

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ԵՎ ՄՊՈՐՏԻ
ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՊԱՐՈՆՅԱՆ ԱԴՐԻՆԵ ԿԱՐԵՆԻ

ՊԻՐԻՆԻ և 14-3-3 ՄՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ԻՋՈՖՈՐՄՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՄՈԴՈՒԼՅԱՏՈՐՆԵՐԻ IN SILICO ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԻՐՈՒԹՅՈՒՆ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2026

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ПАРОНЯН АДРИНЕ КАРЕНОВНА

IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ МОДУЛЯТОРОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ПИРИНА С ИЗОФОРМАМИ БЕЛКА 14-3-3

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН – 2026

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

կենս. գիտ. դոկտոր

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կարեն Բաբկենի Նազարյան

ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, դոցենտ

Եվգենի Շամիլի Մամասախլիսով

կենս. գիտ. թեկնածու

Հարություն Կարապետի Սահակյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Ինֆորմատիկայի և ավտոմատացման
պրոբլեմների ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2026թ. սեպտեմբերի 4-ին,
Ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲԿԳԿ-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 2026թ. օգոստոսի 4-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական

քարտուղար, կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ

 Ս.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор биол. наук,

Карен Бабкенович Назарян

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, доцент

Евгений Шамильевич Мамасахлисов

кандидат биол. наук,

Арутюн Карапетович Саакян

Ведущая организация: Институт проблем информатики и автоматизации НАН РА

Защита диссертации состоится 4-ого сентября 2026г., в 14⁰⁰ часов на заседании
Специализированного совета 051 по Биофизике КВОН РА при Ереванском
государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, факультет
биологии).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного
университета.

Автореферат диссертации разослан 4-ого августа 2026г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,

доктор биол. наук, доцент

 М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Белок пирин является продуктом гена MEFV, мутации в котором вызывают манифестацию двух моногенных заболеваний - Семейной Средиземноморской Лихорадки (ССЛ) и Пирин-Ассоциированного Аутовоспаления с Нейтрофильным Дерматозом (ПААНД). ССЛ и ПААНД — это генетические аутовоспалительные заболевания, характеризующиеся дисрегуляцией внутренних резистентных реакций, которые часто приводят к серьезным клиническим признакам, таким как повторная лихорадка, серозит, нейтрофильный дерматоз и амилоидоз. Функционирование пирина жестко контролируется фосфорилирование-зависимым взаимодействием с белками 14-3-3, которые препятствуют комплексообразованию и как следствие формированию инфламмасы. Дисрегуляция этого взаимодействия может быть отличительной чертой ССЛ и ПААНД, вызывающая обострение заболеваний за счет бесконтрольного выброса интерлейкина-1 β [Jéru et al. 2005; Magnotti et al. 2019; Gao et al. 2016].

У человека семейство белков 14-3-3 состоит из семи изоформ, при этом изоформы тета τ (Uniprot: YWHAQ) и эпсилон ϵ (Uniprot: YWHAЕ) занимают центральное место в этом исследовании благодаря их доказанному взаимодействию с пирином [Park and H. Wood et al. 2016].

Белок-белковые взаимодействия (ББВ) необходимы почти для каждого биологического процесса. Белки редко функционируют изолированно, вместо этого они создают сложные сети взаимодействия. ББВ регулируют функции клеток, включая сигнальные, метаболические пути, репликацию ДНК и иммунные реакции. Понимание ББВ жизненно важно для расшифровки молекулярных механизмов заболеваний. Оно также необходимо для создания методов лечения, и в последнее время ББВ стало объектом перспективных мишеней для разработки лекарств. Они открывают новые возможности для лечения заболеваний, которые раньше считались неизлечимыми.

Показано, что взаимодействие между пирином и 14-3-3 осуществляется путем фосфорилирования сериновых остатков SER208, SER209 и SER242. Основные исследования свидетельствуют, что фосфорилирование в этих сайтах узнаваемыми амфипатическими бороздками 14-3-3, стабилизируют пирин в неактивном состоянии [Munier et al. 2021]. Нарушение этого взаимодействия приводит к конститутивному включению синтеза инфламмасы, как это наблюдается при ССЛ и ПААНД.

Достоверно известно, что нарушение работы комплекса пирин-14-3-3 является основной причиной активации пирина, приводящей к воспалению во время ССЛ и ПААНД, что делает данный комплекс потенциальной мишенью для разработки принципиально нового терапевтического средства для лечения ССЛ и ПААНД путем исследования *in silico*. В работе рассматриваются характеристики ББВ, методы их изучения, применение в разработке лекарств, а также трудности и стратегии, связанные с нацеливанием на эти взаимодействия.

На данный момент из-за больших размеров, а также наличия неструктурированных регионов у пирина в базах данных нет экспериментально полученных полноразмерных структур комплексов нативного и мутированного пирина и белка 14-3-3. Поэтому нашей первоочередной задачей являлось конструирование *in silico* модели данного белок-белкового взаимодействия.

Изучены 16 мутаций пирина, классифицированных на четыре группы:

- Мутации, нарушающие связывание пирина с 14-3-3: S208A, S209A, S242A, S208-S209A (двойная мутация) и S208-S209-S242A (тройная мутация) [Park et al. 2020];

- Мутации в местах фосфорилирования: S208C и S208T [Hong et al. 2019];
- Ассоциированные с ПАНД мутации: S242R и E244K [Van Nieuwenhove et al. 2021];
- Ассоциированные с ССЛ мутации: M680I, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S и R761N [Touitou 2001; Ong et al. 2013];

Эти мутации и их сравнение с нативным белком предоставляют основу для анализа структурных и функциональных последствий взаимодействий пирин-14-3-3. Структурное изучение сайтов, подверженных действию потенциальных лекарств, в регионах взаимодействия данных белков и идентификация модуляторов, нацеленных на стабилизацию комплексообразования может служить перспективной стратегией и привести к открытию новых лекарственных препаратов для лечения ССЛ и ПАНД.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы являлось *in silico* изучение молекул модуляторов взаимодействия изоформ 14-3-3 с белком пирин. В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Построить полноразмерные структурные модели нативных комплексов пирин-14-3-3 τ/τ и пирин-14-3-3 ϵ/ϵ , создав тем самым основу, на которой будут базироваться все последующие вычислительные исследования.
2. Изучить конформационную стабильность и динамическое поведение смоделированных комплексов с помощью молекулярно-динамического моделирования.
3. Провести виртуальный скрининг лигандов нативных комплексов пирин-14-3-3 τ/τ и пирин-14-3-3 ϵ/ϵ с использованием тщательно отобранной библиотеки соединений с целью выявления перспективных низкомолекулярных модуляторов, способных стабилизировать исследуемое белок-белковое взаимодействие.
4. Провести гибкий молекулярный докинг кандидатов, отобранных в ходе виртуального скрининга, определить наиболее перспективных соединений на основе прогнозируемой аффинности связывания и оценки результатов докинга, а также повторить эту процедуру докинга со всеми мутантными вариациями.
5. Подтвердить стабилизирующее влияние выбранных модуляторов на комплексы пирин-14-3-3 с помощью симуляций молекулярной динамики, тем самым обосновав способность этих соединений укреплять комплексы и подтвердив центральную гипотезу данной диссертации.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

- Впервые создана полная структурная модель комплекса пирин-14-3-3. В то время как в базе данных Protein Data Bank содержится всего три комплекса пирин-14-3-3, но пирин представлен исключительно в виде коротких пептидных фрагментов (PDB: 8C28, 8C30 и 8C2Y), данная работа предоставляет полученные валидированные полноразмерные модели комплексообразования.
- Была проведена симуляция молекулярной динамики в 2 микросекунды, после чего методами фильтрации и сравнения с фрагментами из баз данных отобрана наилучшая модель, показавшая внушительные результаты, для дальнейших экспериментов.
- На основе валидированных нативных полных третичных структур смоделированы 16 мутантных вариаций каждого исследуемого комплекса, ассоциированные с заболеваниями ССЛ и ПАНД.
- Проведен виртуальный скрининг 1.5 млрд лигандов и молекулярный докинг для отбора наилучшего соединения, который может выступать в качестве потенциального терапевтического средства.

- Произведена симуляция молекулярной динамики отобранных топ соединений модуляторов с комплексами пирин-14-3-3т/т и пирин-14-3-3ε/ε.
- Получены результаты наиболее перспективных соединений имеющий потенциальный стабилизирующий эффект на ББВ.

Апробация работы. Материалы диссертационной работа были доложены на международных и республиканских конференциях: XII и XIII Годичные научные конференции Российско-Армянского Университета (2021г., 2022г.); Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», STCC22 – Конференция по конвергенции науки и технологий 2022 года, ISFMS2025 — 5-й Международный симпозиум по передовым достижениям молекулярной науки от MDPI, Киото, Япония а также на семинарах и заседаниях лаборатории Компьютерного моделирования биологических процессов Института молекулярной биологии НАН РА и института Биомедицины и Фармации Российско-Армянского Университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ (5 статьи и 2 тезиса).

Объем и структура работы. Работа изложена на 149 страницах, содержит 51 рисунок и 8 таблиц. Библиография включает 145 наименования литературных источников. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения, содержащее 2 рисунка и 11 таблиц.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приводятся: общие сведения, описание и характеристика белков пирин и 14-3-3, эпидемиологии ССЛ и ПААНД, рассматривается важность белок-белкового взаимодействия пирин-14-3-3 при исследуемых заболеваниях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Молекулярное моделирование. AlphaFold — это алгоритм глубокого обучения, разработанный компанией DeepMind, которая произвела революцию в области предсказания структуры белков, используя эволюционную информацию и глубокие нейронные сети [Jumper et al. 2021]. В рамках нашего исследования была использована версия AlphaFold v2.3.2, используя реализацию на основе Docker для обеспечения вычислительной эффективности и воспроизводимости. В качестве модели использовалась модель multimer, оптимизирующая процесс предсказания для белок-белковых взаимодействий [Evans et al. 2021].

Моделирование молекулярной динамики. Чтобы получить представление о динамическом поведении, конформационных изменениях и характеристиках взаимодействия молекулярных систем, было проведено моделирование молекулярной динамики (МД). Этот вычислительный метод имитирует физические движения атомов и молекул с течением времени, предоставляя детальное представление об их эволюции на атомном уровне. Чтобы описать временную эволюцию длин связей, валентных углов и кручений, а также Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и электростатических взаимодействий между атомами, используется силовое поле. Силовое поле — это математическое выражение, описывающее зависимость энергии системы от координат частиц.

Мы использовали как дискретную молекулярную динамику (π DMD), так и классическое моделирование МД с использованием широко известных программных пакетов, таких как AMBER и OpenMM. Моделирование МД для структур гетеротетрамерных нативных (2 микросекунды) и мутантных комплексов, а также структур белок-белок с лигандом (100 наносекунд каждый).

Для согласования с результатами экспериментов также важен правильный выбор силового поля некоторые силовые поля специально разработаны для определенных биомолекул. В нашем случае использовалось силовое поле Amber ff19SB для белков [Tian et al. 2020]. Структуры пирина были фосфолированы и поэтому необходимо использовать также силовое поле специально для этих аминокислот - phosaa19SB [Raguette et al. 2024]. Силовые параметры молекул воды были выбраны согласно модели OPC с формой усеченного октаэдра [Izadi et al. 2014], а силовое поле для лигандов – gaff2 [Wang et al. 2004].

Моделирование предоставило множество данных по различным параметрам, включая среднеквадратичное отклонение (RMSD) [Kufareva and Abagyan 2011], которое количественно определяет структурное отклонение от референтной конформации, и среднеквадратичное отклонение (RMSF) [Amadei et al. 1993], которое измеряет гибкость отдельных остатков, радиус гирации, который описывает общее распространение молекулы и определяется как среднеквадратичное расстояние набора атомов от их общего центра тяжести, анализ дистанций между ключевыми сайтами взаимодействия пирина и 14-3-3, анализ водородных связей, а также энергии связывания с помощью MMGBSA/MMPBSA [Kollman et al. 2000]. MMGBSA использует обобщенную модель Борна (GB) для расчета энергии полярной сольватации. MMPBSA использует уравнение Пуассона-Больцмана (PB) для расчета энергии полярной сольватации [Kollman et al. 2000].

Динамическое поведение и эволюция связывающего кармана анализировались с помощью MDpocket, предназначенного для обнаружения и характеристики полостей в траекториях МД [Schmidtke et al. 2011]. Для идентификации исходного связывающего кармана, структура белка была наложена на эталонную кристаллическую структуру комплекса 14-3-3/PyripnS242 (PDB ID: 8C30) [Lau et al. 2023]. Эта область служила основой для последующего отслеживания и характеристики кармана во время моделирования молекулярной динамики.

Метод кластерного анализа используется для выбора наиболее репрезентативных конформационных популяций, полученных непосредственно после МД симуляций. Кластерные анализы используются для определения геометрических или конформационных особенностей в белковых структурах для дальнейшего понимания сложных энергетических ландшафтов [Hassan et al. 2015; Roccatano 2025]. Для кластерного анализа полученных траекторий была использована программа Ttclust [Tubiana et al. 2018].

База данных модуляторов ББВ Enamine. База данных модуляторов белково-белковых взаимодействий Enamine (<https://enamine.net/compound-collections/real-compounds/real-database-subsets>) представляет собой обширный химический репозиторий, созданный для содействия разработке лекарственных средств, направленных на белково-белковые взаимодействия. Эта база данных содержит около 1.5 миллиарда соединений. Модуляторы ББВ Enamine представляют собой молекулы, имеющие общие физико-химические характеристики: $400 \leq MW \leq 500$, $\text{LogP} \leq 4,0$, $0,35 < \text{F sp } 3 \text{ и } 3 \leq \text{Rings} \leq 6$.

Виртуальный скрининг лигандов. Чтобы выявить потенциальные модуляторы ББВ пирин-14-3-3, был проведен виртуальный скрининг (ВС) лигандов. Процесс скрининга проводился с использованием платформы PLANET, специализированного инструмента, разработанного для таких целей [Zhang et al. 2024]. Все вычислительные задачи выполнялись на суперкомпьютере "Говорун" Hybrilit JINR (<http://hlit.jinr.ru/>). Для процесса скрининга был использован вычислительный узел, оснащенный графическими процессорами NVIDIA Ampere. Каждый запуск использовал один узел с 128 ядрами CPU и 8 графическими процессорами (GPU).

Гибкий молекулярный докинг. Моделирование молекулярного докинга проводилось с использованием MedusaDock 2.0 — сложного вычислительного инструмента, известного своей эффективностью и точностью при докинге белков и лигандов, что является основополагающим методом в современных методологиях виртуального скрининга лекарственных средств. MedusaDock 2.0 устраняет ограничения, присущие традиционным подходам к докингу, за счет повышения эффективности выборки как в конформационном пространстве лиганда, так и в конформационном пространстве рецептора, что способствует выявлению энергетически благоприятных конформаций связывания [Wang and Dokholyan 2019]. Для оценки аффинности связывания использовался показатель Ewithout_VDWR, который исключает член Ван-дер-Ваальса, чтобы снизить чувствительность к незначительным стерическим столкновениям, возникающим из-за ограниченной выборки конформаций [Ding et al. 2010].

Соединения, демонстрирующие оценку скрининга PLANET выше 7, были отнесены к приоритетным для последующих симуляций MedusaDock. Этот строгий этап предварительного скрининга эффективно отсеивает соединения с пониженным потенциалом связывания.

Анализ взаимодействий белок-лиганд с помощью PLIP. Понимание того, как лиганд располагается внутри кармана связывания белка и какие остатки удерживают его на месте, не менее важно, чем само прогнозирование энергии связывания. Чтобы получить эту информацию, мы использовали Protein–Ligand Interaction Profiler (PLIP) [Schake et al. 2025].

ADMET-AI: платформа машинного обучения для оценки химических библиотек. ADMET-AI представляет собой платформу с использованием машинного обучения, предназначенную для быстрой и масштабной оценки свойств ADMET — абсорбции, распределения, метаболизма, экскреции и токсичности у химических соединений [Swanson et al. 2024].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование и проверка комплексов пирин-14-3-3

Одним из основных достижений этой диссертации стало успешное создание вычислительных моделей для полных третичных структурных комплексов пирин-14-3-3 ε/ε и пирин-14-3-3 τ/τ .

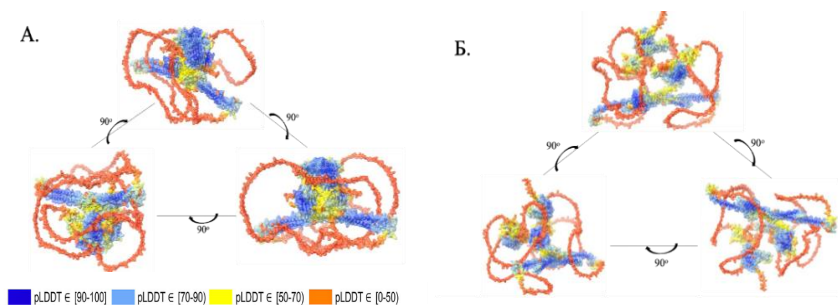


Рисунок 1. Отобранная модель комплекса А: пирин-14-3-3τ/τ и Б: пирин-14-3-3ε/ε после моделирования AlphaFold2.3.2.

Для моделирования структур комплексов, получение которых является приоритетной задачей, мы извлекли соответствующие аминокислотные последовательности из базы данных UniProt. Большинство смоделированных комплексов продемонстрировали высокую степень структурного сходства, что указывает на сохраненные паттерны взаимодействия. pLDDT оценка представляет собой предсказанную локальную разницу расстояний, которая служит индикатором локальной достоверности для каждого аминокислотного остатка. Шкала варьируется от 0 до 100, при этом большие значения указывают на более высокую достоверность и, как правило, на более точный прогноз (рисунок 1).

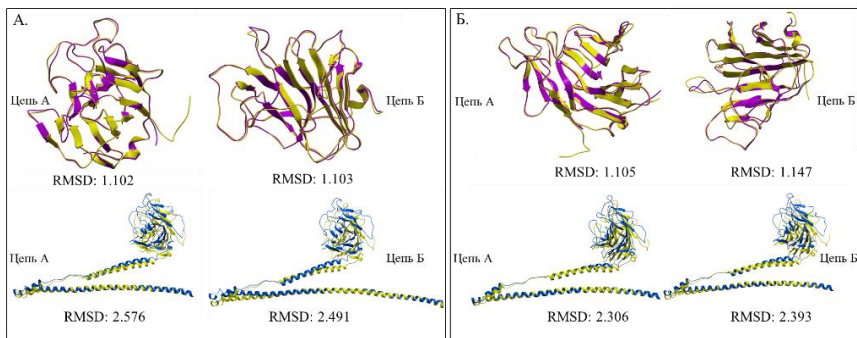


Рисунок 2. Суперимпозиция и сравнение кристаллографических структур (2WL1: фиолетовый, 4CG4: синий) и смоделированных моделей (желтый) для обеих цепей со значением RMSD. А: пирин-14-3-3τ/τ и Б: пирин-14-3-3ε/ε.

Для обеспечения надежности и точности этих вычислительно полученных моделей был проведен строгий процесс проверки. Он включал использование сложных методов фильтрации и сравнительных анализов с доступными экспериментальными фрагментами и гомологичными структурами из установленных баз данных белков (рисунок 2). Результаты показанные на рисунке 2 указывают на повышенную достоверность полученных моделей AlphaFold, имея показатель различия для 2WL1 меньше 1.2Å и для 4CG4 меньше 2.6Å.

Необходимым этапом в нашем исследовании считалось произвести фосфорилирование пирина по необходимым положениям, как упоминалось выше, SER208, SER209 и SER242. Доказано известно, что белки, взаимодействующие с 14-3-3, должны быть в фосфорилированном виде, лишь при таком условии сохраняется стабильность взаимодействия [Muslin et al. 1996].

Моделирование молекулярной динамики и анализ взаимодействия

В данном исследовании для наибольшей эффективности мы скомбинировали два программных пакета классической МД – Amber 22 и OpenMM 8.0. Начальные этапы сборки и подготовки системы, а также анализы после МД симуляции мы выполнили с помощью Amber 22, а процесс эквilibрации и самой симуляции проводилось с помощью OpenMM 8.0. Симуляция молекулярной динамики нативных фосфорилированных комплексов проводилась с шагом моделирования с 4фс, с температурой в 309.75K и общим числом шагов 500.000.000 что составляло 2

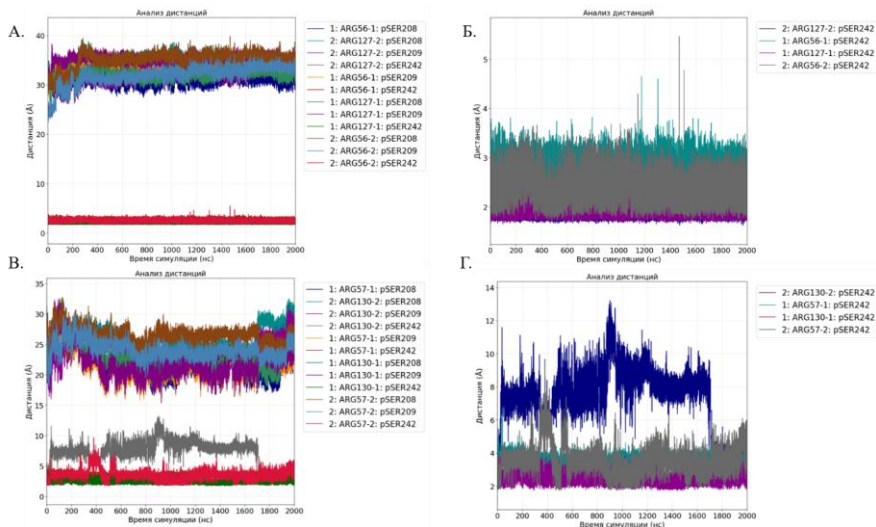


Рисунок 3. График дистанций между сайтами взаимодействия для комплекса А: пирин-14-3-3 τ / ϵ . Б: пирин-14-3-3 ϵ / ϵ . Слева указаны все аминокислоты, справа показавшие лучший результат.

микросекунду. Для валидации полученных результатов классической молекулярной динамики мы использовали ряд параметров, которые включали: RMSD, анализ дистанций и водородных связей, энергии связывания белок-белковых взаимодействий MMGBSA/PBSA, RMSF, RG, идентификация карманов связывания на протяжении всей МД и анализ формирования вторичных структур на протяжении симуляции.

При выполнении анализа дистанций нами были выбраны все возможные комбинации между сайтами взаимодействия, которые представлены на графике дистанций (рисунок 3).

Данные результаты подтверждают структурные исследования, показавшие, что одного фосфорилированного остатка pSER242 достаточно для образования стабильного комплекса с белком 14-3-3, что свидетельствует о том, что одновременное вовлечение всех фосфосериновых остатков не является обязательным условием для

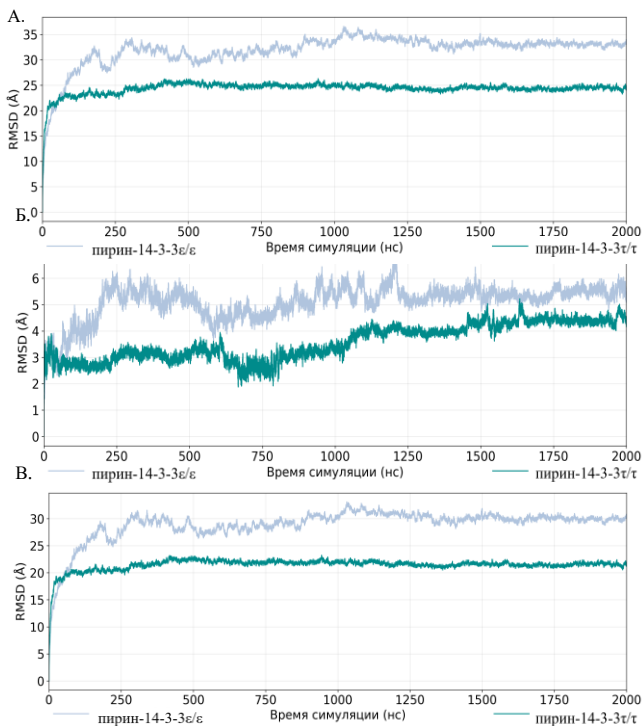


Рисунок 4. RMSD графики комплексов на протяжении всей динамики. А: RMSD значения только пирина; Б: RMSD значения только 14-3-3; В: RMSD значения всего комплекса.

уравновешивания, а затем достигают стабильности, что указывает на то, что моделирования в значительной степени сошлись. Система пирин-14-3-3ε/ε (голубой) постоянно демонстрирует более высокие значения RMSD, колеблясь в среднем около 28-30 Å после уравновешивания в случае всего комплекса.

Система пирин-14-3-3τ/τ (бирюзовый) показывает более низкие значения RMSD, стабилизируясь около 21-22 Å, также в случае всего комплекса. Большие значения RMSD связаны с большими структурами комплексов: пирин-14-3-3τ/τ состоит из 31983 атомов, в водном растворе с Na⁺ и Cl⁻ и 2 ионами Zn²⁺ 712481 атомов. Комплекс пирин-14-3-3ε/ε состоит из 32353 атомов, в водном растворе с Na⁺ и Cl⁻ и 2 ионами Zn²⁺ 805156 атомов.

взаимодействия [La Bella et al. 2024; Lau et al. 2023; Pennington et al. 2018]. Вторым немаловажным критерием считается среднее квадратичное отклонение (RMSD), которое является индикатором стабильности белкового комплекса. В обоих смоделированных комплексах анализ RMSD после МД выявил стабильный профиль, что указывает на то, что структуры достигли равновесия и стабилизировались на протяжении динамики в 2 микросекунды и в продолжении не нуждается (рисунок 4). Обе системы показывают начальное увеличение RMSD по мере

Среднеквадратичное отклонение флуктуаций (RMSF) измеряет степень подвижности или гибкости каждого остатка. Высокие значения RMSF, показывают, что остаток претерпевает существенные позиционные изменения и демонстрирует высокую гибкость, а низкие значения RMSF, указывают на то, что остаток остается относительно стабильным.

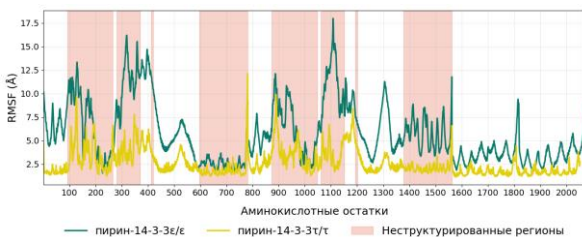


Рисунок 5. График RMSF флуктуаций для обоих комплексов.

Комплексе	MM/GBSA ккал/моль	MM/PBSA ккал/моль
Пирин-14-3-3 τ/τ	-425.0504	-579.5456
Пирин-14-3-3 ε/ε	-261.6924	-384.4040

Таблица 1. Результаты энергии взаимодействия для каждого из комплексов.

Были проведены анализы MMGBSA (молекулярная механика поверхности Борна) и MMPBSA (молекулярная механика поверхности Пуассона–Больцмана) для оценки свободной энергии связывания между комплексами белок-белок [Chen et al. 2016]. Низкие значения свободной энергии связывания указывают на более сильные и стабильные взаимодействия, в то время как более высокие значения указывают на более слабые ассоциации.

Фильтрация и отбор репрезентативных конформаций

Проведение симуляции молекулярной динамики дало нам обширные и многообещающие результаты. Для выбора наилучшего фрейма из всей нашей траектории мы использовали алгоритм фильтрации. Имеются экспериментальные данные о получении кристаллографической структуры комплекса 14-3-3 с фосфорилированным отрезком белка пирина, а именно в базе данных PDB имеется следующие структуры: 8C2Y, 8C28, 8C30 [Lau et al. 2023]. Взяв за эталонную структуру данные кристаллографические структуры, мы сравнивали с полученной нами моделью.

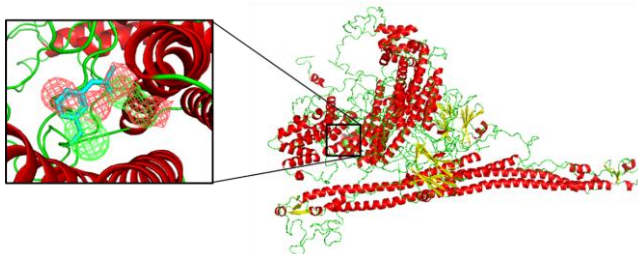


Рисунок 6. Отобранный фрейм и локализация кармана комплекса пирин-14-3-3ε/ε.

С помощью MDprocket мы провели фильтрацию для поиска наилучшего фрейма исходя из эталонной структуры PDB ID: 8C30 по расположению лиганда N-[3-(aminomethyl) phenyl] acetamide (C9H12N2O) (LigandID: 463).

Так, для пирин-14-3-3 τ /т выбран фрейм 12405 (рисунок 6), который имеет значения RMSD по отношению к 8C30 4.9Å, объем кармана составляет 832.49, дистанция между первой цепью пирина pSER242 и первой цепью 14-3-3 ARG56 составляет 3.8Å, дистанция между первой цепью пирина pSER242 и первой цепью 14-3-3 ARG127 составляет 3.01Å, а энергия взаимодействия MMPBSA -502.548 ккал/моль.

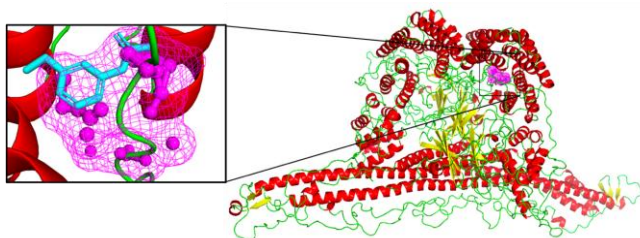


Рисунок 7.
Отобранный
фрейм
и
локализация
кармана
комплекса
пирин-14-3-3 τ /т.

Для пирин-14-3-3 ϵ /е выбран фрейм 23246 (рисунок 7), который имеет значения RMSD по отношению к 8C30 4.6Å, объем кармана составляет 499.59, дистанция между первой цепью пирина SER242 и первой цепью 14-3-3 ARG127 составляет 3.05Å, а энергия взаимодействия MMPBSA -433.0865 ккал/моль.

Моделирование мутантных вариантов белка и анализ их конформационной динамики методом классической молекулярной динамики.

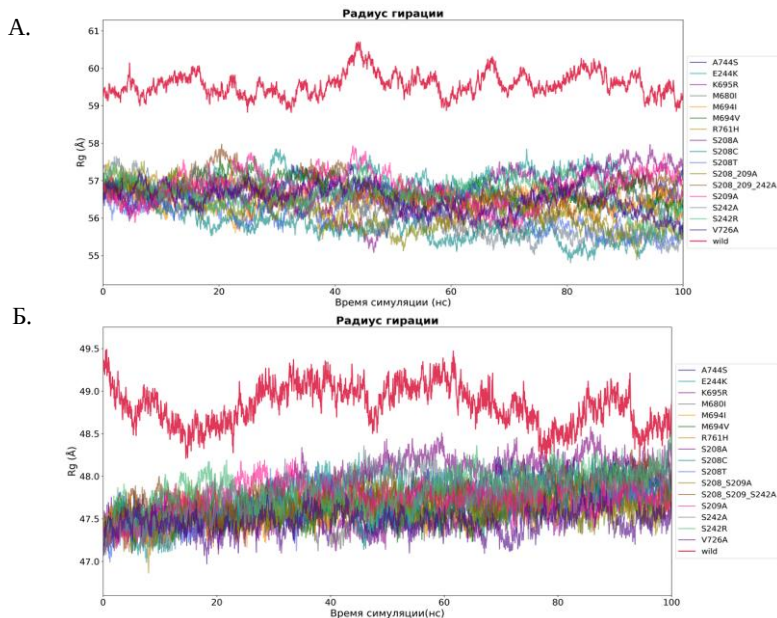


Рисунок 8. Значения радиус гирации для мутантных комплексов пирин-14-3-3 τ /т (А) и пирин-14-3-3 ϵ /е (Б), а также натива, указанный красным.

Создание мутантных структур белковых комплексов осуществлялось на основе репрезентативных фреймов, отобранных с помощью строгого алгоритма фильтрации после проведения МД симуляций.

Значения радиуса гирации (RG) для всех моделируемых вариантов оставались в узком диапазоне ($\sim 47,0$ – $48,5$ Å), что свидетельствует о том, что общая структурная компактность белка в основном сохранялась на протяжении всего моделирования

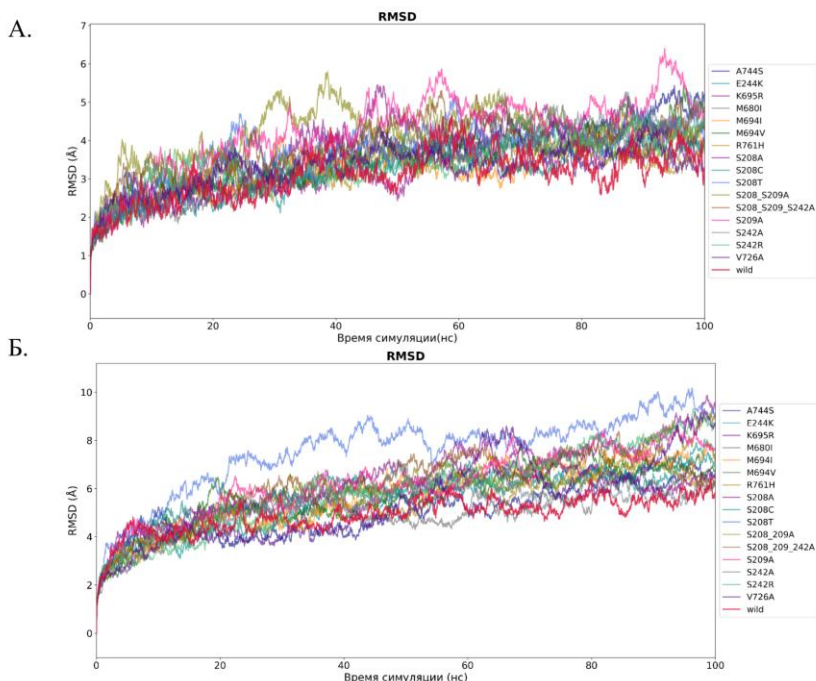


Рисунок 9. Значения RMSD для мутантных комплексов пирин-14-3-3 τ / ϵ (А) и пирин-14-3-3 ϵ / ϵ (Б), а также натива, указанный красным.

(рисунок 9). Резких или крупномасштабных отклонений обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии значительных событий разворачивания или коллапса.

Траектории RMSD демонстрировали быстрый рост в течение первых 10–20 нс, что соответствовало фазе уравнивания, когда системы адаптировались от своих исходных конформаций. Впоследствии большинство вариантов достигали относительной стабильности в пределах $\sim 3,0$ – $5,0$ Å (рисунок 9).

Профили энергии связывания по Пуассону–Больцману демонстрировали флуктуации во время моделирования. Несмотря на эти колебания, большинство вариантов сохраняли стабильно отрицательную энергию связывания, обычно в диапазоне от -250 до -450 ккал/моль. Различия между вариантами оставались умеренными, что позволяет предположить, что, хотя мутации влияют на энергетику связывания, они не ухудшают в значительной степени общую способность к связыванию.

Виртуальный скрининг комплексов пирин-14-3-3 τ/ϵ и пирин-14-3-3 ϵ/ϵ .

Виртуальный скрининг (ВС) больших молекулярных библиотек является основополагающим методом современного поиска новых лекарств. Для эффективной обработки обширных наборов данных необходим автоматизированный и распараллеленный рабочий процесс. Основная функция скрипта запуска ВС заключается в систематическом сканировании библиотеки, содержащего многочисленные молекулы лигандов, обычно предоставляемые в виде файлов sdf. Для каждого файла лиганда, скрипт запускает программу PLANET, которая выполняет фактически расчеты скрининга.

Исходя из отсутствия файлов pdb комплексов белок-лиганд после ВС, необходимо провести докинг полученных результатов. Первым этапом стала фильтрация 1.5 миллиарда соединений исходя из аффинности оценки PLANET, где пороговым значением установлено больше 7, что является допустимым значением аффинности программного пакета PLANET. После этой фильтрации для комплекса пирин-14-3-3 ϵ/ϵ отобрались 227.483.816 лигандов и в случае пирин-14-3-3 τ/ϵ – 553.466.471 лигандов.

Докинг нативных и мутантных комплексов пирин-14-3-3 τ/ϵ и пирин-14-3-3 ϵ/ϵ .

В результате моделирования докинга комплексов пирин-14-3-3 τ/ϵ и пирин-14-3-3 ϵ/ϵ были выявлены топ 10 соединений лидеров для каждого. Результаты, полученные для нативных структур, послужили основой для проведения анализа докинга для всех исследуемых мутантных комплексов, соответственно, для 16 мутаций пирин-14-3-3 τ/ϵ и пирин-14-3-3 ϵ/ϵ каждого димео комплекса.

Пирин-14-3-3 ϵ/ϵ K695R с лигандом IX_14.

Пирин-14-3-3 τ/ϵ A744S с лигандом IX_8.

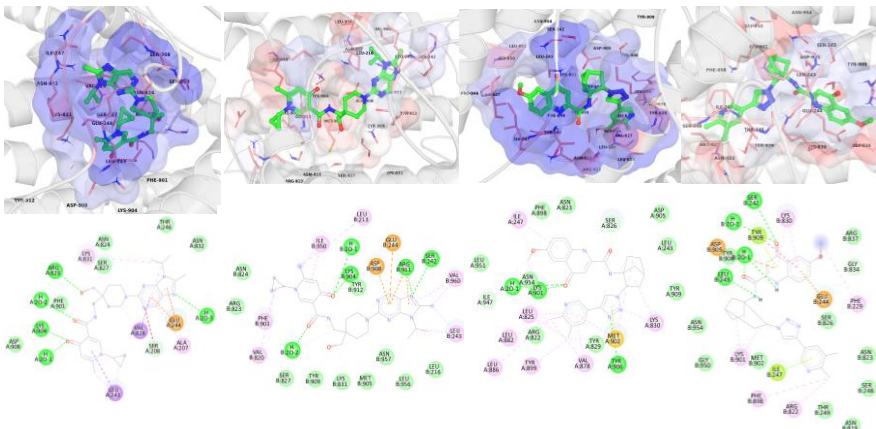


Рисунок 10. Комплексы белок–лиганд, отобранные по результатам докинга.

Для фильтрации полученных 340 комплексов как нативных структур, так и мутантных моделей был сделан анализ взаимодействия лиганда с аминокислотами сайта связывания с помощью алгоритма PLIP. После проведения анализа наших

докированных комплексов мы получили подробный список всех аминокислот, участвующих в удержании лиганда на месте, вместе с типом взаимодействия, в который вносит вклад каждая из них. Исходя из этого, мы получили 4 топ комплексов для пирин-14-3-3ε/ε и 12 топ комплексов пирин-14-3-3τ/τ.

На рисунке 10 представлены некоторые из отобранных комплексов пирин-14-3-3ε/ε и пирин-14-3-3τ/τ. Мутантная вариация пирин-14-3-3ε/ε K695R с лигандом является соединением IX_14 и отмечено взаимодействие в сайте связывания пирина SER242 с дистанцией 2.58 Å и углом 148.06°, а также ARG911 в сайте связывания 14-3-3 с дистанцией в 2.22 Å и углом 174.99°. Энергии связывания составляло для первой цепи -51.3, для второй цепи -59.07. Мутантная вариация пирин-14-3-3τ/τ A744S с лигандом IX_8 где отмечено взаимодействие в сайте связывания пирина SER242 с дистанцией 3.06 Å и углом 102.82°, а также ARG837 в сайте связывания 14-3-3 с дистанцией в 3.0 Å и углом 100.69°. Энергии связывания составляло для первой цепи -61.68, для второй цепи -65.25

Несколько соединений для двенадцати комплексов пирин-14-3-3τ/τ, в частности, IX_9 и IX_8, неоднократно отбирались среди нативного и мутантных комплексов (например, E244K, M680I, M694I, S242R и S208_S209A), что указывает на их универсальность и способность адаптироваться к структурным вариациям.

МД симуляция отобранных комплексов пирин-14-3-3τ/τ и пирин-14-3-3ε/ε.

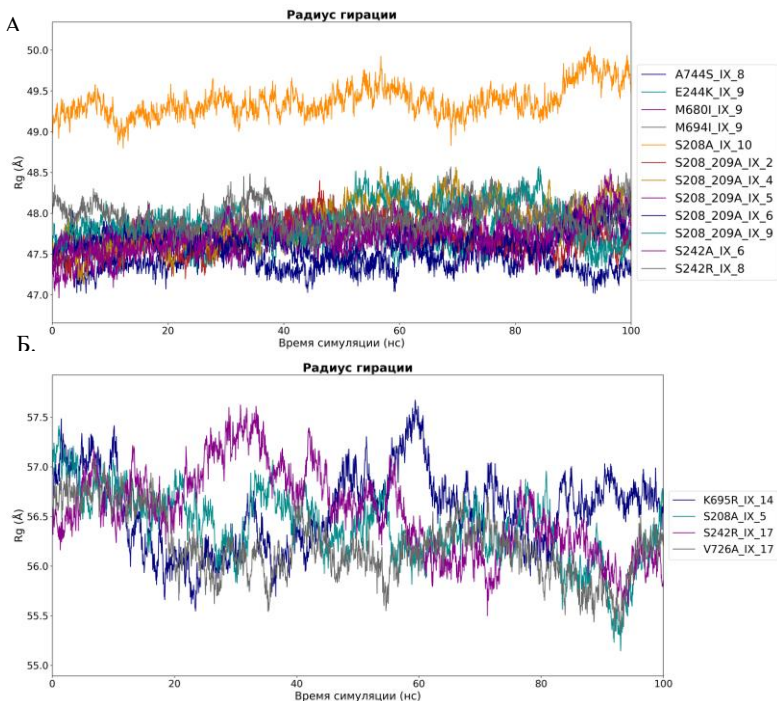


Рисунок 11. RG значения комплексов с соединениями. А: пирин-14-3-3τ/τ и Б: пирин-14-3-3ε/ε.

Для валидации и оптимизации полученных комплексов лигандов с ББВ, которые были отобраны исходя из взаимодействия с необходимыми аминокислотами в сайтах связывания, а также основываясь из энергий связывания, подверглись симуляциям МД продолжительностью в 100нс каждый.

Анализ радиуса гирации (RG) проводился для оценки общей компактности и структурной стабильности отобранных и многообещающих систем, представлен на рисунке 11. Для 12 комплексов пирин-14-3-3 τ /т большинство траекторий оставались стабильными в диапазоне 47.2–48.3 Å, показывая лишь незначительные флуктуации на протяжении всей МД симуляции. Тем самым показывает, что системы в значительной степени сохраняют свои компактные конформации без видимой структурной дестабилизации или разворачивания. Лишь у структуры S208A с лигандом IX_10 замечены относительно остальных большее значение RG, что предполагает умеренную конформационную гибкость. Для 4 комплексов пирин-14-3-3 ϵ /е все полученные результаты демонстрируют более высокие значения, в частности диапазон составляет 55.3-57.7 Å. Почти все комплексы показали значения энергии MMPBSA (рисунок 12) в диапазоне от -30 до -80 ккал/моль, что подтверждает стабильность комплекса белка с лигандом.

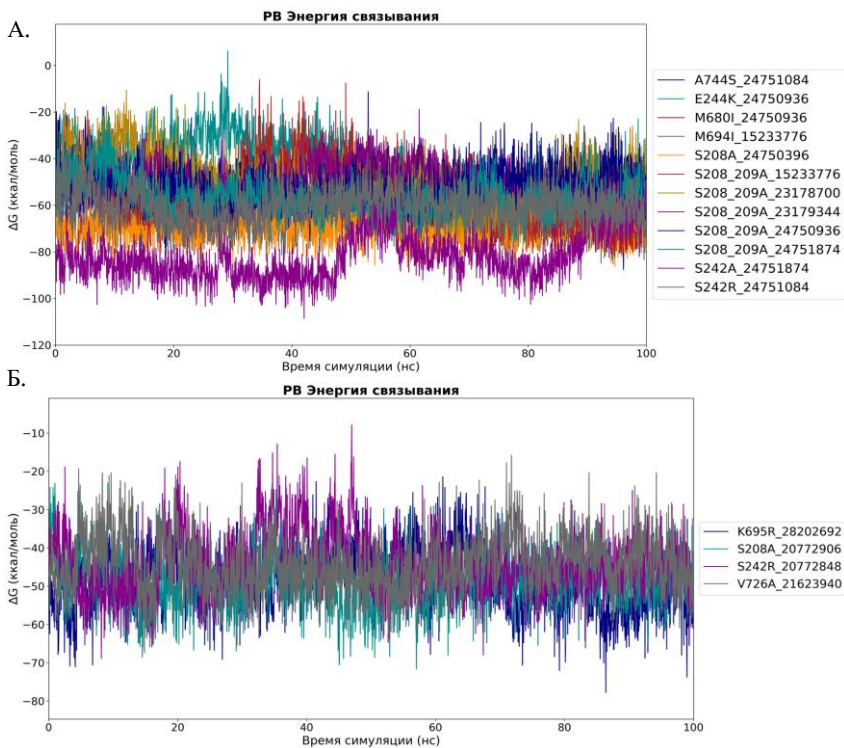


Рисунок 12. РВ значения комплексов с соединениями. А: пирин-14-3-3 τ /т и Б: пирин-14-3-3 ϵ /е.

Также имеются более стабильные и хорошие результаты, где комплексы достигают значения от -85 до -100 ккал/моль. Большинство траекторий 4 комплексов пирин-14-3-3ε остаются стабильными в диапазоне от -55 до -80 ккал/моль на протяжении всей динамики, что указывает на хорошее связывание и отсутствие событий дестабилизации. Важно отметить, что ни один из комплексов не демонстрирует сдвига в сторону положительных значений ΔG или каких-либо признаков дестабилизации, что подтверждает общую структурную стабильность комплексов в течение времени моделирования.

Исходя из всего вышеперечисленного, лиганды играют стабилизирующую роль в белково-белковом комплексе пирин-14-3-3, делая систему энергетически и структурно более выгодной и дает многообещающий потенциал для модуляции этого взаимодействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе представлено комплексное исследование *in silico* модуляции белок-белковых взаимодействий между пирином и изоформами белка 14-3-3, в частности, с упором на их важную роль в аутовоспалительных заболеваниях ССЛ и ПААНД. Исследование затрагивает аспект в современной структурной биологии, учитывая отсутствие экспериментально полученных структур для комплексов пирин-14-3-3 из-за большого размера и неструктурированных областей пирина. Используя современные вычислительные методологии, включая молекулярное моделирование, моделирование молекулярной динамики, виртуальный скрининг и молекулярный докинг, это исследование успешно прояснило структурную основу взаимодействий пирина с 14-3-3 и определило потенциальные терапевтические модуляторы. Результаты вносят существенный вклад в понимание механизмов патологических проявлений и прокладывают путь для новых стратегий открытия лекарств для ССЛ и ПААНД.

Белково-белковые взаимодействия являются основополагающими практически для всех биологических процессов, организуя клеточные функции, начиная от сигнальных путей и метаболической регуляции до репликации ДНК и иммунных реакций. Исследования продемонстрировали, что амфипатическая бороздка распознавания белков 14-3-3 стабилизирует пирин в его неактивной конформации через эти сайты фосфорилирования. Нарушение комплексообразования признано основной опорной точкой активации пирина и последующего воспаления при этих заболеваниях, позиционируя комплекс пирин-14-3-3 как цель для разработки новых терапевтических средств с помощью исследований *in silico*.

В данной диссертационной работе рассматриваются характеристики ББВ, исследование и моделирование наиболее распространенных мутантных вариаций комплексов, передовые методологии, используемые для их изучения, применение при разработке лекарств, а также присущие им проблемы и стратегии, связанные с нацеливанием на эти сложные взаимодействия.

Результаты этого всестороннего *in silico* исследования предоставили существенную информацию о взаимодействии пирин-14-3-3 и определили перспективные терапевтические кандидаты. Это исследование не только способствует пониманию механизмов аутовоспалительных заболеваний, но и обеспечивает надежную основу для будущих усилий по разработке лекарств, направленных на ССЛ и ПААНД.

ВЫВОДЫ

1. Впервые созданы и валидированы полноразмерные модели комплексов белка пирин с димерами 14-3-3ε/ε и 14-3-3τ/τ, что имеет как теоретическое, так и практическое значение для дальнейших разработок лекарственных препаратов.
2. На основе кристаллографических данных разработан алгоритм фильтрации для извлечения оптимальных конформационных состояний из траекторий молекулярной динамики о взаимодействии пирин–14-3-3.
3. Проведено моделирование мутантных вариаций, с использованием выбранных конформаций комплексов пирин–14-3-3ε/ε и пирин–14-3-3τ/τ, ассоциированных с ССЛ и ПААНД, позволившие выяснить, как патогенные замены нарушают стабильность комплекса и изменяют интерфейс взаимодействия.
4. В ходе виртуального скрининга были выявлены десять наиболее перспективных соединений-кандидатов для каждого из комплексов пирин–14-3-3ε/ε и пирин–14-3-3τ/τ, которые впоследствии были подвергнуты молекулярному докингу со всеми 16 мутантными вариациями. И из 340 полученных структур были выбраны четыре структуры для комплекса пирин–14-3-3ε/ε и двенадцать для комплекса пирин–14-3-3τ/τ, исходя из их взаимодействия с критически важными остатками сайта связывания.
5. Проведено моделирование молекулярной динамики комплексов пирин–14-3-3ε/ε и пирин–14-3-3τ/τ с отобранными лигандами для оценки влияния соединений на стабильность взаимодействия пирин с белками 14-3-3. Полученные результаты подтвердили способность исследуемых модуляторов стабилизировать данные белок-белковые взаимодействия.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **Paronyan A**, Muradyan N, Sargsyan A, Arakelov V, Arakelov G, Nazaryan K. In Silico Study of Pyrin and 14-3-3 Protein Modulation During FMF and PAAND. ACS Omega. 2025 Jan 23;10(4):3462-3473. doi: 10.1021/acsomega.4c07386. PMID: 39926484; PMCID: PMC11799992.
2. Muradyan NG, Sargsyan AA, Arakelov VG, **Paronyan AK**, Arakelov GG, Nazaryan KB. [πDMD Simulation as a Strategy for Refinement of AlphaFold2 Modeled Fuzzy Protein Complexes Structures]. Mol Biol (Mosk). 2025 Mar-Apr;59(2):277-287. Russian. doi: 10.31857/S0026898425020095. PMID: 40558039.
3. Sargsyan AA, Muradyan NG, Arakelov VG, **Paronyan AK**, Arakelov GG, Nazaryan KB. [In silico Screening of Protein-Protein Interaction Modulators Using the p53 and 14-3-3γ Proteins as an Example]. Mol Biol (Mosk). 2025 May-Jun;59(3):505-514. Russian. doi: 10.31857/S0026898425030111. PMID: 40864864.
4. **Паронян А. К.** Сравнительный анализ программ предсказания структур белков на примере 14-3-3 // Вестник Российско-Армянского (Славянского) университета

(серия: физико-математические и естественные науки). 2024. №1, стр. 56-60. DOI 10.24412/1829-0450-fm-2024-1-56-60.

5. **Паронян А.К.** “De novo”-дизайн пептидов в качестве потенциальных модуляторов белка 14-3-3 // Вестник Российско-Армянского (Славянского) университета (серия: физико-математические и естественные науки). 2024. №2, стр. 80-93. DOI 10.24412/1829-0450-fm-2024-2-80-93.
6. **Паронян А.К.**, Аракелов Г.Г., Назарян К.Б. In silico исследование молекулярных механизмов ССЛ и ПААНД. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2022» М.: МАКС Пресс, 2022. ISBN 978-5-317-06824-0
7. Nelli Muradyan, **Adrine Paronyan**, Arsen Sargsyan, Vahram Arakelov, Grigor Arakelov, Karen Nazaryan. Combining AlphaFold2 and MD Simulations to Elucidate 14-3-3-Mediated Assembly of IDR Containing Proteins. ISFMS2025-The 5th International Symposium on Frontiers in Molecular Science. 26–29 August 2025, p.20

ՊԱՐՈՆՅԱՆ ԱԴՐԻՆԵ ԿԱՐԵՆ

ՊԵՐԻՆԻ և 14-3-3 ՍՊԵՏԱԿՈՒՑԻ ԻԶՈՖՈՐՄՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶՂԵՑՈՒԹՅԱՆ ՍՈՂՈՒԼՅԱՏՈՂՆԵՐԻ IN SILICO ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆ

ԱՄՓՈՓՈՒՐ

Բանալի բաներ՝ պիրին, 14-3-3, սպիտակուց-սպիտակուց փոխազդեցություն, մոդուլյատորներ, մոլեկուլային դինամիկա, վիրտուալ սկրինինգ, FMF, PAAND, ինֆլամատ:

Աշխատանքի արդիականությունը պայմանավորված է պիրին և 14-3-3 սպիտակուցների փոխազդեցության դերով աուտոբոբբոբային հիվանդությունների՝ FMF-ի և PAAND-ի զարգացման մեջ: Նորմալ պայմաններում պիրինի ակտիվությունը վերահսկվում է 14-3-3 սպիտակուցների հետ ֆոսֆորիլացումից կախված կապմամբ, որը պահպանում է պիրինը ոչ ակտիվ վիճակում: Այս փոխազդեցության խախտումը համարվում է FMF-ի և PAAND-ի պայթյունների կարևոր մեխանիզմ:

Մարդու 14-3-3 սպիտակուցների ընտանիքը ներառում է յոթ իզոֆորմ, որոնցից աշխատանքում ուսումնասիրվել են τ և ϵ իզոֆորմները: Պիրինի և 14-3-3-ի կապումը հիմնականում իրականացվում է SER208, SER209 և SER242 սերինային մնացորդների ֆոսֆորիլացման միջոցով: 14-3-3 սպիտակուցները ճանաչում են այս ֆոսֆոսերինային հատվածները և կայունացնում պիրինի ոչ ակտիվ կոնֆորմացիան: Հետևաբար, պիրին-14-3-3 համալիրը կարող է դիտարկվել որպես նոր թերապևտիկ միջամտության հեռանկարային թիրախ:

Աշխատանքի նպատակն էր *in silico* մեթոդներով ուսումնասիրել պիրինի և 14-3-3 τ/ϵ ու ϵ/ϵ իզոֆորմների փոխազդեցությունը՝ հայտնաբերելու ցածրամոլեկուլային միացություններ, որոնք կարող են կայունացնել այդ

սպիտակուց-սպիտակուց փոխազդեցությունը: Այդ նպատակով մոդելավորվել են պիրին-14-3-3 τ և պիրին-14-3-3 ϵ լիազափ կառուցվածքային մոդելներ, ուսումնասիրվել է դրանց կայունությունն ու դինամիկան, իրականացվել են վիրտուալ սքրինինգ, մոլեկուլային դոքինգ և մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաներ:

Ուսումնասիրվել են պիրինի 16 մուտացիաներ, ներառյալ 14-3-3-ի հետ կապումը խանգարող, ֆոսֆորիլացման վայրերի, ինչպես նաև PAAND-ի և FMF-ի հետ ասոցացված մուտացիաները:

Մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաները կատարվել են Amber 22 և OpenMM 8.0.0 ծրագրերով: Նատիվ ֆոսֆորիլացված համալիրների համար իրականացվել է 2 միկրովայրկյան տևողությամբ սիմուլյացիա: Արդյունքները ցույց են տվել, որ երկու համալիրներն էլ հասնում են հարաբերական հավասարակշռության և պահպանում են կառուցվածքային կայունությունը: Հատկապես կարևոր է եղել pSER242 մնացորդի մասնակցությունը 14-3-3 սպիտակուցի ARG56/ARG57 և ARG127/ARG130 մնացորդների հետ փոխազդեցություններում:

Մոդելների վավերացման համար դրանք համեմատվել են Protein Data Bank-ում առկա պիրինի ֆոսֆորիլացված կարճ պեպտիդների և 14-3-3-ի համալիրների փորձարարական կառուցվածքների հետ: Ֆիլտրման ալգորիթմի միջոցով ընտրվել են ներկայացուցչական կոնֆորմացիաները. պիրին-14-3-3 τ համալիրի համար՝ 12405-րդ ֆրեյմը, իսկ պիրին-14-3-3 ϵ համալիրի համար՝ 23246-րդ ֆրեյմը: Դրանք օգտագործվել են մուտանտային մոդելների կառուցման, վիրտուալ սքրինինգի և դոքինգի համար:

Հետազոտության կարևոր փուլերից էր Enamine տվյալների շտեմարանի մոտ 1.5 միլիարդ միացությունների վիրտուալ սքրինինգը, որն իրականացվել է PLANET հարթակի միջոցով: Նախնական ֆիլտրումից հետո ընտրված բարձր աֆինություն ունեցող միացությունները ենթարկվել են ճկուն մոլեկուլային դոքինգի MedusaDock 2.0 ծրագրով:

Դոքինգի և հետագա վերլուծությունների արդյունքում ընտրվել են առավել խոստումնալից համալիրներ՝ 4-ը պիրին-14-3-3 ϵ և 12-ը պիրին-14-3-3 τ համակարգերի համար: Պիրին-14-3-3 ϵ համալիրի դեպքում առանձնացել է IX_17 միացությունը, իսկ պիրին-14-3-3 τ համալիրի դեպքում՝ IX_9 և IX_8 միացությունները, որոնք բարենպաստ կապման էներգիաներ են ցուցաբերել ինչպես նատիվ, այնպես էլ մի շարք մուտանտային համակարգերում:

Ընտրված սպիտակուց-լիգանդ համալիրները ենթարկվել են 100 նս տևողությամբ մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաների: RMSD-ի, RG, ջրածնային կապերի և MMPBSA/GBSA էներգիաների վերլուծությունը ցույց է տվել, որ լիգանդների առկայությամբ պիրին-14-3-3 համալիրները հիմնականում պահպանում են կառուցվածքային կայունությունը: Կապման էներգիաների մեծ մասը եղել է բարենպաստ՝ մոտավորապես -30-ից -80 կկալ/մոլ միջակայքում, իսկ որոշ դեպքերում՝ մինչև -85 և -100 կկալ/մոլ: Սա վկայում է, որ ընտրված միացությունները կարող են կայունացնել պիրին-14-3-3 փոխազդեցությունը և տեսականորեն կանխել պիրինային ինֆլամատոմի ակտիվացումը:

Աշխատանքի գիտական նորույթն այն է, որ առաջին անգամ ստեղծվել և վավերացվել են պիրին-14-3-3 համալիրների լիաչափ կառուցվածքային մոդելներ, մինչդեռ առկա փորձարարական տվյալներում պիրինը ներկայացված է միայն կարճ պեպտիդային հատվածներով: Բացի այդ, մոդելավորվել են հիվանդությունների հետ ասոցացված 16 մուտանտային տարբերակներ, իրականացվել է լայնածավալ վիրտուալ սքրինինգ և ընտրվել են պիրին-14-3-3 փոխազդեցությունը կայունացնելու ներուժ ունեցող մոդուլյատորներ:

Այսպիսով, աշխատանքը ներկայացնում է պիրին-14-3-3 սպիտակուց-սպիտակուց փոխազդեցության համալիրի *in silico* ուսումնասիրություն: Ստացված արդյունքները խորացնում են FMF-ի և PAAND-ի մոլեկուլային մեխանիզմների ըմբռնումը և կարող են հիմք հանդիսանալ նոր դեղամիջոցների նախագծման համար: Ընտրված միացությունները դիտարկվում են որպես պոտենցիալ թերապևտիկ մոդուլատորներ, որոնք կարող են կայունացնել պիրին-14-3-3 համալիրը և կանխել բորբոքային գործընթացների ակտիվացումը:

PARONYAN ADRINE

IN SILICO STUDY OF MODULATORS OF THE INTERACTION BETWEEN PYRIN AND 14-3-3 PROTEIN ISOFORMS

ABSTRACT

Keywords: pyrin, 14-3-3, protein-protein interaction, modulators, molecular dynamics, virtual screening, FMF, PAAND, inflammasome.

The relevance of this work is determined by the role of the interaction between pyrin and 14-3-3 proteins in the development of autoinflammatory diseases, namely FMF and PAAND. Under normal conditions, pyrin activity is regulated through phosphorylation-dependent binding to 14-3-3 proteins, which maintains pyrin in an inactive state. Disruption of this interaction is considered an important mechanism in the pathogenesis of FMF and PAAND.

The human 14-3-3 protein family includes seven isoforms, of which the τ and ϵ isoforms were studied in this work. The interaction of pyrin with 14-3-3 is primarily mediated by phosphorylation of the serine residues SER208, SER209, and SER242. The 14-3-3 proteins recognize these phosphoserine regions and stabilize the inactive conformation of pyrin. Therefore, the pyrin-14-3-3 complex may be considered a promising target for novel therapeutic intervention.

The aim of this work was to study, using *in silico* methods, the interaction between pyrin and the 14-3-3 τ/τ and ϵ/ϵ isoforms in order to identify low-molecular-weight compounds that may stabilize this protein-protein interaction. For this purpose, full-length structural models of the pyrin-14-3-3 τ/τ and pyrin-14-3-3 ϵ/ϵ complexes were modeled, their stability and dynamics were investigated, and virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics simulations were performed.

Sixteen pyrin mutations were studied, including mutations disrupting binding to 14-3-3, mutations at phosphorylation sites, as well as mutations associated with PAAND and FMF.

Molecular dynamics simulations were performed using Amber 22 and OpenMM 8.0.0. For the native phosphorylated complexes, a 2-microsecond simulation was carried out. The

results showed that both complexes reached relative equilibrium and maintained structural stability. Particularly important was the involvement of the pSER242 residue in interactions with ARG56/ARG57 and ARG127/ARG130 residues of the 14-3-3 protein.

To validate the models, they were compared with experimental structures of complexes between 14-3-3 and phosphorylated short pyrin peptides available in the Protein Data Bank. Using a filtering algorithm, representative conformations were selected: frame 12405 for the pyrin-14-3-3 τ/τ complex and frame 23246 for the pyrin-14-3-3 ϵ/ϵ complex. These conformations were used for the construction of mutant models, virtual screening, and docking.

One of the important stages of the study was the virtual screening of approximately 1.5 billion compounds from the Enamine database, performed using the PLANET platform. After preliminary filtering, the selected high-affinity compounds were subjected to flexible molecular docking using MedusaDock 2.0.

As a result of docking and subsequent analyses, the most promising complexes were selected: 4 for the pyrin-14-3-3 ϵ/ϵ system and 12 for the pyrin-14-3-3 τ/τ system. In the case of the pyrin-14-3-3 ϵ/ϵ complex, compound IX_17 stood out, while in the case of the pyrin-14-3-3 τ/τ complex, compounds IX_9 and IX_8 were distinguished. These compounds demonstrated favorable binding energies in both the native and several mutant systems.

The selected protein-ligand complexes were subjected to 100 ns molecular dynamics simulations. Analysis of RMSD, RG, hydrogen bonds, and MMPBSA/GBSA energies showed that, in the presence of ligands, the pyrin-14-3-3 complexes generally maintained structural stability. Most binding energies were favorable, approximately in the range of -30 to -80 kcal/mol, and in some cases reached -85 and -100 kcal/mol. This indicates that the selected compounds may stabilize the pyrin-14-3-3 interaction and theoretically prevent activation of the pyrin inflammasome.

The scientific novelty of this work lies in the fact that, for the first time, full-length structural models of pyrin-14-3-3 complexes were created and validated, whereas in the available experimental data pyrin is represented only by short peptide fragments. In addition, 16 disease-associated mutant variants were modeled, large-scale virtual screening was performed, and modulators with the potential to stabilize the pyrin-14-3-3 interaction were selected.

Thus, this work presents an *in silico* study of the pyrin-14-3-3 protein-protein interaction complex. The obtained results deepen the understanding of the molecular mechanisms of FMF and PAAND and may serve as a basis for the design of new drugs. The selected compounds are considered potential therapeutic modulators that may stabilize the pyrin-14-3-3 complex and prevent activation of inflammatory processes.

