012), в которых каспаза-8 связывается с FADD через домен DED2.

Предсказание третичной структуры белков и пептидов является чрезвычайно важной и актуальной задачей, решение которой необходимо при изучении молекулярных взаимодействий в клетке и тканях, а также критическим шагом при рациональном конструировании лекарственных препаратов. В последнее время методы МД заняли прочные позиции среди других методов, используемых для решения данных задач. В частности, широкое развитие получили методы *in silico* предсказания третичной структуры белков и пептидов с использованием методов МД в неявной воде (в приближении обобщенной модели Борна). Эти методы позволяют проводить моделирование МД в мик-

росекундном диапазоне и решать задачу фолдинга белков небольших размеров. В работе с помощью данного метода были проведены моделирование и анализ конформаций пептидов, соответствующих фрагментам последовательности MUC1, которые, согласно экспериментальным данным, способны ингибировать взаимодействие FADD с каспазой-8 (Agata et al., 2008).

На первом этапе анализа была проведена оценка применимости данного подхода для предсказания функционально важных конформаций пептидов, участвующих во взаимодействии с DED, на примере белка FADD. Было показано, что моделирование структуры пептидов с использованием метода МД в неявной воде, последовательности которых были взяты из различных фрагментов последовательности белка FADD, позволило выявить стабильные конформации этих пептидов, имеющих сходство с конформациями соответствующих участков полноразмерного белка. В частности, для пептида FADD-2 данная конформация превалировала в ходе моделирования МД.

Анализ траектории МД пептида MUC1-1, который, согласно экспериментальным данным, связывается с субъединицей p18 каспазы-8, показал, что N- и C-концы пептида имеют предрасположенность образовывать бета-складки с неупорядоченным линкером между ними. Для пептида MUC1-2, способного, согласно данным тех же авторов, связываться с доменом DED белка FADD, характерно образование альфа-спирали на C-конце с неупорядоченным N-концом. С применением подхода структурного выравнивания всех конформаций пептида MUC1-2 на структуру доменов DED2 каспазы-8 было сделано предсказание конформаций, потенциально участвующих во взаимодействии с доменом DED белка FADD. Таким образом, полученные результаты являются отправной точкой для планирования сайт-специфических экспериментов по мутагенезу и выявлению структуры функционально важных конформаций пептидов, что позволит в будущем провести рациональный дизайн более эффективных пептидов и низкомолекулярных пептидов-ми-

метиков. Для такой экспериментальной работы особый интерес могут представлять позиции MUC1-2, содержащие сходные аминокислотные остатки каспазы-8, такие как S5, G7, L13, L27, S11, L13, S14 (рис. 5).

Acknowledgments

The modeling of the spatial structure and analysis of apoptosis-inhibiting peptides were supported by the Russian Science Foundation, project 14-44-00011 "Programmed cell death induced via death receptors: identification of molecular mechanisms initiating apoptosis by molecular simulation". Implicit validation of the molecular dynamics method was supported by project VI.61.1.2. Supercomputation was done at the Bioinformatics Shared Access Center.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agata N., Ahmad R., Kawano T., Raina D., Kharbanda S., Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks death receptor-mediated apoptosis by inhibiting recruitment of caspase-8. *Cancer Res.* 2008;68(15):6136-6144. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-0464
- Carrington P.E., Sandu C., Wei Y., Hill J.M., Morisawa G., Huang T., Gavathiotis E., Wei Y., Werner M.H. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol. Cell.* 2006;22(5):599-610. DOI 10.1016/j.molcel.2006.04.018
- Case D.A., Berryman J.T., Betz R.M., Cerutti D.S., Cheatham T.E., Darden T.A., Duke R.E., Giese T.J., Gohlke H., Goetz A.W., Hommeyer N., Izadi S., Janowski P., Kaus J., Kovalenko A., Lee T.S., LeGrand S., Li P., Luchko T., Luo R., Madej B., Merz K.M., Monard G., Needham P., Nguyen H., Nguyen H.T., Omelyan I., Onufriev A., Roe D.R., Roitberg A., Salomon-Ferrer R., Simmerling C.L., Smith W., Swails J., Walker R.C., Wang J., Wolf R.M., Wu X., York D.M., Kollman P.A. AMBER 2015. University of California, San Francisco, 2015.
- Dickens L.S., Boyd R.S., Jukes-Jones R., Hughes M.A., Robinson G.L., Fairall L., Schwabe J.W.R., Cain K., MacFarlane M. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol. Cell.* 2012;47(2):291-305. DOI 10.1016/j.molcel.2012.05.004
- Herbert A., Sternberg M. J. E. MaxCluster – A tool for Protein Structure Comparison and Clustering. 2014. URL: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~maxcluster/>
- Huang L., Chen D., Liu D., Yin L., Kharbanda S., Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3 β -mediated phosphorylation and degradation of β -catenin. *Cancer Res.* 2005;65(22):10413-10422. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-05-2474
- Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Bio-polymers.* 1983;22(12):2577-2637.
- Kufe D., Inghirami G., Abe M., Hayes D., Justi-Wheeker H., Schlom J. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma.* 1984;3:223-32. DOI 10.1089/hyb.1984.3.223.
- Levitin F., Stern O., Weiss M., Gil-Henn C., Ziv R., Prokocimer Z., Smorodinsky N.I., Rubinstein D.B., Wreschner D.H. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J. Biol. Chem.* 2005;280(39):33374-33386. DOI 10.1074/jbc.M506047200
- Li Y., Kuwahara H., Ren J., Wen G., Kufe D. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 β and β -catenin. *J. Biol. Chem.* 2001;276(9):6061-6064. DOI 10.1074/jbc.C000754200
- Ligtenberg M.J., Kruijshaar L., Buijs F., Van Meijer M., Litvinov S.V., Hilkens J. Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J. Biol. Chem.* 1992;267(9):6171-6177.
- Macao B., Johansson D.G., Hansson G.C., Härd T. Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006;13(1):71-76. DOI 10.1038/nsmb1035
- Nguyen H., Roe D.R., Simmerling C. Improved generalized born solvent model parameters for protein simulations. *J. Chem. Theory Comput.* 2013;9(4):2020-2034. DOI 10.1021/ct3010485
- Raina D., Agarwal P., Lee J., Bharti A., McKnight C.J., Sharma P., Kharbanda S., Kufe D. Characterization of the MUC1-C cytoplasmic domain as a cancer target. *PLOS One.* 2015;10(8):e0135156. DOI 10.1371/journal.pone.0135156
- Raina D., Ahmad R., Kumar S., Ren J., Yoshida K., Kharbanda S., Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *EMBO J.* 2006;25(16):3774-3783. DOI 10.1038/sj.emboj.7601263
- Ren J., Li Y., Kufe D. Protein kinase C δ regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in β -catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 2002;277(20):17616-17622. DOI 10.1074/jbc.M200436200
- Schleich K., Warnken U., Fricker N., Öztürk S., Richter P., Kammerer K., Schnölzer M., Karmmer P.H., Lavrik I.N. Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model. *Mol. Cell.* 2012;47(2):306-319. DOI 10.1016/j.molcel.2012.05.006
- Shatsky M., Nussinov R., Wolfson H.J. A method for simultaneous alignment of multiple protein structures. *Proteins- Structure, Function, and Bioinformatics.* 2004;56(1):143-156. DOI 10.1002/prot.10628
- Shen C., Yue H., Pei J., Guo X., Wang T., Quan J.M. Crystal structure of the death effector domains of caspase-8. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 2015;463(3):297-302. DOI 10.1016/j.bbrc.2015.05.054
- Wei X., Xu H., Kufe D. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell.* 2005;7(2):167-178. DOI 10.1016/j.ccr.2005.01.008
- Yang J.K., Wang L., Zheng L., Wan F., Ahmed M., Lenardo M.J., Wu H. Crystal structure of MC159 reveals molecular mechanism of DISC assembly and FLIP inhibition. *Mol. Cell.* 2005;20(6):939-949. DOI 10.1016/j.ccr.2005.01.008
- Zagrovic B., Pande V. Solvent viscosity dependence of the folding rate of a small protein: distributed computing study. *J. Comput. Chem.* 2003;24(12):1432-1436. DOI 10.1002/jcc.10297