

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Паронян Адриане Кареновны

**«In silico исследование модуляторов взаимодействия
пирина с изоформами белка 14-3-3»**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.00.02 - Биофизика, биоинформатика

Диссертационная работа Паронян Адриане Кареновны посвящена актуальной задаче современной молекулярной биофизики и структурной биоинформатики - выяснению молекулярных механизмов взаимодействия белка пирин с изоформами 14-3-3 и поиску низкомолекулярных соединений, способных стабилизировать этот белок-белковый комплекс. Выбор объекта исследования хорошо обоснован. Пирин является продуктом гена MEFV, мутации которого связаны с семейной средиземноморской лихорадкой и пирин-ассоциированным аутовоспалением с нейтрофильным дерматозом. Зависимое от фосфорилирования связывание пирин с белками семейства 14-3-3 поддерживает пирин в неактивном состоянии, тогда как нарушение данного взаимодействия может способствовать неконтролируемой активации инфламмосомы и развитию воспалительного ответа.

Особую сложность исследуемой проблемы определяют крупный размер пирин, наличие в нем протяженных неупорядоченных участков, отсутствие экспериментальной полноразмерной структуры комплекса и необходимость учитывать фосфорилирование, изоформ-специфичность и патогенные варианты белка. В этих условиях сочетание предсказания структуры, длительной молекулярной динамики, анализа конформационных ансамблей, виртуального скрининга и гибкого докинга является логичным и современным подходом. Работа одновременно решает фундаментальную задачу описания структурно-динамической организации комплекса пирин-14-3-3 и прикладную задачу отбора соединений для последующей экспериментальной проверки. Поэтому актуальность диссертации не вызывает сомнений.

Цель работы сформулирована как *in silico* исследование молекул-модуляторов взаимодействия изоформ 14-3-3 с пирин. Для ее достижения соискателем поставлен последовательный комплекс задач: построение полноразмерных моделей нативных комплексов пирин-14-3-3 τ/τ и пирин-14-3-3 ϵ/ϵ ; исследование их конформационной устойчивости; скрининг большой библиотеки химических

соединений; гибкий докинг отобранных кандидатов к нативным и мутантным вариантам; проверка поведения наиболее перспективных тройных комплексов методом молекулярной динамики. Поставленные задачи взаимосвязаны и в целом адекватны заявленной цели.

Сильной стороной замысла является переход от предсказанной статической структуры к конформационному ансамблю, затем - к анализу патогенных замен и, наконец, к поиску химических модуляторов интерфейса. Тем самым диссертация не ограничивается демонстрацией возможности структурного моделирования, а формирует целостный вычислительный маршрут от биологической гипотезы до набора проверяемых молекулярных кандидатов.

Диссертация изложена на 149 страницах, содержит 51 рисунок и 8 таблиц; список литературы включает 145 источников. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения, содержащего 2 рисунка и 11 таблиц, и завершается **Выводами**. Такая структура соответствует логике выполненного исследования.

Глава 1 содержит **Обзор литературы**, в котором систематизированы сведения о строении и функциях пирина и белков семейства 14-3-3, молекулярных механизмах семейной средиземноморской лихорадки и ПААНД, роли белок-белковых взаимодействий в патогенезе и возможностях фармакологической модуляции интерфейсов. Обзор подводит к постановке конкретной структурной задачи и показывает, почему получение полноразмерной модели комплекса имеет самостоятельную научную ценность.

Методы и материалы представлены в **Главе 2** и, в частности, включают в себя методы предсказания комплексов с помощью AlphaFold 2.3.2 Multimer, дискретную и классическую молекулярную динамику с использованием программных пакетов AMBER 22 и OpenMM 8.0, силовых полей ff19SB, phosaa19SB и GAFF2, а также водной модели OPC. Для анализа траекторий описываются такие часто используемые параметры, как RMSD, RMSF, радиус гирации, межкостаточные расстояния и водородные связи. Также описаны такие методы оценки свободной энергии связывания белок – белок, как MM/GBSA и MM/PBSA. В **Главе 2** также описаны методы анализа центров связывания лиганд – белок с помощью программного пакета MDpocket и ряд других методов анализа траекторий, мутаций и т.п.

В Главе 3, **Результаты и обсуждение** подробно представлены исследования, выполненные по теме диссертации. На первом этапе были получены полноразмерные модели комплексов пирин с гомодимерами изоформ 14-3-3 τ и 14-3-3 ϵ . Проведено сопоставление предсказанных структур с доступными кристаллографическими структурами и фрагментами, включая 2WL1, 4CG4 и комплекс 14-3-3/Pyrin-pSer242 (8C30). После введения фосфорилированных остатков Ser208, Ser209 и Ser242 нативные комплексы исследованы в двухмикросекундных траекториях. Анализ нескольких структурных показателей свидетельствует о сохранении комплекса и позволяет выделить репрезентативные конформации с учетом геометрии интерфейса, параметров связывающего кармана и энергетических оценок.

На следующем этапе на основе отобранных конформаций смоделированы 16 вариантов пирин. В набор включены замены, непосредственно затрагивающие фосфорилируемые участки и связывание с 14-3-3, а также варианты, ассоциированные с ПААНД и семейной средиземноморской лихорадкой. По данным молекулярной динамики оценены изменения компактности, отклонения структуры и энергетики комплексообразования. Сравнение двух изоформ 14-3-3 и большого набора патогенных вариантов является важной частью работы, поскольку позволяет обсуждать не только локальные, но и возможные аллостерические эффекты мутаций.

Существенный вычислительный объем связан с виртуальным скринингом приблизительно 1,5 млрд соединений. После виртуального скрининга и докинга нативных и мутантных комплексов пирин-14-3-3 τ /т и пирин-14-3-3 ϵ /е для каждого нативного комплекса были отобраны десять лидирующих лигандов; их докинг выполнен также для всех мутантных вариантов. Из 340 полученных структур после анализа контактов и энергетических характеристик выделены четыре комплекса для изоформы ϵ и двенадцать - для изоформы τ . Для этих систем выполнены 100-наносекундные траектории, показавшие сохранение общей компактности и отрицательные оценки MM/PBSA для белок-лигандного связывания. Повторное появление соединений IX_8 и IX_9 среди разных вариантов может свидетельствовать об устойчивости выбранного химического каркаса к изменениям рецепторного интерфейса.

Научная новизна данной работы обусловлена следующими факторами:

1. Вычислительно построены и валидированы полноразмерные модели комплексов пирин с гомодимерами изоформ 14-3-3 ϵ и 14-3-3 τ , тогда как

экспериментальные структуры представляют лишь короткие фосфорилированные фрагменты пирина.

2. Предложен маршрут фильтрации конформаций из длительных траекторий с опорой на экспериментально известную геометрию интерфейса и положение связывающего кармана.
3. В единой вычислительной схеме сопоставлены нативные комплексы и 16 вариантов пирина, включая замены, ассоциированные с семейной средиземноморской лихорадкой и ПААНД.
4. Выполнен чрезвычайно масштабный виртуальный скрининг библиотеки соединений с последующим гибким докингем, анализом контактов и молекулярно-динамической проверкой лидирующих комплексов.
5. Сформирован набор потенциальных стабилизаторов интерфейса пирин-14-3-3, пригодный для последующей экспериментальной верификации.

Следует подчеркнуть, что новизна последнего результата относится именно к вычислительному уровню: установление терапевтической эффективности требует биохимической, клеточной и далее доклинической проверки. В диссертации кандидаты обоснованно рассматриваются как перспективные модуляторы, а не как готовые лекарственные вещества.

Теоретическое значение работы состоит в расширении структурных представлений о регуляции пирина белками 14-3-3 и о возможной роли изоформ-специфичности и патогенных замен в устойчивости комплекса. Полученные модели и траектории могут использоваться для постановки более узких гипотез о контактах pSer242, динамике неупорядоченных сегментов и дальних аллостерических эффектах вариантов С-концевого домена пирина. Практическое значение заключается в создании воспроизводимой вычислительной схемы отбора стабилизаторов белок-белкового интерфейса и в сужении исходного химического пространства до ограниченного числа соединений. Результаты могут служить основой для биофизических измерений связывания, тестов стабилизации комплекса, клеточных анализов активности инфламмосомы и последующей химической оптимизации. Самостоятельную ценность имеют построенные модели мутантных комплексов и критерии отбора репрезентативных кадров траектории.

Результаты работы докладывались на международных и республиканских научных конференциях и обсуждались на профильных семинарах. По теме

диссертации опубликовано семь работ, включая пять статей и два материала конференций. Среди них имеется статья по непосредственной теме диссертации в журнале ACS Omega, публикации по методическим аспектам моделирования комплексов 14-3-3 и виртуального скрининга, а также работы, в которых соискатель является первым или единственным автором. Представленный публикационный материал в целом отражает основные направления и результаты исследования.

Работа представляет собой законченное и хорошо оформленное научное исследование, которое, однако, не свободно от следующих второстепенных недостатков:

1. Полноразмерный пирин содержит протяженные внутренне неупорядоченные области, для которых локальные оценки AlphaFold могут быть низкими, а единственная статическая модель не обязательно представляет реальный ансамбль. Сопоставление с кристаллографическими фрагментами убедительно валидирует локальный интерфейс, но само по себе не подтверждает глобальную укладку всех неупорядоченных сегментов.
2. Для нативных комплексов приведены траектории длительностью 2 мкс, однако из текста работы не вполне ясно, выполнялись ли независимые повторные расчеты для получения статистического распределения полученных результатов.
3. Энергии MM/GBSA и MM/PBSA используются в работе как важный критерий отбора, хотя их результаты целесообразно рассматривать скорее как относительный показатель внутри единообразно рассчитанного ряда. Возможно, их следовало бы дополнить такими более точными методами расчета, как зонтичная выборка, или термодинамическое интегрирование.
4. Сохранение лиганда в кармане и отрицательная энергия белок-лигандного связывания еще не являются прямым доказательством стабилизации самого белок-белкового контакта. Наиболее строгая проверка потребовала бы сопоставления энергии и геометрии взаимодействия пирин-14-3-3 в бинарном и тройном комплексах, нескольких независимых траекторий, контроля с заведомо неактивными лигандами и расчета относительной стабилизации интерфейса.

Приведенные замечания направлены главным образом на уточнение границ применимости вычислительных выводов и повышение воспроизводимости

описания. Они не затрагивают общую положительную оценку диссертационной работы.

Диссертационная работа Паронян Адриане Кареновны «In silico исследование модуляторов взаимодействия пирин с изоформами белка 14-3-3» представляет собой завершенное, самостоятельное научно-квалификационное исследование. В работе решена актуальная задача структурного моделирования биологически и медицински значимого белок-белкового комплекса, исследована динамика его нативных и мутантных вариантов и предложены низкомолекулярные соединения для дальнейшей экспериментальной проверки. Полученные результаты обладают научной новизной, теоретической и практической значимостью; выводы в целом соответствуют поставленным задачам и представленному фактическому материалу.

По тематике, методологии, содержанию, уровню научной новизны и значимости результатов диссертация полностью соответствует требованиям к кандидатским диссертациям по специальности 03.00.02 - Биофизика, биоинформатика. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы, а ее автор, Паронян Адриане Кареновна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 - Биофизика, биоинформатика.

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук,

Е. Ш. Мамасахлисов

ведущий научный сотрудник Института прикладных проблем физики НАН РА

Подпись: _____

Дата: «19» августа 2026 г.

Подпись официального оппонента заверяю:

ученый секретарь ИППФ, А.А. Назметян

