

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՌԱՔԵԼՈՎ ՎԱՀՐԱՄ ԳԱԼՈՒՍԻ

ԽՈԶԵՐԻ ԱՖՐԻԿՅԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ՎԻՐՈՒՄԻ ԱՐԳԵԼԱԿՄԱՆ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ  
ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա, կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման  
ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2020

---

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АРАКЕЛОВ ВАГРАМ ГАЛУСТОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИНГИБИРОВАНИЯ ВИРУСА  
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.00.02 – Биофизика, биоинформатика

ЕРЕВАН – 2020

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

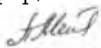
Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր, Կ. Բ. Նազարյան  
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ Ա. Պ. Անտոնյան  
կենս. գիտ. թեկնածու, Հ. Ռ. Ավագյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Միջազգային գիտակրթական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2020թ. հուլիսի 21-ին ժամը 12<sup>00</sup>-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՎ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2020թ. հունիսի 9-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ  Մ.Ա. Փարսադանյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете.


Научный руководитель: доктор биол. наук, К. Б. Назарян  
Официальные оппоненты: доктор биол. наук, доцент А. П. Антонян  
кандидат биол. наук, Г. Р. Авагян

Ведущая организация: Международный научно-образовательный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 21-го июля 2020г. в 12.00 часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 9-го июня 2020г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,  
кандидат биол. наук, доцент  М.А. Парсаданян

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Вирус африканской чумы свиней (ВАЧС) является этиологическим агентом африканской чумы свиней (АЧС) - смертельное заболевание домашних и диких свиней. АЧС имеет значительные последствия на отрасли свиноводства в пострадавших странах, включая Армению. Первая вспышка АЧС в Армении была зарегистрирована в 2007 году, что привело к снижению поголовья свиней более чем на 50%. У свиней, инфицированных высоковирулентным штаммом ВАЧС, развивается геморрагическая лихорадка с высокой летальностью, достигающей до 100% [Karalova et al. 2015, Sargsyan et al. 2018]. Первые случаи болезни с симптомами АЧС были зафиксированы Хатченом в 1903 г., которые наблюдались среди свиней в странах Южной Африки (Кения, Ангола, Мозамбик и др.), откуда болезнь распространилась в страны Евразии и далее по всему миру.

Против вируса АЧС по сей день нет ни вакцин, ни противовирусных препаратов, доступных для профилактики или лечения этого заболевания. Контроль ВАЧС опирается на быструю лабораторную диагностику и реализацию строгих санитарных мер, таких как отбор всех зараженных и восприимчивых животных, ограничение передвижения зараженных особей и уведомление свиноферм о наличии вирусного заболевания для принятия мер [Health et al. 2014].

Однако, известны ферменты, играющие ключевую роль в процессах репарации и репликации ДНК вируса, которые могут послужить хорошими кандидатами для антивирусного скрининга. Ингибирование даже одной из этих мишеней может привести к нарушению молекулярных механизмов репликации и/или репарации ВАЧС и привести к полному ингибированию АЧС.

Ген O174L вируса АЧС кодирует белок ДНК Полимеразу X (ASFV-PolX), чья трехмерная структура экспериментально изучена [Wu et al. 2014, Chen et al. 2017]. ASFV-PolX состоит из 174 аминокислот и представлена двумя доменами: Palm и Thumb. ASFV-PolX принимает участие в процессе репарации поврежденной ДНК вируса, путем замещения однонуклеотидных пробелов. Делеции в гене O174L приводят к значительному нарушению роста вируса в клетках макрофагов свиней [Chen et al. 2017].

Второй потенциальной вирусной мишенью для терапевтического воздействия против вируса АЧС является ДНК-топоизомера типа II ВАЧС (ASFV-TOPOII). ВАЧС единственный известный вирус, который заражает млекопитающих и кодирует ASFV-TOPOII (ORF P1192R) [Coelho et al. 2015]. Филогенетические исследования показали, что этот вирусный белок не образует кластеров с клеточными топоизомеразами [Gadelle et al. 2003] и имеет гомологию с бактериальными ДНК-гиразами и топоизомеразой IV [August et al. 1994], что повышает возможность ее использования в качестве мишени и последующего ингибирования этого белка с помощью специфических препаратов взаимодействующих с топоизомеразой/гиразой. Известно, что ферменты ДНК-топоизомеразы типа II модулируют топологическое состояние ДНК АТФ-зависимым способом, тем самым выполняя ключевую роль в транскрипции и репликации ДНК [Dglics et al. 2009, Nitiss 2009].

ВАЧС - это крупный ДНК-вирус, который собирается на перинуклеарных вирусных фабриках, расположенных рядом с центром организации микротрубочек. Микротрубочки, играют важную роль в распространении, развитии и миграции вирусных фабрик или органелл репликации вируса [Jouvenet et al. 2004]. Поскольку транспорт ВАЧС к клеточной поверхности зависит от микротрубочек, ингибиторы полимеризации тубулина способны подавлять высвобождение ВАЧС из клеток. Было показано, например, что флавоноид

апигенин взаимодействует в сайте связывания колхицина, приводя к ингибированию полимеризации тубулина [Choudhury et al. 2013]. Исходя из этого структура комплекса  $\alpha$ -Тубулина также может быть использована в качестве мишени для последующего ингибирования.

Таким образом, вышеуказанные вирусные мишени могут быть использованы для разработки лекарственных препаратов против ВАЧС, препятствуя его возможности репарации, репликации и дальнейшего распространения.

Флавоноиды принадлежат к классу полифенольных соединений растительного происхождения, являющиеся биологически активными соединениями, некоторые из них проявляют противовирусную активность. На основе флавоноидов возможно создание новых высокоактивных лекарственных препаратов, которые обладали бы противовирусной активностью в отношении различных вирусов [Johari et al. 2012, Romano et al. 2013].

*In silico* методы, в частности, виртуальный скрининг, молекулярный докинг и моделирование молекулярной динамики взаимодействия, могут быть использованы в качестве эффективного и малозатратного первичного скрининга множества флавоноидов и их производных для идентификации их противовирусной активности против ВАЧС, с дальнейшим тестированием наилучших кандидатов в *in vitro* экспериментах. Важность *in silico* методов для конструирования новых лекарственных препаратов неоспорима – структура практически всех новых лекарств, появившихся в последние годы, прошли через стадию *in silico* экспериментов.

#### Цель и задачи исследования

Цель диссертационной работы - поиск потенциальных лекарственных препаратов на основе полифенольных соединений для лечения Африканской чумы свиней.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

- Провести молекулярное моделирование и валидацию третичной структуры ASFV-ТОРОИ.
- Провести моделирование молекулярной динамики ASFV-PoIX и ASFV-ТОРОИ для изучения их возможных конформаций и последующего использования последних в экспериментах по виртуальному скринингу лигандов.
- Осуществить 4D докинг третичных структур ASFV-PoIX и ASFV-ТОРОИ с эндогенными лигандами (dGTP, АТФ), для определения их сайтов взаимодействия и последующего ингибирования этих сайтов взаимодействия.
- Провести поиск структур всех доступных флавоноидов и их аналогов для создания библиотеки тестируемых соединений.
- Провести виртуальный скрининг и молекулярный 4D докинг этих соединений с ASFV-PoIX и ASFV-ТОРОИ.
- Провести ряд симуляций молекулярной динамики взаимодействия отобранных соединений с ASFV-PoIX и ASFV-ТОРОИ, для определения основных сайтов и энергии связывания, анализа физико-химических параметров и особенностей взаимодействия.
- Осуществить 4D докинг и молекулярную динамику взаимодействия тубулина с генкванином в сайте связывания с колхицином, определить наличие корреляции с *in vitro* экспериментами. Определить сайты связывания, значение энергетических показателей, для последующего использования генкванина в качестве ингибитора ВАЧС.

#### Научная новизна и научно-практическая значимость работы

- Впервые была получена компьютерная модель полной третичной структуры ASFV-ТОРОИ.

- ♦ Была создана обширная библиотека флавоноидов и их производных, состоящая из 115854 соединений, которые могут быть использованы для скрининга.
- С помощью *in silico* экспериментов был выявлен ряд полифенольных соединений, обладающих ингибирующим воздействием на ASFV-PolX и ASFV-TOPOII, дальнейшее *in vitro* тестирование которых позволит предложить терапевтические препараты для лечения АЧС.
- ♦ Антивирусная активность некоторых соединений, была проверена с помощью *in vitro* экспериментов.
- Была подтверждена антивирусная активность флавоноида генкванина против ВАЧС.
- ♦ В результате указанных экспериментов получены данные, свидетельствующие в пользу применимости *in silico* экспериментов для изучения антивирусной активности полифенольных соединений на третичную структуру белков, вовлеченных в процессы жизненного цикла вирусов.

Полученные в нашей работе результаты открывают новые возможности для дальнейших *in vitro* и *in vivo* исследований в данной области. Результаты работы могут быть использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, ЕГМУ, РАУ, а также в научных лабораториях, занимающихся исследованием различных вирусных заболеваний и механизмов их лечения.

Апробация работы: Материалы диссертационной работа были доложены на международных и республиканских конференциях: XII и XIII Годичной научной конференции Российско-Армянского Университета (2017г., 2018г.); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017» и «Ломоносов-2018» (Москва, Россия), в 2017 году доклад был высоко оценен экспертным советом и победил в номинации “Лучший устный доклад”; На Международной летней школе по моделированию лекарств EUROFIN (Австрия, Вена 2019г.); На курсах лекций FEBS 2019: Современные достижения в области патогенных исследований (Армения, Ереван 2019г.), а также на семинарах и заседаниях лаборатории Компьютерного моделирования биологических процессов Института молекулярной биологии НАН РА и кафедры Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии РАУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ (3 статьи и 4 тезисов).

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 150 страницах, содержит 58 рисунков. Библиография включает 188 наименований литературных источников. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы и приложения, которое включает 7 таблиц.

## **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В обзоре литературы приводятся: общие сведения, описание и характеристика эпидемиологии ВАЧС, рассматриваются потенциальные мишени и химические соединения для ингибирования ВАЧС.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа выполнена на кафедре Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии РАУ и в лаборатории Компьютерного моделирования биологических процессов Института молекулярной биологии НАН РА.

Молекулярное моделирование третичной структуры белка и валидация полученной модели. Для моделирования третичной структуры ASFV-ТОПОИ была использована аминокислотная последовательность белка (UniProtKB ID: Q00942). Начальное моделирование было осуществлено с помощью онлайн сервера I-TASSER. Из 5 моделей ASFV-ТОПОИ предложенных сервером I-TASSER, в качестве наилучшей была выбрана модель структуры, которая имела наилучшее разрешение исходя из критериев оценки I-TASSER. Улучшение и оптимизация полученной ранее модели было осуществлено с помощью программного пакета ICM-PRO. Гомологическое моделирование третичной структуры ASFV-ТОПОИ проводилось с использованием макроса построения полной модели ICM (Full Model Builder) с параметром полного уточнения модели в силовом поле ICM [Abagyan et al. 1997, Arnautova et al. 2011]. После моделирования третичной структуры ASFV-ТОПОИ был проведен белок-белковый докинг мономера ASFV-ТОПОИ с самим собой для получения гомодимерного комплекса. Докинг был осуществлен с использованием метода быстрого преобразования Фурье [Totrov et al. 1997]. Белок-белковый докинг мономеров ASFV-ТОПОИ был повторен 10 раз с помощью программного пакета ICM-PRO с последующей процедурой уточнения наилучшей полученной модели. Для определения точности полученной модели использовалась программа PROCHECK [Laskowski et al. 1996].

Молекулярная динамика. Моделирование молекулярной динамики ASFV-PoIX, ASFV-ТОПОИ и комплекса  $\alpha$ -Тубулина было осуществлено с помощью программы AMBER18. Моделирование всех систем проводилось в силовом поле ff14SB, которое используется для белковых молекул [Maier et al. 2015]. Было использовано силовое поле GAFF (general AMBER force field), которое предоставляет параметры для органических молекул и малых молекулярных лигандов [Sprenger et al. 2015]. В подготовке параметров лигандов была использована программа antechamber [Wang et al. 2006]. Во время моделирования системы ASFV-PoIX в комплексе с лигандами было использовано силовое поле OL15, которое содержит параметры нуклеиновых кислот [Galindo-Murillo et al. 2016]. Все симуляции молекулярной динамики были проведены с явным учетом водного окружения. Силовые параметры молекул воды были выбраны согласно модели TIP3P. Был выбран периодический бокс с формой усеченного октаэдра. Соблюдалась температура равная 312.15 K.

До проведения моделирования молекулярной динамики полученные системы были подвергнуты процессу минимизации энергии, при фиксированном положении координат атомов белков и ионов  $Mg^{2+}$ , которые являются кофакторами, а в случае систем, в которых присутствовали лиганды, фиксированным были так же и лиганды. Этот шаг привел к упорядочиванию атомарных взаимодействий, что привело к равномерному распределению молекул воды, хлора и натрия. Далее был выполнен короткий разогрев системы при температуре 312.15K и при постоянном давлении, также, как и до этого шага было фиксированное положение координат атомов белка, кофакторов и лигандов. Разогрев системы длился 20 фс. Далее последовал шаг минимизации энергии для всей системы. После минимизации всей системы следующим этапом был, разогрев всей системы без ограничений, система была разогрета до температуры 312.15K, при постоянном давлении с продолжительностью моделирования равным 1 нс. Далее было проведено моделирование при постоянном давлении продолжительность которого составил 2 нс. После выше сказанного была проведена эквilibрация системы, в которой температура моделируемой системы была 312.15K при нормальном давлении и с продолжительностью равной 30 нс, что было достаточно для достижения равновесного состояния в моделируемых системах.

После завершения эквilibрации было проведено молекулярное моделирование динамики всех четырех систем. В экспериментах был установлен шаг моделирования (leap-frog) в 2 фс. Температура моделируемой системы была 312.15K при нормальном давлении. Время моделирования в проведенных экспериментах составляло 100 нс, что было достаточно для достижения равновесного состояния в моделируемых системах.

После завершения всех стадий ВСЛ и фильтрации результатов, лиганды которые показали наилучшие результаты были выбраны для МД симуляций. Во время МД симуляций наилучших лигандов были соблюдены все вышеуказанные процедуры без изменения.

Подготовка библиотеки соединений. Поиск флавоноидов и их аналогов был проведен в базе данных MolCart компании MolSoft. Кроме базы данных MolCart были использованы следующие базы данных: DrugBank, EnamineREAL, Indofine, SuperDrug2, Metabolomics и Phenol-Explorer. Поиск осуществлялся по основной химической структуре всех классов и подклассов флавоноидов с помощью субструктурного метода поиска и сохранностью членства колец. В библиотеку соединений так же были добавлены соединения, которые являются известными ингибиторами ДНК Полимераз и ДНК Топоизомераз.

В рамках коллаборации Лаборатория синтеза психоактивных соединений, Института Тонкой Органической Химии НАН РА предоставила 4751 химическое соединение, они так же были добавлены в библиотеку соединений.

Все химические соединения были собраны в одну библиотеку и были удалены все дубликации.

Виртуальный скрининг и докинг. Для проведения 4D докинга в случае ASFV-PolX нами были использованы экспериментально изученные нативные третичные структуры ASFV-PolX (PDB ID: 5HRI и 5HRL) и третичные структуры ASFV-PolX полученные после МД симуляций репрезентативные структуры которых были выбраны с помощью кластеризации. Общее количество использованных конформаций составило 10. Все конформации были суперимпозированы по отношению к главной конформации в роле, которой выступала третичная структура ASFV-PolX полученная с помощью PCA (PDB ID: 5HRI). После анализа всех экспериментально изученных структур комплекса ASFV-PolX-dGTP, 39 аминокислот и 2 иона  $Mg^{2+}$ , которые окружали dGTP, были выбраны в качестве предполагаемых сайтов взаимодействия. Далее был выделен регион ASFV-PolX содержащий данные сайты, взаимодействие за пределами которого не рассматривалось.

В случае 4D докинга ASFV-ТОПОII были использованы конформации полученные после моделирования по гомологии. В выборку вошли мономеры гомодимерного комплекса ASFV-ТОПОII по отдельности: конформация, которая взаимодействует с натуральным лигандом, конформация, которая взаимодействует с генистеином, конформации мономеров гомодимерного комплекса, подверженного минимизации энергии с 2 и 3 ионами  $Mg^{2+}$ , мономеры гомодимерного комплекса подверженных оптимизации с помощью программного пакета ICM и последующей минимизации энергии с 2 и 3 ионами  $Mg^{2+}$ , которые были подвержены минимизации энергии по отдельности. Так же в систему были добавлены третичные структуры ASFV-ТОПОII, полученные после МД симуляций, репрезентативные структуры которых были выбраны с помощью кластеризации. Общее количество использованных конформаций составляло 17, из которых 10 получено с помощью моделирования по гомологии и 7 репрезентативных конформаций, полученных после кластеризации. Все конформации были суперимпозированы.

После докинг анализа ASFV-ТОПОII с АТФ, 29 аминокислот и ион  $Mg^{2+}$ , которые окружали АТФ, были выбраны в качестве предполагаемых сайтов взаимодействия. Далее

был выделен регион ASFV-ТОПОII содержащий данные сайты, взаимодействие за пределами которого не рассматривалось.

Во время проведения 4D докинга генкванина с комплексом  $\alpha\beta$ -Тубулина, были использованы все экспериментально изученные структуры тубулина (PDB ID: 4O2A, 4X1K, 4YJ2, 5C8Y, 5CA0, 5CA1, 5CB4, 5GON, 5H7O, 5JCB, 5JVD, 5LYI, 5OSK, 5OV7, 5XAF, 5XHC, 5XI7, 5XLT, 5XLZ, 5YL4, 3RYC, 5JQG, 5LOV, 3UT5, 4X1Y, 5EYP, 5LP6, 5M7E, 5M7G, 5M8D, 5M8G, 5NG1, 5O7A, 4EB6). Все структуры были суперимпозированы по отношению к главной конформации в роли, которой выступала третичная структура комплекса  $\alpha\beta$ -Тубулина полученная с помощью PCA (PDB ID: 4O2A). Далее были выбрана 41 аминокислота, из которых 8 аминокислот входят в состав  $\beta$ -Тубулина и создают пакет взаимодействия комплекса  $\alpha\beta$ -Тубулина с колхицином (известный ингибитор комплексообразования тубулина).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Библиотека флавоноидов и их производных. Исходя из вышеуказанных критериев поиска флавоноидов и их производных было отобрано следующее количество соединений: 83149 из базы данных MolCart, 43343 из базы данных Enamine REAL, 14828 из базы данных INDOFINE, 118 из базы данных DrugBank, 36 из базы данных Superdrug. Следует отметить, что все соединения, которые были отобраны из баз данных MolCart и Enamine REAL являются имеющимися в свободной продаже, реальными химическими соединениями. Также была использована вся база данных Metabolomics (6850 соединений) и Phenol-Exploere (523 соединения). Кроме того, был осуществлен поиск известных ингибиторов ДНК Топоизомераз и ДНК Полимераз, в результате которого из базы данных ChemDiv было отобрано 5904 соединения, а из базы данных DrugBank 50 соединений. Ко всем вышеперечисленным соединениям было добавлено 4751 соединений, которые были синтезированы Лабораторией синтеза психоактивных соединений Института Тонкой Органической Химии НАН РА. Все вышеперечисленные библиотеки химических соединений были объединены и из них были удалены дубликаты. Использование вышеуказанных баз данных привело к тому, что в конечной библиотеке соединений, кроме флавоноидов содержались также и другие полифенольные соединения (н.п. фенольные кислоты, стебеноиды и другие полифенолы). Конечная библиотека содержала 115854 соединений

Моделирование третичной структуры ASFV-ТОПОII. Начальная модель третичной структуры мономера ASFV-ТОПОII была получена с помощью сервера I-TASSER (Рисунок 1А). Данная модель была улучшена и оптимизирована с использованием программного пакета ICM-PRO. После чего был проведен процесс верификации модели третичной структуры ASFV-ТОПОII, который был проведен путем оценки степени стереохимической корректности. Была проведена проверка распределения торсионных углов поворота основной цепи  $\phi$  и  $\psi$ , которая является основным индексом стереохимической корректности белков. Результат проверки был визуализирован в виде карты Рамачандрана (Рисунок 1Б). Анализ карты показал, что 885 (74%) аминокислот модели ASFV-ТОПОII располагаются в наиболее благоприятных регионах карты, в разрешенных областях 234 (19%), 45 (3%) в менее допустимых регионах и только 28 (2%) были расположены в недопустимых областях карты. Таким образом, 1164 (98%) аминокислот модели ASFV-ТОПОII локализованы в допустимых областях карты Рамачандрана, что является хорошей оценкой качества стереохимической корректности полученной структуры, так как экспериментально было установлено, что, если в



допустимых областях располагается больше 90% аминокислот белка, то третичная структура является стереохимически корректной.

Так как ASFV-ТОПОII имеет два иона  $Mg^{2+}$  в качестве кофактора на каждой субъединице мономера, был проведен докинг двух ионов  $Mg^{2+}$  с полученной моделью ASFV-ТОПОII. В качестве сайтов взаимодействия были выбраны сайты  $Mg^{2+}$ -I (ILE438, PHE539) и  $Mg^{2+}$ -II (PHE541, PHE539). Вовремя докинга радикалы выбранных аминокислот были гибкими. Результаты докинга двух ионов  $Mg^{2+}$  показаны на Рисунке 1Г. После получения модели третичной структуры ASFV-ТОПОII в комплексе с двумя ионами  $Mg^{2+}$  был проведен белок-белковый докинг полученной модели с самой собой для получения гомодимерного комплекса. В качестве возможных сайтов взаимодействия были выбраны все аминокислоты ASFV-ТОПОII. Кристаллическая структура димера ДНК топоизомеразы II из *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 4GFH) была использована в качестве объекта для оценки точности. В результате белок-белкового докинга было получено 100000 моделей димерной структуры ASFV-ТОПОII. В качестве лучшей была выбрана модель с наименьшей энергией взаимодействия (-106,1 ккал/моль) и наименьшим значением RMSD (8.974Å) по сравнению с структурой 4GFH. Наилучшая структура полученной модели димера ASFV-ТОПОII в комплексе с четырьмя ионами  $Mg^{2+}$  была сольватирована в воде. После этого систему нейтрализовали ионами  $Cl^-$ ,  $Na^+$  и  $Mg^{2+}$  в концентрации 150 мМ. Размер полученной системы составлял 101611 атомов (19158 - ASFV-ТОПОII-А, 19158 - ASFV-ТОПОII-В, 63138 -  $H_2O$ , 57 -  $Na^+$ , 95 -  $Cl^-$ , 5 -  $Mg^{2+}$ ).

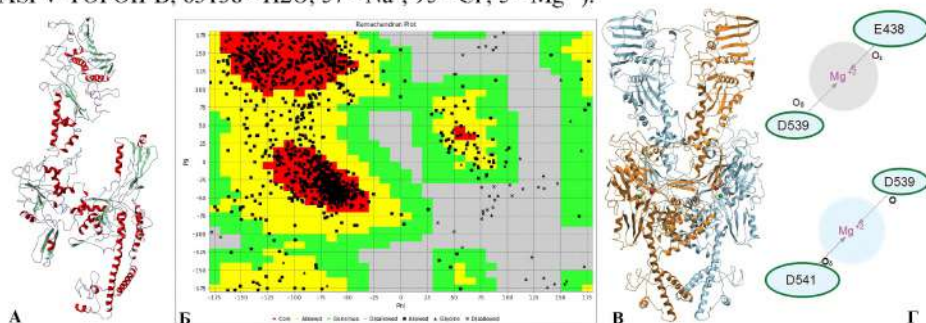


Рисунок 1.

А - Первичная модель ASFV-ТОПОII полученная с помощью I-TASSER.

Б - Карта Рамачандрана. Красные области - наиболее благоприятные регионы, желтые - разрешенные регионы, зеленые - менее допустимые регионы, серые - недопустимые регионы.

В - Структура модели димера ASFV-ТОПОII.

Г - 2D-график сайтов взаимодействия  $Mg^{2+}$  (подробное описание указано в тексте).

Полученная система была подвергнута минимизации энергии с использованием алгоритмов SD (30000 шагов) и ABNR (60000 шагов). Энергия полученной системы составила -193785 ккал/моль. Окончательная модель димера ASFV-ТОПОII представлена на Рисунке 1В.

Докинг ДНК-Топоизомеразы-II с АТФ. Был проведен гибкий докинг полученной димерной модели ASFV-ТОПОII с АТФ. На основании того факта, что все члены семейства ДНК-топоизомеразы II являются высоко-консервативными белками с известными сайтами взаимодействия, сайты взаимодействия для ASFV-ТОПОII были определены по сходству ее аминокислотной последовательности с другими гомологичными белками (UniProtKB

ID: Q00942). В результате чего были определены следующие сайты взаимодействия ASFV-ТОПОII с АТФ: ASN64, ASP67, HIE68, ARG70, ALA71, ASN95, PRO98, GLY99, ILE100, ALA122, GLY129, THR130, ASN131, ASN133, ALA135, LYS136, ASP137, LYS140, GLY142, THR143, ASN144, GLY145, VAL146, GLY147, LEU148, LYS149, GLN366, ARG367 и LYS368.

Структура АТФ получена из базы данных MolCart. Показано, что в нейтральном растворе АТФ существует главным образом в виде АТФ<sup>4-</sup> в комплексе с Mg<sup>2+</sup> ([АТФ-Mg]<sup>2-</sup>) [Alberty et al. 1992, Вах et al. 2017]. Для каждой субъединицы димера ASFV-ТОПОII был добавлен третий ион Mg<sup>2+</sup> в сайт связывания АТФ. Локализацию третьего иона Mg<sup>2+</sup> определяли путем наложения структуры модели димера ASFV-ТОПОII со структурой 4GFH, которая в сайте связывания АТФ имеет ANP (негидролизуемый аналог АТФ) в комплексе с Mg<sup>2+</sup>.

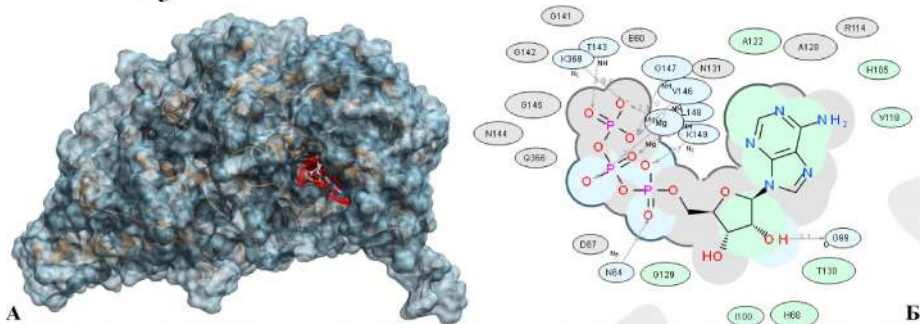


Рисунок 2. Взаимодействие ASFV-ТОПОII с АТФ<sup>4-</sup>.

А - Локализация АТФ<sup>4-</sup> в кармане взаимодействия АТФ-связывающего домена ASFV-ТОПОII.

Б - 2D диаграмма сайтов взаимодействия (подробное описание указано в тексте).

В ходе проведения гибкого докинга АТФ<sup>4-</sup> все аминокислоты сайта связывания АТФ (29 аминокислот и ион Mg<sup>2+</sup> были выбраны в качестве возможных сайтов взаимодействия. Радикалы выбранных аминокислот были гибкими. В результате 300 независимых экспериментов докинга были получены 3000 моделей взаимодействия [АТФ-Mg]<sup>2-</sup> с димером ASFV-ТОПОII. Основываясь на наименьшем значении ICM и визуальном анализе, выбрана лучшая модель. В результате анализа результатов гибкого докинга было установлено, что АТФ<sup>4-</sup> взаимодействует с Mg<sup>2+</sup> и образует 8 водородных связей с АТФ-связывающим доменом ASFV-ТОПОII. Все изученные сайты взаимодействия АТФ<sup>4-</sup> с ASFV-ТОПОII - ASN64, GLY99, THR143, VAL146, GLY147, LEU148, LYS149 и LYS368 являются необходимыми аминокислотами для взаимодействия ASFV-ТОПОII с АТФ (Рисунок 2).

Докинг ДНК-Топоизомеразы-II с генистеином. Для проверки корректности, полученной нами димерной модели ASFV-ТОПОII, был проведен ее гибкий докинг с генистеином, который показал ингибирующую активность [Arabyan et al. 2018]. Кроме того, с помощью *in vitro* экспериментов была показана противовирусная активность генистеина против ВАЧС. Для верификации возможности взаимодействия генистеина с ASFV-ТОПОII, были проведены *in silico* эксперименты. Структура генистеина была получена из базы данных MolCart. При проведении гибкого докинга генистеина все аминокислоты сайта связывания АТФ (29 аминокислот) были выбраны в качестве

возможных сайтов взаимодействия. В результате 300 независимых экспериментов докинга были получены 3000 моделей взаимодействия генистеина с димером ASFV-TOPOII. Из которых была выбрана лучшая модель, которая представлена на Рисунке 3. В результате анализа результатов было установлено, что генистеин образует 4 водородных связи с АТФ-связывающим доменом ASFV-TOPOII. Все изученные сайты взаимодействия генистеина с ASFV-TOPOII - ASN144, VAL146, GLY147 и LEU148 являются необходимыми аминокислотами для взаимодействия ASFV-TOPOII с АТФ (Рисунок 3).

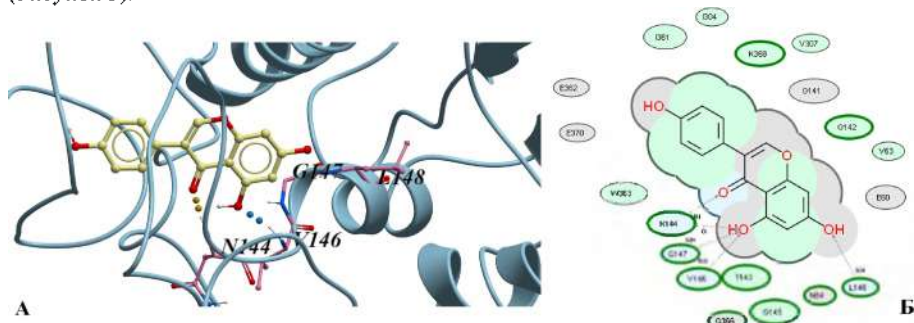


Рисунок 3. Взаимодействие ASFV-TOPOII с генистеином.

А - Локализация генистеина в кармане взаимодействия АТФ-связывающего домена ASFV-TOPOII.

Б - 2D диаграмма сайтов взаимодействия (подробное описание указано в тексте).

Расчеты энергии взаимодействия показали, что генистеин взаимодействует с большей энергией взаимодействия с АТФ-связывающим доменом ASFV-TOPOII (-4,62 ккал/моль) по сравнению с  $ATP^{4-}$  (-3,02 ккал/моль), что позволяет предположить, что генистеин может эффективно конкурировать с  $ATP^{4-}$  за сайт взаимодействия.

Исходя из аналогичных результатов, проведенных *in silico* и *in vitro* экспериментов, полученная модель ASFV-TOPOII может быть использована в качестве мишени для проведения виртуального скрининга лигандов с целью ингибирования ВАЧС [Arabyan et al. 2018].

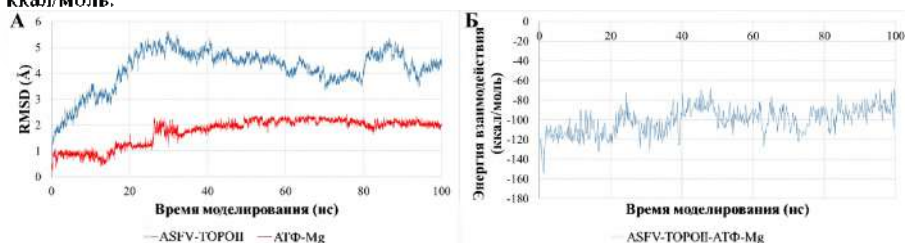
**Моделирование молекулярной динамики взаимодействия ASFV-TOPOII с АТФ.** Было проведено моделирование молекулярной динамики взаимодействия АТФ-связывающего домена ASFV-TOPOII с АТФ. В качестве начальной ориентации расположения АТФ по отношению к ASFV-TOPOII был использован комплекс АТФ-связывающего домена ASFV-TOPOII с АТФ, полученный в результате гибкого докинга. Время симуляции составляло 100 нс, с шагом моделирования 2фс.

В результате анализа траекторий молекулярной динамики взаимодействия было установлено, что на протяжении 100 нс (5000 траекторий) образовывалось 108 водородных связей между АТФ и ASFV-TOPOII. АТФ образовывал 21 водородных связей в более чем 5% траекторий, из которых 16 водородных связей образовывались в более чем 10% траекторий: водородная связь между атомом O11 из АТФ и атомами N-H из GLY147 (АТФ@O11-GLY\_147@N-H) образовывалась на протяжении 4932 траекторий (98,64%); АТФ@O13-THR\_143@N-H - на протяжении 4689 траекторий (93,78%); АТФ@O13-ASN\_144@N-H - 4677 (93,54%); АТФ@O11-VAL\_146@N-H - 4464 (89,28%); АТФ@O9-ASN\_131@ND2-HD21 - 3762 (75,24%); АТФ@O8-ASN\_64@ND2-HD22 - 2564 (51,28%);

АТФ@O13-GLY 145@N-H - 2538 (50,76%); АТФ@O9-ASN\_64@ND2-HD22 - 1815 (36,30%); АТФ@O8-LEU\_148@N-H - 1440 (28,80%); АТФ@O12-LYS 368@NZ-HZ2 - 917 (18,34%); АТФ@O12-LYS 368@NZ-HZ1 - 812 (16,24%); АТФ@O12-LYS 368@NZ-HZ3 - 733 (14,66%); АТФ@O11-GLN 366@NE2-HE22 - 710 (14,20%); ASP 67@OD2-АТФ@O2-H8 - 617 (12,34%); АТФ@N4-ARG\_70@NH1-HH12 - 566 (11,32%); АТФ@N4-LYS 149@NZ-HZ3 - 507 (10,14%).

На Рисунке 4А показаны колебания RMSD основной цепи третичной структуры АТФ-связывающего домена ASFV-ТОРОII и атомов АТФ на протяжении моделирования молекулярной динамики взаимодействия.

На Рисунке 4Б показан график колебания энергии взаимодействия АТФ с ASFV-ТОРОII, из которого следует, что взаимодействие АТФ с ASFV-ТОРОII выходит на плато через 50 нс, после чего колебание энергии взаимодействия АТФ с ASFV-ТОРОII происходило в стационарном режиме. Средняя энергия взаимодействия (Эср) АТФ с ASFV-ТОРОII равнялась -100,44 ккал/моль, а минимальная (Эмин) была равна -154,8 ккал/моль.



**Рисунок 4.** Анализ молекулярной динамики взаимодействия ASFV-ТОРОII с АТФ.  
**А** - RMSD в качестве функции времени моделирования.  
**Б** - Энергия взаимодействия в качестве функции времени моделирования.

После осуществления моделирования молекулярной динамики взаимодействия АТФ-связывающего домена ASFV-ТОРОII с АТФ, был проведен кластерный анализ полученной траектории, состоящей из 5000 конформаций. Кластерный анализ был проведен на основании значений RMSD между всеми траекториями для вышеуказанных 29 обязательных аминокислот, образующих сайт взаимодействия ASFV-ТОРОII с АТФ. В результате кластерного анализа было выявлено 3 кластера, репрезентативные структуры которых были использованы (с целью симуляции гибкости структуры АТФ-связывающего домена ASFV-ТОРОII) далее для проведения 4D докинга и виртуального скрининга лигандов.

В соответствии с вышеописанным протоколом также было проведено моделирование молекулярной динамики взаимодействия АТФ-связывающего домена ASFV-ТОРОII без АТФ. В результате кластерного анализа полученной траектории было выявлено 4 кластера, репрезентативные структуры которых также были использованы для проведения 4D докинга и виртуального скрининга лигандов.

Виртуальный скрининг флавоноидов и их производных с ASFV-ТОРОII. Был осуществлен 4D докинг и виртуальный скрининг, созданной ранее библиотеки соединений. Все полученные ранее репрезентативные структуры АТФ-связывающего домена ASFV-ТОРОII были суперимпозированы по отношению к главному объекту, которой являлась ранее полученная третичная структура ASFV-ТОРОII. Наличие и

использование множества конформаций ASFV-ТОПОII, полученных как из кластерного анализа, так и смоделированных, симулировало гибкость структуры ASFV-ТОПОII.

Из 115854 соединений, 4585 показали хорошие результаты с оценкой докинга ICM равной или меньше -32, что считается минимальной допустимой оценкой докинга в программе ICM-PRO [Bottegoni et al. 2009]. Для данных соединений эксперименты виртуального скрининга и 4D докинга были независимо повторены 10 раз. После чего были отобраны те соединения, которые в результате 11 независимых экспериментов виртуального скрининга и 4D докинга имели оценку докинга равной или меньше допустимого в результате всех 11 экспериментов, всего 330 соединений. Из них были выбраны 10 наилучших соединений исходя из среднего значения оценки докинга. Все 10 выбранных соединений (IX\_132, IX\_1145, IX\_268, IX\_1476, IX\_639, IX\_441, IX\_125, IX\_251, IX\_200, IX\_523) были локализованы в сайте взаимодействия АТФ и имеются в свободной продаже (имеют вендор), что упростит их дальнейшее *in vitro* тестирование на противовирусную активность против ВАЧС.

Несмотря на то, что химические соединения (IX\_2378, IX\_3641, IX\_2802, IX\_2320, IX\_3991, IX\_1945, IX\_3352, IX\_2337, IX\_3240, IX\_2235), предоставленные в рамках коллаборации с Лабораторией Синтеза Психоактивных Соединений ИТОХ НАН РА не входили в топ 10 наилучших соединений, исходя из того что их среднее значение оценок докинга было удовлетворительным, а также принимая во внимание их доступность для проведения *in vitro* тестирования на противовирусную активность против ВАЧС, они так же были рассмотрены и протестированы *in vitro*.

Здесь представлены только 2 соединения: IX\_132, показавшее лучшие результаты в *in silico* экспериментах и IX\_3240, показавшее выраженную противовирусную активность в *in vitro* экспериментах.

Ингибирование сайта взаимодействия ASFV-ТОПОII с АТФ. Соединение IX\_132 образует 5 водородных связей в кармане взаимодействия ASFV-ТОПОII с АТФ. Из всех изученных сайтов взаимодействия IX\_132 с ASFV-ТОПОII следует выделить LYS140, THR143, ASN144, GLY147, которые являются необходимыми аминокислотами для взаимодействия ASFV-ТОПОII с АТФ (Рисунок 5).

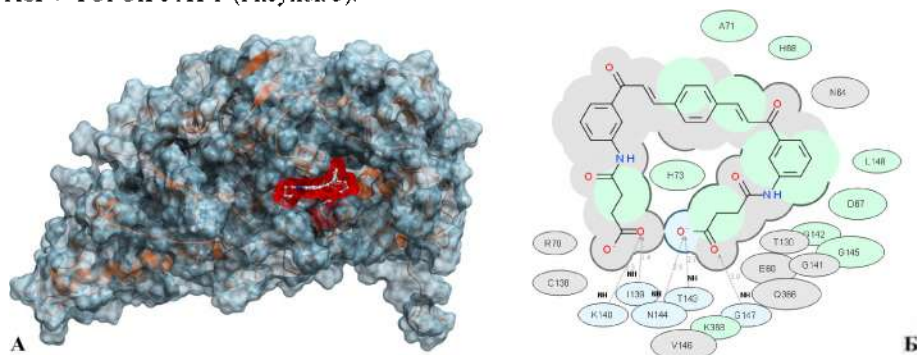
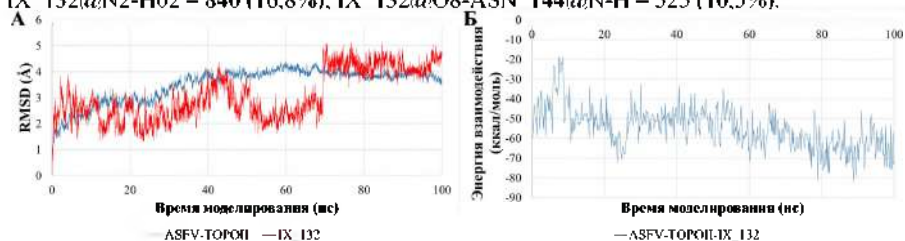


Рисунок 5. Взаимодействие ASFV-ТОПОII с IX\_132.

А - Локализация IX\_132 в кармане взаимодействия АТФ-связывающего домена ASFV-ТОПОII.

Б - 2D диаграмма сайтов взаимодействия (подробное описание указано в тексте).

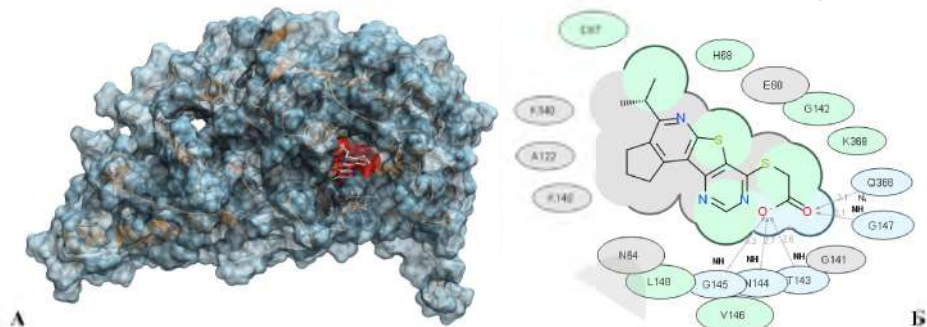
В результате анализа траекторий молекулярной динамики взаимодействия было установлено, что на протяжении 100 нс (5000 траекторий) образовывалось 93 водородных связей между IX\_132 и ASFV-ТОПОII. IX\_132 образовывал 15 водородных связей в более чем 5% траекторий, из которых 13 водородных связей образовывались в более чем 10% траекторий: водородная связь между атомом O8 из IX\_132 и атомами OG1-HG1 из THR143 (IX\_132@O8-THR 143@OG1-HG1) образовывалась на протяжении 4194 траекторий (83,9%); IX\_132@O4-GLY 145@N-H - на протяжении 4076 траекторий (81,5%); IX\_132@O4-THR 143@N-H - 2799 (55,9%); IX\_132@O8-THR 143@N-H - 2507 (50,1%); IX\_132@O4-ASN 144@N-H - 1891 (37,8%); IX\_132@O6-ASN 131@ND2-HD21 - 1623 (32,5%); IX\_132@O8-LYS 368@NZ-HZ2 - 1325 (26,5%); IX\_132@O8-LYS 368@NZ-HZ1 - 1267 (25,3%); IX\_132@O8-LYS 368@NZ-HZ3 - 1223 (24,5%); IX\_132@O1-LEU 148@N-H - 1124 (22,5%); IX\_132@O1-GLY 147@N-H - 886 (17,7%); ALA\_103@O-IX 132@N2-HO2 - 840 (16,8%); IX\_132@O8-ASN 144@N-H - 525 (10,5%).



**Рисунок 6.** Анализ молекулярной динамики взаимодействия ASFV-ТОПОII с IX\_132.  
**А** - RMSD в качестве функции времени моделирования.  
**Б** - Энергия взаимодействия в качестве функции времени моделирования.

На Рисунке 6А показаны колебания RMSD основной цепи третичной структуры ASFV-ТОПОII и атомов IX\_132 на протяжении моделирования молекулярной динамики взаимодействия.  $E_{\text{ср}} = -54,91$  ккал/моль,  $E_{\text{мин}} = -82,11$  ккал/моль.

IX\_3240 образует 5 водородных связей в кармане взаимодействия ASFV-ТОПОII-АТФ. Из всех изученных сайтов взаимодействия IX\_3240 с ASFV-ТОПОII следует особенно выделить THR143, ASN144, GLY145, LYS147 и GLN366, которые являются необходимыми аминокислотами для взаимодействия ASFV-ТОПОII-АТФ (Рисунок 7).



**Рисунок 7.** Взаимодействие ASFV-ТОПОII с IX\_3240.  
**А** - Локализация IX\_3240 в кармане взаимодействия АТФ-связывающего домена ASFV-ТОПОII.  
**Б** - 2D диаграмма сайтов взаимодействия (подробное описание указано в тексте).

IX\_3240 образовывал 19 водородных связей с ASFV-ТОПОII. В более чем 5% траекторий IX\_3240 образовывал 6 водородных связей, из которых 6 водородных связей образовывались в более чем 10% траекторий: IX\_3240@O1-GLY\_147@N-H - 1605 (32,10%); IX\_3240@O2-VAL\_146@N-H - 1437 (28,74%); IX\_3240@O2-GLY\_145@N-H - 1386 (27,72%); IX\_3240@O1-GLY\_145@N-H - 1379 (27,58%); IX\_3240@O1-VAL\_146@N-H - 1321 (26,42%); IX\_3240@O2-GLY\_147@N-H - 1301 (26,02%).

Анализ колебания энергии взаимодействия IX\_3240 с ASFV-ТОПОII, указывает на то, что после 50 нс. взаимодействие переходит в стационарное состояние (Рисунок 8Б). Э<sub>ср</sub> = -37,29 ккал/моль. Э<sub>мин</sub> = -55,34 ккал/моль.

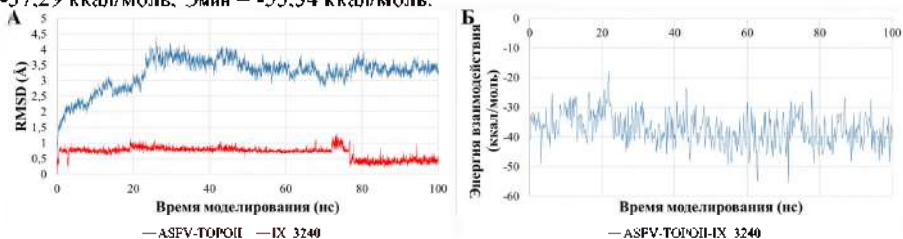


Рисунок 8. Анализ молекулярной динамики взаимодействия ASFV-ТОПОII с IX\_3240.

А - RMSD в качестве функции времени моделирования.

Б - Энергия взаимодействия в качестве функции времени моделирования.

Докинг ДНК-полимеразы-X с dGTP. На начальных стадиях экспериментов был проведен 4D докинг третичной структуры ASFV-PolX с dGTP, комплекс которых был изучен с помощью рентгеноструктурного анализа [Chen et al. 2017]. Эксперимент был независимо проведен 10 раз. На Рисунке 9 приведены локализации dGTP, из которых видно, что полученная нами локализация dGTP относительно ASFV-PolX полностью соответствует рентгеноструктурным данным, что подтверждает точность используемых нами методов. В результате анализа результатов 4D докинга ASFV-PolX с dGTP, было установлено, что валдин в 120-ом положении является необходимым для взаимодействия, что было показано и экспериментально. Также показано что dGTP взаимодействует с обоими ионами Mg<sup>2+</sup> и другими аминокислотами. Рисунке 11 показан карман взаимодействия ASFV-PolX с dGTP и сайты взаимодействия в виде 2D диаграммы.

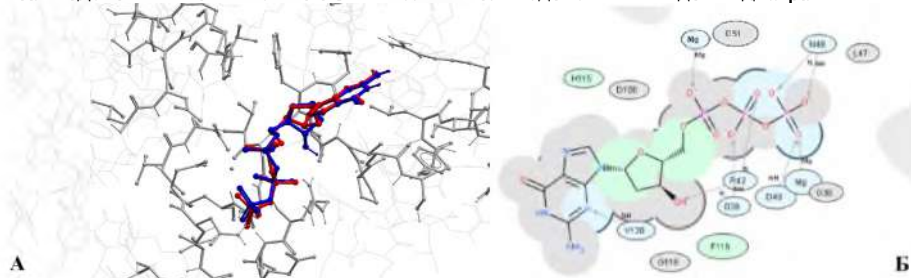
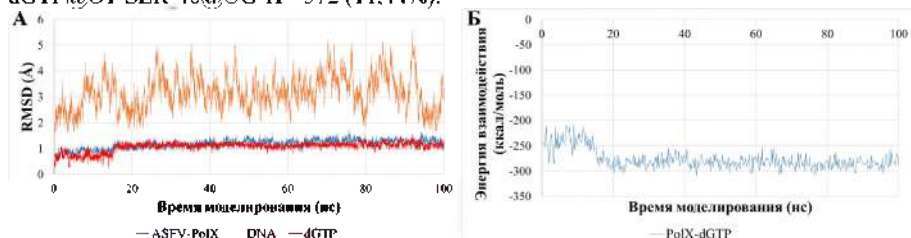


Рисунок 9. Взаимодействие ASFV-PolX с dGTP

А - Локализация dGTP относительно ASFV-PolX. Экспериментально полученная локализация показана синим цветом, смоделированная – красным.

Б - 2D диаграмма сайтов взаимодействия (подробное описание указано в тексте).

**Моделирование молекулярной динамики взаимодействия ASFV-PolX с dGTP.** В качестве начальной ориентации расположения dGTP по отношению к ASFV-PolX был использован комплекс ASFV-PolX-dGTP, который был изучен с помощью рентгеноструктурного анализа (PDB ID: 5HRI). Время симуляции составляло 100 нс с шагом моделирования 2фс. Было установлено, что на протяжении 100 нс (5000 траекторий) образовывалось 23 водородных связей между dGTP и ASFV-PolX. dGTP образовывал 8 водородных связей в более чем 5% траекторий, из которых 7 водородных связей образовывались в более чем 10% траекторий: dGTP@O2-ARG 43@NH1-HH12 - 4189 (83,78%); HIS 116@O-dGTP@O12-H121 - 4149 (82,98%); dGTP@O1-ARG 43@NH2-HH21 - 4125 (82,50%); dGTP@O3-ARG 43@NH2-HH21 - 1368 (27,36%); dGTP@O2-ARG 43@NH2-HH21 - 1081 (21,62%); dGTP@O2-SER 40@OG-HG - 587 (11,74%); dGTP@O1-SER 40@OG-H - 572 (11,44%).



**Рисунок 10.** Анализ молекулярной динамики взаимодействия ASFV-PolX с dGTP.  
**А** - RMSD в качестве функции времени моделирования.  
**Б** - Энергия взаимодействия в качестве функции времени моделирования.

На Рисунке 10А показаны колебания RMSD основной цепи третичной структуры ASFV-PolX, атомов dGTP и ДНК на протяжении моделирования молекулярной динамики взаимодействия. На Рисунке 10Б показан график колебания энергии взаимодействия dGTP с ASFV-PolX, из которого следует, что взаимодействие dGTP с ASFV-PolX стабилизировалось после 19 нс, а оставшиеся 81 нс dGTP и ASFV-PolX колебались в стационарном режиме.  $E_{ср} = -276$  ккал/моль,  $E_{мин} = -308$  ккал/моль.

После осуществления моделирования молекулярной динамики взаимодействия ASFV-PolX с dGTP, был проведен кластерный анализ полученной траектории, состоящей из 5000 конформаций. Кластерный анализ был проведен на основании значений RMSD между всеми траекториями для обязательных аминокислот, образующих сайт взаимодействия ASFV-PolX с dGTP. В результате было выявлено 6 кластеров, репрезентативные структуры которых использованы далее для проведения 4D докинга и виртуального скрининга лигандов.

**Виртуальный скрининг флавоноидов и их производных с ASFV-PolX.** Был осуществлен 4D докинг и виртуальный скрининг библиотеки соединений. Все полученные ранее репрезентативные структуры ASFV-PolX и две экспериментально изученные структуры 5HRI и 5HRL, каждая из которых содержала по две конформации ASFV-PolX, были суперимпозированы. Виртуальный скрининг был проведен в условии полной гибкости лигандов, а наличие и использование множества конформаций ASFV-PolX, полученных как экспериментально, так и смоделированных, симулировало полную гибкость ASFV-PolX. Из 115854 соединений, 550 показали хорошие результаты с оценкой докинга ICM равной или меньше -32. Для этих соединений эксперименты виртуального скрининга и 4D докинга были независимо повторены 10 раз. После чего были отобраны те соединения, которые в результате 11 независимых экспериментов виртуального скрининга



и 4D докинга имели оценку докинга равной или меньше допустимого в результате всех 11 экспериментов, количество которых составило 18 соединений. Из последних, для представления в данной диссертационной работе, были выбраны 10 наилучших соединений исходя из среднего значения оценки докинга в 11 экспериментах. Все 10 выбранных соединений были локализованы в сайте взаимодействия dGTP и имеются в свободной продаже (имеют вендор), что упростит их дальнейшее *in vitro* тестирование на антивирусную активность против ВАЧС.

**Ингибирование сайта взаимодействия ASFV-PolX с dGTP.** Для всех выше приведенных соединений были осуществлены эксперименты по 4D докингу и молекулярному моделированию динамики взаимодействия с ASFV-PolX, в соответствии с протоколом, описанным выше как для dGTP, так и для АТФ.

Соединение IX 83, показавшее лучшие результаты в *in silico* экспериментах, взаимодействует с  $Mg^{2+}$  и образует водородную связь с аминокислотой ARG42, которая находится в кармане взаимодействия ASFV-PolX с dGTP (Рисунок 11).

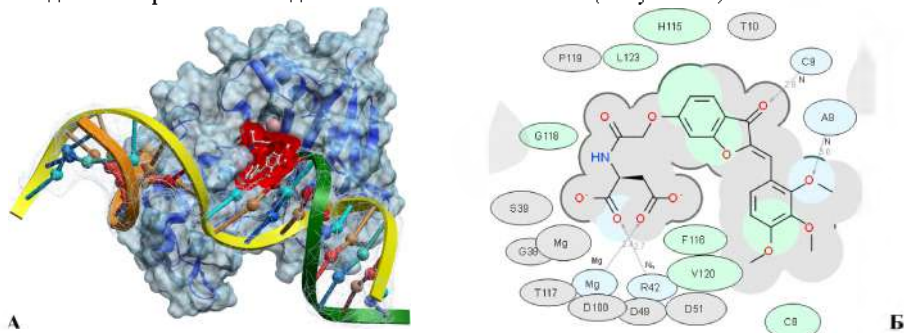


Рисунок 11. Взаимодействие ASFV-PolX с IX\_83.

А - Локализация соединений в кармане взаимодействия.

Б - 2D диаграмма сайтов взаимодействия (подробное описание указано в тексте).

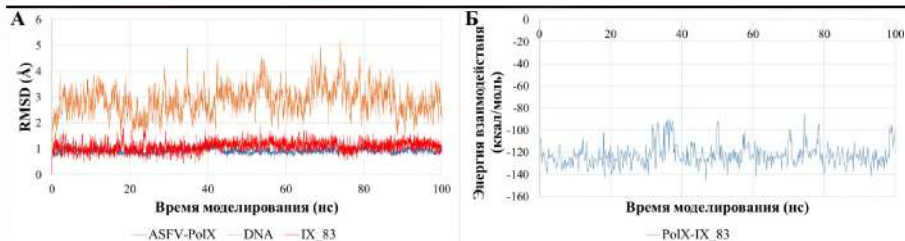


Рисунок 12. Анализ молекулярной динамики взаимодействия ASFV-PolX с IX\_83.

А – RMSD в качестве функции времени моделирования.

Б - Энергия взаимодействия в качестве функции времени моделирования.

При взаимодействии IX\_83 с ASFV-PolX образовывалось 6 водородных связей. IX\_83 образовывал 4 водородных связей в более чем 5% траекторий, из которых только 4 водородных связей образовывались в более чем 10% траекторий: IX\_83@O3-ARG\_43@NH2-HH21 - 4813 (95,82%); IX\_83@O5-ARG\_43@NH1-HH12 - 3306 (65,82%);

IX\_83@O9-SER\_40@N-H - 2865 (57.04%); IX\_83@O3-ARG\_43@NH1-NH12 - 571 (11.37%).

Взаимодействие IX 83 с ASFV-PolX выходит на плато через 40 нс, после чего колебание энергии взаимодействия происходило в стационарном режиме (Рисунок 12Б).  $E_{\text{ср}} = -122,66$  ккал/моль,  $E_{\text{мин}} = -145,92$  ккал/моль.

**Ингибирование Тубулина с помощью генкванина.** Поскольку транспорт ВАЧС к кле-

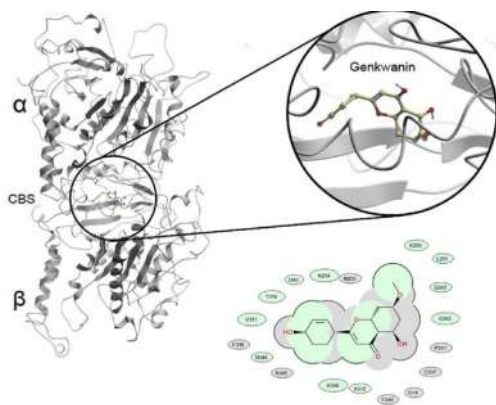


Рисунок 13. Взаимодействие димера тубулина с генкванином. Локализация генкванина в кармане взаимодействия в колхицин связывающем домене [Nakobyan et al. 2019].

Согласно наивысшей оценке докинга, генкванин связывается с промежуточным доменом  $\beta$ -тубулина, расположенным между  $\alpha$ -спиралями H7 (221–236), H8 (247–258) и  $\beta$ -листами S8 (309–316), S9 (344–352), которые образуют сайт связывания колхицина Рисунок 13. Кроме того, было проведено моделирование молекулярной динамики взаимодействия данного комплекса, для изучения более точной конформации взаимодействия. В результате чего была рассчитана энергия взаимодействия, которая составляла  $-31,6$  ккал/моль. Было установлено, что аминокислоты PHE240, ASN254, MET255, THR310 и ALA312 имели наибольший вклад в процесс взаимодействия тубулин-генкванин. На основании полученных результатов была опубликована статья [Nakobyan et al. 2019].

точной поверхности зависит от микротрубочек, ингибиторы полимеризации тубулина, такие как колхицин или нокодазол, способны подавлять высвобождение ВАЧС из клеток. Nakobyan et al. 2019 предположили, что аналоги флавоноида апигенина, который ингибирует полимеризацию тубулина, так же покажут аналогичные результаты. Несмотря на то, что в вышеуказанных *in silico* экспериментах генкванин не показал положительных результатов по ингибированию ASFV-TOP2II и ASFV-PolX, он проявлял выраженную антивирусную активность против ВАЧС в *in vitro* экспериментах. Для верификации *in vitro* экспериментов и данной гипотезы в целом, был проведен докинг генкванина с тубулином, для выявления или опровержения сайтов взаимодействия.

## ВЫВОДЫ

1. Полученные результаты свидетельствуют о применимости *in silico* подхода для моделирования взаимодействия PolX-dGTP, а также воздействия других лигандов на этот комплекс.
2. С помощью моделирования по гомологии впервые получена модель третичной структуры ДНК Топоизомеразы II ВАЧС.
3. Обнаружены соединения, которые показали высокую степень аффинности к ASFV-PolX, что может привести к ингибированию взаимодействия PolX-dGTP и инактивации ВАЧС.
4. Выявлены полифенольные соединения, которые конкурируют с АТФ при взаимодействии с ASFV-ТОПОII.
5. Была подтверждена противовирусная активность флавоноида генкванина против ВАЧС.
6. Полученные результаты показали перспективность использования некоторых полифенольных соединений в качестве ингибиторов ASFV-PolX и ASFV-ТОПОII для инактивации вируса АЧС.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **V. G. Arakelov.** Study of the African swine fever virus DNA Polymerase X 5'-P interaction site possible inhibitors. Biological Journal of Armenia, 2019, 71(4), p. 79-84.
2. A. Hakobyan, E. Arabyan, A. Kotsinyan, Z. Karalyan, H. Sahakyan, **V. Arakelov**, K. Nazaryan, F. Ferreira, H. Zakaryan. Inhibition of African swine fever virus infection by genkwanin. Antiviral research, 2019, 167, p. 78-82.
3. **V. Arakelov**, E. Arabyan, H. Zakaryan, G. Arakelov, K. Nazaryan. In silico study of the molecular mechanisms of African Swine Fever Virus inhibition by flavonoids. FEBS Advance Lecture Course "Current Advances in Pathogen Research", Yerevan, Armenia, March 25-30, 2019, p. 39.
4. E. Arabyan, A. Hakobyan, H. Sahakyan, **V. Arakelov**, K. Nazaryan, H. Zakaryan, Genkwanin inhibits African Swine Fever Virus infection in vitro. FEBS Advance Lecture Course "Current Advances in Pathogen Research", Yerevan, Armenia, March 25-30, 2019, p. 49.
5. E. Arabyan, A. Hakobyan, A. Kotsinyan, Z. Karalyan, **V. Arakelov**, G. Arakelov, K. Nazaryan, A. Simonyan, R. Aroutiounian, F. Ferreira. Genistein inhibits African swine fever virus replication in vitro by disrupting viral DNA synthesis. Antiviral Research, 2018, 156, p. 128-137.
6. **V. Arakelov**, G. Arakelov, E. Arabyan, H. Zakaryan. In silico study of African swine fever virus DNA Topoisomerase II and its inhibition by genistein. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018», Москва, Россия, 9 - 13 апреля, 2018, ISBN 978-5-317-05800-5. [https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2018/data/13738/76714\\_uid87033\\_report.pdf](https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2018/data/13738/76714_uid87033_report.pdf)
7. **В. Г. Аракелов.** Флавоноиды как возможные ингибиторы вируса Африканской чумы свиней. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017», Москва, Россия, 10 - 14 апреля, 2017, ISBN 978-5-317-05504-2. [https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2017/data/11033/uid87033\\_report.pdf](https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2017/data/11033/uid87033_report.pdf)

## ԱՌԱՔԵԼՈՎ ՎԱՀՐԱՄ ԳԱԼՈՒՍԻ

### ԽՈՋԵՐԻ ԱՖՐԻԿՑԱՆ ԺԱՆՏԱՆՏԻ ՎԻՐՈՒՄԻ ԱՐԳԵԼԱԿՄԱՆ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆ

#### ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

**Հանգուցային բառեր՝** ԽԱԺ, ԽԱԺՎ, ԴՆԹ պոլիմերազ X, ԴՆԹ տոպոիզոմերազ II, ֆլավոնոիդներ, վիրտուալ սքրինինգ, մոլեկուլային դիևամիկայի մոդելավորում:

Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսը (ԽԱԺՎ) խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի (ԽԱԺ) էթիոլոգիական գործոնն է: Այն ընտանի խոզերի մահացու հիվանդություն է, որը զգալի հետևանքներ ունի տուժած երկրներում, այդ թվում՝ Հայաստանում:

Չնայած ԽԱԺ-ի լուրջ բացասական ազդեցությանը խոզաբուծության վրա, քիչ տեղեկություններ կան վիրուսային թիրախների մասին՝ ԽԱԺՎ-ի դեմ անհրաժեշտ թերապևտիկ միջամտությունների համար: ԽԱԺ-ի արգելակման մոլեկուլային մեխանիզմները հայտնաբերելու և ուսումնասիրելու համար կարևոր նշանակություն ունի հավանական վիրուսային թիրախների երրորդային կառուցվածքների ուսումնասիրությունը: Կենսաինֆորմատիկայի մի շարք մեթոդներ կարող են օգտագործվել դրանց ուսումնասիրության համար, ինչի շնորհիվ հնարավոր կլինի պարզել վիրուսային ԴՆԹ-ի ռեպլիկացիայի, ռեպարացիայի խաթարման մոլեկուլային մեխանիզմները:

Ատենախոսության նպատակն է համակարգչային մոդելավորման մեթոդների օգնությամբ պոլիֆենոլային միացությունների վրա հիմնված պոտենցիալ դեղամիջոցների որոնումը խոզերի Աֆրիկյան ժանտախտի բուժման համար:

Որպես պոտենցիալ սպիտակուցային թիրախներ ընտրվել են ԴՆԹ պոլիմերազ X-ը՝ ֆերմենտը (ASFV-PolX), որը ներգրավված է վիրուսային ԴՆԹ-ի ռեպարացիոն գործընթացում և ԴՆԹ տոպոիզոմերազ II-ը՝ ֆերմենտ (ASFV-TOPOII), որը պատասխանատու է վիրուսային ԴՆԹ-ի ռեպլիկացիայի համար: Հայտնի է նաև այլ հնարավոր թիրախ՝ αβ-տուբուլինի համալիրը, որը իրականացնում է ԽԱԺՎ-ի փոխադրումը բջջում:

Ելևելով այն փաստից, որ ֆլավոնոիդները և բուսական ծագման այլ պոլիֆենոլային միացությունները ունեն հակավիրուսային ակտիվություն տարբեր վիրուսների նկատմամբ, որպես հնարավոր քիմիական միացություններ, ընտրվեցին ֆլավոնոիդները և այլ պոլիֆենոլային միացությունները:

*In silico* փորձերի արդյունքում, մասնավորապես՝ սպիտակուցի երրորդային կառուցվածքի մոդելավորումն, մոլեկուլային դոկիկցի, լիզանդների վիրտուալ սքրինինգի և փոխազդեցության մոլեկուլային դիևամիկայի մոդելավորման արդյունքում, հայտնաբերվել են ASFV-PolX-ի, ASFV-TOPOII-ի և αβ-տուբուլինի երրորդային կառուցվածքների վրա արգելակող ազդեցություն ունեցող մի շարք պոլիֆենոլային միացություններ:

Իրականացված հետազոտություններում հայտնաբերվել են արգելակման երեք տարբեր մեխանիզմներ.

1. Հայտնաբերվել է 330 պոլիֆենոլային միացություն, որոնք արգելակում են ASFV-TOPOII-ի փոխազդեցության կայքը ԱԵՖ-ի հետ, ինչը կարող է հանգեցնել ASFV-TOPOII-ԱԵՖ համալիրազոյացման արգելակմանը:
2. Հայտնաբերվել են 18 քիմիական միացություններ, որոնք ունեն արգելակող ազդեցություն ASFV-PolX-ի dGTP-ի հետ փոխազդեցության կայքի վրա, ինչը կարող է հանգեցնել ASFV-PolX-dGTP համալիրազոյացման արգելակմանը:
3. Պարզվել է, որ գենկվանինը կապվում է կոլիսիցինի փոխազդեցության կայքի հետ և արգելակում է է տուբուլինի պոլիմերացիան, ինչը հանգեցնում է վարակված բջիջներից ԽԱԺՎ-ի արտազատման ճնշմանը:

Այս արգելակման մեխանիզմները կարող են ճնշել ռեպլիկացիան , վնասված վիրուսային ԴՆԹ-ի ռեպարացիան և վիրուսի հետագա տարածումը:

Սույն ատենախոսությունում հայտնաբերված ASFV-TOPOII-ի 10 հավանական արգելակիչները փորձարկվել են *in vitro* հետազոտություններում, որի արդյունքում հաստատվել է դրանցից երկուսի հակավիրուսային ակտիվությունը (IX\_3240 և IX\_2802) վիրուսով վարակված բջիջների վրա:

## ARAKELOV VAHRAM

### INVESTIGATION OF THE MOLECULAR MECHANISMS OF INHIBITION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUSES

#### SUMMARY

**Key words:** ASF, ASFV, DNA Polymerase X, DNA Topoisomerase II, flavonoids, virtual screening, molecular dynamics simulations.

African swine fever virus (ASFV) is the etiological agent of African swine fever (ASF), a lethal disease in domestic pigs that has significant consequences for pig industry in the countries with large virus outbreak including Armenia.

Though ASFV threatens pig industry worldwide, yet little is known about therapeutic targets against the virus.

To date, the DNA polymerase X is the only protein tertiary structure of which has been completely studied. In this regard, the study of tertiary structures of potential viral targets using bioinformatics methods is of great importance as it will shed light on the molecular mechanisms of ASF inhibition. It also gives an opportunity to reveal the molecular

mechanisms behind the inhibition of enzymes, which play a key role in the processes of replication, viral DNA repair and further dissemination of ASFV, thus playing an important role in the life cycle of the virus.

The aim of the thesis was the search for potential drugs based on polyphenolic compounds for the treatment of African swine fever using computational modeling methods.

ASFV-PolX, an enzyme involved in the repair of viral DNA and ASFV-TOPOII, an enzyme responsible for the replication of viral DNA, were selected as potential protein targets. The  $\alpha\beta$ -Tubulin complex was selected as a target that interferes with virus dissemination.

Commercially available flavonoids and other polyphenolic compounds were selected as potential chemical compounds capable of inhibiting these protein targets. Since it is known that flavonoids and other polyphenolic compounds of plant origin have antiviral activity against various viruses.

As a result of *in silico* experiments, in particular, modeling of the tertiary structure of the protein, molecular docking, virtual ligand screening and molecular dynamics simulation of the interaction, polyphenolic compounds with inhibitory effects on the tertiary structures of ASFV-PolX, ASFV-TOPOII and  $\alpha\beta$ -tubulin were identified.

In the studies, three different mechanisms of inhibition were found:

- 1 330 polyphenolic compounds were found to inhibit the interaction site of ASFV-TOPOII with ATP, which can lead to the inhibition of the complexation of ASFV-PolX-ATP.
- 2 18 chemical compounds were identified that have an inhibitory effect on the interaction site of ASFV-PolX with dGTP, which theoretically can lead to the inhibition of complexation of ASFV-PolX-dGTP.
- 3 It was found that genkwanin binds to the colchicine binding site and affects the polymerization of tubulin, which leads to a suppression of the release of ASFV from infected cells.

These inhibition mechanisms can lead to the disruption of replication, repair of damaged viral DNA and further dissemination of the virus which is necessary for the life cycle of the virus.

As part of a collaboration, the 10 potential ASFV-TOPOII inhibitors found in this thesis were tested *in vitro* experiments, resulting in the confirmation of the antiviral activity of some of them (IX\_3240 and IX\_2802) on the virus-infected cells.



