

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

**ФИЗИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "АТОМНА ФИЗИКА"**

АВТОРЕФЕРАТ

на 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.

Авторката е редовен докторант в катедра "Атомна физика" на Физически факултет на Софийски университет "Св. Климент Охридски".

Дисертацията се състои от списък със съкращения, увод, шест глави, заключение, научни приноси, списък с научните статии, въз основа на които е написан труда, благодарности и библиография. Написана е на 137 страници и съдържа 1 таблица и 58 фигури. Библиографията е съставена от 184 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на катедра "Атомна физика" на Физически факултет на Софийски университет "Св. Климент Охридски" на11.2022 г.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на в аудитория във Физически факултет на Софийски университет "Св. Климент Охридски" пред научно жури в следния състав:

Съдържание

Цели и структура на дисертацията	1
1 Въведение	3
2 Компютърно моделиране на биологични макромолекули и методи за анализ на получените резултати	9
3 Изследване на стабилността на комплекса окситоцин – двувалентен цинк във воден разтвор с молекулна динамика	16
4 Изграждане на 3D структура на човешки окситоцинов рецептор чрез хомоложно моделиране	26
5 Изследване на взаимодействието между пептидният хормон окситоцин и неговия рецептор с молекулна динамика	34
6 Хепаран сулфат като помощна молекула за успешното свързване между човешкия интерферон гама и неговия извънклетъчен рецептор INFγR1	43
Научни приноси	53
Научни публикации, въз основа на които е написана дисертацията	55
Благодарности	56
Библиография	57

Цели и структура на дисертацията

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 инициирането 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

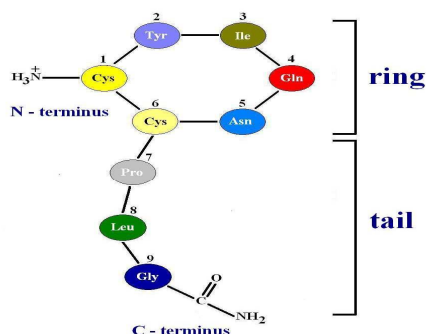
1.1. Хормонът окситоцин и неговия рецептор

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. 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].

Окситоцинът осъществява функциите си чрез взаимодействие със специфичен рецептор, който принадлежи към родопсиновата група 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.

Окситоцинът е изграден от девет аминокиселинни остатъка: Cysteine-Tyrosine-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. 1) [1].



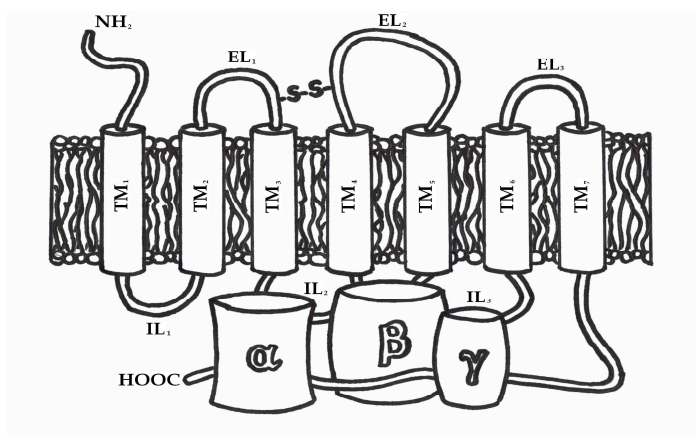
Фигура 1. Структура на окситоцин.

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 - Ile3 - Gln4 - Asn5 - Cys6) се състои от полярни аминокиселини, с изключение на Ile3, 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 - биологично активна и биологично неактивна. 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 [7]. 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 [8, 9]. Времето на полуживот на окситоцина в кръвта е от 3 до 5 минути [10]. 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 [11].

Окситоциновият рецептор е трансмембранен протеин от групата на родопсина, най-голямата и най-разнообразна подгрупа, на рецепторите, свързани с G протеин (GPCRs) [3, 4]. 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 С - край е разположен във вътреклетъчната течност (цитозол) на клетката. С - крайната част на рецептора участва във взаимодействие с цитозолни G протеини, чието име произлиза от това, че те са свързани с гуанинови нуклеотиди. Класът на гуанин - нуклеотид свързаните протеини (G протеини) инициира някои от важните сигнални пътища в клетката. Важна роля в опаковането и стабилизирането на седемте ТМ домена на почти всички GPCRs, играе дисулфидна връзка, която се образува между два цистеинови аминокиселинни остатъка, разположени в извънклетъчния край на TM3/EL1 и EL2 (Фиг. 2) [12, 13].



Фигура 2. Структура на рецептор, свързан с G протеин.

Други общи 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 [3, 14]. 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. Въпреки тези разлики е открита значителна хомология на аминокиселинната последователност при GPCRs [13]. Семейството на родопсините, към което принадлежи и окситоциновия рецептор, е най – голямата подгрупа на тези рецептори, като за членовете му са характерни 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 [15].

GPCRs предават извънклетъчните сигнали към вътреклетъчни мишени след свързване на лиганди (напр. окситоцин) към тяхната извънклетъчна част. Това от своя страна предизвиква конформационни промени в рецептора и активира G протеина [13]. 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). Експериментални данни показват, че при активиране на рецептора вътреклетъчните части на трансмембранните спирали, особено TM6 и TM3/7, се раздалечават [16, 17, 18, 19], а извънклетъчните части се доближават една към друга. По този начин рецепторът се стабилизира в неговото активно състояние (R^*) [20, 21]. Свързването на лиганда, активира както рецептора, така и разположеният във вътреклетъчната среда G протеин. G протеинът е хетеротримерен мембранен белтък, който е свързан с гуанин нуклеотид и е изграден от три субединици - α , β и γ [22].

Поради хомологията в аминокиселинната последователност за членовете на родопсиновото семейство са характерни както общи, така и специфични места на контакт с техните лиганди [23, 24]. 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 лиганди (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) [1, 25, 26, 27, 28, 29]. Експериментални данни показват важната роля на аминокиселината Pe3 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). Пространствената ориентация на три аминокиселинни остатъка в окситоцина (Pe3, 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) [27, 30, 31, 32].

Основният път на предаване на извънклетъчния сигнал към вътреклетъчните мишени след свързването на лиганда (агонист) към рецептора е свързан с активирането на $G\alpha$ субединицата на G протеина. Тази субединица активира ензима фосфолипаза C (PLC), който разгражда 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 и предизвиква освобождаването на калциеви йони (Ca^{2+}) 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 в плазмената мембрана, в резултат на което се увеличава концентрацията на калциевите йони в клетката. Освободените Ca^{2+} във вътреклетъчната среда се свързват с белтъка калмодулин, а получения комплекс Ca^{2+} - калмодулин активира ензим, отговорен за фосфорилирането на леката верига на белтъка миозин. Това води до свързване на миозина с белтъка актин и до контракция на гладката мускулатура на матката. Другият липидоразтворим вторичен посредник DAG има активиращо действие по отношение на протеинкиназа C (PKC), разположена в плазмената мембрана, чиято роля е свързана с фосфорилирането на определени клетъчни белтъци. Съществуват и два допълнителни вътреклетъчни пътя за сигнализация, като митоген-активирана протеин киназна каскада (MAPK) и RhoA/ROK каскада, които също завършват със съкращаване на гладката мускулатура на матката [5, 33, 34, 35, 36].

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

Установено е, че за да осъществи физиологичните си функции в организма, окситоцинът трябва да бъде активиран (биотрансформиран) с помощта на метални йони. Естественото състояние на пептида е неговата протонирана форма, в която N - крайната аминогрупа 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 аминокгрупа, разположена към външната повърхност на молекулата. Това от своя страна позволява ефективното взаимодействие на N - края на хормона с киселинен остатък от рецептора [37].

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+} [31, 38]. Но тяхното изследване не предоставя данни за стабилността на този комплекс във воден разтвор. Окситоцинът е пептид без карбоксилни групи, но съдържа амидни групи. Установено е, че двувалентните метални йони се свързват с амидния кислороден атом. Двувалентният цинков йон може да координира шест основни групи в почти октаедрична координационна сфера (6O хелатиране), като N - крайната аминокгрупа в молекулата на окситоцина също е лиганд [38]. 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, молекулният 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 [31, 38, 39, 40, 41]. 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 [38].

Глава 2

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

2.1. Молекулна динамика

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 [42, 43, 44]. 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, а движението на електроните му се пренебрегва. В молекулната динамика взаимодействията между ядрата на отделните атоми се представят с потенциална функция, т. нар. силово поле, което е приближение на повърхнината на потенциалната енергия в основно състояние [45]. Микросъстоянието описва конкретна конфигурация на системата $(\{\mathbf{r}_i\}, \{\mathbf{v}_i\})$, $i = 1, \dots, N$, с N брой атоми в нея, като всеки атом се характеризира с $3N$ координати и $3N$ скорости.

За да се изследва динамиката на система от молекули е необходимо да се проследи еволюцията във времето на координатите и скоростите на атомите от системата, което се постига чрез интегриране на уравненията за движение на Нютон. 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. Към изследваната система могат допълнително да се включат термостат и / или баростат, ако се налага да се поддържат постоянна температура и / или налягане. След

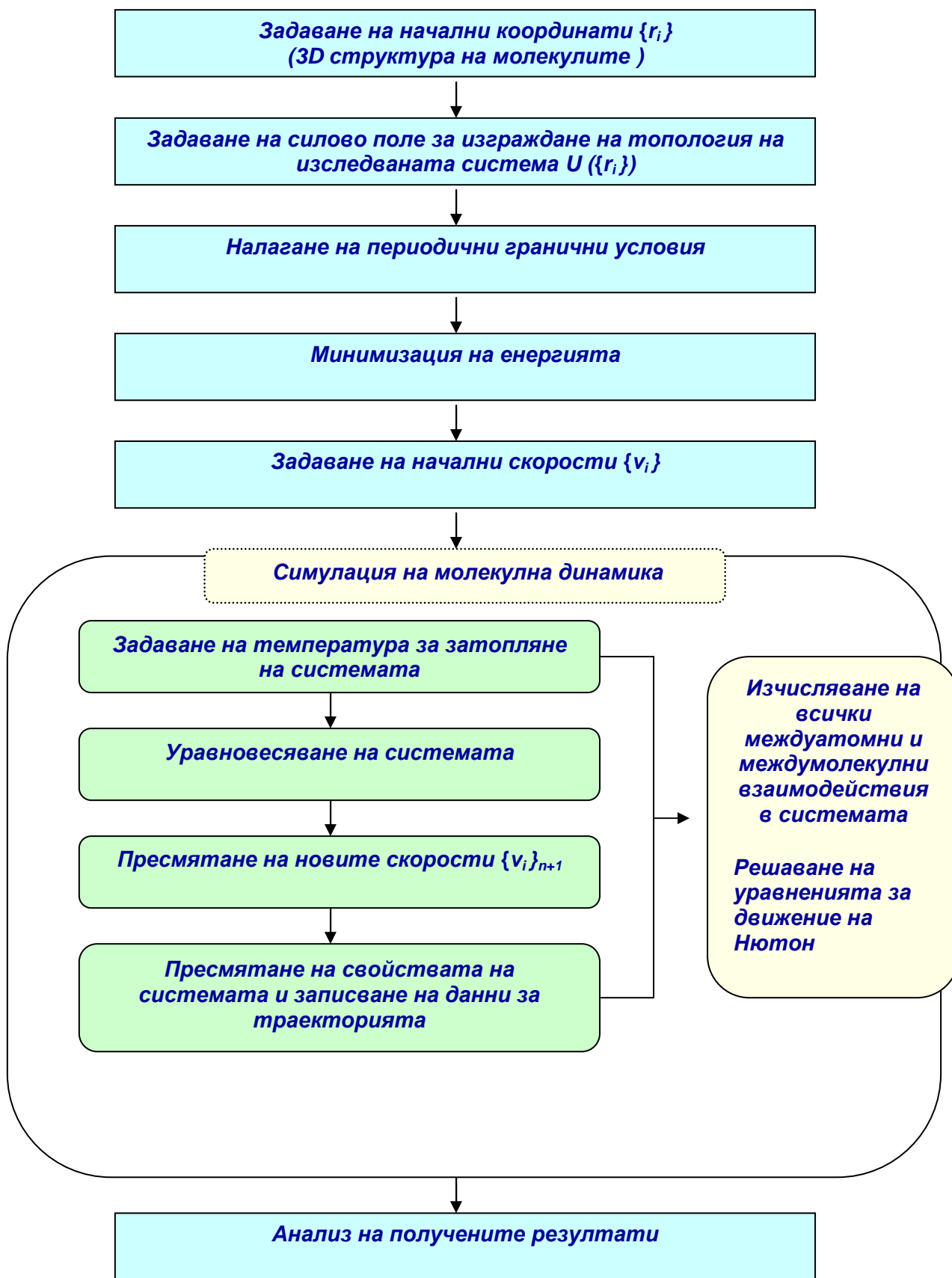
определен период от време системата достига до състояние на равновесие, а пресметнатите ѝ макроскопични свойства се представят чрез анализ на получената траектория [45, 46, 47]. Процедурата, по която протича една симулация на молекулната динамика, е показана на Фиг. 3. За изследване на динамиката на 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. 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. [48].

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 междумолекулни взаимодействия в системата. Така потенциалната функция има следния вид:

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

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

където с първите три члена са описани ковалентните взаимодействия в системата, а с последните два - нековалентните. С K_l , K_θ и 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 .



Фигура 3. Процедура за симулация на МД.

Първият член на потенциалната функция (1) 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).

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 .

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 от 4-те последователно свързани атома.

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 [43, 48].

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. 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 [49].

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 [50]. 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" [51, 52, 53]. 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 [54]. Процесът на хомоложно моделиране включва следните основни етапи: 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.

Modeller [55] 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 [56]. 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 [57, 58, 59].

2.4. Молекулен докинг

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 [60, 61, 62]. С генетичен алгоритъм работи програмата AutoDock [63], която е включена като приставка, наречена vsLab (virtual screening lab) [64], в софтуера за молекулно моделиране и визуализация - VMD (Visual Molecular Dynamics) [65].

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 [60]. 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. Изчисляването на свободната енергия на свързване между лиганда и рецептора с метода MM-PBSA може да се представи по следния начин:

$$(2) \quad \Delta G_{binding} = G_{complex} - G_{protein} - G_{ligand} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} - T\Delta S,$$

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 MM-PBSA е внедрен в инструмента `g_mmpbsa`, който 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. 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 . Сумата от енергийните приноси на аминокиселинните остатъци е равна на енергията на свързване за комплекса лиганд-рецептор [66, 67].

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. 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 трябва да присъства в поне 75% от траекторията. 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 [68].

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. 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+} [31, 38]. 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

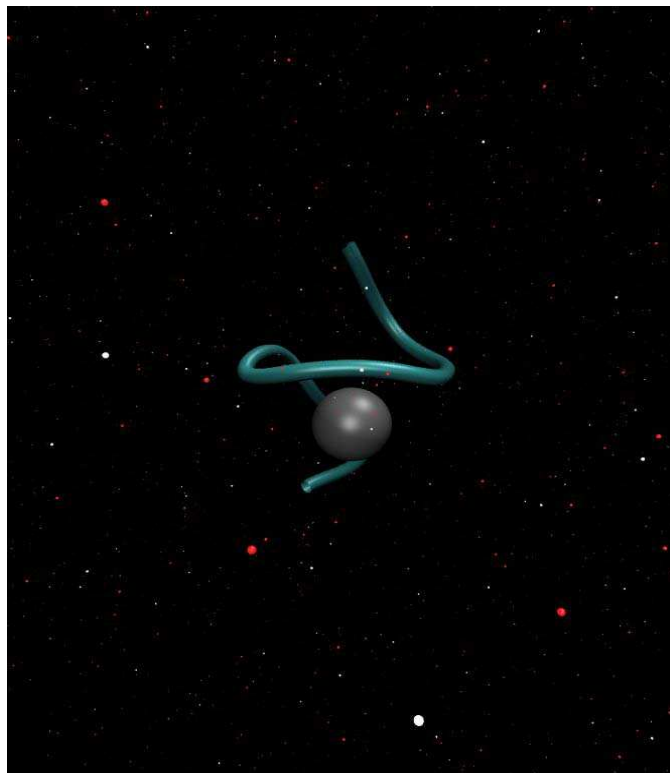
За изграждането на компютърен модел на комплекса окситоцин - двувалентен цинк е използвана магнитно-резонансна структура на човешкия хормон окситоцин с код 2MGO [69], която е свалена от базата данни PDB. Преди конструирането на самия модел, карбоксилната група (COO^-) на аминокиселината Gly на позиция 9 в молекулата на хормона е заместена с амидна група (NH_2), с помощта на програмата *gmx pdb2gmx* на GROMACS. 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 желания 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 [31, 37]. Като преходен метал двувалентния цинков катион се характеризира с напълно изграден (запълнен с 10 електрона) предпоследен електронен слой d_{10} . 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 [70, 71]. 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. 4.



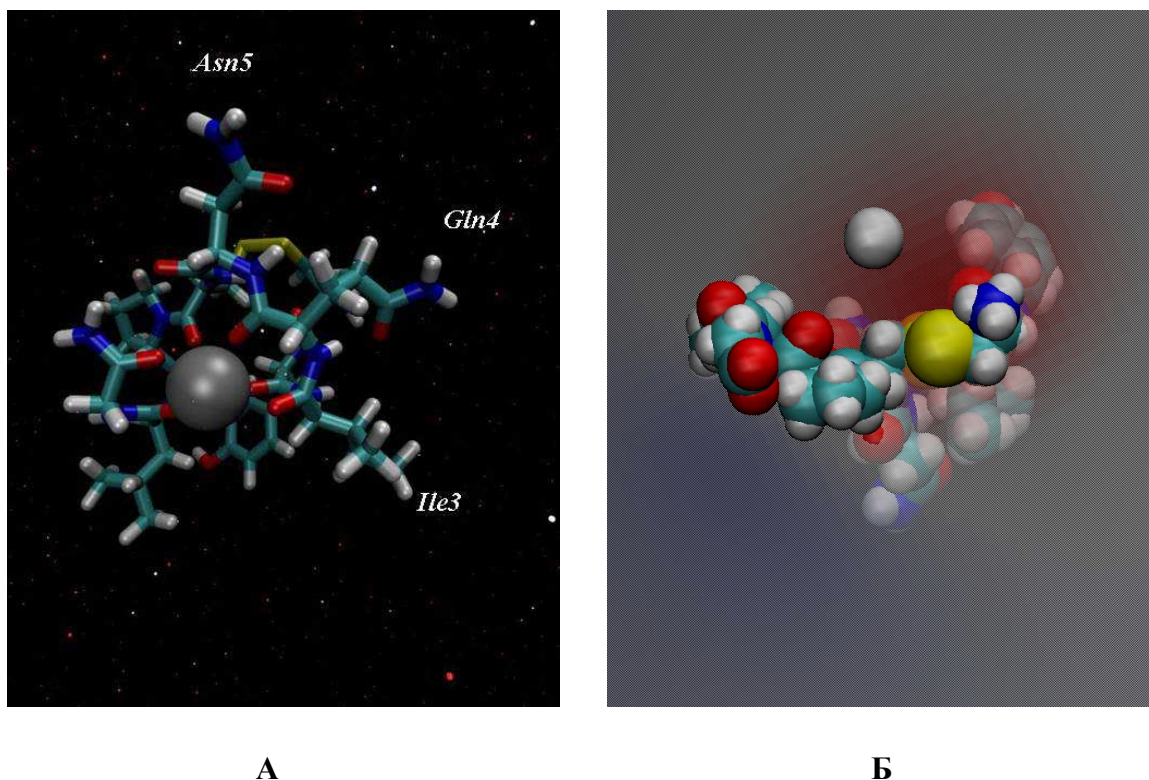
Фигура 4. Модел на комплекса окситоцин - двувалентен цинк, получен чрез използване на ковалентни (artificial) връзки и Charmm 36 силово поле. Окситоцинът е изобразен в синьозелено, а цинковия йон - в сиво.

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 [31]. По този начин цинковия йон е плътно вграден в молекулата на окситоцина. Освен това правилното нагъване на полипепидната 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 $[OH + H]^+$, 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 аминокгрупата на N-края е разположена откъм външната повърхност на молекулата на окситоцина, което позволява нейното успешно взаимодействие с киселинен остатък от окситоциновия рецептор [31, 37].

В изграденият модел на комплекса окситоцин - двувалентен цинк се наблюдава същата ориентация на аминокгрупата 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. 5 А). Тези наблюдения се потвърждават от изчислителните изследвания и на други изследователски групи [31].



Фигура 5. А/Октаедрална ориентация на шесте кислородни атома от въглеродния 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. 5 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. 5 Б.

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

3.2.1. Молекулна динамика

Стабилността на получената структура $OT - Zn^{2+}$ във воден разтвор е изследвана с помощта на метода молекулна динамика. Молекулно - динамичните симулации са проведени със софтуерния пакет GROMACS 5.0.7 [72], като е използвано силовото поле CHARMM 36 [73]. Системата $OT - Zn^{2+}$ 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 [74]. 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 [75]. 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 [76], а налягането е фиксирано на 1 atm и е поддържано с баростат на Паринело-Раман [77]. Електростатичните взаимодействия са изчислени с помощта на метода PME [78] с радиус на обрязване на директната сума от 12 Å. За пресмятането на Ван дер Ваалсовите взаимодействия е използвана функция за изглаждане [79], която се включва при радиус на обрязване от

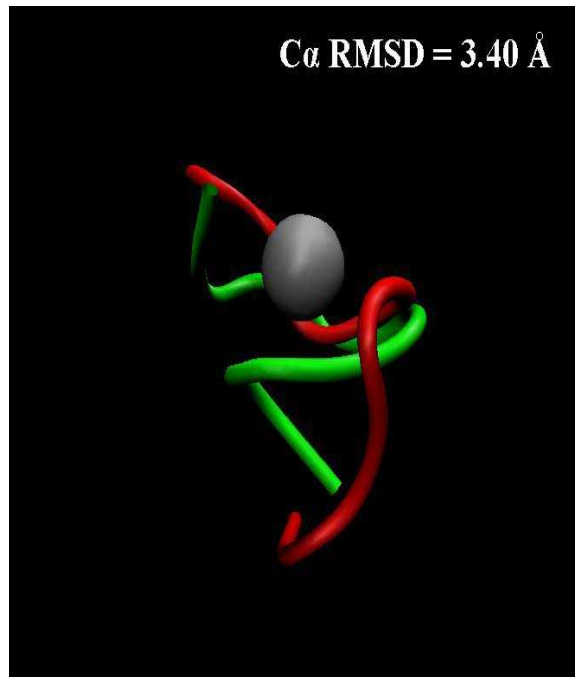
10 Å и плавно се изключва, като нулира тези взаимодействия, при радиус от 12 Å. Подготвени са две системи, окситоцин с цинков йон и окситоцин без цинков йон, всяка от които е подложена на молекулно - динамична симулация с продължителност от 50 ns, като са зададени същите настройки на описаните параметри. 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

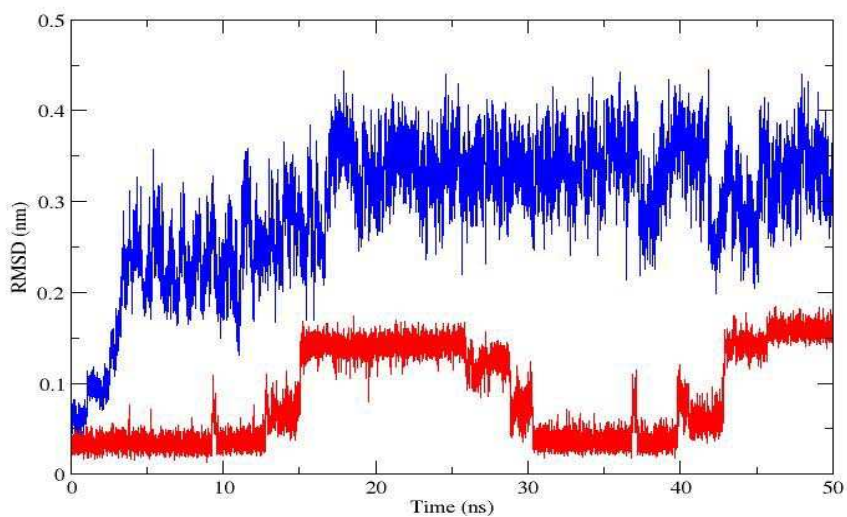
Конформационната стабилност на изградения модел на комплекса OT - Zn²⁺ във воден разтвор е проверена чрез провеждането на молекулно - динамична симулация с продължителност от 50 ns. За целта са подготвени две системи за изследване с молекулна динамика в разтвор - окситоцин без и окситоцин с цинков йон, 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 флуктуация (RMSF), радиуса на въртене (Rg) и достъпната за разтворителя повърхност (SASA). Резултатите от пресмятията са визуализирани с помощта на програмата Xmgrace [80] и софтуерния пакет VMD [65].

Резултатите след анализа на траекториите показват, че средното квадратично отклонение (RMSD) на гръбнака на пептидния хормон без и с цинков йон е 3.40 Å (Фиг. 6). 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. 7 е показано отклонението в положението на C α атомите от гръбнака на пептидната молекула без и с цинков йон. 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.



Фигура 6. Сравнение по C α RMSD стойност между модела на получения комплекс окситоцин - цинков йон (в зелено) и кристалографската структура на окситоцин - без цинков йон (в червено).

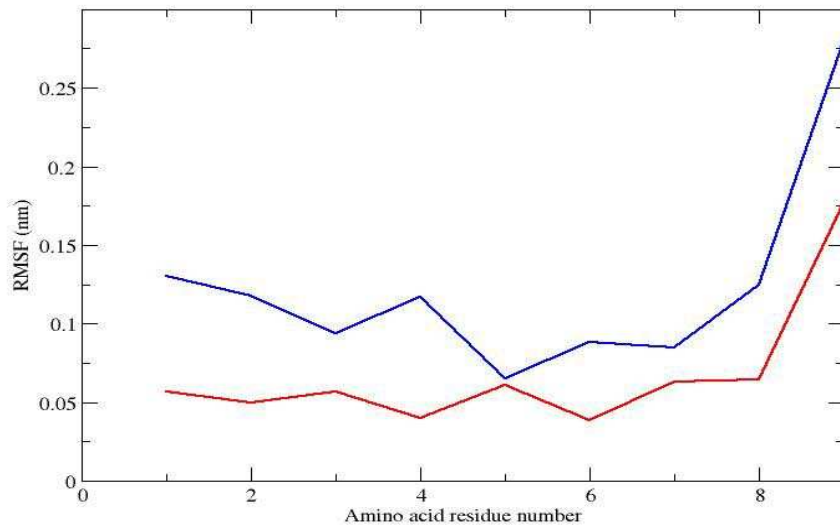


Фигура 7. RMSD на C α атомите на окситоцин без цинков йон (синя линия) и на комплекса окситоцин - цинков йон (червена линия) по време на проведените молекулно - динамични симулации.

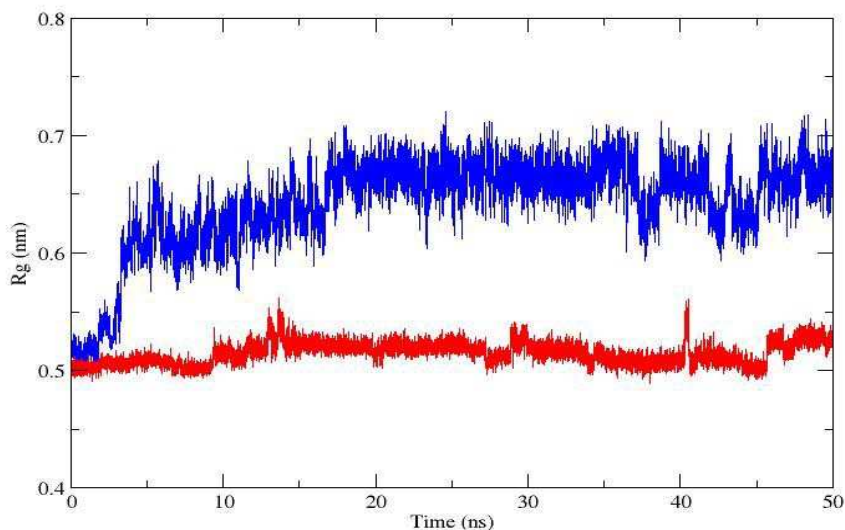
За изследването на ригидността на изградения комплекс, окситоцин - двувалентен цинк, са проследени средните квадратични колебания RMSF на аминокиселинните остатъци от молекулата на хормона и в двата случая - без и с цинков йон. Резултатите са представени на Фиг. 8. Анализът на данните от графиката на Фиг. 8 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. 8).

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. 9. Графиката от Фиг. 9 показва, че пептида без цинков йон се характеризира с по-отворена конформация.

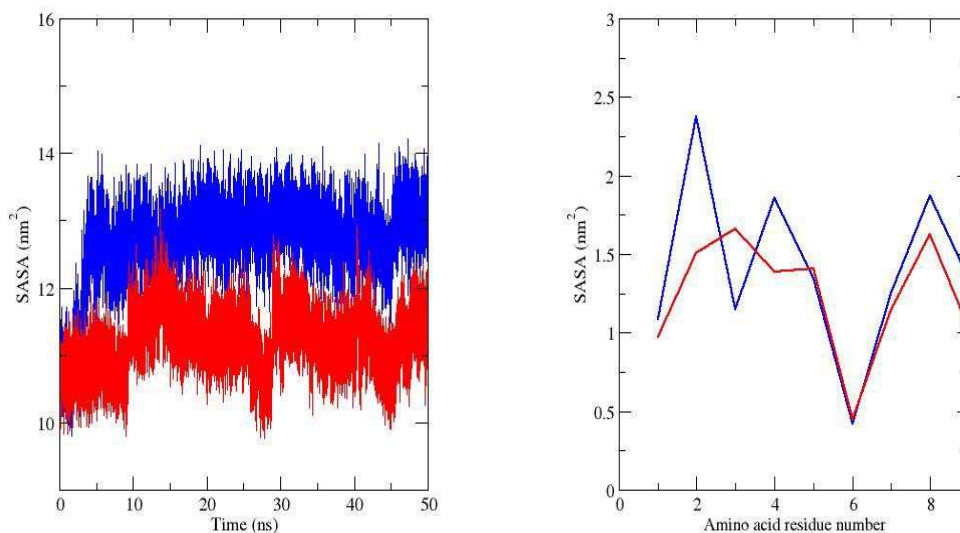
Подобно поведение на молекулата на окситоцина, като описаното при радиуса на въртене, се наблюдава и при оценката на общата повърхност на хормона достъпна до разтворителя (SASA). Параметърът SASA обикновено се използва като мярка за свободната енергия на разтваряне на полярни и неполярни групи в пептидите. Получените резултати, които са представени на Фиг. 10 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. 10 Б, параметърът SASA е с по-ниска стойност за аминокиселинните остатъци в позиции 1, 2, 4, 6, 7, 8 и 9 (с изключение на Ile3, 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 Ile3 - 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 8. 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.



Фигура 9. 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.



А

Б

Фигура 10. 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]. 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 [81, 82] във FASTA формат. След това с помощта на сървъра NCBI-Protein BLAST [83, 84] 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.

Избраният с помощта на BLAST най-близък хомолог на окситоциновия рецептор, в случая говежди родопсин с PDB ID 1JFP [85, 86], е подложен на повторно подравняване с целевата аминокиселинна последователност на рецептора, което е проведено със софтуерния пакет Modeller [55, 87]. 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*) [88], 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.

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. За оценка на създадените 3D структури на окситоциновия рецептор е използвана дискретната оптимизирана протеинова енергия - DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) [89], както и молекулната функция (molpdf) на Modeller [55]. Най-добрият от конструиранияте 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. Полученият енергиен профил е визуализиран с графичната програма GNUPLOT [90]. 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

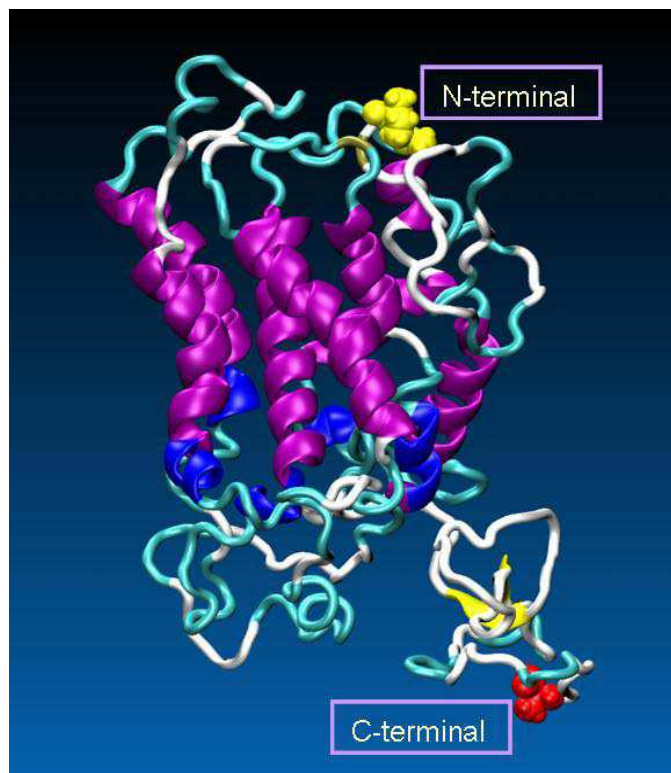
аминокиселинните остатъци, които участват във формирането на седемте трансмембранни спирали на търсения рецептор, неговата последователност е подравнена с тази на най-добрия темплейт - говежди родопсин с PDB ID 1JFP. Степента на сходство между последователностите на двете структури (целевия протеин и 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) [83]. Повторно подравняване на последователностите на целевия протеин (окситоцинов рецептор) и темплейта (говежди родопсин), е проведено и със софтуерния пакет Modeller (Фиг. 11), 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.



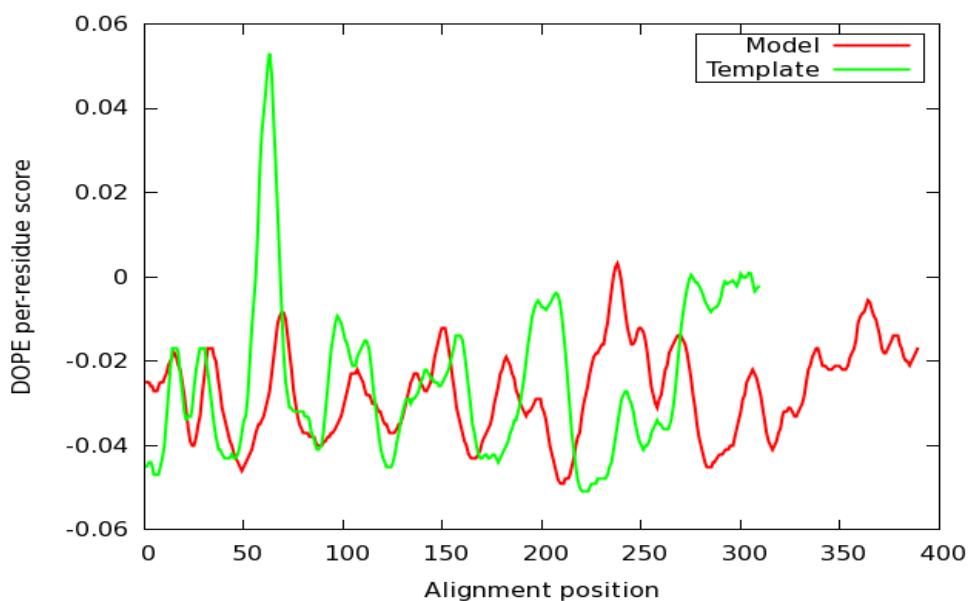
Фигура 11. Подравняване на аминокиселинните последователности на човешкия окситоцинов рецептор (таргет) и говеждия родопсинов рецептор (PDB 1JFP).

Подравняването между таргета и темплейта е проведено за втори път и с Modeller, защото наказателната функция [88], 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. 12).

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. 13). 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 12. 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 13. Оценка на модела на окситоциновия рецептор с DOPE.

Степента на идентичност между последователностите на таргета и темплейта, обаче, не е единствения критерии 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. Подравняването е добро при **RMSD < 2Å**. Разделителната способност на използваната структура за темплейт (говежди родопсин с PDB ID 1JFP) в настоящото изследване е 1.0 Å. Поради тази добра резолюция, създаденият модел на окситоциновия рецептор е в отлично съответствие с експериментално определената 3D структура на шаблона, което се вижда от α RMSD между двете структури, което е само 1.05 Å (Фиг. 14).



Фигура 14. Сравнение по $C\alpha$ 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.

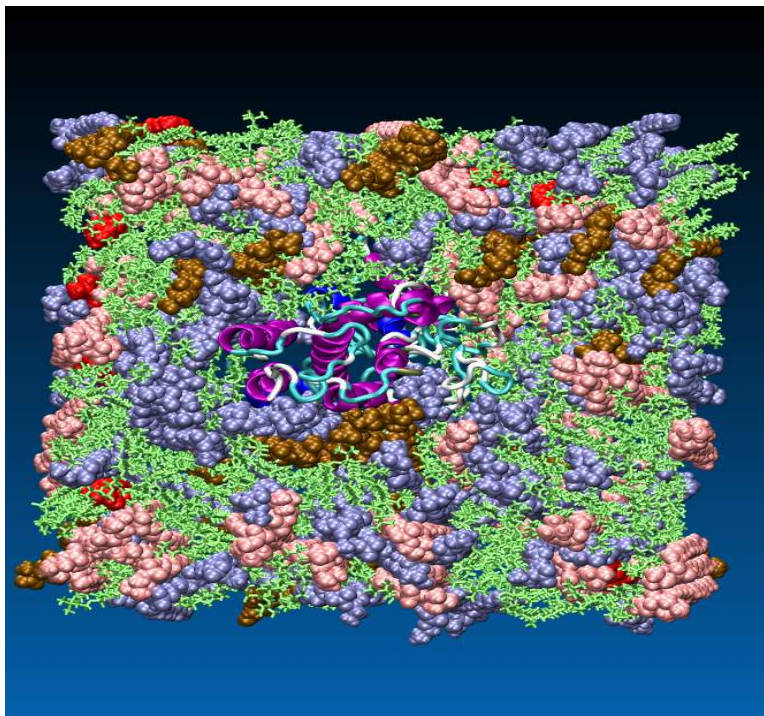
4.2. Изграждане на модел на мембраната на матката

4.2.1. Молекулно моделиране

За по-коректното проучване на механизма на свързване на хормона окситоцин с неговия рецептор, както и за изследване на динамиката на окситоциновия рецептор, като трансмембранен протеин, е необходимо рецептора 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 [91]. Моделът е създаден с помощта на инструмента Membrane Builder, който е част от уеб-базирания графичен потребителски интерфейс CHARMM GUI [92, 93, 94, 95].

4.2.2. Резултати

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. 15.



Фигура 15. 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

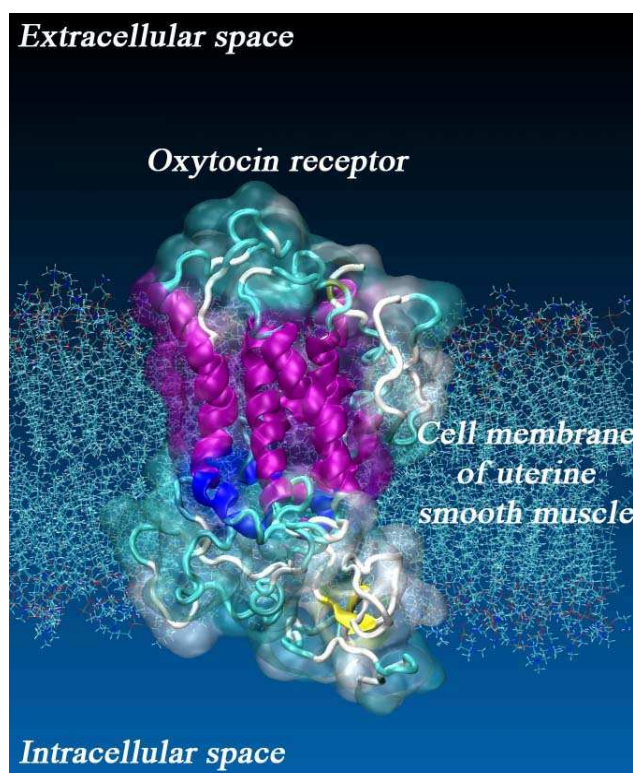
4.3.1. Молекулна динамика

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 [72], като е използвано силовото поле CHARMM 36 [73]. 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 [75]. Радиусът на обрязване на директната сума, за електростатичните взаимодействия, които са

изчислени с метода PME [78], е зададен на 12 \AA . За описване на разтворителя е използван модифициран TIP3P модел на водата [74]. 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 [76] и с баростат на Паринело-Раман [77]. Ван дер Ваалсовите взаимодействия са пресметнати с помощта на функция за изглаждане [79], която се включва при радиус на обрязване от 10 \AA и плавно се изключва, като нулира тези взаимодействия, при радиус от 12 \AA . 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., 5.3.2.), 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. 16.



Фигура 16. 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 [20, 37]. 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 [40]. 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+} [41, 96, 97]. В присъствието на Zn^{2+} , страничните вериги на аминокиселинните остатъци на Ile3, 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. 5 А). Именно тези промени в молекулата на хормона позволяват свързването на специфични остатъци в окситоцина със специфични остатъци в неговия рецептор.

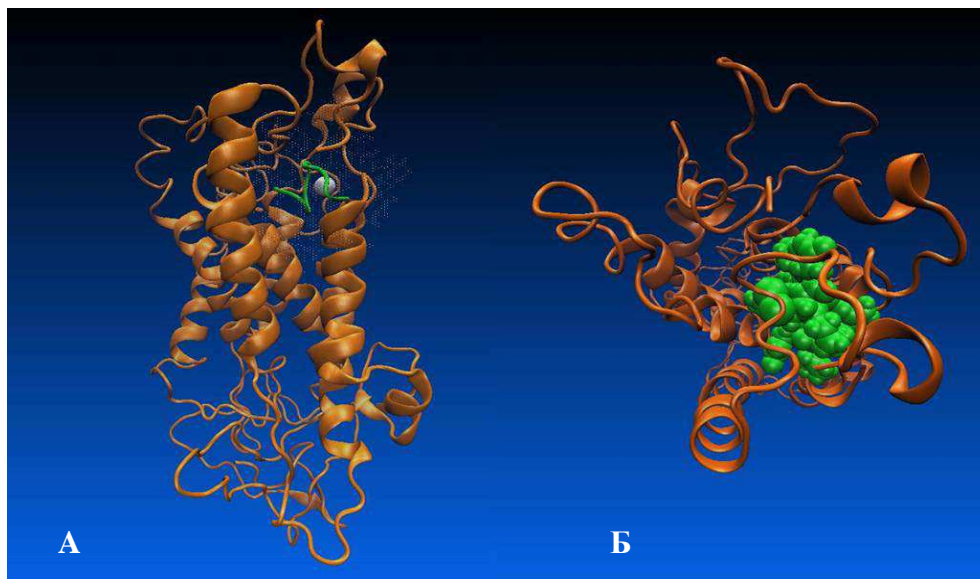
Въпреки данните от проведени до този момент експериментални и теоретични изследвания, няма налична кристалографска структура за окситоцин в комплекс с метален йон. Затова, за да се изясни ролята на двувалентните йони в хормон - рецепторното взаимодействие, в предходно изследване от тази дисертация е изграден модел на такъв комплекс (виж 3.1.1., 3.1.2., Фиг. 4). 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, Ile3, Gln4, Cys6, Leu8 и Gly9 от гръбнака на окситоцина. Тези наблюдения са потвърдени и от изследванията на други групи [31].

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].

Комплексът окситоцин - цинков йон е позициониран чрез докинг с VMD [65] (приставка VsLab [64]), 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 [63], която е включена като приставка, наречена vsLab (virtual screening lab) във VMD.

5.1.2. Резултати

Изграденият хормон - рецепторен комплекс е представен на Фиг. 17.



Фигура 17. 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 [72], като е използвано силовото поле CHARMM 36 [73]. Във всички посоки (x, y и z) са наложени периодични гранични условия, а разтворителя е описан с модифициран TIP3P модел на водата [74]. Алгоритъмът LINCS [75] е използван за ограничаване на дължината на всички химични връзки. Температурата в системата е поддържана постоянна на 310 K с термостат v-rescale [76], а налягането е фиксирано на 1 atm и е поддържано с баростат на Паринело-Раман [77]. 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 [78] при зададен радиус на обрязване на директната сума от 12 Å. Ван дер Ваалсовите взаимодействия са пресметнати, като е използвана функция за изглаждане [79], 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 инструментът `g_mmpbsa` [67], 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 `Hbondanza` [68]. 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.

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).

№	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

^aHB, взаимодействие с водородна връзка.
^bVDW, Ван дер Ваалсово взаимодействие.

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

Експериментални данни показват, че аминокиселината изолевцин, в молекулата на окситоцина, играе важна роля за специфичното свързване на хормона към неговия рецептор [30]. По тази причина, остатъците от изградения модел на окситоциновия рецептор, които са свързани с Пе3, 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 [26, 27, 28, 29].

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]. 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. Вътреклетъчната част на рецептора участва във взаимодействията с G протеина. 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 [98, 99, 100, 101].

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 [102].

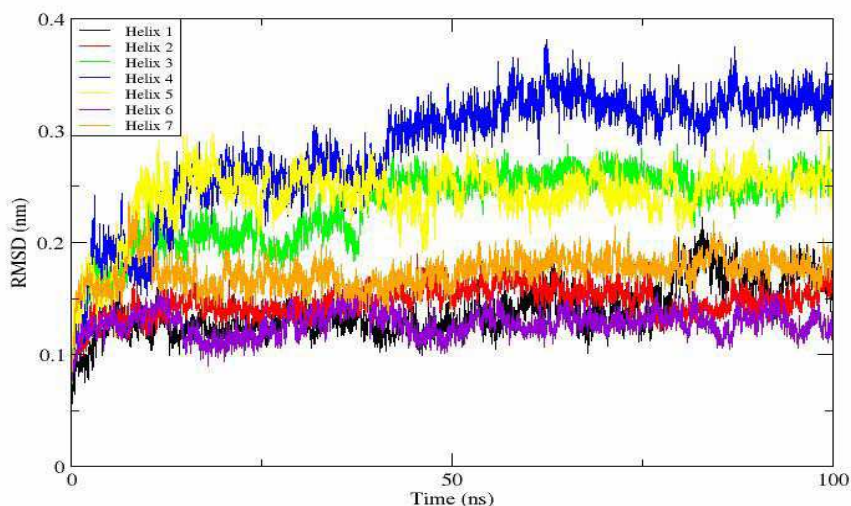
Според хипотезата за полярните джобове, аргинина на мотива E(D)RY е ограничен в джоб, когато рецептора е в неговата неактивна конформация. Този джоб е образуван от консервативните полярни остатъци, разположени върху TM1, TM2 и TM7. За разлика от това, когато рецептора премине в своето активно състояние, 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 ѝ 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 [103].

5.3.2. Резултати

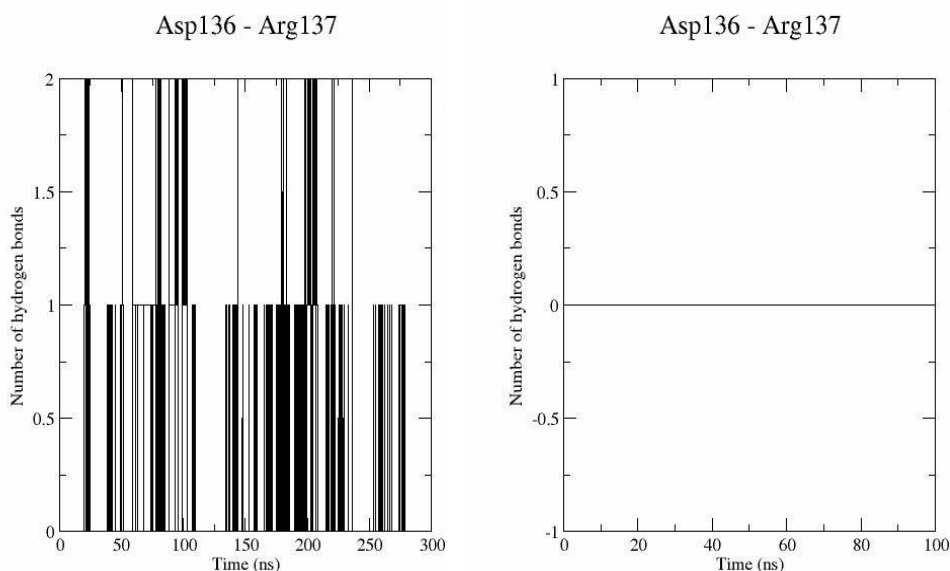
За да се изследва механизма на активиране на окситоциновия рецептор са проведени две симулации: с несвързан с лиганд окситоцинов рецептор (300 ns) и със свързан с агонист (хормона окситоцин) окситоцинов рецептор (100 ns). От анализа на получената траектория, в която рецептора е свързан с окситоцина се вижда, че трансмембранните спирали TM1, TM2, TM6 (след леко първоначално въртене в процеса на свързване на окситоцин) и TM7 остават стабилни (Фиг. 18). 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).

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 аспарат, 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. 19). В същото време, спиралната структура на E(D)RY мотива се стабилизира (Фиг. 20) и се измества извън полярния джоб, образуван от спиралите TM1, TM2 и TM7 (Фиг. 21). Не са наблюдавани други промени във вътреклетъчната част на рецепторната структура.

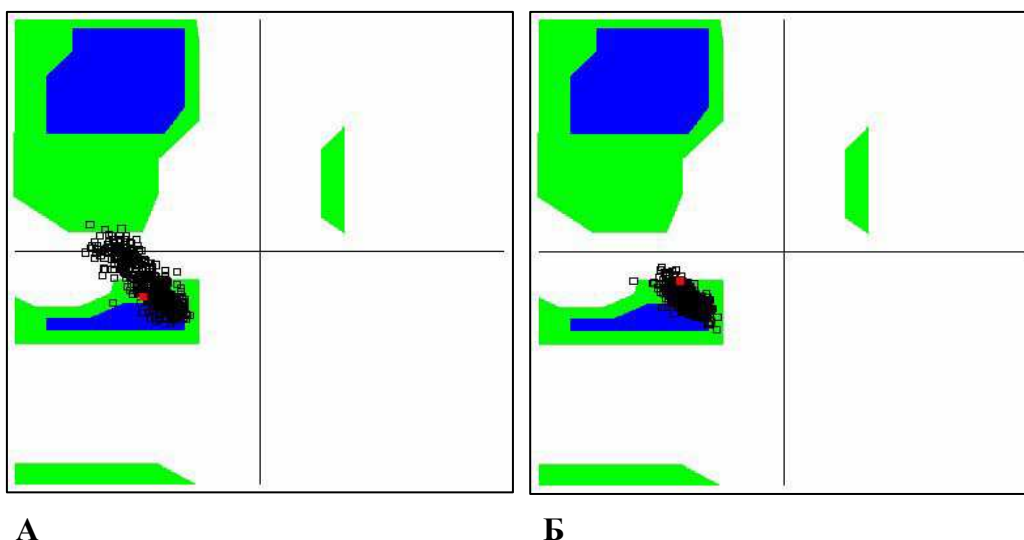
Въз основа на тези наблюдения, стигнахме до хипотезата, че изместването на E(D)RY мотива оказва влияние върху G протеина, като стартира процеса на неговото разпадане от рецептора и последващия вътреклетъчен процес.



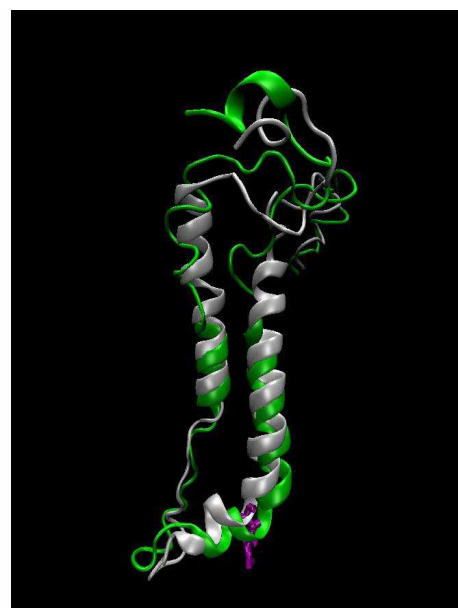
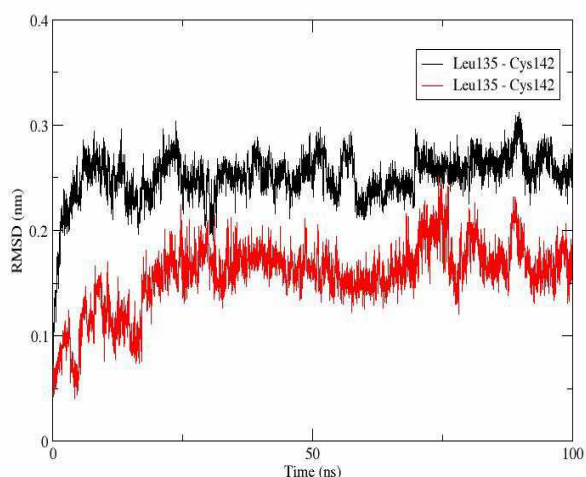
Фигура 18. RMSD на 7-те трансмембрални спирали за траекторията на хормон - рецепторния комплекс. Спиралите са оцветени, както следва: спирала 1 (в черно), спирала 2 (в червено), спирала 3 (в зелено), спирала 4 (в синьо), спирала 5 (в жълто), спирала 6 (в лилаво) и спирала 7 (в оранжево).



Фигура 19. 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 20. А/ Карта на Рамачандран на Arg137 за траекторията на несвързания с лиганд окситоцинов рецептор. Б/ Карта на Рамачандран на Arg137 за траекторията на комплекса агонист - окситоцинов рецептор.



Фигура 21. 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 [104, 105]. Част от защитните функции на окситоцина върху организма, като имуноактивна молекула, са свързани с повишаване на производството на противовъзпалителния цитокин интерферон гама ($INF-\gamma$) [106], както и с предотвратяване на фрагментирането (разпадането) на разположения върху клетъчната повърхност гликозаминогликан (GAG) хепаран сулфат (HS) [107], който служи като локален резервоар за съхраняване на $INF-\gamma$ [108] 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, секретиран от клетките на имунната система в отговор на навлезлите в организма патогени напр.

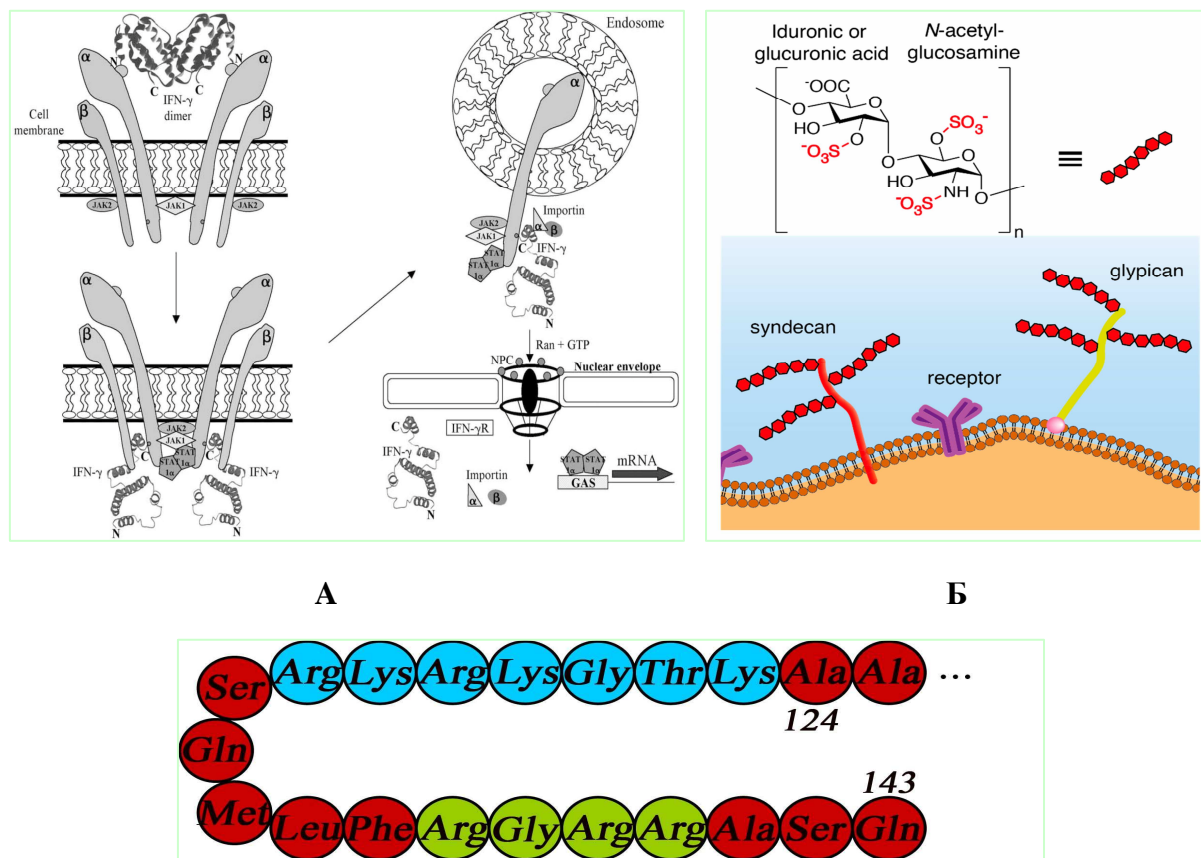
вируси, бактерии и др. Като имуноактивна протеинова молекула цитокинът изпълнява множество биологични функции в човешкото тяло, поради способността му директно да активира или инхибира над 200 различни гена, разположени в ядрото на клетката [109]. Молекулата на INF- γ в биологично активната му форма [110] 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 А–F), които са свързани помежду си с къси извивки, както и дълъг силно подвижен С – край (аминокиселинни остатъци 124–143), разположен в разтворителя извън глобуларната част на молекулата на INF- γ . С – 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 +16е (където "е" е заряда на електрона) [109, 111]. 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). 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, необходима за предаването на сигнала навътре в клетката. Рецепторната олигомеризация е процес водещ до асоциирането на IFN γ R2 субединицата към образувания се комплекс INF- γ - IFN γ R1. Кристалографската структура на комплекса INF- γ - IFN γ R1 е налична в базата данни PDB с код 1FG9 [112] 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 С-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. Експериментални данни показват, че аминокиселинните остатъци от INF- γ , които участват в образуването на контактната повърхност между INF- γ и IFN γ R1, са остатъците в извивката, свързваща спирали А и В (аминокиселинни остатъци 18–26) на цитокина; аминокиселинния остатък His111,

както и къс 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 (Фиг. 22 А) [109, 113, 114, 115, 116].

С-краят на молекулата на INF- γ е положително зареден, силно подвижен участък, разположен в разтворителя, който може да приема различни конформации [111]. Експериментални данни сочат, че този участък е отговорен за биологичната активност на цитокина [115, 116]. С-краят на INF- γ съдържа два домена с базични аминокиселинни остатъци, включващи лизин и аргинин. Първият домен означен с D1 е със заряд +5е и обхваща аминокиселинните остатъци 125–131, а вторият означен с D2 има заряд +3е 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 IFN γ R1. За доменът D2 се смята, че има само регулаторна роля в процеса на свързването (Фиг. 22 С) [112, 117, 118].

Чрез експериментални изследвания е установено, че в правилното формиране на комплекс между INF- γ и субединицата IFN γ R1 от неговия извънклетъчен рецептор, участва и допълнителна отрицателно заредена помощна молекула – хепаран сулфат протеогликан (HSPG), която също се свързва с висок афинитет ($K_d = 1.5 \times 10^{-9}$ М) 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) (Фиг. 22 Б) [118, 119, 120, 121]. 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 [122]. Установено е, че взаимодействието между INF- γ и HSPG молекулите е свързано с: регулиране на биологичната активност на цитокина;

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 [108].



Фигура 22. 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 протеоглигани, 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 [109, 123].

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

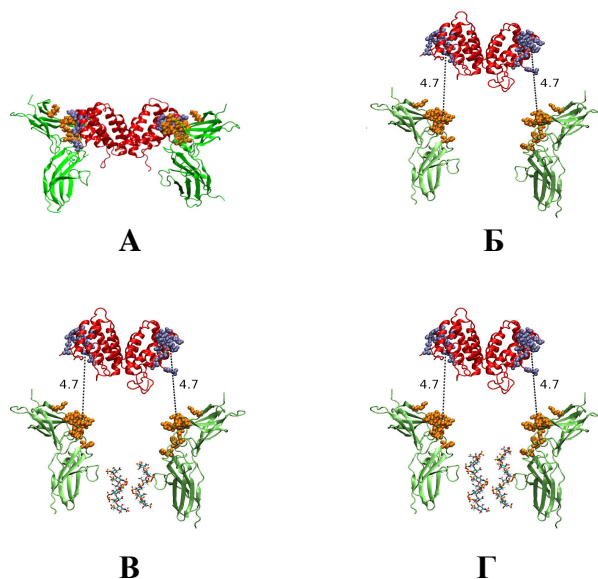
6.2.1. Молекулно моделиране

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 [112] и е използвана като начална структура за референтната МД симулация на комплекса INF- γ -IFN γ R1 (Фиг. 23 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 [124]. Липсващият аминокиселинен участък (аминокиселинни остатъци 141-146) в рецепторната субединица IFN γ R1 е реконструиран с помощта на софтуерния пакет Coot [125]. 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. 23 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. 23 В) или два HS октазахарида (Фиг. 23 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 [126], 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 [127], 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>) [128], като за топологиите е използвана най-новата версия на силовото поле за въглехидрати CHARMM36 [129], 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. 23.



Фигура 23. 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. **А/** 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, уравновесяване на системата за 250 ps и самата компютърна симулация, която е с продължителност от 650 ps. Моделните системи са симулирани със софтуерния пакет GROMACS [72], като за протеините е използвано силовото поле за протеини CHARMM 36 [73], а за HS-те хекса- и октазахариди – силовото поле за въглехидрати CHARMM36 [129]. 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 [74]. 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 [130]. Радиусът на обрязване на директната сума, за електростатичните взаимодействия, които са изчислени с метода PME [78], 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 [76] и с баростат на Паринело-Раман [77]. Ван дер Ваалсовите взаимодействия са пресметнати с помощта на функция за изглаждане [79], 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

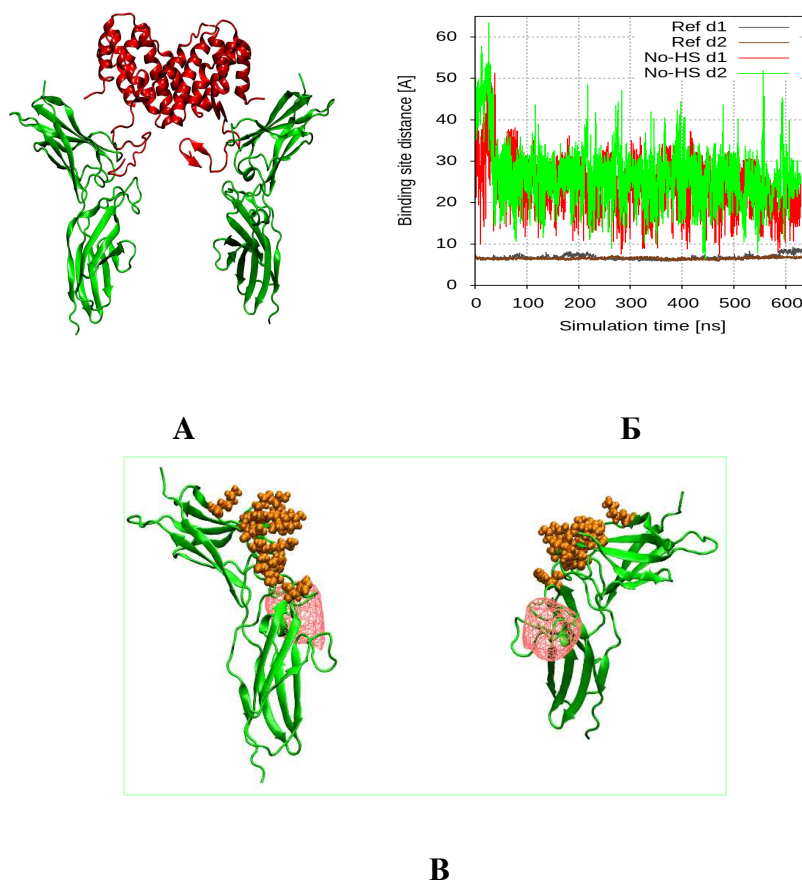
За да се проследи процеса на свързване между цитокина INF- γ и двете α -вериги на рецепторната му субединица IFN γ R1, за всяка от проведените симулации, са използвани промените в разстоянията d1 и d2 по време на симулациите (Фиг. 23 Б). Като d1 и d2 са разстоянията между центровете на масите на рецептор-свързващите 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.

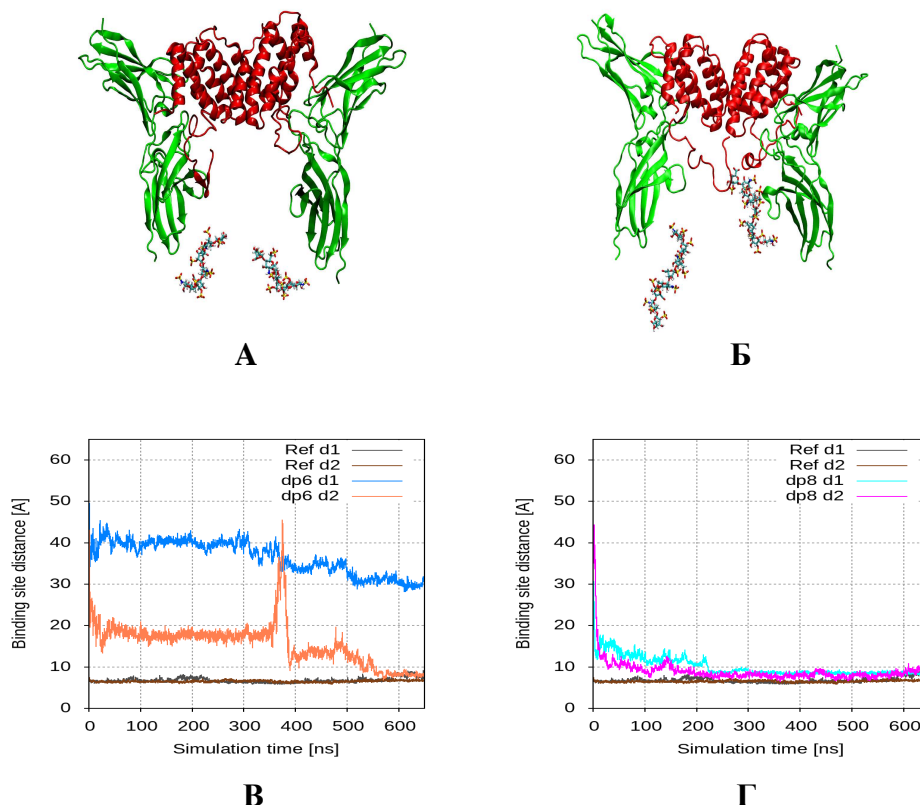
При симулацията за изследване на взаимодействието между INF- γ (с двата му напълно изградени С-края) и рецепторната субединица IFN γ R1 (Фиг. 24 А) се наблюдава, че двата силно положително заредени С-края на цитокина INF- γ се отдалечават от неговата глобуларна част и се свързват с два отрицателно заредени домена от рецепторната субединица IFN γ R1 (наречени "колена") (Фиг. 24 В), които са разположени под цитокин-свързващите места в двете α -вериги на IFN γ R1. 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. 24 Б. По този начин двата С-края на INF- γ пречат за правилното образуване на цитокин-рецепторен комплекс.

Получените резултати показват, че електростатичното взаимодействие между положително заредената молекула на INF- γ (с двата му напълно изградени С-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 накарва да предположим, че в процеса на формирането на цитокин-рецепторен комплекс, участват и други отрицателно заредени помощни молекули, разположени в близост до субединицата IFN γ R1, които със своя отрицателен заряд допринасят за по-ефективното и силно свързване на положително заредената молекула на INF- γ 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 γ R1 [122]. Резултатите от двете симулации за изследване на взаимодействието между INF- γ и неговата рецепторна субединица IFN γ R1 в присъствието на HS хекса- или октазахариди показват, че когато тези помощни молекули са разположени между α -веригите на субединицата IFN γ R1 те привличат електростатично С-края на INF- γ и изтеглят цитокина надолу към местата му за свързване в двете α -вериги на IFN γ R1. При симулацията с дрб се вижда, че хексазахаридите не успяват да привлекат достатъчно силно и двата С-края на INF- γ , в резултат на което само единият мономер на цитокина се свързва с едната от α -веригите на рецептора, а другият мономер на INF- γ не образува

никакви контакти с рецепторната субединица $IFN\gamma R1$ (Фиг. 25 А, В). 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 $INF-\gamma$. Това взаимодействие, между отрицателно заредените области на HS-те октазахариди и положително заредените участъци от С-края на молекулата на $INF-\gamma$, е толкова бързо, че още в първите 100 ns от симулацията, глобуларната част на $INF-\gamma$ се изтегля надолу между двете α -вериги на рецепторната субединица $IFN\gamma R1$ (Фиг. 25 Б, Г).



Фигура 24. А/ Крайна конформация на системата от симулацията за изследване на свързването между $INF-\gamma$ (с двата му напълно изградени С-края) и рецепторната субединица $IFN\gamma R1$. Цитокинът $INF-\gamma$ е представен в червено, а двете α -вериги на рецепторната субединица $IFN\gamma R1$ са в зелено. Б/ Изменение на разстоянията $d1$ и $d2$ с течение на времето между местата на свързване в молекулата на $INF-\gamma$ и рецепторната субединица $IFN\gamma R1$ без присъствието на HS хекса- или октазахариди. В/ Цитокин-свързващите места в двете α -вериги на рецепторната субединица $IFN\gamma R1$ (изобразена в зелено) са представени като оранжеви сфери, а локализираната отрицателна плътност на заряда в двете "колена" на субединицата $IFN\gamma R1$ е показана с червена мрежа.



Фигура 25. 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.

Получените резултати представят модел на взаимодействие между цитокина INF- γ и неговата рецепторна субединица IFN γ R1, при който две HS молекули (октазахариди), разположени в "дъното" на рецепторната субединица IFN γ R1 (имитиращо базалната клетъчна мембрана) привличат много по-силно двата С-края на INF- γ 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 INF- γ 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 IFN γ R1.

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 hIFNGR1. *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. Е. 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. *Physiol Rev*, **81**: 629-683.
2. Ragusa, A., and A. Svelato. 2014. *JPNIM*, **3**: e030123.
3. Fredriksson, R., M. Lagerström, L. Lundin, et al. 2003. *Mol Pharmacol*, **63**: 1256-1272.
4. Gloriam, D., R. Fredriksson, and H. Schiöth. 2007. *BMC Genomics*, **8**: 338.
5. Vrachnis, N., F. Malamas, S. Sifakis, et al. 2011. *Int J Endocrinol*, **2011**: 1-8.
6. Sanborn, B. M., C. Y. Ku, S. Shlykov, et al. 2005. *J Soc Gynecol Investig*, **12**: 479-487.
7. Walter, R., I. L. Schwartz, J. H. Darnell, et al. 1971. *PNAS*, **68**: 1355-1359.
8. Groot, A. N. J. A., T. B. Vree, et al. 1994. *World Health Organization, Geneva*.
9. Hawe, A., R. Poole, S. Romeijn, et al. 2009. *Pharmaceutical Research*, **26**: 1679-1688.
10. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/018261s031lbl.pdf
11. Avanti, C., J. Amorij, D. Setyaningsih, et al. 2011. *The AAPS Journal*, **13**: 284-311.
12. Svoboda, P., J. Teisinger, J. Novotny, et al. 2004. *Physiol Res*, **53**: S141-S152.
13. Lomize, A. L., I. D. Pogozheva, et al. 1999. *J Comput Aided Mol Des*, **13**: 325-353.
14. Lagerström, M. C., and H. B. Schiöth. 2008. *Nat Rev Drug Discov*, **7**: 339-357.
15. Böhm, Hans-Joachim, G. Klebe, and H. Kubinyi. 1996. *Wirkstoffdesign Der Weg zum Arzneimittel*, 1st edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. ISBN 13:978-3827413536
16. Farrens, D. L., C. Altenbach, K. Yang, et al. 1996. *Science*, **274**: 768-770.
17. Kobilka, B. K., and U. Gether. 2002. *Methods Enzymol*, **343**: 170-182.
18. Swaminath, G., Y. Xiang, T. W. Lee, et al. 2004. *J Biol Chem*, **279**: 686-691.
19. Vilardaga, J. P., M. Bunemann, C. Krasel, et al. 2003. *Nat Biotechnol*, **21**: 807-812.
20. Schwartz, T. W., T. M. Frimurer, et al. 2006. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **46**: 481-519.
21. Yao, X., C. Parnot, X. Deupi, et al. 2006. *Nat Chem Biol*, **2**: 417-422.
22. Oldham, W. M., and H. E. Hamm. 2008. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**: 60-71.
23. Akhundova, A., E. Getmanova, V. Gorbulev, et al. 1996. *Eur J Biochem*, **237**: 759-767.
24. Hausmann, H., W. Meyerhof, H. Zwiers, et al. 1995. *FEBS Letters*, **370**: 227-230.
25. Barberis, C. 1998. *Journal of Endocrinology*, **156**: 223-229.
26. Mouillac, B., B. Chini, M.-N. Balestre, et al. 1995. *J Biol Chem*, **270**: 25771-25777.
27. Postina, R., E. Kojro, and F. Fahrenholz. 1996. *J Biol Chem*, **271**: 31593-31601.
28. Fanelli, F., P. Barbier, D. Zanchetta, et al. 1999. *Mol Pharmacol*, **56**: 214-225.
29. Koebach, J., T. Stockner, C. Bergmayr, et al. 2013. *Biochem Soc Trans*, **41**: 197-204.
30. Sluzars, M. J., R. Sluzars, and J. Ciarkowski. 2006. *J Pept Sci*, **12**: 171-179.
31. Liu, D., A. Seuthe, O. Ehrler, et al. 2005. *JACS Communications*, **127**: 2024-2025.
32. Kojro, E., P. Eich, G. Gimpl, et al. 1993. *Biochemistry*, **32**: 13537-13544.
33. <https://www.creative-diagnostics.com/oxytocin-signaling-pathway.htm>
34. Arrowsmith, S., and S. Wray. 2014. *Journal of Neuroendocrinology*, **26**: 356-369.
35. Al Otaibi, M. 2014. *Calcium Signaling*, **1**: 70-75.
36. Viero, C., I. Shibuya, N. Kitamura, et al. 2010. *CNS Neurosci. Ther.*, **16**: e138-e156.
37. Xu, X., Z. Huang, and Z. Lin. 2010. *J. Phys. Chem. B*, **114**: 1417-1423.
38. Wyttenbach, T., D. Liu, and M. Bowers. 2008. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**: 5993-6000.

39. **Stevenson, M.**, K. Uyeda, N. Harder, et al. **2018**. *Metallomics*.
40. **Pearlmutter, A.**, and M. Soloff. **1979**. *Journal of Biological Chemistry*, **254**: 3899–3906.
41. **Danyi, P.**, K. Várnagy, I. Sóvágó, et al. **1995**. *J. Inorg. Biochem.*, **60**: 69–78.
42. **Alder, B.**, and T. Wainwright. **1957**. *The Journal of Chemical Physics*, **27**: 1208–1209.
43. **Leach, A.** **2001**. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2nd edn. Prentice-Hall.
44. **Frenkel, D.**, and B. Smit. **2002**. *Understanding Molecular Simulation*. 2nd edn. Academic Press, San Diego.
45. **Cramer, C.** **2004**. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. 2nd edn. John Wiley & Sons Ltd, ISBN: 978-0-470-09182-1.
46. **Gupta, S.**, and P. Varadwaj. **2018**. *Int J Pharm Sci Res*, **9**: 1333–1350.
47. **Meller, J.** **2001**. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–8.
48. **González, M.** **2011**. *EDP Sciences*, **12**: 169–200.
49. **Abraham, M.**, B. Hess, et al. **2014**. GROMACS User Manual version 5.0.4.
50. **Caffrey, M.** **2003**. *Journal of Structural Biology*, **142**: 108–132.
51. **Krieger, E.**, S. Nabuurs, and G. Vriend. **2003**. *Structural Bioinformatics*, **25**: 507–521.
52. **Wieman, H.**, K. Tøndel, E. Anderssen, et al. **2004**. *Mini Rev Med Chem*, **4**: 793–804.
53. **Webb, B.**, and A. Sali. **2014**. *Protein Structure Prediction*, **1137**: 1–15.
54. **Halip, L.**, A. Cruia, A. Borota, et al. **2012**. *Revue Roumaine de Chimie*, **57**: 763–768.
55. **Sali, A.**, and T. Blundell. **1993**. *Journal of Molecular Biology*, **234**: 779–815.
56. **Brooks, B.**, C. Brooks, A. Mackerell, et al. **2009**. *J. Comput. Chem.*, **30**: 1545–1614.
57. **Brandt, E.**, M. Hellgren, T. Brinck, et al. **2009**. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**: 975–983.
58. **Stote, R.**, and M. Karplus. **1995**. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **23**: 12–31.
59. **Hoops, S.**, K. Anderson, and K. Merz. **1991**. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**: 8262–8270.
60. **Вайсилов, Г.**, И. Иванов, Л. Литов и съвт. **2012**. Суперкомпютърни приложения в природните науки (сборник - лекции), ISBN: 978-954-92937-1-5.
61. **Meng, X.-Y.**, H.-X. Zhang, et al. **2011**. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.*, **7**: 146–157.
62. **Banaganapalli, B.**, F. Morad, et al. **2019**. *Essentials of Bioinformatics*, **1**: 335–353.
63. **Morris, G.**, R. Huey, W. Lindstrom, et al. **2009**. *J. Comput. Chem.*, **30**: 2785–2791.
64. **Cerqueira, N.**, J. Ribeiro, et al. **2010**. *Int. J. Quantum Chem.*, **111**: 1208–1212.
65. **Humphrey, W.**, A. Dalke, and K. Schulten. **1996**. *J. Mol. Graph.*, **14**: 33–38.
66. **Genheden, S.**, and U. Ryde. **2015**. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **10**: 449–461.
67. **Kumari, R.**, R. Kumar, and A. Lynn. **2014**. *J. Chem. Inf. Model.*, **54**: 1951–1962.
68. **Durrant, J.**, and J. McCammon. **2011**. *J. Mol. Graph. Model.*, **31**: 5–9.
69. **Koebach, J.**, M. O'Brien, M. Muttenthaler, et al. **2013**. *PNAS*, **110**: 21183–21188.
70. **Pang, Y.**, K. Xu, J. Yazal, et al. **2000**. *Protein Science*, **9**: 1857–1865.
71. **Roe, R.**, and Y. Pang. **1999**. *Journal of Molecular Modeling*, **5**: 134–140.
72. **Abraham, M.**, T. Murtola, R. Schulz, et al. **2015**. *SoftwareX*, **1-2**: 19–25.
73. **Huang, J.**, and A. MacKerell. **2013**. *J. Comput. Chem.*, **34**: 2135–2145.
74. **Jorgensen, W.**, J. Chandrasekhar, J. Madura, et al. **1983**. *J. Chem. Phys.*, **79**: 926–935.
75. **Hess, B.**, H. Bekker, H. Berendsen, et al. **1997**. *J. Comput. Chem.*, **18**: 1463–1472.
76. **Bussi, G.**, D. Donadio, and M. Parrinello. **2007**. *J. Chem. Phys.*, **126**, 014101.
77. **Parrinello, M.**, and A. Rahman. **1981**. *Journal of Applied Physics*, **52**: 7182–7190.
78. **Darden, T.**, D. York, and L. Pedersen. **1993**. *J. Chem. Phys.*, **98**: 10089–10092.
79. **Steinbach, P.**, and B. Brooks. **1994**. *J. Comput. Chem.*, **15**: 667–683.
80. **Turner, P.** **2005**. XMGRACE, Version 5.1.19. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR.
81. NCBI Resource Coordinators. **2015**. *Nucleic Acids Research*, **43** (Database issue): D6–17.
82. [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)
83. **Altschul, S.**, W. Gish, W. Miller, et al. **1990**. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403–410.

84. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LI_LOC=blasthome
85. Rose, P., A. Prlic, et al. **2017**. *Nucleic Acids Research*, **45** (Database issue): D271–D281.
86. Yeagle, P., G. Choi, and A. Albert. **2001**. *Biochemistry*, **40**: 11932–11937.
87. Sali, A., B. Webb, M. Madhusudhan, et al. **2014**. MODELLER: A Program for Protein Structure Modeling, Release 9.14, r10167, <http://salilab.org/modeller/>.
88. Madhusudhan, M., M. Marti-Renom, M. Sanchez, et al. **2006**. *PEDS*, **19**: 129–133.
89. Shen, M., and A. Sali. **2006**. *Protein Science*, **15**: 2507–2524.
90. Racine, J. **2006**. gnuplot 4.0: a portable interactive plotting utility. *J. Appl. Econom.*, **21**: 133–141.
91. Carroll, P., and D. Sereda. **1968**. *Nature*, **217**: 666–667.
92. Jo, S., T. Kim, and W. Im. **2007**. *PLoS ONE*, **2**: e880.
93. Jo, S., J. Lim, J. Klauda, et al. **2009**. *Biophysical Journal*, **97**: 50–58.
94. Woolf, T., and B. Roux. **1996**. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **24**: 92–114.
95. Woolf, T., and B. Roux. **1994**. *PNAS*, **91**: 11631–11635.
96. Kozlowski, H., B. Radomska, et al. **1989**. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1**: 173–177.
97. Bal, W., H. Kozlowski, B. Lammek, et al. **1992**. *J. Inorg. Biochem.*, **45**: 193–202.
98. Strader, C., T. Fong, M. Tota, et al. **1994**. *Annual Review of Biochemistry*, **63**: 101–132.
99. Weiss, J., P. Morgan, M. Lutz, et al. **1996**. *Journal of Theoretical Biology*, **181**: 381–397.
100. Rubenstein, L., and R. Lanzara. **1998**. *J Mol Struc-Theochem*, **430**: 57–71.
101. Mirzadegan, T., G. Benko, S. Filipek, et al. **2003**. *Biochemistry*, **42**: 2759–2767.
102. Ballesteros, J., A. Jensen, G. Liapakis, et al. **2001**. *J. Biol. Chem.*, **276**: 29171–29177.
103. Chini, B., and F. Fanelli. **2000**. *Experimental Physiology*, **85**: 59S–66S.
104. Li, T., P. Wang, S. Wang, and Yu-Feng Wang. **2017**. *Frontiers in Immunology*, **7**: 1–9.
105. Wang, Yu-Feng. **2016**. *J Clin Exp Neuroimmunol*, **1**: 1–7.
106. Johnson, H., and B. Torres. **1985**. *J Immunol*, **135**: 773s–775s.
107. Stralin, P., et al. **2001**. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**: H1621–H1629.
108. Collins, L., and L. Troeberg. **2018**. *Journal of Leukocyte Biology*, 1–12.
109. Young, H., and D. Hodge. **2003**. Interferon- γ . *Encyclopedia of Hormones*, 391–397.
110. Ealick, S., W. Cook, S. Vijay-Kumar, et al. **1991**. *Science*, **252**: 698–702.
111. Altobelli, G., G. Nacheva, et al. **2001**. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **43**: 125–133.
112. Thiel, D., M-H. le Du, R. Walter, et al. **2000**. *Structure*, **8**: 927–936.
113. Lortat-Jacob, H., C. Brisson, S. Guerret, et al. **1996**. *Cytokine*, **8**: 557–566.
114. Walter, M., W. Windsor, T. Nagabhushan, et al. **1995**. *Nature*, **376**: 230–235.
115. Haelewyn, J., L. Michiels, P. Verhaert, et al. **1997**. *Biochemical Journal*, **324**: 591–595.
116. Lundell, D., C. Lunn, D. Dalgarno, et al. **1991**. *PEDS*, **4**: 335–341.
117. Döbeli, H., R. Gentz, W. Jucker, et al. **1988**. *Journal of Biotechnology*, **7**: 199–216.
118. Sadir, R., and H. Lortat-Jacob. **1998**. *J Biol Chem.*, **273**: 10919–10925.
119. Lortat-Jacob, H., and J-A. Grimaud. **1991**. *FEBS Letters*, **280**: 152–154.
120. Saesen, E., S. Sarrazin, C. Laguri, et al. **2013**. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**: 9384–9390.
121. Gallagher, J., M. Lyon, and W. Steward. **1986**. *Biochemical Journal*, **236**: 313–325.
122. Lortat-Jacob, H., and J-A. Grimaud. **1992**. *Biochim Biophys Acta*, **1117**: 126–130.
123. Cagno, V., E. Tseligka, S. Jones, and C. Tapparel. **2019**. *Viruses*, **11**: 1–24.
124. Schrodinger, L. **2010**. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
125. Emsley, P., and K. Cowtan. **2004**. *Acta Crystallographica Section D*, **60**: 2126–2132.
126. Lortat-Jacob, H., J. Turnbull, and J-A. Grimaud. **1995**. *Biochem. J.*, **310**: 497–505.
127. Vanhaverbeke, C., J-P. Simorre, R. Sadir, et al. **2004**. *Biochem. J.*, **384**: 93–99.
128. Park, S-J., J. Lee, Y. Qi, et al. **2019**. *Glycobiology*, **29**: 320–331.
129. Guvench, O., S. Mallajosyula, et al. **2011**. *J. Chem. Theory Comput.*, **7**: 3162–3180.
130. Hess, B. **2008**. *J. Chem. Theory Comput.*, **4**: 116–122.