

# Дизайн и проверка действия малых химических соединений, направленных на ингибирование белка FADD

Н.В. Иванисенко<sup>1,2</sup>, Л. Хиллерт<sup>3</sup>, В.А. Иванисенко<sup>1</sup>, И.Н. Лаврик<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Факультет прикладных исследований воспалительных процессов, Институт экспериментальной внутренней медицины, Университет Отто фон Гюрике, Магдебург, Германия

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. Был осуществлен поиск малых химических соединений *in silico*, направленно взаимодействующих с доменом DED белка FADD. Для достижения данной цели были проведены молекулярное моделирование белковых комплексов и виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов FADD, а также разработана новая методология экспериментальной проверки их биологического эффекта на клеточных линиях. Компьютерно-экспериментальный анализ позволил выявить оптимальную конформацию белка FADD для дизайна низкомолекулярных соединений, способных связываться в районе аминокислотного остатка Y25. Мы предполагаем, что дальнейшая оптимизация структур химических соединений, способных связываться с гидро-фобным карманом вблизи аминокислотного остатка Y25 FADD, позволит создать новые перспективные ингибиторы программируемой клеточной гибели.

Ключевые слова: апоптоз; CD95; FADD; молекулярное моделирование; DiSc; каспаза.

## HOW TO CITE THIS ARTICLE?

ivanisenko n.V., Hillert L., ivanisenko V.A., Lavrik I.N. Design and experimental validation of the action of small molecule-based inhibitors of the FADD protein. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(6):724-730. Doi 10.18699/VJ15.084

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Иванисенко Н.В., Хиллерт Л., Иванисенко В.А., Лаврик И.Н. Дизайн и проверка действия малых химических соединений, направленных на ингибирование белка FADD. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(6):724-730. Doi 10.18699/VJ15.084

## Design and experimental validation of the action of small molecule-based inhibitors of the FADD protein

N.V. Ivanisenko<sup>1,2</sup>, L. Hillert<sup>3</sup>, V.A. Ivanisenko<sup>1</sup>, I.N. Lavrik<sup>1,3</sup>

CD95 is one of the best studied members of the death receptor family. Activation of cD95 leads to the induction of the cell death programme, apoptosis, via formation of the death-inducing signaling complex (DiSc). FADD is a key adaptor protein for the formation of the cD95 DiSc and activation of caspase-8 in the receptor complex. FADD comprises the death domain and the death effector domain (DED). The death domain is essential for the inter-actions of FADD with CD95, while DED is necessary for the recruitment of procaspase-8, -10 and the protein c-FLIP into the DiSc. The search for the inhibitors that would block the interactions of FADD with the other core proteins of the DiSc is essential for the studies of the structure and function of this complex, investigation of the apoptosis mechanisms and development of new treatments for neurodegenerative diseases. In the course of this work, the screening for small inhibitors *in silico* that selectively interact with DED has been performed. For this purpose, the molecular modeling of the protein complexes and virtual screening of the potential inhibitors of FADD has been performed. In addition, a new technology to test the activity of these inhibitors has been developed. The computational and experimental analysis performed allowed us to characterize the optimal conformation of the FADD protein for the design of the small molecules that can bind in the region of amino acid residue Y25. We presume that further optimization of the structures of chemical compounds that can bind with the hydrophobic pocket next to the residue Y25 of FADD will allow for the creation of the new perspective inhibitors of the programmed cell death.

Key words: apoptosis; cD95; FADD; molecular modeling; DiSc; caspase.

Received 14.09.2015

Accepted for publication 12.10.2015

© АВТОРЫ, 2015

**А**пoptоз – это неотъемлемая функция всех многоклеточных организмов, которая отвечает за уничтожение всех поврежденных клеток (Krammer et al., 2007). Дефекты в системе программируемой клеточной гибели, апоптоза, были описаны для целого ряда онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Имеются два основных пути, по которым передаются апоптотические сигналы: внутренний, или митохондриальный, и внешний, передаваемый через так называемые рецепторы смерти (DR – Death Receptor) (Lavrik, Krammer, 2012). При поступлении сигнала инициации апоптоза происходит образование ряда апоптотических сигнальных комплексов, в которых осуществляется активация основных ферментов апоптоза – каспаз, что, собственно, и является сигналом к инициации апоптоза (Lavrik et al., 2005). Поэтому изучение молекулярных механизмов апоптоза и действия каспаз, включающих в себя исследование белковых комплексов, в которых происходит их активация, является актуальнейшей задачей современных биомедицинских исследований.

В настоящее время в научной литературе представлено значительное количество работ, посвященных изучению апоптоза, индуцируемого через рецепторы смерти (Krammer et al., 2007). Рецептор CD95, который также известен как Fas или APO-1, является одним из наиболее изученных представителей данного семейства. Известно, что первый этап инициации апоптоза через рецептор CD95 заключается в образовании комплекса DISC (Death-Inducing Signaling Complex – комплекс, индуцирующий смерть) (Lavrik, Krammer, 2012). CD95 DISC – это сложный макромолекулярный комплекс, иницирующий апоптоз, который состоит из рецептора CD95, белка-адаптера FADD (Fas-associated death domain – ФАС-ассоциированный домен смерти), прокаспазы-8, 10 и белка c-FLIP (cellular FLICE (FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme) Inhibitory Protein – клеточный белок, ингибирующий FLICE (FADD-подобный белок-конвертирующий интерлейкин-1) (Krammer et al., 2007). Гомотипические взаимодействия играют центральную роль в формировании комплекса CD95 DISC. Домен смерти рецептора CD95 взаимодействует с соответствующим доменом белка-адаптера FADD, а за счет взаимодействия доменов DED (Death Effector Domain – эффекторный домен смерти) происходит связывание в комплекс прокаспазы-8, прокаспазы-10 и белка c-FLIP (Lavrik et al., 2005). В результате образования комплекса происходит активация каспазы-8, что и служит основным сигналом запуска апоптоза (Schleich et al., 2012).

Однако, несмотря на значительный прогресс в понимании апоптоза, по-прежнему остается невыясненным целый ряд механизмов функционирования молекулярных комплексов, индуцирующих апоптоз. В частности, это связано с тем, что структурная информация о молекулярных взаимодействиях в составе макромолекулярных белковых комплексов, иницирующих апоптоз, в большинстве случаев отсутствует. Поэтому огромное значение для исследований структуры и функции макромолекулярных комплексов, индуцирующих апоптоз, приобретают передовые технологии молекулярного моделирования, которые позволяют создавать малые молекулы, специфически

ингибирующие белок-белковые взаимодействия. Данный подход позволяет осуществлять направленное воздействие на определенные белок-белковые взаимодействия в сигнальном пути апоптоза, индуцируемого через рецепторы смерти, и, таким образом, получать уникальную информацию об особенностях функционирования исследуемого сигнального пути. Широкие перспективы для изучения этих процессов предоставляют технологии виртуального молекулярного скрининга, предназначенные для идентификации малых химических соединений, эффективно ингибирующих функциональную активность белков. Компьютерное моделирование ингибиторов основных компонент сигнального пути апоптоза, индуцируемого через рецепторы смерти, и экспериментальное изучение эффекта их действия могут позволить получить новые фундаментальные знания о молекулярных механизмах биологического процесса клеточной смерти, включая знания о межмолекулярных взаимодействиях в составе апоптотических белковых платформ, и создадут основу для разработки принципиально новых лекарственных препаратов, направленных на лечение заболеваний, обусловленных дефектами в системе рецепторов смерти.

В данной работе описаны стратегии поиска малых химических соединений, направленно взаимодействующих с основным структурным белком комплекса CD95 DISC, белком FADD, и изучение с их помощью особенностей структурно-функциональной организации данного комплекса и молекулярных механизмов клеточной смерти. Для достижения данной цели были проведены молекулярное моделирование белковых комплексов и виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов с последующей экспериментальной проверкой их биологического эффекта на клеточных линиях. В качестве основной мишени для дизайна малых химических соединений был выбран белок FADD, который является основным структурным звеном сборки комплекса CD95 DISC и, тем самым, ключевым регулятором сигнальных путей апоптоза, индуцируемых через активацию рецепторов смерти (Lavrik, Krammer, 2012). Как было отмечено выше, именно связывание белка FADD с рецептором смерти предоставляет возможность активации прокаспазы-8 в рецепторном комплексе и, соответственно, в отсутствие активного белка FADD инициация апоптоза является невозможной. Таким образом, создание специфических соединений, селективно блокирующих взаимодействие между белком FADD и другими ключевыми компонентами комплекса DISC, является приоритетной задачей современных биомедицинских исследований, решение которой позволит создать новые терапевтические подходы для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний.

## Материалы и методы

### Процедура виртуального скрининга

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 скри-

нинг 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 проводилась предварительная замена Y25F, а также минимизация состояния белка с ограничением на среднеквадратичное отклонение атомов не более 0,3 Е.

### Процедура проверки действия ингибиторов Fa DD

Проверка действия соединений FADDin (FADD Inhibitor – ингибитор FADD) проводилась в Т-клеточной линии Jurkat при использовании лиганда CD95 (CD95L, CD95 Ligand) в концентрации 60 нг/мл. Клеточная гибель была измерена с помощью набора CellTiter-Glo (Promega, Германия) для определения жизнеспособности клеток на основе их метаболической активности путем детекции АТФ. Клетки Jurkat ( $2 \times 10^4$ ) были обработаны соединениями FADDin в концентрациях 5 мкМ, 10 мкМ и 20 мкМ за 2 ч до добавления CD95L с последующей инкубацией с CD95L в течение 6 и 22 ч. Содержание АТФ и жизнеспособность клеток определялись согласно инструкциям производителя.

Для контроля отсутствия неспецифических эффектов на клеточную гибель растворителя к клеткам линии Jurkat добавлялся растворитель диметилсульфоксид (ДМСО/ DMSO) для растворения соединений FADDin. При этом его количество соответствовало количеству DMSO при добавлении 20 мкМ соединения FADDin.

## результаты и обсуждение

### Поиск малых соединений, ингибирующих белок Fa DD *in silico*

Для проведения виртуального скрининга было решено использовать единственную опубликованную на сегодняшний день структуру полноразмерного белка FADD (pdb 2GF5), полученную с помощью метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР), с использованием которой было выявлено наличие 25 различных конформаций этого белка (Carrington et al., 2006). В данной работе было показано, что аминокислотный остаток F25 играет важную роль при олигомеризации белка FADD, а также то, что аминокислотная замена F25Y заметно уменьшает эффективность такого типа олигомеризации. Более того, в работе Carrington с коллегами было сделано предположение о наличии гидрофобной полости в районе остатка F25. Поэтому в настоящей работе виртуальный скрининг был сфокусирован на поиске низкомолекулярных соединений, способных связываться с участком белка вблизи аминокислотного остатка F25. При этом была выбрана структура, содержащая аминокислотную замену F25Y (pdb 2GF5). Анализ пространственной структуры белка

*in silico* показал расположение потенциальной полости для связывания низкомолекулярных соединений вблизи альфа-спиралей  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и петли, соединяющей спирали  $\alpha 3$  и  $\alpha 4$  (рис. 1), 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* (таблица).

Данные соединения были названы FADDin. На рис. 2 показаны конформации со связанными потенциальными низкомолекулярными ингибиторами, использованные для молекулярного докинга.

### Экспериментальная проверка действия соединений

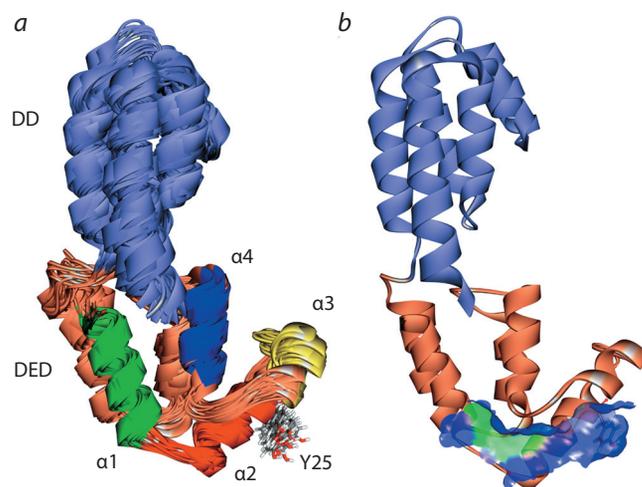
Для проверки действия соединений, полученных в результате скрининга, было решено использовать индукцию апоптоза при добавлении лиганда CD95 (CD95L) к Т-клеточной линии Jurkat. Данная форма индукции внешнего пути апоптоза широко используется в ряде исследований и сопровождается эффективным образованием комплекса CD95 DISC, активацией каспаз и индукцией апоптоза (Lavrik et al., 2012). Клеточная гибель была измерена с помощью набора CellTiter-Glo (Promega, Германия) для определения жизнеспособности клеток по их метаболической активности, основанного на детекции АТФ. При этом в случае эффективной индукции клеточной гибели происходит значительное уменьшение содержания АТФ в клетках. Соединения FADDin, согласно моделированию *in silico*, предположительно ингибируют олигомеризацию белка FADD, что должно препятствовать связыванию и последующей активации каспазы-8 в комплексе CD95 DISC и, тем самым, приводить к ингибированию апоптоза. Таким образом, в ходе экспериментальной проверки действия соединения FADDin ожидалось ингибирование клеточной гибели при индукции апоптоза через рецептор CD95 при одновременном добавлении соединений FADDin. В частности, с учетом того что ингибирование клеточной гибели не должно менять количество жизнеспособных клеток, ожидалось отсутствие снижения в них уровня содержания АТФ, поскольку для определения

жизнеспособности клеток, как упоминалось выше, использовался набор CellTiter-Glo (Promega, Германия), работа которого основана на детекции АТФ. Таким образом, индукция апоптоза измерялась по снижению содержания АТФ в клетках относительно необработанных клеток, а вывод по ингибированию апоптоза мог быть сделан только при неизменном уровне АТФ.

Были проверены несколько концентраций соединений FADDin (5, 10 и 20  $\mu\text{M}$ ), а также два временных интервала: 6 и 22 ч. Промежуток времени 6 ч был выбран для анализа различий на начальных этапах апоптоза, поскольку в данный временной интервал количество погибших клеток незначительно, что может позволить детекцию различий в скорости индукции апоптоза под действием соединений FADDin (рис. 3). Временной интервал 22 ч соответствует поздним этапам апоптоза, когда большинство клеток уже погибло и количество жизнеспособных клеток значительно уменьшилось (рис. 4), что дает возможность проанализировать влияние FADDin на окончательное число клеток, вошедших в апоптоз. В ходе экспериментов соединения FADDin добавляли за 2 ч до добавления CD95L, после чего в течение 6 и 22 ч проводили инкубацию, как упоминалось выше.

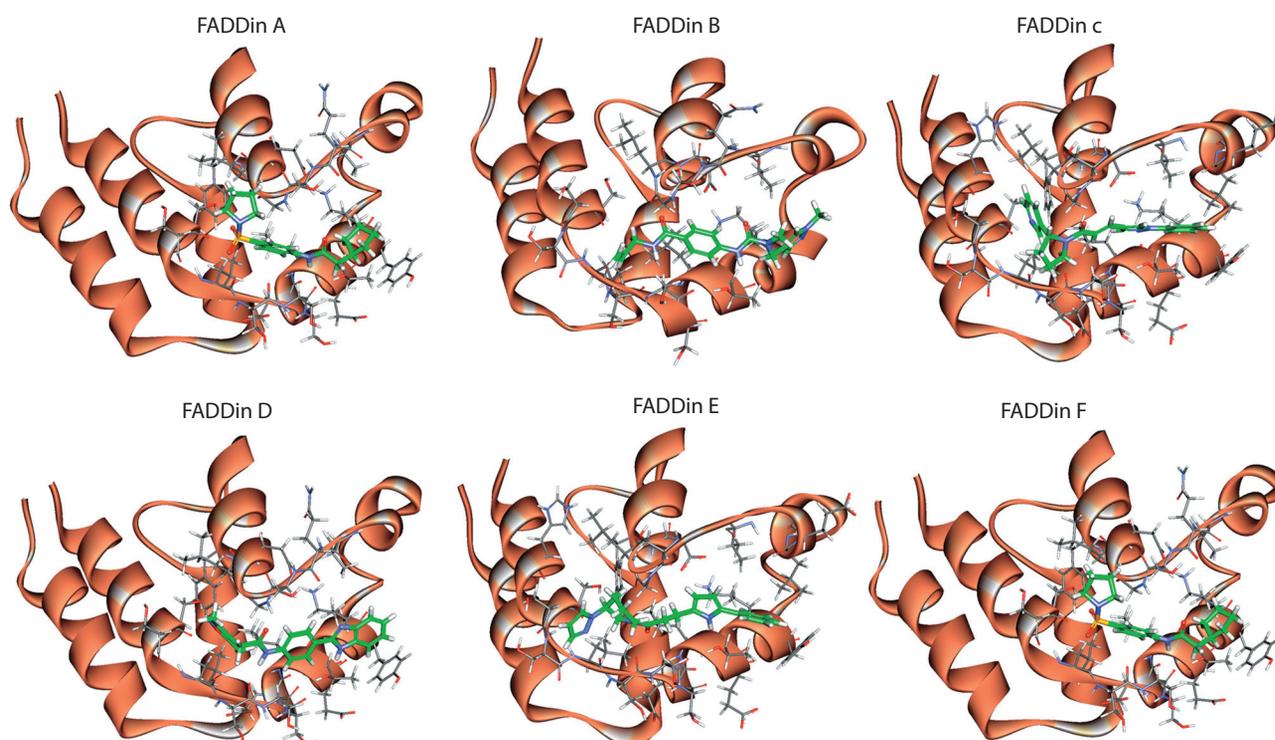
Добавление к клеткам почти всех соединений группы FADDin в комбинации с CD95L не вызвало ожидаемого ингибирующего эффекта на индукцию апоптоза, поскольку изменения содержания АТФ в клетках при добавлении только CD95L или в комбинации с FADDin не наблюдалось (рис. 3, 4). Более того, следует отметить, что добавление соединений FADDin без CD95L к клеткам линии Jurkat в некоторых случаях вело к снижению содержания АТФ

в клетках при обработке только соединениями FADDin в концентрациях 5, 10 и 20  $\mu\text{M}$ , особенно при инкубации в течение 22 ч (рис. 3, 4, столбцы 3–5). В частности, данный эффект заключается в понижении количества АТФ, что



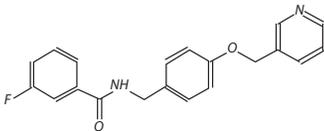
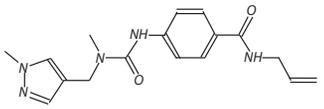
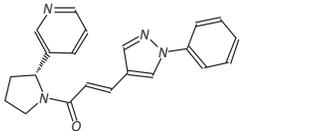
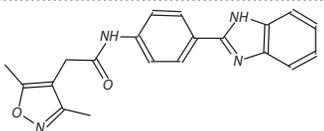
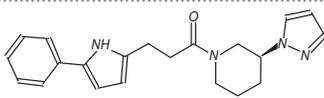
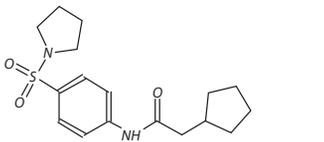
**Fig. 1.** The structure of the FADD protein used in this work.

(a) Superposition of 25 conformations of FADD obtained by nMr (pdb 2GF5). r residue Y25 is shown as a ball-and-stick model. (b) The conformation of protein #2 with the domain binding low-molecular-weight compounds. The putative binding domain is shown as a surface accessible for the solvent.



**Fig. 2.** The position of the binding of the best ligands selected for three nMr conformations of the FADD protein.

characterization of FADDin compounds tested in this work. The ligand chemical structure, docking ranking, and the ordinal number of the FADD 2GF5 conformation used for its generation

FADDin type	Structure	identifie	SP Score	XP Score	Protein conformation n.o.
FADDin A		Zinc 36391506	143	27	23
FADDin B		Zinc 48159387	83	28	13
FADDin c		Zinc 12793275	575	40	23
FADDin D		Zinc 22394070	306	55	2
FADDin e		Zinc 69568542	813	13	23
FADDin F		Zinc 06271291	944	24	2

свидетельствует об индукции клеточной гибели лишь при добавлении соединений FADDin и, тем самым, о неспецифических эффектах данных соединений на индукцию клеточной гибели.

Важным исключением оказалось соединение FADDin B. Характерной чертой этого соединения было отсутствие неспецифических эффектов на индукцию клеточной гибели: изменение содержания АТФ в клетках при обработке FADDin B даже в самой высокой применяемой концентрации 20  $\mu\text{M}$  в течение 6, а также 22 ч не наблюдалось (рис. 3, 4, столбец 3).

Отметим, что при сравнительном анализе неспецифических эффектов соединений FADDin на индукцию клеточной гибели наибольшую токсичность показывает FADDin A (рис. 3, 4, столбцы 3–5). При обработке этим соединением в течение 6 ч наблюдалась значительная потеря содержания АТФ в клетках, свидетельствующая о снижении их жизнеспособности, в то время как все другие соединения FADDin в течение данного интервала времени подобного действия не оказывали. Наибольшая потеря содержания АТФ наблюдалась при использовании FADDin A в концентрации 20  $\mu\text{M}$  (рис. 3, столбец 3), но также следует отметить снижение содержания АТФ в клетках при использовании FADDin A в концентрациях 10  $\mu\text{M}$  (рис. 3, столбец 4) и даже 5  $\mu\text{M}$  (рис. 3, столбец 5). Более того, если взять за критерий отсутствие неспецифических эффектов при инкубации в течение 22 ч с концентрацией

FADDin 20  $\mu\text{M}$  (рис. 4, столбец 3), то по показателю клеточной гибели на первом месте будет соединение FADDin B, на втором – FADDin C, затем – FADDin E и F, за которыми последует FADDin D, и, наконец, на последнем месте, как было отмечено выше, будет находиться FADDin A. При этом только FADDin B не проявлял неспецифических эффектов соединений FADDin на индукцию клеточной гибели, в то время как все остальные соединения данной группы продемонстрировали некоторую токсичность: максимальную – в случае FADDin A и небольшую (только при инкубации в течение 22 ч в самой высокой концентрации) – в случае FADDin C.

При сравнительном анализе эффектов FADDin при комбинаторном воздействии вместе с CD95L наилучшее действие имело FADDin B. Добавление к клеткам соединения FADDin B в комбинации с CD95L вызвало небольшой ингибирующий эффект на индукцию программируемой клеточной гибели. В частности, было детектировано большее содержание АТФ в клетках во временной точке 6 ч при обработке CD95L в комбинации с соединением FADDin B в концентрациях 20 и 10  $\mu\text{M}$  (рис. 3, столбцы 8, 9) по сравнению с содержанием АТФ при обработке только CD95L (рис. 3, столбцы 6, 7). При этом добавление FADDin B в концентрации 20  $\mu\text{M}$  оказывало чуть больший эффект (рис. 3, столбец 8), чем в концентрации 10  $\mu\text{M}$  (рис. 3, столбец 9). Как отмечалось выше, в ходе проверки действия соединений FADDin ожидалось отсутствие сни-

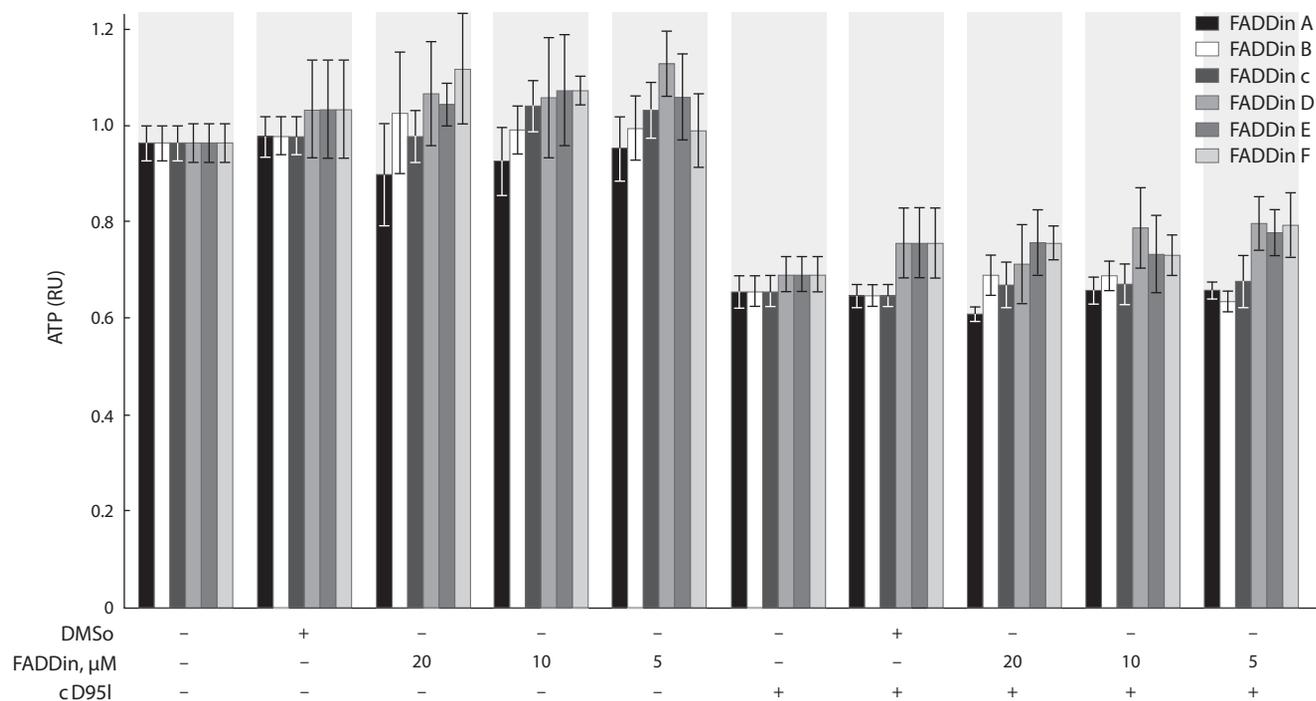


Fig. 3. Action of compounds FADDin A, B, C, D, E и F on Jurkat cells after 6-h incubation with CD95L.

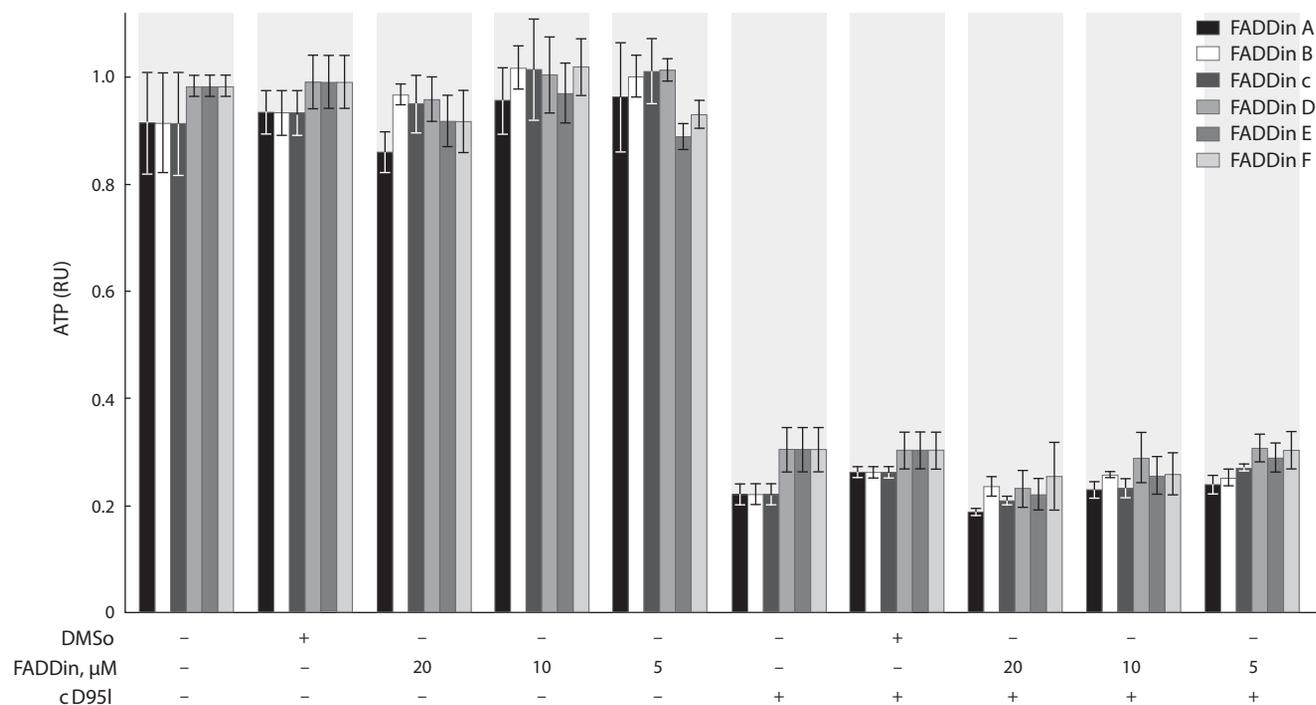


Fig. 4. Action of compounds FADDin A, B, C, D, E и F on Jurkat cells after 22-h incubation with CD95L.

жения уровня содержания АТФ в клетках при индукции апоптоза через рецептор CD95 при добавлении соединений FADDin за счет ингибирования клеточной гибели и, соответственно, повышения количества жизнеспособных клеток. Таким образом, эффекты, наблюдаемые в данном

эксперименте, вполне можно отнести к ожидаемому эффекту FADDin B на ингибирование апоптоза через связывание с белком FADD.

Отметим, что ингибирующее влияние соединения FADDin B при инкубации вместе с CD95L во временной

точке 22 ч отсутствовало (рис. 4, столбцы 8, 9). По-видимому, данное явление связано с тем, что действие FADDin B в концентрациях 20 и 10  $\mu\text{M}$  является недостаточно эффективным, в связи с этим его активность можно детектировать только на начальных стадиях индукции апоптоза.

Таким образом, проведенный анализ показывает, что соединение FADDin B обладает потенциалом для ингибирования апоптоза, что должно быть проверено в последующих исследованиях. Отсутствие явно выраженных неспецифических эффектов соединений FADDin на индукцию клеточной гибели позволяет сделать предположение о том, что концентрация FADDin B может быть увеличена в дальнейших экспериментах для увеличения эффективности его действия. Более того, данные экспериментального анализа позволяют предположить, что именно конформация белка FADD № 13, возможно, является активной при образовании комплекса CD95 DISC и рекрутировании прокаспазы-8 в данный комплекс, что соответствует ключевому этапу в запуске апоптоза через рецептор CD95.

Также небольшие эффекты по ингибированию апоптоза проявляли FADDin E и F при обработке вместе с CD95L в течение 6 ч в концентрации 5  $\mu\text{M}$  (рис. 3, столбец 10). Также следует отметить потенциальное действие FADDin D при инкубации вместе с CD95L в течение 6 ч и концентрациях 10 и 5  $\mu\text{M}$  (рис. 3, столбцы 9, 10). Если проранжировать эффект действия данных химических соединений, принимая за критерий влияние на клеточную гибель при обработке вместе с CD95L в течение 6 ч и концентрации FADDin 20  $\mu\text{M}$ , то первое место, безусловно, занимает FADDin B, а последнее – FADDin A.

При этом следует отметить, что наблюдаемые эффекты по ингибированию апоптоза, индуцируемого через рецептор CD95, были не очень большими, что позволяет предложить дальнейшую химическую модификацию полученных малых химических соединений как стратегию продолжения данных исследований. Альтернативным объяснением может служить предположение, что конформации белка FADD, такие как № 2 и 23, не содержат гидрофобного кармана вблизи аминокислотного остатка Y25, благоприятного для связывания низкомолекулярных соединений. В дальнейших исследованиях предполагается проверить возможность дизайна малых химических соединений для других участков белка FADD, которые могут служить сайтами для их связывания.

Таким образом, в ходе данной работы был проведен поиск малых химических соединений *in silico*, направленно взаимодействующих с основным структурным белком комплекса CD95 DISC, FADD, и с их помощью изучены особенности структурно-функциональной организации этого комплекса и молекулярные механизмы клеточной гибели. Для достижения поставленной цели были проведены молекулярное моделирование белковых комплексов и виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов (соединений FADDin), а также разработана новая методология экспериментальной проверки их биологического эффекта на клеточной линии Jurkat. Действие соединений FADDin на ингибирование апоптоза, индуцируемого через рецептор CD95, было не очень значительным, что

позволяет предложить дальнейшую химическую модификацию соединений группы FADDin как стратегию продолжения данных исследований. Наибольшую активность продемонстрировало соединение FADDin B, что, в свою очередь, позволяет высказать предположение о том, что именно конформация белка FADD № 13, которая является мишенью для соединения FADDin B, представляет потенциал для проведения дальнейшего структурного дизайна низкомолекулярных химических ингибиторов программируемой клеточной гибели.

## Acknowledgments

The work was 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”.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Bissantz C., Kuhn B., Stahl M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *J. Med. Chemistry*. 2010;53(14):5061-5084. DOI 10.1021/jm100950p
- 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
- Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T., Repasky M.P., Knoll E.H., Shaw D.E., Shelley M., Perry J.K., Francis P., Shenkin P.S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem*. 2004;47(7):1739-1749. DOI 10.1021/jm0306430
- Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P., Frye L.L., Greenwood J.R., Halgren T.A., Sanschagrin P.C., Mainz D.T. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem*. 2006;49(21):6177-6196. DOI 10.1021/jm051256o
- Halgren T.A., Murphy R.B., Friesner R.A., Beard H.S., Frye L.L., Pollard W.T., Banks J.L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem*. 2004;47(7):1750-1759. DOI 10.1021/jm030644s
- Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S., Coleman R.G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model*. 2012;52(7):1757-1768. DOI 10.1021/ci3001277
- Krammer P.H., Arnold R., Lavrik I.N. Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2007;7(7):532-542. DOI 10.1038/nri2115
- Lavrik I.N., Golks A., Krammer P.H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest*. 2005;115(10):2665-2672. DOI 10.1172/JCI26252
- Lavrik I.N., Krammer P.H. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):36-41. DOI 10.1038/cdd.2011.155
- Sastry G.M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aid. Mol. Des*. 2013;27(3):221-234. DOI 10.1007/s10822-013-9644-8
- Schleich K., Warnken U., Fricker N., Öztürk S., Richter P., Kammerer K., Schnoelzer M., Krammer 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