

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՌԱՔԵԼՈՎ ԳՐԻԳՈՐ ԳԱԼՈՒՍԻ

ՊԻՐԻՆԻ ԵՐՐՈՐԴԱԿԱՆ ԿԱՐՈՒՑՎԱԾՔԻ *DE NOVO* ՍՈՂԵԼԱՎՈՐՈՒՄ ԵՎ ՆՐԱ  
ՓՈԽԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ԱՊՈՊՏՈԶԻ ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՀԵՏ

Գ.00.16 – Կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

ԵՐԵՎԱՆ 2015

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АРАКЕЛОВ ГРИГОР ГАЛУСТОВИЧ

*DE NOVO* МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПИРИНА И ДИНАМИКА  
ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БЕЛКАМИ АПОПТОЗА

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.16 – Биоинформатика

ЕРЕВАН 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝

կենս. գիտ. դոկտոր,  
Կ.Բ. Նազարյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կենս. գիտ. դոկտոր,  
պրոֆեսոր Տ.Ֆ. Սարգսյան  
կենս. գիտ. թեկնածու,  
Ա.Է. Գևորգյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Միջազգային գիտակրթական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015թ. հունիսի 30-ին, ժամը 14<sup>00</sup>-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-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 2015թ. մայիսի 29-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,  
профессор Т.Ф. Саркисян  
кандидат биол. наук,  
А.Э. Геворгян

Ведущая организация: Международный научно-образовательный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 30-го июня 2015г., в 14<sup>00</sup> 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 29-го мая 2015г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051  
кандидат биологических наук, доцент



М.А. Парсаданян

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Семейная Средиземноморская Лихорадка (ССЛ), является одним из самых распространённых аутовоспалительных синдромов. В мире им страдают более 100000 людей [Kastner, 2005; Siegal, 1945; Drenth et al, 2001]. Заболевание встречается преимущественно у определённых этнических групп, относящихся к народам средиземноморского бассейна: армян, евреев-сефардов, арабов и некоторых других национальностей [Kuijk et al, 2008]. ССЛ является аутосомно-рецессивным заболеванием, причина его манифестации — наличие мутантного гена MEFV, который был обнаружен в 1997 г. и располагается в коротком плече 16-ой хромосомы (16p13.3) [The French FMF Consortium, 1997; The International FMF Consortium, 1997; Pras et al, 1992]. ССЛ развивается у гомозигот по MEFV, согласно данным на 2015 год известно 305 мутаций указанного гена. Частота гетерозиготного носительства ССЛ различна в различных популяциях, у армян эта цифра довольно высокая, так, каждый пятый армянин является носителем одной из мутаций MEFV [Sarkisian et al, 2008]. Наибольшее число мутаций приходится на второй и десятый экзоны гена MEFV. У подавляющего большинства больных ССЛ отмечают 8 основных мутаций: E148Q, M680I, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H [Centola, 1998]. Наиболее часто встречаемой мутацией является M694V, которая становится причиной болезни в 80% случаев [Medlej-Hashim et al., 2011]. Наличие M694V мутации считают фактором, способствующим и обуславливающим тяжелое течение ССЛ, с ранней манифестацией заболевания, частыми приступами, высоким риском суставных деструкций, развитием рожеподобной эритемы и более высокому риску развития амилоидоза. Мутации M680I, V726A и E148Q, по сравнению с M694V, ассоциированы с средним, а в некоторых случаях лёгким, доброкачественным течением заболевания [Diaz et al, 2004]. Извыше перечисленных 8-и наиболее распространенных мутаций: V726A, M694V, M694I, M680I и E148Q, составляют пул наиболее распространенных мутаций у народов средиземноморья и составляют 74% из всех случаев заболевания ССЛ в этих популяциях.

Одним из особенностей ССЛ является наличие комплексных аллелей и в этом случае причиной манифестации болезни становится наличие более одной мутации в одной и той же аллели. При комплексных аллельных мутациях продукт гена MEFV – белок пирин, будет содержать более одной мутированной аминокислоты. Известны следующие мутации комплексных аллелей - L110P-E148Q, E148Q-S179N, E148Q-P369S, E148Q-P369S-R408Q, E148Q-I692DEL, E148Q-M694I, E148Q-M694V, E148Q-V726A, E148Q-A744S, E148Q-R761H, E148Q-V726A-R761H, E167D-F479L, I640M-R653H, M680I-M694I [Milhavel et al, 2008].

Другой особенностью ССЛ является наличие и доминантных мутаций. Несмотря на то, что основным видом наследования при ССЛ является аутосомно-рецессивный, имеются исследования в которых показано, что ССЛ может также наследоваться доминантно. В настоящее время известны следующие доказанные доминантные мутации: H478Y, T577N, T577S, M694del, E148Q-P369S, E148Q-M694I. Также имеются некоторые мутации (R653H, M694V, V726A), доминантное наследование которых, доказано не полностью и они в настоящее время считается псевдо-доминантными [Booth et al, 2000].

В норме в результате экспрессии гена MEFV образуется белок пирин, состоящий из 781 аминокислотного остатка [Aldea et al, 2004; Mansfield et al, 2001]. Вторичная структура пирина представлена 3 доменами и 2 мотивами: 1) N-концевой домен - DAPIN, расположенный в позиции 1-92 аминокислотной последовательности белка; 2) bZIP базовый домен (266-280); 3) мотив - B-box type zinc-finger (370 – 412); 4) предполагаемый мотив NLS (420-437), состоящий из двух перекрывающихся сигналов ядерной локализации; 5) C-концевой домен B30.2 (580 – 775), который можно подразделить на 2 субдомена: N-концевой Prγ и C-концевой Spγ. Трёхмерная структура всего белка неизвестна, а из всех вышеперечисленных доменов экспериментально изучена третичная структура только двух: DAPIN – с помощью ядерного магнитного резонанса (PDB id: 2MPC) [Vajjhala et al, 2015] и B30.2 – с помощью рентгеноструктурного анализа (PDB id:

2WL1) [Weinert et al, 2009]. Функционально домен В30.2 интересен тем, что в нем локализованы 7 из 8 наиболее распространенных мутаций, ассоциированных с ССЛ. Известно, что все домены и мотивы пирина, прямым или косвенным образом вовлечены в процесс белок-белкового взаимодействия с белками апоптоза, регулируя тем самым каскад воспалительных реакций. Домен DAPIN был обнаружен у более чем 20 белков участвующих в регуляции воспаления и апоптоза [Bertin et al, 2000; Martinon, et al, 2001]. Посредством DAPIN - DAPIN взаимодействий пирин может взаимодействовать с другими белками, имеющие домен DAPIN, к их числу относится ASC (Apoptosis Associated Speck-Like Protein With a CARD). Взаимодействие пирина с ASC имеет важное значение в регуляции активности каспазы-1 и, соответственно, экспрессии ИЛ-1 $\beta$ . Образование ИЛ-1 $\beta$ , пирин может регулировать так же через непосредственное взаимодействие С-концевого В30.2 домена с каспазой-1. Домен В30.2 взаимодействует с каспазой-1, ингибируя последнюю, что приводит к подавлению пролиферации ИЛ-1 $\beta$  и к запуску аутовоспалительного процесса [Jae et al, 2009].

Из вышесказанного следует, что исследование белка пирина, мутации которого являются причиной манифестации ССЛ, весьма актуально для выявления молекулярных механизмов развития ССЛ.

### Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы являлось изучение методами компьютерного моделирования воздействия мутаций, ассоциированных с ССЛ, на третичную структуру пирина и динамику его взаимодействия с ASC и каспазой-1.

В работе были изучены 15 мутаций: 7 самых распространенных мутаций - E148Q, M680I, M694V, M694I, V726A, A744S, R761H; 6 мутаций комплексных аллелей - E148Q-M694V, E148Q-M694I, E148Q-V726A, E148Q-A744S, E148Q-R761H, E148Q-V726A-R761H, сочетающих самые распространенные и тяжелые единичные мутации; и 2 доминантные мутации: T577N и T577S, доминантная наследственность которых полностью доказана.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

- Для доказательства адекватности применяемых методов компьютерного моделирования третичных структур белков провести моделирование третичных структур доменов DAPIN и В30.2, третичные структуры которых изучены в реальном эксперименте.
- Для изучения влияний мутаций на структуру доменов на основании полученных моделей нативных третичных структур доменов DAPIN и В30.2 смоделировать их мутантные формы.
- Осуществить компьютерное моделирование взаимодействия нативных и мутированных доменов DAPIN и В30.2 с белками ASC и каспазой-1 соответственно, для изучения воздействий мутаций на процессы комплексообразования.
- Провести молекулярное моделирование полной третичной структуры пирина и его мутантных форм.

### Научная новизна и практическая ценность

- Получены данные, свидетельствующие в пользу адекватности *in silico* экспериментов для изучения влияний мутаций как на третичную структуру белков, так и на процессы их комплексообразования.
- Впервые была получена компьютерная модель полной третичной структуры пирина с высоким разрешением в 1.6 Å.
- Впервые, в *in silico* экспериментах, было изучено воздействие мутаций на третичную структуру пирина и на процесс его комплексообразования с ASC и каспазой-1.
- Обнаружена прямая корреляция между тяжестью изученных мутаций, степенью их воздействия на стабильность третичной структуры пирина и его комплексообразованием с каспазой-1.
- Показано, что мутации, локализованные в домене В30.2 пирина, приводят к структурным перестройкам и в остальных доменах.

Полученные в данной работе результаты открывают новые возможности для дальнейших исследований в данной области. Полученные данные могут быть использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, ЕГМУ, РАУ, а также в научных лабораториях, занимающихся исследованием ССЛ и механизмов аутовоспалительных процессов.

#### Апробация работы.

Материалы диссертации были доложены на международных и республиканских конференциях: 7-ом конгрессе международной организации системных аутовоспалительных заболеваний “Аутовоспаление 2013” (Лозанна, Швейцария, 2013), международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013», «Ломоносов-2014», «Ломоносов-2015», (Россия, 2013, 2014, 2015), международной конференции молодых ученых «Перспективы развития молекулярной и клеточной биологии-4» (Армения, 2013), а также на семинарах и заседаниях кафедры Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии РАУ.

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

Объем и структура работы. Работа изложена на 126 страницах, содержит 3 графика, 7 таблиц и 18 рисунков. Библиография включает 176 наименований литературных источников. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

## **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В обзоре литературы приводятся: общее описание и характеристика Семейной Средиземноморской Лихорадки, описание гена MEFV и мутаций, ответственных за развитие ССЛ, характеристика белка пирина и его функций, описание аутовоспалительного процесса, современные критерии диагностики и лечения ССЛ. Отдельный раздел посвящен третичным структурам белков и их базам данных. Краткие содержания остальных глав приводятся ниже.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Работа выполнена на кафедре Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии Российско-Армянского (Славянского) университета (РАУ) и в лаборатории Компьютерного моделирования биологических процессов Института молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения (НАН РА).

#### Молекулярное моделирование третичной структуры белка.

Для молекулярного моделирования третичной структуры отдельных доменов и всего пирин в целом, методами de novo моделирования и трединга, был использован программный пакет ROSETTA 3.5 [Baker, 2010; Leaver-Fay et al, 2011]. Для предсказания структуры белка по аминокислотной последовательности, программный пакет ROSETTA 3.5 использует информацию об уже расшифрованных структурах. ROSETTA ежегодно показывает хорошие результаты на конкурсе CASP в категории предсказания нового фолда. ROSETTA 3.5, используя данные об уже имеющихся структурах, сначала предсказывает структуру отдельных фрагментов, объединяя их впоследствии в единую структуру. Вначале последовательность разбивается на фрагменты от 3 до 9 аминокислот и происходит поиск схожих фрагментов в белках с известной структурой. Поскольку фрагменты достаточно короткие, то никаких предположений о родственных связях между белками не делается. Исходя из возможных вариантов структуры отдельных фрагментов, рассчитываются возможные варианты структуры белка в целом. ROSETTA 3.5 использует для анализа таких комбинаций метод Монте-Карло. Функция энергии включает в себя члены, характеризующие компактность, спаренность  $\beta$ -листов и экранированность гидрофобных остатков. Процедура производит 1000 независимых вычислений для



структур, отобранных на основании заранее сгенерированного паттерна распределения конформаций фрагментов. Схожие структуры, полученные в результате независимых симуляций Монте-Карло, объединяются в кластеры; при этом центральные структуры наибольших кластеров принимаются за модели исследуемого белка. Таким образом, основная идея заключается в том, что структура, полученная наибольшее количество раз в ходе независимых испытаний Монте-Карло и обладающая наименьшей энергией Гиббса и будет наиболее правдоподобной моделью.

Для молекулярного моделирования была использована аминокислотная последовательность человеческого пирина (UniProt ID: O15553). Молекулярное моделирование третичной структуры доменов DAPIN и V30.2 проводилось методом de novo моделирования, из базы данных фрагментов была удалена информация об экспериментально полученных структурах данных доменов, для доказательства достоверности используемых методов и программного пакета. Для обоих доменов было смоделировано по 100000 моделей третичных структур, которые были кластеризованы и анализированы. На основании полученных наилучших моделей доменов, методом моделирования по гомологии, были смоделированы их мутантные вариации. Для каждой мутации было смоделировано 1000 моделей. Для молекулярного моделирования полной третичной структуры пирина были использованы методы de novo моделирования, трединга и протокол RosettaCM [Song et al, 2013].

Для молекулярного моделирования третичной структуры домена DAPIN в качестве шаблонов были использованы – ранее полученная нами виртуальная модель и экспериментально полученная структура домена DAPIN белка NLRP12 (PDB ID: 2L6A) [Pinheiro et al, 2010]; для моделирования структуры bZIP базового домена использовался – комплекс мышинной РНКазы H2 (PDB ID: 3KIO) [Shaban et al, 2009]; B-box type zinc-finger – C-концевой домен димеризации нуклеокапсидного белка вирусного бронхита (PDB ID: 2GE8) [Jayaram et al, 2006]; для не охарактеризованного региона Coiled-coil, в состав которого входит мотив NLS – была использована модель полученная методом de novo моделирования, экспериментально полученная структура комплекса Bmi1/Ring1b-UbcH5c (PDB ID: 3RPG) [Bentley et al, 2011] и регион BBox-Coiled-coil белка Trim5alpha (PDB ID: 4TN3) [Goldstone et al, 2014]; для молекулярного моделирования структуры V30.2 домена – ранее полученная, методами de novo моделирования, модель и экспериментально полученная структура этого же домена (PDB ID: 2WL1) [Weinert et al, 2009]. Полученные модели третичных структур всех доменов и мотивов далее были использованы в качестве шаблонов для моделирования полной третичной структуры пирина с помощью протокола RosettaCM. Было получено 1000000 моделей полной третичной структуры пирина.

Изучение влияний мутаций на стабильность третичной структуры белка было осуществлено с помощью программы SDM [Worth et al, 2011]. Таким образом были вычислены - свободная энергия Гиббса ( $\Delta G$ ) для нативного домена и для его мутированных форм, после чего было проведено вычисление разницы ( $\Delta\Delta G$ ) между  $\Delta G$  нативной и  $\Delta G$  мутированной структуры ( $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{нативной}} - \Delta G_{\text{мутированной}}$ ), которая и является показателем влияния мутаций на стабильность третичных структур белков.

Моделирование регионов взаимодействия домена DAPIN с ASC было проведено с помощью программного пакета ROSSETA 3.5. Моделирование было осуществлено программой RosettaDock [Chaudhury et al, 2011], с использованием протоколов докинга низкого и высокого разрешения [Gray et al, 2003; Wang et al, 2005; Wang et al, 2007]. Принцип данных протоколов заключается в следующем - один из взаимодействующих белков фиксируется в неподвижном состоянии, в то время как второй взаимодействующий белок перемещается по поверхности первого, одновременно вращаясь в случайно заданных направлениях. В проведенных экспериментах значение перемещения равнялось 3 Å, а вращения – 8 Å. После каждого перемещения и вращения, второй белок приближается к первому на фиксированное расстояние. После чего программой рассчитывается энергия взаимодействия двух белков в раннее смоделированной ориентации.

Моделирование молекулярной динамики взаимодействия было осуществлено с помощью программы CHARMM 38.b1 [Brooks et al, 1983] и метода “неявной сольватации” (implicit solvation method) [Brooks et al, 2009] с использованием функции эффективной энергии 1 (EEF1) [Lazaridis et al, 1999], использующей силовое поле CHARMM19. Этот метод широко применяется для моделирования молекулярной динамики взаимодействия биологических макромолекул и позволяет сократить время моделирования, так как дает возможность удалить из моделируемой системы молекулы растворителя, а также все атомы водорода, которые образуют ковалентные связи с атомами углерода в исследуемых объектах, не приводя к потере точности расчетов. Моделирование молекулярной динамики взаимодействия позволяет вычислить траектории всех атомов моделируемой системы в указанном временном интервале. Следуя за динамикой системы в любом интервале времени можно получить информацию о геометрии молекул, энергии взаимодействия, формировании или разрыве водородных связей. Во всех проведенных экспериментах был установлен шаг моделирования (leap-frog) в 2 фс. Температура моделируемой системы была 309К (36°C) при нормальном давлении. Время моделирования в проведенных экспериментах составляло 100-200 нс, что было достаточно для достижения равновесного состояния в моделируемых системах.

Визуализация и сравнительный анализ нативных и мутированных моделей третичных структур доменов DAPIN и B30.2, полной структуры пирина и их комплексов с каспазой-1 и ASC, были осуществлены с помощью программы VMD 1.9.2 [Humphrey et al, 1996]. С помощью VMD 1.9.2 так же был осуществлен расчет значений среднеквадратичного отклонения атомов основной цепи (RMSD) между нативными и мутированными моделями третичных структур.

Все программные пакеты были использованы в операционной системе Linux, на 24-х ядерном компьютерном кластере ИМБ НАН РА [Hakobyan & Nazaryan, 2010] и на суперкомпьютерном комплексе МГУ имени М.В. Ломоносова [Воеводин и др, 2012].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Моделирование третичных структур доменов DAPIN и B30.2.

На начальных стадиях экспериментов для доказательства адекватности используемых методов и программных пакетов, методом de novo моделирования, было проведено моделирование третичных структур доменов DAPIN и B30.2, структуры которых известны. Результаты молекулярного моделирования третичных структур доменов и их выравнивание с экспериментально полученными представлены на Рис.1 и Рис. 2.

В результате выравнивания смоделированных нами и полученных экспериментально третичных структур доменов DAPIN и B30.2, было установлено что среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в случае домена DAPIN равняется 0,6 Å, а в случае B30.2 = 0,8 Å, что сопоставимо с идентичностью структур на  $\geq 90\%$ .

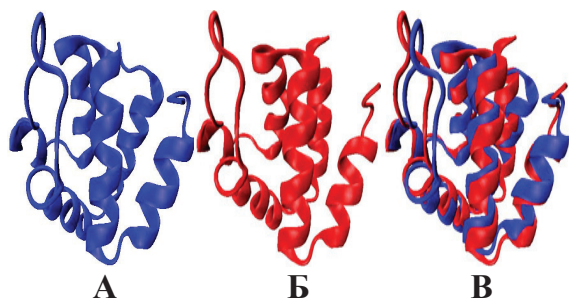


Рисунок 1. Сравнение смоделированной и экспериментально полученной третичных структур домена DAPIN.

А - смоделированная, Б – экспериментально полученная, В – результат их выравнивания.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени сходства экспериментально полученных и компьютерных моделей изучаемых доменов.

На основании полученных моделей нативных третичных структур доменов DAPIN и B30.2, методом моделирования по гомологии, были смоделированы мутантные вариации доменов. Для домена DAPIN были смоделированы мутации R42W, E84K и A89T, а для домена B30.2 - M680I, M694V, M694I, K695R, V726A и V744S.

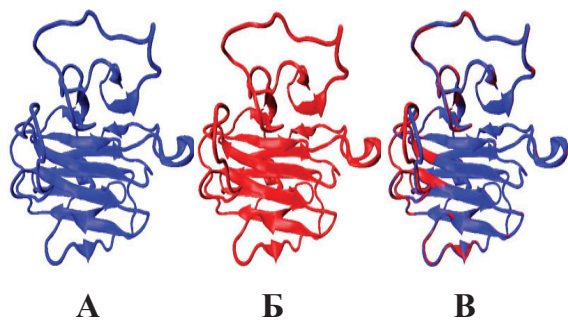


Рисунок 2. Сравнение смоделированной и экспериментально полученной третичных структур домена В30.2.

А - смоделированная, Б – экспериментально полученная, В – результат их выравнивания.

Для каждой мутации методами трединга были получены по 1000 моделей, из которых, исходя из наименьшей энергии Гиббса и наибольшей встречаемости в ряду полученных моделей была выбрана одна наилучшая. Результаты моделирования для каждой мутации и анализ влияния мутации на третичную структуру доменов DAPIN и В30.2 представлены на Рис. 3 и 4.

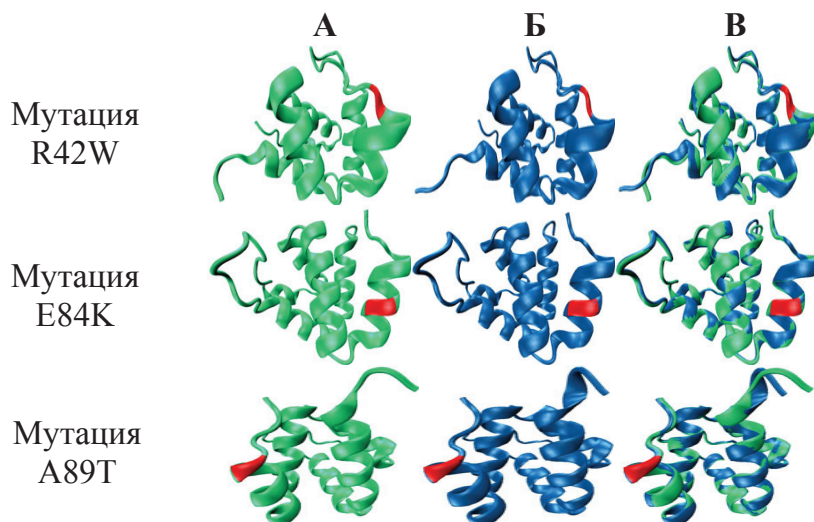


Рисунок 3.

Влияние мутаций на третичную структуру домена DAPIN.

А – нативная структура; Б – мутированная структура; В – результат их выравнивания.

Красным цветом обозначена локализация мутаций.

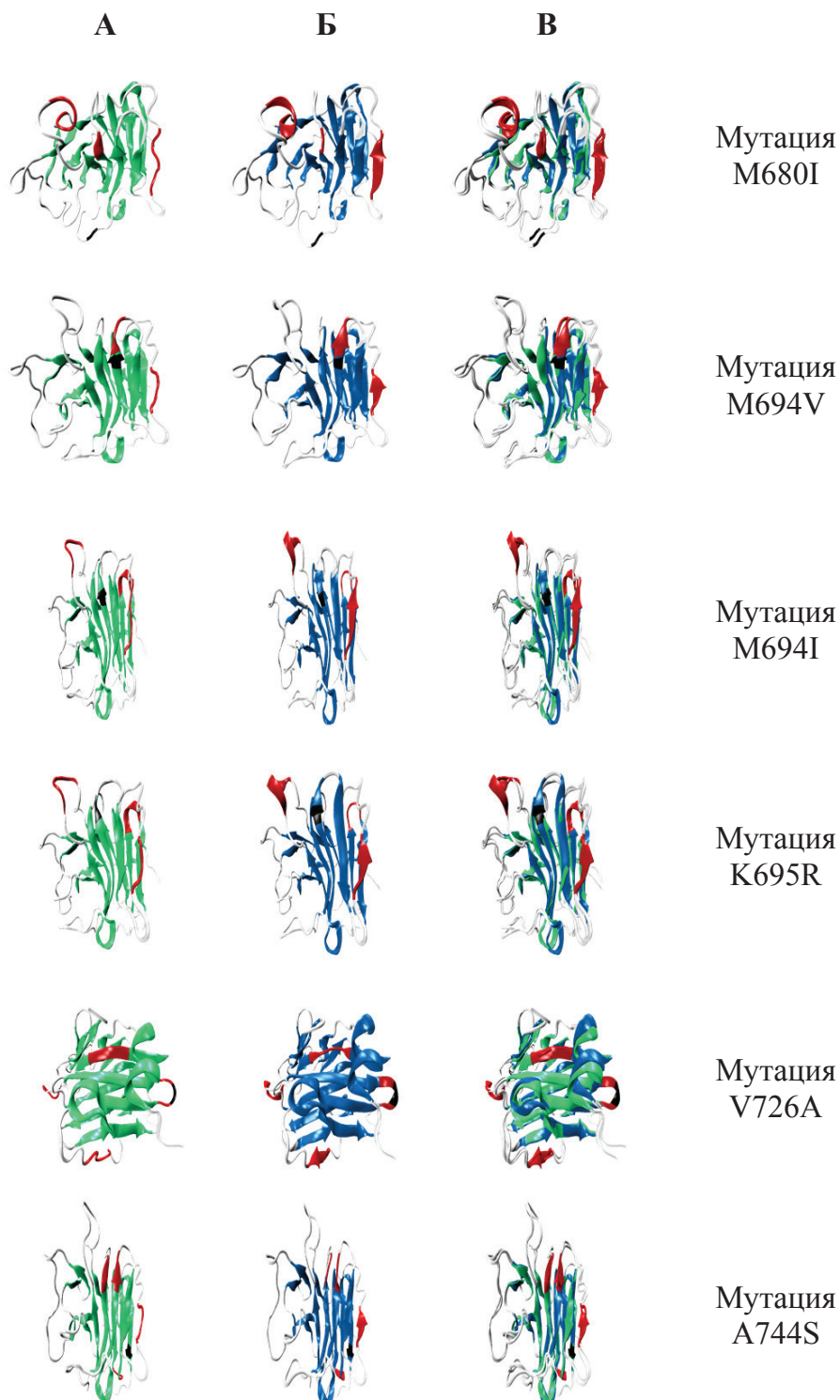
В результате анализа влияний мутаций на третичную структуру домена DAPIN, было установлено что ни одна из мутаций не приводит к каким-либо значимым изменениям или перестройкам на уровне вторичной структуры белка. RMSD = 1,06 Å (R42W); 1,08 Å (E84K); и 1,05 Å (A89T).

Анализ влияния мутации **M680I** на третичную структуру домена показал, что мутация приводит структурным перестройкам: переход  $\beta$ -лист – петля в положении THR663-TRP665, петля -  $\beta$ -лист в положении THR707- LEU710 и петля -  $\alpha$ -спираль в положении LYS765 – ALA768. В результате выравнивания нативной структуры с мутантной было установлено что RMSD = 1,137 Å. Мутация **M694V** приводит к следующим структурным перестройкам: переходам петля -  $\beta$ -лист в положениях LYS695-GLU696 и THR707 – LEU709. В результате выравнивания нативной структуры с мутантной было установлено что RMSD = 1,699 Å. Мутация **M694I** приводит к: элонгации  $\beta$ -листа в положении THR122- LEU125, перестройке петля -  $\alpha$ -спираль в положении THR150-ARG152 и ASP177-LYS180. RMSD = 1,099 Å. Мутация **K695R** приводит к перестройкам: петля -  $\beta$ -лист в положении THR122 - LEU124,  $\alpha$ -спираль – петля в положении VAL149 – ARG152 и петля -  $\alpha$ -спираль в положении ASP177 –LYS180. RMSD = 1,151 Å. Компьютерный анализ влияния мутации **V726A** на третичную структуру домена В30.2 показал, что, и данная мутация, как в предыдущих двух случаях, приводит к определенным структурным перестройкам, а именно: переход  $\beta$ -лист – петля в положении TRP655 – VAL657, петля -  $\beta$ -лист в положении THR707- LEU710, петля -  $\beta$ -лист в положении ARG725 – GLY727 и петля -  $\alpha$ -спираль в положении ASP762 – LYS765. RMSD = 1,808 Å. Мутация **A744S** приводит к перестройкам  $\beta$ -лист – петля в положениях ALA79-TRP80 и MET109-LYS110, петля -  $\beta$ -лист в положении THR122-LEU124 и петля -  $\alpha$ -спираль в положении ARG140-GLY142. RMSD = 0,796 Å.

Сравнение смоделированных мутантных и нормальных структур доменов DAPIN и В30.2, позволят изучить влияние мутаций на третичные структуры доменов и на процессы их комплексообразования с ASC и каспазой-1.



Рисунок 4.  
Влияние мутаций на третичную структуру домена V30.2.  
А – нативная третичная структура;  
Б – мутированная структура;  
В – результат их выравнивания.  
Красным цветом обозначена локализация перестройки, черным – локализация мутации.



#### Моделирование регионов взаимодействия домена DAPIN с ASC.

С помощью протоколов докинга низкого и высокого разрешения было получено 5500 ориентаций взаимодействия DAPIN с ASC. Из которых, в качестве наилучшей была выбрана ориентация с наименьшей энергией взаимодействия (-154.75 ккал/моль), которая встречалась 103 раза в ряду полученных ориентаций. На Графике 1 показаны все полученные ориентации в виде точек, также показано значение энергии взаимодействия для каждой ориентации. Выбранная нами наилучшая ориентация расположения домена DAPIN относительно белка ASC соответствует ранее существующим предположениям, в которых говорилось, что взаимодействие происходит между DAPIN доменами обоих белков, как и в случаи взаимодействия других доменов входящих в суперсемейство доменов смерти. Наилучшая ориентация расположения домена DAPIN относительно белка ASC представлена на Рис. 5.

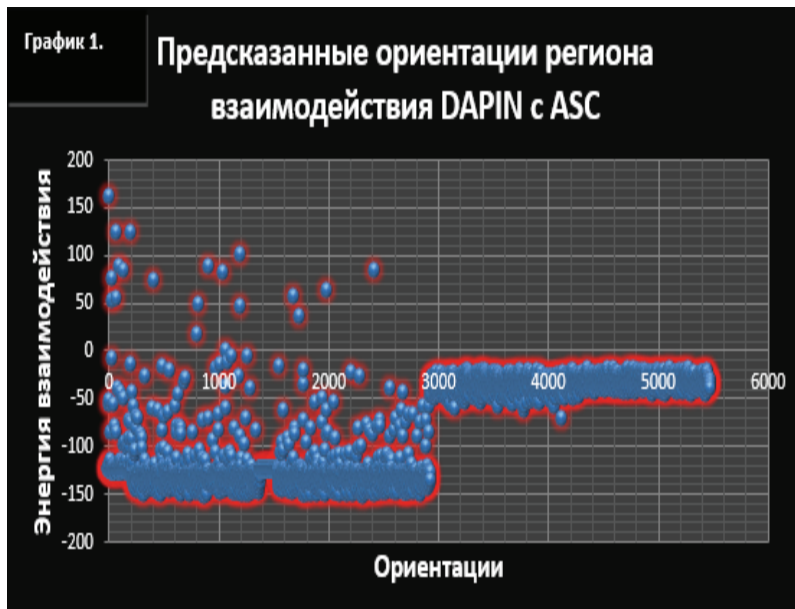
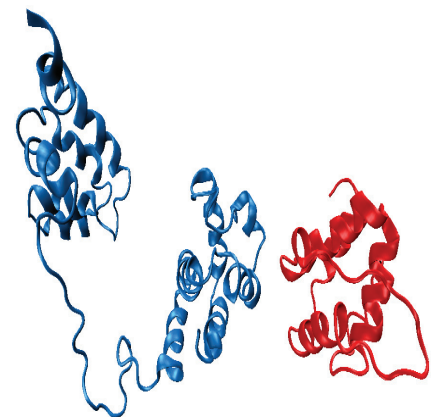


Рисунок 5. Ориентация расположения домена DAPIN (красный) относительно белка ASC (синий).



Моделирование молекулярной динамики взаимодействия домена DAPIN с белком ASC. Было проведено моделирование молекулярной динамики взаимодействия домена DAPIN белка пирина с белком ASC. В качестве исходной ориентации для моделирования взаимодействия была использована ранее смоделированная ориентация (Рис.5). Моделирование проводилось в системе *EEF1*. Скачок моделирования (leap-frog) был выбран в 2 фс. Время моделирования 200 нс. Было проведено моделирование динамики взаимодействия, как нативного домена DAPIN так и его мутированных вариаций, с белком ASC, для выявления влияний мутаций на данное взаимодействие. Мутированные вариации домена DAPIN были размещены по отношению к ASC в той же ориентации что и нативный. В результате моделирование молекулярной динамики взаимодействия нативного DAPIN с ASC было установлено, что взаимодействие происходит между Thr<sup>19</sup>-Gly<sup>22</sup> с Leu<sup>47</sup>-Val<sup>50</sup>; Gln<sup>29</sup>-Thr<sup>31</sup> с Ser<sup>12</sup>-Leu<sup>14</sup>; Pro<sup>42</sup>-Gln<sup>44</sup> с Ser<sup>3</sup>-His<sup>5</sup> соответственно. Был получен график колебания энергии взаимодействия нативного DAPIN с ASC (График 2). Из Графика 2 следует, что взаимодействие нативного DAPIN с ASC стабилизировалось на 126 нс, а оставшиеся 74 нс данные белки колебались в стационарном режиме.

Средняя энергия взаимодействия нативного DAPIN с ASC  $\bar{E}_{\text{ср}} = -90,87$  ккал/моль, а минимальная  $E_{\text{мин}} = -121,07$  ккал/моль. При взаимодействии мутированного DAPIN (**R42W**) с ASC было установлено что взаимодействие происходит между Leu<sup>16</sup>-Asp<sup>20</sup> с Leu<sup>45</sup>-Ser<sup>49</sup>; Pro<sup>50</sup>-Lys<sup>52</sup> с Lys<sup>41</sup>-Phe<sup>43</sup> соответственно. Из Графика 2 следует, что взаимодействие мутированного DAPIN (R42W) с ASC стабилизировалось на 109 нс оставшиеся 91 нс данные белки колебались в указанном регионе взаимодействия.  $\bar{E}_{\text{ср}} = -91,89$  ккал/моль,  $E_{\text{мин}} = -131,59$  ккал/моль. Взаимодействие DAPIN (**E84K**) с ASC происходит между Leu<sup>13</sup>-Glu<sup>14</sup> с Lys<sup>41</sup>-Lys<sup>42</sup>; Val<sup>17</sup>-Tyr<sup>19</sup> с Pro<sup>51</sup>-Arg<sup>53</sup>; Ile<sup>45</sup>-Ala<sup>48</sup> с Tyr<sup>56</sup>-Ile<sup>59</sup> соответственно. Из Графика 2 следует, что взаимодействие мутированного DAPIN (E84K) с ASC закончилось на 71 нс оставшиеся 129 нс данные белки колебались в указанном регионе взаимодействия.  $\bar{E}_{\text{ср}} = -97,54$  ккал/моль,  $E_{\text{мин}} = -132,48$  ккал/моль. Взаимодействие мутированного DAPIN (**A89T**) с ASC происходит между Ser<sup>11</sup>-Val<sup>17</sup> с Lys<sup>42</sup>-Leu<sup>48</sup>; Arg<sup>47</sup>-Arg<sup>49</sup> с Glu<sup>38</sup>-Leu<sup>40</sup> соответственно. Из Графика 2 следует, что взаимодействие мутированного DAPIN (A89T) с ASC закончилось на 33 нс оставшиеся 167 нс данные белки колебались в указанном регионе взаимодействия.  $\bar{E}_{\text{ср}} = -102,97$  ккал/моль,  $E_{\text{мин}} = -136,7$  ккал/моль.

Вышеприведенные данные показали, что мутации локализованные в домене DAPIN белка пирина имеют слабое воздействие на взаимодействие последнего с белком ASC. Была показана незначительная разница во значениях энергии взаимодействия данных белков, а также разница в частичном смещении сайтов связывания, что может привести к незначительному изменению действия DAPIN на ASC и тем самым повлиять на активацию Caspase-1, которая осуществляется с непосредственным участием ASC.

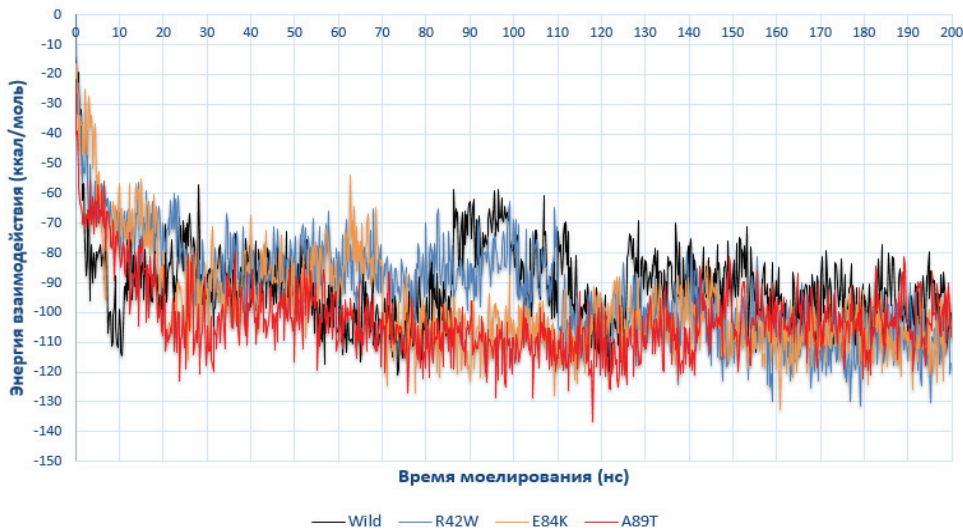


График 2.  
Колебание энергий взаимодействия нативного и мутированных доменов DAPIN с белком ASC.

### Моделирование молекулярной динамики взаимодействия домена В30.2 с каспазой-1.

При моделировании динамики взаимодействия домена В30.2 пирина с каспазой-1 в качестве исходной ориентации была взята ранее изученная ориентация расположения В30.2 относительно каспазы-1 [Chae J.J et al, 2006]. Было проведено моделирование динамики взаимодействия, как с нативным доменом В30.2 так и с мутированными вариантами, которые были размещены по отношению к каспазе-1 в той же ориентации что и нативная. В результате моделирования взаимодействия нативного В30.2 с каспазой-1 было установлено что взаимодействие происходит по сайтам Asn679-Met680 (В30.2) и Ser23-Thp24 (субъединицы P10 каспазы-1); Thr672-Lys677 (В30.2) и Glu42-Pro47 (субъединицы P20 каспазы-1). На Графике 3. представлено колебание энергии взаимодействия В30.2 с каспазой-1, из которого следует, что взаимодействие В30.2 с каспазой-1 выходит на плато через 76 нс., после чего колебание энергии взаимодействия происходило в стационарном режиме. Средняя энергия взаимодействия В30.2 с каспазой-1 (Эср) составляла -103.565 ккал/моль. Взаимодействие мутированного В30.2 (**M680I**) с каспазой-1 происходит по сайтам Asn624-Trp626 и Ser119-Gln121 (P20); Cys639-Ile640 и Arg25-His26 (P10); Gly759-Arg760 и Val22-Trp24 (P10) соответственно. При анализе колебания энергии взаимодействия В30.2 (M680I) с каспазой-1, было установлено, что взаимодействие В30.2 (M680I) с каспазой-1 стабилизировалось на 83 нс. (График 3.), Эср = -103.344 ккал/моль. Взаимодействие В30.2 (**M694V**) с каспазой-1 происходит между Asp637-Ser638 и Ile46-Pro47 (P20); Gly763-Gly764 и Gln121-Val122 (P20); Leu682-Ser683 и Ser23-Trp24 (P10) соответственно.

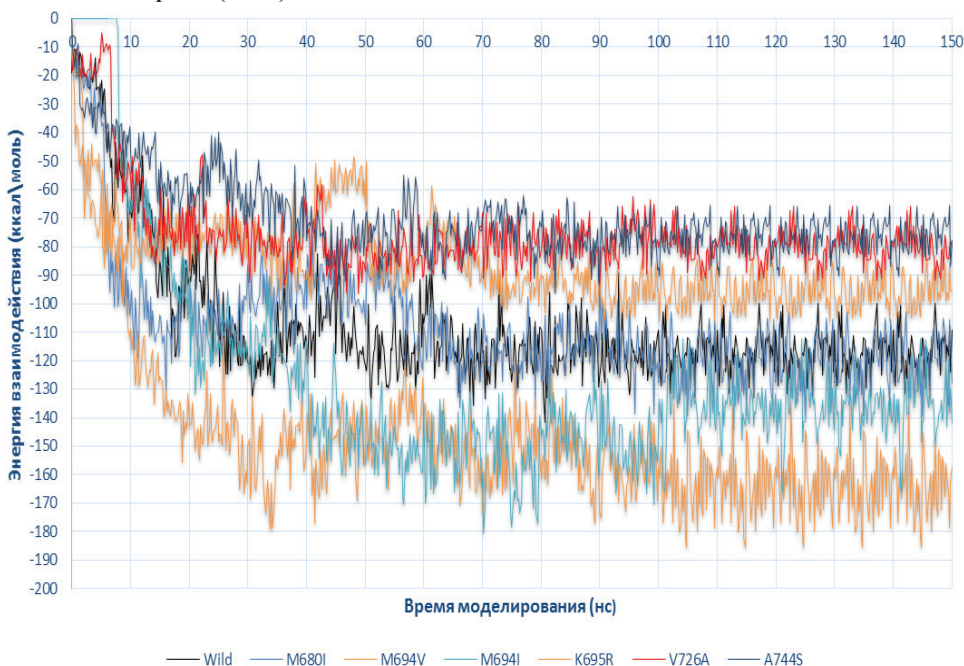


График 3.  
Колебание энергий взаимодействия нативного и мутированных доменов В30.2 с каспазой-1.



Анализ колебания энергии взаимодействия В30.2 (М694V) с каспазой-1, указывает на то, что взаимодействие В30.2 (М694V) с каспазой-1 после 90 нс. переходит в стационарное состояние (График 3.),  $\Delta E_{\text{ср}} = -141.711$  ккал/моль. При моделировании взаимодействия мутированного В30.2 (**М694I**) с Каспазой-1 было установлено, что взаимодействие происходит между Lys671 – Asn669 – Thr659 - Glu668 (В30.2) с Trp24 - Arg25 - Pro27 - His26 (P10) и Asn669 - Asp177 – Pro757 – Thr606 (В30.2) с Lys166 - Ser159 - Glu120 - Ser45 (P20) соответственно. Анализ колебания энергии взаимодействия В30.2 (М694I) с каспазой-1, указывает на то, что взаимодействие В30.2 (М694I) с каспазой-1 после 107 нс. переходит в стационарное состояние (График 3.),  $\Delta E_{\text{ср}} = -126.316$  ккал/моль. Взаимодействие В30.2 (**К695R**) с каспазой-1 происходит между Pro661 – Glu681 – Ser693 (В30.2) с Lys166 - Val163 - Pro47 (P20) и Gly679 – MET686 (В30.2) с His26 - Ser23 (P10) соответственно. При анализе колебания энергии взаимодействия В30.2 (К695R) с каспазой-1, было установлено, что взаимодействие В30.2 (К695R) с каспазой-1 стабилизировалось на 70 нс. (График 3.),  $\Delta E_{\text{ср}} = -85,569$  ккал/моль. При моделировании взаимодействия мутированного В30.2 (**V726A**) с Каспазой-1 было установлено, что взаимодействие происходит между Trp<sup>626</sup>-Asp<sup>631</sup> с Ser<sup>45</sup>-Thr<sup>50</sup> (P20); Asp<sup>637</sup>-Cys<sup>639</sup> с Trp<sup>24</sup>-His<sup>26</sup> (P10) соответственно. При анализе колебания энергии взаимодействия В30.2 (V726A) с каспазой-1, было установлено, что взаимодействие В30.2 (V726A) с каспазой-1 стабилизировалось на 60 нс. (График 3.),  $\Delta E_{\text{ср}} = -75,214$  ккал/моль. Взаимодействие мутированного В30.2 (**A744S**) с каспазой-1 происходит по сайтам Ser728 Lys615–Met686–Ser728 (В30.2) с Trp24-Arg25-Gly66 (P10) и Gly751– Arg756– Pro660– Asn680 (В30.2) с Pro47-Gly51-Val163-Lys166 (P20) соответственно. Анализ колебания энергии взаимодействия В30.2 (A744S) с каспазой-1, указывает на то, что взаимодействие В30.2 (A744S) с каспазой-1 после 75 нс. переходит в стационарное состояние (График 3.),  $\Delta E_{\text{ср}} = -69,583$  ккал/моль. Результаты моделирования молекулярной динамики взаимодействия мутированных вариантов домена В30.2 с каспазой-1 показали незначительное понижение энергии взаимодействия в случае мутации **M680I** (0.21% по сравнению с нативным доменом), сильное понижение в случае мутации **M694V** на 36.8%, сильное понижение в случае мутации **M694I** на 54,4%, повышение средней энергии взаимодействия в случае мутации **K695R** на 30%, повышение средней энергии взаимодействия в случае мутации **V726A** на 29% и повышение средней энергии взаимодействия в случае мутации **A744S** на 67%. Полученные данные, тесно коррелируют с тяжестью изученных мутаций – мутация **M680I**, которая вызывает легкое течение ССЛ, имеет слабое воздействие на энергию взаимодействия с каспазой-1. А мутация **M694V**, которая является фактором тяжелого течения ССЛ, сильно влияет на энергию взаимодействия последнего с каспазой-1. Результаты, компьютерного моделирования взаимодействия, сопоставимы с результатами других авторов [Chae J.J et al, 2006; Chae J.J et al, 2009], которые также свидетельствуют о влиянии мутаций на комплексообразование В30.2-каспаза-1.

#### Молекулярное моделирование полной третичной структуры пирина и ее достоверность.

Методами de novo моделирования и трединга было получено 10000000 моделей третичной структуры белка пирин, из которых, исходя из наименьшей энергии Гиббса и наибольшей встречаемости в ряду полученных моделей, была выбрана одна наилучшая (Рис. 6). После чего была проведена проверка достоверности и разрешения наилучшей модели структуры пирин, с помощью оценки степени стереохимической корректности. В частности была осуществлена проверка распределения торсионных углов поворота основной цепи  $\phi$  и  $\psi$ , которая является основным индексом стереохимической корректности белков. Результаты данной проверки были визуализированы в виде карты Рамачандрана (Рис. 7). На этой карте представлены торсионные углы для всех аминокислот пирин. Остатки глицина и пролина показаны отдельно, в виде треугольников, поскольку они не привязаны к какой-либо определенной области карты. Окрашенные регионы карты показывают ее основные благоприятные области. Чем темнее область, тем более благоприятна данная комбинация  $\phi$  и  $\psi$  углов. Неокрашенные регионы – являются неблагоприятными областями карты.





Рисунок 6.  
 Модель третичной структуры пирина. Домен DAPIN показан красным цветом, bZIP – зеленым, B-box type Zn-fingers – пурпурным,  $\alpha$ -Helix – синим, V30.2 – оранжевым, а черным показаны неописанные регионы.

Расположение в неблагоприятных областях, допустимо только для остатков глицина и пролина, поскольку они имеют другие благоприятные и неблагоприятные области из-за своей особой стереохимии. Анализ карты Рамачандрана, для полученной третичной структуры белка пирина, показал, что 603 аминокислоты пирина (91,6%) располагаются в наиболее благоприятных регионах карты [A, B, L], в дополнительно допустимых регионах [a,b,l,p] – 53 (8,1%), в менее допустимых регионах [ $\sim$ a, $\sim$ b, $\sim$ l, $\sim$ p] – 1 (0,2%) и в недопустимых регионах карты находится только одна аминокислота (0,2%) – ASN78.

Ramachandran Plot

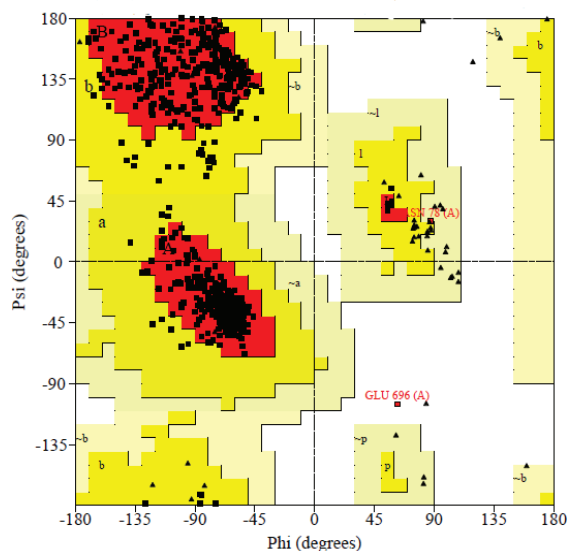


Рисунок 7.  
 Карта Рамачандрана для полной третичной структуры пирина.

Таким образом, в допустимых областях карты Рамачандрана, для модели третичной структуры пирина, располагается 99,8% аминокислот, 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.

Также была проведена проверка стереохимической корректности полученной структуры по распределению углов поворота боковой цепи и по другим дополнительным параметрам, что дало возможность определить стереохимическую корректность полученной структуры и определить ее разрешение. В результате проверки достоверности полученной третичной структуры пирина было установлено, что полученная модель имеет разрешение 1,6 Å, что является высоким разрешением для такого большого белка.

После молекулярного моделирования третичной структуры пирина и оценки ее достоверности, было проведено изучение влияний мутаций на стабильность третичной структуры пирина, с помощью программ SDM. Была вычислена  $\Delta\Delta G$  между  $\Delta G$  нативной и  $\Delta G$  мутированной структур пирина, исходя из значения которой, была определена мера изменения стабильности белка под воздействие мутаций. Были изучены все значимые

мутации (66) локализованные в домене В30.2 белка пирин. В результате исследований было определено, что **41-а** мутация (R628K, G632S, D637G, P646L, S650Y, D661N, K671M, G678E, M680I, M680V, M680L, G687D, Y688F, M694I, M694V, M694K, K695R, K695M, S702C, R717S, I720M, V726A, I729V, S730C, R737K, F743Y, A744S, A744T, S749C, I755V, P758S, R761H, I772V, Q778L, P780T) влияют на стабильность третичной структуры пирина, а **25** мутаций (N599D, I640M, I641F, R652C, R652H, R653H, E656A, I666V, T681I, M693I, L709R, M694L, K695N, V704I, P705S, R708C, R717H, V722M, N733S, F743L, Q753H, P754R, R761C, S675N, P769A) – имеют нейтральное воздействие на стабильность третичной структуры пирина.

Из изученных мутаций, своим пагубным воздействием на стабильность третичной структуры пирина, выделяются 7 самых распространенных мутаций вызывающих ССЛ. В Таблице 1. приведены значения  $\Delta\Delta G$  для данных мутаций.

<b>Таблица 1. Влияние мутаций на стабильность структуры пирина.</b>		
<b>Влияние</b>	<b>Мутация</b>	<b><math>\Delta\Delta G</math> (ккал/моль)</b>
<b>Сильно дестабилизирующее</b>	M694V	-3.56
	M680I	-0.98
<b>Слабо дестабилизирующее</b>	M694I	-0,72
	K695R	-0,84
	V726A	-0,88
	A744S	-0,56
	R761H	-0,65

В экспериментах была выявлена корреляция между влиянием самых распространенных мутаций, локализованных в домене В30.2, на стабильность третичной структуры пирина и степенью их тяжести на процесс течения ССЛ. Было установлено, что мутация M694V, которая является фактором тяжелого течения ССЛ имеет сильно дестабилизирующее воздействие на стабильность третичной структуры пирина, а мутации M680I, M694I, K695R, V726A, A744S и R761H, являющиеся, по сравнению с M694V, фактором более легкого течения ССЛ, имеют слабо дестабилизирующее воздействие.

Полученные данные коррелируют с экспериментально полученными, относительно тяжести самых распространенных мутаций на течение ССЛ и показали, что данные мутации приводят к дестабилизации третичной структуры пирина.

#### Молекулярное моделирование мутантных вариаций полной третичной структуры пирина.

На основании полученной модели нативной третичной структуры полного пирина, методом моделирования по гомологии, были смоделированы мутантные вариации белка. Для каждой мутации было получено по 10000 моделей, из которых, исходя из наименьшей энергии Гиббса и наибольшей встречаемости в ряду полученных моделей была выбрана одна наилучшая. Были смоделированы 15 мутаций: 7 самых распространенных мутаций - E148Q, M680I, M694V, M694I, V726A, A744S, R761H (Рис. 8); 6 мутаций комплексных аллелей - E148Q-M694V, E148Q-M694I, E148Q-V726A, E148Q-A744S, E148Q-R761H, E148Q-V726A-R761H (Рис. 9), сочетающих в себе самые распространенные и тяжелые единичные мутации; и 2 доминантные мутации: T577N и T577S (Рис. 9), доминантная наследственность которых полностью доказана.

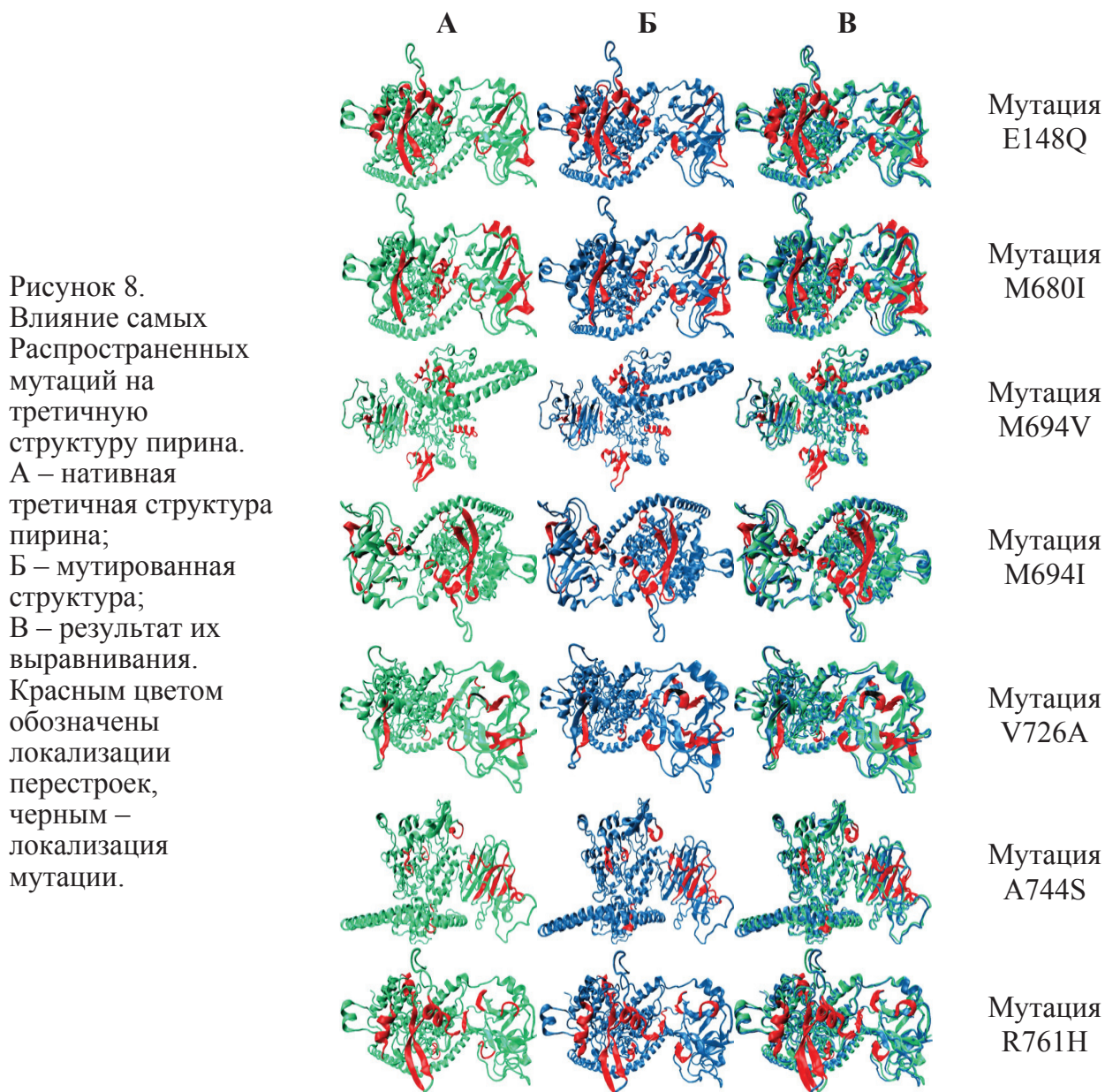


Рисунок 8.  
Влияние самых  
Распространенных  
мутаций на  
третичную  
структуру пирина.  
А – нативная  
третичная структура  
пирин;  
Б – мутированная  
структура;  
В – результат их  
выравнивания.  
Красным цветом  
обозначены  
локализации  
перестроек,  
черным –  
локализация  
мутации.

Анализ влияния мутации **E148Q** на третичную структуру полного белка пирина показал, что мутация приводит структурным перестройкам: переход  $\alpha$ -спираль - петля в положении LYS160-GLU163; петля -  $\beta$ -лист в положении PRO180-LEU182 и PRO188-PRO190; петля -  $\alpha$ -спираль в положении GLU299-ARG305 и PRO684-GLY687. Также приводит к укорочению  $\beta$ -листов в положениях: с CYS226-PRO234 на CYS226-LEU233 и с LYS237-VAL245 на MET238-VAL245. К удлинению  $\alpha$ -спиралей в положениях с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274. Приводит к переходу  $\beta$ -лист- $\alpha$ -спираль на  $\beta$ -лист-петля в положениях - ILE601-ASP603—ALA604-ALA607 на ILE601-ALA604—GLU605-ALA607. К разбиению одного большого  $\beta$ -листа на два малых в положении ARG652-VAL659 на ARG652-TYR654—TRP655—GLU656-VAL659. В результате выравнивания нативной структуры с мутантной было установлено что RMSD = 1,1253 Å. Мутация **M680I** приводит к укорочению  $\beta$ -листов в положениях: с CYS226-PRO234 на CYS226-LEU233, LYS237-VAL245 на MET238-VAL245, с VAL642-PRO646 на VAL642-SER645 и с LEU770-PRO774 на PRO769-PRO774. К переходам петля -  $\alpha$ -спираль в положениях ASP272-ALA274, PRO298-THR303 и PRO684-GLY687. К удлинению  $\alpha$ -спиралей в положениях с SER399-HIS407 на SER399-ARG408, с GLU524-VAL541 на TRP525-VAL541 и с LEU590-HIS596 на LEU590-ALA597. К переходу  $\beta$ -лист- $\alpha$ -спираль-петля на петля- $\beta$ -лист в положении ILE601-ASP603—ALA605-ALA607—TYR608 на ILE601—LEU602-TYR608. К укорочению  $\beta$ -листа в положении с THR707-ILE711 на THR707-LEU710. К переходу  $\alpha$ -спираль-петля в положении VAL775-GLN778. RMSD = 1,3309 Å. Мутация **M694V** приводит: к удлинению  $\alpha$ -спиралей в положениях с ARG80-SER95 на



ARG80-GLU98, с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274, с SER399-HIS407 на SER399-ARG408; к укорочению  $\beta$ -листов в положениях с CYS226-PRO234 на CYS225-LEU233, с LYS237-VAL245 на MET238-VAL245, с PRO706-ILE711 на THR707-ILE711 и с VAL642-PRO646 на VAL642-GLY644; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положении GLU299-ARG305; к укорочению  $\alpha$ -спирали в положении с PRO307-GLY320 на PRO313-GLY320; к переходу  $\beta$ -лист – петля в положении ILE601-ASP603; к разбиению одного большого  $\beta$ -листа на два малых в положении с ARG652-VAL659 на ARG652-TYR654—TRP655—GLU656-VAL659; и к переходу  $\alpha$ -спираль – петля в положении VAL775-GLN778. RMSD = 1,1679 Å. Мутация **M694I** приводит: к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положениях LYS160-GLU163 и VAL775-GLN778; к укорочению  $\beta$ -листов в положениях с GLU225-PRO234 на GLU225-ILE233 и LYS237-VAL245 на MET238-VAL245; к удлинению  $\alpha$ -спирали в положении с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положениях GLU299-ARG305, PRO684-GLY687, TYR688-GLU696, THR735-ARG737, ASP762-LYS765; к переходу  $\beta$ -лист— $\alpha$ -спираль—петля на один длинный  $\beta$ -лист в положении с ILE601-ASP603—ALA604-ALA607—TYR608 на ILE601-TYR608. RMSD = 1,2518 Å. Мутация **V726A** приводит: к укорочению  $\beta$ -листов в положениях с CYS226-PRO234 на CYS226-LEU233, с VAL642-PRO646 на VAL642-SER645, с THR707-ILE711 на THR707-LEU710, с ILE601-ASP603 на LEU602-ALA604; к петля -  $\alpha$ -спираль в положениях GLU299-ARG305, PRO684-GLY687, ARG725-GLY727, THR735-ARG737; к разбиению одного большого  $\beta$ -листа на два малых в положениях с ARG652-VAL659 на ARG652-TYR654—TRP655—GLU656-VAL659 и с LEU752-PRO758 на LEU752-PRO754—ILE755-PRO758. RMSD = 1,2317 Å. Анализ влияния мутации **A744S** на третичную структуру полного белка пирин показал, что мутация приводит структурным перестройкам: переход петля -  $\beta$ -лист в положении PRO180-PRO183 и GLY185-PRO190; петля -  $\alpha$ -спираль в положении GLU195-GLN198, ASN270-ALA274, PRO298-ARG305, PRO684-GLY687 и THR735-ARG737;  $\beta$ -лист – петля в положении ILE601-ASP603;  $\alpha$ -спираль - петля в положении ALA604-ALA607. Также приводит к укорочению  $\beta$ -листов в положениях: с VAL642-PRO646 на VAL642-GLY644, с TRP665-THR672 на ILE666-LYS671, с SER738-ALA744 на HIS739-SER744 и с LEU752-PRO758 на GLN753-PRO758. В результате выравнивания нативной структуры с мутантной было установлено что RMSD = 1,4571 Å. Мутация **R761H** приводит: к удлинению  $\alpha$ -спирали в положениях с PRO18-GLN29 на PRO18-ASN30 и с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положениях LYS160-GLU163 и ASN297-ARG305; к перемещению  $\alpha$ -спирали с SER208-LEU216 на ALA207-ALA217; к разбиению одного большого  $\beta$ -листа на два малых в положениях с CYS226-PRO234 на CYS226-PRO228—PHE229—GLU230-PRO234 и с LYS237-VAL245 на LYS237-ARG241—SER242—LEU243-VAL245; к удлинению  $\alpha$ -спирали в положении с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положении PRO684-GLY687 и ARG725-GLY727; к укорочению  $\beta$ -листов в положениях с THR707-ILE711 на THR707-LEU709 и с SER738-ALA744 на HIS739-ALA744. RMSD = 1,3021 Å.

Мутация **E148Q-M694V** приводит: к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положении LYS160-GLU163; к удлинению  $\alpha$ -спирали в положениях с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положении PRO298-ARG305, PRO684-GLY687; к переходу  $\beta$ -лист— $\alpha$ -спираль -  $\beta$ -лист—петля в положении с ILE601-ASP603—ALA604-ALA607 на LEU602-ALA604—GLU605-ALA607; приводит к укорочению  $\beta$ -листов в положениях: с VAL642-PRO646 на VAL642-SER645 и SER738-ALA744 на SER738-THR742. RMSD = 1,3404 Å. Мутация **E148Q-M694I** приводит: к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положении LYS160-GLU163 и VAL775-GLN778; к разбиению одного большого  $\beta$ -листа на два малых в положениях с CYS226-PRO234 на CYS226-PRO228—PHE229—GLU230-LEU233 и LYS237-VAL245 на LYS237—MET238-ARG241—SER242—LEU243-VAL245; к удлинению  $\alpha$ -спирали в положениях с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положении PRO298-ARG305, SER683-GLY687 и THR735-ARG737; к укорочению  $\beta$ -листов в положениях с GLY325-VAL328 на GLY325-CYS327, с ILE394-ILE397 на ILE394-LEU396, с VAL642-PRO646 на VAL642-GLY644, с 717ARG-TYR724 на VAL718-TYR724; к переходу  $\beta$ -лист - петля в положении ILE601-ASP603. RMSD = 1,3027 Å.



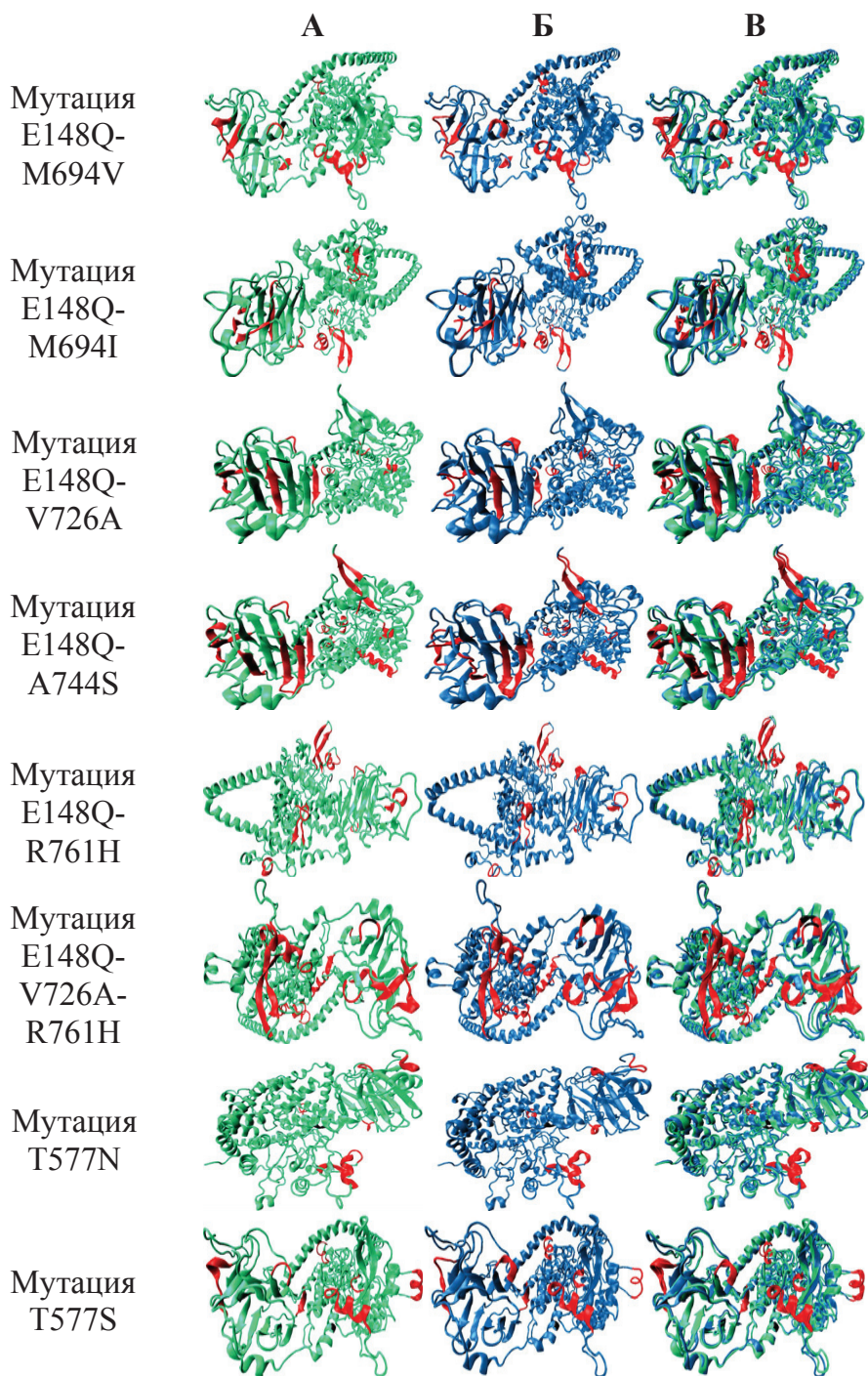


Рисунок 9. Влияние комплексных аллельных и доминантных мутаций на третичную структуру пирин. А – нативная третичная структура пирин; Б – мутированная структура; В – результат их выравнивания. Красным цветом обозначены локализации перестроек, черным – локализация мутации.

Мутация **E148Q-V726A** приводит: к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положении LYS160-GLU163; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положении GLU195-GLN198, GLU299-GLY304 и PRO684-GLY687; к переходу  $\beta$ -лист - петля в положении ILE601-ASP603; к укорочению  $\beta$ -листов в положениях с VAL642-PRO646 на VAL642-GLY644, с THR707-ILE711 на ARG708-LEU710; к удлинению  $\beta$ -листов в положениях с VAL718-TYR724 на ARG717-TYR724. RMSD = 1,3885 Å. Мутация **E148Q-A744S** приводит: к удлинению  $\alpha$ -спиралей в положениях с PRO18-GLN29 на PRO18-THR31; к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положении PRO353-HIS359; приводит к укорочению  $\beta$ -листов в положениях: с GLU225-PRO234 на CYS226-LEU233 и LYS237-VAL245 на MET238-VAL245; петля -  $\alpha$ -спираль в положении PRO298-VAL302 и PRO684-GLY687; укорочению  $\alpha$ -спирали в положении с PRO313-GLY320 на PRO313-GLU319; к переходу  $\beta$ -лист - петля в положении GLY325-VAL328 на GLY325-VAL328 и Ile394-Ile397 на ILE394-ILE397; приводит к укорочению  $\beta$ -листов в положениях: с VAL642-PRO646 на VAL642-SER645 и THR707-ILE711 на THR707-LEU710. RMSD = 1,1292 Å. Мутация **E148Q-R761H** приводит: к укорочению  $\beta$ -листов в положениях с CYS226-PRO234 на PRO228-LEU233 и LYS237-VAL245 на MET238-

LEU243; приводит к удлинению  $\alpha$ -спиралей в положениях с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положении GLU299-ARG305, PRO684-GLY687 и THR735-ARG737; к переходу  $\beta$ -лист – петля в положении GLY325-VAL328 и ILE394-ILE397; к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положении PRO364-SER368. RMSD = 1,3541 Å. Мутация **E148Q-V726A-R761H** приводит: к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положении LYS160-GLU163; к укорочению  $\beta$ -листов в положениях с CYS226-PRO234 на PRO228-LEU233, с LYS237-VAL245 на MET238-LEU243, с VAL642-PRO646 на VAL642-SER645, с TRP665-THR672 на TRP665-LYS671, с THR707-ILE711 на ARG708-LEU710; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положении PRO684-GLY687, GLU299-ARG305 и ARG725-GLY727; приводит к удлинению  $\alpha$ -спиралей в положениях с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; к укорочению  $\alpha$ -спиралей в положениях с PRO307-GLY320 на THR309-GLY320. RMSD = 1,1253 Å.

Мутация **T577N** приводит к укорочению  $\beta$ -листа в положении с CYS226-PRO234 на CYS226-LEU233; приводит к удлинению  $\beta$ -листа в положении с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; петля -  $\alpha$ -спираль в положении GLU299-ARG305, PRO684-GLY687 и THR735-ARG737; к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положении VAL775-GLN778. RMSD = 1,2839 Å. Мутация **T577S** приводит к переходу  $\alpha$ -спираль - петля в положении ALA105-GLY111; к переходу петля -  $\alpha$ -спираль в положениях GLU195-GLN198, PRO298-ARG305 и PRO684-GLY687; к удлинению переходу  $\alpha$ -спираль в положении с LEU263-LEU271 на LEU263-ALA274; к укорочению  $\alpha$ -спираль в положении с THR707-ILE711 на THR707-LEU710. RMSD = 1,3984 Å.

## ВЫВОДЫ

1. Полученные результаты свидетельствуют об адекватности *in silico* экспериментов и показывают высокую степень сходства экспериментально полученных и компьютерных моделей третичных структур изучаемых доменов.
2. Ни одна из изученных мутаций домена DAPIN не приводит к каким-либо значимым изменениям или перестройкам на уровне элементов вторичной структуры и практически не влияет на процесс комплексообразования с ASC, из чего следует, что данные мутации не влияют на процессы активации каспазы-1 и не приводят к манифестации ССЛ.
3. Все изученные мутации, локализованные в домене В30.2 пирина влияют на процесс комплексообразования с каспазой-1 и приводят к структурным перестройкам следующих типов: переход петля -  $\beta$ -лист, петля -  $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -лист – петля,  $\alpha$ -спираль – петля,  $\alpha$ -спираль -  $\beta$ -лист, элонгация  $\beta$ -листов и  $\alpha$ -спиралей, укорочение  $\beta$ -листов и  $\alpha$ -спиралей и разбиение одного большого  $\beta$ -листа на два малых.
4. Методами компьютерного моделирования получена модель полной третичной структуры белка пирина, имеющая высокие показатели стереохимической корректности и имеющая разрешение – 1,6 Å, что доказывает достоверность применяемых методов для решения подобных задач.
5. 41-а мутация, из 66-и локализованных в домене В30.2, влияют на стабильность третичной структуры белка и приводят к ее изменениям, что говорит о важности домена в манифестации ССЛ.
6. Была обнаружена корреляция между степенью тяжести мутаций и их влиянием на стабильность третичной структуры пирина.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Г.Г. Аракелов, С.Г. Джаангирян, К.Б. Назарян. Молекулярное моделирование структур доменов пирина и динамика их взаимодействия с белками апоптоза. // Вестник РАУ, Физико-Математические и Естественные Науки, №2, Издательство РАУ, Ереван, 2012, стр. 49-54.
2. Г. Г. Аракелов, С. Г. Джаангирян. Влияние мутаций R42W, E84K и A89T на третичную структуру домена PYD пирина и его взаимодействие с ASC. // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013», Москва, Россия, 8 – 13 апреля, 2013, ISBN 978-5-317-04429-9.
3. K. Nazaryan, G. Arakelov. Mutations in PB30.2D and complexing with Caspase-1. // 7th Congress of ISSAID, International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases, Lausanne, Switzerland, May 22-26, PW01-035, Pediatric Rheumatology 2013, 11(Suppl 1):A88
4. G. G. Arakelov, S. G. Jahangiryan, K. B. Nazaryan. Influence of M694I, K695R, V744S mutations on B30.2 tertiary structure and it's interaction with caspase-1. // Biological Journal of Armenia, Volume LXV, Supplement 1, 2013, Yerevan, pp. 33-34.
5. Г. Г. Аракелов, О.В. Осипов. In silico анализ белка пирина на наличие сигнала ядерной локализации. // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014», Москва, Россия, 7 – 11 апреля, 2014, ISBN 978-5-317-04429-9.
6. В.Г. Аракелов, Г. Г. Аракелов, О.В. Осипов. Влияние мутаций M680I, M694V, V726A, A744S и R761H на третичную структуру белка пирин. // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015», Москва, Россия, 13 – 17 апреля, 2015, ISBN 978-5-317-04946-1.
7. G.G. Arakelov. Influence of the mutation on the stability of pyrin protein and development of Familial Mediterranean Fever. // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, Volume 3, Issue 2, 2015, pp. 220 – 225.

ՊԻՐԻՆԻ ԵՐՐՈՐԴԱԿԱՆ ԿԱՐՈՒՑՎԱԾՔԻ *DE NOVO* ՍՈՂԵԼԱՎՈՐՈՒՄ ԵՎ ՆՐԱ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ԱՊՈՊՏՈԶԻ ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՀԵՏ

ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ԸՍՏ, պիրին, կասպազ-1, *in silico*, մոլեկուլային մոդելավորում, սպիտակուց-սպիտակուցային փոխազդեցություն:

Պատմականորեն Ընտանեկան Միջերկրածովային Տենդը (ԸՍՏ) հանդիսանում է առաջին ներկայացված աուտոբորբոքային հիվանդությունը: ԸՍՏ-ն հանդիսանում է ամենատարածված աուտոբորբոքային համախտանիշ: Աշխարհում այս հիվանդությունով տառապում են ավելի քան 100000 մարդ: Հիվանդությունը գլխավորապես հանդիպում է կոնկրետ էթնիկական խմբերում, որոնք պատկանում են միջերկրածովյան ավազանին. հայերի, սեֆարդիկ հրեաների, արաբների և թուրքերի մոտ: Վերը նշվածից հետևում է, որ ԸՍՏ-ի հետազոտությունը, ավելի կոնկրետ պիրին սպիտակուցի, որի մուտացիաները հանդիսանում են տվյալ հիվանդության առաջացման պատճառ, ունի մեծ նշանակություն բոլոր միջերկրածովյան պոպուլյացիաների համար, այդ թվում նաև հայերի: ԸՍՏ-ն հանդիսանում է աուտոսոմային ռեցեսիվ հիվանդություն, որի պատճառը MEFV (**M**editerranean **F**e**V**er) մուտանտ գենի առկայությունն է: 2015թ-ի տվյալներով հայտնի է նշված գենի 305 մուտացիա: MEFV գենի էկսպրեսիայի արդյունքում առաջանում է պիրին սպիտակուցը, որը բաղկացած է 781 ամինաթթվային մնացորդներից: Սպիտակուցի ամբողջ երրորդային կառուցվածքը հայտնի չէ, հայտնի են միայն նրա երկու դոմենների երրորդային կառուցվածքները՝ DAPIN և B30.2 դոմենների: Հայտնի է, որ պիրինի բոլոր դոմենները և մոտիվները, ուղղակիորեն կամ անուղղակիորեն ներգրավված են սպիտակուց-սպիտակուցային փոխազդեցությունների մեջ ապոպտոզի սպիտակուցների հետ, դրանով կարգավորելով բորբոքային ռեակցիաների կասկադը:

Աշխատանքի նպատակն էր հանդիսանում համակարգչային մոդելավորման մեթոդներով ԸՍՏ-ի մուտացիաների ազդեցությունների ուսումնասիրությունը պիրին սպիտակուցի երրորդային կառուցվածքի վրա և նրա փոխազդեցությանը ASC և Caspase-1 սպիտակուցների հետ: Այս աշխատանքում ուսումնասիրվել են 15 մուտացիաներ. 7 ամենատարածված մուտացիաները՝ E148Q, M680I, M694V, M694I, V726A, A744S, R761H, 6 կոմպլեկսային ալելների մուտացիա՝ E148Q-M694V, E148Q-M694I, E148Q-V726A, E148Q-A744S, E148Q-R761H, E148Q-V726A-R761H և 2 դոմինանտ մուտացիա՝ T577N և T577S, որոնց դոմինանտ ժառանգությունը լիովին ապացուցված է:

Իրականացվել են պիրինի երրորդային կառուցվածքի և ապոպտոզի սպիտակուցների հետ նրա փոխազդեցության համակարգչային մոդելավորումը: Մասնավորապես մոդելավորվել են պիրին սպիտակուցի DAPIN և B30.2 դոմենների նատիվ (վայրի տեսակը) երրորդային կառուցվածքները 0.6 Å և 0,8 Å ճշտությամբ: Հիմնվելով DAPIN-ի նատիվ երրորդային կառուցվածքի վրա, կառուցվել են նաև նրա մուտանտ տեսակները՝ R42W, E84K, A89T: Իրականացվել է DAPIN դոմենի ինչպես



նաստիվ կառուցվածքի, այնպես էլ մուտանտ ձևերի և ASC սպիտակուցի փոխազդեցության դինամիկայի մոլեկուլային մոդելավորումը: Արդյունքների վերլուծությունը ցույց տվեց, որ այս մուտացիաները ունեն ցածր ազդեցություն DAPIN-ի երրորդային կառուցվածքի վրա և նրա փոխազդեցությանը ASC-ի հետ:

Հիմնվելով B30.2-ի նաստիվ երրորդային կառուցվածքի վրա, մոդելավորվել են տվյալ դոմենի մուտանտ վարիացիաները՝ **M680I**, **M694V**, **M694I**, **K695R**, **V726A**, **A744S**, **R761H**: Մուտանտային վարիացիաների վերլուծությունը ցույց տվեց, որ բոլոր ուսումնասիրված դեպքերում մուտացիաները բերում են կառուցվածքային վերադասավորումների երրորդային կառուցվածքում (ինչպես, օրինակ, հանգույց -  $\alpha$ -պարույր, հանգույց -  $\beta$ -թերթ,  $\beta$ -թերթ - հանգույց և  $\alpha$ -պարույր - հանգույց):

Իրականացվել է B30.2 դոմենի նաստիվ և մուտանտային երրորդային կառուցվածքների և Caspase-1 փոխազդեցության դինամիկայի մոլեկուլային մոդելավորումը: B30.2-Caspase-1-ի փոխազդեցության դինամիկայի մոլեկուլային մոդելավորումը ցույց տվեց զգալի տարբերություններ նորմալ և մուտանտային դոմենների փոխազդեցության էներգիայում. **M680I**-ի դեպքում շատ քիչ նվազում 0,21%-ով կոմպլեքսի կազմավորման միջին էներգիայում (համեմատած նորմալ դոմենի հետ), նվազում **M694V**-ի դեպքում (36,8%), նվազում **M694I**-ի դեպքում (54,4%), աճ **K695R**-ի դեպքում (30%), աճ **V726A**-ի դեպքում (29%) և աճ **A744S**-ի դեպքում (67%):

Մոդելավորվել է պիրին սպիտակուցի ամբողջական նաստիվ երրորդային կառուցվածքը 1.6 Å ճշտությամբ, որը հանդիսանում է լավ թույլատվություն նման խոշոր սպիտակուցի համար: Հիմնվելով մոդելավորված պիրինի նաստիվ երրորդային կառուցվածքի վրա, կառուցվել են հետևյալ մուտանտ տեսակները՝ **E148Q**, **M680I**, **M694V**, **M694I**, **V726A**, **A744S**, **R761H**, **E148Q-M694V**, **E148Q-M694I**, **E148Q-V726A**, **E148Q-A744S**, **E148Q-R761H**, **E148Q-V726A-R761H**, **T577N** և **T577S**:

Մուտանտային վարիացիաների վերլուծությունը ցույց տվեց, որ բոլոր ուսումնասիրված դեպքերում, մուտացիաները բերում են կառուցվածքային վերադասավորումների երրորդային կառուցվածքում, օրինակ՝ հանգույց -  $\alpha$ -պարույր, հանգույց -  $\beta$ -թերթ,  $\beta$ -թերթ - հանգույց,  $\alpha$ -պարույր - հանգույց,  $\alpha$ -պարույր -  $\beta$ -թերթ,  $\beta$ -թերթերի և  $\alpha$ -պարույրների երկարացում և կրճատում, մեկ մեծ  $\beta$ -թերթի բաժանում երկու փոքրերի:

ARAKELOV GRIGOR

## ***DE NOVO* MODELING OF PYRIN TERTIARY STRUCTURE AND ITS INTERACTION DYNAMIC WITH APOPTOSIS PROTEINS**

### **SUMMARY**

**Key words:** FMF, pyrin, caspase-1, in silico, molecular modeling, protein-protein interaction.

Historically, the **Familial Mediterranean Fever (FMF)** has been the first autoinflammatory disease described. FMF is the most widely spread autoinflammatory syndrome. More than 100000 patients suffer from it in the world. The disease predominantly occurs in certain ethnic groups of the Mediterranean basin: Armenians, Sephardic Jews, Arabs and Turks. From the above it follows, that the research of FMF, specifically the pyrin protein, mutations of which

induce FMF, is important for all populations in the Mediterranean, including Armenians. FMF is an autosomal recessive disease, caused by the presence of a mutant **MEFV** gene (**ME**diterranean **Fe**Ver). By 2015 305 mutations of the mentioned gene were known. MEFV gene expression results in the formation of pyrin protein, consisting of 781 amino acid residues. The tertiary structure of the whole protein is unknown, experimentally studied the tertiary structure only of two domains: DAPIN and B30.2. It is known that all domains and motifs of pyrin, directly or indirectly involved in protein-protein interactions with proteins of apoptosis, thereby regulating a cascade of inflammatory reactions.

The goal of thesis is studying the effects of dominant mutations on the tertiary structure of the pyrin protein and its interaction with ASC and Caspase-1 with help of computer modeling methods. In this work have been studied 15 mutations: 7 most common mutations - **E148Q**, **M680I**, **M694V**, **M694I**, **V726A**, **A744S**, **R761H**; 6 complex allele mutations - **E148Q-M694V**, **E148Q-M694I**, **E148Q-V726A**, **E148Q-A744S**, **E148Q-R761H**, **E148Q-V726A-R761H** and 2 dominant mutations - **T577N** and **T577S**, dominant inheritance of which are fully proved.

Was conducted the experiments by computer modeling of pyrin tertiary structure and its interaction with apoptosis proteins. In particular native (wild type) tertiary structure of DAPIN and B30.2 domains of pyrin protein with accuracy of 0.6 Å and 0,8 Å was modeled. On the basis of the modeled native tertiary structure of DAPIN its mutated variations - **R42W**, **E84K**, **A89T** have been built. Molecular modeling of interaction dynamics of native, as well as mutated variations tertiary structure of domain DAPIN with ASC protein was conducted. Analysis of the results showed that these mutations had low effect on the tertiary structure of the DAPIN domain and on its interaction with ASC.

On the basis of the modeled native tertiary structure of domain B30.2 mutant variations of this domain - **M680I**, **M694V**, **M694I**, **K695R**, **V726A**, **A744S**, **R761H** have been modeled. The analysis of mutant variations showed that all studied cases of mutations led to structural rearrangements in the tertiary structure (such as loop –  $\alpha$ -helix ; loop- $\beta$ -sheet;  $\beta$ -sheet- loop and  $\alpha$ -helix – loop).

Molecular modeling of interaction dynamics of native and mutated B30.2 domain tertiary structures with Caspase-1 has been performed. Molecular modeling of B30.2-Caspase-1 interaction dynamic revealed significant differences between interaction energy of normal and mutated domains. Decrease in the average complex formation energy in the case of **M680I** - 0,21% (in comparison to the normal domain), decrease in the case of **M694V** (36,8%), decrease in the case of **M694I** (54,4%), increase in **K695R** (30%), increase in **V726A** (29%) and increase in **A744S** (67%) have been observed.

A full-length native tertiary structure of pyrin protein with accuracy of 1.6 Å was modeled, which was a good resolution for such a big protein. On the basis of the modeled native tertiary structure the following mutated variations **E148Q**, **M680I**, **M694V**, **M694I**, **V726A**, **A744S**, **R761H**, **E148Q-M694V**, **E148Q-M694I**, **E148Q-V726A**, **E148Q-A744S**, **E148Q-R761H**, **E148Q-V726A-R761H**, **T577N** and **T577S** have been built.

The analysis of mutant variations showed that all studied cases of mutations led to structural rearrangements in the tertiary structure, such as: loop –  $\alpha$ -helix, loop- $\beta$ -sheet,  $\beta$ -sheet- loop,  $\alpha$ -helix – loop,  $\alpha$ -helix –  $\beta$ -sheet, elongations and shortening of  $\beta$ -sheets and  $\alpha$ -helices, separation of one large  $\beta$ -sheet into two small.

