

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

**ФИЗИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "АТОМНА ФИЗИКА"**

ДИСЕРТАЦИЯ

на

Елисавета Любомирова Миладинова

за присъждане на образователната и научна степен "Доктор",
в професионално направление "4.1 Физически науки",
научна специалност "01.06.08 Биофизика"

РАЗРАБОТВАНЕ НА ФИЗИЧЕСКИ МОДЕЛИ НА ИМУНОАКТИВНИ МОЛЕКУЛИ

Научен ръководител:

проф. д-р Леандър Литов

СОФИЯ, 2022 г.

Съдържание

Съкращения	1
Увод	3
1 Въведение	5
1.1. Окситоцин	5
1.1.1. Структура на човешкия хормон окситоцин	6
1.1.2. Биосинтез на окситоцин	8
1.1.3. Стабилност, време на полуживот и деградация на окситоциновата молекула	10
1.2. Окситоцинов рецептор (OTR)	12
1.2.1. Рецептор, свързан с G протеин (GPCR)	12
1.2.2. Неактивно (R) и активно състояние на рецептора (R*)	14
1.2.3. G протеин - структура, механизъм на действие и регулация	16
1.2.4. Структура на гена, кодиращ окситоциновия рецептор	19
1.2.5. Аминокиселинни отстатъци в рецептора, важни за свързването на окситоцина	20
1.3. Сигнална трансдукция	22
1.4. Роля на холестерола и прогестерона в регулацията на рецепторната експресия	24
1.5. Металните йони като посредник за успешното взаимодействие между окситоцин и неговия рецептор	25
2 Компютърно моделиране на биологични макромолекули и методи за анализ на получените резултати	30
2.1. Молекулна динамика	30
2.1.1. Силов поле (междуатомен потенциал)	33
2.1.2. Налагане на периодични гранични условия	40
2.1.3. Минимизация на енергията	41
2.1.4. Инициализация и алгоритми за интегриране на уравненията за движение	42
2.1.5. Ограничаване на дължината на химичните връзки с алгоритъма LINCS	45
2.1.6. Поддържане на постоянна температура и налягане	46
2.1.7. Софтуерен пакет за молекулна динамика GROMACS	49
2.2. Хомоложно моделиране	50
2.2.1. Намиране на подходящи структури за темплейти и секвенционно подравняване	52
2.2.2. Провеждане на хомоложното моделиране (изграждане на модел)	55
2.2.3. Усъвършенстване на модела	57
2.2.4. Анализ и оценка на качеството на модела	57
2.2.5. Софтуерен пакет за хомоложно моделиране MODELLER	58
2.3. Свързан подход (“bonded approach”)	58
2.4. Молекулен докинг	59

2.5. Методи за анализ на лиганд – рецепторни взаимодействия	60
2.5.1. ММ – PBSA подход	60
2.5.2. HBonanza алгоритъм	62
3 Изследване на стабилността на комплекса окситоцин – дивалентен цинк във воден разтвор с молекулна динамика	63
3.1. Моделиране на комплекса окситоцин – дивалентен цинк	63
3.1.1. Молекулно моделиране	63
3.1.2. Резултати	64
3.2. Стабилност на изградения комплекс окситоцин – дивалентен цинк във воден разтвор	68
3.2.1. Молекулна динамика	68
3.2.2. Резултати	69
4 Изграждане на 3D структура на човешки окситоцинов рецептор чрез хомоложно моделиране	75
4.1. In silico модел на пространствената структура на рецептора	75
4.1.1. Хомоложно моделиране	75
4.1.2. Резултати	80
4.2. Изграждане на модел на мембраната на матката	84
4.2.1. Молекулно моделиране	84
4.2.2. Резултати	84
4.3. Молекулна динамика на системата рецептор – мембрана	85
4.3.1. Молекулна динамика	85
4.3.2. Резултати	86
5 Изследване на взаимодействието между пептидният хормон окситоцин и неговия рецептор с молекулна динамика	87
5.1. Моделиране на системата рецептор – мембрана – окситоцин	87
5.1.1. Изграждане на хормон – рецепторен комплекс	87
5.1.2. Резултати	89
5.2. Места на свързване в комплекса хормон – рецептор	90
5.2.1. Молекулна динамика	90
5.2.2. Резултати	90
5.3. Конформационни промени в окситоциновия рецептор, предизвикани от свързването на лиганда – окситоцин	93
5.3.1. Изследване на механизма на активиране на рецептора	93
5.3.2. Карта на Рамачандран	94
5.3.3. Резултати	95
6 Хепаран сулфат като помощна молекула за успешното свързване между човешкия интерферон гама и неговия извънклетъчен рецептор INFγR1	99
6.1. Хепаран сулфат и интерферон гама	99
6.2. Моделиране на системите: INF- γ , INF γ R1 и INF- γ , INF γ R1, HS хекса- или октазахариди	104
6.2.1. Молекулно моделиране	104
6.2.2. Резултати	105
6.3. Изследване на взаимодействието между INF- γ и INF γ R1 без и в присъствието на HS хекса- или октазахариди	106
6.3.1. Молекулна динамика	106

6.3.2. Резултати	107
Заключение	112
Научни приноси	116
Научни публикации, въз основа на които е написана дисертацията	118
Благодарности	120
Библиография	121

Съкращения

OT	окситоцин
GPCRs	G-протеин свързани рецептори
TM	трансмембранен
EL	извънклетъчна извивка
IL	вътреклетъчна извивка
СП	сигнален пептид
НФ	неврофизин
OTR	окситоцинов рецептор
GTP	гуанозинтрифосфат
GDP	гуанозиндифосфат
Pi	неорганичен фосфат
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
PLC	фосфолипаза C
PIP2	фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат
PI3	инозитол 1,4,5-трифосфат
DAG	1,2-диацилглицерол
MLCK	киназа на леката верига на миозина
PKC	протеинкиназа C
MAPK	митоген-активирана протеин киназа
PLA2	фосфолипаза A2
МД	молекулна динамика
PME	мрежа от частици на Евалд
FFT	бързо преобразуване на Фурие
PDB	база от данни за протеини
LINCS	метод за решаване на линейни ограничения
GROMACS	машина за химически симулации на Грьонинген
MPI	интерфейс (библиотека) за предаване на съобщения

BLAST	основен инструмент за търсене на локално подравняване
NCBI	Национален център за биотехнологична информация
PAM	приета точкова мутация
BLOSUM	матрица за заместване на блокове
pdf	функция на плътността на вероятността
molpdf	молекулна функция
DOPE	дискретна оптимизирана енергия на протеина
RMSD	средно квадратично отклонение
vsLab	виртуална лаборатория за скрининг
VMD	визуална молекулна динамика
MM-PBSA	молекулна механика на Поасон – Болцман
RMSF	средна квадратична флукуация
Rg	радиус на въртене
SASA	достъпна за разтворителя повърхност
INF- γ	интерферон гама
GAG	гликозоаминогликан
HS	хепаран сулфат
IFN γ R	рецепторен комплекс за интерферон гама
IFN γ R1	α -верига на рецепторния комплекс
IFN γ R2	β -верига на рецепторния комплекс
JAK1	Янус киназа 1
JAK2	Янус киназа 2
STAT1	сигнален преобразувател и активатор на транскрипцията
HSPG	хепаран сулфат протеогликан
dp	степен на полимеризация

Увод

Преждевременното раждане е обект на научно внимание от много години. Въпреки големия брой изследвания, патофизиологията на този процес, който започва преди 37-мата седмица от бременността, остава все още неизвестна.

През последните десетилетия, благодарение на големите успехи на молекулярната биология, медицината разкрива редица молекулно-биохимични детайли, свързани с преждевременното раждане. Усъвършенстването на молекулярно-биологичното познание е важна предпоставка за разработване на нови лекарства с по-голяма ефикасност и на нови терапевтични стратегии. Това са изследвания, насочени към разкриването на биологични мишени и молекули на сигналните пътища, които участват в иницирането на процеса на ранното раждане.

Съществен проблем в борбата с преждевременното раждане е липсата на високоефективни и високоселективни лекарствени препарати, сред които са и инхибиторите на окситоцина. Окситоцинът е хормон с пептидна структура, който се отделя от задния дял на хипофизата и се свързва чрез специални рецептори в матката, като така предизвиква маточните контракции преди раждането. При предтерминно раждане се цели въвеждането на медикамент (антагонист), който да има противоположно действие на това на окситоцина (агонист), за да се намалят или спрат маточните контракции. Разрешен за употреба антагонист на окситоцина от групата на токолитиците е Atosiban (Tractocile®), за който обаче са характерни нежелани лекарствени реакции, а също и ниска селективност, изразяваща се в това, че освен с рецепторите за окситоцин, атозибанът се свързва и с вазопресиновите рецептори. При преждеременно раждане често се използва и комбинация от токолитични лекарства, с различен механизъм на действие, което от една страна, позволява атакуването на различни молекулярно-биологични мишени, но от друга страна е свързано и с повишен риск от нежелани лекарствени реакции. Причината за липсата на достатъчно ефикасно лекарство за предотвратяване на преждевременното раждане е, че взаимодействието между окситоцина (лиганд) и неговия рецептор, медирано от метални йони като кофактор, не се разбира добре на молекулно ниво, защото пространствената структура на двете молекули е неизвестна. А тя е важен фактор, който контролира свързването на лигандите в биомолекулните системи.

Хормонът окситоцин е и ключов регулатор на имунната система, като част от защитните му функции върху организма са свързани с повишаване на производството на противовъзпалителния цитокин интерферон гама по време на вирусни или бактериални инфекции. Подобни инфекции на пикочо-половата система са и сред една от най-честите причини, водещи до преждеременно раждане. За да се спре инфекцията в организма е необходимо интерферон гама да се свърже със своя извънклетъчен рецептор. Механизмът на взаимодействие между интерферон гама и неговия рецептор IFN γ R1, обаче, не е напълно изяснен на молекулно ниво.

Използването на експериментални методи за определяне на пространствената структура на биомолекули и за изследване на взаимодействията между тях, обикновено е трудоемко, не винаги успешно, а и скъпоструващо. Затова насоките в съвременната медицина са свързани с търсенето на

подходящи теоретични подходи за целта. Изграждането на теоретични модели на процеси, протичащи в човешкото тяло и изучаването на тези процеси с помощта на компютърни симулации дава много по-подробна информация за тях, която не може да бъде получена чрез лабораторни експерименти.

Настоящата дисертация е свързана със създаването на компютърен модел на хормон - рецепторен комплекс, изграден въз основа на по-рано докладвани експериментални данни, с помощта на който да се изясни в детайли механизма на взаимодействие между човешкия хормон окситоцин и неговия рецептор. Информацията за местата на свързване и конформационните промени, предизвикани от свързването на лиганда в този модел, ще позволят проектирането и разработването на по-ефективни и селективни антагонисти на рецептора, с възможно приложение за превенция на преждевременните раждания. Освен това дисертацията е насочена и към по-детайлно проучване на взаимодействието между цитокина интерферон гама и неговия извънклетъчен рецептор IFN γ R1 с помощта на компютърни симулации. Целта на тези симулации е да бъде изяснена ролята на C – края на цитокина при взаимодействието му с рецептора, а също и да бъде изяснена ролята на гликозаминогликана хепаран сулфат, като помощна молекула, в процеса на свързване между интерферон гама и неговия клетъчен рецептор. Изясняването на механизма на взаимодействие между интерферон гама и неговия рецептор ще допринесе за разработването на по-ефективни терапевтични стратегии за контрол на нивата на противовъзпалителния цитокин при преждевременно раждане.

Дисертацията се състои от увод, шест глави и заключение. Първата глава от дисертацията е въведение, описващо структурата и биологичните функции в организма на човешкия хормон окситоцин и неговия извънклетъчен рецептор, както и ролята на металните йони като важен посредник за успешното свързване между двете молекули – хормон и рецептор. Във втората глава е изложена накратко същността на методите, които са използвани за компютърно моделиране, симулиране и анализ на получените резултати на изследваните в дисертацията биологични макромолекули. Третата глава е свързана с получаването на стабилен комплекс между хормона окситоцин и двувалентен цинков йон във воден разтвор, което е важно условие за успешното свързване на окситоцина с неговия рецептор. Тъй като окситоциновият рецептор е мембранен протеин, който е труден за кристализиране, неговата 3D структура е неизвестна, поради което четвъртата глава от дисертацията е посветена на изграждането на пространствената структура на рецептора, с помощта на метода хомоложно моделиране. В петата глава е изследвано взаимодействието между окситоцина (свързан с метален йон) и неговия рецептор чрез молекулно-динамични симулации. Последната шеста глава от дисертацията представя модел на взаимодействие между противовъзпалителния цитокин интерферон гама и неговия извънклетъчен рецептор IFN γ R1, с помощта на който е изяснена ролята на C – края на цитокина при това взаимодействие, а също и ключовата роля на хепаран сулфата, като помощна молекула, в процеса на свързване между интерферон гама и неговия клетъчен рецептор.

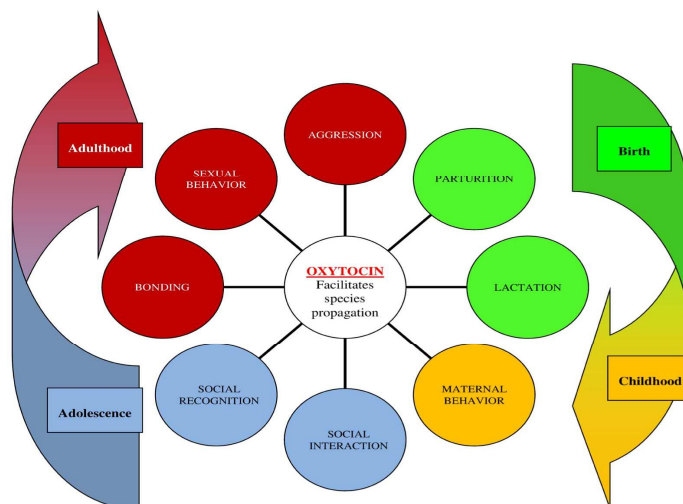
Накрая дисертацията съдържа научните приноси на докторанта, списък с научните статии, въз основа на които е написана и библиография.

Глава 1

Въведение

1.1. Окситоцин

Окситоцинът (ОТ) е хормон с пептидна структура, който действа както върху периферните тъкани (хормонално), така и като невротрансмитер в мозъка. Той играе важна роля в контрола на маточните контракции по време на раждане, в секрецията на мляко, в регулацията на имунната система и в много социални и поведенчески реакции (Фиг. 1). Синтезира се от неврони, разположени в хипоталамуса. Хормонът се транспортира по аксоните на хипоталамо - хипофизния тракт във вид на прохормон (свързан с белтъка неврофизин) и се натрупва в задния дял на хипофизата, откъдето се секретира в кръвообръщението в отговор на различни стимули [1, 2].

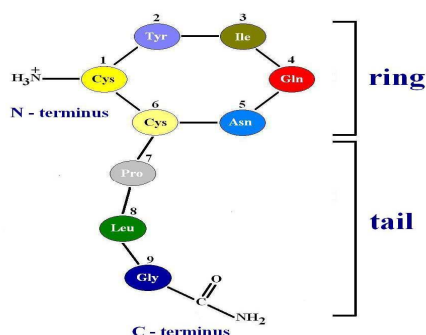


Фигура 1. Периоди от живота на човека, в които окситоцинът може да повлияе на неговото поведение и физиология. Фигурата е от [2].

Окситоцинът осъществява функциите си чрез взаимодействие със специфичен рецептор, който принадлежи към родопсиновата група, най-голямата и най-разнообразна подгрупа, на G - протеин свързаните рецептори (GPCRs) [3, 4]. Хормонът се свързва към трансмембранната част на рецептора и по този начин го активира, предизвиквайки стартирането на различни вътреклетъчни сигнални пътища. Това води до повишаване на концентрацията на Ca^{2+} в клетката, актиновите филаменти се свързват с миозиновите и гладката мускулатура на матката се съкращава. Повишената секреция на окситоцин, свързана с хормонални нарушения в ендокринните жлези (щитовидна жлеза, хипофиза), по време на бременност, може да причини контракции на матката и преждевременно раждане. Конкурентни антагонисти на човешкия окситоцин на рецепторно ниво се използват широко за предотвратяване на такива случаи [5, 6], но тяхната ефикасност е ограничена. По тази причина се налага търсенето на по-ефективни и селективни лекарства, които да блокират активността на окситоцина, като се свържат с неговия рецептор.

1.1.1. Структура на човешкия хормон окситоцин

Окситоцинът е изолиран и синтезиран за първи път през 1953 г. от Винсент дю Виньо, който две години по-късно е носител на Нобелова награда по химия за това откритие [2]. Химичната формула на хормона е $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$, а неговата молекулна маса е 1007 Da (далтона). Той е нонапептид изграден от девет аминокиселинни остатъка. Аминокиселинната последователност е: Cysteine-Тyrosine-Isoleucine-Glutamine-Asparagine-Cysteine-Proline-Leucine-Glycinamide. Първият аминокиселинен остатък Cys1 и шестият аминокиселинен остатък Cys6 в окситоциновата молекула са свързани с дисулфиден мост, който разделя хормона на две части - дисулфиден пръстен и ациклична трипептидна опашка (Фиг. 2) [1].

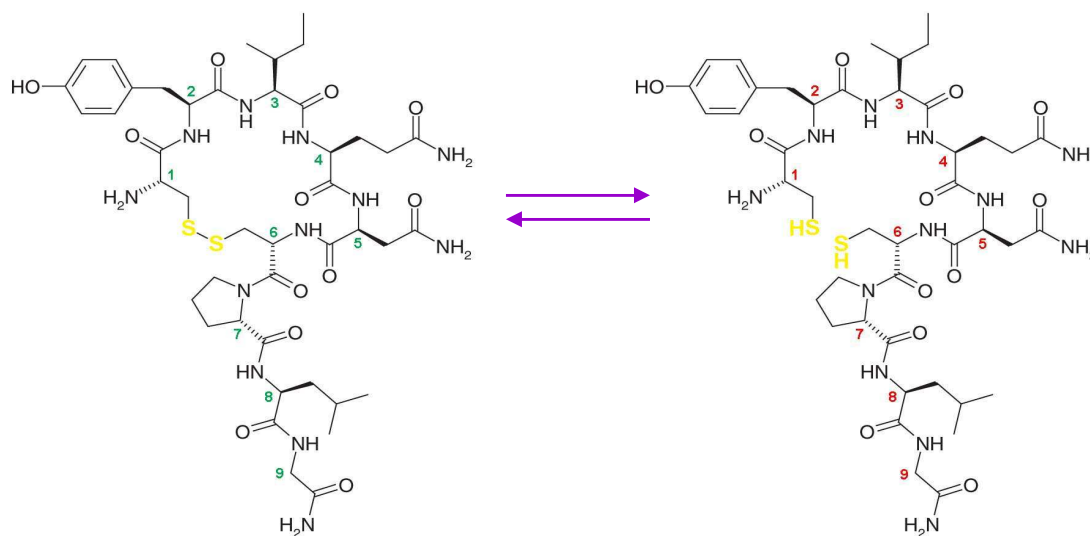


Фигура 2. Структура на окситоцин.

Аминокиселинната последователност в молекулата на окситоцина е еднаква при всички бозайници. Изключение правят само маймуни като мармозети, тамарини и други примати от Новия свят, за които е установена нова структура на хормона, при която аминокиселината левцин, в позиция осем, е заместена с пролин. Биологичната роля на тази единична мутация, в аминокиселинния състав на окситоцина, остава все още неизяснена, но се предполага че е свързана с функцията на пептида [7].

Молекулата на окситоцина проявява амфифилен (двойствен) характер, тъй като е изградена както от полярни, така и от неполярни аминокиселинни остатъци. Шестчленният пръстен на хормона (Cys1 - Tyr2 - Phe3 - Gln4 - Asn5 - Cys6) се състои от полярни аминокиселини, с изключение на Phe3, която е неполярна, а трипептидната опашка (Pro7 - Leu8 - Gly9) е съставена от неполярни остатъци.

Експериментални изследвания показват, че окситоцина може да съществува в две форми - окислена (биологично активна) и редуцирана (биологично неактивна). Окислената форма на пептида, известна като окситоцин дисулфид е със стабилна връзка между двата цистеинови остатъка Cys1 - Cys6 в молекулата, докато в редуцираната форма, наречена окситоцеин (дителион наонапептид), тази връзка е разрушена. Интересен е фактът, че окситоцеинът действа като чистач на свободните радикали в организма, тъй като е донор на свободни електрони. Освен това той може да се окисли отново до биологично активната форма на пептида - окситоцин дисулфид (Фиг. 3) [8].

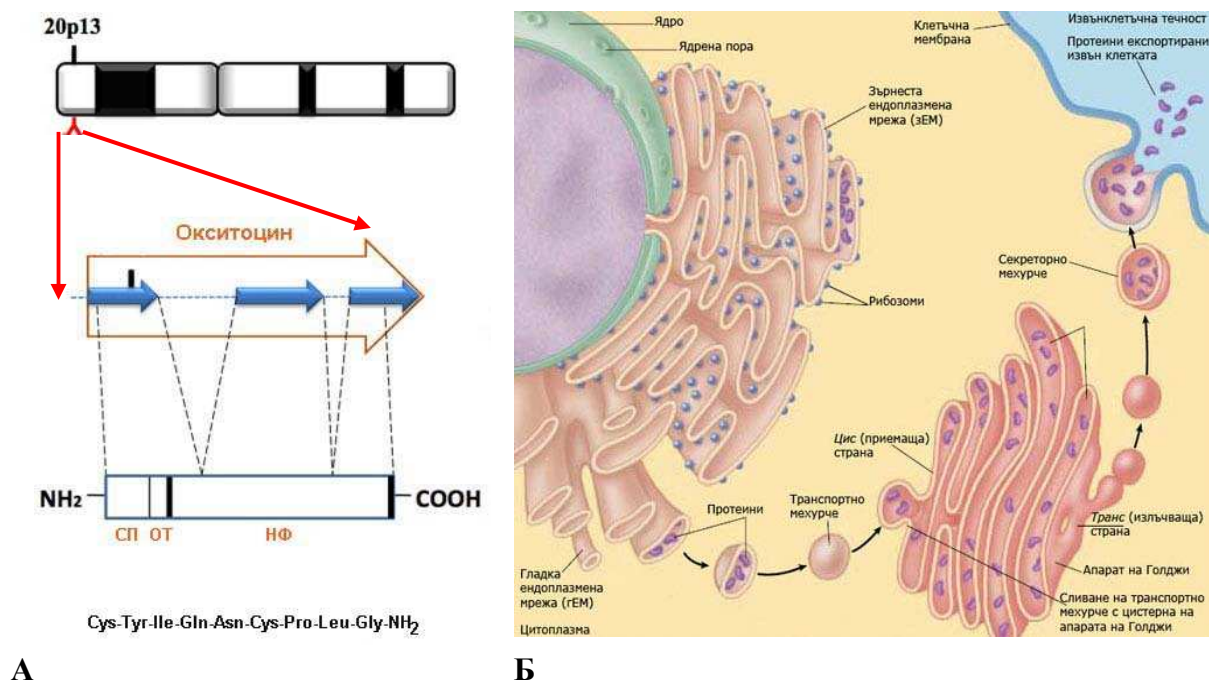


Фигура 3. Биологично активна (окислена) и биологично неактивна (редуцирана) форма на окситоцин. Фигурата е използвана с леки промени от [9].

1.1.2. Биосинтез на окситоцин

Окситоцинът принадлежи към групата на невропептидите, най-разнообразният клас молекули в тялото, които се продуцират и секретират от нервните клетки (неврони). Генът отговорен за неговата експресия е разположен върху хромозома 20p13 и се състои от три екзона. Първият екзон кодира: сигнална последователност, нонапептидният хормон и първите десет аминокиселинни остатъка на белтък, наречен неврофизин, чиято роля е да пренесе окситоцина до отдалечените, крайни части на неврона. Вторият и третият екзон кодират централната част на неврофизина (остатъци 10-76), както и неговия СООН - терминален регион (остатъци 77-93/99) [1, 10].

Невропептидите се произвеждат като големи неактивни предшественици (пропептиди) и узряват чрез посттранслационни модификации. Дължината на полипептидната им верига варира от 5 до 80 аминокиселинни остатъка. Характерна за пропептидите е N - терминална сигнална последователност (с дължина между 15 и 40 остатъка), която е изградена от положително заредена област, хидрофобна област и няколко полярни, но незаредени аминокиселини. С помощта на комплекс наречен транслокон тази сигнална последователност участва в закрепването на синтезиращата се верига на пропептида към мембраната на ендоплазмената мрежа. След поредица от стъпки за модификация, общи за много протеини в ендоплазмената мрежа, неактивните пропептиди се пакетират в транс частта на апарата на Голджи, в незрели секреторни гранули заедно със специфичните за пептида биосинтетични ензими за обработка. Един от тези ензими (пептидилглицин алфа-амидираща монооксигеназа) добавя amidна група към глицина в C - края на пропептида, като по този начин стабилизира пептидната структура, предпазвайки я от разграждане. Секреторните гранули узряват в големи секреторни везикули, в които се извършва допълнителна обработка на пропептида до по-малки, по-нататъшно модифицирани, активни невропептиди. Посттранслационните модификации във везикулите включват: ацетилиране, сулфатиране, гликозилиране, фосфорилиране и циклизация. Много от тези на пръв поглед незначителни модификации са от съществено значение за биологичната активност. След това невропептидите се съхраняват и транспортират до отдалечени (терминални) части на неврона, откъдето се освобождават (в кръвообръщението или към друга нервна клетка) в отговор на стимул (Фиг. 4) [11, 12].

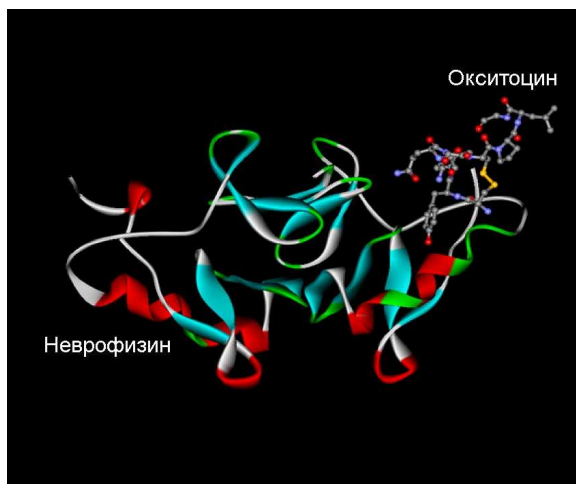


Фигура 4. А/ Схематична диаграма на гена на окситоцина (голяма стрелка), пропептида (кутии) и невропептида (отдолу). Позицията на гена в хромозомата е показана най-отгоре. Генът е съставен от три екзона, представени със сини стрелки, които са разделени помежду си от два интрона (изобразени като пунктирна линия между екзоните). Пропептидът е изграден от сигнален пептид (СП), невропептид (ОТ) и неврофизин (НФ). Сигналите за обработка на пептид са представени с дебели черни линии. Б/ Синтез на невропептиди в клетката. Фигурата е от [13, 14].

Неврофизините са белтъците - носители на пептиди като окситоцин и вазопресин (важен за водната регулация в организма), като тяхната основна роля е свързана с правилното насочване, опаковане и съхранение на невропептида в секреторната везикула преди освобождаването му в кръвта. Тези белтъци пренасят пептидите от мястото на синтез в клетъчното тяло на неврона до неговите терминални (крайни) части, разположени в задния дял на хипофизата. Неврофизините са изградени от единична полипептидна верига, която се състои от 93-95 аминокиселинни остатъка и съдържат 14 цистеинови остатъка, които образуват 7 дисулфидни връзки помежду си. Cys1 и Tyr2 в молекулата на окситоцина са двете основни аминокиселини, които участват в свързването с неврофизина (Фиг. 5) [15].

В кисела среда (рН 5.5), като тази в невросекреторните везикули, двете молекули на окситоцина и на неврофизина образуват стабилен комплекс, тъй като α -

аминогрупата на първия цистеинов остатък (Cys1) в пептида е протонирана, което позволява участието ѝ както в електростатични взаимодействия така и във водородни връзки с белтъка - носител. За разлика от това, след освобождаване на комплекса (окситоцин - неврофизин), от невросекреторните везикули и навлизането му в кръвната плазма, където рН е около 7.4, се наблюдава неговото разпадане, поради депротониране на α - аминогрупата [1].



Фигура 5. Окситоцин, свързан с неговия протеин - носител неврофизин. Фигурата е от [16].

В невроните се произвеждат както невропептиди, които действат върху отдалечени тъкани и органи в човешкия организъм, така и пептиди (напр. кортикотропин и диноρφин), които осъществяват ефектите си локално. Окситоцинът и вазопресинът са единствените известни хормони, отделяни от задния дял на хипофизата при човека, които действат на разстояние [17].

1.1.3. Стабилност, време на полуживот и деградация на окситоциновата молекула

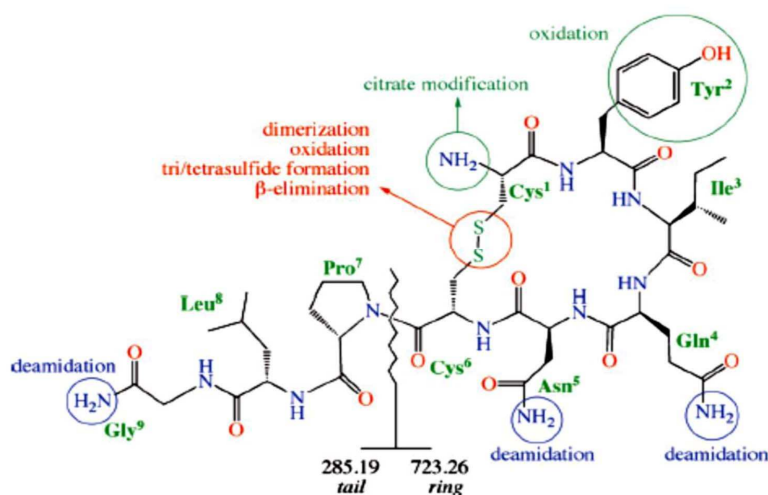
Окситоцинът се състои от шестчленен пръстен, Cys1 - Tyr2 - Ile3 - Gln4 - Asn5 - Cys6 и тричленна опашка, Pro7 - Leu8 - Gly9 - NH₂, като двата цистеинови остатъка Cys1 и Cys6 в неговата молекула са свързани с дисулфидна връзка помежду си. Установено е, че аминокиселината Asn5 е отговорна за биологичната активност на хормона, а аминокиселинните остатъци Ile3, Gln4, Pro7 и Leu8 са важни за

взаимодействието с активния център на рецептора [18]. Разграждането на окситоцина в организма е свързано с промени в структурата му, което от своя страна може да доведе до промяна в биологичната активност на неuropeптида и/или до загуба на неговия афинитет към рецептора. Изсушеният чрез замразяване окситоцин ацетат остава стабилен при температури от 2 до 6° C в продължение на няколко години, с минимална загуба на своята активност [19]. За разлика от това, във воден разтвор, при температура около 30° C и по-висока, окситоцинът е силно подвижен и изключително нестабилен. Освен това стабилността на молекулната му структура е силно зависима и от рН на средата, като най-висока стабилност е установена при кисело рН 4.5 [20, 21].

Времето на полуживот на окситоцина в кръвта е от 3 до 5 минути [22].

За пептидите във воден разтвор са характерни два типа на разграждане - химическо и/или физическо. Разграждането по химичен път е свързано с модифициране на структурата на пептида, чрез образуване или разрушаване на ковалентни връзки, което води до нова химична структура, в резултат на протичането на следните химични реакции: хидролиза, окисляване, дезаминиране, дисулфиден обмен и β - елиминирание. Физическо разграждане се наблюдава, когато пептидът претърпи структурни промени, които са от по-висок ред, например димеризация.

Окситоцинът преминава през различни пътища на разграждане в зависимост от типа на аминокиселинните остатъци, рН и температурата (Фиг. 6).



Фигура 6. Пътища за разграждане на окситоцина в организма. Фигурата е от [23].

Най - често срещаната форма на разграждане по химичен път е дезаминирането. Този процес е много бърз при физиологично рН и е типичен за три аминокиселини остатъка от окситоциновата молекула - Gln4, Asn5 и Gly9. За разлика от това, в неутрална или алкална среда, дезаминирането на тези остатъци се осъществява по-бавно, с образуване на междинни съединения - циклични имиди [21]. Предразположени към разграждане чрез окисление са пептидите, в чиято химична структура присъстват аминокиселинните остатъци цистеин (Cys) и тирозин (Tyr). В присъствието на светлина и метални йони Cys1, Cys6 и Tyr2 в окситоциновата молекула се окисляват, като процесът зависи също и от рН, температурата и буферния състав на разтвора. Най-чувствителен към този тип разграждане е цистеинът. Потенциално място за разрушаване чрез β - елиминирание или дисулфиден обмен в окситоцина е и връзката между двата цистеинови остатъка Cys1 и Cys6. Разпадане на дисулфидната връзка, между тези два остатъка, с помощта на β - елиминирание, се наблюдава в алкална среда и при висока температура, с образуване на свободни тиолови групи.

Разграждането на пептидите по физичен път е свързано с димеризация, която може да завърши с агрегация. В кисела среда, протонирането на дисулфидната връзка между Cys1 и Cys6 в молекулата на окситоцина, води до реакция на обмяна на дисулфид чрез дисулфидиев катион. Образуват се димери или по-големи агрегати [23].

Експериментални изследвания показват, че термичната стабилност на окситоцина, във воден разтвор, значително се повишава при използването на цитратен буфер (рН 4.5), както и с добавянето на двувалентни метални йони, като Mg^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} . А по - слабата подвижност на хормона и стабилността на молекулната му структура във воден разтвор са от съществено значение за успешното му взаимодействие с рецептора [24].

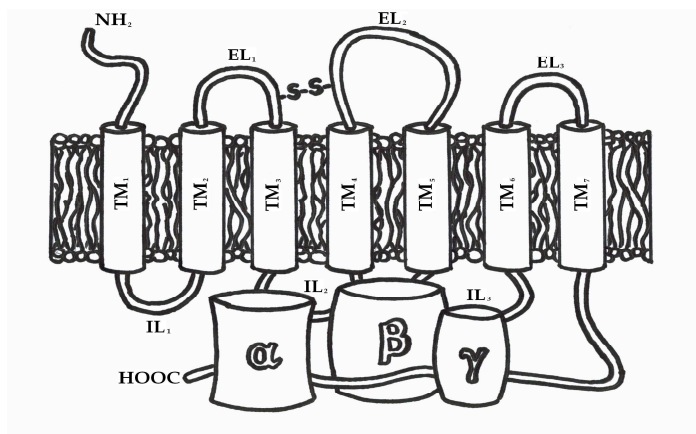
1.2. Окситоцинов рецептор (OTR)

1.2.1. Рецептор, свързан с G протеин (GPCR)

Окситоцинът осъществява функциите си чрез взаимодействие със специфичен рецептор. Хормонът се свързва към рецептора и по този начин го активира, предизвиквайки стартирането на различни вътреклетъчни сигнални пътища. Окситоциновият рецептор е представител на групата на родопсина, най-голямата и най-разнообразна подгрупа, на рецепторите, свързани с G протеин (GPCRs) [3, 4]. Тези рецептори, са важен клас от трансмембранни протеини, тъй като са таргети за много

лекарства, което ги прави интересни, както за академични, така и за фармацевтични изследвания [25, 26].

За всички членове на GPCRs са характерни структурни и функционални прилики. Те са изградени от единична полипептидна верига, която се състои от седем трансмембранни α - спирали (TM1-7), свързани помежду си с редуващи се извънклетъчни (EL1, EL2 и EL3) и вътреклетъчни извивки (IL1, IL2 и IL3). При всички GPCRs, N - край се намира в извънклетъчното пространство, а C - край е разположен във вътреклетъчната течност (цитозол) на клетката. C - крайната част на рецептора участва във взаимодействие с цитозолни G протеини. Името на тези протеини произлиза от това, че те са свързани с гуанинови нуклеотиди. Класът на гуанин - нуклеотид свързаните протеини (G протеини) иницира някои от важните сигнални пътища в клетката. Важна роля в опаковането и стабилизирането на седемте TM домена на GPCRs, играе дисулфидна връзка, която се образува между два цистеинови остатъка, разположени в извънклетъчния край на TM3/EL1 и EL2. Тези цистеинови аминокиселинни остатъци също са консервативни при почти всички рецепторни структури (Фиг. 7) [27, 28].



Фигура 7. Структура на рецептор, свързан с G протеин.

Други важни мотиви, които са характерни за представителите на GPCRs са: E(D)RY мотива (Asp/Glu3.49, Arg3.50 и Tyr3.51), разположен във вътреклетъчната част на TM3 и NPXXY мотива (Asn7.49, Pro7.50 и Tyr7.53) в TM7. Те са свързани с физиологичната функция на рецептора. Общи за GPCRs от групата на родопсина са и местата на гликозилиране в N - края на протеина, местата на палмитоилиране (добавяне

на мастна киселина, наречена палмитат, към белтъка) след ТМ7, а също така и местата на фосфорилиране в С - края [3, 25].

Членовете на GPCRs се различават главно по дължината на аминокиселинната последователност, вътреклетъчните си извивки, както и по дължината и функцията на техните N - и С - крайни домени. Тези крайни части осигуряват специфични взаимодействия с различни протеини в извънклетъчната и вътреклетъчната среда. Въпреки тези разлики в няколко подгрупи е открита значителна хомология на аминокиселинната последователност [28].

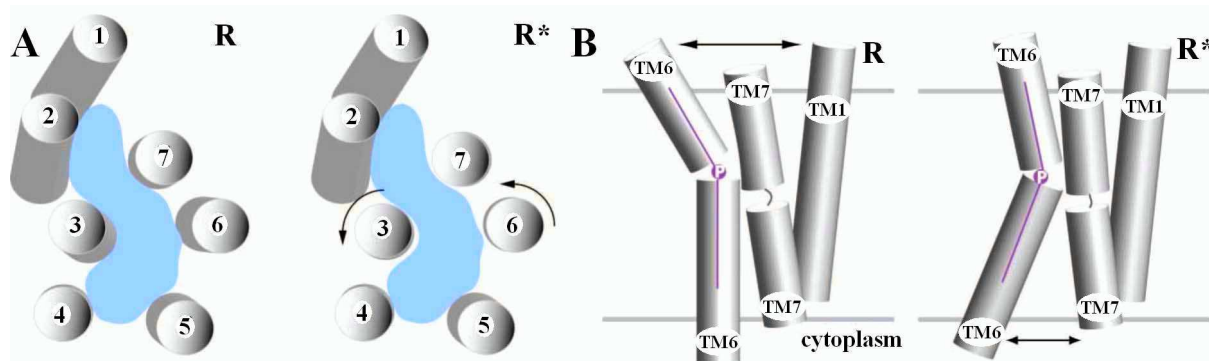
До момента са известни над 800 уникални GPCRs. Въз основа на степента на хомологията на аминокиселинната последователност и сходството във функциите им, тези рецептори са групирани в пет различни подгрупи: родопсинова (семейство А), секретринова (семейство Б), глутаматна (семейство С), адхезионна и Frizzled/Taste2. Семейството на родопсините, към което принадлежи и окситоциновия рецептор, е най-голямото и за членовете му са характерни консервативни мотиви на последователността, които предполагат общи структурни характеристики и механизми на активиране [3, 4]. Но информацията относно структурата за тази подгрупа от белтъци е оскъдна, тъй като те са мембранни протеини, които са трудни за кристализиране. Затова и пространствената структура на окситоциновия рецептор е неизвестна. А за да се създаде ефективно лекарство е необходимо познаването на триизмерната (3D) структура на целевия рецептор, както и местата на свързване с неговия лиганд [29].

GPCRs предават извънклетъчните сигнали към вътреклетъчни мишени (ефекторни молекули с белтъчна структура) след свързване на лиганди (агонисти) към тяхната извънклетъчна част. Това от своя страна предизвиква конформационни промени в рецептора и активира G протеина [28].

1.2.2. Неактивно (R) и активно състояние на рецептора (R*)

В зависимост от това дали е свързана с лиганд или не, рецепторната молекула може да съществува в две основни състояния - активно (R*) или неактивно (R). Изследвания, проведени с различни експериментални техники (електронна парамагнитна резонансна спектроскопия, флуоресцентна спектроскопия и др.), показват, че при активиране на рецептора вътреклетъчните части на трансмембранните спирали, особено ТМ6 и ТМ3/7, се раздалечават (Фиг. 8) [30, 31, 32, 33]. Тези пренареждания са

възможни благодарение на подвижната структура на една от вътреклетъчните извивки на рецептора (IL3). За разлика от това, извънклетъчните части се доближават една към друга.



Фигура 8. А/ Позиция на седемте трансмембрални спирали на рецептора в неактивно състояние (вляво) и в активно състояние (вдясно). Изгледът е от извънклетъчната страна на мембраната. Като синя зона е представено пространството между спиралите във вътреклетъчната страна на мембраната, което се разширява при активиране на рецептора чрез движението на TM3 и TM6 в противоположни посоки (стрелки). В/ Схема на процеса на активиране - страничен изглед. Пурпурният цвят Р изобразява линия, която дава възможност за движения на ригидното тяло. При активирането на рецептора (R*), рецепторната структура е отворена в цитоплазмената част, за разлика от затварянето ѝ в извънклетъчната страна на мембраната. Схемата е от [30, 34].

Отдалечаването на вътреклетъчните трансмембрални спирали една от друга, позволява на рецепторни участъци, като TM3/ E(D)RY и TM7/NPXXY мотиви, да образуват места за разпознаване от сигнални партньори, като хетеротримерни G протеини и арестин (белтък, инхибиращ свързването между рецептора и G протеина) [34]. Движенията на ригидното тяло на спиралите, представляват движения нагоре - надолу, при което въртенето се дължи на високо консервативни пролинови огъвания в средата на плазмената мембрана (Фиг. 8 В) [35]. Следователно GPCRs могат да комуникират със своите партньори за предаване на сигнала надолу по веригата, едва след като претърпят цялостни конформационни промени, механизъм, наречен "модел на активиране на превключвателя" за рецепторите със 7ТМ спирали. Предполага се, че TM6 в неактивната си форма приема конформация, която може да действа като пружина, когато се освободи от ограничение, образувано от йонна ключалка. Това заключване

между аргининовия остатък от E(D)RY мотива и глутаминовата киселина във вътреклетъчното разширение на TM6 е необходимо за поддържане на вътреклетъчния край на TM6 в непосредствена близост до TM3. Смята се, че активирането на GPCR, чрез лиганда, е свързано както със разрушаването на йонното заключване, така и на превключвателя [36], като по този начин рецептора се стабилизира в неговото активно състояние (R*) [34].

Известно е, че след активирането им с помощта на лиганди, GPCRs могат да образуват хомо- или хетеродимери помежду си, но молекулния механизъм на този процес все още не е достатъчно добре изяснен и затова няма да бъде обект на обсъждане в настоящата дисертация [37, 38, 39].

1.2.3. G протеин - структура, механизъм на действие и регулация

Рецепторът, свързан с G протеин служи като физичен път за предаване на химични сигнали през клетъчната мембрана. Свързването на лиганда, активира както рецептора, така и разположеният във вътреклетъчната среда G протеин.

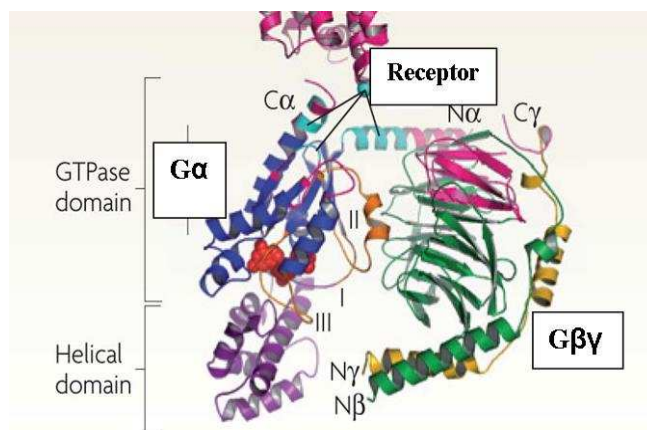
G протеинът представлява хетеротримерен мембранен белтък, който е свързан с гуанин нуклеотид. Изграден е от три субединици - α , β и γ [40]. В човешкия организъм са известни 21 $G\alpha$ субединици, кодирани от 16 гена, 6 $G\beta$ субединици, кодирани от 5 гена и 12 $G\gamma$ субединици [41]. Въз основа на сходството в първичната аминокиселинна последователност на $G\alpha$ субединицата, G протеините се разделят на четири основни класа: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ и $G\alpha_{12}$ [42].

$G\alpha$ субединицата се състои от два домена: GTP - азен и спирален. GTP - азният домен е консервативен при всички членове от семейството на G протеините. Неговата функция е свързана с хидролизата на гуанозинтрифосфат (GTP) до гуанозиндифосфат (GDP), както и с осигуряването на места за свързване с $G\beta\gamma$ димера, GPCRs и ефекторни протеини. Този домен съдържа и три гъбгави извивки, наречени превключватели - I, II и III, които участват в гуанин нуклеотидния обмен между GDP и GTP. Спиралният домен на $G\alpha$ субединицата, който е специфичен за различните представители от семейството на G протеините се състои от 6 α - спирали, които образуват капак над мястото за свързване на нуклеотидите. По този начин нуклеотидите се затварят във вътрешността на протеина. Всички $G\alpha$ субединици съдържат в N - края си мастната киселина палмитат, която е важна за регулирането на

разположението им в мембраната, а също и за взаимодействието им с други вътреклетъчни протеини .

G протеиновите β - и γ - субединици образуват функционална единица, под формата на $G\beta\gamma$ хетеродимер, която може да бъде дисоциирана само чрез денатурация. $G\beta$ субединицата започва с α - спирала в N - края си и е играна от β - витловидна гънка, образувана от седем отделни сегмента. $G\gamma$ субединицата представлява удължен участък от две α - спирали, свързани помежду си с извивка. N - крайът на $G\beta$ субединицата взаимодейства с N - края на $G\gamma$ субединицата. Всички $G\gamma$ субединици са изопренилирани с фарнезил или геранилгеранил в техния C - край, като тази липидна модификация е важна за правилната локализация на $G\beta\gamma$ димера в мембраната, а оттам и за взаимодействието му с рецептора.

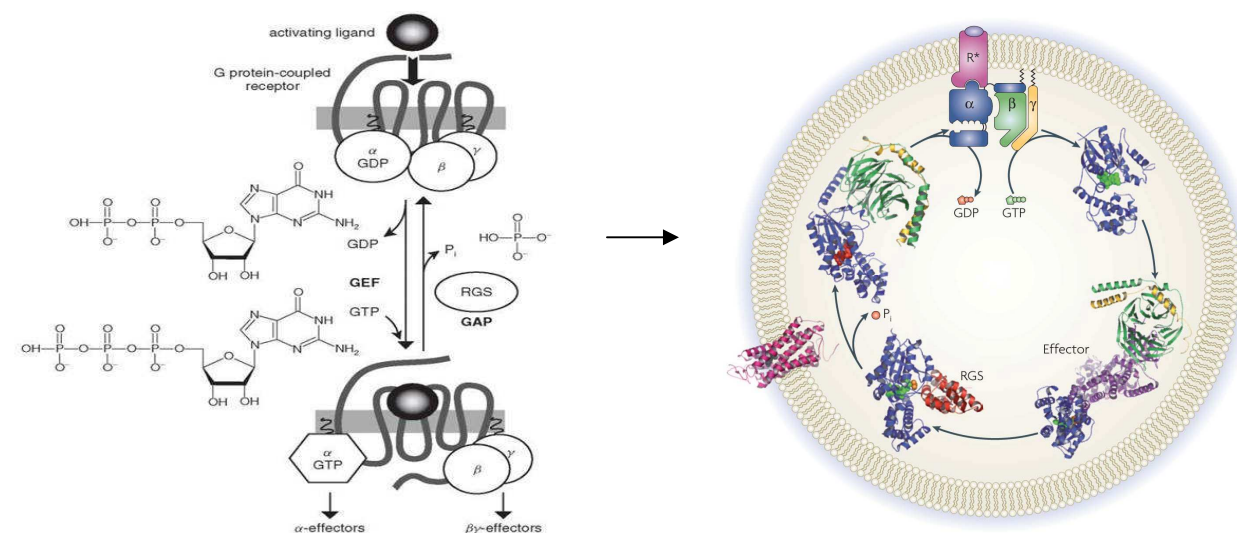
Установено е, че N - крайната част на $G\alpha$ субединицата, както и две от извивките (превключватели I и II) участват във взаимодействието с $G\beta\gamma$ димера, а C - крайната част е отговорна за свързването със специфични ефекторни протеини (Фиг. 9) [40, 43].



Фигура 9. Структура на хетеротримерен G протеин, изграден от $G\alpha$ (в тъмно синьо и виолетово), $G\beta$ (в зелено) и $G\gamma$ (в жълто) субединици. Местата на контакт между G протеина и рецептора са оцветени в розово и циан, а молекулата на гуанозиндифосфата е представена с червени сфери. Фигурата е от [40].

Пептидните лиганди се свързват, както с трансмембранните спирали на рецептора, така и с част от неговите извънклетъчни извивки, което води до конформационна промяна във вътреклетъчната част на рецептора, свързана с G протеина. Тази конформационна промяна активира рецептора и той катализира освобождаването на

GDP от $G\alpha$ субединицата. Комплексът $G\alpha$ субединица с GDP е неактивната форма на G протеина. Освобождането на GDP засилва афинитета на свързване между рецептора и G протеина, и това продължава до момента на замяната на GDP с GTP, който обикновено е в по-висока концентрация в клетката. $G\alpha$ субединицата свързана с GTP, представлява активната форма на G протеина. Свързването на GTP предизвиква разделяне (отделяне) на $G\alpha$ субединицата от $G\beta\gamma$ димера. Това позволява на $G\alpha$ субединицата и $G\beta\gamma$ димера да участват поотделно във взаимодействия с ефекторни молекули, като ензими (продуциращи вторични посредници в клетката) или с различни класове йонни канали. След като изпълни функцията си в клетката $G\alpha$ субединицата, с помощта на GTP - азния си домен хидролизира GTP до GDP и неорганичен фосфат (P_i), което позволява повторното ѝ свързване с $G\beta\gamma$ димера и завършване на цикъла (Фиг. 10) [27, 40, 43, 44].



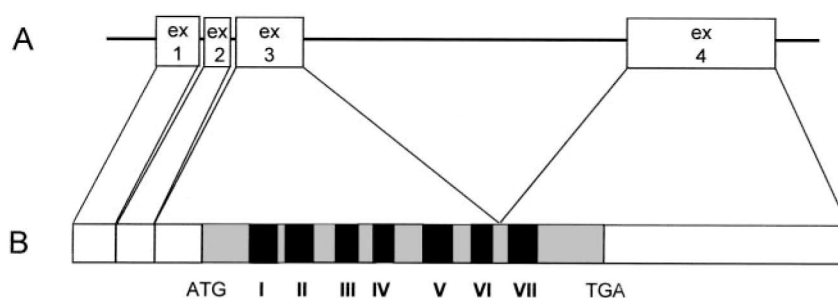
Фигура 10. Цикъл на гуанинов нуклеотиден обмен и GTP хидролиза чрез хетеротримерен G протеин. Рецепторът в неговата активна форма (R^*) е представен в розово, $G\alpha$ субединицата в тъмно синьо и виолетово, $G\beta\gamma$ димера в зелено (β) и жълто (γ), а RGS белтъците в червено. GDP и GTP са изобразени с червени и зелени сфери. P_i е неорганичен фосфат. Фигурата е от [40, 43].

Експериментални изследвания показват, че скоростта на хидролиза на GTP в клетката е много бавен процес, което предполага участието и на други помощни протеини, които го ускоряват. RGS белтъците са мултифункционални сигнални

протеини, които регулират сигналните пътища на G протеина. Те се свързват директно към $G\alpha$ - GTP субединицата и действат като протектори, които активират GTP - азния й домен. Това ограничава живота на GTP и той се хидролизира, което от своя страна води до инхибиране на G протеин сигнализацията. Цикълът на активиране / дезактивиране на тримерните G протеини е много бърз процес, вариращ от милисекунди (трансдуция) до секунди при различните групи G белтъци [27, 44].

1.2.4. Структура на гена, кодиращ окситоциновия рецептор

Окситоциновият рецептор е кодиран от ген, разположен в генен локус 3p25-3p26.2 на генома при човека. Генът е изграден от 3 интрона и 4 екзона и е отговорен за синтез на протеин с дължина от 389 аминокиселинни остатъка. Екзони 1 и 2 съответстват на некодиращ регион, докато екзони 3 и 4 кодират аминокиселините на рецептора. Интрон 3 разделя кодиращата област, непосредствено след трансмембранна спирала 6. Екзон 4, съдържа последователност, кодираща седмия трансмембранен домен, C - края на рецептора и целия некодиращ регион, влючващ сигналите за полиаденилиране (Фиг. 11). Установено е, че генен елемент в интрон 3, на гена на човешкия окситоцинов рецептор, е свързан с физиологичния контрол и подтиска експресията на рецептора. Стероидните хормони също имат косвено влияние, както върху гените за окситоцина, така и върху гените за неговия рецептор, като вероятно включват междинни транскрипционни фактори или кофактори [1, 45].



Фигура 11. А/ Схематична диаграма на гена на окситоциновия рецептор при човека. С бели кутии (отгоре) са представени екзоните, като от тях само екзони 3 и 4 кодират аминокиселинната последователност на рецептора. В/ На схемата (отдолу) са изобразени също стартовия кодон (ATG) и стоп (TGA) кодона от ДНК (дезоксирибонуклеинова киселина) на рецептора. ДНК последователностите,

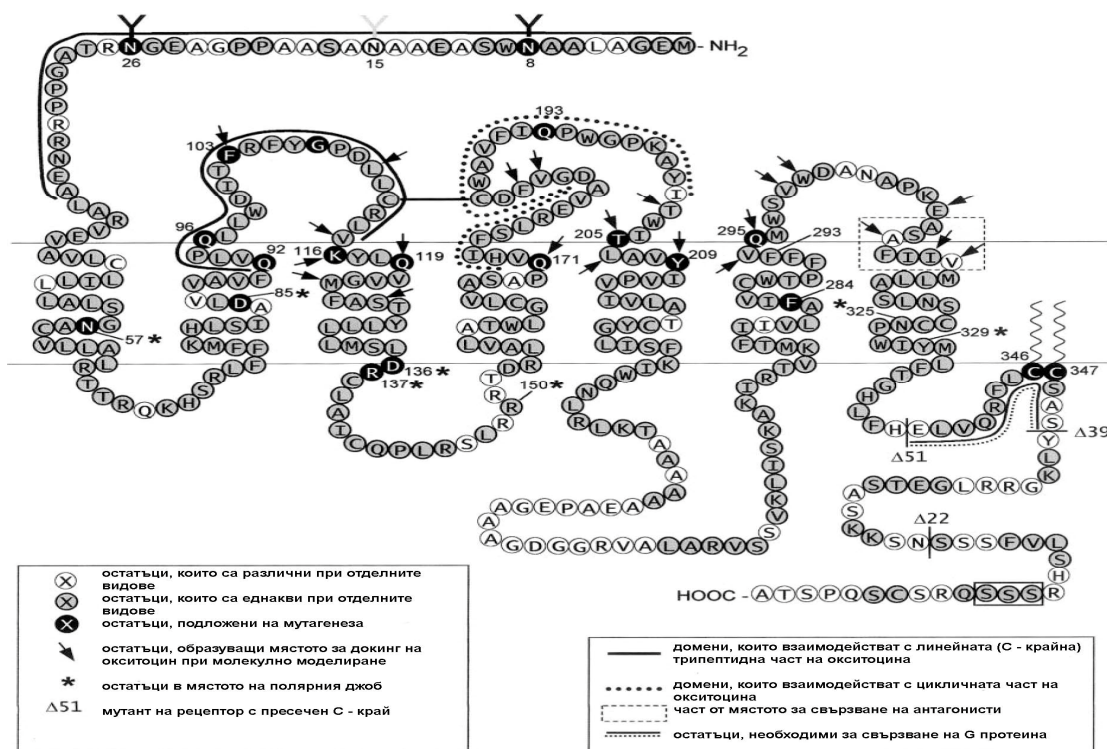
кодиращи трансмембранните участъци I - VII, са обозначени с черни зони. Фигурата е от [1].

1.2.5. Аминокиселинни остатъци в рецептора, важни за свързването на окситоцина

Общите структурни характеристики на рецепторите са важни за разпознаването на лигандите, които трябва да се свържат към тях. Доказано е, че за представителите на родопсиновото семейство е характерна значителна хомология в аминокиселинната последователност, особено за аминокиселинните остатъци, разположени в извънклетъчните извивки и трансмембранните спирали. По - слаби прилики се наблюдават в С - и N - крайните домени на рецепторите, а най - незначителни прилики има във вътреклетъчните им извивки. При свързването на пептидни лиганди, като окситоцин или вазопресин, е установено, участието на аминокиселинни остатъци на съответния рецептор, разположени както в извънклетъчните извивки така и в трансмембранните спирали. Поради хомологията в аминокиселинната последователност за членовете на родопсиновото семейство са характерни както общи, така и специфични места на контакт с техните лиганди [46, 47].

Комбинация от теоретични и експериментални изследвания показват, че свързващият джоб за окситоцина в неговия рецептор е разположен в тясна цепнатина с пръстеновидна форма, ограничена от трансмембранните спирали на рецептора. Аминокиселината Val115 (TM3) играе решаваща роля за селективността на лиганда, а силно консервативните Gln остатъци (Gln119 и Gln295) в трансмембранните домени 3 и 6 създават общ джоб за свързване на агонисти за всички представители на родопсиновото семейство. Други консервативни остатъци от рецептора, които участват във взаимодействието с окситоцина са: Met123 (TM3), Gln171 (TM4), Phe291 (TM6) и Leu317 (TM7). Молекулно моделиране на други групи в комбинация с мутагенетични изследвания, разкриват голям брой потенциални места в окситоциновия рецептор, за които се предполага, че са съществени за свързване на неговия лиганд: Phe103, Leu110, Val115, Lys116, Gln119, Met123, Ser126, Gln171, Val184, Phe185, Thr202, Thr205, Leu206, Tyr209, Val294, Gln295, Val299, Trp300, Glu307, Ala310, Ile313, Val314. От тях, аминокиселинните остатъци подложени на мутагенеза са: Lys116, Gln119, Gln171, Thr205, Tyr209 and Gln295 [1, 48, 49, 50, 51, 52].

Експериментални данни показват важната роля на аминокиселината Пе3 в окситоциновата молекула за специфичното свързване към рецептора. Счита се, че остатъците от окситоциновия рецептор, които разпознават тази аминокиселина са решаващи за взаимодействието му с хормона. Тези остатъци са: Phe291 (TM6), Leu317 (TM7), Val294 (TM6), Met123 (TM3), Gln295 (TM6) и Gln119 (TM3). Освен това пространствената ориентация на три аминокиселинни остатъка в окситоцина (Пе3, Gln4 и Asn5) е също изключително важна за правилното свързване с рецептора. Специфични места за свързване на окситоцина, определящи селективността, са и две от извънклетъчните извивки в окситоциновия рецептор - EL1 и EL2. Предполага се, че цикличната част на хормона (N - края) е свързана към едната (EL2), а трипептидната му опашка (C - края) към другата извънклетъчна извивка (EL1). Проведени изследвания показват, че афинитета на свързване на окситоцина към неговия рецептор се дължи главно на неговата циклична част, а не на трипептидната му опашка. Като за специфичната селективност на лиганда е отговорна аминокиселината Пе3, разположена в неговата пръстенна част (Фиг. 12) [50, 53, 54, 55].



Фигура 12. Схематичен модел на човешкия окситоцинов рецептор, показващ аминокиселинните остатъци, за които се предполага, че участват както в свързването на лиганди, така и в процеса на сигнална трансдукция. Фигурата е от [1].

С помощта на експериментални изследвания, е доказано, че мястото за свързване на агонисти в окситоциновия рецептор е различно от мястото за свързване на антагонисти. Обикновено пептидният антагонист взаимодейства с аминокиселинни остатъци, намиращи се в TM1, TM2 и TM7, като основен принос за афинитета му на свързване към рецептора има горната част на TM7. Тези аминокиселинни остатъци обаче не участват при взаимодействието с агонистични лиганди. Освен това е установено, че мутациите, които засягат афинитета на свързване на агонистите, имат незначителен ефект върху афинитета на свързване на антагонистите [48, 49, 50, 56].

1.3. Сигнална трансдукция

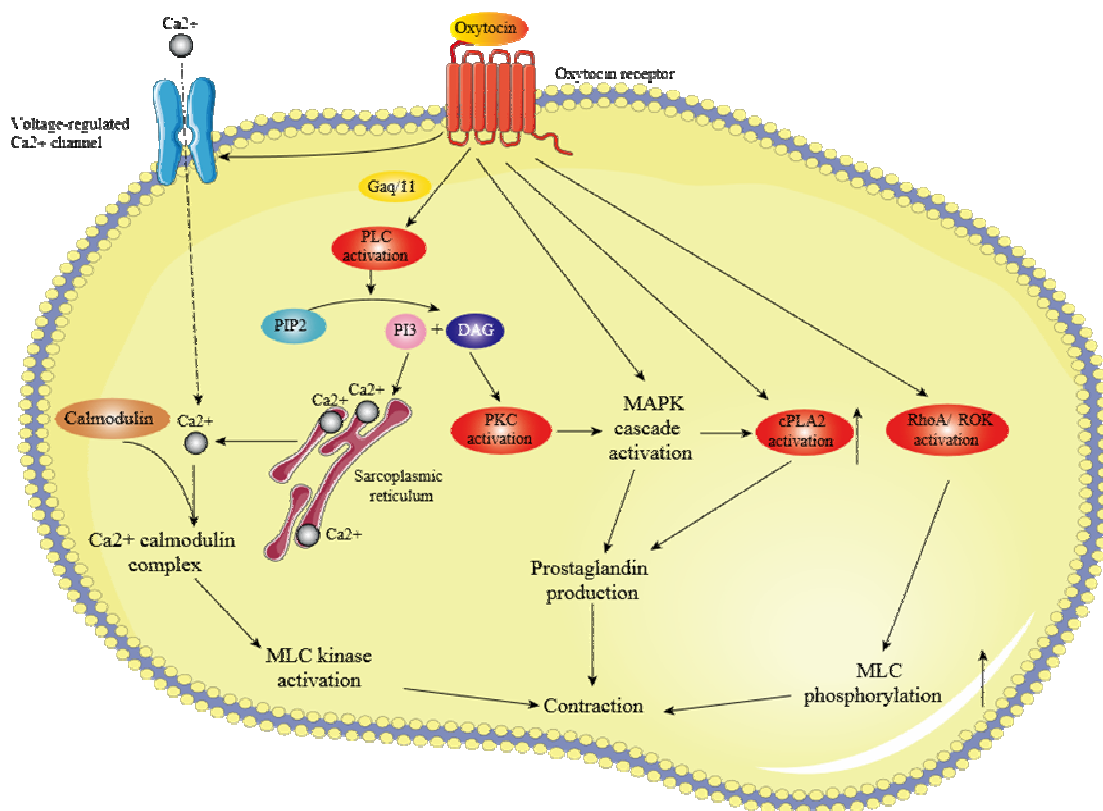
Рецепторът преминава в активно състояние след свързването на окситоцина към неговата извънклетъчна част, което предизвиква стартирането на различни вътреклетъчни сигнални пътища, част от които завършват със съкращаване на гладката мускулна тъкан на матката (Фиг. 13). Основният път на предаване на извънклетъчния сигнал към вътреклетъчните мишени е свързан с активирането на $G\alpha$ субединицата на G протеина. Тази субединица от своя страна активира водоразтворимия ензим фосфолипаза C (PLC), който повишава скоростта на разграждане на свързания с клетъчната мембрана фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (PIP₂) до инозитол 1,4,5-трифосфат (PI₃) и 1,2-диацилглицерол (DAG). Последните две молекули (PI₃ и DAG) изпълняват ролята на вторични посредници на сигнала. Като водоразтворима молекула PI₃ се придвижва до ендоплазмената мрежа, където се свързва със специфичен за него рецептор и така предизвиква освобождаването на калциеви йони (Ca^{2+}) от този клетъчен органел във вътреклетъчната среда.

Предполага се, че активирането на $G\alpha$ субединицата на G протеина предизвиква също и мембранна деполяризация, водеща до отварянето на калциеви канали (Voltage-regulated Ca^{2+} channel) в плазмената мембрана, в резултат на което се увеличава концентрацията на калциевите йони в клетката. Отварянето на калциеви канали в плазмената мембрана или на вътреклетъчни мембранни калциеви канали са двата основни пътя за увеличаване на Ca^{2+} в клетката, чиято концентрация там обикновено е ниска при липса на сигнал. Освободените независимо по кой път Ca^{2+} във вътреклетъчната среда се свързват с белтъка калмодулин. Ca^{2+} - калмодулин комплекса от своя страна активира ензим наречен миозин лека верига киназа (MLCK), отговорен за фосфорилирането на Ser19, разположен върху леката верига на белтъка миозин. Това

води до свързване на миозина с актин (друг втреклетъчен белтък) и до контракция на гладката мускулатура на матката. Релаксация се наблюдава, когато друг втреклетъчен ензим - миозинова фосфатаза дефосфорилира миозина.

Другият липидоразтворим вторичен посредник, 1,2-диацилглицерол (DAG), има активиращо действие по отношение на протеинкиназа С (PKC), разположена в плазмената мембрана, чиято роля е свързана с фосфорилирането на определени клетъчни белтъци.

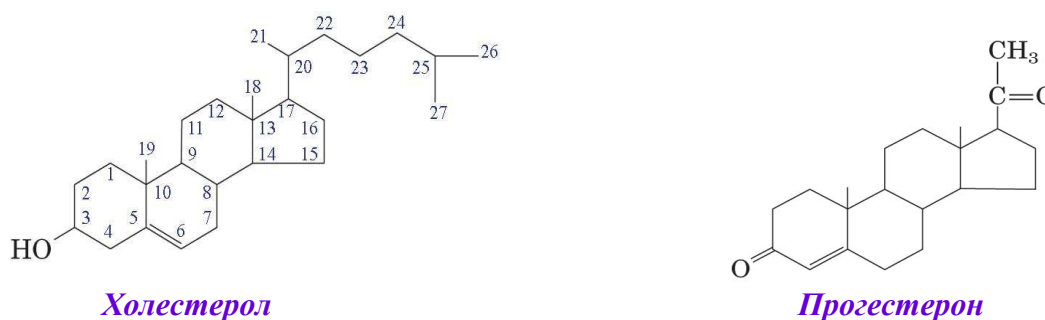
Съществуват и два допълнителни втреклетъчни пътя за сигнализация, като митоген-активирана протеин киназна каскада (MAPK) и RhoA/ROK каскада, които също завършват със съкращаване на гладката мускулатура на матката. MAPK сигналният път се активира от вече активираната протеинкиназа С (PKC) и води до повишена продукция на простагландин под действието на ензима фосфолипаза А2 (PLA2), докато RhoA/ROK каскадата пък е свързана с повишеното фосфолиране на леката верига на миозин [5, 57, 58, 59, 60].



Фигура 13. Сигнална трансдукция на окситоцин. Фигурата е от [57].

1.4. Роля на холестерола и прогестерона в регулацията на рецепторната експресия

Въпреки голямото количество от експериментални и теоретични данни събрани до този момент, механизмите, които участват в експресията на човешкия окситоцинов рецептор остават все още неизяснени, тъй като се предполага че факторите, които ги обуславят са много на брой. Един от тези фактори е концентрацията на циркулиращите стероидни хормони - холестерол и прогестерон. Предполага се, че холестеролът (представител на групата на естрогените), увеличава както количеството на рецепторите, така и броя на местата за свързване на сигнални молекули (например окситоцин) към тях, докато обратно, прогестеронът потиска експресията на OTR (Фиг. 14). Този механизъм на стероидна регулация, обаче, не е напълно проучен [58, 61, 62, 63].



Фигура 14. Химична структура на холестерол и прогестерон. Фигурата е от [64].

Холестеролът е един от най-разпространените липиди в мембраната и има основна роля за определяне на нейната течливост (флуидност), като по този начин той оказва влияние върху функцията и организацията на мембранните протеини (включително GPCRs). Много от събраните до момента данни показват, че съдържанието на холестерол в плазмената мембрана може да регулира афинитета на свързване на лиганда, а също и стабилността на рецептора в липидната среда, и следователно да повлияе на рецепторната сигнализация. Известно е, че окситоциновите рецептори показват по-висок афинитет към свързването на окситоцин, когато са локализирани в богати на холестерол домени, наречени липидни рафтове [65, 66]. Фактът, че регулацията на експресията на окситоциновите рецептори зависи от биофизичните

свойства на мембраната на мускулната тъкан на матката показва, че нарушения в тези свойства могат да окажат негативни последствия върху процеса на раждане [58].

Установено е, че прогестеронът има противоположен ефект на този на холестерола. Той инхибира естерификацията на холестерола и неговия транспорт от и до плазмената мембрана, като по този начин намалява съдържанието на холестерол в липидните рафтове и поддържа окситоциновите рецептори в състояние на нисък афинитет, в което те не могат да се свържат с природния си лиганд - окситоцин [1, 58].

Освен стероидната регулация на рецепторната експресия, разтягането на мускулатурата на матката също се смята за основен стимул за повишаване на броя на окситоциновите рецептори и затова се определя като допълнително ниво в контрола на маточната дейност [58].

Процесът, при който в резултат на многократно или продължително стимулиране някои GPCRs губят своята хормонална реакция, се нарича десенсибилизация. За молекулярния механизъм на този процес е отговорен друг протеин β -арестин, който се натрупва в рецептора след стимулация от агониста (например окситоцин). След свързването на агониста белтъци наречени кинази (като например PKC или други) добавят фосфатен остатък към C - крайната опашка на рецептора, предизвиквайки натрупването на β -арестин. Това от своя страна затруднява повторното стерично свързване на G протеина към рецептора и по този начин води до намаляване на количеството на вторични посредници на сигнала в клетката, като PI3 и DAG. Следва интернализиране на рецепторите в клетката, където те се насочват за рециклиране в клетъчната мембрана или се подлагат на разграждане от лизозомите [67].

1.5. Металните йони като посредник за успешното взаимодействие между окситоцин и неговия рецептор

Установено е, че за да осъществи физиологичните си функции окситоцинът трябва да бъде активиран (биотрансформиран) с помощта на метални йони. Естественото състояние на пептида е неговата протонирана форма, в която N - крайната аминокгрупа е разположена във вътрешността на молекулата. В това състояние хормонът не може да се свърже успешно със своя рецептор. Едновалентните метални йони не могат да активират окситоцина. За разлика от тях двувалентните метални йони, като цинк (Zn^{2+}), са способни да предизвикат драстична конформационна промяна в молекулата на пептида. Те трансформират окситоцина в структура с N - крайна

аминогрупа, разположена към външната повърхност на молекулата. Това от своя страна позволява ефективното взаимодействие на N - края на хормона с киселинен остатък от рецептора [68].

Взаимодействието между рецептора и неговия естествен лиганд окситоцин, медирано от метални йони като кофактор, не е добре проучено на молекулно ниво, тъй като правилната конформация на двете структури (лиганд и рецептор) е неизвестна. А тази конформация е ключов фактор, който контролира свързването на лиганда в биомолекулните системи.

Получаването на стабилен комплекс между окситоцин и двувалентен цинков йон във воден разтвор е също важно условие, необходимо за свързването на хормона и рецептора. Използвайки комбинация от експериментални процедури и теоретични методи, Liu и съавтори показват, че когато Zn^{2+} се свързва с окситоцин, той предизвиква значителна структурна промяна в молекулата на хормона, което води до повишен афинитет на рецептора към комплекса OT - Zn^{2+} [54, 69]. Но тяхното изследване не предоставя данни за стабилността на този комплекс във воден разтвор.

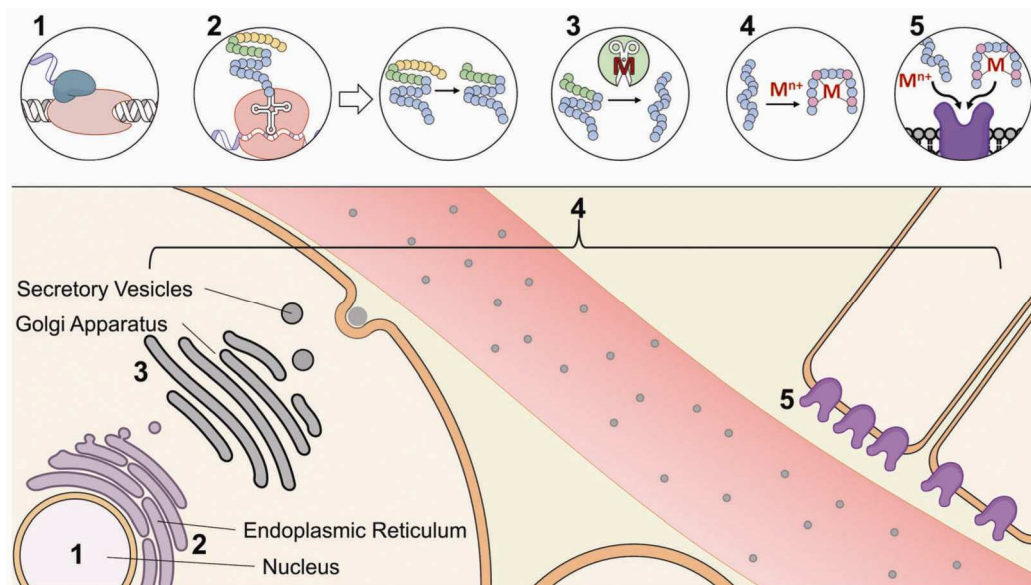
Цинкът е един от най-често срещаните метални йони, свързани с пептиди или протеини в живите организми. Неговата роля в тези биомолекули е каталитична или е свързана със стабилизиране на пространствената им структура. Химичните свойства на цинка го правят различен от другите преходни метали, като мед и желязо, които показват няколко степени на окисление в биологичните системи. Цинкът съществува като двувалентен катион с електронна конфигурация на аргон [Ar] 3d¹⁰. Напълно запълнената d - орбитала я прави диамагнитна [70, 71].

В протеините цинковият йон взаимодейства със страничните аминокиселинни вериги на аспарагиновата киселина, глутаминовата киселина, цистеин и хистидин. Той може да се свързва с кислородни, азотни и серни атоми, които участват в изграждането на тези аминокиселинни вериги [70]. Освен това двувалентният цинков йон е част от динамична система, което му позволява да променя координационния си номер, като октаедричната и тетраедричната геометрия в неговите комплекси са най-често наблюдаваните. Проведени изследвания показват, че тетраедричните комплекси на цинка са с по-висока енергия от октаедричната структура [72, 73]. Важно е да се отбележи, че във водна среда цинкът предпочита да бъде октаедрично координиран, тъй като този комплекс е по-добре хидратиран (цинковият двувалентен йон е координиран с шест водни молекули). За разлика от това, в протеинова среда, цинкът може да бъде с октаедрична или тетраедрична геометрия, в зависимост от вида на

протеиновия лиганд, към който е свързан, и достъпа на разтворител до мястото на свързване на метала [73].

Окситоцинът е пептид без карбоксилни групи, но съдържа amidни групи. Установено е, че двувалентните метални йони се свързват с amidния кислороден атом при взаимодействието между метал (например като Zn^{2+}) и amid. Ако обаче amidната група е анионна, поради депротониране на азотния атом, възниква метално взаимодействие. Тъй като аминогрупата (-NH-) на amidите е слабо кисела (pKa 15), се очаква металните йони да се свържат с amidния кислороден атом около pH 7. Депротонирането на amid не е характерно за Zn^{2+} - пептидните комплекси. Дувалентният цинков йон може да координира шест основни групи в почти октаедрична координационна сфера (6O хелатиране с разстояния от 2.1 Å), като N - крайната аминогрупа в молекулата на окситоцина също е лиганд [69]. Съществуват доказателства, които показват важната роля на някои от аминокиселинните остатъци в пептида при взаимодействието му с рецептора, като от особен интерес са остатъците Ile3, Gln4 и Asn5, за които се смята, че взаимодействат с извънклетъчната верига на окситоциновия рецептор. Тези три остатъка, в комплекса OT - Zn^{2+} , са ориентирани в приблизително една и съща равнина, което е от съществено значение за взаимодействието на хормона с хидрофобен джоб, разположен в рецептора [1, 50, 51, 74]. Предполага се, че комплексът пептид - метален йон придобива спираловидна форма, в която въглеродородните кислородни атоми на шест остатъка от гръбнака на окситоцина (Tyr2, Ile3, Gln4, Cys6, Leu8 и Gly9), солватират Zn^{2+} йон в октаедрична координация. По този начин двувалентният цинков йон е плътно вграден в структурата на окситоцина [75]. Важно е да се отбележи, че външната повърхност на комплекса пептид - метален йон също е хидрофобна, тъй като карбонилните кислородни атоми са насочени към сърцевината на молекулата, така че да могат да взаимодействат с Zn^{2+} .

Металните йони могат да взаимодействат с пептидните хормони по време на тяхното узряване. На Фиг. 15 е изобразен биосинтезът, секрецията и действието на типичен пептиден/протеинов хормон, както и различните етапи на които се смята, че металните йони пряко взаимодействат с тези биомолекули [76, 77, 78].



Фигура 15. Синтез, узряване и действие на пептидните / протеиновите хормони и взаимодействие с металите по този път. (1) Генът, свързан с хормона се транскрибира. (2) Препрохормонът се транслира в ендоплазмената мрежа и сигналната последователност (жълта) се разцепва, като се получава прохормон. (3) Прохормонът се разделя допълнително, за да се превърне в зрял хормон (син). (4) Взаимодействие на металите с хормона, може да се наблюдава по време на узряването на пептида от трансляцията до свързването на пептида с неговата таргетна молекула. (5) Хормоните се съединяват с целевите си рецептори и стартират различни вътреклетъчни сигнални пътища. Свързването с метал може да промени конформацията на хормона (като повлияе на афинитета към неговия рецептор) или директно да улесни образуването на хормон - рецепторен комплекс. Фигурата е от [78].

Пептидните и протеиновите хормони първо се транскрибират като по-дълги последователности, наречени препрохормони, които се насочват към ендоплазмената мрежа. В тази мрежа сигнализиращата последователност на пептида/протеина се отцепва и така се образува прохормон. След това прохормона се насочва към апарата на Голджи за обработка от ензими наречени пептидази, които превръщат прохормона в зрял хормон. Пептидният/протеиновият хормон могат да бъдат подложени на допълнителни посттранслационни модификации от разнообразни по вид пептидази [78]. Тези модификации са от съществено значение за функцията на пептидите и подпомагат тяхното свързване със съответните метални йони. В апарата на Голджи

хормонът се пакетира в секреторни везикули за износ от клетката (процес наречен екзоцитоза). След получаване на сигнала за секреция, пептидът/протеинът се освобождава в стомашно-чревната или съдовата система, откъдето се насочва към специфична прицелна тъкан, свързва се с извънклетъчен рецептор и инициира сигнална каскада. Металните йони могат да повлияват хормоналната активност на пептидите/протеините по време на техния синтез, узряване, секреция и свързване с рецепторите. Йоните могат директно да се свързват с хормоните по време на тяхната трансляция или при навлизане в ендоплазмената мрежа, апарата на Голджи или секреторните везикули, като по този начин оказват влияние върху тяхната стабилност и обработка в съответните органели [78, 79]. Свързването с метални йони след секреция може да промени конформацията на хормоните, като така се активира или инхибира биологична активност на пептидите/протеините [78, 80]. Освен това, металите могат да играят важна роля за успешното свързване между хормона и рецептора, при образуването на хормон - рецепторен комплекс [78, 81].

Тъй като металните йони не се синтезират в живия организъм те трябва да постъпят в него от външната среда, след което да бъдат разделени, разпределени и регулирани за правилното им използване. Това се осъществява с помощта на специфични протеини, които спомагат за поддържането на минералната хомеостаза и мобилизират йоните за използване, когато е необходимо [82, 83].

Все още не е напълно изяснен въпросът дали металните йони взаимодействат предимно с рецептора, с окситоцина или и с двете структури. Предполага се, че съществуват две отделни области в окситоциновия рецептор за свързване на метални йони, което води до увеличаване на афинитета за свързване с хормона. Тъй като рецепторните структури са трудни за изследване в тяхната естествена липидна среда, молекулярният механизъм на взаимодействието им с металните йони остава все още не добре проучен. За разлика от това, с помощта на потенциометрични и спектроскопски техники е установено, че окситоцинът образува стабилни комплекси с двувалентните метални йони [54, 69, 78, 81, 84]. Високият афинитет на хормона към металните йони, както и ригидността на получените комплекси (хормон - метален йон) са от съществено значение за успешното взаимодействие на окситоцина с неговия рецептор [69]. Експериментални и теоретични доказателства показват, че пептидът претърпява значителна конформационна промяна, когато се координира с Zn^{2+} , като тези промени директно улесняват свързването на специфични остатъци в неговата молекула със специфични остатъци в рецептора [54].

Глава 2

Компютърно моделиране на биологични макромолекули и методи за анализ на получените резултати

2.1. Молекулна динамика

Идеята за молекулната динамика (МД) е въведена, за първи път в края на 50-те години на XX век, за да се изследват взаимодействията между твърдите сфери. Молекулната динамика е теоретичен метод за компютърна симулация на сложни физични и биологични системи. Тези системи се моделират на атомно ниво с помощта на класическата механика за пресмятане на техните равновесни и транспортни свойства. Използването на класически методи за изучаване биологичните молекули се налага, поради големия брой атоми, от които са изградени, което прави и практически невъзможно описването им на квантово ниво [85, 86, 87].

Изграждането на физичен модел на биологична система изисква всички атоми от които е съставена, както и взаимодействията между тях, да бъдат описани, с техните координати, скорости и действащите им сили. Според законите на класическата физика за описанието на динамиката на един атом се проследява само движението на неговото ядро като функция на времето. За електроните се смята, че се намират в стационарното поле на ядрото и се преместват заедно с него (т.е. не се отчита движението на електроните). В молекулната динамика взаимодействията между ядрата на отделните атоми се представят с потенциална функция, наречена още силово поле. Силовото поле е приближение на повърхнината на потенциалната енергия в основно състояние при следните условия: изпълнено е приближението на Борн - Опенхаймер, не се разкъсват и не се образуват ковалентни връзки, не се отчита движението на електроните т.е. те са локализирани [88].

Фазовото пространство представлява пространството, в което са представени всички възможни състояния на дадена система, а всяка точка (състояние) в това пространство се нарича микросъстояние. Микросъстоянието описва конкретна конфигурация на системата ($\{\mathbf{r}_i\}, \{\mathbf{v}_i\}$), $i = 1, \dots, N$, с N на брой атоми в нея, като всеки атом се характеризира с $3N$ координати $\{\mathbf{r}_i\}$ и $3N$ скорости $\{\mathbf{v}_i\}$, тъй като се намира в $6N$ - мерно пространство. Сумата от потенциалната енергия (зададена от скоростите на атомите) и кинетичната енергия (зададена от координатите на атомите) на всички атоми е общата енергия на биологичната система, която се запазва постоянна и се изразява чрез Хамилтониана:

$$(1) \quad \mathbf{H}(\{\mathbf{r}_i\}, \{\mathbf{v}_i\}) = \mathbf{K}(\{\mathbf{v}_i\}) + \mathbf{U}(\{\mathbf{r}_i\}) = \sum_i^N \frac{\mathbf{m}_i |\mathbf{v}_i|^2}{2} + \mathbf{U}(\{\mathbf{r}_i\})$$

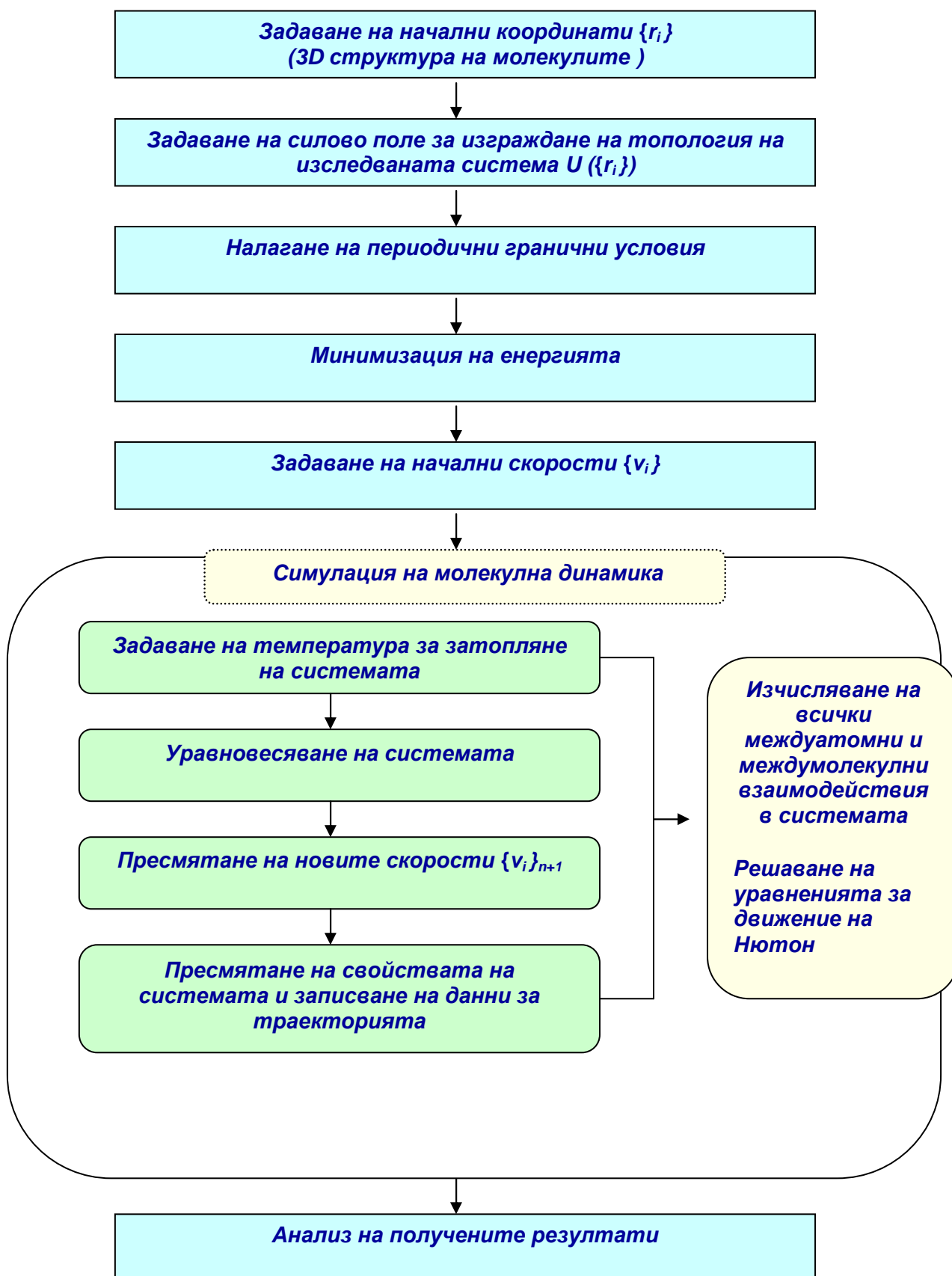
За да се изследва динамиката на система от молекули (като напр. поведението им при определени условия или взаимодействията между тях), е необходимо да се проследи еволюцията във времето на координатите и скоростите на атомите от системата. Това се постига чрез интегриране на уравненията за движение на Нютон:

$$(2) \quad \mathbf{F}_i = \mathbf{m}_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}$$

С решаването на тези уравнения се изчисляват координатите и скоростите на атомите за малък интервал от време многократно и така се строи траекторията на системата през фазовото пространство. Силите действащи между атомите се представят като отрицателни производни по координатите на потенциалната енергия:

$$(3) \quad \mathbf{F}_i = - \nabla_i \mathbf{U}(\{\mathbf{r}_i\})$$

Към изследваната система могат допълнително да се включат термостат и / или баростат, ако се налага да се поддържат постоянна температура и / или налягане. След определен период от време системата достига до състояние на равновесие, а пресметнатите ѝ макроскопични свойства се представят чрез анализ на получената траектория [88, 89, 90]. Процедурата, по която протича една симулация на молекулната динамика, е показана на Фиг. 16.



Фигура 16. Процедура за симулация на МД.

2.1.1. Силов поле (междуатомен потенциал)

За да се изследва динамиката на една система е необходимо да се решат уравненията за движение на Нютон. А силите действащи между атомите в системата се представят като отрицателни производни по координатите на потенциалната енергия (3). Силовото поле се състои от аналитична форма, описваща междуатомната потенциална енергия и набор от параметри, описващи атомите, от които е изградена системата. Параметрите за атомите обикновено се получават или въз основа на *ab initio* изчисления, или от полуемпирични квантово - механични изчисления, или чрез експериментални данни от рентгенова спектроскопия, ЯМР спектроскопия, електронна дифракция и др. Изборът на потенциална функция е важен, тъй като тя трябва да бъде достатъчно проста, за да бъде оценена бързо, но и достатъчно детайлна, за да възпроизведе интересующите ни физични свойства на изследваната система [91].

В силовото поле атомите (ядрото и електроните около него) са представени като точкови заряди с определена маса, които притежават Ван дер Ваалсов радиус, поляризуемост и електричен заряд, а потенциалната енергия е сумата от всички междуатомни и межумолекулни взаимодействия в системата. Така потенциалната функция има следния вид:

$$(4) \quad U(\{\mathbf{r}_i\}) = \sum_{bonds} \mathbf{K}_l (l - l_0)^2 + \sum_{angles} \mathbf{K}_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} \mathbf{K}_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta))$$

$$+ \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

където с първите три члена са описани ковалентните взаимодействия в системата, а с последните два - нековалентните. С \mathbf{K}_l , \mathbf{K}_θ и \mathbf{K}_ϕ са означени коефициентите на химичната връзка, на валентния ъгъл и на ъгъла на усукване; l , θ и ϕ са дължината на химичната връзка, валентния ъгъл и двустенния ъгъл, а равновесните им стойности са отбелязани с нулев индекс; n и δ представляват мултиплетността и фазовото отместване на ъгъла на усукване; i и j са номерата на взаимодействащите си атоми; ϵ_{ij} е дълбочината на ямата на потенциала на Ленард - Джоунс; σ_{ij} е разстоянието, на което този потенциал придобива нулева стойност; q_i и q_j са електричните заряди на i - тия,

съответно на j - тия атом; ϵ_0 е диелектричната проницаемост на средата, а r_{ij} е разстоянието между атомите i и j .

Първият член на потенциалната функция (4) е от тип хармоничен осцилатор и описва ковалентните взаимодействия между всяка двойка съседни атоми, участващи в изграждането на молекулата. Движенията на атомите се свеждат до трептене около тяхното равновесно положение (l_0) с амплитуда, определена от коефициента K_l . K_l пък зависи от природата на химичната връзка (например единична, двойна, тройна). Параметрите за K_l и l_0 се получават с помощта на *ab initio* изчисления.

Вторият член на функцията също е хармоничен потенциал, който характеризира изменението на ъгъла θ между три съседни атома, свързани с ковалентни връзки. Степента на вариация на ъгъла около равновесното му положение (θ_0) се определя от амплитудата, зададена от коефициента K_θ . Параметрите за K_θ и θ_0 са отново въз основа на *ab initio* изчисления и зависят от типа на химичната връзка.

Третият член на потенциала описва усукването на ковалентните връзки, с които са свързани четири съседни атома. В този случай се наблюдава завъртане (ротация) около равновесната стойност на ъгъла (ϕ), заключен между двете равнини, определени съответно от атоми 1, 2 и 3 и атоми 2, 3, и 4. Параметрите за K_ϕ , n , ϕ и δ се получават чрез квантови изчисления, които след това се усъвършенстват с помощта на експериментални данни (като молекулни геометрии или вибрационни спектри).

Последните два члена на потенциалната функция описват нековалентните взаимодействия между атомите в изследваната система - Ван дер Ваалсовото и електростатичното. Ван дер Ваалсовото взаимодействие се представя чрез потенциала на Ленард - Джоунс, а за изчисляване на електростатичното (кулоново взаимодействие) се използват методи, произхождащи от сумите на Евалд. Параметрите и за двата типа взаимодействия са от квантови изчисления и експериментални резултати.

Тъй като всеки атом взаимодейства само с най-близко разположените до него съседни атоми, изчисляването на енергията на членовете на потенциала, свързани с ковалентни връзки, не представлява проблем. За разлика от това, за пресмятането на енергията на отделния атом, при нековалентните взаимодействия, е необходимо да се отчетат приносите на енергиите на всички двойки атоми в системата. А в зависимост от големината на изследваната система броят на двойките атоми се увеличава като $O(N^2)$. Това от своя страна създава известни затруднения при изчисляването на потенциалната функция, за преодоляването на които са разработени допълнителни методи [86, 91].

Ван дер Ваалсовите сили на взаимодействие се пресмятат с помощта на потенциала на Ленард - Джоунс [92]:

$$(5) \quad U_{LJ}(\mathbf{r}_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right)$$

В биомолекулните системи общата сила на Ван дер Ваалс се изчислява като сума на всички взаимодействащи си двойки атоми и се състои от два компонента - сила на привличане и сила на отблъскване между два атома. Силата на привличане се дължи на индуцирани диполи и варира като r^{-6} , а тази на отблъскване е в резултат на припокриването на електронните облаци между два атома (r^{-12}). За всяка различна двойка атоми се определя набор от параметри ε_{ij} и σ_{ij} , които зависят от разстоянието, бързо сходящи са и се получават от правилата за комбиниране на Лоренц - Бергло:

$$(6) \quad \begin{aligned} \varepsilon_{ij} &= (\varepsilon_{ii} \varepsilon_{jj})^{1/2} \\ \sigma_{ij} &= 1/2 (\sigma_{ii} + \sigma_{jj}) \end{aligned}$$

Тъй като взаимодействията между двойките атоми, представени като сферични тела с определени радиуси, намаляват като r^{-6} , за да се ускорят изчисленията се въвежда радиус на обрязване (r_{cutoff}). Енергията на Ван дер Ваалсовите взаимодействия се пренебрегва, ако разстоянието между двата атома е по-голямо от този радиус ($r > r_{cutoff}$). В случаите, когато $r = r_{cutoff}$ към действащите върху атомите сили (F) се прибавя изглаждаща функция $S(r)$, за да може $F_{LJ}(r_{cutoff}) = 0$ и $U_{LJ}(r_{cutoff}) = 0$, като по този начин се получават непрекъснати производни на потенциала в точката на изравняване на двата радиуса [91, 92]. Силата след изглаждането може да се представи по следния начин:

$$(7) \quad \begin{aligned} F_s(\mathbf{r}) &= F_a(\mathbf{r}) & r < r_1 \\ F_s(\mathbf{r}) &= F_a(\mathbf{r}) + S(\mathbf{r}) & r_1 \leq r < r_{cutoff} \\ F_s(\mathbf{r}) &= 0 & r_{cutoff} \leq r \end{aligned}$$

като $F(r) = F_{\alpha}(r) = r^{-(\alpha+1)}$, α е степенен показател на взаимодействието, за силите на привличане ($\alpha = 6$), съответно силите на отблъскване ($\alpha = 12$), от потенциала на Ленард - Джоунс. С r_1 е означено разстоянието, от което започва изглаждането на силите.

Функцията, която се използва за изглаждане е следната:

$$(8) \quad S(r) = A(r - r_1)^2 + B(r - r_1)^3$$

$$A = - \frac{(\alpha + 4)r_{cutoff} - (\alpha + 1)r_1}{r_{cutoff}^{\alpha+2} (r_{cutoff} - r_1)^2}$$

$$B = \frac{(\alpha + 3)r_{cutoff} - (\alpha + 1)r_1}{r_{cutoff}^{\alpha+2} (r_{cutoff} - r_1)^3}$$

А силите и потенциала след изглаждането с тази функция имат следния вид:

$$(9) \quad F_s(r, r_1, r_{cutoff}) = \frac{\alpha}{r^{\alpha+1}} + A(r - r_1)^2 + B(r - r_1)^3$$

$$U_s(r, r_1, r_{cutoff}) = \frac{1}{r^{\alpha}} - \frac{A}{3} (r - r_1)^3 - \frac{B}{4} (r - r_1)^4 - C$$

$$C = \frac{1}{r_{cutoff}^{\alpha}} - \frac{A}{3} (r_{cutoff} - r_1)^3 - \frac{B}{4} (r_{cutoff} - r_1)^4$$

За изчисляване на *електростатичното (кулоново) взаимодействие* (последен член от уравнение (4)) между всяка двойка атоми в изследваната система, се използват методи, произхождащи от сумите на Евалд. За разлика от Ван дер Ваалсовите сили, електростатичните действат на дълги разстояния и са бавно сходящи (т.е. те не намаляват достатъчно бързо с увеличаване на разстоянието между съответната двойка атоми), което прави простото обрязване на потенциала неефективно. Затова за пресмятане на електростатиката в периодични и псевдо - периодични системи е създаден метод, основан на сумите на Евалд. Неговата идея е бавно сходящата част, съответстваща на последния член от уравнение (4) и представена в уравнение (11), да

се трансформира в две бързо сходящи части, които да се обрежат, като се разделят бързо вариращата част на потенциала за малки \mathbf{r} и гладката част за големи \mathbf{r} :

$$(10) \quad \frac{1}{\mathbf{r}} = \frac{f(\mathbf{r})}{\mathbf{r}} + \frac{1 - f(\mathbf{r})}{\mathbf{r}}$$

По този начин, след прилагането на техниката на Евалд, кулоновото взаимодействие между две заредени частици i и j :

$$(11) \quad U_{electrostatic}(\mathbf{r}_{ij}) = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r \mathbf{r}_{ij}}$$

с $f = \frac{1}{4\pi\epsilon_0}$, може да се представи по следния начин:

$$(12) \quad U_{electrostatic}(\mathbf{r}_{ij}) = f \frac{\text{erfc}(\beta \mathbf{r}_{ij})}{\mathbf{r}_{ij}} q_i q_j,$$

където β е параметър, който определя относителното тегло на правата и реципрочната сума на Евалд, а $\text{erfc}(\beta \mathbf{r}_{ij}) = f(\mathbf{r})$ е допълнителна функция за грешка.

Класическото сумиране на Евалд се състои в това, че методът позволява добавяне на сферичен гаусов облак към всеки точков заряд q_i . Така гаусовият облак скъсява разстоянието на действие на точковия заряд, като го компенсира със своя противоположен заряд. Това сумиране на точкови и гаусови заряди е известно като директна сума на Евалд и се извършва в реалното пространство. За компенсиране на резултата от първия гаусов облак се използва реципрочна сума на Евалд. Сумата се получава от уравнението на Поасон с помощта на Фурие преобразуване в реципрочното пространство. Същността на това сумиране се изразява в добавяне на втори гаусов облак към всеки точков заряд q_i , но този път всеки гаусов облак е със заряд като на точковия (Фиг. 17). За коректното пресмятане на електростатичния потенциал е необходимо да се отчете и енергията от самовзаимодействието на гаусовия заряд (в реалното пространство), която се премахва. Потенциалната енергия при този метод може да се представи като:

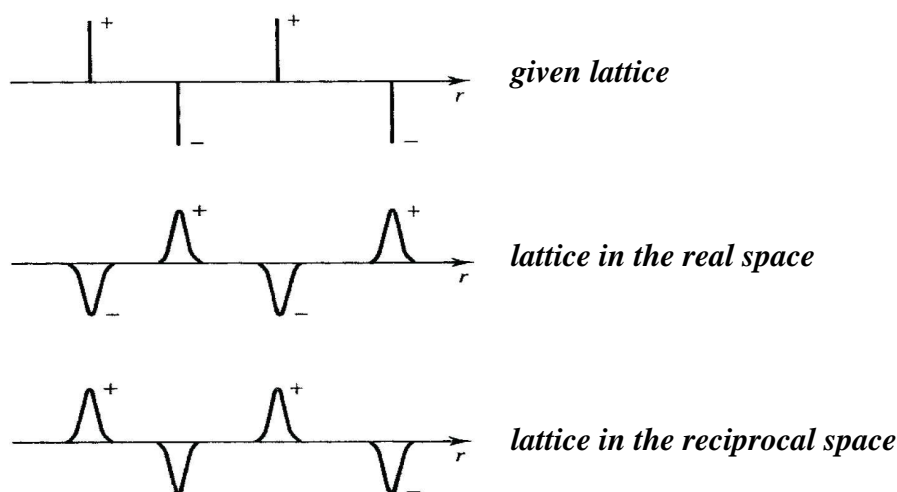
$$(13) \quad U_{electrostatic} = U_{dir} + U_{rec} + U_0$$

$$U_{dir} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{2} \sum_{i,j} \sum_n q_i q_j \frac{\text{erfc}(\beta r_{ij}, n)}{r_{ij}, n}$$

$$U_{rec} = \frac{1}{2V\epsilon_0} \sum_{i,j} q_i q_j \sum_{k \neq 0} \frac{\exp(-(\pi k / \beta)^2 + 2\pi i k \cdot (r_i - r_j))}{k^2}$$

$$U_0 = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_i q_i^2,$$

където \mathbf{n} е векторът на централната кутия (при наложени периодични гранични условия на изследваната система, виж 2.1.2) в реалното пространство, r_{ij}, n е реалното разстояние между зарядите i и j , а не минималното им изображение и \mathbf{k} е векторът в реципрочното пространство.



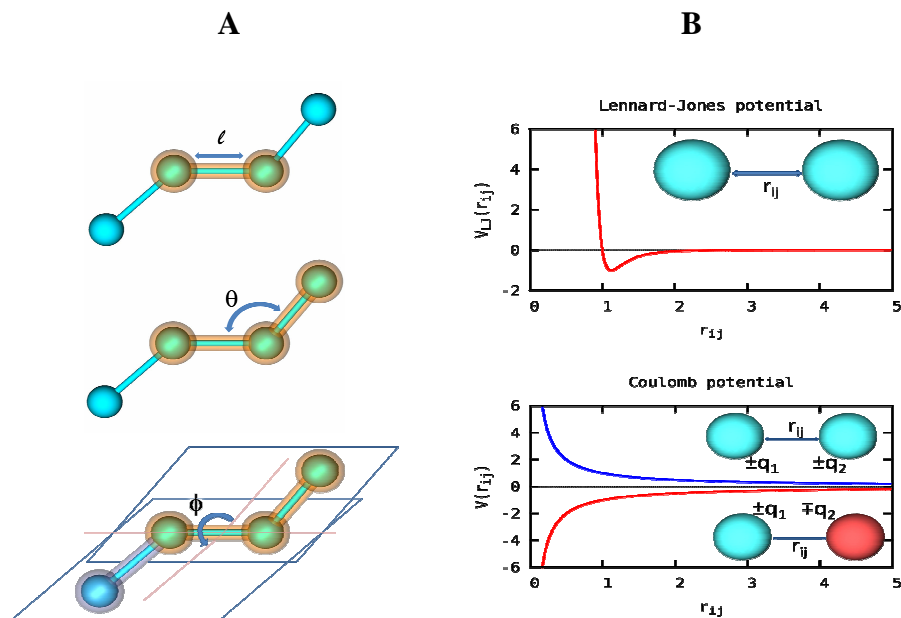
Фигура 17. Класическо сумиране на Евалд в реалното и реципрочното пространство. Фигурата е използвана с леки промени от [86].

Преобразуването на една бавно сходяща сума в две бързо сходящи със сумирането на Евалд, позволява използването на радиус на обрязване (r_{cutoff}), както в реалното, така и в реципрочното пространство. Като по този начин късо и дълго действащото електростатично взаимодействие, се пресмятат поотделно в двете пространства.

Недостатък на метода е това, че поради много бавно променящият се далекодействащ електростатичен потенциал, изчисляването на реципрочната сума нараства като $O(N^{3/2})$, което оскъпява пресмятането и прави подхода неудобен за прилагане върху големи молекулни системи [86, 91, 92].

За по-бързо изчисляване на реципрочната сума се използва PME (Particle Mesh Ewald) техниката. Тя се основава на факта, че уравнението на Поасон може да се реши много по-ефективно, ако зарядите се разпределят в мрежа. Затова вместо да се извършва директно сумиране на вълнови вектори, гаусовите заряди се поставят в решетка с помощта на B - сплайн интерполация. Реципрочният енергиен член се получава, като единична сума в мрежата на k - пространството, чрез алгоритъм за бързо 3D Фурие преобразуване (FFT). Потенциалът в точките на мрежата се изчислява с обратно преобразуване, а силите действащи върху всеки атом се пресмятат от факторите за интерполация. За разлика от класическото сумиране на Евалд, PME методът позволява по-бързо скалиране като $O(N \log N)$ и затова се използва в компютърните симулации на средни и големи системи [91, 92, 93].

Членовете на потенциалната функция от уравнение (4) са представени на Фиг. 18.



Фигура 18. Членове на потенциалната функция, които участват в изграждането на силовото поле: **A/** ковалентни и **B/** нековалентни. Фигурата е от [94].

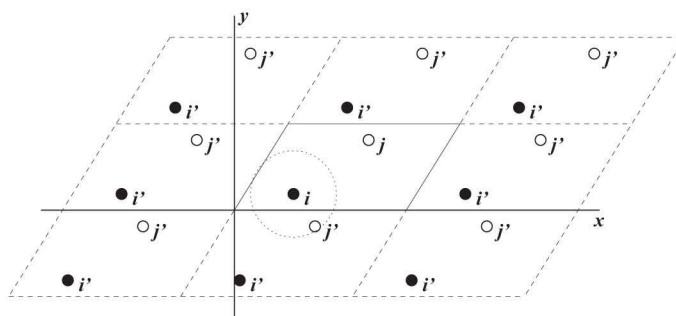
Освен от междуатомна потенциална енергия, силовото поле се състои и от набор от параметри, описващи атомите, от които е изградена изследваната система. В този набор от параметри се включват не само характеристики за различните видове атоми, но и характеристики за атомите или атомните групи, които ги заобикалят. Това позволява разделянето на силовите полета на няколко основни типа: силови полета с описание на всички атоми (*all atom force fields*), силови полета с обединени атоми (*united atom force fields*) и едрозърнести силови полета (*coarse - grained force fields*). Първият тип полета съдържат параметри за всеки вид атом в системата, което означава, че основна взаимодействаща единица при тях са отделните атоми. При вторият тип силови полета взаимодействащата единица е цяла атомна група (напр. метилова, етилова), тъй като даден атом е обединен със свързаните към него неполярни водородни атоми. А за третият тип полета е характерно, че отделни функционални групи или групи от атоми са обединени в нов тип образувания, наречени зърна.

С помощта на избраното силово поле се изгражда топология на изследваната система, която ни дава информация за това кои атоми (обединения от атоми) са свързани с химични връзки [92].

2.1.2. Налагане на периодични гранични условия

За да се изследва една макроскопична система, която е изградена от краен брой частици, е необходимо използването на периодични гранични условия. По този начин се премахват повърхностните ефекти, по време на симулация, причинени от по-големия брой частици, разположени по граничните повърхности на системата в сравнение с тези, намиращи се в нея. Периодичните гранични условия се налагат чрез задаване на централна симулационна кутия, която чрез трансляция по трите пространствени оси се намножава до безкрайност и така запълва цялото пространство. Броят на атомите в тази кутия остава постоянен, тъй като по време на симулацията, всяка излизаща от кутията частица се заменя с нейн, движещ се по същия начин, периодичен образ от някоя от съседните кутии. За да се намали броят на взаимодействията между частиците, който нараства значително с въвеждането на периодичните гранични условия, се използва конвенция за най-близкия образ, според която всяка частица от системата може да взаимодейства само с най-близкия образ на другите частици. В този случай радиусът на обрязване (r_{cutoff}), както за Ван дер Ваалсовите, така и за електростатичните взаимодействия (методи на Евалд), не може да бъде по-голям от половината на

дължината (вектора) на централната симулационна кутия (при кутия с форма на куб). При правоъгълни кутии радиусът на обрязване не трябва да бъде по-голям от половината на дължината на най-късата страна (вектор) [86, 91, 92]. Така с помощта на периодичните гранични условия можем да симулираме изследваната система, представена като една безкрайна система (Фиг. 19).



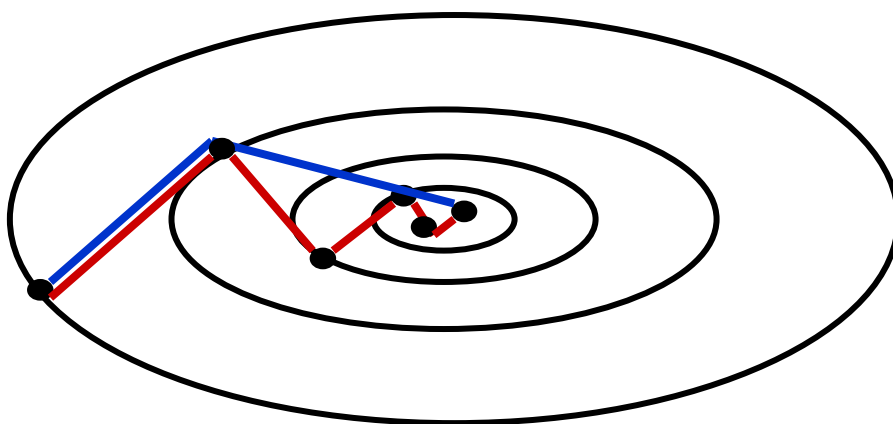
Фигура 19. Периодични гранични условия. Според конвенцията за най-близкия образ, атом i може да взаимодейства с атом j' , но не и с атом j , разположен в централната симулационна кутия. Със сфера е обозначено пространството около атом i , допустимо за взаимодействия с други атоми, съгласно радиуса на обрязване. Графиката е от [92].

2.1.3. Минимизация на енергията

Възможно е в началната конфигурация на изследваната система някои от атомите, които я изграждат да се окажат много близо един до друг, в резултат на неподходящи Ван дер Ваалсови контакти. В такива случаи между тези атоми възникват големи сили на взаимодействие, които драстично променят координатите и скоростите им, което може да доведе до сблъсъци с други атоми от системата по време на компютърна симулация. За да се избегне това, преди провеждането на симулацията е необходимо да се минимизира енергията на изследваната молекула, така, че нейните атоми да заемат естествените си позиции, а молекулата да попадне в своя локален минимум.

Алгоритмите, които най-често се използват за минимизиране на енергията на системата в молекулната динамика са метода на най-бързото спускане и метода на спрегнатите градиенти. При първият метод като параметър се задава максимална стъпка, чрез която координатите на атомите се преместват в посока, която е обратна на градиента на потенциалната енергия. Характерно за този алгоритъм е, че всяка

следваща посока на движение до достигане на локалния минимум е ортогонална на предишната. Методът е ефективен и бърз, само когато началната конфигурация на системата се намира далече от своя минимум. Достигане на локален минимум с по-малък брой стъпки, позволява метода на спрегнатите градиенти, тъй като при него, за разлика от метода на най-бързото спускане, не се наблюдава осцилиращо поведение, когато системата е близо до минимум. При алгоритъмът на спрегнатите градиенти движението на координатите на атомите е в същата посока като при първия метод до точката на минимум, след което посоката става перпендикулярна на първоначалната (Фиг. 20) [86, 92].



Фигура 20. Минимизиране на енергията на изследваната система чрез метода на най-бързото спускане (червена линия) и с метода на спрегнатите градиенти (синя линия).

2.1.4. Инициализация и алгоритми за интегриране на уравненията за движение

За да се изгради траекторията на изследваната система чрез интегриране на уравненията за движение на Нютон е необходима информация за първоначалните позиции и скорости на всяка частица в системата. Съществуват специални бази от данни за структури, като Protein Data Bank (PDB) [95], откъдето могат да бъдат свалени началните координати на атомите, получени с ЯМР спектроскопия или дифракция на рентгенови лъчи. А в случаите, когато в тези бази от данни няма налична информация за интересуващата ни структура, координатите на атомите могат да бъдат генерирани чрез хомоложно моделиране. Началната скорост на всеки атом се задава на случаен

принцип, така че да се представи коректно разпределението на Максвел - Болцман при определена температура T , а импулса на системата да е равен на нула:

$$(14) \quad p(\mathbf{v}_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2kT}\right)$$

като k е константата на Болцман.

След това се решават класическите уравнения за движение:

$$(15) \quad m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i = -\nabla_i U(\{\mathbf{r}_i\}),$$

където $U(\{\mathbf{r}_i\})$ е потенциалната енергия в зависимост от координатите на частиците.

Тъй като тези уравнения нямат аналитично решение се прибегва към тяхното числено интегриране с помощта на алгоритми на малки времеви стъпки:

$$(16) \quad \mathbf{r}_i(t) \rightarrow \mathbf{r}_i(t + \Delta t) \rightarrow \mathbf{r}_i(t + 2\Delta t) \rightarrow \dots \rightarrow \mathbf{r}_i(t + n\Delta t)$$

При повечето изчисления обикновено се използва стъпка от порядъка на 1-2 фемтосекунди (10^{-15} секунди). Координатите на i -тия атом се развиват в ред на Тейлър по степени на Δt :

$$(17) \quad \mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} \Delta t^2 + O(\Delta t^3)$$

Този алгоритъм обаче е нестабилен и неточен. По-добро решение за интегриране на уравненията за движение е използването на метода на Верле (уравнения 18 и 19). Ако сумираме разложенията на Тейлър за $+\Delta t$ и $-\Delta t$, условията в Δt , Δt^3 и т.н. се отменят и така получаваме:

$$(18) \quad \mathbf{r}_i(t + \Delta t) = -\mathbf{r}_i(t - \Delta t) + 2\mathbf{r}_i(t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \Delta t^2 + O(\Delta t^4)$$

Или:

$$\mathbf{r}_i^{n+1} = -\mathbf{r}_i^{n-1} + 2\mathbf{r}_i^n + \frac{\mathbf{F}_i^n}{m_i} \Delta t^2 + O(\Delta t^4)$$

Алгоритъмът на Верле е бърз и обратим във времето, като при него не е необходимо използването на скорости за изчисляване на координатите на частиците. Въпреки това могат да бъдат получени и скоростите:

$$(19) \quad \mathbf{v}_i(\mathbf{t}) = \frac{1}{2\Delta t} [\mathbf{r}_i(\mathbf{t} + \Delta t) - \mathbf{r}_i(\mathbf{t} - \Delta t)]$$

Или:

$$\mathbf{v}_i^n = \frac{\mathbf{r}_i^{n+1} - \mathbf{r}_i^{n-1}}{2\Delta t}$$

Описаният метод обаче не е подходящ за компютърни симулации с поддържане на постоянна температура, поради грешката от $O(\Delta t^4)$ при пресмятане на скоростите. Затова като алтернатива в молекулната динамика се използват други два алгоритъма, които са еквивалентни на метода на Верле: метод на скачащата жаба (т. нар. leap - frog алгоритъм) и метод на Верле със скорости. Характерно за методът на скачащата жаба е, че скоростите са отместени с половин времева стъпка, което позволява по точното им изчисляване, а с това се осигурява и поддържане на желаната температура при симулация (Фиг. 21). Алгоритъмът leap - frog може да се представи по следния начин:

$$(20) \quad \mathbf{r}_i(\mathbf{t} + \Delta t) = \mathbf{r}_i(\mathbf{t}) + \mathbf{v}_i \left(\mathbf{t} + \frac{\Delta t}{2} \right) \Delta t$$

Или:

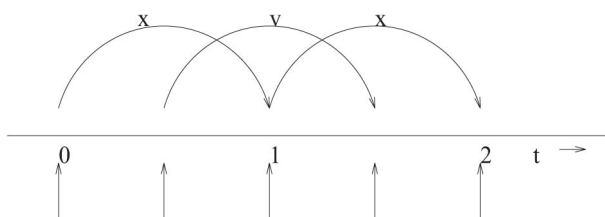
$$\mathbf{r}_i^{n+1} = \mathbf{r}_i^n + \mathbf{v}_i^{n+1/2} \Delta t$$

$$\mathbf{v}_i \left(\mathbf{t} + \frac{\Delta t}{2} \right) = \mathbf{v}_i \left(\mathbf{t} - \frac{\Delta t}{2} \right) + \frac{\mathbf{F}_i(\mathbf{t})}{\mathbf{m}_i} \Delta t$$

Или:

$$\mathbf{v}_i^{n+1/2} = \mathbf{v}_i^{n-1/2} + \frac{\mathbf{F}_i^n}{\mathbf{m}_i} \Delta t$$

Основен недостатък на този метод е, че позициите и скоростите на атомите не се изчисляват по едно и също време, което не позволява директното пресмятане на пълната енергия (кинетична и потенциална) на системата.



Фигура 21. Метод на скачащата жаба. Алгоритъмът се нарича така, защото при пресмятането им координатите (\mathbf{r}) и скоростите (\mathbf{v}) скачат като жаби едни над други, разминавайки се с половин стъпка. Фигурата е от [92].

Пресмятането на позициите и скоростите на частиците по едно и също време е възможно с метода на Верле със скорости:

$$(21) \quad \mathbf{r}_i(\mathbf{t} + \Delta t) = \mathbf{r}_i(\mathbf{t}) + \mathbf{v}_i(\mathbf{t}) \Delta t + \frac{1}{2} \frac{\mathbf{F}_i(\mathbf{t})}{m_i} \Delta t^2$$

Или:

$$\mathbf{r}_i^{n+1} = \mathbf{r}_i^n + \mathbf{v}_i^{n+1/2} \Delta t + \frac{\mathbf{F}_i^n}{m_i} \Delta t^2$$

$$\mathbf{v}_i(\mathbf{t} + \Delta t) = \mathbf{v}_i(\mathbf{t}) + \frac{1}{2} \left(\frac{\mathbf{F}_i(\mathbf{t})}{m_i} + \frac{\mathbf{F}_i(\mathbf{t} + \Delta t)}{m_i} \right) \Delta t$$

Или:

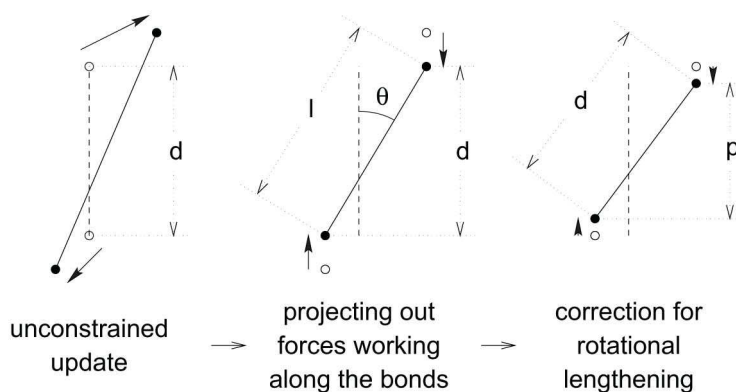
$$\mathbf{v}_i^{n+1} = \mathbf{v}_i^{n+1/2} + \frac{\mathbf{F}_i^{n+1}}{2m_i} \Delta t$$

Този алгоритъм е бърз, обратим във времето и стабилен, като предлага и възможност за промяна на времевата стъпка. Единственият му недостатък е необходимостта от допълнителна памет за извършване на изчисленията [87, 91, 92].

2.1.5. Ограничаване на дължината на химичните връзки с алгоритъма LINC6

Времева стъпка при интегрирането на уравненията за движение в молекулната динамика най-често е ограничена до $\Delta t = 0,5 - 1$ fs от вибрационните движения на ковалентните връзки (в които участват и водородни атоми), характерни за

многоатомните молекули. Тъй като трептенията на молекулата не са пряко свързани с нейните транслационни и ротационни движения, вибрационните степени на свобода могат да бъдат пренебрегнати, а ковалентните химични връзки да се "замразят" т.е. да останат с постоянна дължина. За фиксиране на дължината на химичните връзки се използва алгоритъма LINCS (*LIN*ear *Con*straint *Sol*ver), който работи с помощта на матрици и не е итеративен. Методът връща връзките (и ъглите) до първоначално зададените им стойности чрез преместване на свързаните частици успоредно на старите посоки на връзките. Алгоритъмът LINCS позволява и корекция на скоростта на атомите, като така се предотвратява удължаването на връзките, поради въртене (Фиг. 22).



Фигура 22. Фиксиране на дължината на химичните връзки с алгоритъма LINCS. С прекъснатата линия е означена старата връзка с дължина d , плътните линии са новите връзки, а p е проекцията на новите връзки върху старите посоки на връзките. Фигурата е от [92].

С помощта на описания метод времевата стъпка може да се увеличи 8 пъти. P-LINCS е версията на LINCS, с която уравненията за движение могат да се пресмятат паралелно на високопроизводителни машини [91, 92, 96].

2.1.6. Поддържане на постоянна температура и налягане

Молекулната динамика трябва да се провежда при поддържане на постоянна температура и налягане, за да може една биологична система да се симулира при условия, които са най-близки до реалните в живия организъм, а нейните

макроскопични свойства да бъдат сравними с резултатите от лабораторен експеримент. Затова вместо в микроканоничен NVE ансамбъл, запазващ пълната енергия на изследваната система, молекулно - динамичните симулации обикновено се провеждат в каноничен NVT ансамбъл (за постоянна температура) и изотермно - изобарен NPT ансамбъл (осигуряващ освен постоянна температура и постоянно налягане).

За да се поддържа постоянна температура по време на симулация към системата се включва термостат, чиято основна цел е да контролира колебанията в енергията, чрез нейното прибавяне и отделяне от системата. Един от най-често използваните термостати е този на Берендсен [97]. С негова помощ температурата на системата се променя експоненциално до желаната стойност T_0 (зададена предварително на термостата), чрез скалиране на скоростите на частиците при всяка времева стъпка. По този начин, скоростта на изменение на температурата, в дадения момент от време t , става пропорционална на разликата между температурите на термостата и системата:

$$(22) \quad \frac{dT(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau_T} (T_0 - T(t))$$

В случая τ_T е параметър на свързване, чиято стойност показва колко здраво са свързани термостата и системата. По-малката му стойност, означава по-силно свързване, което води до по-бързо достигане на желаната температура. Коефициентът на скалиране на скоростите на частиците може да се представи по следния начин:

$$(23) \quad \lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right)$$

Въпреки, че методът на Берендсен е стабилен и широко използван, той не може да възпроизведе достатъчно точно каноничен ансамбъл, поради потискане на колебанията на кинетичната енергия на системата. Канонично разпределение с този метод се наблюдава само при симулации на големи системи.

Като подобрена алтернатива на термостата на Берендсен се използва термостатът v - rescale [98], при който скоростите на частиците се рескалират със специфичен коефициент, който осигурява коректно възпроизвеждане на каноничен ансамбъл. В този случай кинетичната енергия на изследваната системата се променя по следния начин:

$$(24) \quad dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_T} + 2 \sqrt{\frac{KK_0}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_T}},$$

където $K_0 = N_f kT_0/2$ е средната кинетична енергия при желаната температура (зададена предварително на термостата), N_f е броят на степените на свобода, τ_T е параметърът на свързване между термостата и системата, а dW е Винеров процес.

Предимството на метода v - rescale е, че той осигурява правилно разпределение на кинетичната енергия в системата.

Широко използван за поддържане на постоянно налягане по време на симулация е баростатът на Берендсен, с който налягането в системата достига експоненциално до желаната стойност P_0 чрез скалиране на векторите на симулационната кутия и координатите на частиците на всяка времева стъпка:

$$(25) \quad \frac{dP(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_P} (P_0 - P(t))$$

В случая τ_P е параметър на свързване към баростата. Коефициентът на скалиране е матрица и може да се представи като:

$$(26) \quad \mu^3 = 1 - \frac{\beta \Delta t}{\tau_P} (P_0 - P(t)),$$

където β е изотермната свиваемост на системата. За съжаление баростатът на Берендсен не може да генерира правилен изотермно - изобарен NPT ансамбъл, за който са характерни както постоянна температура, така и постоянно налягане. Затова в молекулната динамика, като по-ефективен вариант за поддържане на постоянно налягане, се използва подходът на Паринело - Раман [99]. При него баростатът и системата са свързани чрез допълнителни степени на свобода, които представят движението на векторите на симулационната кутия:

$$(27) \quad \frac{db^2}{dt^2} = \mathbf{VW}^{-1}\mathbf{b}^{T-1} (P(t) - P_0),$$

където с V е означен обемът на кутията, а с W^{-1} матрица, която показва колко здраво са свързани баростата и системата и до каква степен може да се деформира кутията под действие на налягането. Елементите на матрицата са: $(W^{-1})_{ij} = 4\pi^2\beta_{ij} / 2\tau_p^2L$, от който с L е отбелязана най-дългата страна на симулационната кутия. Движението на частиците в системата може да се представи по следния начин:

$$(28) \quad \frac{d^2\mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{\mathbf{m}_i} - \mathbf{M} \frac{d\mathbf{r}_i}{dt}$$

$$\mathbf{M} = \mathbf{b}^{-1} \left(\mathbf{b} \frac{d\mathbf{b}^T}{dt} + \frac{d\mathbf{b}}{dt} \mathbf{b}^T \right) \mathbf{b}^{T-1}$$

Така с метода на Паринело - Раман симулацията се провежда при постоянна температура и налягане, а траекторията на изследваната система е с правилен NPT ансамбъл [86, 91, 92].

2.1.7. Софтуерен пакет за молекулна динамика GROMACS

Широко разпространен софтуер с отворен код за компютърни симулации на биологични системи е **GROMACS** (*Groningen machine for chemical simulations*), който е използван и в настоящата дисертация. Този програмен пакет е лесен за употреба и позволява бързо изчисляване на избраните от потребителя параметри. Кодът на **GROMACS** е съвместим и с различни операционни платформи, включително операционни системи **UNIX** и **LINUX**, и може да използва голям брой изчислителни CPU ядра. Удобна функция в софтуерния пакет е възможността за преобразуване на структурни файлове свалени от PDB в такива, които са разбираеми от кода на **GROMACS**. Важно е да се отбележи, че **GROMACS** не притежава собствено силово поле, но пък е съвместим със силови полета като OPLS, GROMOS, AMBER, CHARMM 36 и т.н. За по-бързо изчисляване на зададените параметри на изследваната система, пакетът включва и опция за паралелно извършване на пресмятията върху високопроизводителни машини, чрез използване на стандарта MPI (*Message Passing Interface*). С помощта на MPI алгоритъма, който е добавен в **GROMACS**, системата се разделя на части, които се разпределят за пресмятия между отделните процесори. Системата може да бъде разделена по два начина: пространствено разделяне или още разделяне по домени (*domain decomposition*) и разделяне по частици (*particle*

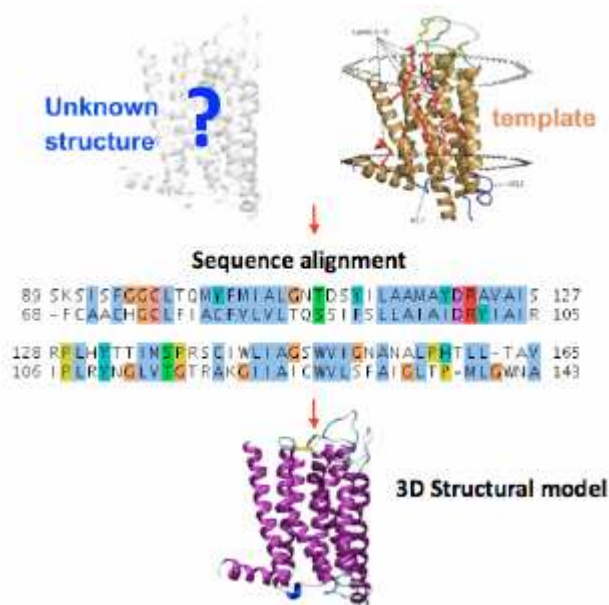
decomposition). При пространственото разделяне симулационната кутия се дели на домени на всяка времева стъпка, като изчисляването на силите действащи между частиците се разпределя така, че всеки процесор да получи по един пространствен домен. В случая предимство е намалената комуникация между процесорите, защото се пресмятат само локални взаимодействия, а недостатък е движението на частиците между процесорите на всяка времева стъпка, което изисква и допълнителна памет за изчисленията. При разделянето по частици всеки процесор получава определен брой частици от системата така, че изчисляването на силите действащи между тези частици да бъде равномерно разпределено между отделните процесори. В този случай няма обмяна на частици между процесорите и обикновено по този начин се пресмятат взаимодействията, действащи на дълги разстояния. Основен недостатък е, че всеки процесор съхранява копие на половината от всички атомни координати, което изисква използване на много памет, а също и повече комуникация между процесорите.

За разрешаването на проблемите и при двата начина за разделяне на системата и за подобряване на производителността в **GROMACS** е добавен допълнителен алгоритъм за пресмятане на електростатичните взаимодействия, действащи на дълги разстояния - методът PME (описан в точка 2.1.1, при който се отчита взаимодействието на всяка отделна частица с всички останали частици от системата). Неговото използване позволява изчислителните ядра на процесорите да се разделят на два типа: *pme ядра* за изчисляване на електростатичните взаимодействия с алгоритъма PME (глобална комуникация) и *pp ядра* за пресмятане на всички останали взаимодействия в изследваната система (локална комуникация). В **GROMACS** са предвидени няколко режима за разпределяне на *pp:pme* изчислителните ядра, които могат да се зададат от потребителя: *interleave*, *pp_pme* и *cartesian*. Първият от тях, *interleave* е по подразбиране и той се активира автоматично, ако не е избран друг режим [92, 100].

2.2. Хомоложно моделиране

Тъй като мембранните протеини, чиито представител е и окситоциновия рецептор, са трудни за кристализация, до този момент няма налична информация за пространствената структура на голяма част от тези белтъци. Освен това, експерименталното определяне на структурата на даден протеин (най-често чрез дифракция на рентгенови лъчи или ЯМР спектроскопия) изисква дълъг период от време и е скъпоструващо [101]. Затова като алтернативен вариант за предсказване на 3D

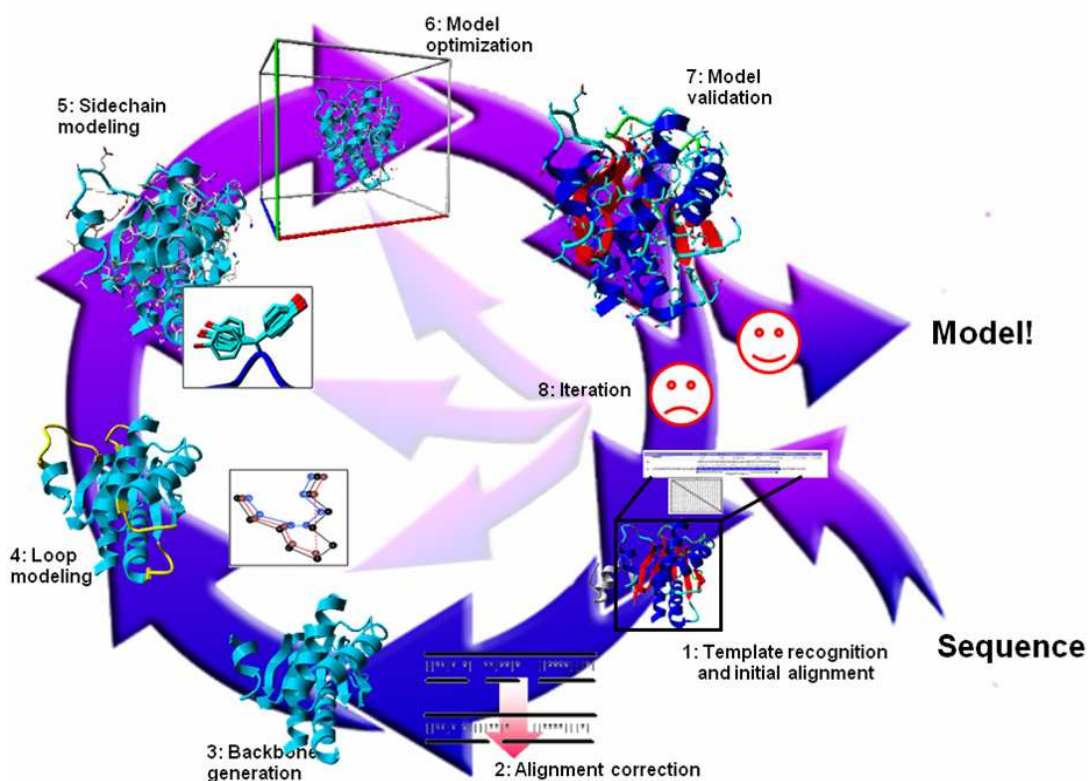
структурата на белтъците се използва сравнителното или хомоложното моделиране, чиято крайна цел е предвиждането на структурата от нейната аминокиселинна последователност с точност, която е сравнима с най-добрите резултати постигнати експериментално. По този начин създадените *in silico* модели могат да бъдат полезни при изучаването на взаимодействието между лигандите и техните рецептори, в откриването на нови функции на протеините, в рационалния дизайн на белтъци с по-голяма стабилност, в базиращия се на структурата лекарствен дизайн и т.н. Моделирането в случая се основава на факта, че подобни последователности се нагъват в пространството в сходни структури, тъй като по време на еволюцията структурата е по-стабилна и се променя много по-бавно от свързаната последователност. По своята същност хомоложното моделиране е техника, която позволява изграждането на модел на протеин - "таргет" (с неизвестно пространствено разположение на атомите в него) от аминокиселинната му последователност и експериментално получена 3D структура на подобен протеин - "темплейт" (Фиг. 23) [102, 103, 104]. Важно е да се отбележи, че структурата на темплейта трябва да бъде с разумно качество - с разделителна способност по-добра от 2.5 Å и идентичност на последователността с целевия (таргетен) протеин от поне 25%. Освен това биологичната функция на двата протеина трябва да бъде сходна или поне свързана [105].



Фигура 23. Хомоложно (сравнително) моделиране. Фигурата е от [106].

Процесът на хомоложно моделиране включва следните основни етапи (Фиг. 24):

- намиране на подходящи структури за темплейти и секвенционно подравняване;
- провеждане на хомоложното моделиране (изграждане на модел);
- усъвършенстване на модела;
- анализ и оценка на качеството на модела.



Фигура 24. Етапи на хомоложното моделиране. Фигурата е от [107].

2.2.1. Намиране на подходящи структури за темплейти и секвенционно подравняване

Първата стъпка в сравнителното моделиране е да се намерят една или повече подходящи структури за темплейти (т. е. последователности с известна 3D структура), които да са сходни с последователността на търсения протеин - "таргет", при който пространственото разположение на атомите, които го изграждат е неизвестно. Най-често откриването на темплейти (шаблони) се осъществява с помощта на програми за подравняване на последователности, като например BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment

Search Tool) [108]. Компютърният алгоритъм BLAST е достъпен за онлайн използване от уебсайта на Националния център за биотехнологична информация (NCBI) [109]. Този алгоритъм позволява сравняване и подравняване на таргетни последователности с последователности на 3D структури на протеини, които се съхраняват в бази от данни, като Protein Data Bank.

Обикновено за измерване на секвенционната идентичност между сравняваните аминокиселинни последователности се използват два типа на подравняване - глобално или локално. При алгоритмите за глобално подравняване изчисляването на сходството обхваща цялата дължина на изследваните последователности, които най-често са еволюционно свързани и са с еднаква дължина на аминокиселинната верига. Недостатък на това подравняване обаче е, че при пресмятанията могат да се включат и участъци с нисък процент на подобие. За локалното подравняване е характерно, че при него се търсят само консервативни (запазени) области в сравняваните последователности, а районите с ниска идентичност не допринасят за измерване на сходството. В този случай изследваните последователности могат да са с различна дължина и да принадлежат на отдалечени сродни протеини. Програмата BLAST, например, изчислява статистическата значимост (т.нар. E-value) на съвпаденията в последователностите на таргетния протеин и темплейта/ите, като намира участъци с локално сходство между тях. Параметърът E-value (*expected value*) представлява очаквания брой на случайните подравнявания при търсене в база данни с определен размер. Колкото по-малка е стойността на E, толкова по-добро е съвпадението (например ако стойността е по-близо до нула това означава по-голямо сходство на сравняваните последователности). Друга величина за оценка на подравняването е идентичността в проценти. Тя показва колко подобен е таргетния протеин с последователностите, с които е подравнен и се изчислява като съотношение между броя на съответстващите си аминокиселинни остатъци в сравняваните протеини към общата дължина на подравняването. По-висок процент, означава по-голямо сходство между таргета и темплейта.

В случаите, когато се наблюдават вариации в местоположенията на консервативните остатъци или разлика в дължината на сравняваните последователности се въвеждат празни места в подравняването. Най-често липсващите части (празнините) съответстват на области, където извивките (извънклетъчни и вътреклетъчни) на полипептидната верига се изтриват или вмъкват. За да се сведе до минимум броят на тези празни места се използва наказателна функция (*gap penalty*

function), която да коригира резултатите от подравняването (като се имат предвид броя и дължината на празните места).

Секвенционното подравняване се осъществява с използването на матрици. При сравняването на две аминокиселинни последователности, всяка буква в едната последователност се вдвоява или "подравнява" точно с една буква или празно място в другата последователност. Резултатът от подравняването се изчислява, като се присвоява стойност на всяка подравнена двойка букви, а след това тези стойности се сумират по дължината на подравняването. Стойност 1 получават идентичните двойки от букви, а стойност 0 всички останали двойки.

Според алтернативен подход, на оценката на подравняването чрез процента на секвенционна идентичност, топологично еквивалентните остатъци в два структурно хомоложни протеина може да не са идентични, но често са сходни по форма, образувани от тях водородни връзки и хидрофобни свойства. Това позволява осъществяването на консервативни замествания между тези остатъци т.е. вероятност за мутация на едната аминокиселина в друга, след определен период от еволюционно време. Тези вероятности се съхраняват в т.нар. PAM (point accepted mutation) матрици. Понятието PAM може да се разглежда и като мярка за еволюционно разстояние, като един PAM обикновено съответства на промяна (средно) в 1% от всички аминокиселинни позиции. Подобни на PAM, но по-добри от тях, са BLOSUM (block substitution matrix) матриците. В BLOSUM матриците, като данни, се използват блокове от подобни аминокиселинни последователности. След това данните се обработват със статистически методи, за да се изчислят резултатите за сходство. Програмата BLAST, например, работи с BLOSUM-62 матрица.

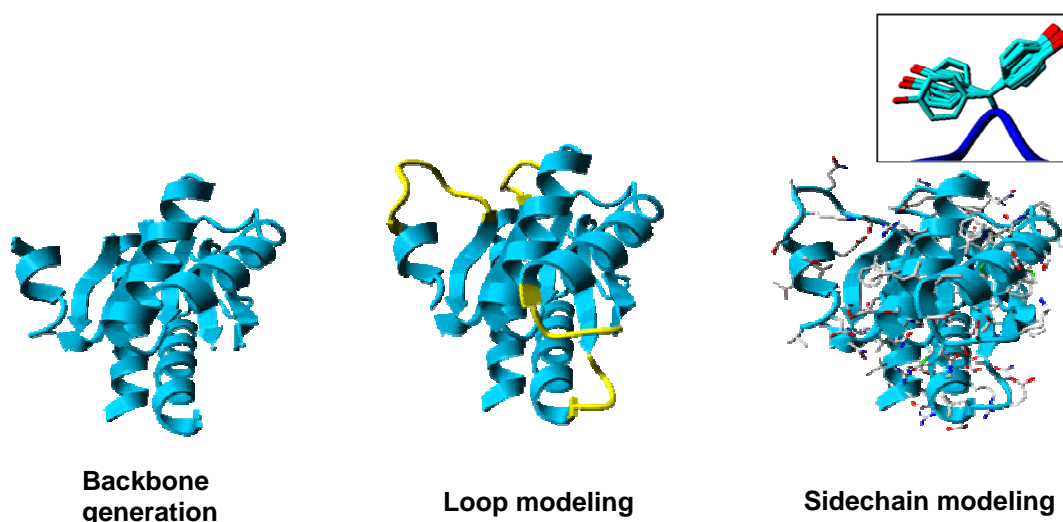
Сравняването на последователностите на три или повече подобни протеина е известно като *multiple alignment* и може да се използва за подобряване на прогнозирането на вторични структурни елементи, както и за намиране на характерни мотиви и консервативни остатъци в семействата от белтъци. Този тип на подравняване е и много полезен, когато е необходимо да се вмъкнат или изтрият определени области, в които последователностите са силно разминаващи се.

Освен секвенционната идентичност, друг важен фактор, който оказва съществено влияние върху изграждането на успешен модел на търсения протеин, е качеството на експериментално определената структура на темплейта. Мярка за това качество е разделителната способност на шаблона, която трябва да бъде по-добра от 2.5 Å. Добра

разделителна способност е тази, която е по-малка от 2 Å за мембранни протеини (като родопсина) и 1 Å за останалите протеини [86, 107, 108].

2.2.2. Провеждане на хомоложното моделиране (изграждане на модел)

След като са определени сходните аминокиселинни остатъци между последователностите на таргетния протеин и темплейта/ите може да започне построяването на модел на пространствената структура на неизвестния протеин. Този процес се състои в изграждането на въглеродния скелет (гръбнака), извънклетъчните и вътреклетъчните извивки, и страничните вериги на търсения протеин (Фиг. 25).



Фигура 25. Изграждане на модел чрез хомоложно моделиране. Фигурата е използвана с леки промени от [107].

При моделирането пространствената структура на белтъците обикновено е разделена на структурно запазени и структурно променливи области. Структурно запазените участъци са тези с максимална идентичност между последователностите на таргета и темплейта/ите и най-често са разположени в сърцевината на протеина или в активния му център. Структурно променливите райони са извънклетъчните и вътреклетъчните извивки на белтъка, които участват в свързването между вторични структурни елементи като α -спирали и др.

За провеждане на хомоложното моделиране се използват три основни метода. Първият от тях е известен като метод за сглобяване на твърдо тяло. При него моделът се изгражда въз основа на информация за усреднените стойности на координатите на $C\alpha$ атомите от структурно запазените области на използваните в подравняването темплейт/и. Така се конструира сърцевината на неизвестния протеин, към която след това се добавят извивките и страничните вериги. Вторият подход за моделиране чрез съвпадение на сегменти, използва позициите на някои атоми (обикновено $C\alpha$ атоми) от подравняването, за да намери съответстващи сегменти в база от данни на известни протеинови структури. По този начин могат да се сглобят, както атомите на въглеродородния скелет на неизвестния белтък, така и атомите, съставляващи неговите извивки и страничните му вериги. Третият метод, който е използван и в настоящата дисертация, се основава на моделиране чрез удовлетворяване на пространствените ограничения. Една част от тези ограничения са свързани с хомологията и те се налагат, като се приема, че съответните разстояния между подравнените аминокиселинни остатъци в темплейта/ите и търсения протеин са сходни. Другата част са стереохимични ограничения върху дължините на химичните връзки, ъглите на връзката, ъглите на усукване, Ван дер Ваалсовите контакти и др., които са получени от молекулно-механични силови полета. Моделът на неизвестния протеин се изгражда чрез минимизиране на нарушенията на всички наложени ограничения. Това се постига като пространствените ограничения, изразени с помощта на функции на плътността на вероятността (probability density function - pdf), се комбинират в молекулна функция (molpdf), която се оптимизира. Оптимизацията се извършва с алгоритъм на спрегнатите градиенти и молекулна динамика с контролирано нагриване и охлаждане на системата. Моделирането в този случай е подобно на определянето на търсената структура с помощта на ЯМР спектроскопия.

Построяването на модел по един от описаните методи започва с изграждането на въглеродородния скелет (гръбнака) на белтъка, след което към него се добавят извънклетъчните и вътреклетъчните извивки, и страничните вериги. Когато в използваните при подравняването темплейт/и няма налична информация за извивките и страничните вериги на неизвестния протеин (представени в случая като празни места в подравняването) за тяхното моделиране се провежда търсене в базите данни с експериментално определени структури и/или се прилагат *ab initio* методи [86, 107].

2.2.3. Усъвършенстване на модела

След като построяването на модела е завършено, т.е. изграден е въглеводородния скелет, добавени са извивките и страничните вериги на белтъка, се използват различни техники за оптимизация на получената структура. Двата най-често прилагани метода са минимизирането на енергията и молекулната динамика (виж 2.1 и 2.1.3), чиято цел е намирането на локалния енергиен минимум на системата (модела). По този начин новоизграденият протеин се изследва за недостатъци, като лоши стерични контакти, изкривени химични връзки и др., които се отстраняват, а пространствената му структура заема най-благоприятната си конформация [107].

2.2.4. Анализ и оценка на качеството на модела

За анализ и оценка на качеството на изградената 3D структура на модела се използват статистически потенциали. Такъв потенциал, базиран изцяло на теорията на вероятностите, е дискретната оптимизирана протеинова енергия - DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) [110]. DOPE е статистическа величина, която е зависима от разстоянието между атомите и се изчислява въз основа на извадка от експериментално определени структури на протеини, използвани като референтни. Потенциалът DOPE характеризира взаимодействията между двойки атоми и може да бъде разложен за оценка на всеки аминокиселинен остатък. Полученият по този начин енергиен профил е полезен за откриване на локални области с висока псевдо-енергия, които обикновено съответстват на грешки в модела.

Друг метод за оценка на получената с хомоложно моделиране 3D структура на търсения протеин е средното квадратично отклонение - RMSD (Root Mean Square of the sum of the squared Distances) [111]. Параметърът RMSD дава средната стойност за разстоянията между всички атоми в две сравнявани структури, като по този начин се използва за количествена мярка (абсолютна оценка) на подравняването между таргета и темплейта. Пресмята се по следната формула:

$$(29) \quad \text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} d_i^2},$$

където \mathbf{d} е разстоянието между двойка подравнени атоми. Подравняването е добро при $\text{RMSD} < 2\text{\AA}$.

Качеството на създадения модел може да бъде оценено и от гледна точка на неговата стереохимия т.е. дали е оптимална или не е. Това се осъществява с помощта на алгоритми за проверка на правилното конструиране на геометрията на белтъчната молекула. Чрез тях могат да се открият отклонения във въглеродородния скелет на протеина, в страничните му вериги, неподходящи контакти между атомите и др. Пример за такива алгоритми са тези използвани от MolProbity сървър [112].

2.2.5. Софтуерен пакет за хомоложно моделиране MODELLER

Modeller [113] е една от най-широко използваните компютърни програми за хомоложно моделиране на неизвестни структури на белтъци, поради точния и бърз алгоритъм, който използва. Софтуерът работи със скриптове написани на програмния език Python. Изграждането на модел се осъществява чрез метода на удовлетворяване на пространствените ограничения, които включват: получени въз основа на хомологията ограничения при подравняването на таргета и темплейта/ите; статистически ограничения, произтичащи от всички известни протеинови структури и стереохимични ограничения от силовото поле за молекулна механика CHARMM-22 [114]. Тези ограничения, изразени с помощта на функции на плътността на вероятността (pdf), се комбинират в молекулна функция (molpdf), която се оптимизира с алгоритъм на спрегнатите градиенти и молекулна динамика с контролирано нагряване и охлаждане на системата.

2.3. Свързан подход ("bonded approach")

При класическите МД симулации повечето от широко използваните силови полета нямат подходящи параметри за метални йони. Затова за моделирането на цинк и други двувалентни йони, вградени в пептидите, са разработени два различни метода, които се използват за описване на взаимодействията между металните йони и координираните с тях аминокиселинни остатъци. При първият подход се създава несвързан модел, при който няма σ връзки между централно разположения метален йон и неговите лиганди. В този случай пространствената структура на модела се поддържа само от Ван дер Ваалсови и електростатични сили. Това позволява на комплексът метал-лиганд да променя своята конфигурация, когато е в разтвор. При вторият метод, известен като "свързан подход", се използват ковалентни (изкуствени) връзки за представяне на взаимодействията между металния йон (напр. Zn^{2+}) и лигандите му. По

този начин избраната координационна геометрия, на централния йон (напр. Zn^{2+}) и свързаните с него атоми от аминокиселинните остатъци в пептидите, се поддържа постоянна по време на симулациите във воден разтвор [70, 72, 115].

2.4. Молекулен докинг

Правилното протичане на биологичните процеси в организма зависи от способността на молекулите на белтъците да се свързват с други протеини или с различни лиганди по строго специфичен начин. Молекулният докинг е метод, който позволява бърза оценка на вероятността за свързване между две молекули, напр. рецептор и лиганд, въз основа на тяхната геометрична съвместимост. С помощта на този подход се предсказва структурата на получения комплекс. Процедурата по докинг се провежда в два основни етапа: първо се генерират всички възможни ориентации на лиганда в активния център на рецептора, а след това се оценява вероятността за свързване между двете молекули, въз основа на получените ориентации, от които се избира най-подходящата.

Един от най-широко използваните алгоритми за докинг е генетичния. При него степените на свобода на лиганда (три на транслационна, три на ротационна свобода и степените на конформационна свобода) са кодирани като двоични низове, наречени гени. Тези гени изграждат "хромозома", която представлява ориентацията (позата) на лиганда. Набор от няколко ориентации (хромозоми), които са генерирани на случаен принцип, образуват начална популация. От нея се формира нова популация чрез кръстосване и мутации на старите ориентации отново на случаен принцип. Следва оценка на енергията на получените пози и създаването на нова популация от ориентации с ниска енергия, като итерациите продължават до намирането на набора от най-нискоенергетични пози. За да бъдат оценени и сортирани различните ориентации се използват функции за оценка, които отчитат енергията на свързване между двете молекули (в случая рецептор и лиганд). В зависимост от типа на функцията за оценка в пресмятането на енергията могат да участват различни членове, като Ван дер Ваалсови взаимодействия, водородни връзки, електростатични взаимодействия, взаимодействия с разтворител (вода) и др. [94, 116, 117].

С генетичен алгоритъм работи програмата AutoDock [118], която е включена като приставка, наречена vsLab (virtual screening lab) [119], в софтуера за молекулно моделиране и визуализация - VMD (Visual Molecular Dynamics) [120].

2.5. Методи за анализ на лиганд - рецепторни взаимодействия

Образуването на стабилен комплекс между лиганда и неговия рецептор е резултат от електростатични, хидрофобни взаимодействия и водородни връзки, които свързват структурите на двете молекули. Електростатичните взаимодействия са пространствено насочени, действат на дълги разстояния ($> 3\text{\AA}$) и подпомагат началното разпознаване между биомолекулите. Характерни са за йони, диполи и индуцирани диполи, под каквато форма са аминокиселинните остатъци на белтъците при физиологично рН. Енергията на електростатичните сили намалява с увеличаване на разстоянието между заредените частици. При хидрофобното свързване, хидрофобните области от рецептора се запълват с хидрофобни групи от лиганда, за да се намали неблагоприятната за тези участъци контактна повърхност с водните молекули. Този тип на взаимодействия са слаби и не са пространствено насочени. Водородните връзки осигуряват правилното позициониране на лиганда върху мястото на свързване с рецептора, пространствено насочени са и се образуват на разстояния между 2 и 3.5\AA [94].

2.5.1. ММ-PBSA подход

Методът ММ-PBSA (molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area) е широко използван за оценка на лиганд - рецепторните взаимодействия. При него свободната енергия на свързване (афинитет) между двете молекули се изчислява като сума от потенциалната енергия във вакуум, енергиите на разтваряне, съставени от полярна и неполярна част и приноса на ентропията във вакуум. Потенциалната енергия във вакуум, която включва енергията на ковалентните и нековалентните взаимодействия, се определя с помощта на молекулно - механично (ММ) силово поле. Полярната (електростатична) част на енергията на разтваряне се пресмята с решаване на уравнението на Поасон-Болцман (PB) [121], а неполярната част се получава въз основа на Ван дер Ваалсовите (хидрофобни) взаимодействия и корелира с повърхността (SA) на разтвореното вещество, която е достъпна до разтворителя. Изчисляването на свободната енергия на свързване между лиганда и рецептора с метода ММ-PBSA може да се представи по следния начин:

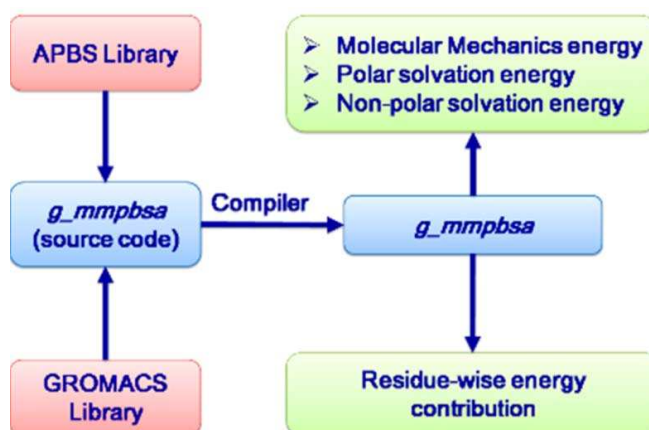
$$(30) \quad \Delta G_{binding} = G_{complex} - G_{protein} - G_{ligand} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} - T\Delta S,$$

където E_{MM} е потенциалната енергия на взаимодействие между лиганда и протеина във вакуум; G_{PB} и G_{SA} са съответно електростатичния и неполярния принос за разтваряне при свързване на лиганда и $-T\Delta S$ е приноса на ентропията към свободната енергия във вакуум, като T е абсолютната температура, а S е ентропията. Обикновено последния член $-T\Delta S$ не се пресмята, поради увеличаване на грешката и разходите за изчисления.

Методът ММ-PBSA е внедрен в инструмента `g_mmpbsa`, който може да бъде добавен към софтуерния пакет **GROMACS**. Програмата `g_mmpbsa` позволява не само изчисляване на свободната енергия на свързване между лиганда и неговия рецептор, но и нейното разлагане въз основа на приноса на всеки участващ аминокиселинен остатък (Фиг. 26). Разлагането на енергията се осъществява чрез пресмятане на енергийните членове E_{MM} , G_{PB} и G_{SA} за отделните атоми, както в свързаната, така и в несвързаната форма на лиганда и рецептора. След това се изчислява приноса на тези атоми към енергията на свързване ΔR_X за остатъка X:

$$(31) \quad \Delta R_X = \sum_{i=0}^n (A_{i(bound)} - A_{i(free)}),$$

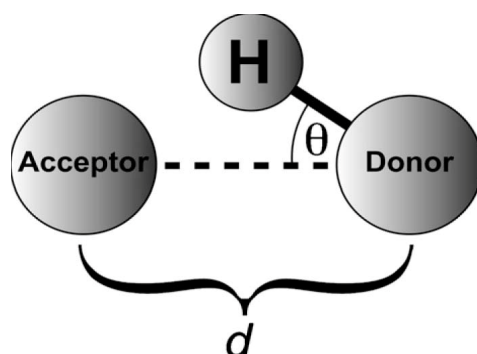
където $A_{i(bound)}$ и $A_{i(free)}$ са съответно енергията на i -тия атом от остатъка X в свързаната и несвързаната форма на лиганда и рецептора, а n е общия брой на атомите в остатъка. Сумата от енергийните приноси на аминокиселинните остатъци е равна на енергията на свързване за комплекса лиганд-рецептор [122, 123].



Фигура 26. Схематично представяне на метода ММ-PBSA, който е внедрен в инструмента `g_mmpbsa`. Фигурата е използвана с леки промени от [123].

2.5.2. HBonanza алгоритъм

Компютърната програма HBonanza е една от най-често използваните за анализ на водородните връзки, които осигуряват правилното позициониране на лиганда в активния център на рецептора. Водородната връзка се образува между водороден атом, който е ковалентно свързан с по-електроотрицателен атом, наречен донор и друг електроотрицателен атом със свободна електронна двойка, наречен акцептор (Фиг. 27). С помощта на алгоритъма на HBonanza могат да се откриват водородни връзки в траектории от молекулно - динамични симулации, като за тяхното идентифициране се използват следните критерии: донора и акцептора в този тип връзка са атоми на кислород, азот, флуор или сяра; разстоянието между атомите на донора и акцептора не трябва да бъде по-голямо от 3.5 Å; ъгълът между водородния атом, донорния и акцепторния атом трябва да бъде по-малък от 30°; водородната връзка, както е дефинирана по-горе, трябва да присъства в поне 75% от траекторията.



Фигура 27. Схематично представяне на водородна връзка. С d е означено разстоянието между донорния и акцепторния атом, а с θ ъгъла между водородния атом, донорния и акцепторния атом. Фигурата е от [124].

Основно предимство на програмата HBonanza пред останалите налични софтуерни продукти за анализ на водородни връзки е възможността за определянето само на тези мрежи от водородни връзки, които се отнасят за лиганда, който е обект на интерес. Идентифицираните водородни връзки с HBonanza се описват в текстова таблица, а освен това могат да бъдат и визуализирани [124].

Глава 3

Изследване на стабилността на комплекса окситоцин - двувалентен цинк във воден разтвор с молекулна динамика

Получаването на стабилен комплекс между окситоцин и двувалентен цинков йон във воден разтвор е важно условие, необходимо за успешното свързване между човешкия хормон окситоцин и неговия рецептор (виж 1.5.). Използвайки комбинация от експериментални процедури и теоретични методи, Liu и съавтори показват, че когато Zn^{2+} се свързва с окситоцин, той предизвиква значителна структурна промяна в молекулата на хормона, което води до повишен афинитет на рецептора към комплекса OT - Zn^{2+} [54, 69]. Но тяхното проучване не предоставя данни за стабилността на този комплекс във воден разтвор. Затова целта на настоящото изследване беше да се изгради ригидна структура между човешкия хормон окситоцин и двувалентния цинков йон и да се провери стабилността на получения нов комплекс във воден разтвор с помощта на метода молекулна динамика.

3.1. Моделиране на комплекса окситоцин - двувалентен цинк

3.1.1. Молекулно моделиране

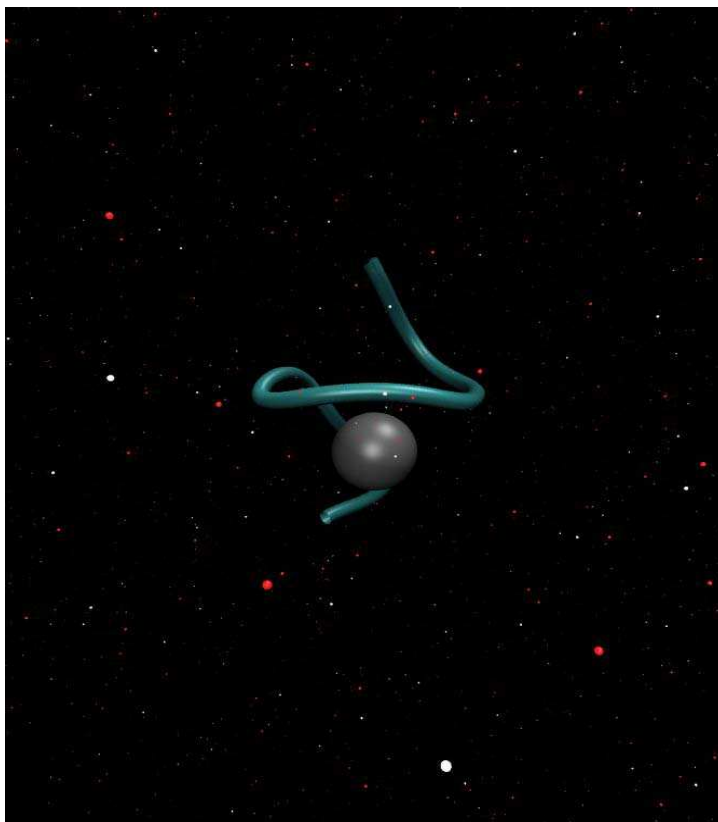
За изграждането на компютърен модел на комплекса окситоцин - двувалентен цинк е използвана магнитно-резонансна структура на човешкия хормон окситоцин с код 2MGO [125], която е свалена от базата данни PDB. Преди конструирането на самия модел, карбоксилната група (COO^-) на аминокиселината Gly на позиция 9 в молекулата на хормона е заместена с амидна група (NH_2), с помощта на програмата *gmx pdb2gmx* на GROMACS. Включването на флага *-ter*, като опция, на тази програма, позволява избор

на състоянието на протониране на N- и C- краищата в пептидите или протеините. За моделирането на комплекса окситоцин - двувалентен цинк е използван свързан подход. С метода са въведени ковалентни (изкуствени) връзки между металния йон и неговите лиганди (кислородните атоми на шест остатъка Tyr2, Ile3, Gln4, Cys6, Leu8 и Gly9 от гръбнака на окситоцина). Ограниченията в разстоянието между всеки от шесте кислородни атома и цинковия йон са използвани за намаляване на степените на свобода на създадения модел. С помощта на свързания подход е зададен желан режим на координационна геометрия между остатъците от пептида и двувалентния цинк, като така е предотвратена обмяната или пермутацията на лиганди в получения комплекс. В резултат на това координационното число (т.е. броят на лигандите, свързани с металния йон) остава също непроменено по време на молекулно-динамична симулация.

3.1.2. Резултати

Експериментални и теоретични изследвания показват, че двувалентните метални йони са ключов посредник за успешното свързване между човешкия хормон окситоцин и неговия рецептор. Молекулата на окситоцина претърпява съществена конформационна промяна, когато се координира с Zn^{2+} , което позволява взаимодействието на специфични аминокиселинни остатъци от хормона със специфични остатъци от окситоциновия рецептор [54, 68]. Като преходен метал двувалентния цинков катион се характеризира с напълно изграден (запълнен с 10 електрона) предпоследен електронен слой d10. Тази електронна конфигурация му позволява да участва в координационни комплекси с четири, пет или шест лиганда във воден разтвор. Стабилната конфигурация за цинковия двувалентен катион е тетраедричната координационна геометрия само с четири лиганда, тъй като неговата електронна структура позволява да бъдат приети четири електронни двойки във свободните му $4s4p^3$ орбитали. За комплексите, в които металния йон е свързан с пет или шест лиганда, е установено експериментално, че от енергийна гледна точка са нестабилни във воден разтвор [126, 127]. Затова в настоящото изследване за изграждането на стабилен във воден разтвор комплекс между шесте лиганда, в случая кислородните атоми от гръбнака на окситоцина и двувалентния цинков йон е използван свързан подход. Този метод позволява поддържане на избраната координационна геометрия по време на молекулно-динамична симулация. В моделираната структура дължината на връзката между цинковия йон и всеки един от шесте кислородни атома е

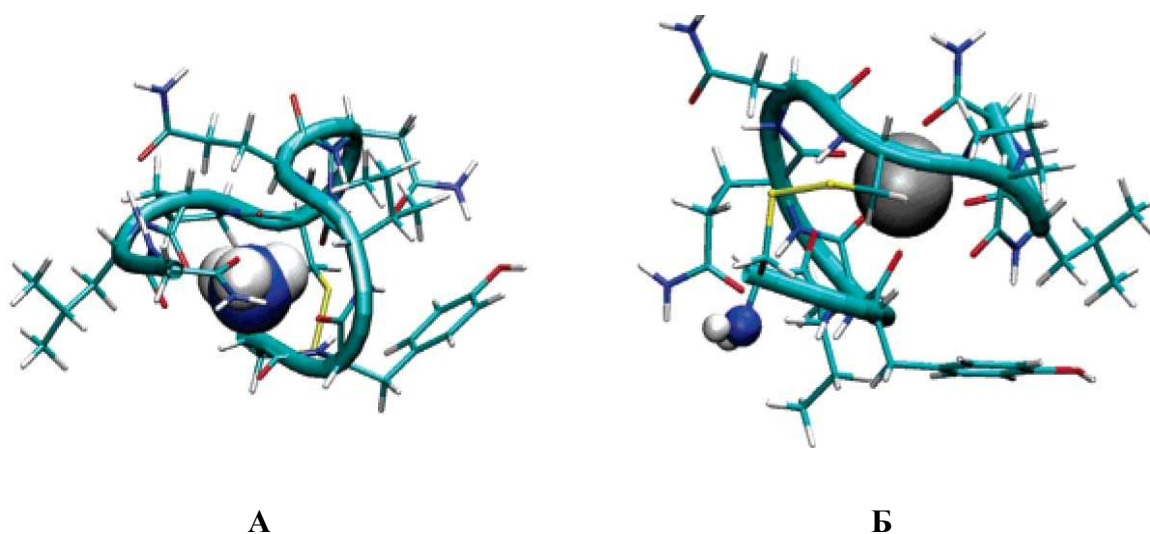
фиксирана на 2.12 Å. Изграденият модел на комплекса окситоцин - двувалентен цинк е представен на Фиг. 28.



Фигура 28. Модел на комплекса окситоцин - двувалентен цинк, получен чрез използване на ковалентни (artificial) връзки и Charmm 36 силово поле. Окситоцинът е изобразен в синьозелено, а цинковия йон - в сиво.

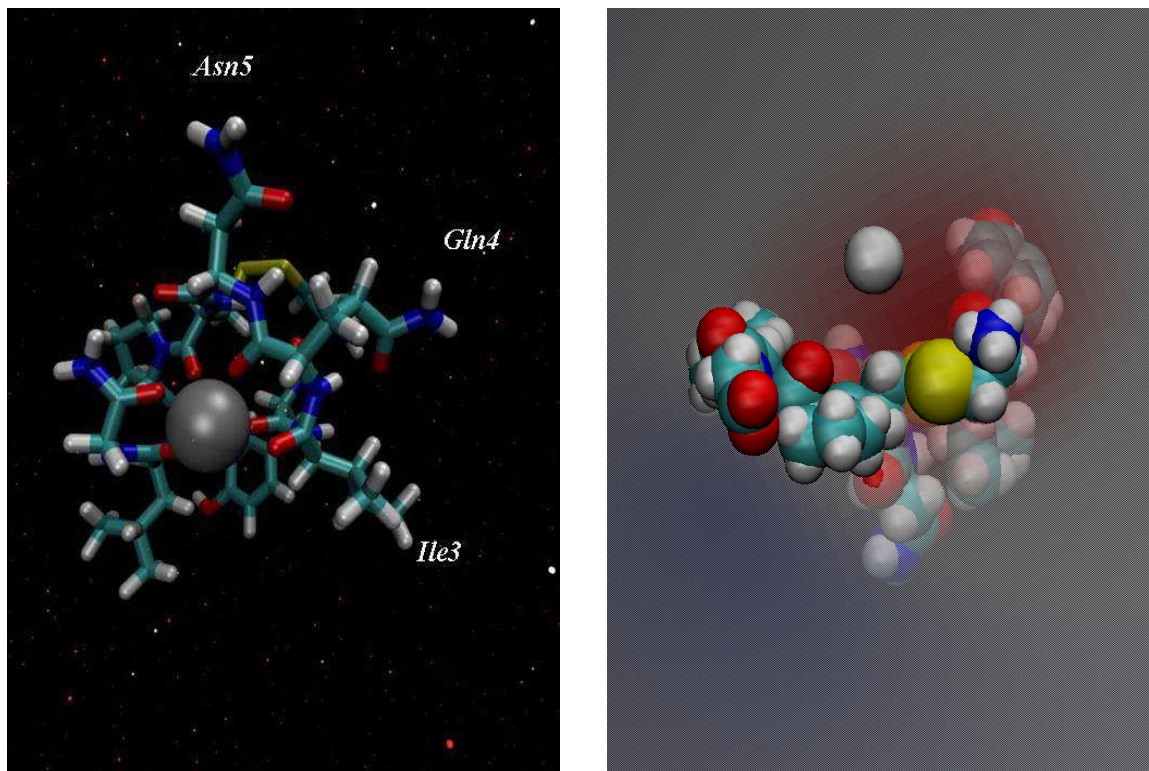
Полученият модел показва, че комплекса хормон - метален йон придобива форма на спирала, в която кислородните атоми на шест остатъка от гръбнака на окситоцина (Tyr2, Ile3, Gln4, Cys6, Leu8 и Gly9) солватират цинковия йон в октаедрична координационна геометрия, което се потвърждава и от други проведени експериментални и изчислителни изследвания [54]. По този начин цинковия йон е плътно вграден в молекулата на окситоцина. Освен това правилното нагъване на полипептидната верига, което в изградения модел е във вид на спирала, е основно условие за много пептиди, да бъдат активирани, за да могат да изпълнят физиологичните си функции в организма.

Естественото състояние на окситоцина в биологичните системи е неговата физиологично неактивна форма, която е протонирана $[OT + H]^+$, с аминогрупа на N-края насочена към вътрешността на молекулата на хормона. В присъствието на двувалентни цинкови йони във воден разтвор, обаче, състоянието на хормона се променя в следната форма $[OT + M]^{2+}$, която е физиологично активна. При тази форма аминогрупата на N-края е разположена откъм външната повърхност на молекулата на окситоцина, което позволява нейното успешно взаимодействие с киселинен остатък от окситоциновия рецептор (Фиг. 29) [54, 68].



Фигура 29. А/ Физиологично неактивна и Б/ физиологично активна форма на човешкия хормон окситоцин. Окситоцинът е изобразен в синьозелено, цинковия йон в сиво, а аминогрупата на N-края от молекулата на хормона е представена с тъмносиня сфера. Фигурата е използвана с леки промени от [54].

В изграденият модел на комплекса окситоцин - двувалентен цинк се наблюдава същата ориентация на аминогрупата на N-края, която е характерна за физиологично активната форма $[OT + M]^{2+}$ на хормона. Освен това, резултатите от моделирането, показват, че свързването на Zn^{2+} с окситоцина променя пространственото разположение на страничните вериги на Ile3, Gln4 и Asn5 в пептидната молекула, така че да се образува почти равнинна повърхност, подходяща за взаимодействие с рецептора (Фиг. 30 А). Тези наблюдения се потвърждават от изчислителните изследвания и на други изследователски групи [54].



А

Б

Фигура 30. А/Октаедрална ориентация на шесте кислородни атома от въглеводородния гръбнак на окситоциновата молекула около двувалентния цинков йон. Б/ Цинков йон в електричното поле, създадено от шесте кислородни атома от гръбнака на окситоциновата молекула. Окситоцинът е представен в синьозелено, цинковия йон в сиво, а кислородните атоми в червено.

От фиг. 30 А се вижда, че шесте кислородни атома, от гръбнака на хормона, са ориентирани към вътрешността на окситоциновата молекула, така че да могат да взаимодействат с двувалентния цинков йон. По този начин повърхността на комплекса $[OT + Zn]^{2+}$ става хидрофобна, което допринася за успешното му свързване към рецептора. Хидрофилната част на хормона е неговата трипептидна опашка (Pro7-Leu8-Gly9). Тъй като шесте кислородни атома, от карбонилните групи на пептида, са заредени, те генерират електрично поле с отрицателен заряд, за първоначалното свързване на Zn^{2+} с молекулата на окситоцина, както е показано на Фиг. 30 Б.

3.2. Стабилност на изградения комплекс окситоцин - двувалентен цинк във воден разтвор

3.2.1. Молекулна динамика

Стабилността на получената структура OT - Zn²⁺ във воден разтвор е изследвана с помощта на метода молекулна динамика. Молекулно - динамичните симулации са проведени със софтуерния пакет GROMACS 5.0.7 [128], като е използвано силовото поле CHARMM 36 [129]. Системата OT - Zn²⁺ е разтворена в кубична кутия с минимално разстояние между пептида и стените на кутията от 1.2 nm, а разтворителят е описан с модифициран TIP3P модел на водата [130]. Във всички посоки (x, y и z) са наложени периодични гранични условия. Процедурата по подготовката и провеждането на молекулната динамика включва първоначалното минимизиране на енергията на системата, нейното уравнивяване и самата компютърна симулация, която е с продължителност от 50 ns. С алгоритъма на най-бързото спускане е направено минимизиране на енергията от 10 000 стъпки. Симулациите за уравнивяване на системата (NVT и NPT ансамбъл) са проведени с продължителност от 0.5 ns. Дължината на всички химични връзки е фиксирана с алгоритъма LINCS [96]. Интеграторът на скачащата жаба е използван за пресмятането на уравненията за движение с времева стъпка от 2 fs. Поддържането на постоянна температура в системата от 310 K е осъществено с термостат v-rescale [98], а налягането е фиксирано на 1 atm и е поддържано с баростат на Паринело-Раман [99]. Електростатичните взаимодействия са изчислени с помощта на метода PME [93] с радиус на обрязване на директната сума от 12 Å. За пресмятането на Ван дер Ваалсовите взаимодействия е използвана функция за изглаждане [131], която се включва при радиус на обрязване от 10 Å и плавно се изключва, като нулира тези взаимодействия, при радиус от 12 Å. Подготвени са две системи, окситоцин с цинков йон и окситоцин без цинков йон, всяка от които е подложена на молекулно - динамична симулация с продължителност от 50 ns, като са зададени същите настройки на описаните параметри. Симулациите са проведени на клъстера BIOSIM към Физически факултет на Софийски университет "Св. Климент Охридски". BIOSIM представлява локален Linux клъстер, който включва: 24 процесора Intel Xeon E55402.53GHz и 8 процесора Intel Xeon E5-2620v22.10GHz с общо 288 нишки и 544 GB RAM, 4 графични ускорителя Tesla K20m и 8 TB дисково пространство.

3.2.2. Резултати

Конформационната стабилност на изградения модел на комплекса OT - Zn²⁺ във воден разтвор е проверена чрез провеждането на молекулно - динамична симулация с продължителност от 50 ns. За целта са подготвени две системи за изследване с молекулна динамика в разтвор - окситоцин без и окситоцин с цинков йон, за да бъде сравнена конформационната динамика на пептидния хормон и в двата случая. За анализ на получените от симулациите траектории са използвани част от програмите на софтуерния пакет GROMACS, с които са изчислени следните параметри: средното квадратично отклонение (RMSD), средната квадратична флукуация (RMSF), радиуса на въртене (Rg) и достъпната за разтворителя повърхност (SASA). Резултатите от пресмятанята са визуализирани с помощта на програмата Xmgrace [132] и софтуерния пакет VMD [120].

Промените в конформацията на пептидния хормон по време на двете симулации са проследени, чрез изчисляването на параметъра RMSD (root mean square deviation), с програмата *gmx rms* на GROMACS, като е измерено средното разстояние между координатите на атомите за всеки две времеви точки от траекторията:

$$(32) \quad \text{RMSD}(t) = \left(\frac{\mathbf{1}}{\mathbf{M}} \sum_{i=1}^N \mathbf{m}_i | \mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i^{\text{ref}} |^2 \right)^{1/2},$$

където $\mathbf{M} = \sum_{i=1}^N \mathbf{m}_i$,

$\mathbf{r}_i(t)$ е положението на атом i в момент t , а $\mathbf{r}_i^{\text{ref}}$ е референтната позиция на атом i .

За да се установи кои части от структурата на окситоцина по време на проведените симулации се колебаят най-много или най-малко около средната си позиция с програмата *gmx rmsf* на GROMACS е пресметнат параметъра RMSF (root mean square fluctuations):

$$(33) \quad \text{RMSF}_i = \left(\frac{\mathbf{1}}{\mathbf{T}} \sum_{t_j=1}^T | \mathbf{r}_i(t_j) - \mathbf{r}_i^{\text{ref}} |^2 \right)^{1/2},$$

където \mathbf{T} е времето за пресмятане на средната стойност, а $\mathbf{r}_i^{\text{ref}}$ е референтната позиция на аминокиселинния остатък i .

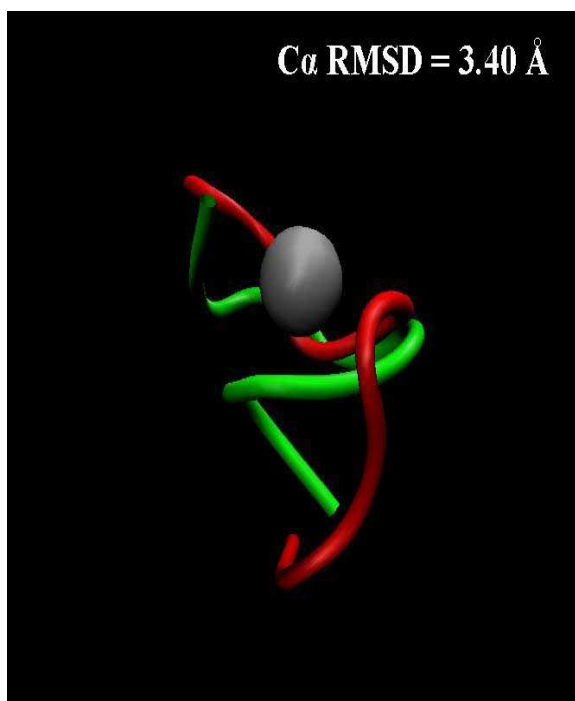
Компактността на окситоциновата молекула по време на двете симулации е определена с помощта на параметъра Rg (radius of gyration), който е пресметнат с програмата *gmx gyrate* на GROMACS по следната формула:

$$(34) \quad \mathbf{Rg} = \left(\frac{\sum_i |\mathbf{r}_i|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^2,$$

където m_i е масата на атом i , а \mathbf{r}_i е позицията на атом i спрямо центъра на масата на молекулата.

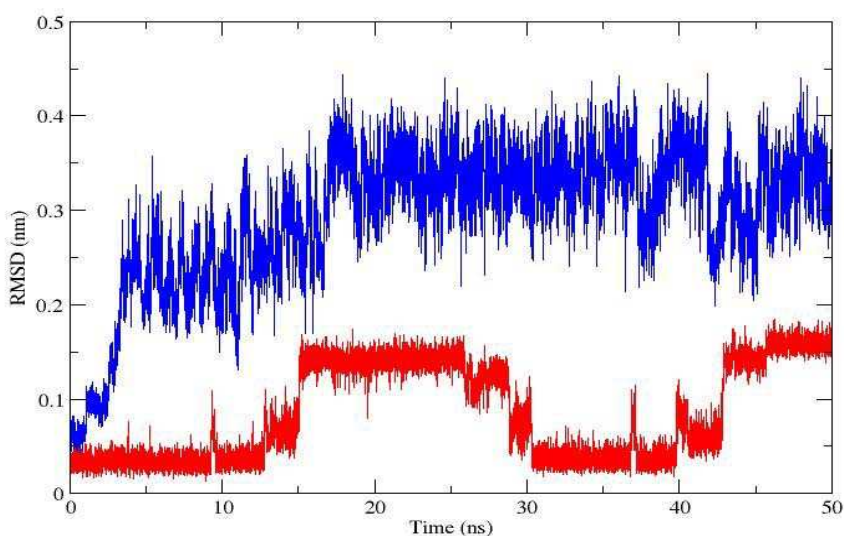
За изчисляването на достъпната до разтворителя повърхност от молекулата на хормона, по време на проведените симулации, е използван параметъра SASA (solvent accessible surface area), който е пресметнат с програмата *gmx sasa* на GROMACS.

Резултатите след анализа на траекториите показват, че средното квадратично отклонение (RMSD) на гръбнака на пептидният хормон без и с цинков йон е 3.40 Å (Фиг. 31).



Фигура 31. Сравнение по Ca RMSD стойност между модела на получения комплекс окситоцин - цинков йон (в зелено) и кристалографската структура на окситоцин - без цинков йон (в червено).

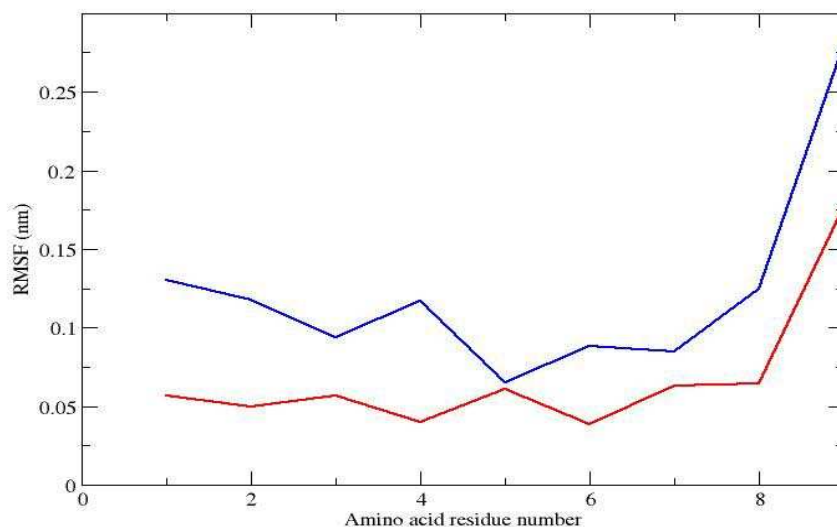
Голямата стойност на параметъра се дължи на промяната на конформацията на хормона, във вид на спирала, след свързването на цинковия йон към молекулата на окситоцина. Тази промяна в конформацията позволява, активирането на окситоцина чрез трансформация на пръстеновидната част на пептидния хормон в хидрофобно ядро, подходящо за взаимодействие с рецептора. На Фиг. 32 е показано отклонението в положението на C α атомите от гръбнака на пептидната молекула без и с цинков йон.



Фигура 32. RMSD на C α атомите на окситоцин без цинков йон (синя линия) и на комплекса окситоцин - цинков йон (червена линия) по време на проведените молекулно - динамични симулации.

От графиката се вижда, че за окситоцина без метален йон е характерна по-голяма стойност на RMSD, което означава, че той е с по-подвижна структура, в сравнение с тази на окситоцина с цинков йон. Това показва, че свързването на цинковия йон предизвиква значителни структурни промени в гръбнака на пептида, което води до неговото стабилизиране във воден разтвор.

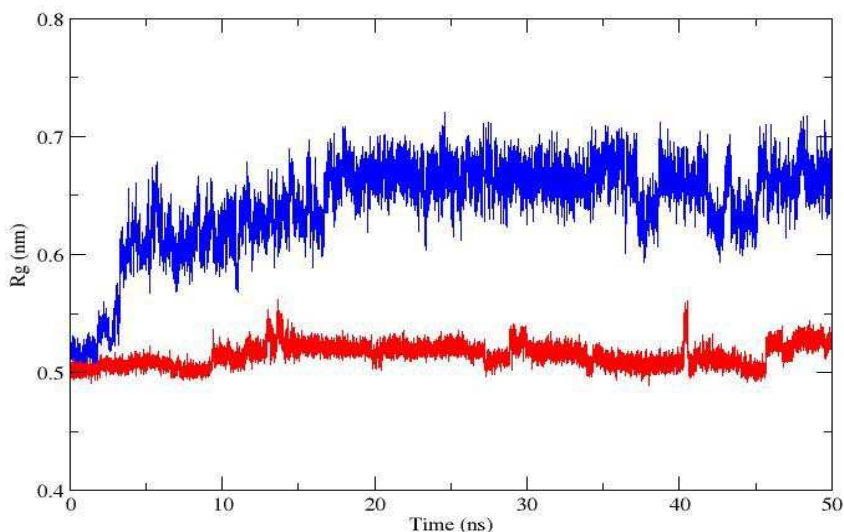
За изследването на ригидността на изградения комплекс, окситоцин - двувалентен цинк, са проследени средните квадратични колебания RMSF на аминокиселинните остатъци от молекулата на хормона и в двата случая - без и с цинков йон. Резултатите са представени на Фиг. 33.



Фигура 33. RMSF на аминокиселинните остатъци на окситоцин без цинков йон (синя линия) и на комплекса окситоцин - цинков йон (червена линия) по време на проведените молекулно - динамични симулации.

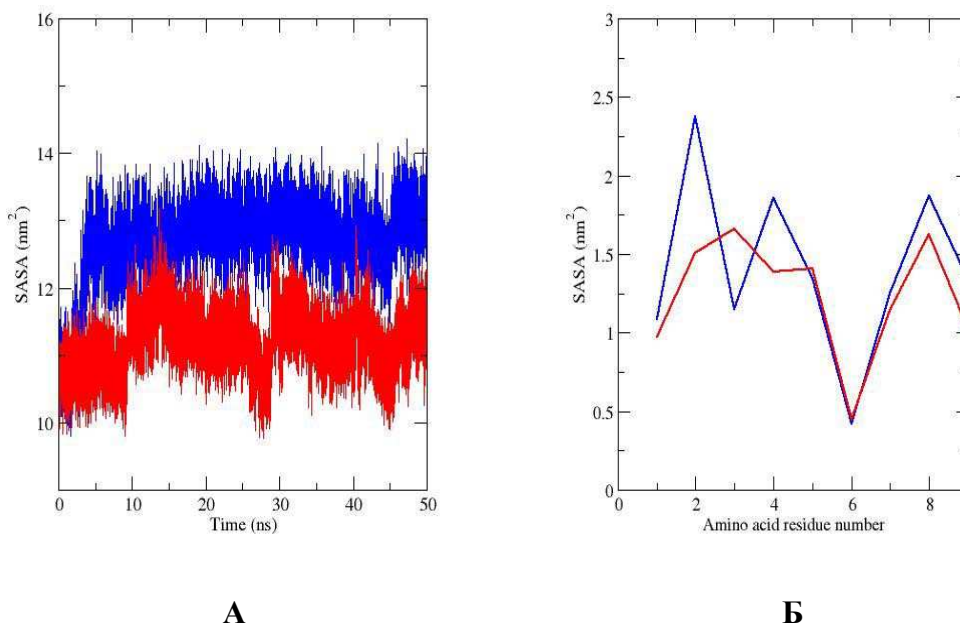
Анализът на данните от графиката на Фиг. 33 показва, че координирания с цинк пептид е по-стабилен, с най-малко колебания, в сравнение със структурата на пептида без цинков йон, който се характеризира с повече колебания в остатъците. Тези наблюдения са доказателство за стабилизирането на пространствената структура на хормона под влиянието на двувалентния цинков йон. Получените резултати потвърждават и по-слабата подвижност на аминокиселинните остатъци Tyr2, Ile3, Gln4, Cys6, Leu8 и Gly9 от комплекса окситоцин - двувалентен цинк в сравнение със структурата на хормона без метален йон. От тези шест остатъка най-подвижен е Gly9 и за двете сравнени структури на окситоцина (Фиг. 33).

Стабилизацията на по-компактната конформация на пептида, която е тази, свързана с двувалентния цинков йон, може да се види и от радиуса на въртене R_g , който е представен на Фиг. 34. Графиката от Фиг. 34 показва, че пептида без цинков йон се характеризира с по-отворена конформация.



Фигура 34. Радиус на въртене (R_g) на молекулата на окситоцина без цинков йон (синя линия) и на комплекса окситоцин - цинков йон (червена линия) по време на проведените молекулно - динамични симулации.

Подобно поведение на молекулата на окситоцина, като описаното при радиуса на въртене, се наблюдава и при оценката на общата повърхност на хормона достъпна до разтворителя (SASA). Параметърът SASA обикновено се използва като мярка за свободната енергия на разтваряне на полярни и неполярни групи в пептидите. Получените резултати, които са представени на Фиг. 35 А, показват, че зоната достъпна за водните молекули при комплекса окситоцин - цинков йон намалява, докато при молекулата на хормона с липсващ цинков йон достъпната до разтворителя повърхност се увеличава. Както се вижда от графиката, показана на Фиг. 35 Б, параметъра SASA е с по-ниска стойност за аминокиселинните остатъци в позиция 1, 2, 4, 6, 7, 8 и 9 (с изключение на Pe_3 , където е с по-висока стойност) при комплекса окситоцин - двувалентен цинк и с по-висока стойност за остатъците в позиции 1, 2, 4, 7, 8 и 9 (с изключение на Pe_3 - ниска стойност) при молекулата на окситоцина без метален йон. Оцененият параметър е с еднаква стойност само за аминокиселинния остатък Cys6 и в двете изследвани с молекулна динамика системи.



Фигура 35. А/ SASA и Б/ SASA на аминокиселинните остатъци на молекулата на окситоцина без цинков йон (синя линия) и на комплекса окситоцин - цинков йон (червена линия) по време на проведените молекулно - динамични симулации.

Като обобщение, може да се каже, че получените резултати потвърждават конформационната стабилност на изградения модел на комплекса окситоцин - двувалентен цинк във воден разтвор.

Глава 4

Изграждане на 3D структура на човешки окситоцинов рецептор чрез хомоложно моделиране

Хормонът окситоцин осъществява биологичните си функции в организма с помощта на специфичен окситоцинов рецептор [3, 4] (виж 1.2.1.). За да се създаде молекула, която да действа успешно върху таргетния рецептор, е необходимо да се познава пространствената структура на рецептора. За съжаление, обаче, 3D структурата на окситоциновия рецептор е неизвестна, тъй като е мембранен протеин, който е труден за кристализиране. Затова целта на настоящото изследване беше да се изгради триизмерен модел на окситоциновия рецептор с помощта на метода хомоложно моделиране.

4.1. *In silico* модел на пространствената структура на рецептора

4.1.1. Хомоложно моделиране

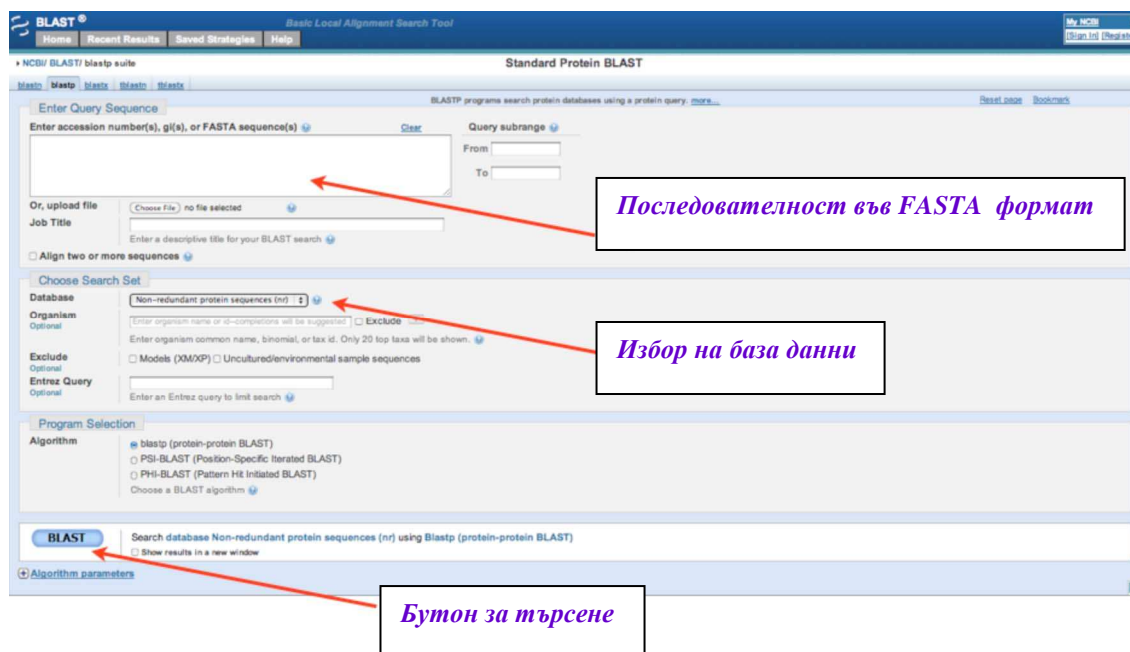
За изграждането на компютърен модел на човешкия окситоцинов рецептор е използвана неговата първична аминокиселинна последователност, която е свалена от базата данни NCBI [109, 133] във FASTA формат (Фиг. 36):

```
>gi|32307152|ref|NP_000907.2| oxytocin receptor [Homo sapiens]  
MEGALAAANWSAEAAANASAAPPGAEGNRTAGPPRRNEALARVEVAVLCLILLLALSGNACVLLALRTRQKHSRL  
FFFMKHLADIADLVVAVFQVLPQLLWDITFRFYGPDLLCRLVKYLQVVGMFASYLLLLMSLDRCLAICQPLRSL
```

```
RRRTDRLAVLATWLGCLVASAPQVHIFSLREVADGVFDCWAVFIQPWGPKAYITWITLAVYIVPVIVLAACYGLI
SFKIWQNLRLKTAATAAAAAEAPEGAAAGDGGRVALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIVLAFIVCWTPFFFVQMW
SVWDANAPKEASAFIIVMLLASLNSCCNPWIYMLFTGHLFHVELVQRFLCCSASYLKGRRRLGETSASKKSNSSSFV
LSHRSSSQRSCSQPSTA
```

Фигура 36. Първична аминокиселинна последователност на окситоциновия рецептор във FASTA формат. Първият ред след символа ">" в този формат е коментар, който предоставя информация за последователността, а останалите редове са самата аминокиселинна последователност на рецептора, която е представена като еднобуквен код.

След това с помощта на сървъра NCBI-Protein BLAST (Фиг. 37) [108, 134] е намерен най-близкия хомолог с известна 3D структура (темплейт) на свалената целева последователност на окситоциновия рецептор (таргет), състояща се от 389 аминокиселинни остатъка. По време на търсенето на този хомолог, определените като най-подходящи последователности за темплейти според BLAST, въз основа на оптимизираната E - стойност, са подложени на *multiple sequence alignment*. За избора на най-доброто подравняване, сред всички възможни, са използвани реципрочното разположение на консервативните аминокиселинни остатъци в таргета и темплейтите, както и оценката за всяко едно от проведените подравнявания.



Фигура 37. Интерфейс на сървъра NCBI-Protein BLAST. Фигурата е от [134].

Избраният с помощта на BLAST най-близък хомолог на окситоциновия рецептор, в случая говежди родопсин с PDB ID 1JFP [95, 135], е подложен на повторно подравняване с целевата аминокиселинна последователност на рецептора, което е проведено със софтуерния пакет Modeller [113, 136]. Подравняването е осъществено с функцията *align2d* () на Modeller, която използва алгоритъм за динамично програмиране. Алгоритъмът работи въз основа на информация от структурата на темплейта, с което се различава от стандартните методи за подравняване на последователности. Същността му се изразява в това, че използва наказателна функция (*gap penalty function*) [137], която поставя празни места не между две позиции, които са разположени близо една до друга в пространството, а в изложените на разтворител и извити области от последователността, които се намират извън участъците с вторична структура. По този начин, функцията коригира резултатите от подравняването, като намалява грешките с една трета, спрямо тези които възникват при стандартните техники. Изпълнението на *align2d* () на Modeller е осъществено чрез стартирането на скрипта "*align2d.py*" (Фиг. 38), написан на програмния език Python:

```

from modeller import *
env = environ()
aln = alignment(env)
mdl = model(env, file='tseq', model_segment=('FIRST:A','LAST:A'))
aln.append_model(mdl, align_codes='tseq', atom_files='tseq.pdb')
aln.append(file='qseq.ali', align_codes='qseq')
aln.align2d()
aln.write(file='qseq-tseq.ali', alignment_format='PIR')
aln.write(file='qseq-tseq.pap', alignment_format='PAP')

```

Фигура 38. Скрипт *align2d.py*, написан на програмния език Python. Последователността на темплейта е означена с "*tseq*", а тази на окситоциновия рецептор с "*qseq*".

Скриптът започва със създаване на обект "environ", който е необходим като вход за по-нататъшни команди. Следва задаване на празно подравняване "aln", както и на нов модел на протеин "mdl", в който да се прочете верига А от структурния файл на темплейта - "*tseq*". С помощта на командата "append_model ()" последователността на модела на темплейта, която е в pdb формат, е прехвърлена за подравняване, като и е

присвоено име "tseq" с "align_codes". С командата "append ()" към подравняването е добавена и аминокиселинната последователност на таргета (окситоциновия рецептор) - "qseq", след което е извикана функцията "align2d()", която извършва сравняването на двете последователности. Резултатът от подравняването е записан в два формата - PIR ("qseq-tseq.ali") и PAP ("qseq-tseq.pap"). Форматът PIR е използван по-нататък от Modeller за моделиране на търсения рецептор, докато формата PAP служи за визуализиране на подравняването.

Следващата стъпка в хомоложното моделиране е изграждането на 3D модел на таргетния (окситоцинов) рецептор, което е осъществено напълно автоматично с помощта на класа *automodel* на Modeller. Процесът започва със стартирането на скрипта "model.py" (Фиг. 39), написан на програмния език Python:

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *
#from modeller import soap_protein_od
env = environ()
a = automodel(env, alnfile='qseq-tseq.ali',
              knowns='tseq', sequence='qseq',
              assess_methods=(assess.DOPE,
                              #soap_protein_od.Scorer(),
                              assess.GA341))

a.starting_model = 1
a.ending_model = 5
a.make()
```

Фигура 39. Скрипт *model.py*, написан на програмния език Python. Последователността на темплейта е означена с "tseq", а тази на окситоциновия рецептор с "qseq".

Първоначално скриптът зарежда класа *automodel*. Следва създаване на обект, наречен "a", който принадлежи към класа *automodel* и задаване на параметри, които да управляват процеса за изграждане на модел. Такива параметри са: името на файла, съдържащ двете подравнени последователности (темплейт и таргет) в PIR формат, което е посочено с "alnfile"; името на известната 3D структура на темплейта в "alnfile", което е определено с "knowns", както и името на таргетната последователност в "alnfile", зададено със "sequence". Към параметрите се отнасят и

методите за оценка на конструирания/те модел/и, които са зададени с "assess_methods", а също и "starting_model" и "ending_model", определящи броя на моделите за пресмятане. Накрая скрипта завършва с извикването на метода "make()", който изчислява моделите. За оценка на създадените 3D структури на окситоциновия рецептор е използвана дискретната оптимизирана протеинова енергия - DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) [110], както и молекулната функция (molpdf) на Modeller [113]. Координатите на моделите са записани в pdb файлове.

Най-добрият от конструираните модели е избран въз основа на най-ниската стойност за молекулната функция (molpdf) на Modeller или на оценката DOPE. Тъй като потенциала DOPE е сума от взаимодействията между двойки атоми, той може да бъде разложен за оценка на всеки аминокиселинен остатък. Така полученият енергиен профил е полезен за откриването на локални области с висока псевдоенергия, които обикновено съответстват на грешки в модела. Енергийният профил на модела, с най-добър DOPE резултат, е генериран чрез стартирането на скрипта "make_energy_profile.py" (Фиг. 40), написан на програмния език Python:

```
-----
from modeller import *
from modeller.scripts import complete_pdb
log.verbose()      # request verbose output
env = environ()
env.libs.topology.read(file='${LIB}/top_heav.lib') # read topology
env.libs.parameters.read(file='${LIB}/par.lib') # read parameters
# read model file
mdl = complete_pdb(env, 'qseq1.B99990004.pdb')

# Assess with DOPE:
s = selection(mdl) # all atom selection
s.assess_dope(output='ENERGY_PROFILE_NO_REPORT', file='qseq1.profile',
              normalize_profile=True, smoothing_window=15)
-----
```

Фигура 40. Скрипт *make_energy_profile.py*, написан на програмния език Python. Последователността на избраният като най-добър модел на окситоциновия рецептор е означена с "qseq1".

За да бъде прочетен и подготвен `pdb` файла на избраният модел на окситоциновия рецептор за енергийни изчисления, в скрипта "`make_energy_profile.py`", е използван скрипта на Modeller "`complete_pdb`". По този начин е допусната възможността в `pdb` файла на модела да има атоми в нестандартен ред или да има различни подмножества от атоми, като всички атоми, включително и водородни атоми. Поради факта, че повечето енергийни функции на Modeller работят върху подмножество от моделни атоми, в скрипта "`make_energy_profile.py`", е създадена селекция от всички атоми (`# all atom selection`). След това с командата "`assess_dope`" е изчислена енергията на DOPE, като допълнително е изискан енергиен профил, изгледен над прозорец от 15 остатъка и нормализиран от броя на ограниченията, които действат върху всеки остатък. Полученият енергиен профил е записан във файла "`qseq1.profile`" и е визуализиран с графичната програма GNUPLOT [138]. Финалният 3D модел на окситоциновия рецептор е оценен и с други софтуерни продукти, освен с Modeller.

4.1.2. Резултати

Пространствената структура на човешкия окситоцинов рецептор, която не е известна, е изградена с метода на хомоложното моделиране. За да бъдат определени аминокиселинните остатъци, които участват във формирането на седемте трансмембранни спирали на търсения рецептор, неговата последователност е подравнена с тази на най-добрия темплейт - говежди родопсин с PDB ID 1JFP. Степента на сходство между последователностите на двете структури (целевия протеин и темплейта) е важна за точността на прогнозите чрез сравнително моделиране. В настоящото изследване оценката за подравняването е 74.3 бита, обхвата на търсене е 83%, а секвенционната идентичност между двете сравнявани последователности е 22% (получена с помощта на програмата BLAST) [108]. Повторно подравняване на последователностите на целевия протеин (окситоцинов рецептор) и темплейта (говежди родопсин), е проведено и със софтуерния пакет Modeller (Фиг. 41), като в този случай идентичността в проценти е 27%. За семейството на GPCRs, към което принадлежи и окситоциновия рецептор, е характерно, че притежават сходни мотиви [3], каквито са извънклетъчния дисулфиден мост между TM3 и EL2 (Asn1.50, Asp2.50); мотива E/DRY (Asp/Glu3.49, Arg3.50 и Tyr3.51); Trp4.50; двата пролинови остатъка Pro5.50 и Pro6.50, както и мотива NPXXY (Asn7.49, Pro7.50 и Tyr7.53), който е разположен в TM7. Именно затова, подравняването между двете последователности е ръководено от силно

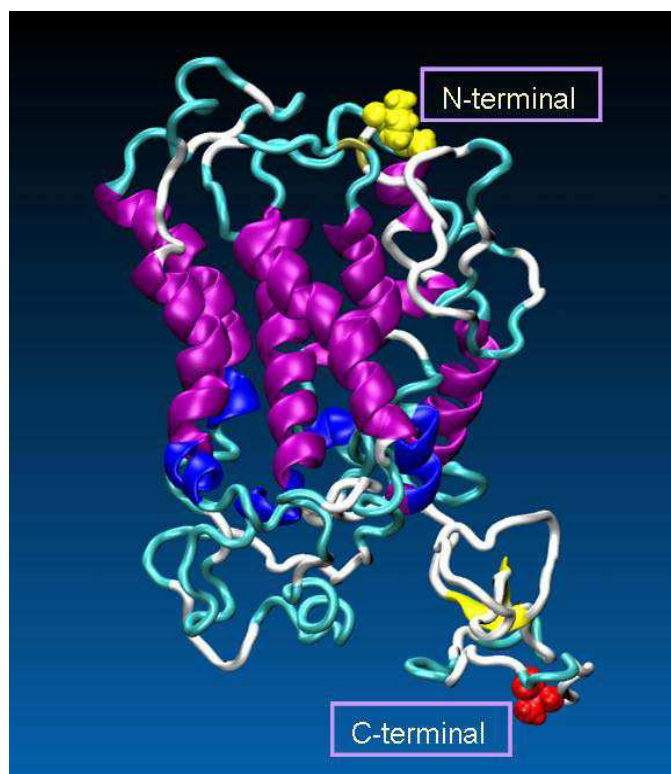
запазените аминокиселинни остатъци в тези мотиви, тъй като те са свързани с участъци от окситоциновия рецептор, които определят неговата структура или функции.



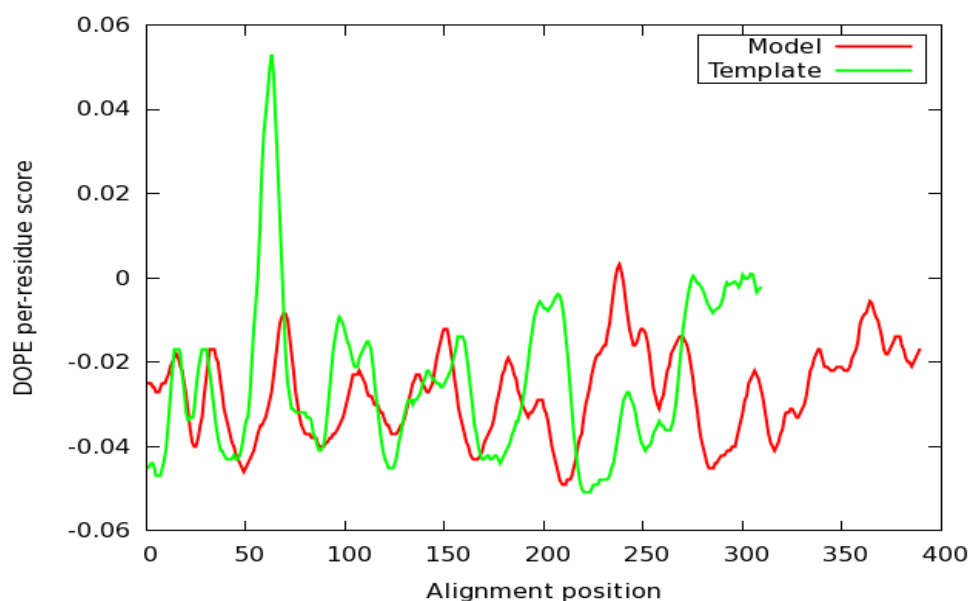
Фигура 41. Подравняване на аминокиселинните последователности на човешкия окситоцинов рецептор (таргет) и говеждия родопсинов рецептор (PDB 1JFP).

Подравняването между таргета и темплейта е проведено за втори път и с Modeller, защото наказателната функция [137], която използва този софтуер, намалява грешките при сравняването с една трета, спрямо тези които възникват при стандартните техники, като BLAST. Така с идентичност между двете последователности от 27%, с помощта на Modeller, са изградени пет 3D модела на окситоциновия рецептор. Като най-добър модел, от генерираните, е определена структурата с най-ниската стойност на молекулната функция (molpdf) на Modeller (5399) и на DOPE резултата (-33055), както и с най-малък брой на нарушения на наложените ограничения (Фиг. 42).

Първоначално, конструираният модел на окситоциновия рецептор, е оценен с функцията за оценка на DOPE, която е имплементирана в Modeller, чрез сравняване на енергийните профили на модела и темплейта (Фиг. 43). Големият пик, който се наблюдава, в профила на темплейта, в областта при позиция 70, най-вероятно се дължи на активен център. Следователно, евентуална грешка, посочена от функцията за оценка на Modeller, не е непременно реална.



Фигура 42. 3D модел на човешкия окситоцинов рецептор, генериран с Modeller. Вторичните структури на рецептора са оцветени, както следва: α -спирала (лилаво), 3-10-спирала (синьо), β -структура (жълто), извивка (синьозелено), намотка (бяло). С Ван дер Ваалсови сфери са представени N- (в жълто) и C-крайната част (в червено) на полипептидната верига на рецептора.



Фигура 43. Оценка на модела на окситоциновия рецептор с DOPE.

Степента на идентичност между последователностите на таргета и темплейта, обаче, не е единствения критерий за оценка на качеството на модела. Изборът на шаблон, с достатъчно добра разделителна способност по време на хомоложното моделиране, също оказва влияние върху качеството на изградения модел. Количествена мярка за подравняването е средното квадратично отклонение (RMSD) между двете структури (виж 2.2.4., формула 29). Подравняването е добро при $\text{RMSD} < 2\text{\AA}$. Разделителната способност на използваната структура за темплейт (говежди родопсин с PDB ID 1JFP) в настоящото изследване е 1.0\AA . Поради тази добра резолюция, създаденият модел на окситоциновия рецептор е в отлично съответствие с експериментално определената 3D структура на шаблона, което се вижда от $\text{C}\alpha$ RMSD между двете структури, което е само 1.05\AA (Фиг. 44).



Фигура 44. Сравнение по $\text{C}\alpha$ RMSD стойност между модела на човешкия окситоцинов рецептор (в синьозелено) и кристалографската структура на говежди родопсин (в червено). N- и C-крайните части на двата рецептора са отбелязани в жълто.

4.2. Изграждане на модел на мембраната на матката

4.2.1. Молекулно моделиране

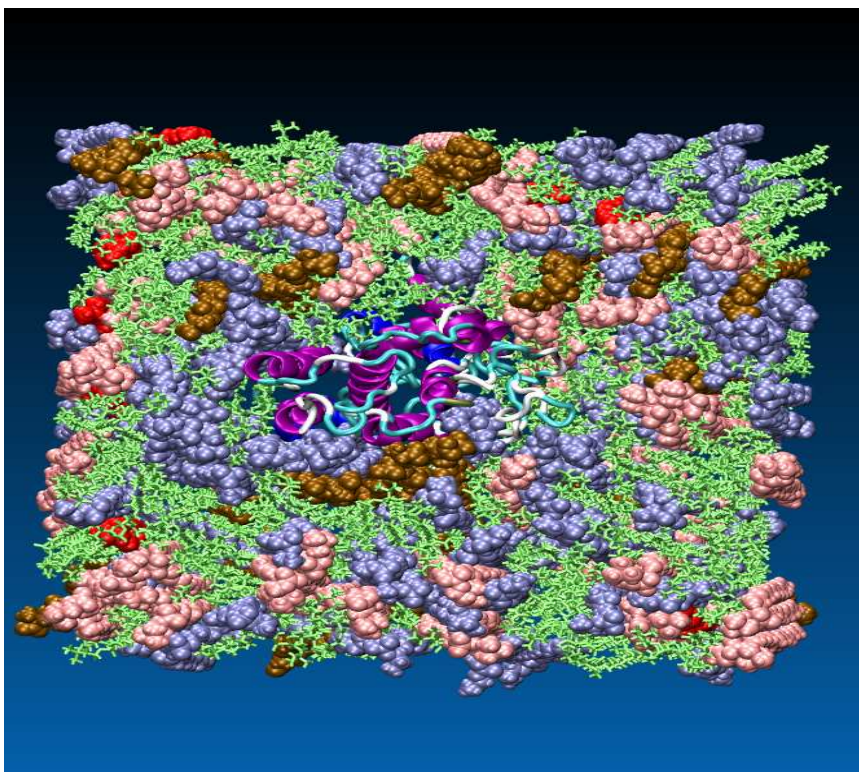
За изследване на динамиката на окситоциновия рецептор, като трансмембранен протеин, е необходимо той да бъде разгледан в комплекс с неговата мембрана. За тази цел е изграден двуслоен мембранен модел на гладката мускулатура на матката, състоящ се от 5 различни вида фосфолипиди [139]. Моделът е създаден с помощта на инструмента Membrane Builder, който е част от уеб-базирания графичен потребителски интерфейс CHARMM GUI [140, 141, 142].

Конструирането на системата рецептор - мембрана е осъществено по следната процедура. Генерираният с Modeller модел на окситоциновия рецептор (виж 4.1.2.) е оптимално разположен и ориентиран по протежението на Z-оста на мембраната. След това трансмембраният протеин е разтворен в правоъгълна кутия с липиден бислой, съставен от: фосфатидилхолин 50.3%, фосфатидил етаноламин 24.8%, сфингомиелин 13.8%, фосфатидилсерин 6.4% и холестерол 2%. Липидният бислой е разположен около протеина с метода на заместване [142, 143], който използва липидоподобни псевдоатоми за генерирането на липидна обвивка, след което замества тези псевдоатоми с липидни молекули. Следва генерирането и добавянето на водните молекули, а също и на йоните, необходими за неутрализирането на изградената система. С метода на Монте Карло са поставени 59 Na⁺ и 54 Cl⁻. В предпоследната стъпка всички компоненти на системата, като окситоцинов рецептор, липиден бислой, водни молекули и йони са събрани заедно, според зададените за тях преди това параметри. Последната стъпка от процедурата е свързана с генерирането от Membrane Builder на CHARMM GUI на входни файлове за уравнивяването [140] на системата рецептор - мембрана, както и за провеждането на самата компютърна симулация.

4.2.2. Резултати

Тъй като конформационната стабилност на GPCRs, като мембранни протеини, зависи силно от естествената им среда - липидния бислой [144], за да бъде изследван коректно механизма на свързване на хормона окситоцин с неговия рецептор, е конструиран мембранен модел на гладката мускулатура на матката. Мембраният модел е изграден от фосфатидилхолин 50.3%, фосфатидил етаноламин 24.8%,

сфингомиелин 13.8%, фосфатидилсерин 6.4% и холестерол 2% и е представен на Фиг. 45.



Фигура 45. Модел на мембраната на гладката мускулатура на матката със следния фосфолипиден състав: фосфатидилхолин 50.3% (в зелено), фосфатидил етаноламин 24.8% (в синьо), сфингомиелин 13.8% (в розово), фосфатидилсерин 6.4% (в охра) и холестерол 2% (в червено).

4.3. Молекулна динамика на системата рецептор - мембрана

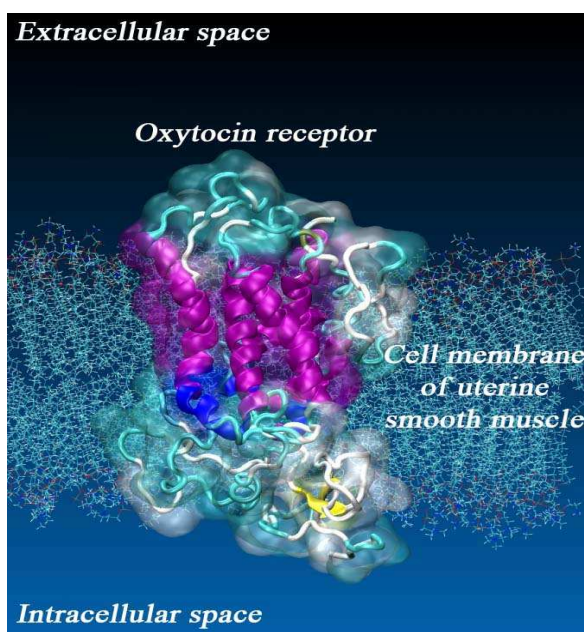
4.3.1. Молекулна динамика

Енергията на изграденият модел на окситоциновия рецептор е минимизирана, с цел проверка на неговата стабилност и подобряване на структурата му, с помощта на алгоритъма на най-бързото спускане. След това системата рецептор - мембрана е подложена на молекулно-динамична симулация. Процесът по подготовката и провеждането на молекулната динамика включва, уравнивяване на системата за 375 ps и самата компютърна симулация, която е с продължителност от 300 ns. Моделната система рецептор - мембрана е симулирана със софтуерния пакет GROMACS 5.0.7

[128], като е използвано силовото поле CHARMM 36 [129]. За пресмятането на уравненията за движение е използван интегратора на скачащата жаба с времева стъпка от 2 fs. Дължината на всички химични връзки е фиксирана с алгоритъма LINCS [96]. Радиусът на обрязване на директната сума, за електростатичните взаимодействия, които са изчислени с метода PME [93], е зададен на 12 Å. За описване на разтворителя е използван модифициран TIP3P модел на водата [130]. Във всички посоки (x, y и z) са наложени периодични гранични условия. Поддържането на постоянна температура в системата от 310 K и постоянно налягане от 1 atm е осъществено съответно с термостат v-rescale [98] и с баростат на Паринело-Раман [99]. Ван дер Ваалсовите взаимодействия са пресметнати с помощта на функция за изглаждане [131], която се включва при радиус на обрязване от 10 Å и плавно се изключва, като нулира тези взаимодействия, при радиус от 12 Å. Симулациите са направени на клъстера BIOSIM към Физически факултет на Софийски университет "Св. Климент Охридски".

4.3.2. Резултати

Проведената молекулно-динамична симулация на системата рецептор - мембрана е използвана, както като референтна (виж 5.3.1., 5.3.3.), така и за усъвършенстване на моделната система, като по време на този процес са релаксирани и остатъците от мембраната и разтворителя, които образуват интерфейса между рецепторния модел и липидно-водната среда. Комплексът рецептор - мембрана е представен на Фиг. 46.



Фигура 46. Система окситоцинов рецептор - мембрана.

Глава 5

Изследване на взаимодействието между пептидния хормон окситоцин и неговия рецептор с молекулна динамика

Ключов фактор, който контролира свързването на лигандите в биомолекулните системи, е правилната конформация на лиганда и на неговия клетъчен рецептор. Взаимодействието между окситоциновия рецептор и природния му лиганд окситоцин, медирано от метални йони като кофактор, не е добре изучено на молекулно ниво, тъй като конформацията на двете структури е неизвестна [34, 68] (виж 1.2.1., 1.2.2., 1.5.). Затова въз основа на налични експериментални данни е изграден компютърен модел на хормон-рецепторния комплекс, за да се изследва механизма на свързване между двете молекули, с помощта на метода молекулна динамика. Целта на настоящото изследване беше да се определят местата на свързване в хормон - рецепторния комплекс, както и конформационните промени, предизвикани от свързването на лиганда (окситоцин). Получените резултати ще позволят, проектирането на по-ефективни и селективни антагонисти на окситоциновия рецептор, с възможно приложение за предотвратяване на преждевременно раждане.

5.1. Моделиране на системата рецептор-мембрана-окситоцин

5.1.1. Изграждане на хормон - рецепторен комплекс

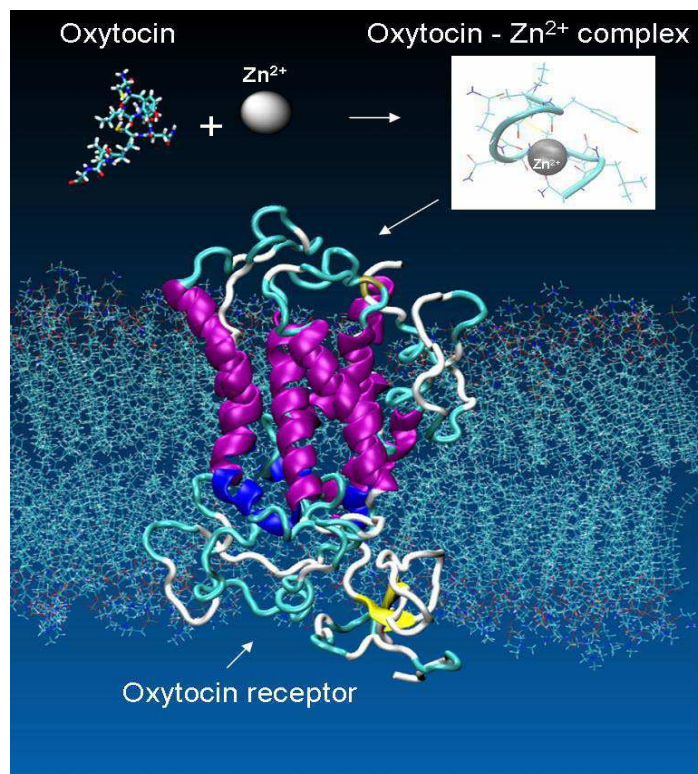
Установено е, че присъствието на двувалентни метални йони, като Zn^{2+} или Cu^{2+} , играе съществена роля в специфичното свързване на пептидния хормон окситоцин с неговия рецептор. Все още не е изяснено, обаче, дали металните йони, взаимодействат предимно с рецептора, с хормона или и с двата участника в процеса [81]. Тъй като

рецепторните структури са трудни за изследване в тяхната естествена липидна среда, молекулния механизъм на взаимодействието им с металните йони остава не добре проучен. За разлика от това, данни от проведени експериментални и теоретични изследвания, показват, че окситоциновата молекула, претърпява значителни конформационни промени при свързването си с Zn^{2+} [84, 145, 146]. В присъствието на Zn^{2+} , страничните вериги на аминокиселинните остатъци на Pe3, Gln4 и Asn5 в пептидния хормон, се подреждат така, че да образуват почти равнинна повърхност, подходяща за взаимодействие с рецептора (виж 3.1.2., Фиг. 30 А). Именно тези промени в молекулата на хормона позволяват свързването на специфични остатъци в окситоцина със специфични остатъци в неговия рецептор.

Въпреки данните от проведени до този момент експериментални и теоретични изследвания, няма налична кристалографска структура за окситоцин в комплекс с метален йон. Затова, за да се изясни ролята на двувалентните йони в хормон - рецепторното взаимодействие, в предходно изследване от тази дисертация е изграден модел на такъв комплекс (виж 3.1.1., 3.1.2., Фиг. 28). А стабилността на създадената структура OT - Zn^{2+} във воден разтвор е потвърдена с молекулно-динамични симулации (виж 3.2.1., 3.2.2.). В получения комплекс OT - Zn^{2+} се наблюдава, че двувалентния цинков йон образува почти съвършен октаедър, заедно с кислородните атоми на шест остатъка Tyr2, Pe3, Gln4, Cys6, Leu8 и Gly9 от гръбнака на окситоцина (Фиг. 47). Тези наблюдения са потвърдени и от изследванията на други групи [54].

Експериментални данни показват, че аминокиселинни остатъци, разположени в трансмембранните домени, както и в извънклетъчните извивки на рецептора, участват в свързването на пептиди, като окситоцин и аргинин вазопресин. Установено е, че аминокиселината Val115 (спирала 3) е изключително важна за селективността на лигандите. А пък консервативните Gln остатъци в трансмембранните спирали 3 и 6 създават общ агонист-свързващ джоб за различните видове рецептори от семейството на родопсина [1] (виж 1.2.5., Фиг. 12).

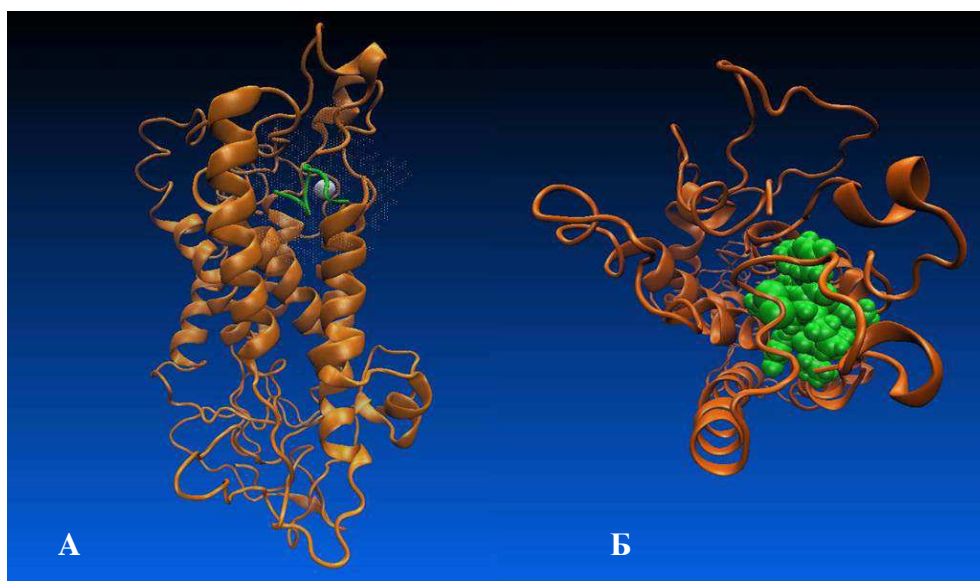
Комплексът окситоцин - цинков йон е позициониран чрез докинг с VMD [120] (приставка VsLab [119]), в трансмембранната част на рецептора, имайки предвид експериментално известните му места на свързване. За определянето на най-добрата ориентация на лиганда (комплекса окситоцин - цинков йон), в активния център на окситоциновия рецептор, е използван генетичения алгоритъм на програмата AutoDock [118], която е включена като приставка, наречена vsLab (virtual screening lab) във VMD.



Фигура 47. Металните йони като медиатор за специфичното свързване на окситоцина с неговия рецептор.

5.1.2. Резултати

Изграденият хормон - рецепторен комплекс е представен на Фиг. 48.



Фигура 48. Окситоцин в активния център на рецептора: **А/** изглед от страни и **Б/** изглед отгоре.

5.2. Места на свързване в комплекса хормон - рецептор

5.2.1. Молекулна динамика

Конструираната система рецептор - мембрана - окситоцин, съдържаща около 137 000 атома, е подложена на минимизиране на енергията и е уравновесена, след което със системата е проведена молекулно - динамична симулация с продължителност от 100 ns. Минимизирането на енергията е осъществено с алгоритъма на най-бързото спускане, който е използван в комбинация с метода на спрегнатите градиенти. Уравновесяването на системата (NVT и NPT ансамбъл) е проведено с продължителност от 0.5 ns, като по време на уравновесяването в NPT ансамбъла е релаксирана структурата на хормон - рецепторния комплекс. Симулациите са направени със софтуерния пакет GROMACS 5.0.7 [128], като е използвано силовото поле CHARMM 36 [129]. Във всички посоки (x, y и z) са наложени периодични гранични условия, а разтворителя е описан с модифициран TIP3P модел на водата [130]. Алгоритъмът LINCS [96] е използван за ограничаване на дължината на всички химични връзки. Температурата в системата е поддържана постоянна на 310 K с термостат v-rescale [98], а налягането е фиксирано на 1 atm и е поддържано с баростат на Паринело-Раман [99]. За пресмятането на уравненията за движение, с времева стъпка от 2 fs, е използван интегратора на скачащата жаба. Електростатичните взаимодействия са изчислени с метода PME [93] при зададен радиус на обрязване на директната сума от 12 Å. Ван дер Ваалсовите взаимодействия са пресметнати, като е използвана функция за изглаждане [131], която се включва при радиус на обрязване от 10 Å и плавно се изключва, като нулира тези взаимодействия, при радиус от 12 Å. Симулациите са проведени на клъстера BIOSIM към Физически факултет на Софийски университет "Св. Климент Охридски".

5.2.2. Резултати

Получената от симулацията траектория е анализирана, като в оценката на взаимодействието между хормона окситоцин (OT) и неговия рецептор (OTR) са включени, както хидрофобните контакти, така и водородните връзки, които допринасят за образуването на стабилен комплекс между двете молекули. За изчисляването на свободната енергия на свързване, в хормон - рецепторния комплекс, е използван инструментa g_mmpbsa [123], който е имплементиран в софтуерния пакет GROMACS. С g_mmpbsa са определени неполярните и полярните контакти между двете структури в

комплекса, като енергията на свързване е разложена, въз основа на приноса на всеки участващ аминокиселинен остатък. За анализ на водородните връзки е използван компютърния алгоритъм HBonanza [124]. Информацията за вида на всяко взаимодействие, както и за аминокиселините, които участват в образуването на свързващия джоб между окситоциновия рецептор и неговия лиганд окситоцин, е обобщена в Таблица 1.

№	OT	OTR	Междумолекулно взаимодействие
1	Cys1	Glu307 (el3)	IONIC HB
2	Cys1	Val115 (helix 3)	VDW ^b
3	Cys1	Tyr200 (el2)	HB ^a
4	Cys1	Gln119 (helix 3)	HB
5	Tyr2	Met123 (helix 3)	VDW
6	Tyr2	Gln119 (helix 3)	VDW
7	Tyr2	Val115 (helix 3)	VDW
8	Tyr2	Tyr200 (el2)	VDW
9	Tyr2	Ile201(el2)	VDW
10	Tyr2	Gln171 (helix 4)	HB
11	Tyr2	Gln171 (helix 4)	VDW
12	Ile3	Phe291 (helix 6)	VDW
13	Ile3	Leu317 (helix 7)	VDW
14	Ile3	Val294 (helix 6)	VDW
15	Ile3	Met123 (helix 3)	VDW
16	Ile3	Gln295 (helix 6)	HB
17	Ile3	Gln119 (helix 3)	HB
18	Gln4	Ile313 (helix 7)	VDW
19	Gln4	Val314 (helix 7)	VDW
20	Gln4	Leu317 (helix 7)	VDW
21	Asn5	Trp300 (el3)	VDW
22	Asn5	Ile312 (helix 7)	VDW
23	Asn5	Ile313 (helix 7)	VDW
24	Asn5	Phe311 (helix 7)	VDW
25	Asn5	Ile313 (helix 7)	HB
26	Asn5	Phe311 (helix 7)	HB
27	Cys6	Tyr200 (el2)	VDW
28	Pro7	Thr202 (el2)	VDW
29	Pro7	Tyr200 (el2)	VDW
30	Leu8	Ile201(el2)	VDW
31	Leu8	Ile204 (helix 5)	VDW
32	Leu8	Trp203 (el2)	VDW
33	Leu8	Thr202 (el2)	VDW
34	Gly9	Gln295 (helix 6)	VDW
35	Gly9	Ser298 (el3)	VDW
36	Gly9	Trp297 (el3)	HB
37	Gly9	Val294 (helix 6)	HB
^a HB, взаимодействие с водородна връзка.			
^b VDW, Ван дер Ваалсово взаимодействие.			

Таблица 1. Описание на местата на свързване в хормон - рецепторния комплекс.

Анализът на получените резултати показва, че общо 21 аминокиселинни остатъка, от изградения модел на окситоциновия рецептор, са определени като места за свързване на молекулата на пептидния хормон - окситоцин. Тези аминокиселинни остатъци са: Glu307 (el3), Val115 (helix 3), Tyr200 (el2), Gln119 (helix 3), Met123 (helix 3), Ile201 (el2), Gln171 (helix 4), Phe291 (helix 6), Leu317 (helix 7), Val294 (helix 6), Gln295 (helix 6), Ile313 (helix 7), Val314 (helix 7), Trp300 (el3), Ile312 (helix 7), Phe311 (helix 7), Ile204 (helix 5), Trp203 (el2), Thr202 (el2), Ser298 (el3) and Trp297 (el3). Консервативните остатъци от рецептора, които участват в хормон - рецепторното взаимодействие са: Val115 (helix 3), Gln119 (helix 3), Met123 (helix 3), Gln171 (helix 4), Phe291 (helix 6), Leu317 (helix 7), Gln295 (helix 6).

Експериментални данни показват, че аминокиселината изолевцин, в молекулата на окситоцина, играе важна роля за специфичното свързване на хормона към неговия рецептор [53] (виж 1.2.5., Фиг. 12). По тази причина, остатъците от изградения модел на окситоциновия рецептор, които са свързани с Ile3, се смятат за решаващи при разпознаването на хормона. Тези остатъци в моделирания рецептор са: Phe291 (helix 6), Leu317 (helix 7), Val294 (helix 6), Met123 (helix 3), Gln295 (helix 6) and Gln119 (helix 3). Освен това, като важни остатъци в модела на рецептора, за свързването на лиганда и за стабилизирането на хормон - рецепторния комплекс, са определени следните консервативни Gln остатъци: Gln119, Gln171 и Gln295. Наблюденията ни за Gln119, Gln171 и Gln295 съвпадат, както с теоретичните, така и с експерименталните резултати, получени и от други изследователски групи [49, 50, 51, 52].

Молекулно моделиране на други групи в комбинация с изследвания на мутагенеза, показват голям брой места в окситоциновия рецептор, които са от съществено значение за свързването на хормона окситоцин [1] (виж 1.2.5., Фиг. 12). При сравняването на тези места с аминокиселинните остатъци от моделирания рецептор, които участват в хормон - рецепторното взаимодействие, са открити следните съвпадения: Val115, Gln119, Met123, Gln171, Thr202, Val294, Gln295, Trp300, Glu307, Ile313, Val314. Освен това, четири от съвпадащите си аминокиселинни остатъци, а именно Gln119, Gln171, Gln295 и Glu307, съответстват на места на свързване, които са определени експериментално.

5.3. Конформационни промени в окситоциновия рецептор, предизвикани от свързването на лиганда - окситоцин

5.3.1. Изследване на механизма на активиране на рецептора

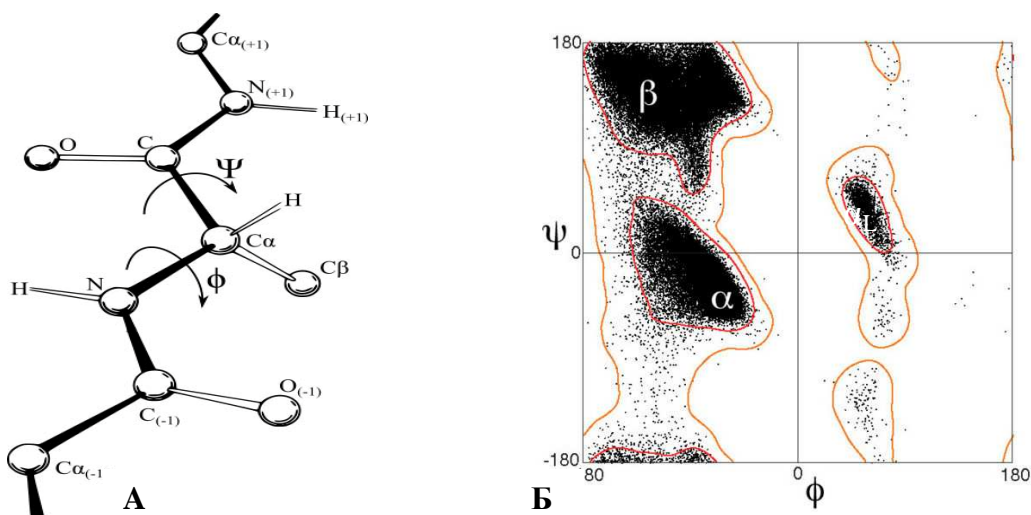
Рецепторната молекула може да съществува в две състояния (неактивно и активно), които са в конформационно равновесие помежду си (виж 1.2.2., Фиг. 8). Вътреклетъчната част на рецептора участва във взаимодействията с G протеина (виж 1.2.3., Фиг. 9). Конформационното равновесие се измества, в състояние на активен рецептор, след свързването на лиганда в трансмембрания джоб, разположен близо до извънклетъчната част. Свързването на агониста (лиганд) с рецептора, води до конформационни промени в неговите извънклетъчни и вътреклетъчни извивки, както и в неговата трансмембранна част [147, 148, 149, 150].

За рецепторите от семейството на GPCRs е характерен общ механизъм на активиране, в който участват силно консервативни аминокиселинни остатъци. Тези аминокиселинни остатъци се намират във вътреклетъчните части на спирали TM3 (Arg137, която е част от мотива E(D)RY) и TM6, като образуват "йонна ключалка", която държи TM3 и TM6 в тяхната неактивна форма. Разрушаването на междумолекулните взаимодействия, между тези остатъци, е ключов момент в процеса на активирането на рецептора. Като наблюдаваните конформационни промени са: екранирането на електростатичното взаимодействие между спиралите, движението на спирали TM6, TM5 и разделянето на цитоплазмените части на TM3 и TM6, след счупването на "йонната ключалка" между тях [151].

Според хипотезата за полярните джобове, аргинина на мотива E(D)RY е ограничен в джоб, когато рецептора е в неговата неактивна конформация. Този джоб е образуван от консервативните полярни остатъци, разположени върху TM1, TM2 и TM7. За разлика от това, когато рецептора премине в своето активно състояние, задействано от агониста, страничната верига на аргинина се измества извън полярния джоб. Отрицателно заредената аспарагинова киселина в мотива E(D)RY, е също важна аминокиселина, тъй като от двете й състояния, протонирана (неутрална) и депротонирана (анионна), зависи равновесието между активната и неактивната рецепторна форма. Тези наблюдения са потвърдени, както от резултати от изследвания на мутагенеза, така и от молекулно - динамични симулации [152].

5.3.2. Карта на Рамачандран

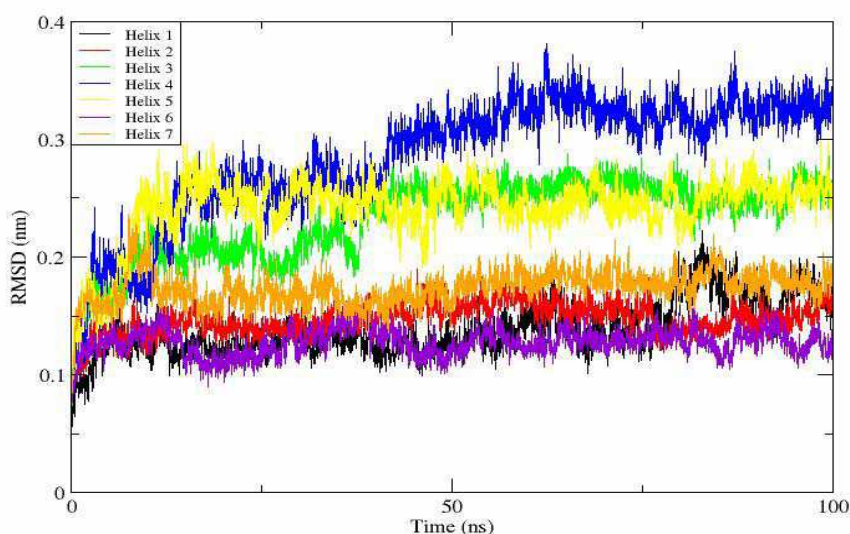
Всеки $C\alpha$ атом, от въглеродния скелет на пептидите или белтъците, притежава две въртящи се една около друга връзки: C-N връзката, описана от ъгъла на усукване ϕ и C-C връзката, описана от ъгъла на усукване ψ . Връзките C-N и C-C са части от две съседни пептидни връзки. За ъглите ϕ и ψ се допускат само определени комбинации, между -180° и $+180^\circ$, тъй като при въртенето на връзките съществува вероятност за стерични сблъсъци между съседните аминокиселинни остатъци (Фиг. 49 А). По този начин, с позволените стойности на ϕ и ψ ъглите на усукване може да бъде определена конформацията на гръбнака на пептидите или белтъците, а получената конформационна диаграма е известна като карта на Рамачандран [153, 154]. В картата на Рамачандран, атомите са представени като твърди сфери с радиус, който е равен на Ван дер Ваалсовия и са разпределени в т.нар. забранени и разрешени области. В забранените области са разположени атомите, които си пречат стерично и са енергетично неизгодни, а в разрешените области попадат двойките повтарящи се ϕ и ψ ъгли, които съответстват на стерично позволени структури, като α спирали, леви α спирали и разгънати β структури. По-късно, първоначалната карта на Рамачандран е подобрена, като са определени нови контури на разрешените области в нея. Новите контури са установени чрез подбор в базата данни PDB на най-добрите 500 нехомоложни протеина, с резолюция по-добра от 1.8 \AA , от които е получено разпределението на всички реално наблюдавани ъгли на Рамачандран (Фиг. 49 Б).



Фигура 49. А/ Ъгли на усукване ϕ и ψ на гръбнака на пептид или белтък. Б/ Карта на Рамачандран. С червен контур са заградени разрешените области, в които се намират 98% от точките, а с оранжев тези с 99.95% от точките. Фигурата е от [155, 156].

5.3.3. Резултати

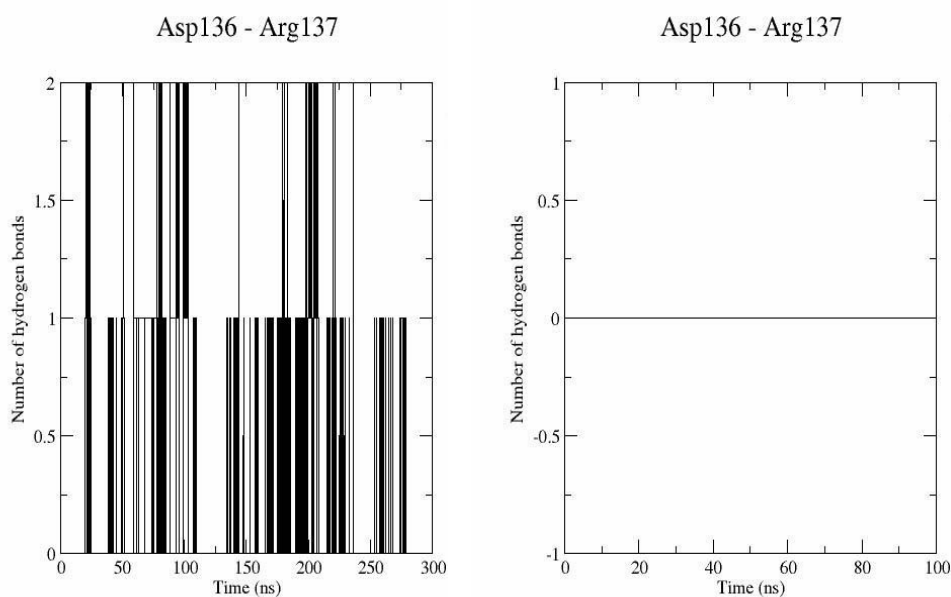
За да се изследва механизма на активиране на окситоциновия рецептор са проведени две симулации: с несвързан с лиганд окситоцинов рецептор (300 ns) и със свързан с агонист (хормона окситоцин) окситоцинов рецептор (100 ns). От анализа на получената траектория, в която рецептора е свързан с окситоцина се вижда, че трансмембранните спирали TM1, TM2, TM6 (след леко първоначално въртене в процеса на свързване на окситоцин) и TM7 остават стабилни (Фиг. 50). Наблюдава се и разгъване на спиралната структура на TM3 (Arg113 – Met123), задействано от свързването на окситоцина в позиции Val115, Glu119 и Met123. Освен това, структурата на спиралите TM4 (Val166-Leu177) и TM5 (Trp203-Leu206), също е променена значително в резултат на взаимодействието на хормона с EL2 (Tyr200, Ile201, Thr202 и Trp203), TM4 (Gln171) и TM5 (Ile204).



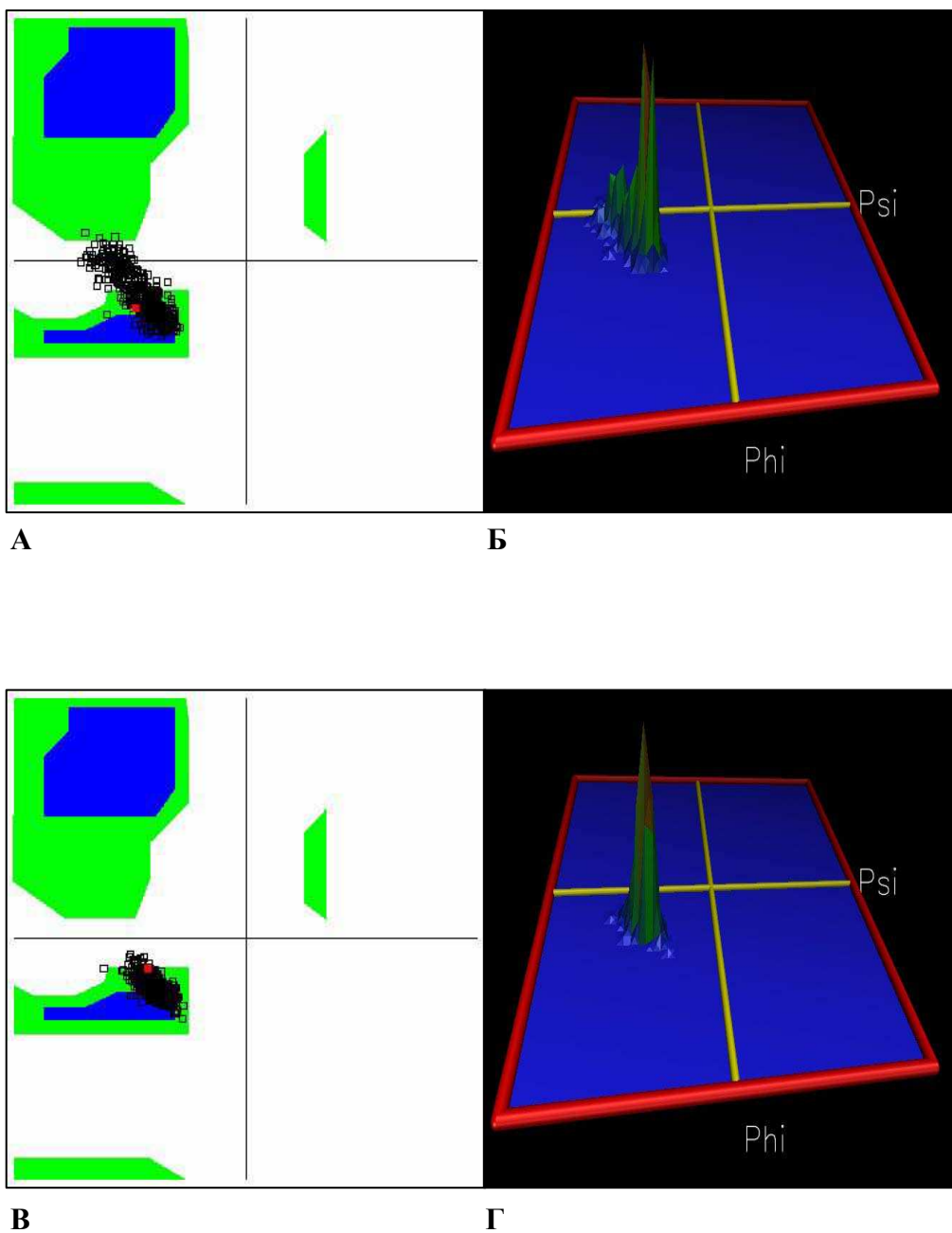
Фигура 50. RMSD на 7-те трансмембранни спирали за траекторията на хормон - рецепторния комплекс. Спиралите са оцветени, както следва: спирала 1 (в черно), спирала 2 (в червено), спирала 3 (в зелено), спирала 4 (в синьо), спирала 5 (в жълто), спирала 6 (в лилаво) и спирала 7 (в оранжево).

Анализът на траекторията на несвързания с лиганд окситоцинов рецептор, показва наличието на Н - връзка между Arg137 (спирала 3) на E(D)RY мотива и съседния аспаргат, Asp136. Структурните промени, които настъпват в спиралите TM3 и TM4, наблюдавани в траекторията на хормон - рецепторния комплекс, водят до разрушаването на тази водородна връзка (Фиг. 51). В същото време, спиралната структура на E(D)RY мотива се стабилизира (Фиг. 52) и се измества извън полярния джоб, образуван от спиралите TM1, TM2 и TM7 (Фиг. 53). Не са наблюдавани други промени във вътреклетъчната част на рецепторната структура.

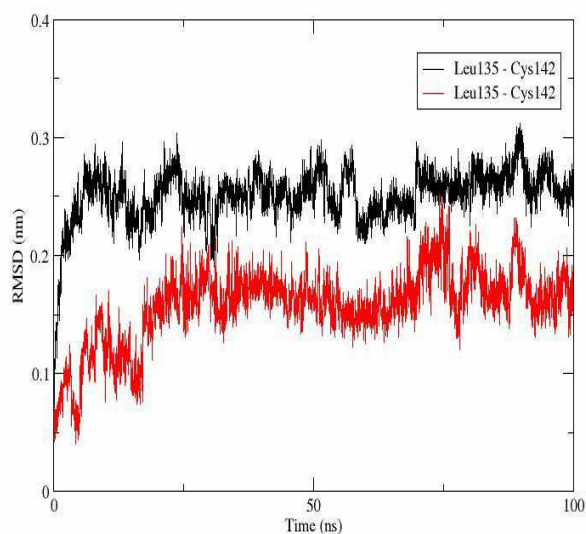
Въз основа на тези наблюдения, стигнахме до хипотезата, че изместването на E(D)RY мотива оказва влияние върху G протеина, като стартира процеса на неговото разпадане от рецептора и последващия вътреклетъчен процес (виж 1.2.3., Фиг. 9 и 1.3., Фиг. 13).



Фигура 51. Брой водородни връзки между аминокиселинните остатъци Asp136 и Arg137 за траекторията на несвързания с лиганд окситоцинов рецептор (вляво) и траекторията на комплекса агонист - окситоцинов рецептор (вдясно).



Фигура 52. А/ Карта на Рамачандран на Arg137 и Б/ тримерна хистограма на картата на Рамачандран на Arg137 за траекторията на несвързания с лиганд окситоцинов рецептор. В/ Карта на Рамачандран на Arg137 и Г/ тримерна хистограма на картата на Рамачандран на Arg137 за траекторията на комплекса агонист - окситоцинов рецептор.



Фигура 53. RMSD на аминокиселинната последователност Leu135-Cys142, която включва мотива E(D)RY (Leu135-Asp136-Arg137-Cys138) на окситоциновия рецептор (вляво). С черна линия е представен мотива E(D)RY от траекторията на несвързания с лиганд окситоцинов рецептор, а с червена линия този от траекторията на комплекса агонист - окситоцинов рецептор. В десният панел е показана наложената структура на спирала 3 (вдясно) и 4 (вляво) за несвързания окситоцинов рецептор (бял) и за комплекса агонист - окситоцинов рецептор (зелен) - RMSD 3.5 Å. Във виолетово е представен аминокиселинния остатък Arg137, който е част от трансмембранна спирала 3 и E(D)RY мотива.

Глава 6

Хепаран сулфат като помощна молекула за успешното свързване между човешкия интерферон гама и неговия извънклетъчен рецептор $IFN\gamma R1$

Човешкият хормон окситоцин е и ключов регулатор на активността на имунната система, поради което е подходящ за лечение и на редица вирусни, бактериални и автоимунни заболявания [157, 158]. Част от защитните функции на окситоцина върху организма, като имуноактивна молекула, са свързани с повишаване на производството на противовъзпалителния цитокин интерферон гама ($INF-\gamma$) [159], както и с предотвратяване на фрагментирането (разпадането) на разположения върху клетъчната повърхност гликозаминогликан (GAG) хепаран сулфат (HS) [160], който служи като локален резервоар за съхраняване на $INF-\gamma$ [161] по време на инфекция. За да се спре инфекцията в организма е необходимо $INF-\gamma$ да се свърже със своя извънклетъчен рецептор. Въпросът свързан с механизма на взаимодействие между интерферон гама и неговия извънклетъчен рецептор $IFN\gamma R1$ не е напълно изяснен на молекулно ниво. Затова целта на настоящото изследване беше да се проучи по-детайлно това взаимодействие с помощта на компютърни симулации, чрез които да се изясни ролята на C – края на цитокина $INF-\gamma$ в него, а също и ролята на хепаран сулфата като помощна молекула в процеса на свързване между $INF-\gamma$ и неговия клетъчен рецептор.

6.1. Хепаран сулфат и интерферон гама

Интерферон гама е противовъзпалителен разтворим цитокин, секретирани от клетките на имунната система (главно от естествените клетки убийци NK, участващи

във вродения имунен отговор, както и от CD8⁺ цитотоксичните Т лимфоцити и CD4⁺ помощните Т лимфоцити, отговорни за придобития имунен отговор) в отговор на навлезлите в организма патогени напр. вируси, бактерии и др. Като имуноактивна протеинова молекула цитокинът изпълнява множество биологични функции (стимулиране на макрофаги, производство на антитела и др.) в човешкото тяло, поради способността му директно да активира или инхибира над 200 различни гена, разположени в ядрото на клетката [162]. Молекулата на INF- γ в биологично активната му форма [163] представлява хомодимер, състоящ се от два преплетени полипептида, всеки от които е изграден от по 143 аминокиселинни остатъка (от които 28 са базични аминокиселини - лизин и аргинин). Всеки мономер на цитокина съдържа по 6 α -спирали (обозначени A–F), които са свързани помежду си с къси извивки, както и дълъг силно подвижен C – край (надолу по веригата на F спиралата; аминокиселинни остатъци 124–143), разположен в разтворителя извън глобуларната част на молекулата на INF- γ . C – край на INF- γ е силно положително зареден, тъй като съдържа 10 от 28-те базични аминокиселини (лизин и аргинин), поради което е и лесно податлив на разграждане от ензими, наречени протеази. Именно наличието на базични групи в цитокина, при физиологични условия, му придава нетен заряд от +16e (където "e" е заряда на електрона) [162, 164]. За да осъществи биологичните си функции в организма INF- γ трябва да се свърже към специфичен за него трансмембранен рецептор, който се намира върху клетъчната повърхност на почти всички видове клетки. Рецепторът (IFN γ R) за INF- γ представлява хетеродимерен комплекс, изграден от два мономера на субединицата IFN γ R1 (α -верига) и два мономера на субединицата IFN γ R2 (β -верига). И двете вериги на рецептора принадлежат към клас II на семейството на цитокиновите рецептори. Установено е, че IFN γ R1 веригата е тази, която свързва лиганда INF- γ с висок афинитет ($K_d = 10^{-10}$ M) и участва пряко във вътреклетъчната сигнализация, докато IFN γ R2 веригата не взаимодейства с молекулата на INF- γ , но играе важна роля за рецепторната олигомеризация (т.е. за образуването на комплекс между субединиците IFN γ R1 и IFN γ R2 след свързването на INF- γ към субединицата IFN γ R1), необходима за предаването на сигнала навътре в клетката. Кристалографската структура на комплекса INF- γ - IFN γ R1 е налична в базата данни PDB с код 1FG9 [165] и е получена с помощта на рентгенова дифракция. Анализът на структурата на комплекса INF- γ - IFN γ R1 показва, че молекулата на INF- γ се свързва с извънклетъчната част на субединицата IFN γ R1 основно чрез своя N-край. Ролята на C-края на INF- γ в това взаимодействие с рецепторната субединица IFN γ R1 остава един от най-неясните и спорни въпроси до

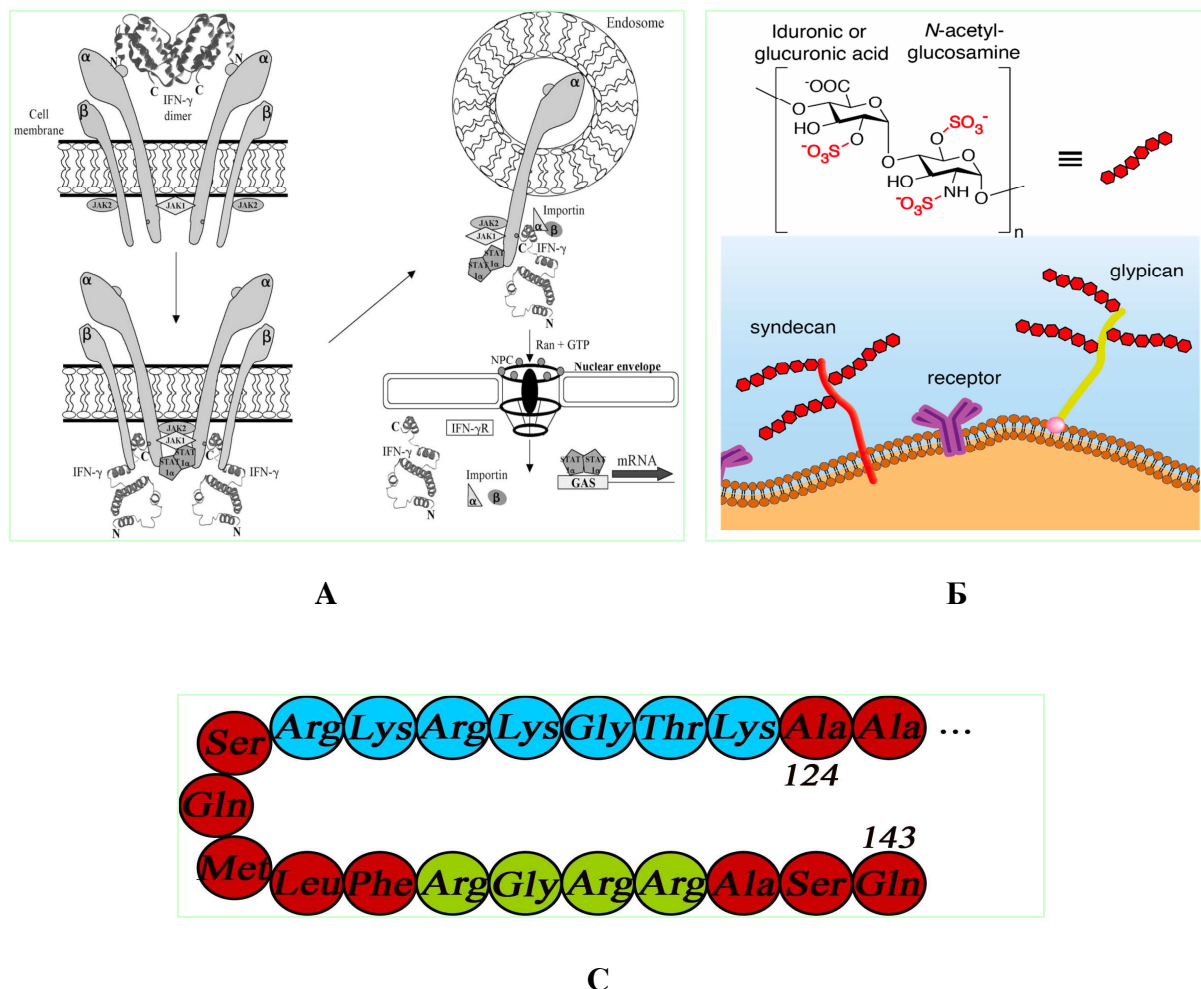
този момент, тъй като липсва информация от рентгенова дифракция за тази част от молекулата, поради което координатите на атомите на INF- γ след 125-тия аминокиселинен остатък не са известни. Аминокиселинните остатъци от INF- γ , които участват в образуването на контактната повърхност между INF- γ и IFN γ R1 се намират в два основни полипептидни участъка на всеки един от мономерите на цитокина: първият участък обхваща спирала А; извивката, свързваща спирали А и В и спирала В на INF- γ (аминокиселинни остатъци 1–42), а вторият включва спирала F и С-края на цитокина (аминокиселинни остатъци 108–124). Експериментални изследвания със синтетични пептиди и мутантни форми на INF- γ показват, че от посочените аминокиселинни остатъци най-важни за свързването между INF- γ и IFN γ R1 са тези, разположени в извивката, свързваща спирали А и В (аминокиселинни остатъци 18–26) на цитокина, аминокиселинния остатък His111, както и със фрагмент в С-края на молекулата на INF- γ (аминокиселинни остатъци 128–131). Свързването на лиганда INF- γ към извънклетъчната част на рецепторната субединица IFN γ R1 предизвиква рецепторна олигомеризация, с което се активира вътреклетъчния път на сигнална трансдукция. Рецепторната олигомеризация е процес водещ до асоциирането на IFN γ R2 субединицата към образувания се комплекс INF- γ - IFN γ R1. Това от своя страна активира два ензима, киназите JAK1 и JAK2, които са свързани с вътреклетъчните части на рецепторните субединици IFN γ R1 и IFN γ R2. Активираните кинази фосфорилират аминокиселинния остатък Tyr440, намиращ се в С-края на IFN γ R1 субединицата и така позволяват на белтъка STAT1 α да образува димер, който се свързва към IFN γ R1. Формираният се комплекс INF- γ -IFN γ R1-JAK1-JAK2-STAT1 α димер се отделя от IFN γ R2 субединицата и попада чрез ендоцитоза в цитоплазмата на клетката, откъдето с помощта на белтъка импортин, който се свързва с С-края на INF- γ , комплексът се транспортира в клетъчното ядро, където INF- γ може да повлияе директно върху различни гени (Фиг. 54 А) [162, 166, 167, 168, 169].

С-краят на молекулата на INF- γ е положително зареден, силно подвижен участък, разположен в разтворителя, който може да приема различни конформации [164]. Експериментални данни сочат, че този участък е отговорен за биологичната активност на цитокина [168, 169]. С-краят на INF- γ съдържа два домена с базични аминокиселинни остатъци, включващи лизин и аргинин. Първият домен означен с D1 е със заряд +5e и обхваща аминокиселинните остатъци 125–131, а вторият означен с D2 има заряд +3e и се състои от аминокиселинните остатъци 137–140. Предполага се, че от двата домена D1 и D2 по-важен за осъществяването на биологичните функции на INF- γ

в организма е доменът D1, тъй като той съдържа аминокиселинната последователност Lys128–Arg129–Lys130–Arg131, за която е установено, че допринася за свързването с висок афинитет между INF- γ и рецепторната субединица INF γ R1. За доменът D2 се смята, че има само регулаторна роля в процеса на свързването (Фиг. 54 С). Доказателство за това предположение са проведени експериментални изследвания, които показват, че отстраняването на 9 до 10 аминокиселинни остатъка, които включват и домена D2, води до увеличаване на биологичната активност на INF- γ , докато премахването на последователността Lys128–Arg129–Lys130–Arg131, част от домена D1, е свързано със загуба на активността на цитокина [165, 170, 171].

Чрез експериментални изследвания е установено, че в правилното формиране на комплекс между INF- γ и субединицата INF γ R1 от неговия извънклетъчен рецептор, участва и допълнителна отрицателно заредена помощна молекула – хепаран сулфат протеогликан (HSPG), която също се свързва с висок афинитет ($K_d = 1.5 \times 10^{-9}$ M) с двата домена D1 и D2, разположени в С-края на цитокина INF- γ . Доменът D1 е реалното място на свързване от молекулата на INF- γ с хепаран сулфат протеогликана, докато другият домен D2 ускорява процеса на асоцииране и е необходим за правилното пространствено ориентиране на двете молекули INF- γ и HSPG при образуването на комплекс между тях. HSPG са въглехидрати, прикрепени за клетъчната повърхност на почти всички клетки на бозайниците с помощта на един основен протеин, който е ковалентно свързан с гликозаминогликанови вериги (GAG), изградени от неразклонени, сулфатирани и силно отрицателно заредени полизахариди, известни като хепаран сулфати (HS). Основният протеин при HSPG може да бъде синдекан или глипикан, а градивната единица на хепаран сулфатите е повтарящ се дизахарид, състоящ се от уронова киселина и глюкозамин. Уроновите остатъци могат да бъдат или под формата на глюкуронова киселина или на идуронова киселина, а глюкозамина може да бъде или N-сулфатиран или N-ацетилян (Фиг. 54 Б) [171, 172, 173, 174]. Експериментални данни показват, че именно N-сулфатираните отрицателно заредени области от HS участват в електростатично взаимодействие с положително заредените участъци от С-края на молекулата на INF- γ [175]. Установено е, че взаимодействието между INF- γ и HSPG молекулите е свързано с: регулиране на биологичната активност на цитокина (т.е. нейното намаляване или увеличаване чрез ограничаване на степента на протеолитично разграждане на двата С-края на INF- γ хомодимера до по-малко от 10 аминокиселинни остатъка); осигуряване на локални натрупвания от INF- γ близо до

мястото на неговото действие върху прицелните клетки; както и с улесняване на свързването между INF- γ и неговия извънклетъчен рецептор [161].



Фигура 54. А/ Трансдукция на сигнала след свързването на лиганда INF- γ към извънклетъчната част на рецепторната субединица IFN γ R1 (α -верига). Б/ Структура на хепаран сулфат протеогликани, прикрепени по повърхността на клетъчната мембрана. Основният протеин синдекан или глипикан на HSPG е илюстриран с червена съответно жълта пръчица, а хепаран сулфатните гликозаминогликани са означени като червени верижки. Градивната единица във вид на дизахарид на хепаран сулфатите е показана в квадратни скоби. С/ С-край на цитокина INF- γ . Аминокиселинните остатъци, които изграждат домена D1 от С-края са представени в синьо, а тези от които е съставен домена D2 са оцветени в зелено. Фигурата е от [162, 176].

6.2. Моделиране на системите: INF- γ , IFN γ R1 и INF- γ , IFN γ R1, HS хекса- или октазахариди

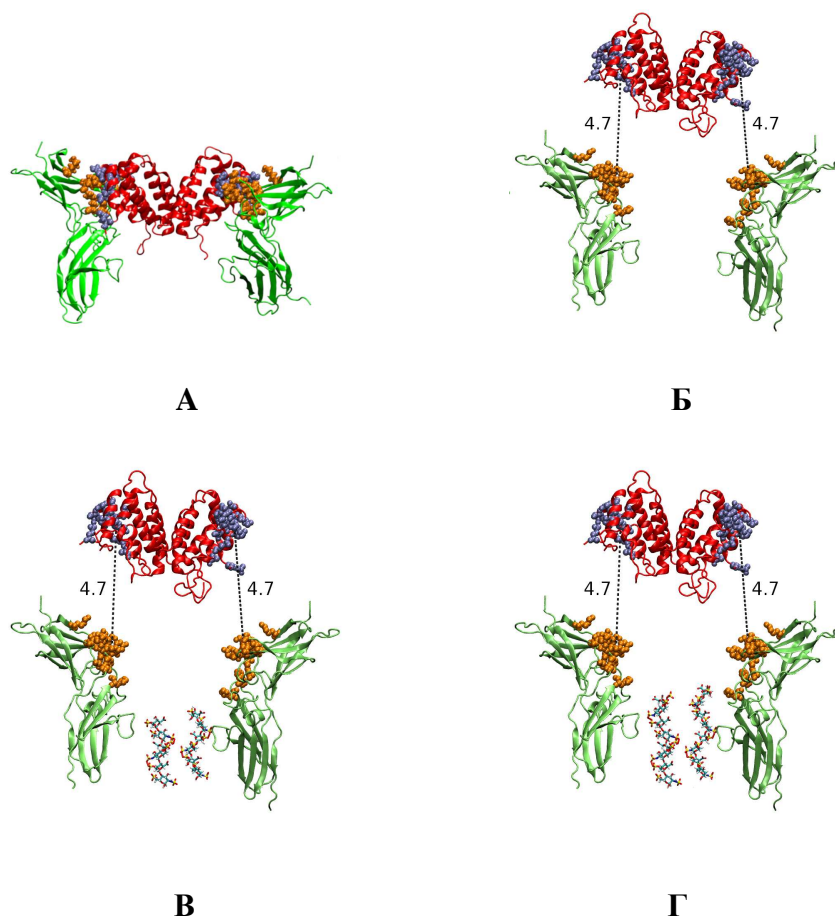
6.2.1. Молекулно моделиране

Конструирането на системите интерферон- γ , рецепторна субединица IFN γ R1 и интерферон- γ , рецепторна субединица IFN γ R1, хепаран сулфатни хекса- или октазахариди е осъществено по следния начин. Пространствената структура (3D) на INF- γ и рецепторната му субединица IFN γ R1 е свалена от базата данни PDB с код 1FG9 [165] и е използвана като начална структура за референтната МД симулация на комплекса INF- γ -IFN γ R1 (Фиг. 55 А). Тъй като в 1FG9 липсва информация за координатите на атомите на последните 18 аминокиселинни остатъка, изграждащи двата С-края на молекулата на INF- γ , тези остатъци са добавени допълнително към всеки от мономерите на цитокина чрез програмата PyMOL [177]. Липсващият аминокиселинен участък (аминокиселинни остатъци 141-146) в рецепторната субединица IFN γ R1 е реконструиран с помощта на софтуерния пакет Coot [178]. За да се изследва образуването на комплекса INF- γ -IFN γ R1 чрез молекулна динамика, с вече напълно възстановените структури на цитокина и на рецепторната му субединица IFN γ R1, е създадена конформация, при която молекулата на INF- γ е отдалечена на няколко нанометра по оста z от двете α -вериги на рецепторната субединица IFN γ R1 (Фиг. 55 Б). Конформацията на напълно изградената структура на цитокина с нагънат С-край на всеки от мономерите, която е отдалечена на определено разстояние от α -веригите на рецепторната субединица IFN γ R1, е използвана за провеждането на още две компютърни симулации, при които между двете α -вериги на рецептора са добавени или два HS хексазахарида (Фиг. 55 В) или два HS октазахарида (Фиг. 55 Г). В случая целта беше да се проучи ролята на HS в процеса на формирането на комплекс между INF- γ и неговия извънклетъчен рецептор. За провеждането на двете симулации са използвани HS хекса- или октазахариди, тъй като експериментални данни показват [179], че двата типа олигозахариди взаимодействат най-силно с С-краищата на цитокина INF- γ . Компютърните модели на хепаран сулфатите със степен на полимеризация 6 (dp6) и 8 (dp8) са изградени въз основа на магнитно-резонансна структура с код 1HPN [180], която е свалена от базата данни PDB. Пространствените структури и топологиите на моделите на хекса- и октазахаридите са получени с помощта на инструмента Glycan Modeler (Glycan Reader и Modeler) на сървър

CHARMM GUI (<http://charmm-gui.org>) [181], като за топологиите е използвана най-новата версия на силовото поле за въглеhidрати CHARMM36 [182], след което топологиите са преобразувани в съвместими със софтуерния пакет GROMACS.

6.2.2. Резултати

Началните конформации на системите, които са изградени за изследване на свързването между цитокина INF- γ и неговата рецепторна субединица IFN γ R1, са представени на Фиг. 55.



Фигура 55. Начални конформации на системите, използвани за изследване на свързването между цитокина INF- γ и двете α -вериги на рецепторната субединица IFN γ R1. Цитокинът INF- γ е представен в червено, двете α -вериги на рецепторната субединица IFN γ R1 са в зелено, а HS-те хекса- и октазахариди са изобразени като цветни пръчици. Аминокиселинните остатъци от INF- γ и IFN γ R1, които участват в образуването на контактната повърхост между двете молекули, са показани като сини и оранжеви сфери. Разстоянията $d1 = 4.7$ nm и $d2 = 4.7$ nm между центровете на свързване в молекулата на INF- γ и двете α -вериги на рецептора са изобразени с черни прекъснати

линии. **A/** Система за референтна симулация, базирана на кристалографската структура на комплекса INF- γ -IFN γ R1. **Б/** Система за изследване на свързването между INF- γ (с двата му напълно изградени С-края) и рецепторната субединица IFN γ R1. Система за изследване на свързването на INF- γ (с двата му напълно изградени С-края) към рецепторната субединица IFN γ R1 в присъствието на **В/** HS хексазахариди или **Г/** HS октазахариди.

6.3. Изследване на взаимодействието между INF- γ и IFN γ R1 без и в присъствието на HS хекса- или октазахариди

6.3.1. Молекулна динамика

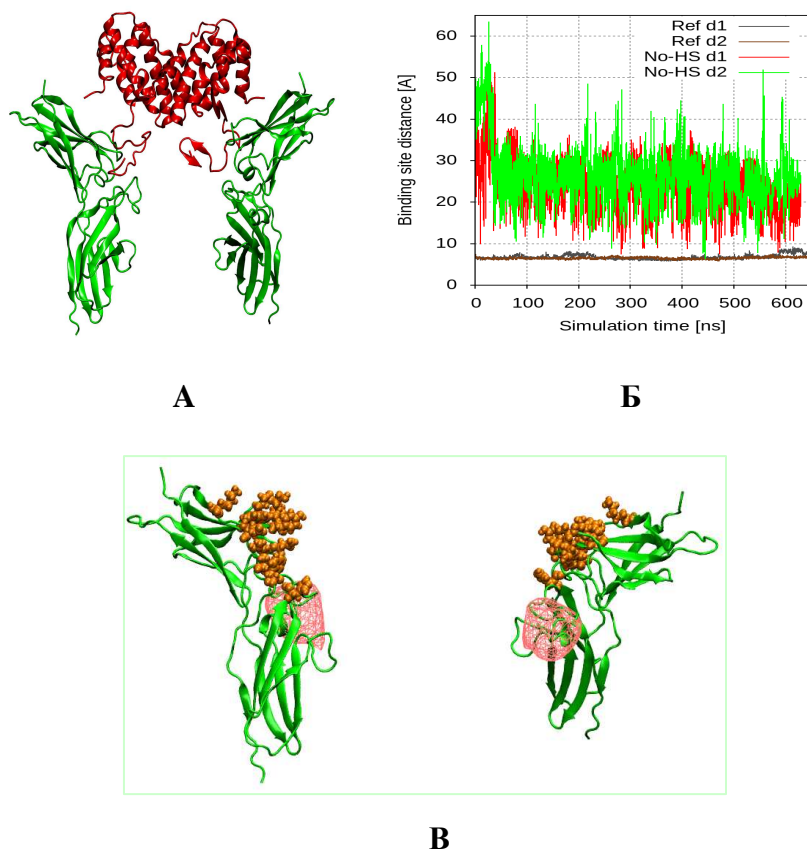
Всяка от изградените системи е подложена на молекулно-динамична (MD) симулация. Процесът по подготовката и провеждането на молекулната динамика включва минимизиране на енергията на системата с алгоритъма на най-бързото спускане, уравнивяване на системата за 250 ps и самата компютърна симулация, която е с продължителност от 650 ns. Моделните системи са симулирани със софтуерния пакет GROMACS [128], като за протеините е използвано силовото поле за протеини CHARMM 36 [129], а за HS-те хекса- и октазахариди – силовото поле за въглехидрати CHARMM36 [182]. Молекулите на протеините и на олигозахаридите за всяка от системите са разтворени в правоъгълни кутии с минимално разстояние между разтворените молекули и стените на кутията от 2 nm. За описване на разтворителя е използван модифициран TIP3P модел на водата [130]. Във всички посоки (x, y и z) са наложени периодични гранични условия. За пресмятането на уравненията за движение е използван интегратора на скачащата жаба с времева стъпка от 2 fs. Дължината на всички химични връзки е фиксирана с алгоритъма P-LINCS [183]. Радиусът на обрязване на директната сума, за електростатичните взаимодействия, които са изчислени с метода PME [93], е зададен на 12 Å. Поддържането на постоянна температура в системата от 310 K и постоянно налягане от 1 atm е осъществено съответно с термостат v-rescale [98] и с баростат на Паринело-Раман [99]. Ван дер Ваалсовите взаимодействия са пресметнати с помощта на функция за изглаждане [131], която се включва при радиус на обрязване от 10 Å и плавно се изключва, като нулира тези взаимодействия, при радиус от 12 Å. Симулациите са проведени на клъстера BIOSIM към Физически факултет на Софийски университет "Св. Климент Охридски".

6.3.2. Резултати

За да се проследи процеса на свързване между цитокина INF- γ и двете α -вериги на рецепторната му субединица IFN γ R1, за всяка от проведените симулации, са използвани промените в разстоянията d1 и d2 по време на симулациите (Фиг. 55 Б). Като d1 и d2 са разстоянията между центровете на масите на рецептор-свързващите места в двата мономера на INF- γ и цитокин-свързващите места в двете α -вериги на рецепторната му субединица IFN γ R1. Тези разстояния в началните конформации на изградените системи, с изключение на референтната система, са: d1 = 4.7 nm и d2 = 4.7 nm. Средните стойности на разстоянията d1 и d2 за референтната симулация на комплекса INF- γ -IFN γ R1 са: d1 = 6.87 \pm 0.56 nm и d2 = 6.58 \pm 0.24 nm.

При симулацията за изследване на взаимодействието между INF- γ (с двата му напълно изградени С-края) и рецепторната субединица IFN γ R1 (Фиг. 56 А) се наблюдава, че двата силно положително заредени С-края (с общ заряд от +18e) на цитокина INF- γ се отдалечават от неговата глобуларна част и се свързват с два отрицателно заредени домена от рецепторната субединица IFN γ R1 (наречени "колена") (Фиг. 56 В), които са разположени под цитокин-свързващите места в двете α -вериги на IFN γ R1 (всяка от α -веригите на IFN γ R1 е със заряд -9e). Това от своя страна не позволява на глобуларната част на INF- γ да се доближи достатъчно до местата си за свързване в рецепторната субединица IFN γ R1, като контактните повърхности от двете молекули INF- γ и IFN γ R1 остават на разстояние 20-25 nm една от друга и не могат да взаимодействат помежду си (Фиг. 56 Б (виж и картите за контакт, представени на Фиг. 57 А и Фиг. 57 Б)). По този начин двата С-края на INF- γ пречат за правилното образуване на цитокин-рецепторен комплекс. Картите за контакт показват честотата на близките контакти между двете молекули INF- γ и IFN γ R1, а контакт между тях съществува, когато два тежки атома от INF- γ мономер и от съответната α -верига на субединицата IFN γ R1 са в радиус на обрязване от 4.5 Å. За анализа на контактите са използвани последните 150 ns от всяка траектория на симулираните системи, а картите за контакт са генерирани с пакета MDTraj [184]. На Фиг. 57 А се вижда, че N-края на мономера А на INF- γ не образува контакти с α -веригата С на рецепторната субединица IFN γ R1. Контакти се наблюдават между С-края на мономера В на INF- γ и α -веригата С на субединицата IFN γ R1, но те не включват ключовия остатък His111 от С-края на цитокина. По отношение на другата контактна повърхност между INF- γ и IFN γ R1 (Фиг.

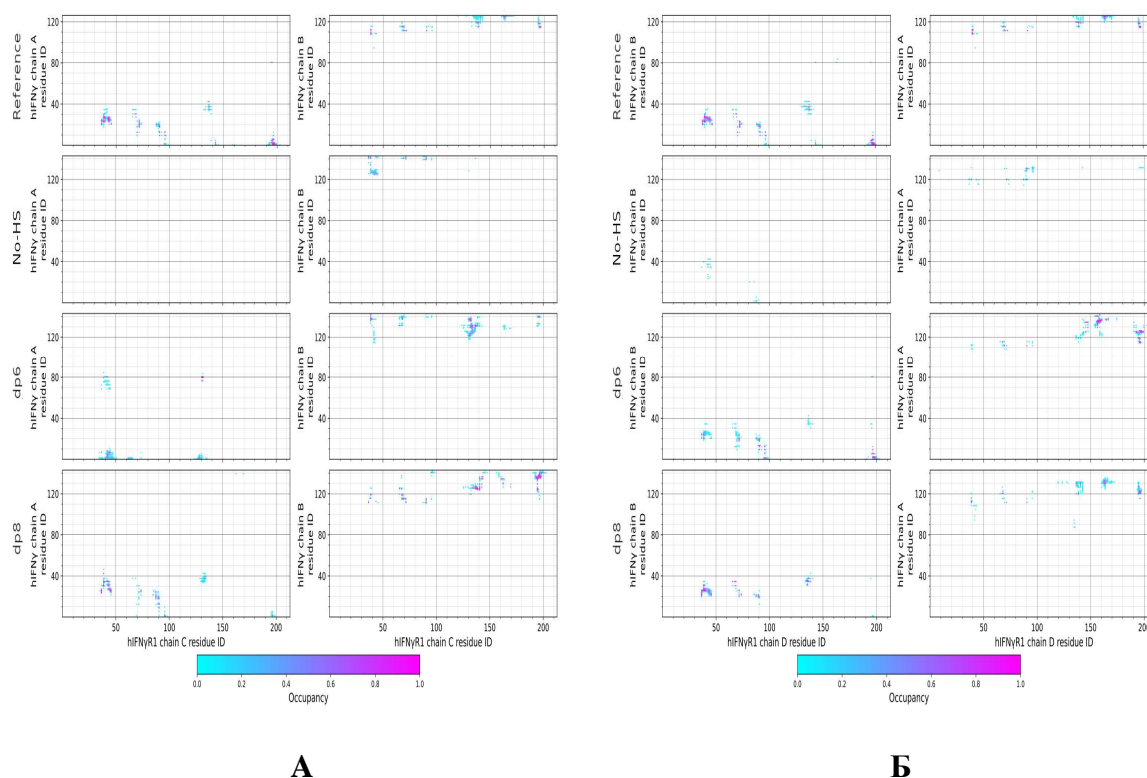
57 Б), N-края на мономера В на INF- γ участва в някакви контакти с α -веригата D на субединицата IFN γ R1, но те не са стабилни. Такива нестабилни контакти се наблюдават и при взаимодействието между α -веригата D на IFN γ R1 и C-края на мономера А на INF- γ .



Фигура 56. А/ Крайна конформация на системата от симулацията за изследване на свързването между INF- γ (с двата му напълно изградени C-края) и рецепторната субединица IFN γ R1. Цитокинът INF- γ е представен в червено, а двете α -вериги на рецепторната субединица IFN γ R1 са в зелено. Б/ Изменение на разстоянията d1 и d2 с течение на времето между местата на свързване в молекулата на INF- γ и рецепторната субединица IFN γ R1 без присъствието на HS хекса- или октазахариди. В/ Цитокин-свързващите места в двете α -вериги на рецепторната субединица IFN γ R1 (изобразена в зелено) са представени като оранжеви сфери, а локализираната отрицателна плътност на заряда в двете "колена" на субединицата IFN γ R1 е показана с червена мрежа.

Получените резултати показват, че електростатичното взаимодействие между положително заредената молекула на INF- γ (с двата му напълно изградени C-края) и двете отрицателно заредени α -вериги на субединицата IFN γ R1 е кратко и недостатъчно

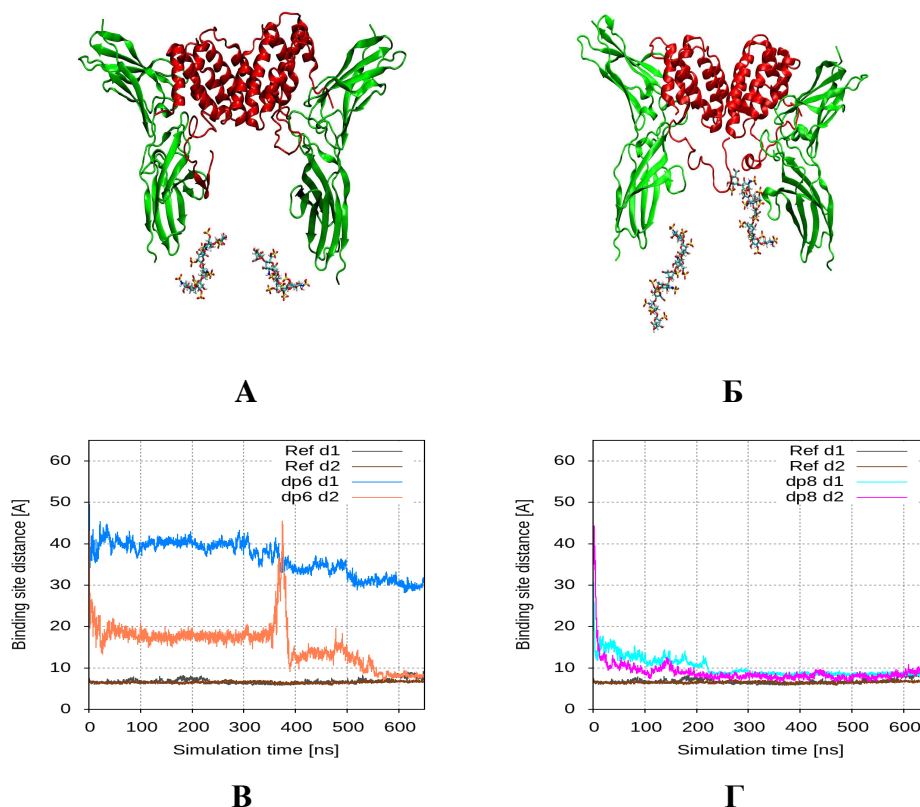
силно за правилното образуване на комплекса цитокин-рецептор. Това ни накара да предположим, че в процеса на формирането на цитокин-рецепторен комплекс, участват и други отрицателно заредени помощни молекули, разположени в близост до субединицата $IFN\gamma R1$, които със своя отрицателен заряд допринасят за по-ефективното и силно свързване на положително заредената молекула на $INF-\gamma$ с рецептора. Данни от експериментални изследвания сочат, че ролята на такива помощни молекули се изпълнява от хепаран сулфатни (HS) полизахаридни вериги (хекса- или октазахариди), прикрепени по клетъчната повърхност до α -веригите на рецепторната субединица $IFN\gamma R1$ [175]. Резултатите от двете симулации за изследване на взаимодействието между $INF-\gamma$ и неговата рецепторна субединица $IFN\gamma R1$ в присъствието на HS хекса- или октазахариди показват, че когато тези помощни молекули са разположени между α -веригите на субединицата $IFN\gamma R1$ те привличат електростатично С-края на $INF-\gamma$ и изтеглят цитокина надолу към местата му за свързване в двете α -вериги на $IFN\gamma R1$.



Фигура 57. А/ Карти за контакти между двата мономера на цитокина $INF-\gamma$ (означени като верига А и В) и едната α -верига (означена като верига С) на рецепторната субединица $IFN\gamma R1$. Б/ Карти за контакти между двата мономера на цитокина $INF-\gamma$ (означени като верига В и А) и другата α -верига (означена като верига D) на рецепторната субединица $IFN\gamma R1$.

При симулацията с dp6 се вижда, че хексахаридите не успяват да привлекат достатъчно силно и двата С-края на $\text{INF-}\gamma$, в резултат на което само единият мономер на цитокина се свързва с едната от α -веригите на рецептора, а другият мономер на $\text{INF-}\gamma$ не образува никакви контакти с рецепторната субединица $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ (Фиг. 58 А, В). Това е показано и на втория от долните панели на Фиг. 57 А и Фиг. 57 Б, където се наблюдава, че картите за контакти между $\text{INF-}\gamma$ и α -веригата D на субединицата $\text{IFN}\gamma\text{R1}$, наподобяват референтната контактна карта (Фиг. 57 Б), докато контакти между $\text{INF-}\gamma$ и α -веригата C на $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ не се образуват (Фиг. 57 А). За разлика от това при симулацията с dp8 се вижда, че когато между двете α -вериги на рецептора присъстват октазахариди, те успяват да привлекат много по-силно двата С-края на цитокина $\text{INF-}\gamma$. Това взаимодействие, между отрицателно заредените области на HS-те октазахариди и положително заредените участъци от С-края на молекулата на $\text{INF-}\gamma$, е толкова бързо, че още в първите 100 ns от симулацията, глобуларната част на $\text{INF-}\gamma$ се изтегля надолу между двете α -вериги на рецепторната субединица $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ (Фиг. 58 Б, Г). Картите за контакти в най-долните панели на Фиг. 57 А и Фиг. 57 Б показват, че в случая и двете контактни повърхности между $\text{INF-}\gamma$ и $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ прилягат доста добре една към друга и много наподобяват референтните контактни карти на комплекса $\text{INF-}\gamma$ - $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ (горните панели на Фиг. 57 А и Фиг. 57 Б).

Получените резултати представят модел на взаимодействие между цитокина $\text{INF-}\gamma$ и неговата рецепторна субединица $\text{IFN}\gamma\text{R1}$, при който две HS молекули (октазахариди), разположени в "дъното" на рецепторната субединица $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ (имитиращо базалната клетъчна мембрана) привличат много по-силно двата С-края на $\text{INF-}\gamma$ от самия рецептор (по-конкретно от т.нар. "колена" в рецептора), като по този начин улесняват началните етапи на взаимодействието между цитокина и рецептора. В резултат на това глобуларната част на цитокина $\text{INF-}\gamma$ се изтегля надолу към клетъчната повърхност и приема правилна (съвпадаща с рецептора) конформация, необходима за образуването на стабилен и функционален комплекс с рецепторната му субединица $\text{IFN}\gamma\text{R1}$.



Фигура 58. Крайна конформация на системата от симулацията за изследване на свързването между INF- γ (с двата му напълно изградени С-края) и рецепторната субединица IFN γ R1 в присъствието на **А/** HS хекса- или **Б/** октазахариди. Цитокинът INF- γ е представен в червено, двете α -вериги на рецепторната субединица IFN γ R1 са в зелено, а HS-те хекса- и октазахариди са изобразени като цветни пръчици. Изменение на разстоянията d1 и d2 с течение на времето между местата на свързване в молекулата на INF- γ и рецепторната субединица IFN γ R1 в присъствието на **В/** HS хекса- или **Г/** октазахариди.

Заклучение

Пептидният хормон окситоцин (OT) действа както върху периферните тъкани, така и като невротрансмитер в мозъка, като се свързва към специфичен за него рецептор (OTR), разположен в мембраните на клетките. По този начин хормонът играе важна роля в контрола на маточните контракции по време на раждане, в секрецията на мляко, в регулацията на имунната система и в много социални и поведенчески реакции. Свръхпроизводството на окситоцин, по време на бременност, може да предизвика преждевременно раждане. Предотвратяването на такива случаи може да се постигне чрез блокирането на рецептора, което не позволява свързването му с хормона. В настоящата дисертация е изграден компютърен модел на окситоцин - рецепторен комплекс, описващ в детайли взаимодействието между двете молекули, който да послужи като основа за проектирането на лекарства блокиращи рецептора.

За изграждането на този модел най-напред е изследвано поведението на човешкия хормон окситоцин във водна среда с метода на молекулната динамика. Изключителната подвижност на хормона в разтвор, наблюдавана при проведените симулации, показва че молекулата на окситоцина се намира в неговата биологично неактивна форма, което възпрепятства свързването му с рецептора. А важно условие за успешното формиране на хормон – рецепторен комплекс е окситоцина да бъде биотрансформиран от неактивна към активна форма, чрез метални йони. Затова е изграден модел на молекулата на окситоцина свързана с двувалентен цинков йон, за който няма налична информация в кристалографските бази от данни. За запазване на пространствената геометрия на моделираната структура в разтвор (във вид на октаедър) е използван “свързан подход”. Полученият модел показва, че свързването на двувалентен цинков йон, чрез шест ковалентни връзки, с молекулата на окситоцина, драстично променя конформацията на хормона във формата на спирала, като по този начин осигурява правилното разположение на образувания се комплекс хормон – метален йон в активния център на рецептора. Тази съществена промяна се вижда ясно от високата стойност на параметъра RMSD. Средното квадратично отклонение (RMSD) на гръбнака на пептидният хормон без и с цинков йон е 3.40 Å. Резултатите от проведените симулации показват, че конформацията във форма на спирала, която приема молекулата на окситоцина, след ковалентно свързване с цинковия йон, остава стабилна във воден разтвор.

За да може да се изследва взаимодействието между хормона окситоцин и неговия извънклетъчен рецептор, чрез който хормона изпълнява биологичните си функции в организма, е необходима пространствената структура на рецептора. Тази структура обаче не е известна, тъй като рецептора е мембранен протеин, който е труден за кристализиране. Затова с помощта на метода хомоложно моделиране, с използването на говежди родопсин за темплейт, е създаден триизмерен модел на окситоциновия рецептор. Резултатите от моделирането показват, че изградената пространствена

структура на модела на окситоциновия рецептор съвпада отлично с експериментално определената 3D структура на говеждия родопсин, която е използвана като шаблон. Това съвпадение е доказано, както от сравнените с помощта на функцията за оценка на DOPE енергийни профили на модела и темплейта, така и от минималното средно квадратично отклонение на $C\alpha$ атомите между структурите на модела и темплейта, което е само 1.05 Å. Така с получените резултати е установено, че е изграден качествен модел на окситоциновия рецептор, който може да бъде използван за изследването на процеса на хормон – рецепторното взаимодействие. За да бъде проучен коректно механизма на свързване на хормона окситоцин с неговия рецептор е важно да се отчете и влиянието на естествената среда, в която е разположен рецептора, а именно липидния бислой, изграждащ клетъчната мембрана. Затова е конструиран двуслоен мембранен модел на гладката мускулатура на матката, изграден от 5 различни вида фосфолипиди (фосфатидилхолин 50.3%, фосфатидил етаноламин 24.8%, сфингомиелин 13.8%, фосфатидилсерин 6.4% и холестерол 2%), в който е вграден създадения модел на окситоциновия рецептор. Получената система рецептор – мембрана е усъвършенствана, като е проведена компютърна симулация, по време на която са релаксирани остатъците от мембраната и разтворителя, образуващи интерфейса между рецепторния модел и липидно-водната среда.

Ключов фактор, който контролира свързването на лигандите в биомолекулните системи, е правилната конформация (пространствена структура) на лиганда и на неговия клетъчен рецептор. Взаимодействието между окситоциновия рецептор и природния му лиганд окситоцин, в което участват и метални йони като посредник, не е добре изучено на молекулно ниво, тъй като конформацията на двете структури е неизвестна. Затова въз основа на налични експериментални данни е разработен и сглобен компютърен модел на хормон – рецепторния комплекс, за да се изследва механизма на свързване между двете молекули, с помощта на метода молекулна динамика. Полученият комплекс окситоцин – рецептор – мембрана е използван, както за определянето на местата на взаимодействие между хормона и неговия рецептор, така и за изследването на процеса на активиране на рецептора, предизвикано от свързването му с окситоцина. В хода на изследването на процеса на активиране на рецептора, с цел представяне на неактивното му състояние, като референтна е използвана системата рецептор – мембрана, създадена в предходен етап от изследванията. След анализ на траекториите от проведените симулации е установено, че 21 остатъка от рецептора участват в свързването на хормона окситоцин, от които 10 са нови места за свързване, останалите 11 са съществени за свързването и съвпадат с резултати от подобни изследвания на други групи, а 4 места (Gln119, Gln171, Gln295 и Glu307) от тези 11 са определени експериментално. От наблюдаваните взаимодействия между рецептора и хормона 9 се дължат на водородни връзки, а останалите са в резултат на Ван дер Ваалсови контакти между аминокиселинните остатъци на двете молекули. Изследването на промените в структурата на рецептора, предизвикани от свързването му с хормона окситоцин, показва че трансмембранните спирали TM1, TM2, TM6 и TM7 в рецептора остават непроменени, за разлика от спиралите TM3, TM4 и TM5, в които се наблюдава частично разгъване. Наблюдаваните промени след свързването на хормона, водят до стабилизирането на спиралната структура на E(D)RY мотива, разположен във вътреклетъчната част на TM3 на рецептора, и го изместват извън полярния джоб, образуван от спиралите TM1, TM2 и TM7. Въз основа на тези наблюдения стигнахме до хипотезата, че изместването на E(D)RY мотива стартира разпадането на свързания към

рецептора G протеин, а оттам стартира и последващия вътреклетъчен процес. Получените резултати доказват хипотезата за важната роля на E(D)RY мотива в процеса на активирането на рецептора.

Хормонът окситоцин е и ключов регулатор на имунната система, като част от защитните му функции върху организма са свързани с повишаване на производството на противовъзпалителния цитокин интерферон гама по време на вирусни или бактериални инфекции. Подобни инфекции на пикочо-половата система са и сред една от най-честите причини, водещи до преждевременно раждане. За да се спре инфекцията в организма е необходимо интерферон гама да се свърже със своя извънклетъчен рецептор IFN γ R1. Въпросът, обаче, относно механизма на взаимодействие между цитокина и рецептора не е напълно изяснен на молекулно ниво. Затова в настоящата дисертация е проведено по-детайлно проучване на това взаимодействие с компютърни симулации, чрез които да се изясни ролята на C – края на цитокина интерферон гама в него, а също и ролята на гликозаминогликана хепаран сулфат като помощна молекула в процеса на свързване между интерферон гама и неговия клетъчен рецептор. Получените резултати представят модел на взаимодействие между интерферон гама и извънклетъчния му рецептор IFN γ R1, при който две хепаран сулфатни молекули (октазахариди), разположени в основата на рецептора IFN γ R1 (имитираща базалната клетъчна мембрана) привличат много по-силно двата C-края на интерферон гама от самия рецептор (по-конкретно от т.нар. "колена" в рецептора), като по този начин улесняват началните етапи на взаимодействието между цитокина и рецептора. В резултат на това глобуларната част на интерферон гама се изтегля надолу към клетъчната повърхност и приема правилна (съвпадаща с рецептора) конформация, необходима за образуването на стабилен и функционален комплекс с неговия рецептор IFN γ R1.

В заключение може да се каже, че изграденият модел на окситоцин – рецепторен комплекс е подходящ за изследване на динамиката на свързване между хормона окситоцин и неговия рецептор, а оттам и за проектирането на високоселективни лекарства блокиращи рецептора, които да могат да се приложат за предотвратяване на преждевременно раждане. А информацията от изяснения в детайли молекулен механизъм на взаимодействие между цитокина интерферон гама и неговия извънклетъчен рецептор ще може да се използва за разработването на по-ефективни терапевтични стратегии за контрол на нивата на противовъзпалителния цитокин при преждевременно раждане.

Научни приноси

- Изграден е компютърен модел на молекулата на човешкия хормон окситоцин, свързана с двувалентен цинков йон, който е използван за изследване на процеса на взаимодействие между хормона и неговия извънклетъчен рецептор. За получената структура на комплекса хормон – метален йон няма налична информация в кристалографските бази от данни.
- Проучена и доказана е стабилността на създадената пространствена структура на комплекса хормон – метален йон във воден разтвор чрез молекулно – динамични симулации.
- Изграден е триизмерен модел на окситоцинов рецептор чрез хомоложно моделиране, като е използван говежди родопсин за темплейт. Точността на изградената пространствена структура на рецептора е доказана чрез свързване с естествения му лиганд – хормона окситоцин.
- За по-коректно проучване на хормон – рецепторния комплекс, в неговата естествена липидна среда, е създаден модел на мембраната на гладката мускулатура на матката, състоящ се от 5 различни вида фосфолипиди, в който е вграден модела на окситоциновия рецептор.
- Разработен е модел на системата окситоцин – рецептор – мембрана, който е използван както за определянето на местата на взаимодействие между хормона и неговия рецептор, така и за изследването на процеса на активиране на рецептора, предизвикано от свързването му с окситоцина.
- Определени са 21 остатъка от рецептора, които участват в свързването на хормона окситоцин, от които 10 са нови места за свързване, останалите 11 са съществени за свързването и съвпадат с резултати от подобни изследвания на

други групи, а 4 места от тези 11 са определени експериментално. От взаимодействията между рецептора и хормона 9 се дължат на водородни връзки, а останалите са в резултат на Ван дер Ваалсови контакти между аминокиселинните остатъци на двете молекули.

- Изследвани са промените в структурата на рецептора, предизвикани от свързването му с хормона окситоцин. Установено е, че трансмембранните спирали TM1, TM2, TM6 и TM7 остават непроменени, за разлика от спиралите TM3, TM4 и TM5, в които се наблюдава частично разгъване. Доказано е, че взаимодействието хормон – рецептор води до стабилизирането на спиралната структура на E(D)RY мотива, разположен във вътреклетъчната част на TM3 на рецептора, и го измества извън полярния джоб, образуван от спиралите TM1, TM2 и TM7.
- Въз основа на наблюдаваните промени, след свързването на хормона към рецептора, се стигна до хипотезата, че изместването на E(D)RY мотива, който е част от TM3 на рецептора, стартира разпадането на свързания към рецептора G протеин, а оттам стартира и последващия вътреклетъчен процес. Получените резултати доказват хипотезата за важната роля на E(D)RY мотива в процеса на активирането на рецептора.
- Изграден е модел на взаимодействие между противовъзпалителния цитокин интерферон гама и неговия извънклетъчен рецептор IFN γ R1, който обяснява по-детайлно молекулния механизъм на свързване между двете молекули. Чрез този модел на взаимодействие е изяснена ролята на C-края на интерферон гама в това свързване, а също и ключовата роля на гликозаминогликана хепаран сулфат, като помощна молекула, която улеснява правилното позициониране на глобуларната част на цитокина в неговия рецептор.

Научни публикации, въз основа на които е написана дисертацията

Публикации в научни списания

1. E. Miladinova, **2019**. Molecular dynamic study of the stability of oxytocin – divalent zinc complex in aqueous solution. *Journal of Computational Chemistry and Molecular Modeling*, **3**: 252–260, DOI: 10.25177/JCCMM.3.1.SC.494.
2. E. Miladinova, P. Petkov, N. Ilieva, and L. Litov. **2020**. Computer aided study of the oxytocin – receptor complex binding sites. *Journal of Computational Chemistry and Molecular Modeling*, **4**: 353–364, DOI: 10.25177/JCCMM.4.2.RA.10605.
3. E. Miladinova, E. Lilkova, E. Krachmarova, K. Malinova, P. Petkov, N. Ilieva, G. Nacheva, and L. Litov. **2022**. Heparan Sulfate facilitates binding of hIFN γ to its cell-surface receptor hIFN γ R1. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**: 1–14, DOI: 10.3390/ijms23169415.

Публикации от представени на конференции доклади

1. E. Miladinova, E. Lilkova, P. Petkov, N. Ilieva, and L. Litov. Homology modeling of the oxytocin G – protein coupling receptor. *International Conference on Mathematical Methods and Models in Biosciences (BIOMATH)*, Blagoevgrad, Bulgaria, 14-19 June **2015**.
2. E. Миладинова, П. Петков, Н. Илиева и Л. Литов. Хомоложно моделиране и молекулна динамика на G – протеин свързан окситоцинов рецептор. *Трети*

Национален Конгрес по Физически Науки, София, България, 29 септември – 2 октомври 2016 г.

3. E. Miladinova, and L. Litov. Obtaining a stable complex between oxytocin and divalent zinc ion and testing it using molecular dynamic simulations. *9th International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms*, Funchal, Madeira, Portugal, 19 -21 January **2018**.

Благодарности

На първо място бих искала да изкажа своята специална благодарност на научния си ръководител проф. д-р Леандър Литов за предоставената ми възможност да бъда част от неговата група, за интересната тема на дисертационния ми труд, разработена под негово ръководство, за ценните насоки, полезните дискусии, съветите и техническата подкрепа от негова страна в хода на провеждането на изследванията и преди всичко за проявеното търпение по време на съвместната ни работа. Благодаря и на доц. д-р Пейчо Петков за оказаната ми помощ в случаите на съвместна работа. Бих желала искрено да благодаря и на доц. д-р Борислав Павлов за точните съвети, споделения опит, както и за проявената от негова страна сърдечност и отзивчивост във всеки един от моментите, когато съм имала нужда от помощ. Благодаря на проф. д-р Невена Илиева и проф. д-р Леандър Литов за полезния контакт с проф. Шрайнер и неговата група от Медицинския университет във Виена, Австрия. Искам също да благодаря на доц. д-р Пейчо Петков, доц. д-р Елена Лилкова и проф. д-р Невена Илиева за помощта във връзка с работата ми по изследванията, свързани с интерферон гама и неговия рецептор.

Издавам своята благодарност и на проф. д-р Волфганг Шрайнер, проф. д-р Рудолф Карх, проф. д-р Харалд Хайнцл, д-р Майкъл Кен и Майкъл Цибена за полезните дискусии и оказаната помощ по време на престоя ми в Медицинския университет във Виена, Австрия.

Искам да благодаря от цялото си сърце на моето семейство за моралната им подкрепа, безкрайната им обич, голямото им търпение, проявеното разбиране и най-вече за вярата им в мен.

Част от изследванията, представени в дисертацията бяха финансирани по проект "Изграждане на съвременна образователна и научноизследователска среда за развитието на докторанти, постдокторанти и млади учени във Физическия факултет на СУ "Св. Климент Охридски"", финансиран по Оперативна програма "Развитие на човешките ресурси", съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз, както и по проект "Докторантски център "Св. Климент Охридски"", финансиран от Оперативна програма "Наука и образование за интелигентен растеж", съфинансирана от Европейския съюз чрез Европейските структурни и инвестиционни фондове.

Библиография

1. **Gimpl, G.**, and F. Fahrenholz. **2001**. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, **81**: 629-683.
2. **Ragusa, A.**, and A. Svelato. **2014**. Oxytocin and customization of assistance in labor. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine*, **3**: e030123.
3. **Fredriksson, R.**, M. Lagerström, L. Lundin, and H. Schiöth. **2003**. The G protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, **63**: 1256-1272.
4. **Gloriam, D.**, R. Fredriksson, and H. Schiöth. **2007**. The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics*, **8**: 338.
5. **Vrachnis, N.**, F. Malamas, S. Sifakis, E. Deligeoroglou, and Z. Iliodromiti. **2011**. The Oxytocin - Oxytocin Receptor System and Its Antagonists as Tocolytic Agents. *Int J Endocrinol*, **2011**: 1-8.
6. **Sanborn, B. M.**, C. Y. Ku, S. Shlykov, and L. Babich. **2005**. Molecular signaling through G-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium. *J Soc Gynecol Investig*, **12**: 479-487.
7. **Lee, A. G.**, D. R. Cool, W. C. Grunwald, D. E. Neal, C. L. Buckmaster, M. Y. Cheng, ..., K. J. Parker. **2011**. A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biology Letters*, **7**: 584-587.
8. **Yamashiro, D.**, D. Gillessen, and V. du Vigneaud. **1966**. Oxytoceine and Deamino-oxytoceine*. *Biochemistry*, **5**: 3711-3720.
9. **Borthwick, A. D.** **2006**. Oxytocin Antagonists and Agonists. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **41**: 409-421.

10. **Chatterjee, O.**, K. Patil, A. Sahu, L. Gopalakrishnan, P. Mol, J. Advani, ... T. S. K. Prasad. **2016**. An overview of the oxytocin-oxytocin receptor signaling network. *Journal of Cell Communication and Signaling*, **10**: 355–360.
11. **Sobota, J. A.**, B. A. Eipper, and R. E. Mains. **2009**. Neuropeptide Synthesis and Storage. *Encyclopedia of Neuroscience*, 829–836.
12. **Sahbaz, B. D.**, and N. B. Iyison. **2018**. Neuropeptides as Ligands for GPCRs. *Ligand*. doi:10.5772/intechopen.73504.
13. **Lee, H.-J.**, A. H. Macbeth, J. Pagani, and W. S. Young. **2009**. Oxytocin: The Great Facilitator of Life. *Progress in Neurobiology*, **88**: 127–151.
14. http://www.fredonia.edu/bio241/images/5.19_ER_and_Golgi.jpg
15. **Drenth, J.** **1981**. The Structure of Neurophysin. *The Journal of Biological Chemistry*, **256**: 2601–2602.
16. **Rose, J. P.**, C.-K. Wu, C.-D. Hsiao, E. Breslow, and B.-C. Wang. **1996**. Crystal structure of the neurophysin - oxytocin complex. *Nature Structural Biology*, **3**: 163–169.
17. **Singh, M.** **2011**. Oxytocin: The Cuddle Hormone. *Agricultural research communication centre*, **32**: 295–303.
18. **Walter, R.**, I. L. Schwartz, J. H. Darnell, and D. W. Urry. **1971**. Relation of the Conformation of Oxytocin to the Biology of Neurohypophyseal Hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **68**: 1355–1359.
19. **Nachtmann, F.**, K. Krummen, F. Maxl, and E. Riemer. **1981**. Oxytocin. *Analytical Profiles of Drug Substances*, **10**: 563–596.
20. **Groot, A. N. J. A.**, T. B. Vree, H. V. Hogerzeil, and G. J. A. Walker. **1994**. Stability of oral oxytocics in tropical climates: results of simulation studies on oral ergometrine, oral methylegometrine, buccal oxytocin and buccal desamino-oxytocin. *World Health Organization, Geneva*.
21. **Hawe, A.**, R. Poole, S. Romeijn, P. Kasper, R. van der Heijden, and W. Jiskoot. **2009**. Towards heat-stable oxytocin formulations: analysis of degradation kinetics and identification of

degradation products. *Pharmaceutical Research*, **26**: 1679–1688.

22. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/018261s031lbl.pdf

23. **Avanti, C.**, W. Jiskoot, W. L. J. Hinrichs, and H. W. Frijlink. **2012**. Current strategies for stabilization of therapeutic peptides in aqueous formulations in: Avanti, C., Innovative strategies for stabilization of therapeutic peptides in aqueous formulations. *TIPharma*, pp. 15–31.

24. **Avanti, C.**, J. Amorij, D. Setyaningsih, A. Hawe, W. Jiskoot, J. Visser, A. Kedrov, A. J. M. Driessen, W. L. J. Hinrichs, and H. W. Frijlink. **2011**. A new strategy to stabilize oxytocin in aqueous solutions: i. the effects of divalent metal ions and citrate buffer. *The AAPS Journal*, **13**: 284–311.

25. **Lagerström, M. C.**, and H. B. Schiöth. **2008**. Structural diversity of G protein-coupled receptor and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **7**: 339-357.

26. **Overington, J.P.**, B. Al-Lazikani, and A. L. Hopkins. **2006**. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, **5**: 993-996.

27. **Svoboda, P.**, J. Teisinger, J. Novotny, L. Bourova, T. Drmota, L. Hejnova, Z. Moravcova, V. Lisy, V. Rudajev, J. Stöhr, A. Vokurkova, I. Svandova, and D. Durchankova. **2004**. Biochemistry of transmembrane signalling mediated by trimeric G proteins. *Physiol Res*, **53**: S141-S152.

28. **Lomize, A. L.**, I. D. Pogozheva, and H. I. Mosberg. **1999**. Structural organization of G - protein coupled receptors. *J Comput Aided Mol Des*, **13**: 325-353.

29. **Böhm, Hans-Joachim**, G. Klebe, and H. Kubinyi. **1996**. Wirkstoffdesign Der Weg zum Arzneimittel, 1st edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. ISBN **13**:978-3827413536

30. **Farrens, D. L.**, C. Altenbach, K. Yang, W. L. Hubbell, and H. G. Khorana. **1996**. Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science*, **274**: 768-770.

31. **Kobilka, B. K.**, and U. Gether. **2002**. Use of fluorescence spectroscopy to study conformational changes in the beta 2-adrenoceptor. *Methods Enzymol*, **343**: 170-182.

32. **Swaminath, G.**, Y. Xiang, T. W. Lee, J. Steenhuis, C. Parnot, and B. K. Kobilka. **2004**. Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J Biol Chem*, **279**: 686-691.
33. **Villardaga, J. P.**, M. Bunemann, C. Krasel, M. Castro, and M. J. Lohse. **2003**. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol*, **21**: 807-812.
34. **Schwartz, T. W.**, T. M. Frimurer, B. Holst, M. M. Rosenkilde, and C. E. Elling. **2006**. Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **46**: 481-519.
35. **Shi, L.**, G. Liapakis, R. Xu, F. Guarnieri, J. A. Ballesteros, and J. A. Javitch. **2002**. Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J Biol Chem*, **277**: 40989-40996.
36. **Yao, X.**, C. Parnot, X. Deupi, V. R. Ratnala, G. Swaminath, D. Farrens, and B. Kobilka. **2006**. Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. *Nat Chem Biol*, **2**: 417-422.
37. **Liang, Y.**, D. Fotiadis, S. Filipek, D. A. Saperstein, K. Palczewski, and A. Engel. **2003**. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem*, **278**: 21655-21662.
38. **Prinster, S. C.**, C. Hague, and R. A. Hall. **2005**. Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev*, **57**: 289-298.
39. **Kunishima, N.**, Y. Shimada, Y. Tsuji, T. Sato, M. Yamamoto, T. Kumasaka, S. Nakanishi, H. Jingami, and K. Morikawa. **2000**. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, **407**: 971-977.
40. **Oldham, W. M.**, and H. E. Hamm. **2008**. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**: 60-71.
41. **Downes, G. B.**, and N. Gautam. **1999**. The G protein subunit gene families. *Genomics*, **62**: 544-552.
42. **Simon, M. I.**, M. P. Strathmann, and N. Gautam. **1991**. Diversity of G proteins in signal

transduction. *Science*, **252**: 802–808.

43. **Siderovski D. P.**, A. J. Kimple, and F. S. Willard. **2009**. Large G-Proteins. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, **4**: 1734-1742, ISBN: 978-0-471-75477-0.

44. **Milligan, G.**, and E. Kostenis. **2009**. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*, **147**(S1): S46–S55.

45. **Inoue, T.**, T. Kimura, C. Azuma, J. Inazawa, M. Takemura, T. Kikuchi, Y. Kubota, K. Ogita, and F. Saji. **1994**. Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem*, **269**: 32451–32456.

46. **Akhundova, A.**, E. Getmanova, V. Gorbulev, E. Carnazzi, P. Eggena, and F. Fahrenholz. **1996**. Cloning and Functional Characterization of the Amphibian Mesotocin Receptor, a Member of the Oxytocin/Vasopressin Receptor Superfamily. *European Journal of Biochemistry*, **237**: 759–767.

47. **Hausmann, H.**, W. Meyerhof, H. Zwiers, K. Lederis, and D. Richter. **1995**. Teleost isotocin receptor: structure, functional expression, mRNA distribution and phylogeny. *FEBS Letters*, **370**: 227–230.

48. **Barberis, C.** **1998**. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *Journal of Endocrinology*, **156**: 223–229.

49. **Mouillac, B.**, B. Chini, M.-N. Balestre, J. Elands, S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack, ... C. Barberis. **1995**. The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions. *Journal of Biological Chemistry*, **270**: 25771–25777.

50. **Postina, R.**, E. Kojro, and F. Fahrenholz. **1996**. Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V2 vasopressin receptor. *J Biol Chem*, **271**: 31593–31601.

51. **Fanelli, F.**, P. Barbier, D. Zanchetta, P. De Benedetti, and B. Chini. **1999**. Activation mechanism of human oxytocin receptor: a combined study of experimental and computer simulated mutagenesis. *Mol Pharmacol*, **56**: 214–225.

52. **Koebach, J.**, T. Stockner, C. Bergmayr, M. Muttenthaler, and C. Gruber. **2013**. Insights

into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *Biochem Soc Trans*, **41**: 197–204.

53. Sluzars, M. J., R. Sluzars, and J. Ciarkowski. 2006. Molecular dynamics simulation of human neurohypophyseal hormone receptors complexed with oxytocin – modeling of an activated state. *J Pept Sci*, **12**: 171–179.

54. Liu, D., A. Seuthe, O. Ehrler, X. Zhang, T. Wyttenbach, J. Hsu, and M. Bowers. 2005. Oxytocin - Receptor Binding: Why Divalent Metals Are Essential. *JACS Communications*, **127**: 2024–2025.

55. Kojro, E., P. Eich, G. Gimpl, and F. Fahrenholz. 1993. Direct identification of an extracellular agonist binding site in the renal V2 vasopressin receptor. *Biochemistry*, **32**: 13537–13544.

56. Elands, J., C. Barberis, S. Jard, E. Tribollet, J.-J. Dreifuss, K. Bankowski, ... W. H. Sawyer. 1988. 125I-labelled d(CH₂)₅[Tyr(Me)₂,Thr₄,Tyr-NH₂]₉OVT: a selective oxytocin receptor ligand. *European Journal of Pharmacology*, **147**: 197–207.

57. <https://www.creative-diagnostics.com/oxytocin-signaling-pathway.htm>

58. Arrowsmith, S., and S. Wray. 2014. Oxytocin: Its Mechanism of Action and Receptor Signalling in the Myometrium. *Journal of Neuroendocrinology*, **26**: 356–369.

59. Al Otaibi, M. 2014. The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion. *Calcium Signaling*, **1**: 70–75.

60. Viero, C., I. Shibuya, N. Kitamura, A. Verkhatsky, H. Fujihara, A. Katoh, ... G. Dayanithi. 2010. Oxytocin: Crossing the Bridge between Basic Science and Pharmacotherapy. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, **16**: e138–e156.

61. Fang, X., S. Wong, and B. Mitchell. 1996. Relationships among sex steroids, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation and at parturition. *Endocrinology*, **137**: 3213–3219.

62. Fang, X., S. Wong, and B. Mitchell. 1997. Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation. *Endocrinology*, **138**: 2763–2768.

63. **Murata, T.**, E. Murata, C. Liu, K. Narita, K. Honda, and T. Higuchi. **2000**. Oxytocin receptor gene expression in rat uterus: regulation by ovarian steroids. *The Journal of Endocrinology*, **166**: 45–52.
64. **Nelson, D.**, and M. Cox. **Fourth edition**. Lehninger Principles of Biochemistry. *University of Wisconsin–Madison*, 1–1119.
65. **Fahrenholz, F.**, U. Klein, and G. Gimpl. **1995**. Conversion of the myometrial oxytocin receptor from low to high affinity state by cholesterol. *Advances in experimental medicine and biology*, **395**: 311–319.
66. **Gimpl, G.**, and F. Fahrenholz. **2002**. Cholesterol as stabilizer of the oxytocin receptor. *Biochimica et biophysica acta*, **1564**: 384–392.
67. **Luttrell, L.**, and R. Lefkowitz. **2002**. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G Protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science*, **115**: 455–465.
68. **Xu, X.**, Z. Huang, and Z. Lin. **2010**. Comprehensive Density Functional Theory Study on the Mechanism of Activation of the Nonapeptide Hormone Oxytocin by Metal Ions. *The Journal of Physical Chemistry B*, **114**: 1417–1423.
69. **Wytenbach, T.**, D. Liu, and M. Bowers. **2008**. Interactions of the Hormone Oxytocin with Divalent Metal Ions. *Journal of the American Chemical Society*, **130**: 5993–6000.
70. **Brandt, E.**, M. Hellgren, T. Brinck, T. Bergman, and O. Edholm. **2009**. Molecular dynamics study of zinc binding to cysteines in a peptide mimic of the alcohol dehydrogenase structural zinc site. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**: 975–983.
71. **Laitaoja, M.**, J. Valjakka, and J. Jänis. **2013**. Zinc Coordination Spheres in Protein Structures. *Inorganic Chemistry*, **52**: 10983–10991.
72. **Stote, R.**, and M. Karplus. **1995**. Zinc binding in proteins and solution: A simple but accurate nonbonded representation. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **23**: 12–31.
73. **Dudev, T.**, and C. Lim. **2000**. Tetrahedral vs Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest: A DFT/CDM Study. *Journal of the American Chemical Society*, **122**: 11146–11153.

74. **Hakala, J. 1994.** Modeling the Peptide Receptor Interaction: Selectivity of the Oxytocin Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **202**: 1569–1573.
75. **Kleinnijenhuis, A., R. Mihalca, R. Heeren, and A. Heck. 2006.** Atypical behavior in the electron capture induced dissociation of biologically relevant transition metal ion complexes of the peptide hormone oxytocin. *International Journal of Mass Spectrometry*, **253**: 217–224.
76. **Nussey, S., and S. Whitehead. 2001.** Endocrinology: An Integrated Approach. *BIOS Scientific Publishers*.
77. **Voet, D., and J. G. Voet. 2011.** Biochemistry. *Wiley, New York*, **4th edn.**
78. **Stevenson, M., K. Uyeda, N. Harder, and M. Heffern. 2018.** Metal-dependent hormone function: the emerging interdisciplinary field of metalloendocrinology. *Metallomics*.
79. **Lee, E., E. Ha, S. Singh, L. Legesse, S. Ahmad, E. Karnaukhova, R. Donaldson, and A. Jeremic. 2013.** Copper(II)–human amylin complex protects pancreatic cells from amylin toxicity. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**: 12558.
80. **O’Halloran, T., M. Kebede, S. Philips, and A. Attie. 2013.** Zinc, insulin, and the liver: a me´nage a` trois. *J. Clin. Invest.*, **123**: 4136–4139.
81. **Pearlmutter, A., and M. Soloff. 1979.** Characterization of the metal ion requirement for oxytocin–receptor interaction in rat mammary gland membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **254**: 3899–3906.
82. **Chang, C. 2015.** Searching for harmony in transition-metal signaling. *Nat. Chem. Biol.*, **11**: 744–747.
83. **O’Halloran, T., and V. Culotta. 2000.** Metallochaperones, an Intracellular Shuttle Service for Metal Ions. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 25057–25060.
84. **Danyi, P., K. Várnagy, I. Sóvágó, I. Schön, D. Sanna, and G. Micera. 1995.** Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of peptide hormones containing disulfide bridges. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **60**: 69–78.
85. **Alder, B., and T. Wainwright. 1957.** Phase Transition for a Hard Sphere System. *The Journal of Chemical Physics*, **27**: 1208–1209.

86. **Leach, A. 2001.** *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2nd edn. Prentice-Hall.
87. **Frenkel, D., and B. Smit. 2002.** *Understanding Molecular Simulation*. 2nd edn. Academic Press, San Diego.
88. **Cramer, C. 2004.** *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. 2nd edn. John Wiley & Sons Ltd, ISBN: 978-0-470-09182-1.
89. **Gupta, S., and P. Varadwaj. 2018.** A brief overview on molecular dynamics simulation of biomolecular system: procedure, algorithms and applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* , **9**: 1333–1350.
90. **Meller, J. 2001.** Molecular Dynamics. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–8.
91. **González, M. 2011.** Force fields and molecular dynamics simulations. *EDP Sciences*, **12**: 169–200.
92. **Abraham, M., B. Hess, D. van der Spoel, E. Lindahl, ..., M. Wolf. 2014.** GROMACS User Manual version 5.0.4., www.gromacs.org.
93. **Darden, T., D. York, and L. Pedersen. 1993.** Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, **98**: 10089–10092.
94. **Вайсилов, Г., И. Иванов, И. Дойчинова, К. Кирилов, Л. Литов и П. Петков. 2012.** Суперкомпютърни приложения в природните науки (сборник - лекции), ISBN: 978-954-92937-1-5.
95. **Rose, P., A. Prlic, A. Altunkaya, ..., S. Burley. 2017.** The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Research*, **45** (Database issue): D271–D281.
96. **Hess, B., H. Bekker, H. Berendsen, and J. Fraaije. 1997.** LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, **18**: 1463–1472.
97. **Berendsen, H., J. Postma, ..., J. Haak. 1984.** Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, **81**: 3684–3690.
98. **Bussi, G., D. Donadio, and M. Parrinello. 2007.** Canonical sampling through velocity

rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, **126**, 014101.

99. Parrinello, M., and A. Rahman. **1981.** Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, **52**: 7182–7190.

100. Berendsen, H., D. van der Spoel, and R. van Drunen. **1995.** GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, **91**: 43–56.

101. Caffrey, M. **2003.** Membrane protein crystallization. *Journal of Structural Biology*, **142**: 108–132.

102. Krieger, E., S. Nabuurs, and G. Vriend. **2003.** Homology modeling. *Structural Bioinformatics*, **25**: 507–521.

103. Wieman, H., K. Tøndel, E. Anderssen, and F. Drabløs. **2004.** Homology - Based Modelling of Targets for Rational Drug Design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **4**: 793–804.

104. Webb, B., and A. Sali. **2014.** Protein Structure Modeling with MODELLER. *Protein Structure Prediction*, **1137**: 1–15.

105. Halip, L., A. Cruia, A. Borota, Maria Mracec, R. Curpan, and Mircea Mracec. **2012.** 3D Homology model of the α_2c -adrenergic receptor subtype. *Revue Roumaine de Chimie*, **57**: 763–768.

106. Chandramore, K. **2017.** Homology modeling of subcutaneous filariasis DHFR proteins. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, **9**: 76–78.

107. Venselaar, H., R. Joosten, B. Vroiling, C. Baakman, M. Hekkelman, E. Krieger, and G. Vriend. **2009.** Homology modelling and spectroscopy, a never-ending love story. *European Biophysics Journal*, **39**: 551–563.

108. Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers, and D. Lipman. **1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**: 403–410.

109. NCBI Resource Coordinators. **2015.** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, **43** (Database issue): D6–17.

110. **Shen, M.,** and A. Sali. **2006.** Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, **15**: 2507–2524.
111. **Carugo, O.** **2003.** How root-mean-square distance (r.m.s.d.) values depend on the resolution of protein structures that are compared. *Journal of Applied Crystallography*, **36**: 125–128.
112. **Davis, I.,** A. Leaver-Fay, V. Chen, J. Block, G. Kapral, X. Wang, ..., D. Richardson. **2007.** MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, **35**(Web Server): W375–W383.
113. **Sali, A.,** and T. Blundell. **1993.** Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, **234**: 779–815.
114. **Brooks, B.,** C. Brooks, A. Mackerell, L. Nilsson, R. Petrella, B. Roux, ..., M. Karplus. **2009.** CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, **30**: 1545–1614.
115. **Hoops, S.,** K. Anderson, and K. Merz. **1991.** Force field design for metalloproteins. *Journal of the American Chemical Society*, **113**: 8262–8270.
116. **Meng, X.-Y.,** H.-X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui. **2011.** Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, **7**: 146–157.
117. **Banaganapalli, B.,** F. Morad, M. Khan, C. Kumar, R. Elango, Z. Awan, and N. Shaik. **2019.** Molecular Docking. *Essentials of Bioinformatics*, **1**: 335–353.
118. **Morris, G.,** R. Huey, W. Lindstrom, M. Sanner, R. Belew, D. Goodsell, and A. Olson. **2009.** AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, **30**: 2785–2791.
119. **Cerqueira, N.,** J. Ribeiro, P. Fernandes, and M. Ramos. **2010.** vsLab-An implementation for virtual high-throughput screening using AutoDock and VMD. *International Journal of Quantum Chemistry*, **111**: 1208–1212.
120. **Humphrey, W.,** A. Dalke, and K. Schulten. **1996.** VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, **14**: 33–38.

121. **Gilson, M.**, K. Sharp, and B. Honig. **1988**. Calculating the electrostatic potential of molecules in solution: Method and error assessment. *Journal of Computational Chemistry*, **9**: 327–335.
122. **Genheden, S.**, and U. Ryde. **2015**. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **10**: 449–461.
123. **Kumari, R.**, R. Kumar, and A. Lynn. **2014**. g_mmpbsa—A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **54**: 1951–1962.
124. **Durrant, J.**, and J. McCammon. **2011**. HBonanza: A computer algorithm for molecular-dynamics-trajectory hydrogen-bond analysis. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **31**: 5–9.
125. **Koebach, J.**, M. O'Brien, M. Muttenthaler, M. Miazzo, M. Akcan, A. Elliott, ..., C. Gruber. **2013**. Oxytocic plant cyclotides as templates for peptide G protein-coupled receptor ligand design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**: 21183–21188.
126. **Pang, Y.**, K. Xu, J. Yazal, and F. Prendergas. **2000**. Successful molecular dynamics simulation of the zinc-bound farnesyltransferase using the cationic dummy atom approach. *Protein Science*, **9**: 1857–1865.
127. **Roe, R.**, and Y. Pang. **1999**. Zinc's Exclusive Tetrahedral Coordination Governed by Its Electronic Structure. *Journal of Molecular Modeling*, **5**: 134–140.
128. **Abraham, M.**, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. Smith, B. Hess, and E. Lindahl. **2015**. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, **1-2**: 19–25.
129. **Huang, J.**, and A. MacKerell. **2013**. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, **34**: 2135–2145.
130. **Jorgensen, W.**, J. Chandrasekhar, J. Madura, R. Impey, and M. Klein. **1983**. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, **79**: 926–935.

131. **Steinbach, P.**, and B. Brooks. **1994**. New spherical-cutoff methods for long-range forces in macromolecular simulation. *Journal of Computational Chemistry*, **15**: 667–683.
132. **Turner, P.** **2005**. XMGRACE, Version 5.1.19. *Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR*.
133. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000907.2?report=fasta&log\\$=seqview](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000907.2?report=fasta&log$=seqview)
134. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LI_LOC=blasthome
135. **Yeagle, P.**, G. Choi, and A. Albert. **2001**. Studies on the Structure of the G-Protein-Coupled Receptor Rhodopsin Including the Putative G-Protein Binding Site in Unactivated and Activated Forms. *Biochemistry*, **40**: 11932–11937.
136. **Sali, A.**, B. Webb, M. Madhusudhan, ..., E. Feyfant. **2014**. MODELLER: A Program for Protein Structure Modeling, Release 9.14, r10167, <http://salilab.org/modeller/>.
137. **Madhusudhan, M.**, M. Marti-Renom, M. Sanchez, and A. Sali. **2006**. Variable gap penalty for protein sequence–structure alignment. *Protein Engineering, Design and Selection*, **19**: 129–133.
138. **Racine, J.** **2006**. gnuplot 4.0: a portable interactive plotting utility. *Journal of Applied Econometrics*, **21**: 133–141.
139. **Carroll, P.**, and D. Sereda. **1968**. Cell Membrane of Uterine Smooth Muscle. *Nature*, **217**: 666–667.
140. **Jo, S.**, T. Kim, and W. Im. **2007**. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE*, **2**: e880.
141. **Jo, S.**, J. Lim, J. Klauda, and W. Im. **2009**. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophysical Journal*, **97**: 50–58.
142. **Woolf, T.**, and B. Roux. **1996**. Structure, energetics, and dynamics of lipid–protein interactions: A molecular dynamics study of the gramicidin A channel in a DMPC bilayer. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **24**: 92–114.
143. **Woolf, T.**, and B. Roux. **1994**. Molecular dynamics simulation of the gramicidin channel

in a phospholipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 11631–11635.

144. **Schlegel, B.**, W. Sippl, and H.-D. Höltje. **2005**. Molecular dynamics simulations of bovine rhodopsin: influence of protonation states and different membrane-mimicking environments. *Journal of Molecular Modeling*, **12**: 49–64.

145. **Kozłowski, H.**, B. Radomska, G. Kupryszewski, B. Lammek, C. Livera, L. Pettit, and S. Pyburn. **1989**. The unusual co-ordination ability of vasopressin-like peptides; potentiometric and spectroscopic studies of some copper(II) and nickel(II) complexes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, **1**: 173–177.

146. **Bal, W.**, H. Kozłowski, B. Lammek, L. Pettit, and K. Rolka. **1992**. Potentiometric and spectroscopic studies of the Cu(II) complexes of Ala-Arg8-vasopressin and oxytocin: Two vasopressin-like peptides. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **45**: 193–202.

147. **Strader, C.**, T. Fong, M. Tota, D. Underwood, and R. Dixon. **1994**. Structure and Function of G Protein-Coupled Receptors. *Annual Review of Biochemistry*, **63**: 101–132.

148. **Weiss, J.**, P. Morgan, M. Lutz, and T. Kenakin. **1996**. The Cubic Ternary Complex Receptor-Occupancy Model III. Resurrecting Efficacy. *Journal of Theoretical Biology*, **181**: 381–397.

149. **Rubenstein, L.**, and R. Lanzara. **1998**. Activation of G protein-coupled receptors entails cysteine modulation of agonist binding. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, **430**: 57–71.

150. **Mirzadegan, T.**, G. Benko, S. Filipek, and K. Palczewski. **2003**. Sequence analyses of G protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry*, **42**: 2759–2767.

151. **Ballesteros, J.**, A. Jensen, G. Liapakis, S. Rasmussen, L. Shi, U. Gether, and J. Javitch. **2001**. Activation of the β 2-Adrenergic Receptor Involves Disruption of an Ionic Lock between the Cytoplasmic Ends of Transmembrane Segments 3 and 6. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 29171–29177.

152. **Chini, B.**, and F. Fanelli. **2000**. Molecular basis of ligand binding and receptor activation in the oxytocin and vasopressin receptor family. *Experimental Physiology*, **85**: 59S–66S.

153. **Ramachandran, G.**, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan. **1963**. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, **7**: 95–99.
154. **Lovell, S.**, I. Davis, W. Arendall, P. de Bakker, J. Word, M. Prisant, ... , D. Richardson. **2003**. Structure validation by Ca geometry: ϕ, ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **50**: 437–450.
155. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B0_%D0%A0%D0%B0%D0%BC%D0%B0%D1%87%D0%B0%D0%BD%D0%B4%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B0#/media/Файл:Protein_backbone_PhiPsiOmega_drawing.jpg
156. https://en.wikipedia.org/wiki/Ramachandran_plot#/media/File:Ramachandran_plot_general_100K.jpg
157. **Li, T.**, P. Wang, S. Wang, and Yu-Feng Wang. **2017**. Approaches Mediating Oxytocin Regulation of the Immune System. *Frontiers in Immunology*, **7**: 1–9.
158. **Wang, Yu-Feng**. **2016**. Center Role of the Oxytocin-Secreting System in Neuroendocrine-Immune Network Revisited. *J Clin Exp Neuroimmunol*, **1**: 1–7.
159. **Johnson, H.**, and B. Torres. **1985**. Regulation of lymphokine production by arginine vasopressin and oxytocin: modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones. *J Immunol*, **135**: 773s–775s.
160. **Stralin, P.**, and S. Marklund. **2001**. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**: H1621–H1629.
161. **Collins, L.**, and L. Troeberg. **2018**. Heparan sulfate as a regulator of inflammation and immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 1–12.
162. **Young, H.**, and D. Hodge. **2003**. Interferon- γ . *Encyclopedia of Hormones*, 391–397.
163. **Ealick, S.**, W. Cook, S. Vijay-Kumar, M. Carson, ..., and C. Bugg. **1991**. Three-dimensional structure of recombinant human interferon- γ . *Science*, **252**: 698–702.
164. **Altobelli, G.**, G. Nacheva, K. Todorova, I. Ivanov, and A. Karshikoff. **2001**. Role of the C-terminal chain in human interferon- γ stability: An electrostatic study. *PROTEINS*:

Structure, Function, and Genetics, **43**: 125–133.

165. **Thiel, D.**, M-H. le Du, R. Walter, A. D'Arcy, C. Chène, ..., and S. Ealick. **2000**. Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon- γ receptor complex. *Structure*, **8**: 927–936.

166. **Lortat-Jacob, H.**, C. Brisson, S. Guerret, and G. Morel. **1996**. Non-receptor-mediated tissue localization of human interferon-gamma: role of heparan sulfate/heparin-like molecules. *Cytokine*, **8**: 557–566.

167. **Walter, M.**, W. Windsor, T. Nagabhushan, ..., and S. Narula. **1995**. Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high-affinity receptor. *Nature*, **376**: 230–235.

168. **Haelewyn, J.**, L. Michiels, P. Verhaert, ..., and M. Ley. **1997**. Interaction of truncated human interferon- γ variants with the interferon- γ receptor: crucial importance of Arg-129. *Biochemical Journal*, **324**: 591–595.

169. **Lundell, D.**, C. Lunn, D. Dalgarno, J. Fossetta, ..., and S. Narula. **1991**. The carboxyl-terminal region of human interferon γ is important for biological activity: mutagenic and NMR analysis. *Protein Engineering, Design and Selection*, **4**: 335–341.

170. **Döbeli, H.**, R. Gentz, W. Jucker, G. Garotta, D. Hartmann, and E. Hochuli. **1988**. Role of the carboxy-terminal sequence on the biological activity of human immune interferon (IFN- γ). *Journal of Biotechnology*, **7**: 199–216.

171. **Sadir, R.**, and H. Lortat-Jacob. **1998**. The Heparan Sulfate Binding Sequence of Interferon- γ Increased the On Rate of the Interferon- γ -Interferon- γ Receptor Complex Formation. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 10919–10925.

172. **Lortat-Jacob, H.**, and J-A. Grimaud. **1991**. Interferon- γ binds to heparan sulfate by a cluster of amino acids located in the C-terminal part of the molecule. *FEBS Letters*, **280**: 152–154.

173. **Saesen, E.**, S. Sarrazin, C. Laguri, R. Sadir, D. Maurin, A. Thomas, A. Imberty, and H. Lortat-Jacob. **2013**. Insights into the Mechanism by Which Interferon- γ Basic Amino Acid Clusters Mediate Protein Binding to Heparan Sulfate. *Journal of the American Chemical Society*, **135**: 9384–9390.

174. **Gallagher, J.**, M. Lyon, and W. Steward. **1986**. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochemical Journal*, **236**: 313–325.
175. **Lortat-Jacob, H.**, and J-A. Grimaud. **1992**. Binding of interferon- γ to heparan sulphate is restricted to the heparin-like domains and involves carboxylic - but not N-sulfated - groups. *Biochim Biophys Acta*, **1117**: 126–130.
176. **Cagno, V.**, E. Tseligka, S. Jones, and C. Tapparel. **2019**. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias?. *Viruses*, **11**: 1–24.
177. **Schrodinger, L.** **2010**. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
178. **Emsley, P.**, and K. Cowtan. **2004**. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D*, **60**: 2126–2132.
179. **Lortat-Jacob, H.**, J. Turnbull, and J-A. Grimaud. **1995**. Molecular organization of the interferon- γ -binding domain in heparan sulphate. *Biochem. J.*, **310**: 497–505.
180. **Vanhaverbeke, C.**, J-P. Simorre, R. Sadir, P. Gans, and H. Lortat-Jacob. **2004**. NMR characterization of the interaction between the C-terminal domain of interferon- γ and heparin-derived oligosaccharides. *Biochemical Journal*, **384**: 93–99.
181. **Park, S-J.**, J. Lee, Y. Qi, N. Kern, H. Lee, S. Jo, ..., and W. Im. **2019**. CHARMM-GUI Glycan Modeler for modeling and simulation of carbohydrates and glycoconjugates. *Glycobiology*, **29**: 320–331.
182. **Guvench, O.**, S. Mallajosyula, E. Raman, E. Hatcher, ..., and A. MacKerell. **2011**. CHARMM Additive All-Atom Force Field for Carbohydrate Derivatives and Its Utility in Polysaccharide and Carbohydrate–Protein Modeling. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **7**: 3162–3180.
183. **Hess, B.** **2008**. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **4**: 116–122.
184. **McGibbon, R.**, K. Beauchamp, M. Harrigan, ..., and V. Pande. **2015**. MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories. *Biophysical Journal*, **109**: 1528–1532.