

УДК 577.24

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕМОНСТРИРУЕТ ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ФИЛАМЕНТОВ DED НА АКТИВНОСТЬ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ, НАЦЕЛЕННЫХ НА ГЕТЕРОДИМЕР КАСПАЗА-8/с-FLIP_L

© 2020 Н.В. Иванисенко¹, И.Н. Лаврик^{1,2*}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия;
электронная почта: n.ivanisenko@gmail.com

² Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Otto von Guericke University Magdeburg,
39106 Magdeburg, Germany; E-mail: ilav3103@gmail.com

Поступила в редакцию 17.07.2020

После доработки 24.07.2020

Принята к публикации 24.07.2020

Активация прокаспазы-8 в «сигнальном комплексе, индуцирующем гибель» клетки (DISC), приводит к запуску внешнего пути апоптоза. Активация прокаспазы-8 происходит в филаментах «эффекторного домена смерти» (DED), и этот процесс регулируется белками с-FLIP, в частности, т.н. длинной изоформой белка, с-FLIP_L. Недавно было описано первое рационально сконструированное химическое соединение, FLIPin, нацеленное на гетеродимер каспазы-8/с-FLIP_L. FLIPin повышает активность каспазы-8 при процессинге гетеродимера. В настоящей работе с использованием кинетической модели были исследованы механизмы действия FLIPin в комплексе DISC. Ключевой целью данной работы было предсказание активности FLIPin в зависимости от различной стехиометрии и состава DED филамента. С помощью математического моделирования были получены оптимальные соотношения между белком с-FLIP_L и прокаспазой-8 в различных внутриклеточных ландшафтах, благоприятствующих действию FLIPin. Анализ модели показал, что в модуляции активности FLIPin при снижении или повышении экспрессии с-FLIP_L задействованы различные молекулярные механизмы. Таким образом, комбинация математического моделирования и системной фармакологии является важным инструментом для разработки более эффективных терапевтических подходов и предсказания оптимальных стратегий лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, DISC, каспаза-8, FLIPin, DED, DRs.

DOI: 10.31857/S0320972520100024

ВВЕДЕНИЕ

Инициация внешнего пути апоптоза происходит в результате активации т.н. рецепторов смерти (DRs), в частности, CD95/Fas/APO-1 или TRAIL-R1/2 [1]. Это приводит к формированию макромолекулярной платформы, обозначаемой как «сигнальный комплекс, индуцирующий гибель» (DISC) [2, 3]. В состав DISC входят соответствующий рецептор смерти (DR), белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора (FADD), белки прокаспазы-8, прокаспазы-10 и с-FLIP. Сборка DISC приводит к активации прокаспазы-8, что происходит в составе филаментов, образуемых эффекторными доменами смерти (DED). Сборка DED филаментов происходит за счет взаимодействия между эф-

фекторными доменами смерти и белков FADD, прокаспазы-8, прокаспазы-10 и белка с-FLIP. Образованные филаменты DED служат в качестве платформы для димеризации и последующей активации прокаспазы-8 [4–7].

Димеризация каталитических доменов прокаспазы-8a/b приводит к конформационным изменениям структуры прокаспазы-8a/b и положения т.н. петли L2, которая играет центральную роль в структурной организации активного центра данного фермента [8, 9]. Это событие приводит к формированию активного центра каспазы-8 и далее к инициации активации прокаспазы-8. Следует отметить, что вслед за активацией прокаспазы-8 происходит её автокаталитический процессинг, который включает расщепление петли L2 в районе остатка аспарагиновой кислоты D374 на фрагменты L2 («процессированный» L2) и L2'. Данное событие приводит к образованию продуктов расщепления прокаспазы-8a/b (p43/p41 и p12) [10]. Последние далее подвергаются автокаталитическому процессингу в результате протеолиза по аминокислотным ос-

Принятые сокращения: DISC (death-inducing signaling complex) – сигнальный комплекс, индуцирующий гибель клетки; DED (death effector domain) – эффекторный домен смерти; FLIPin (FLIP inhibitor) – ингибитор белка FLIP; DRs (death receptors) – рецепторы смерти.

* Адресат для корреспонденции.

таткам D384 и D210/216 с образованием т.н. активных субъединиц каспазы-8 (p10 и p18), которые, в свою очередь, образуют гетеротетрамер p10₂/p18₂ [11–14]. Показано, что гомодимер про-каспаза-8a/b и продукт его расщепления p43/p41 обладают каталитической активностью, которая тесным образом связана с конформационными изменениями в активном центре после димеризации прокаспазы-8 [7, 11]. Кроме того, было показано, что активность прокаспазы-8 отличается от активности гетеротетрамера каспазы-8 (p10₂/p18₂), и оба комплекса характеризуются различной субстратной специфичностью [7, 11].

Описаны три изоформы белка c-FLIP, обозначаемые Long (L), Short (S) и Raji (R), т.е. c-FLIP_L, c-FLIP_S и c-FLIP_R [15, 16]. Короткие изоформы белка c-FLIP, а именно, c-FLIP_S и c-FLIP_R блокируют активацию прокаспазы-8 в филаментах DED. В то же время c-FLIP_L в составе DISC может действовать и как активатор апоптоза, и как его ингибитор [8, 9, 17–19]. С позиции структурной биологии, проапоптотическая функция c-FLIP_L опосредована образованием гетеродимеров прокаспаза-8/c-FLIP_L, в которых петля L2 прокаспазы-8 и, тем самым, ее активный центр стабилизированы в «закрытой» конформации через взаимодействия с белком c-FLIP_L. Это приводит к повышению ферментативной активности каспазы-8 [8, 20, 21]. Было показано, что проапоптотическое действие c-FLIP_L наблюдается в случае низкого или среднего уровня экспрессии данного белка, в то время как при повышенной экспрессии данная изоформа действует как ингибитор апоптоза [17]. Данные выводы основаны на многих работах, в

которых было показано, что уровень экспрессии c-FLIP_L играет важную роль в его про- или антиапоптотической функции. Кроме того, недавно было показано, что антиапоптотическую роль белка c-FLIP_L можно объяснить его влиянием на состав и структуру филамента DED [18, 22]. В частности, было показано, что повышенная экспрессия c-FLIP останавливает рост филамента DED, что приводит к укорочению филаментов DED и ограничению активации каспазы-8. Таким образом, количество белка c-FLIP играет роль чекпойнта, контролирующего длину филамента DED и его структуру [18].

Ожидается, что после активации прокаспазы-8 и последующего расщепления прокаспазы-8 по остатку D374 в гетеродимере прокаспаза-8/c-FLIP_L, «закрытая» конформация петли L2' в молекуле прокаспазы-8 нарушается, что вызывает ингибирование активности каспазы-8 в составе гетеродимера прокаспаза-8/c-FLIP_L [8, 23]. Недавно была описана малая молекула, названная FLIPin (FLIP inhibitor), которая была разработана для увеличения каталитической активности гетеродимера [23]. FLIPin был сконструирован таким образом, чтобы связываться с белком c-FLIP_L на интерфейсе гетеродимера каспаза-8/c-FLIP_L. FLIPin имитирует стабилизирующий эффект петли L2' в «закрытой» конформации (рис. 1). В частности, предполагается, что FLIPin связывается с гетеродимером после процессинга прокаспазы-8 и образования p43/p41 и, тем самым, восстанавливает сеть взаимодействий, приводя к стабилизации активного центра каспазы-8. Данное соединение было получено в результате проведения виртуального

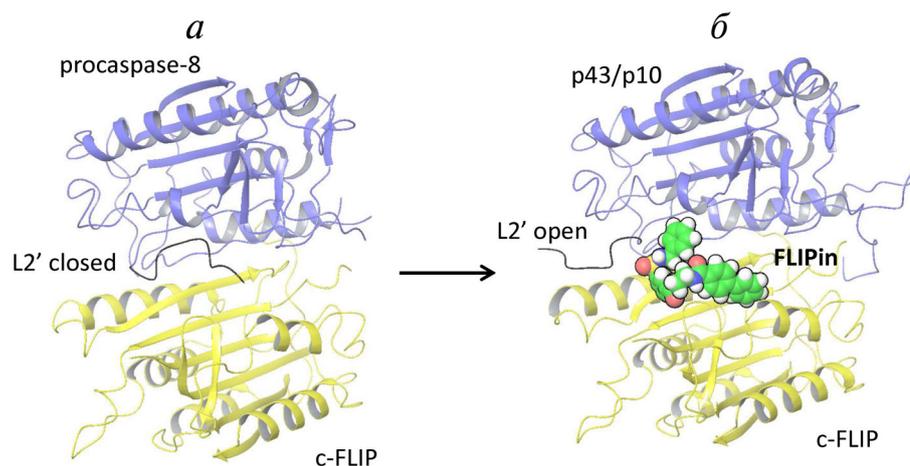


Рис. 1. Модель структуры гетеродимера каспаза-8/c-FLIP_L, связанного с FLIPin. *а* – Структура гетеродимера прокаспазы-8 (темно-синий цвет) и c-FLIP_L (желтый цвет) [PDB ID 3H11]. Показана петля L2 в «закрытой» конформации; *б* – модель структуры гетеродимера белка c-FLIP_L [PDB ID 3H11] и продукта протеолиза каспазы-8-p43/p10 [PDB ID 3H13], связанного с FLIPin (зеленый цвет) в предполагаемом связывающем центре. Показана петля L2' в «открытой» конформации. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

скрининга *in silico*. Кроме того, на основе FLIPin было создано оптимизированное химическое соединение FLIPinB γ , которое повышает активность каспазы-8 в комплексе DISC, усиливает активацию эффекторных каспаз и DR-опосредованный апоптоз [23].

Математическое моделирование сети апоптоза стало мощным инструментом для изучения динамики регуляции гибели клеток [24, 25]. В частности, был очень тщательно изучен процесс CD95-опосредованной передачи сигнала с использованием системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ; ODEs), а также других математических формализмов, таких как булевы и агентные модели [5, 26–28]. С помощью математических моделей была получена новая информация о контроле механизмов внешнего пути апоптоза. В частности, было выявлено пороговое поведение CD95-опосредованной передачи сигнала и получено количественное представление о проапоптотической роли белков с-FLIP_L. Кроме того, были расшифрованы механизмы переключения про- и антиапоптотических сигнальных путей, индуцированных через рецептор CD95 [26, 29, 30].

Недавно нами была разработана математическая модель, которая позволяет проводить анализ влияния FLIPin на усиление активации прокаспазы-8 в комплексе DISC [23]. Однако данная модель не учитывала недавно открытую роль с-FLIP в регуляции состава и стехиометрии комплекса DISC [18]. Чтобы учесть новые структур-

ные данные относительно роли с-FLIP_L и получить количественные представления о механизмах действия FLIPin, в настоящей работе был использован метод математического моделирования с помощью системы ОДУ. На основе моделирования предсказаны оптимальные количественные соотношения между уровнями прокаспазы-8 и белка с-FLIP_L в различных внутриклеточных ландшафтах для получения максимальной активности FLIPin. Полученные результаты обеспечивают основу для разработки новых, более эффективных терапевтических противораковых подходов, а также позволяют дополнить представления о механизмах регуляции филаментов DED.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование. Математическая модель была основана на системе ОДУ (ODEs), описывающих процессы активации каспазы-8 в комплексе DISC в присутствии или отсутствии FLIPinB γ . Данный подход был ранее представлен в работе [23] и доработан в данном исследовании. Значения скоростей реакции и параметры модели были взяты из работы [23]. Для решения ОДУ была использована программа Scipy.integrate.odeint из программного пакета Python SciPy (www.scipy.org). Модель была описана с помощью 12 дифференциальных уравнений (1–2, табл. 1) и 8 параметров (табл. 2).

Уравнения, использованные в модели:

$$\frac{dFLIP}{dt} = -\gamma \cdot k_d \cdot FLIP \cdot P8 + (1 - \sigma_{FLIPin}) \cdot k_p \cdot DISC_cat \cdot FLIP_P8 - k_{deg} \cdot FLIP \quad (1)$$

$$\frac{dP8}{dt} = -\gamma \cdot k_d \cdot FLIP \cdot P8 - 2 \cdot k_d \cdot P8 \cdot P8 - k_d \cdot P8 \cdot C8 - k_{deg} \cdot P8 \quad (2)$$

$$\frac{dC8}{dt} = (1 - \sigma_{FLIPin}) \cdot k_p \cdot DISC_cat \cdot FLIP_P8 - 2 \cdot \gamma \cdot k_d \cdot C8 \cdot C8 - k_d \cdot P8 \cdot C8 - k_{deg} \cdot C8 \quad (3)$$

$$\frac{dFLIP_P8}{dt} = \gamma \cdot k_d \cdot FLIP \cdot P8 - k_p \cdot DISC_cat \cdot FLIP_P8 - k_{deg} \cdot FLIP_P8 \quad (4)$$

$$\frac{dP8_P8}{dt} = -k_p \cdot DISC_cat \cdot P8_P8 + k_d \cdot P8 \cdot P8 - k_{deg} \cdot P8_P8 \quad (5)$$

$$\frac{dC8_C8}{dt} = k_p \cdot DISC_cat \cdot (P8_P8 + P8_C8) + \gamma \cdot k_d \cdot C8 \cdot C8 - k_{deg} \cdot C8_C8 \quad (6)$$

$$\frac{dP8_C8}{dt} = -k_p \cdot DISC_cat \cdot C8_P8 + k_d \cdot P8 \cdot C8 - k_{deg} \cdot P8_C8 \quad (7)$$

$$\frac{dCellDeathSubstrate}{dt} = -k_{cd} \cdot CellDeathSubstrate \cdot DISC_cat - k_{cd_c3} \cdot CellDeathSubstrate \cdot C3 \quad (8)$$

$$\frac{dCellDeath}{dt} = -\frac{dCellDeathSubstrate}{dt} \quad (9)$$

$$\frac{dp3}{dt} = -k_{p3} \cdot DISC_cat \cdot p3 - k_{c3_p3} \cdot p3 \cdot c3 \quad (10)$$

$$\frac{dc3}{dt} = k_{p3} \cdot DISC_cat \cdot p3 + k_{c3_p3} \cdot p3 \cdot c3 \quad (11)$$

$$\frac{dFLIP_C8_FLIPin}{dt} = \sigma_{FLIPin} \cdot k_p \cdot DISC_cat \cdot FLIP_P8 - k_{deg} \cdot FLIP_C8_FLIPin \quad (12)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ODE модель процесса активации каспазы-8 в филаменте DED, описывающая влияние FLIPin. FLIPin нацелен на гетеродимер каспазы-8/с-FLIP_L, следовательно, количество гетеродимеров прокаспазы-8/с-FLIP_L, образующихся на филаменте DED, должно коррелировать с активностью FLIPin. Кроме того, недавно нами было показано, что белок с-FLIP_L имеет два специфических сайта связывания в структуре филамента DED, и поэтому возможно как минимум две пространственные локализации, внутри которых может происходить сборка гетеродимера каспазы-8/с-FLIP_L [18]. А именно с-FLIP_L может связываться как с DED FADD, так и с доменом DED2 прокаспазы-8, что и обеспечивает образование гетеродимеров. Кроме того, данный факт приводит к возникновению ситуации, при которой белок с-FLIP_L может ограничивать рост филаментов DED и при повышенной экспрессии укорачивать длину филаментов DED [18]. Поэтому в данной работе мы постави-

ли целью разработать систему ОДУ, с помощью которой можно анализировать эффекты FLIPin в различном клеточном контексте. В частности, было сосредоточено внимание на выявление зависимости активности FLIPin от длины различных филаментов DED и соотношения с-FLIP_L: прокаспазы-8.

Чтобы найти ответы на эти вопросы, была выбрана недавно разработанная система обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), описывающая воздействие FLIPin на гетеродимер каспазы-8/с-FLIP_L, и затем её расширили с учетом новой структурной информации, касающейся филаментов DED. С этой целью был добавлен дополнительный параметр, определяющий длину цепи DED. При построении структуры модели принят во внимание тот факт, что три цепи DED образуют один филамент DED, и что согласно результатам недавних протеомных исследований, в среднем, на одну цепь DED приходится одна молекула с-FLIP_L [18]. Топология модели включала образование гомо- (прокаспазы-8/прокаспазы-8) и гетеродимеров (прокаспа-

Таблица 1. Обозначения, использованные в модели, и их исходные значения

Обозначения	Исходные условия для клеток HeLa-CD95	Описание
DED_chain_length	9,71	длина цепи DED в филаменте DED. Длину цепи рассчитывали из соотношения $(P8+FLIP)/FLIP = DED\ chain\ length$
FLIP	7,39 [нМ]	с-FLIP _L
P8	64,4 [нМ]	прокаспазы-8
C8	0	каспазы-8 (p43/p10)
FLIP_P8	0	гетеродимер C-концевых доменов с-FLIP _L и прокаспазы-8 в DISC
P8_P8	0	гомодимер C-концевых доменов прокаспазы-8/прокаспазы-8 в DISC
C8_C8	0	гетеротетрамер каспазы-8 (p43/p10/p18/p10)
P8_C8	0	димер C-концевых доменов прокаспазы-8/каспазы-8 в DISC
FLIP_C8_FLIPin	0	каспазы-8/с-FLIP _L , стабилизированная FLIPin в DISC
CellDeathSubstrate	1	субстрат клеточной смерти
CellDeath	0	относительное количество погибших клеток
Procaspase-3	1,44 [нМ]	прокаспазы-3
Caspase-3	0	каспазы-3
σ_{FLIPin}	1 или 0 при условии, что FLIPin был добавлен или нет соответственно	коэффициент, который указывает на присутствие FLIPin
DISC_cat	$FLIP_P8 + FLIP_C8_FLIPin + 2 \cdot P8_C8 + 2 \cdot C8_C8 + 2 \cdot P8_P8$	суммарная каталитическая активность каспазы-8 в комплексе DISC

Таблица 2. Параметры модели

Параметр	Описание	Значения	Размерность
k_d	скорость димеризации (для каспаза-8/прокаспазы-8, прокаспазы-8/прокаспазы-8)	0,00102	$[\text{ч}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1}]$
γ	коэффициент увеличения скорости димеризации комплексов прокаспазы-8/ с-FLIP _L и каспаза-8/каспазы-8	33,5796	—
k_p	скорость процессинга каспазой-8 субстратов DISC	3,14368	$[\text{ч}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1}]$
k_{deg}	скорость деградации DISC	0,693	$[\text{ч}^{-1}]$
k_{cd}	скорость процессинга субстрата клеточной смерти, опосредованного каспазой-8	0,12875	$[\text{ч}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1}]$
k_{cd_c3}	скорость процессинга субстрата клеточной смерти, опосредованного каспазой-3	0,15725	$[\text{ч}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1}]$
k_{p3}	скорость процессинга прокаспазы-3 каспазой-8	0,02093	$[\text{ч}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1}]$
k_{p3_c3}	скорость процессинга прокаспазы-3 каспазой-3	1,12659	$[\text{ч}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1}]$

Примечание. Значения параметров взяты из работы [23].

за-8/с-FLIP_L) в составе филаментов DED (рис. 2). После образования гомо- и гетеродимеров прокаспазы-8 подвергается аутокаталитической активации в филаменте DED, после чего происходит внутри- и межмолекулярный процессинг димеров с образованием p43/p41 (p43-каспазы-8), p18 и p10 [10]. Также при построении топологии модели было сделано предположение, что как гомодимер прокаспазы-8/прокаспазы-8, так и продукты её расщепления, а именно p43-каспазы-8/p43-каспазы-8 и p18/p43-каспазы-8, обладают каталитической активностью в филаменте DED. Эти предположения были основаны на предыдущих сообщениях о том, что гомодимер прокаспазы-8a/b, а также продукт его расщепления p43/p41 обладают каталитической активностью, которая тесным образом связана с конформационными изменениями в активном центре при димеризации прокаспазы-8 и последующей активации димера [7, 11]. Другие предположения были сделаны в случае гетеродимера прокаспазы-8/с-FLIP_L. В этом случае было предположено, что только гетеродимер прокаспазы-8/с-FLIP_L обладает каталитической активностью, в то время как продукт его расщепления p43-каспазы-8/с-FLIP_L каталитически неактивен, и в отсутствие FLIPin происходит его быстрая диссоциация. Также было предположено, что связывание FLIPin приводит к восстановлению активности комплекса p43-каспазы-8/с-FLIP_L, достигая значений активности, характерных для гетеродимера прокаспазы-8/с-FLIP_L. Активация прокаспазы-8 сопровождается опосредованным каспазой-8 расщеплением прокаспазы-3 с образованием каспазы-3 и её последующей активацией, приводящей к

гибели клетки. В структуре модели «общий уровень гибели клеток» соответствует уровню расщепленного субстрата клеточной смерти, который был интегрирован с течением времени. В структуру модели были включены процессинг субстрата клеточной смерти, происходящий как с участием каспазы-3, так и каспазы-8. Значения констант связывания и соответствующая параметризация были взяты из предыдущей модели процесса активации комплекса DISC при добавлении FLIPin, которая была получена на экспериментальных данных, полученных при работе с клетками HeLa-CD95 [23].

В настоящей работе, чтобы смоделировать эффекты FLIPin, основным предположением было то, что белок с-FLIP_L ограничивает количество активной прокаспазы-8 в комплексе DISC путем остановки сборки филамента DED. В то же время было предположено, что повышение уровня с-FLIP_L в составе DISC не влияет на соотношение FADD:с-FLIP_L. Кроме того, в структуре модели было заложено, что сборка филаментов DED происходит сразу после добавления CD95L. Точная стехиометрия филамента DED была определена начальными условиями модели. В частности, соотношения между прокаспазой-8 и с-FLIP_L в комплексе DISC основывались на результатах количественного протеомного анализа, полученных в нашей предыдущей работе [18]. Данные результаты свидетельствуют о том, что в филаменте DED соотношения между этими белками примерно равны 1:9 (с-FLIP_L:прокаспазы-8). Однако при высоком уровне с-FLIP_L соотношение с-FLIP_L и прокаспазы-8 оказалось примерно равным 1 к 1 [18]. Таким образом, данные соотношения были

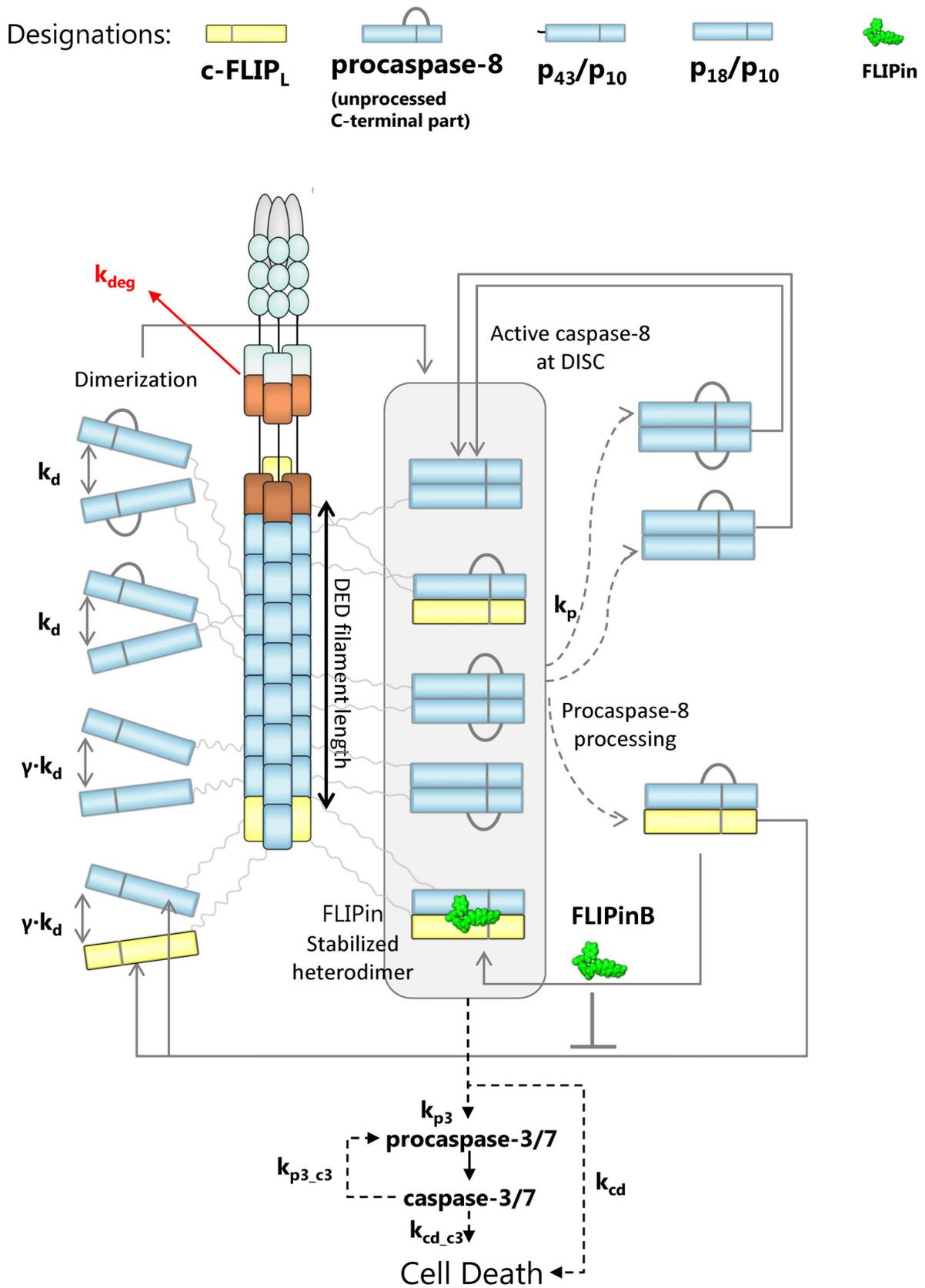
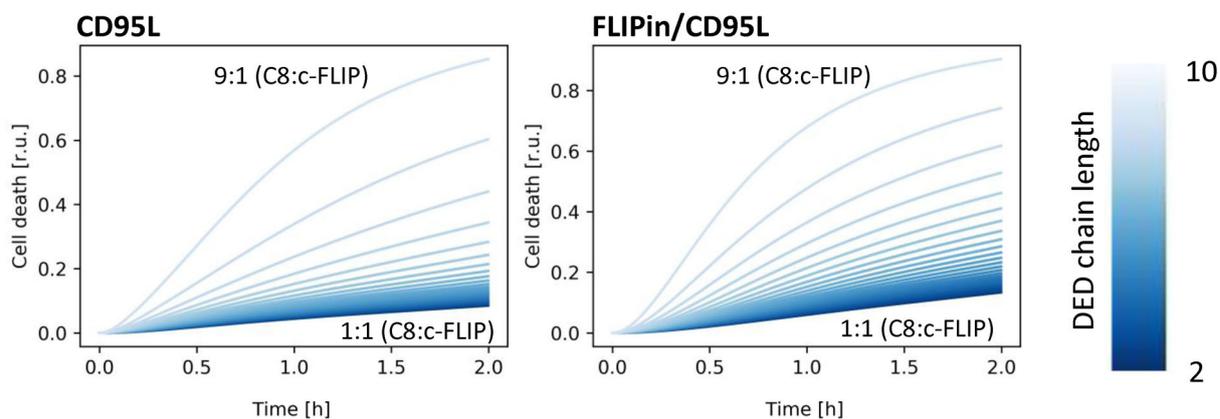


Рис. 2. Математическая модель процесса активации каспазы-8 в филamente DISC/DED, учитывающая действие FLIPin. Указаны структура модели, объекты модели и константы взаимодействия

Kinetics of the cell death



Active caspase-8 at the DISC

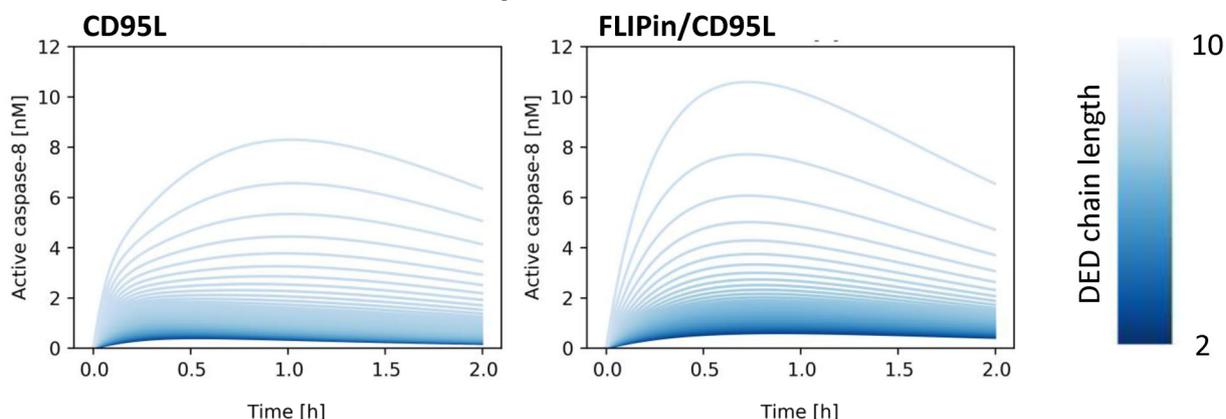


Рис. 3. Кинетика клеточной гибели (вверху) и активации каспазы-8 (внизу) при различных соотношениях прокаспазы-8 и с-FLIP. Показана кинетика в случае стимуляции только CD95L (слева) и совместной стимуляции CD95L и FLIPin (справа). Градиент интенсивности окраски от темного до светлого означает постепенное изменение длины цепи DED от короткой (соотношение с-FLIP:каспазы-8 равно 1 : 1, светлое окрашивание) до длинной цепи (соотношение с-FLIP:каспазы-8 равно 1 : 9, интенсивное окрашивание)

включены в модель, и следующим шагом было изучение поведения этой системы *in silico*.

С помощью математического моделирования можно предсказать усиление гибели клеток и повышение активности каспазы-8 малой молекулой FLIPin при различных соотношениях с-FLIP_L и прокаспазы-8. На первом этапе был проведен анализ того, как активность FLIPin зависит от различного уровня белка с-FLIP_L (рис. 3). Данные расчеты проводились при условии, что количество комплекса CD95/CD95L/FADD со временем не изменяется. Сначала было изучено влияние уровня с-FLIP_L на каталитическую активность каспазы-8 и индукцию клеточной смерти *in silico*. Как и ожидалось, значения наивысшей активности каспазы-8 в комплексе DISC и наибольшего уровня индукции клеточной смерти были получены при низком уровне

с-FLIP_L, который соответствует эндогенному уровню этого белка (рис. 3). В клетках HeLa-CD95 он соответствует соотношению, примерно равному 1:9 (с-FLIP_L:прокаспазы-8) в комплексе DISC (рис. 3). Максимальные значения активности каспазы-8 при этих соотношениях наблюдались примерно через 1 ч после стимуляции CD95L *in silico* (рис. 3). При увеличении уровня белка с-FLIP_L активность каспазы-8 в комплексе DISC и уровень индукции клеточной гибели понижались (рис. 3). На втором этапе было изучено действие FLIPin. При совместной обработке клеток FLIPin и CD95L в соотношении 1:9 (с-FLIP_L:прокаспазы-8) максимальное значение активности каспазы-8 наблюдалось в более ранний момент времени, который соответствовал 45 мин после стимуляции CD95L. Кроме того, при совместной обработке CD95L и FLIPin *in*

in silico общая активность каспазы-8 была выше, чем при обработке только CD95L (рис. 3). Повышение активности каспазы-8 и усиление клеточной гибели при совместной обработке CD95L и FLIPin также наблюдалось в случае всех изученных соотношений с-FLIP_L:прокаспаза-8 в комплексе DISC (рис. 3). Таким образом, с помощью модели была получена картина чувствительности комплекса к добавлению FLIPin, зависящая от уровня белка с-FLIP_L.

Затем было изучено, как длина филаментов DED влияет на активность FLIPin. Как было отмечено ранее, основным предположением модели было то, что увеличение уровня белка с-FLIP_L приводит к уменьшению длины филамента DED. Укорочение филамента DED вызывает снижение количества прокаспазы-8 в филаменте DED. Это приводит к снижению активности каспазы-8 и индукции клеточной гибели, что нами наблюдалось *in silico* (рис. 3). Эти данные хорошо согласуются с наблюдениями Hillert et al. в условиях *in vitro* [18]. В частности, существенное снижение активности каспазы-8 и уровня клеточной смерти наблюдалось в клетках HeLa-CD95-FL, которые характеризуются повышенной экспрессией с-FLIP_L [18]. Интересно, что в данных условиях ожидалось, что количество гетеродимеров прокаспаза-8/с-FLIP_L увеличится, что может привести к увеличению активности каспазы-8, но эти предположения не оправдались из-за сильно уменьшенной суммарной концентрации прокаспазы-8 за счет уменьшения длины филамента DED [18].

Чтобы определить, как активность FLIPin зависит от длины филамента DED, был введен коэффициент эффективности действия FLIPin. Этот коэффициент рассчитывался как соотношение значений увеличения активности каспазы-8 в комплексе DISC и индукции гибели клеток при обработке только CD95L или CD95L/FLIPin. Более того, эффективность действия FLIPin была проанализирована для различных соотношений с-FLIP_L и прокаспазы-8. Для этого были оценены значения длины филамента DED и соотношения с-FLIP_L:прокаспаза-8, при которых наблюдалась максимальная активность FLIPin *in silico*. Оказалось, что оптимальное значение длины филамента наблюдается при промежуточном диапазоне уровня экспрессии с-FLIP_L (рис. 4). Увеличение гибели клеток достигало своего пика при соотношении с-FLIP_L:прокаспаза-8, примерно равном 1:3, приводя к увеличению более, чем на 80%, в то время как наивысшая активность каспазы-8 наблюдалась при соотношении 1:2 (с-FLIP_L:прокаспаза-8) и увеличении >140% (рис. 4). Предсказания, полученные на основе модели, пока-

зали, что данные соотношения с-FLIP_L и прокаспазы-8 должны обеспечивать оптимальные соотношения между количеством гомодимеров прокаспазы-8 и гетеродимеров прокаспаза-8/с-FLIP_L, создавая оптимальный ландшафт для эффективного действия FLIPin.

Далее была проведена проверка соответствия предсказаний, сделанных с помощью предложенной модели, известным внутриклеточным системам, в которых проверялось действие FLIPin. Протеомным анализом было показано, что в случае клеток HeLa-CD95 соотношение с-FLIP_L:прокаспаза-8 в комплексе DISC было примерно равно 1:9. Это приводит к относительно низкому уровню гетеродимеров прокаспаза-8/с-FLIP_L [18]. На основе модели было предсказано, что в клетках HeLa-CD95 имеет место относительно низкий вклад гетеродимеров прокаспаза-8/с-FLIP_L в повышение активности каспазы-8. Полученная оценка действительна для всех значений — временных интервалов, включая один час, который соответствует предсказанному максимуму активности CD95 DISC (рис. 3). Соответственно, это приводит к предсказанной *in silico* относительно низкой эффективности действия FLIPin в данной клеточной линии, которое действительно наблюдалось экспериментально [23]. В случае комплекса DISC в клетках HeLa-CD95-FL, которые характеризуются повышенной экспрессией белка с-FLIP_L, протеомный анализ показал соотношение с-FLIP: прокаспаза-8, равное 1:1 [18]. При этом соотношении происходит образование коротких филаментов DED, которые скорее всего в основном состоят из гетеродимеров прокаспаза-8/с-FLIP_L. Интересно, что для данной клеточной линии предсказанный пик активности каспазы-8 соответствует периодам времени, которые превышают рассчитанное время полужизни комплекса DISC, что ограничивает активность FLIPin, которая напрямую связана с максимальной активностью каспазы-8. Другой линией клеток, для которой был проведен количественный протеомный анализ комплекса DISC, была В-лимфобластоидная клеточная линия SKW6.4 [5, 31, 32]. В этой линии клеток действие FLIPin было протестировано, однако, при этом не наблюдалось практически никакого действия со стороны этого соединения (данные не представлены). Это хорошо согласуется со стехиометрией комплекса DISC и филаментов DED в клетках SKW6.4. Последние содержат очень низкие количества с-FLIP_L с таким соотношением к прокаспаза-8, которое очень близко к стехиометрии комплекса DISC в клетках HeLa-CD95, т.е. 1:9 (с-FLIP_L:прокаспаза-8). Кроме того, клетки SKW6.4 характеризу-

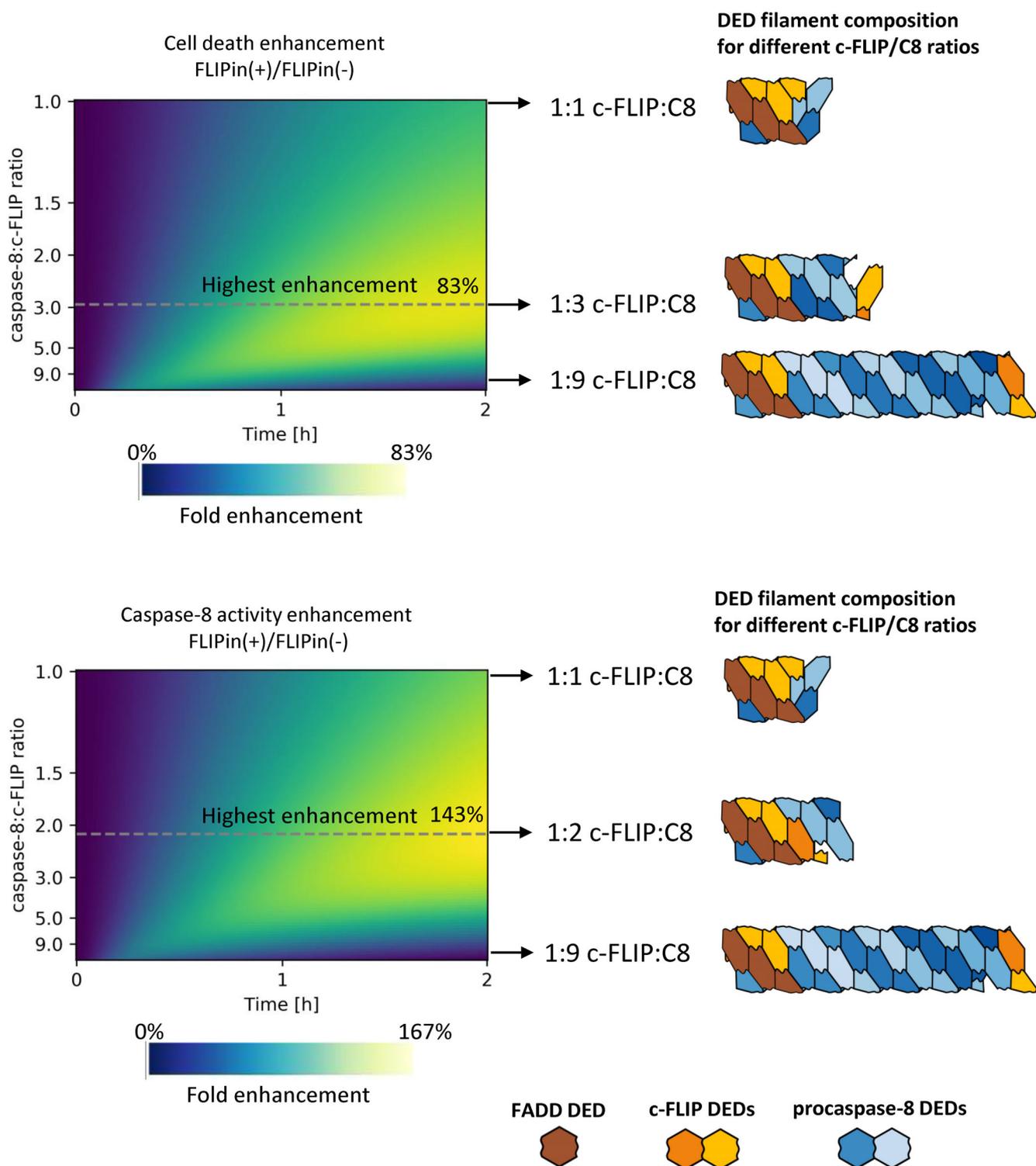


Рис. 4. Относительное усиление гибели клеток (вверху) и повышение активности каспазы-8 (внизу) при различных соотношениях c-FLIP и каспазы-8 в филаменте DED. Градиент интенсивности окрашивания обозначает кратное усиление окрашивания с помощью FLIPin. Филаменты DED, соответствующие наивысшей активности FLIPin, обозначены пунктирной линией. Эффекторные домены смерти (DEDs) белка FADD, прокаспазы-8 и белка c-FLIP показаны соответственно коричневым, синим и оранжевым цветом

ются более быстрой активацией каспазы-8 и индукцией апоптоза в сравнении с клетками HeLa-CD95 и более коротким временем полужизни комплекса DISC, которое, по-видимому, не позволяет детектировать влияние FLIPin на процесс активации каспазы-8. В целом, проведенный анализ хорошо объясняет полученные экспериментальные данные и позволяет предположить проведение скрининга различных типов клеток с целью идентификации клеточных линий, подходящих для наиболее эффективного действия FLIPin.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущей работе для создания малой молекулы (FLIPin), целенаправленно действующей на гетеродимер каспазы-8/c-FLIP_L, нами были применены современные методы компьютерной биологии *in silico* [23]. Было предсказано, что FLIPin будет имитировать стабилизирующий эффект петли L2', находящейся в «закрытой» конформации, который приводит к повышению активности каспазы-8 в комплексе DISC и более эффективной индукции апоптоза. Экспериментальные данные, полученные с оптимизированной малой молекулой FLIPinBy подтвердили предсказанный *in silico* механизм действия этого гетеродимера [23]. В настоящей работе с помощью компьютерного моделирования нами были изучены отдельные параметры, определяющие эффективность действия FLIPin. Нами было показано, что соотношение c-FLIP_L и прокаспазы-8 в филаментах DED является ключевым фактором, определяющим эффективность действия данного соединения. Полученный результат вытекает не только из роли уровня c-FLIP_L в осуществлении контроля соотношения между гомо- и гетеродимерами в комплексе DISC, но он также ассоциирован с ключевой функцией c-FLIP_L в регуляции длины филамента DED.

Соотношения гомо- и гетеродимеров прокаспазы-8 в филаменте DED контролируются рядом факторов. В их число входят уровень внутриклеточной экспрессии белка c-FLIP_L и прокаспазы-8, константы их ассоциации в комплексе DISC и структура филамента DED. Данные факторы связаны между собой нелинейной динамикой, которая может быть проанализирована на количественном уровне с использованием компьютерного моделирования. В настоящей работе была создана компьютерная модель, которая позволила предсказать уровень образующихся гетеродимеров в зависимости от соотношения прокаспазы-8 и c-FLIP_L и от

архитектуры филамента DED. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что уровень гетеродимеров в комплексе DISC является ключевым фактором для проявления активности FLIPin. Кроме того, выяснилось, что существуют дополнительные факторы, контролирующие активность FLIPin, такие как размер филамента DED. Таким образом, с помощью модели была изучена роль структуры филамента DED в способности FLIPin усиливать гибель клеток и активность прокаспазы-8.

Далее обнаружено, что повышение уровня экспрессии белка c-FLIP_L непосредственно влияет на активность соединения FLIPin. Однако это влияние не носило линейный характер, в связи с чем применение метода математического моделирования для изучения данных эффектов представляет большой интерес. В частности, нелинейный характер объясняется множественной ролью белка c-FLIP_L в регуляции активации каспазы-8, а именно его влиянием на длину филамента DED и вкладом гетеродимеров прокаспазы-8/c-FLIP_L в суммарную активность каспазы-8 в комплексе DISC. Например, в клетках HeLa-CD95 имеется только ограниченное количество гетеродимеров прокаспазы-8/c-FLIP_L по сравнению с гомодимерами каспазы-8, что ограничивает влияние FLIPin. Повышение концентрации c-FLIP_L в филаменте DED должно привести к повышению количества гетеродимеров прокаспазы-8/c-FLIP_L и увеличению активности FLIPin. В этой связи с использованием метода масс-спектрометрии было показано, что повышение концентрации белка c-FLIP_L приводит к более эффективной концентрации гетеродимеров прокаспазы-8/c-FLIP_L [18]. Однако данный процесс также ограничивает рост филамента DED, тем самым вызывая значительное снижение количества гомодимеров прокаспазы-8 и оказывая ингибирующее влияние на активность FLIPin. Это хорошо согласуется с экспериментальными данными, такими как не очень значительное повышение активности FLIPin, которое наблюдалось в клетках HeLa-FL при сильном повышении экспрессии c-FLIP_L [23].

Результаты моделирования показали, что уровень белка c-FLIP_L в комплексе DISC, оптимальный для действия FLIPin, находится в диапазоне значений соотношения c-FLIP_L/прокаспазы-8 между 1:9 и 1:1. В случае высокого содержания прокаспазы-8 или низкого уровня экспрессии белка FLIP_L происходит быстрая активация каспазы-8, что выражается в низком вкладе стабилизированных гетеродимеров прокаспазы-8/c-FLIP_L в увеличение активности прокаспазы-8. Напротив, в случае низкого со-

держания каспазы-8 или повышенной экспрессии с-FLIP_L активность FLIPin ограничена короткими филаментами DED, приводя к пониженной активности каспазы-8. Кроме того, с помощью настоящей модели мы предсказываем, что наивысшая активность FLIPin наблюдается тогда, когда соотношение каспаза-8:с-FLIP_L находится в диапазоне от 2:1 до 3:1. Так, при соотношении 2:1 (каспаза-8:с-FLIP_L) наблюдалось наибольшее увеличение скорости гибели клеток, а при соотношении 3:1 наблюдалась наивысшая активность каспазы-8 в DISC. В этой связи следует особо подчеркнуть, что ряд линий раковых клеток характеризуется высоким уровнем белка с-FLIP_L, который близок к количеству белка, предсказанным математической моделью для оптимального действия соединения FLIPin. Это позволяет предположить, что разработка химических соединений на основе FLIPin в целом обладает чрезвычайно высоким терапевтическим потенциалом для разработки методов лечения рака [33].

Модель ОДУ показала, что повышение активности каспазы-8 с помощью FLIPin сразу после стимуляции CD95L способствует индукции апоптоза. Последнее может быть тесным образом связано с высокой скоростью деградации комплекса DISC, которая было описана в работе [10]. Действительно, рассчитанное время полужизни комплекса DISC в клетках HeLa-CD95 равно лишь одному часу [10], в то время как, согласно нашей модели, требуется значительно больше времени, чтобы активировать все молекулы прокаспазы-8 в комплексе DISC. В этой связи наш подход показал, что увеличение времени активности гетеродимера через стабилизирующее влияние FLIPin может послужить многообещающей стратегией для разработки противораковой терапии.

Большинство уже созданных моделей CD95 DISC не учитывают образование филаментов DED и их структуру [27, 34, 35]. Это обеспечивает дополнительное важное направление в будущих исследованиях количественной динамики контроля апоптоза. Настоящее исследование показывает важность правильной стехиометрии и структуры филамента DED для эффективной индукции апоптоза, подчеркивая необходимость детального рассмотрения макромолекулярных комплексов, индуцирующих клеточную гибель, чтобы понять механизмы принятия решений в жизненном цикле клеток.

Представленная в настоящей работе модель может рассматриваться как минимальная модель для описания процессинга прокаспазы-8 в комплексе DISC. Данная модель была проверена с использованием экспериментальных дан-

ных, полученных на клеточной линии HeLa и фиксированной концентрации CD95L. В будущем может быть создана более детальная модель, которая будет учитывать явную динамику образования филамента DED при различной силе стимуляции CD95, а также учитывать пространственные ограничения процесса образования гетеродимеров с-FLIP_L и каспазы-8. Кроме того, из предыдущих работ мы знаем, что низкие или т.н. пороговые концентрации CD95L регулируют длину цепей филаментов DED [5, 26–28]. Важным направлением будущих исследований является детальный анализ влияния на архитектуру филамента DED двух факторов, а именно, стимуляции пороговыми концентрациями CD95L и различных уровней экспрессии с-FLIP в клетке. Кроме того, рассмотрение сложных взаимодействий с-FLIP_L и C-концевых доменов прокаспазы-8 представляет собой важный шаг на пути к количественному пониманию динамики филамента DED. В частности, взаимодействие близкорасположенных молекул DED в филаменте DED вероятно приводит к более эффективной димеризации C-концевых доменов, чем взаимодействие молекул, расположенных на удаленных участках в структуре филамента DED. В то же время стерические препятствия, вероятно, ограничивают активность каспазы-8 в коротких филаментах DED, которые соответствуют стехиометрии 1-2:1:1 для комплекса с-FLIP:прокаспаза-8:FADD. Детальное моделирование процесса сборки филамента DED и ингибирование данного процесса белком с-FLIP позволит выявить связь между уровнем эндогенной экспрессии с-FLIP, стехиометрией DISC и активностью FLIPin.

Таким образом, проведенное исследование показывает важность сочетания методов математического и структурного моделирования и системной фармакологии для определения молекулярных механизмов и разработки более эффективных терапевтических подходов в персонализированной медицине.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (19-54-45015; 18-04-00207) и Российского государственного бюджетного задания (AAAA-A17-117092070032-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит исследований, выполненных с участием авторов, в которых были бы использованы люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krammer, P. H., Arnold, R., and Lavrik, I. N. (2007) Life and death in peripheral T cells, *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 532-542.
2. Lavrik, I. N., and Krammer, P. H. (2012) Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC, *Cell Death Differ.*, **19**, 36-41.
3. Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Zhivotovsky, B., and Lavrik, I. N. (2015) Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 505-517.
4. Dickens, L. S., Boyd, R. S., Jukes-Jones, R., Hughes, M. A., Robinson, G. L., Fairall, L., Schwabe, J. W., Cain, K., and Macfarlane, M. (2012) A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death, *Mol. Cell*, **47**, 291-305.
5. Schleich, K., Warnken, U., Fricker, N., Ozturk, S., Richter, P., Kammerer, K., Schnolzer, M., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2012) Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model, *Mol. Cell*, **47**, 306-319.
6. Fu, T. M., Li, Y., Lu, A., Li, Z., Vajjhala, P. R., Cruz, A. C., Srivastava, D. B., DiMaio, F., Penczek, P. A., Siegel, R. M., et al. (2016) Cryo-EM structure of caspase-8 tandem DED filament reveals assembly and regulation mechanisms of the death-inducing signaling complex, *Mol. Cell*, **64**, 236-250.
7. Hughes, M. A., Harper, N., Butterworth, M., Cain, K., Cohen, G. M., and MacFarlane, M. (2009) Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival, *Mol. Cell*, **35**, 265-279.
8. Yu, J. W., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2009) Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8169-8174.
9. Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex, *J. Biol. Chem.*, **277**, 45162-45171.
10. Kallenberger, S. M., Beaudouin, J., Claus, J., Fischer, C., Sorger, P. K., Legewie, S., and Eils, R. (2014) Intra- and interdimeric caspase-8 self-cleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis, *Sci. Signal.*, **7**, ra23.
11. Golks, A., Brenner, D., Schmitz, I., Watzl, C., Krueger, A., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2006) The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation, *Cell Death Differ.*, **13**, 489-498.
12. Hoffmann, J. C., Pappa, A., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2009) A new C-terminal cleavage product of procaspase-8, p30, defines an alternative pathway of procaspase-8 activation, *Mol. Cell Biol.*, **29**, 4431-4440.
13. Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2003) The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC, *Cell Death Differ.*, **10**, 144-145.
14. Ivanisenko, N. V., and Lavrik, I. N. (2019) Mechanisms of procaspase-8 activation in the extrinsic programmed cell death pathway, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **53**, 830-837.
15. Ozturk, S., Schleich, K., and Lavrik, I. N. (2012) Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): fine-tuners of life and death decisions, *Exp. Cell Res.*, **318**, 1324-1331.
16. Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **280**, 14507-14513.
17. Fricker, N., Beaudouin, J., Richter, P., Eils, R., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2010) Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and anti-apoptotic role of c-FLIPL, *J. Cell Biol.*, **190**, 377-389.
18. Hillert, L. K., Ivanisenko, N. V., Espe, J., Konig, C., Ivanisenko, V. A., Kahne, T., and Lavrik, I. N. (2020) Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly, *Oncogene*, **39**, 1756-1772.
19. Ueffing, N., Keil, E., Freund, C., Kuhne, R., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2008) Mutational analyses of c-FLIPR, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment, *Cell Death Differ.*, **15**, 773-782.
20. Boatright, K. M., Deis, C., Denault, J. B., Sutherlin, D. P., and Salvesen, G. S. (2004) Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L), *Biochem. J.*, **382**, 651-657.
21. Pop, C., Oberst, A., Drag, M., Van Raam, B. J., Riedl, S. J., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2011) FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity, *Biochem. J.*, **433**, 447-457.
22. Hughes, M. A., Powley, I. R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., Schwabe, J. W., Leverkus, M., Cain, K., and MacFarlane, M. (2016) Co-operative and hierarchical binding of c-FLIP and caspase-8: a unified model defines how c-FLIP isoforms differentially control cell fate, *Mol. Cell*, **61**, 834-849.
23. Hillert, L. K., Ivanisenko, N. V., Busse, D., Espe, J., Konig, C., Peltek, S. E., Kolchanov, N. A., Ivanisenko, V. A., and Lavrik, I. N. (2020) Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer, *Cell Death Differ.*, **27**, 2117-2130.
24. Spencer, S. L., and Sorger, P. K. (2011) Measuring and modeling apoptosis in single cells, *Cell*, **144**, 926-939.
25. Flusberg, D. A., and Sorger, P. K. (2015) Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells, *Trends Cell Biol.*, **25**, 446-458.
26. Bentele, M., Lavrik, I., Ulrich, M., Stosser, S., Heermann, D. W., Kalthoff, H., Krammer, P. H., and Eils, R. (2004) Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis, *J. Cell Biol.*, **166**, 839-851.
27. Lavrik, I. N. (2014) Systems biology of death receptor networks: live and let die, *Cell Death Dis.*, **5**, e1259.
28. Schleich, K., and Lavrik, I. N. (2013) Mathematical modeling of apoptosis, *Cell Commun. Signal.*, **11**, 44.
29. Neumann, L., Pforr, C., Beaudouin, J., Pappa, A., Fricker, N., Krammer, P. H., Lavrik, I. N., and Eils, R. (2010) Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells, *Mol. Syst. Biol.*, **6**, 352.
30. Buchbinder, J. H., Pischel, D., Sundmacher, K., Flassig, R. J., and Lavrik, I. N. (2018) Quantitative single cell analysis uncovers the life/death decision in CD95 network. *PLoS Comput. Biol.*, **14**, e1006368.
31. Warnken, U., Schleich, K., Schnolzer, M., and Lavrik, I. (2013) Quantification of high-molecular weight protein platforms by AQUA mass spectrometry as exemplified for the CD95 Death-Inducing Signaling Complex (DISC), *Cells*, **2**, 476-495.
32. Schleich, K., Buchbinder, J. H., Pietkiewicz, S., Kahne, T., Warnken, U., Ozturk, S., Schnolzer, M., Naumann, M., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2016) Molecular architecture of the DED chains at the DISC: regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain, *Cell Death Differ.*, **23**, 681-694.
33. Fulda, S. (2013) Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer, *Expert Opin. Ther. Targets*, **17**, 195-201.

34. Spencer, S. L., Gaudet, S., Albeck, J. G., Burke, J. M., and Sorger, P. K. (2009) Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis, *Nature*, **459**, 428-432.
35. Aldridge, B. B., Gaudet, S., Lauffenburger, D. A., and Sorger, P. K. (2011) Lyapunov exponents and phase diagrams reveal multi-factorial control over TRAIL-induced apoptosis, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 553.

MATHEMATICAL MODELING REVEALS A ROLE FOR THE COMPOSITION OF DED FILAMENTS IN THE EFFECTS OF SMALL MOLECULES TARGETING CASPASE-8/c-FLIP_L HETERODIMER

N. V. Ivanisenko¹ and I. N. Lavrik^{1,2*}

¹ *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: n.ivanisenko@gmail.com*

² *Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Otto von Guericke University Magdeburg, 39106 Magdeburg, Germany; E-mail: ilav3103@gmail.com*

Received July 17, 2020

Revised July 24, 2020

Accepted July 24, 2020

Procaspase-8 activation at the death-inducing signaling complex (DISC) triggers extrinsic apoptotic pathway. Procaspase-8 activation takes place in the death effector domain (DED) filaments and is regulated by c-FLIP proteins, in particular, by the long isoform c-FLIP_L. Recently, the first-in-class chemical probe targeting the caspase-8/c-FLIP_L heterodimer was reported. This rationally designed small molecule, FLIPin, enhances caspase-8 activity after initial heterodimer processing. Here, we used a kinetic mathematical model to gain an insight into the mechanisms of FLIPin action in a complex with DISC, in particular, to unravel the effects of FLIPin at different stoichiometry and composition of the DED filament. Analysis of this model has identified the optimal c-FLIP_L to procaspase-8 ratios in different cellular landscapes favoring the activity of FLIPin. We predicted that the activity FLIPin is regulated via different mechanisms upon c-FLIP_L downregulation or upregulation. Our study demonstrates that a combination of mathematical modeling with system pharmacology allows development of more efficient therapeutic approaches and prediction of optimal treatment strategies.

Keywords: apoptosis, DISC, caspase-8, FLIPin, DED, death receptors