

Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Факултет по химия и фармация

Катедра Физикохимия

**МОДЕЛИРАНЕ НА НАСОЧВАНЕТО НА  
ЛЕКАРСТВЕНИ КОМПЛЕКСИ КЪМ  
КЛЕТЪЧНИ РЕЦЕПТОРИ**

Гергана Пламенова Гочева

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

по професионално направление 4.2. Химически науки

(Теоретична химия – Квантова химия)

**Научен ръководител:** проф. д-р Анела Иванова

София, 2019 г.

Дисертационната работа е обсъдена и насочена за защита от катедрен съвет на Катедра Физикохимия на Факултета по химия и фармация на Софийския университет „Св. Климент Охридски“ проведен на 07. 10. 2019 г.

Дисертационната работа съдържа 182 страници, 65 фигури, 31 уравнения и 9 таблици в 8 глави, заключение, приноси и литература. Библиографията обхваща 276 заглавия.

Номерацията на фигурите, таблиците и литературните източници в автореферата отговаря на тази в дисертацията.

Получаването и разпространението на резултатите е финансирано от проект № ДН09/14 от 16. 12. 2016 г. на Фонд „Научни изследвания“. Компютърно време за някои от изчисленията е осигурено от проект VI-SEEM, договор № 675121, приложения MULTIDRUG и Surf\_prop.

## Съдържание

1.	Увод .....	1
2.	Литературен обзор .....	2
2.1.	Системи за насочен лекарствен транспорт .....	2
2.2.	Лиганд-рецепторни двойки в активното насочване.....	2
2.2.1.	Биотин и натриево-зависим мултивитаминен транспортер.....	3
2.2.2.	Фолиева киселина и $\alpha$ -фолатен рецептор .....	3
2.2.3.	Кобаламин и транскобаламинов рецептор .....	4
2.2.4.	Трансферин и трансферинов рецептор .....	5
2.2.5.	Хиалуронова киселина и CD44.....	6
2.2.6.	Интегрин-свързващи лиганди и интегрин $\alpha_v\beta_3$ .....	6
2.2.7.	Епидермален растежен фактор и рецептор за епидермални растежни фактори.....	7
2.3.	Клетъчни мембрани .....	8
2.3.1.	Състав и структура .....	8
2.3.2.	Фазови състояния .....	10
3.	Изчислителни методи .....	12
4.	Изследвани атомистични модели и изчислителен протокол .....	12
4.1.	Моделни системи .....	12
4.1.1.	Насочващи лиганди.....	12
4.1.2.	Мембрана с вграден $\alpha$ -фолатен рецептор .....	13
4.1.3.	Лекарство-преносни системи .....	16
4.1.4.	Мембрана с вграден $\alpha$ -фолатен рецептор и лекарство-преносни системи . .....	17
4.2.	Изчислителен протокол .....	17
5.	Насочващи лиганди.....	19
5.1.	Позиционна изомерия на фолиева киселина .....	20
5.2.	Структура на фолиева киселина и нейни аналози .....	21
5.2.1.	Разстояние глава-опашка.....	21
5.2.2.	Клъстерен анализ.....	23
6.	Мембрана с вграден $\alpha$ -фолатен рецептор .....	24
6.1.	Профили на масовата плътност .....	26

6.2.	Средна площ за липид .....	28
6.3.	Деутериеви параметри на порядък на липидните опашки.....	30
6.4.	Инерчен радиус на $\alpha$ -фолатния рецептор .....	33
6.5.	Вторична структура на $\alpha$ -фолатния рецептор .....	35
6.6.	Обем на лиганд-свързващия джоб.....	38
6.7.	Ориентация на рецептора спрямо мембраната.....	39
7.	Лекарство-преносни системи .....	42
7.1.	Структурна подвижност на лиганда и част от комплексите.....	42
7.2.	Междумолекулна ориентация в комплексите .....	43
7.3.	Клъстерен анализ на комплексите .....	44
8.	Насочване на лекарствен товар.....	45
8.1.	Структурна подвижност .....	45
8.2.	Приближаване към $\alpha$ -фолатен рецептор .....	46
8.3.	Самостоятелно движение на лекарствените молекули .....	50
9.	Заключение .....	53
10.	Приноси.....	56
11.	Списък със съкращения .....	60
12.	Литература.....	62

## 1. Увод

Фокусът на настоящото изследване е провеждането на молекулодинамични (МД) симулации на системи за насочена доставка на лекарства в присъствие на вграден в клетъчна мембрана рецептор. Като насочващи молекули са избрани фолиева киселина и серия от нейни производни. Проследява се взаимодействието им с  $\alpha$ -фолатен рецептор, когато към тях има прикачен лекарствен товар. Последният се състои от комплекс на химиотерапевтика доксорубицин, който е прикрепен нековалентно към специално разработен лекарство-свързващ пептид. Лекарствената подсистема е свързана ковалентно към молекулата-вектор. Четирите компонента (лекарство, пептид, свързваща част и насочващ лиганд) формират лекарство-преносната система за насочен транспорт.

Конструирани са модели, които да отразяват възможно по-точно поведението на изследваните обекти в условията на човешкия организъм (физиологичен разтвор, телесна температура, атмосферно налягане), като първоначално всеки от тях е разгледан самостоятелно. Изследвано е и влиянието на някои изчислителни параметри, чрез които могат се моделират различни експериментални или физиологични 'сценарии'. Получените резултати позволяват да се подберат най-подходящите симулационни условия, чрез които коректно да се моделира процесът на разпознаване на насочващите лиганди в организма и да се открият преимуществата или недостатъците на предложените лекарство-преносни системи.

### **Цели на работата по докторантския проект:**

1. Подбор на двойка лиганд-рецептор подходяща за изследване на молекулно ниво.
2. Съставяне на реалистичен модел на мембрана на ракова клетка с вграден в нея  $\alpha$ -фолатен рецептор.
3. Изследване на влиянието на някои изчислителни параметри върху свойствата на мембраната и на протеина и валидиране на модела.
4. Определяне на оптимален изчислителен протокол за симулациите на насочването на лекарство-преносните системи към целевия рецептор.
5. Оценка на взаимодействията между (и в рамките на) моделните системи за насочена доставка на лекарства и рецептора и/или мембраната.

## 2. Литературен обзор

### 2.1. Системи за насочен лекарствен транспорт

В основата на настоящото изследване стоят подходите за насочване на лекарствени препарати към целевите области в човешкия организъм. Инкорпорирането на активните съставки в „умни“ системи, реагиращи на различни стимули, е един от тях [1]. Друг метод за насочен транспорт е *пасивното насочване*, базирано на ефекта на засилена пропускливост и задържане (enhanced permeability and retention) на неопластичните клетки [2]. *Активното прицелване* също е удачен подход за повишаване на селективността на лекарствените препарати. В основата му стои използването на векторни молекули (с различен размер и функция), които да ориентират товара към целевите области в организма. Те могат да бъдат лиганди, които се разпознават от рецептори свръхекспресирани на повърхността на раковите клетки като следствие от ускореното им развитие. Не съществува обаче еднозначно мнение за избора на най-подходящата двойка лиганд/рецептор. Въпреки че някои рецептори се срещат в по-големи количества на повърхността на раковите клетки, експресията им при нормалните често също не е пренебрежима. Следователно и здравата тъкан може да бъде засегната от приложената терапия. В допълнение, механизмът на рецепторно разпознаване не винаги е известен. Що се отнася за избора на лиганд, изследвани са много различни молекули като насочващи агенти [12], но все още съществуват неизяснени въпроси относно проявената специфичност на някои от тях и липсата на такава при други.

*Активното прицелване е подходът избран в настоящата работа.* Причината е, че то е един от методите с по-малко недостатъци и в същото време има нерешени въпроси, които могат да се изследват на молекулно ниво.

### 2.2. Лиганд-рецепторни двойки в активното насочване

В тази част от литературния обзор на дисертацията са разгледани седем лиганд-рецепторни двойки с потенциал за приложение в активното насочване. Изборът им е продиктуван от няколко фактора: (i) всички рецептори са свръхекспресирани на повърхността на няколко типа ракови клетки, което разширява обхвата им на приложение; (ii) достъпни са експериментално определените им кристални структури (с едно изключение), което ги прави подходящ обект за молекулно моделиране; (iii) съществуват данни за естествените им лиганди и спецификата на свързване.

### **2.2.1. Биотин и натриево-зависим мултивитаминен транспортер**

Ускорената пролиферация на раковите клетки обуславя завишената им необходимост от биотин (biotin, Bt, витамин B7) – екзогенна субстанция важна за растежа и функцията на клетките. Bt представлява малка молекула състояща се от уреидо-тиофенов пръстен свързан с пентанова киселина. Натриево-зависимият мултивитаминен транспортер (sodium-dependent multivitamin transporter, SMVT) е клетъчният рецептор отговарящ за транспорта не само на биотин, но и на пантотенова (витамин B5) и липоева киселина [13]. SMVT е свръхекспресиран на повърхността на редица ракови клетки: левкемия, мастоцитома, рак на яйчниците, дебелото черво, белите дробове, бъбреците, гърдата, простатата [14, 15]. SMVT е протеин състоящ се от 12 трансмембранни (ТМ) домена, като С- и N-краищата му се намират в цитоплазмата [16]. Към момента точната му пространствена структура не е експериментално определена.

В обзорната статия на Кие и сътр. [5], посветена на използването на малки молекули в активно насочени системи за лекарствен транспорт, са представени множество примери за биотинови конюгати. Zhong и сътр. [22] дискутират използването на Bt (и други лиганди) за функционализиране на полимерни наночастици. В публикацията на Maiti и Paiga [23] също са описани системи за доставка на лекарства с участие на биотин. Теоретичните разработки по темата обаче са много малко. Lei и сътр. изучават динамиката на биотин във воден разтвор [24]. Не са открити молекулно-динамични изследвания посветени на SMVT, най-вероятно поради липсата на експериментална информация за точната му геометрия.

### **2.2.2. Фолиева киселина и $\alpha$ -фолатен рецептор**

Друг витамин, необходим за функцията и растежа на бързо развиващите се клетки, е фолиевата киселина (folic acid, FA, витамин B9). Молекулата ѝ се състои от  $\pi$ -спрегнат птеринов цикъл, следван от аминокиселинобензоил фрагмент, свързан с глутаминова киселина посредством амидна връзка подобна на тази в пептидите. При физиологични условия FA е водоразтворима и съществува под формата на дианион наречен фолат [26]. Един от начините за навлизане на фолиева киселина в клетките е след свързване с фолатни рецептори (folate receptors, FRs), при които транспортът се осъществява чрез рецептор-медирана ендоцитоза [27]. FR- $\alpha$  (една от хомоложните изоформи) е експресиран на апикалната повърхност на нормалните епителни клетки и свръхекспресиран при тумори от епителен произход (колоректални, ендометриални, на яйчниците, белите дробове, гърдата, бъбреците и други) [14]. Кристалографската структура на тази изоформа на рецептора в комплекс с фолиева киселина е публикувана от Chen и сътр. (PDB ID: 4LRH; всички идентификационни кодове използвани отук нататък са от базата данни Protein Data Bank (PDB); ако не е специално упоменато друго, протеините са от човешки

произход) [30]. FR- $\alpha$  е относително малък протеин, състоящ се от около 200 АК остатъка, формиращи 6  $\alpha$ -спирали, 4  $\beta$ -нишки и множество примки. FR- $\alpha$  има ясно обособен лиганд-свързващ джоб, в който е разположена FA, като птериновият ѝ фрагмент се намира навътре в кухината, а глутаматната ѝ опашка взаимодейства с положително заредения отвор.  $\alpha$ -Фолатният рецептор е вграден в мембраната посредством гликозилфосфатидилинозитолова (glycosyl-phosphatidylinositol, GPI) котва свързана ковалентно към С-края на протеина [31].

Изследвани са редица лекарство-преносни системи съдържащи фолиева киселина [5, 11]. Недостигът на FA също може да бъде използван като форма на противоракова терапия [32]. Някои аналози (антиметаболити, антифолати) могат да се прилагат като терапевтици, тъй като блокират етапи от фолатния метаболизъм [33]. Описаните в дисертацията теоретични разработки предоставят детайлна информация за структурата на лигандите (FA и аналози) и лиганд-рецепторния комплекс, както и за взаимодействията между тях. Разгледано е и приложението на FA в системи за насочен лекарствен транспорт (включително и в присъствие на FR- $\alpha$ ), като е обърнато внимание върху специфичното поведение на лиганда, силно зависимо от химичната природа на останалите участници в системите. В нито едно от изследванията обаче не е отчетено присъствието на клетъчната мембрана, в която е вграден рецепторът.

### **2.2.3. Кобаламин и транскобаламинов рецептор**

Кобаламин (cobalamin, Cbl, витамин B12) е молекула, участваща в клетъчния метаболизъм, която е особено важна за туморните клетки [43]. Той е екзогенна субстанция, като приемът ѝ се осъществява чрез храната. Усвояването ѝ в човешкото тяло е специфичен процес медиран от транспортни протеини – хаптокорин (haptocorrin, HC) в слюнката и кръвта, т.нар. вътрешен фактор в стомашния сок, и транскобаламин (transcobalamin, TC) в кръвта [44]. Около 80 % от кобаламин в кръвния серум е свързан с HC, но останалата част, взаимодействаща с TC, е тази, която подлежи на прием от клетките [44]. Кристалографската структура на транскобаламин в комплекс с Cbl е изолирана от Wuerges и сътр. (2BB5) [45]. Cbl-TC комплексът навлиза в клетките чрез транскобаламиновия рецептор (transcobalamin receptor, TCR, CD320) [44], като свързването между тях е силно ( $K_d \sim 0.8$  pM [46]). TCR е свръхекспресиран на повърхността на различни неопластични клетки: мастоцитома, левкемия, лимфома, рак на гърдата, белите дробове, дебелото черво, бъбреците [14]. Alam и сътр. получават кристалографската структура на извънклетъчната (ИК) част на рецептора в комплекс с Cbl-TC (4ZRP) [47].

Приложенията на кобаламин като средство за доставка на лекарства са разнообразни. От една страна той може да се използва като насочващ агент, като някои примери са дадени в [49, 50]. От друга страна при перорален прием на различни пептиди и протеини свързани с Cbl транспортните му протеини могат да



защитят активните молекули в храносмилателния тракт и да осигурят навлизането им в кръвния поток [51]. В допълнение съществува близка връзка между фолатния и кобаламиновия метаболизъм [52]. Индуцирането на дефицит на Cbl може да доведе до смущаване на фолатните метаболитни процеси, което от своя страна да повлияе на развитието на раковите клетки. Основна част от теоретичните изследвания, описани в тази част на литературния обзор, са насочени към определяне на геометрията на различни комплекси на CN-Cbl с приложение в доставката на лекарства. Изчисленията дават информация за основните взаимодействия, протичащи в тях, и/или как те влияят върху свързването на кобаламин с транспортния му протеин ТС. В литературата на са открити публикации описващи симулации на транскобаламиновия рецептор, като възможна причина за това е експериментално непълно определената му структура. Публикуването на пълната геометрия би предоставило допълнителна възможност за изследване на взаимодействията на рецептора със системи за насочен транспорт на молекулно ниво.

#### **2.2.4. Трансферин и трансферинов рецептор**

За туморните клетки е характерна увеличена необходимост от желязо, тъй като то играе важна роля в клетъчния метаболизъм и синтеза на ДНК [66].  $\text{Fe}^{3+}$  достига до клетките свързано със серумен трансферин (transferrin, Tf). Tf представлява едноверижен гликопротеин с молекулна маса около 80 kDa, който отговаря за транспорта и на други метални йони [67]. Yang и сътр. получават кристалната структура на *холо* трансферин с два  $\text{Fe}^{3+}$  (3QYT) [68]. Желязо-свързаният Tf навлиза в клетките посредством рецептор-медирана ендоцитоза осъществена чрез трансферинов рецептор 1 (transferrin receptor 1, TfR1) [67]. Той представлява трансмембранен гликопротеин от тип II и е свръхекспресиран на повърхността на редица ракови клетки – левкемия, рак на мозъка, гърдата, черния дроб, яйчниците, белите дробове [72]. Cheng и сътр. получават пространственото разположение на комплекса Tf-TfR1 (1SUV [77]).

Използването на TfR1 като цел на системи за насочен лекарствен транспорт е разгледано в групата на Penichet [78] и обобщено в разработката на Yan и сътр. [11]. Не са открити равновесни симулации на структурата на трансфериновия рецептор. Усилията на повечето автори са концентрирани в изследване на механизмите на освобождаване на желязо от Tf. Описаните е дисертацията МД симулации открояват ключовите АК остатъци и фактори на средата, които направляват прехода между отворената и затворената форма на трансферин, важен за свързването и освобождаването на железни йони от протеина. Изненадващо е, че не е изследвано приложението на лиганд-рецепторната двойка в доставката на лекарства при наличието на експериментални структури и на двете молекули. Вероятна причина за това е големият им размер, който би затруднил симулациите.

### 2.2.5. Хиалуронова киселина и CD44

Хиалуроновата киселина (hyaluronic acid, HA) е биосъвместим и биоразградим полимер съставен от несулфатирани остатъци на глюкоуронова киселина и N-ацетилглюкозамин свързани чрез редуващи се  $\beta$ -1,3 и  $\beta$ -1,4 гликозидни връзки. HA е отрицателно заредена, хидрофилна и неимуногенна и е основен компонент на извънклетъчната матрица и синовиалната течност [89]. Хиалуроновата киселина играе роля в клетъчната адхезия, миграция, растеж, диференциация, ангиогенезата и метастазите [90]. CD44 (Cluster of Differentiation 44) е основният рецептор на HA [91]. Различни изоформи на CD44 са свръхекспресирани на повърхността на клетки от рак на панкреаса, гърдата, простатата, стомашно-чревния тракт и други [94]. Кристалографската геометрия на CD44 (остатъци 25-174) от мишки в комплекс с HA<sub>8</sub> е публикувана от Vanegji и сътр. (2JCQ, 2JCR [97]). Подобие то с човешкия рецептор е потвърдено от ниската стойност (0.076 nm) на средно-квадратичното отклонение (root-mean-square deviation, RMSD) на C $\alpha$  атомите на някои еквивалентни АК. Следователно тази структура може да се използва за описание на свързването на HA към рецептора.

Yan и сътр. [11], както и групата на Dosio, разглеждат различни лекарствени комплекси с хиалуронова киселина и HA-функционализирани частици [98]. Много примери са дадени и в публикациите на Misra и сътр. [99] и Mattheolabakis и сътр. [100] допълнени от подробна информация за биологичната функция на лиганда и рецептора. Теоретичните изследвания за двойката HA-CD44 предоставят информация за времевата скала и някои ключови структурни и енергетични параметри на конформационния преход в HABD на рецептора. Характеризиран е начинът на свързване на HA олигомери към CD44. Изследвана е и структура на системи за доставка на лекарства с хиалуронова киселина във физиологичен разтвор.

### 2.2.6. Интегрин-свързващи лиганди и интегрин $\alpha_v\beta_3$

Интегрините са хетеродимерни трансмембранни гликопротеини съставени от нековалентно свързани  $\alpha$ - и  $\beta$ -подединици [112]. Съществуват общо 24 интегрина (в зависимост от комбинацията от подединици) с различни функции [113]. Те играят роля в междуклетъчната сигнализация направляваща клетъчната адхезия, миграция, пролиферация и апоптоза [114]. Към интегрините се свързват редица протеини от извънклетъчната матрица (колагени, фибронектини, ламинини и други) или различни пептиди [116]. Спецификата на разпознаване се определя от наличието на Arg-Gly-Asp (RGD) мотив в лиганда и от координацията на двувалентни метални йони в някои места на рецептора. Някои от най-често изследваните представители, свръхекспресирани на повърхността на различни неопластични клетки (меланома, глиобластома, рак на гърдата, простата, панкреаса, яйчниците, маточната шийка, дебелото черво, недребноклетъчен рак на белия дроб), са  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  и

$\alpha_6\beta_4$  [118]. Структурите на някои от тях са експериментално определени, но за разглеждане в настоящия обзор е избран  $\alpha_v\beta_3$ . Xiong и сътр. изолират комплекса му с цикличен RGD-съдържащ пентапептид (*cyclo* Arg-Gly-Asp-D-Phe-N-метил-Val) (1L5G) [123].

В обзорните статии на Kue и сътр. [5] и Yan и сътр. [11] са изброени множество лекарствени комплекси насочени към интегриновите рецептори. Допълнителни примери могат да бъдат намерени в разработката на Wang и сътр. [127]. Теоретично е изследвана структурата на RGD-съдържащи пептиди във воден разтвор. Част от симулациите на  $\alpha_v\beta_3$  имат за цел да обяснят отварянето на рецепторната глава. Проследено е още влиянието на (различни) метални йони върху стабилността на интегрин и свързването на лиганди. Разгледаните лиганд-рецепторни комплекси очертават някои от основните промени настъпващи при свързване. Установено е „предпочитанието“ на интегрин към циклични пептиди, които дори са включени в обещаващи системи за насочен лекарствен транспорт.

### **2.2.7. Епидермален растежен фактор и рецептор за епидермални растежни фактори**

Епидермалните растежни фактори (epidermal growth factors, EGFs) играят роля в регулацията на клетъчния растеж, метастази и ангиогенеза при свързване с рецепторите за епидермални растежни фактори (epidermal growth factor receptor, EGFR) [144, 145]. Кристалографската структура на EGF е публикувана от Lu и сътр. (1JL9) [148]. EGFR (HER1, EbrB1) е член на клас тирозин-киназни рецептори [146] и е свръхекспресиран на повърхността на клетки от епителен произход, а също и на колоректални тумори, рак на белите дробове, бъбреците, гърдата, яйчниците, маточната шийка, недребноклетъчен рак на белия дроб и други [144, 149]. Кристалографската структура на хомодимерния комплекс EGF-EGFR е публикувана от Lu и сътр. (3NJP [150]) и включва сърцевидната извънклетъчна част и трансмембранните фрагменти. Взаимодействията между EGF и рецептора са описани подробно в по-ранната разработка на Ogiso и сътр. (1IVO [151]).

EGFR е представен като подходяща цел на системи за насочен лекарствен транспорт в обзорните статии на Zhong и сътр. [22] и Wang и сътр. [127], като това е подкрепено от редица експериментални данни. МД симулациите на двойката EGF-EGFR предоставят информация за глобалната структура на протеина, описват конформационните промени произтичащи от свързване на лиганд и/или гликозилиране на рецептора. Наблюдавани и анализирани са някои дълговременни ефекти. Това е и единствената лиганд-рецепторна двойка, при която е оценено влиянието на мембранната среда, като е доказано, че присъствието ѝ е важно за точното моделиране на подобни системи. Разгледан е и конюгат за насочен транспорт към EGFR на молекулно ниво.

Въз основа на направения дотук преглед на лигандите и техните рецептори може да се подберат подходящи системи за изучаване на процеса на насочване на молекулно ниво, което е цел на дисертационния труд. Формулирани са няколко критерия, на които да отговарят лиганд-рецепторните двойки: (i) наличие на експериментални данни за структурата на лигандите и химичните им особености във физиологични условия; (ii) аналогична информация за рецептора (кристалографска или ЯМР геометрия, протониране на АК остатъци, гликозилиране, начин на вграждане в мембрана), което да предостави възможност за еднозначно конструиране на молекулен модел; (iii) експериментално известен начин на свързване на лигандите към него, което да направи възможна правилната оценка на афинитета както на познати, така и на нови молекули-вектори; (iv) размер на лиганда и рецептора, който позволява провеждане на молекулно-динамични симулации на достатъчни по големина модели, за да бъдат реалистични, и също така в обозримо време; (v) наличие на молекулно-механични силови параметри за описание на всички компоненти на моделните системи.

*Фолиевата киселина и  $\alpha$ -фолатният рецептор* отговарят на тези условия и са избрани като обект на изследване. Химичната структура на FA е известна, като съществува и информация за заряда ѝ във воден разтвор [26]. Познати са достатъчно нейни аналози (антифолати) [33], които могат да бъдат изследвани паралелно като алтернативни лиганди на FR- $\alpha$  в системи за насочен лекарствен транспорт. Публикувана е кристалната структура на протеина в комплекс с FA [30], като свързването между молекулите е детайлно описано. Посочени са и N-гликозилираните остатъци в FR- $\alpha$ . Известен е начинът на вграждане на рецептора в клетъчната мембрана [31], като GPI котвата може да бъде реконструирана по експериментални данни [174]. Размерът на рецептора (~200 АК) и потенциалните му лиганди (~50-60 атома) е подходящ за атомистични МД симулации, които да бъдат реализирани в рамките на докторантурата. Молекулно-механичните силови параметри за всеки компонент от системата са или предварително налични, или могат лесно да бъдат генерирани допълнително.

## **2.3. Клетъчни мембрани**

### **2.3.1. Състав и структура**

Плазмените мембрани (ПМ) представляват бариерата, която отделя клетките от обкръжаващата ги среда и същевременно осигурява възможност за насочен (навътре и навън) транспорт на биоактивни молекули [175]. ПМ са изградени от нековалентно свързани липиди организирани в бислои, в състава на който са включени и редица протеини. Разгледаните в предишната точка рецептори представляват само някои примери от многообразието от мембранни протеини.

В човешкия организъм съществуват повече от 1000 типа липиди. Според изграждащите ги фрагменти те се разделят на няколко класа: фосфолипиди (основен градивен елемент на ПМ при бозайниците), гликолипиди (GLs) и стероли. В състава на плазмените мембрани влизат и трите вида липиди, като първите са в най-голямо количество. При физиологично рН някои от тях са цвистерйонни (фосфатидилхолин (phosphatidylcholine, PC), фосфатидилетаноламин (phosphatidylethanolamine, PE)), а други се характеризират с отрицателен нетен заряд (фосфатидилсерин (phosphatidylserine, PS), фосфатидилинозитол (phosphatidylinositol, PI), фосфатидилглицерол (phosphatidylglycerol, PG), фосфатидинова киселина (phosphatidic acid, PA)).

При фосфоглицеридите главата е свързана с една от крайните хидроксилни групи (sn3) на глицерола. Към другите две позиции (означени като sn1 и sn2) чрез естерни или етерни връзки са свързани мастнокиселинни (ацилни или алкилови) вериги формиращи липидната опашка. Опашките могат да бъдат една или две. Те съдържат четен брой въглеродни атоми (между 14 и 24). Степента на ненаситеност може да варира от 0 до 6 двойни връзки намиращи се в *cis* конформация. Плазмалогените (plasmalogens, PLs) са фосфолипиди, при които единият мастнокиселинен остатък е свързан към sn1 с естерна връзка, а другият – към sn2 с етерна. Повишеното им съдържание е една от характеристиките на мембраните на неопластичните клетки.

Сфинголипидите са друг тип липиди, чиято опашка е изградена от сфингозин – аминокиселин с дълъг мононенаситен (*trans* двойна връзка) въглеводороден остатък. Към аминокиселинната група на алкохола чрез amidна връзка е прикачена мастнокиселинна верига. Най-разпространеният представител е сфингомиелин (sphingomyelin, SM), при който към хидроксилната група на сфингозин е свързан фосфохолин.

Основният стерол при бозайниците е холестеролът. Той се различава от останалите липиди по системата от четири кондензирани ядра. Поради структурните си особености CHL не може да образува самостоятелни бислоеве, а интеркалира между хидрофобните опашки на останалите липиди.

Съставът на плазмените мембрани зависи силно от конкретната тъкан и нейното физиологично състояние [176]. Най-общо ПМ са богати на PC, PE, SM и CHL, докато анионните фосфоглицериди се срещат в по-малко количество [177] и обикновено са съсредоточени във вътрешния монослой на мембраната.

Мембранните бислоеве са динамични структури с поведение на вискозна течност, а не на твърдо вещество. За липидите (и протеините) в тях са характерни латерална дифузия (описва се със съответния дифузионен коефициент,  $D_L$ ) и ротация около дългата ос на молекулите ( $D_R$ ). Липидите могат и да прескачат между двата монослоя (напречна дифузия или flip-flop, характеризира се с време на полуживот на прехода,  $t_{1/2}$ ) [178]. Тези процеси са важни за редица свойства и функции на

мембраните като например зарядова асиметрия. Хетерогенното разпределение на липидите в мембраните води до характеристична асиметрия (в термини на брой и вид на молекулите) нормално на бислоя и до образуване на различни домени в латерално направление [179]. Известно е, че PC и SM са основно локализирани във външния монослой на ПМ, а вътрешният е изграден предимно от PE, PS и PI. Съсредоточаването на отрицателно заредени липидни глави в единия монослой създава зарядов градиент през мембраната. Наличието му е определящо за редица клетъчни функции, включително взаимодействието с някои протеини в цитозола. Разпределението на холестерол все още е спорен въпрос. Според някои проучвания той е локализиран предимно в горния монослой [180], докато според други (за синаптична ПМ [181]) той се намира основно в долния. Експериментално получените граници за количеството CHL във външния монослой са много широки (от <20 % до >90 %), като това може да се обясни с технически трудности при измерванията възникнали поради склонността му да участва в flip-flop процеси [182], както и със спецификата на съответната тъкан.

Друга особеност в подреждането на липидите е образуването на краткоживущи домени (липидни салове, lipid rafts) в равнината на всеки монослой от асиметричната мембрана [183]. Тези домени представляват динамични относително подредени области, богати на холестерол и сфинголипиди, с големина от 10 до 200 nm (могат да достигнат и над 300 nm). В тях се вграждат и доста протеини (вкл. FR- $\alpha$ ), най-често чрез GPI или палмитоилови котви, като взаимодействията им с липидите също играят важна роля за образуването на тези домени. Като цяло липидните салове могат да се разглеждат като среда на специфични контакти между различни протеини (например агрегиране и създаване на реакционен център), където се регулира тяхното поведение и активност.

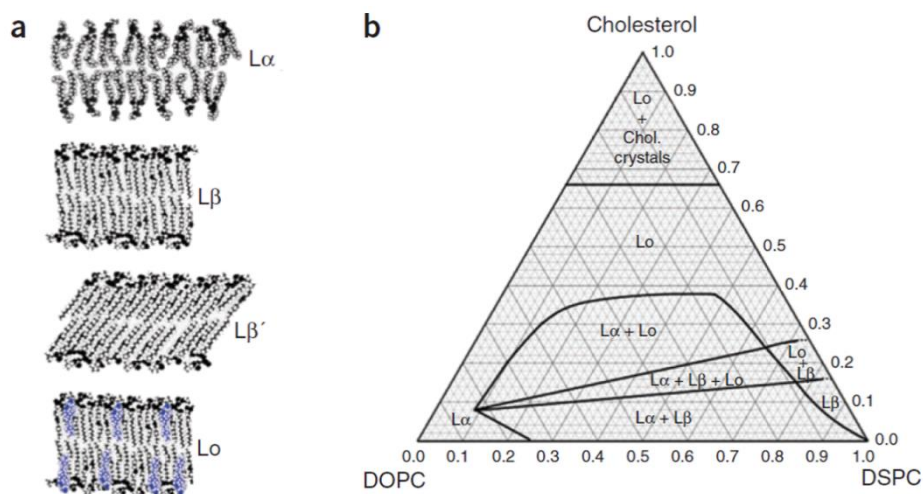
Огромна част от молекулодинамичните изследвания на моделни липидни бислоеве са обобщени в подробната обзорна работа на Marrink и сътр. [184]. Накратко, повечето атомистични модели на клетъчни мембрани съдържат до три или четири различни липидни типа. Голяма част от тях са симетрични, т.е. молекуленото съдържание на двата монослоя е идентично, което не е в съгласие с характерната зарядова асиметрия на мембраните [179]. В публикацията на Marrink и сътр. са дадени допълнителни примери за подобни атомистични и окрупнени модели [184].

### **2.3.2. Фазови състояния**

Липидният състав на биологичните мембрани и условията на средата в човешкия организъм определят фазовото състояние на бислоеве, което се отразява в различни структурни особености. Познати са четири ламеларни фази (Фигура 9, ляво) отличаващи се по скоростта на латерална дифузия на липидите и подредбата на хидрофобните им опашки [175]. За твърдо-кристалната ( $S_o$ ) или гел ( $L_{\beta}$ ) фаза са характерни бавна дифузия и високо ниво на порядък. Липидите с по-дълги наситени

въглеродни вериги образуват такива фази. Те могат да са наклонени ( $L_{\beta}'$ ) или ненаклонени ( $L_{\beta}$ ) спрямо нормалата на мембранната повърхност. При течно-кристалната ( $L_{\alpha}$ ) или течно неподредената ( $L_d$ ) фаза се наблюдава бърза дифузия и значително по-слаба подредба. Подобни области са заселени предимно от липиди с ненаситени опашки. Течно-подредената ( $L_o$ ) фаза има междинно поведение – липидите в нея дифундират бързо в латерално направление, но опашките им са подредени. Такава фаза се реализира в присъствие на холестерол и е характерна за липидните салове [183].

За онагледяване на фазовите състояния, реализирани във външния монослой на ПМ на бозайник, може да се използва смес от холестерол, липид с висока и липид с ниска температура на топене. Диаграма на такава смес от DSPC/DOPC/CHL при 296 К е представена на Фигура 9, дясно [196]. При ниски концентрации на CHL се наблюдава равновесие между течно-кристална и гел фаза. При увеличаване на количеството CHL започва да се формира  $L_o$  и се установява област на съществуване на трите фази,  $L_{\alpha}$ ,  $L_{\beta}$  и  $L_o$ . Следващо повишаване на концентрацията му води до изчезване на твърдата фаза и равновесие между течно кристално и течно подредено състояние. След  $\sim 0.67$  молна част CHL се наблюдават кристали от холестерол монохидрат и  $L_o$ .



**Фигура 9.** (ляво) Схематично представяне на фазовите състояния на биомембраните; холестерол е оцветен в синьо, останалите липиди в черно и сиво; (дясно) фазова диаграма на моделна смес от DSPC/DOPC/CHL [196]

Една от ключовите физикохимични характеристики на липидните бислоеве в ПМ, която е свързана с така описаните фазови състояния, е повърхностното налягане. То може се изчисли от стойността на повърхностното налягане. Повърхностното налягане на смесени липидни бислоеве, наподобяващи по състав тези в клетъчна мембрана, както и за фрагменти от истински ПМ, заема стойности между 30 и 35  $mN \cdot m^{-1}$  [199]. За еритроцитни мембрани е установено, че латералното налягане на външния монослой при 310 К е между 31 и 34.8  $mN \cdot m^{-1}$ .

### **3. Изчислителни методи**

В дисертацията са описани накратко принципите на метода на молекулната динамика използван за постигане на поставените цели. Обобщени са някои изчислителни процедури, чието влияние върху поведението на моделната мембрана и вградения в нея рецептор е проследено в рамките на работата по дисертацията. Разгледани са и някои по-специфични типове анализи проведени върху получените резултати.

### **4. Изследвани атомистични модели и изчислителен протокол**

#### **4.1. Моделни системи**

Преди да се осъществи крайната цел, поставена в дисертационния труд, а именно моделиране на насочването на лекарствени комплекси към  $\alpha$ -фолатния рецептор, са симулирани поотделно основните компоненти от системата. Изградени са модели на серия от лиганди във физиологичен разтвор. Конструирана е плазмена мембрана на ракова клетка, в която е вграден FR- $\alpha$ . Построени са пептид-лекарствени комплекси, в състава на които е включен по един от лигандите, като е използвана геометрията получена от симулациите на първия тип модели. След това лекарство-преносните системи са поставени на случайно място във водния разтвор от страната на рецептора и е проследено поведението им в негово присъствие и това на мембраната. Всички модели са атомистични, както и проведените с тях симулации.

##### **4.1.1. Насочващи лиганди**

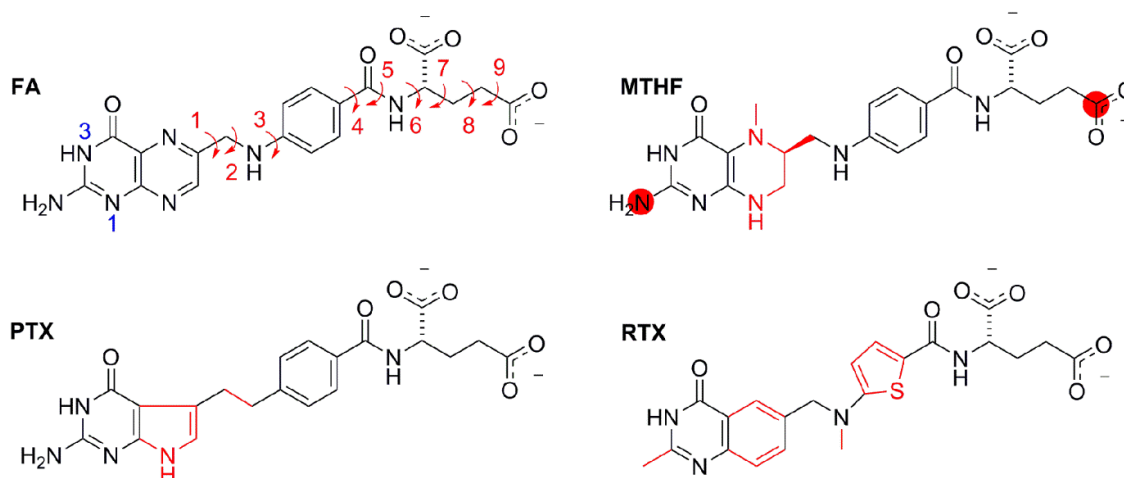
Освен фолиева киселина, естественият лиганд на  $\alpha$ -фолатния рецептор описан подробно в т. 2.2.2, за изследване са избрани още три молекули с подобна химична структура (Фигура 13): 5-метил тетрахидрофолат (5-methyl tetrahydrofolate, МТНФ), пеметрексед (pemetrexed, РТХ) и ралтитрексед (raltitrexed, RTX).

Един допълнителен аспект, свързан със структурата на фолиевата киселина, е възможността за позиционна изомерия на лакрамната форма на птериновия ѝ фрагмент (водороден атом при N1 или N3, означени на Фигура 13). Няма обаче данни за детайлно изследване на позиционната изомерия в молекулата на фолиевата киселина. Поради тази причина са подготвени и симулирани два модела на FA, в които Н-атомът се намира при N1 (FA-N1) или при N3 (FA-N3).

В съгласие с данни от литературата [26] фолиевата киселина (FA-N1 и FA-N3) и нейните аналози са разглеждани като дианиони (Фигура 13). Проведено е първоначално конформационно търсене (КТ) за определяне на възможните конформери на молекулите. Всеки лиганд е поставен в кубична периодична кутия с



дължина на ръба 3.6 nm. Добавени са хлоридни аниони за неутрализиране на заряда и около 1500 водни молекули.



**Фигура 13.** Химична формула и използвани съкратени обозначения на моделираните лиганди; вариациите в химичния състав на всяка молекула спрямо FA са дадени в червено; с номера и червени стрелки са маркирани простите връзки в молекулния скелет; червените кръгчета показват атомите, които са използвани за пресмятане на разстоянието глава-опашка; сините цифри са номерата на съответните азотни атоми в птерин

За да се определи кой позиционен изомер на FA е по-стабилен са проведени квантовохимични изчисления. Използвани са две структури на FA-N1 и FA-N3 от КТ. Те са подбрани така, че да се различават по геометрия и конформация на amidната връзка. За всяка от тях са построени двата изомера чрез преместване на водорода при съответните азотни атоми. По този начин се цели да се оцени влиянието както на позицията му, така и на конформацията на молекулата. Извършена е геометрична оптимизация и е определена относителната свободна енергия на получените структури.

Най-нискоенергетичните структури от КТ (включително и на двата позиционни изомера) служат за начални конфигурации за МД симулациите. Всяка молекула е поставена в периодична кутия с размери 5 x 5 x 5 nm. Зарядът е неутрализиран с Cl<sup>-</sup>. Добавени са около 4000 водни молекули и 150 mM NaCl за пресъздаване на физиологичен разтвор. Получените системи съдържат около 12000 атома.

#### 4.1.2. Мембрана с вграден $\alpha$ -фолатен рецептор

Съставен е моделен бислой базиран на експериментални данни за състава на неопластични мембрани. Включени са осем различни типа фосфолипиди в съотношение определено от Merchant и сътр. за мембрана на клетки от рак на гърдата [233]. Липидите с анионни глави (PI, PS, PG, PA) са поставени единствено във вътрешния монослой, създавайки характеристичната зарядова асиметрия на естествените мембрани [179]. Добавени са и плазмалогени, тъй като те се оказват

важен компонент на раковите мембрани [233]. Цвитерйонните липиди (PC, PE, SM) са разпределени между двата монослоя, като PE са съсредоточени основно във вътрешния, а SM (част от молекулите са хидрогенирани) – във външния. Холестерол е разположен само във външния монослой. С това, в комбинация с повишената концентрация на SM, се цели да се наподобява мембранната структура на липиден сал [183]. Процентните съотношения на различните типове липиди (като част от цялата мембрана) са представени в Таблица 1.

**Таблица 1.** Съотношение на различните типове липиди като процент от цялата моделна мембрана

Тип	PC	PE	SM	PL	PI	PS	PG	PA	CHL
[mol %]	33.0	11.4	11.6	9.2	2.7	8.1	0.5	1.1	22.4

За определяне на степента на наситеност на опашките е използвано изследването на Yu и сътр. за мембрана на уротелиални ракови клетки [234]. 61.0 mol % от липидите в модела имат наситени въглеводородни вериги, 28.0 mol % мононенаситени от тип  $\omega$ -9, а 11.0 mol % полиненаситени (polyunsaturated, PUFA) от тип  $\omega$ -6. Двойните връзки в PUFA са между две и шест. Дължината на опашките варира между 14 и 24 въглеродни атома в една верига, като дългите са по-предпочетени (основно от 32 до 36 C-атома в двете вериги). Повечето липиди имат по две диацилно свързани вериги, но има и такива с алкил-ацилни (плазмалогенни) опашки, а също и няколко едноопашни молекули.

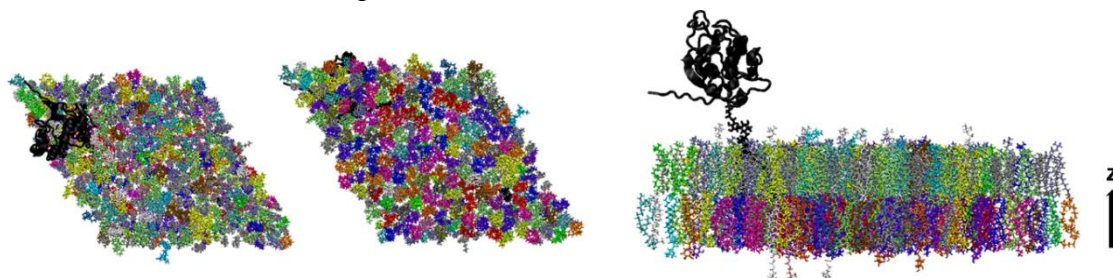
Като резултат в моделната мембрана са включени 370 молекули от 35 вида липиди. Нетният заряд на бислоя, концентриран във вътрешния монослой, е -55 (-56 от анионните липиди и +1 от едноопашния сфингозилфосфорилхолин). Мембраната е конструирана чрез инструмента Membrane Builder на уеб-базираната програма CHARMM-GUI [235]. Липидите, които липсват от базата данни на CHARMM-GUI, са създадени ръчно чрез модифициране на подобни на тях молекули. По този начин изградената вече структура на бислоя се пертурбира минимално.

Следваща стъпка е вграждането на  $\alpha$ -фолатния рецептор в моделния бислой. В мембраните той се локализира предимно в липидните салове [183, 236]. Експериментално е доказано, че около 20-40 % от молекулите на GPI-закотвените протеини (FR- $\alpha$  и green fluorescent protein) се организират в клъстери съдържащи от две до четири (различни) молекули, като наличието на холестерол играе ключова роля за формирането и стабилизирането им [237]. Останалите рецепторни молекули дифундират свободно като мономери. Тези фактори обуславят и специфичната конструкция на представената тук моделна мембрана. Като се вземе предвид и

размерът ѝ, една рецепторна молекула е достатъчна за коректно описание на поведението ѝ в обкръжение подобно на това в живия организъм.

Използвана е кристалографската структура на комплекса на рецептора с фолиева киселина (4LRH [30]) описана подробно в т. 2.2.2. Запазени са N-ацетилглюкозаминовите остатъци, а FA е премахната от лиганд-свързващия джоб. В съгласие с взаимодействията, наблюдавани в експерименталната структура, кухнята е дефинирана чрез следните 16 аминокиселинни (АК) остатъка: Tyr60, Phe62, Asp81, Tyr85, Trp102, Arg103, Arg106, Trp134, His135, Lys136, Gly137, Trp138, Trp140, Trp171, Ser174 и Tyr175. Протеинът е протониран според моделираните физиологични условия ( $pH = 7.4$ ). 20 АК (13 Glu и 7 Asp) са отрицателно заредени, а 24 АК (12 Lys, 11 Arg и N-крайния Gln) – положително. Нетният заряд е +4. GPI котвата е пресъздадена, спазвайки наличните експериментални резултати [174]. Гликолипидната част се състои от фосфатидилинозитол свързан с глюкозамин и три манозни остатъка. Алкиловите вериги са закачени за C1 ( $C_{20:1}$ ) и C2 ( $C_{22:0}$ ) на глицерол и O5 на инозитол ( $C_{22:0}$ ). Връзката с C-края на FR- $\alpha$  се осъществява посредством етаноламинов фрагмент свързан с последния манозен остатък на GPI. За целта е премахната късата сигнална последователност от протеина [31, 238]. Нетният заряд на котвата (-1) се дължи на две депротонирани фосфатни групи и протонираната аминокиселина в глюкозамин.

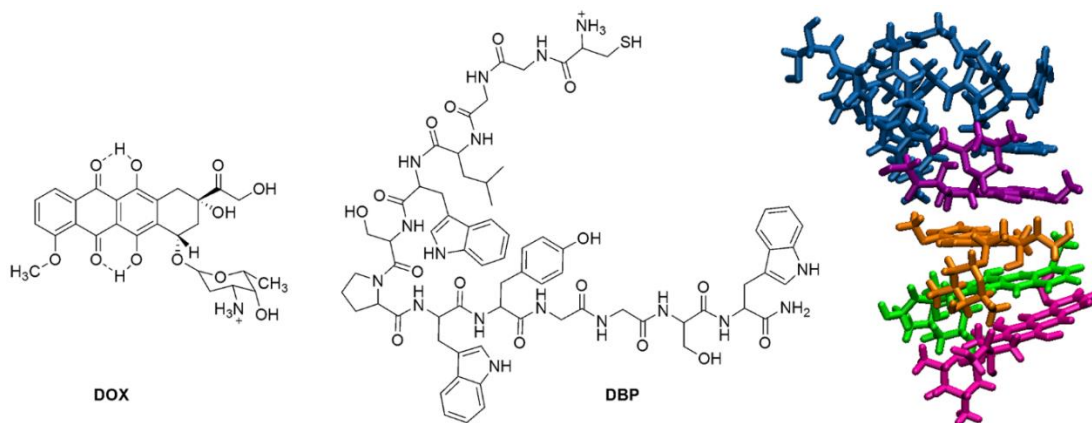
FR- $\alpha$ -GPI е включен в състава на мембраната чрез заместване на един от липидите поставен специално за целта на произволна позиция във външния монослой. Структурата на целия модел е показана на Фигура 15. Системата е поставена в хексагонална периодична кутия с размери 11.1 x 11.1 x 17.0 nm осигуряваща правилно подреждане на липидите, като бислоят е центриран по z оста ѝ. Размерът на модела е сравним с експериментално определените характеристични разстояния на липидните слоеве [237]. От двете страни на мембраната са добавени повече от 45000 водни молекули. За неутрализиране на заряда са добавени  $Na^+$  и  $Cl^-$ . Йонната сила на физиологичен разтвор е пресъздадена с допълнителни 150 mM NaCl. Готовият модел съдържа около 185000 атома.



**Фигура 15.** Изглед отгоре, отдолу и отстрани (отляво надясно) на началната конфигурация на моделната мембрана на ракова клетка с вграден  $\alpha$ -фолатен рецептор; молекулите от бислоя са оцветени според типа липид; FR- $\alpha$ -GPI е черен; водата и противойоните са премахнати за яснота; отбелязана е ориентацията на z оста на симулационната кутия

### 4.1.3. Лекарство-преносни системи

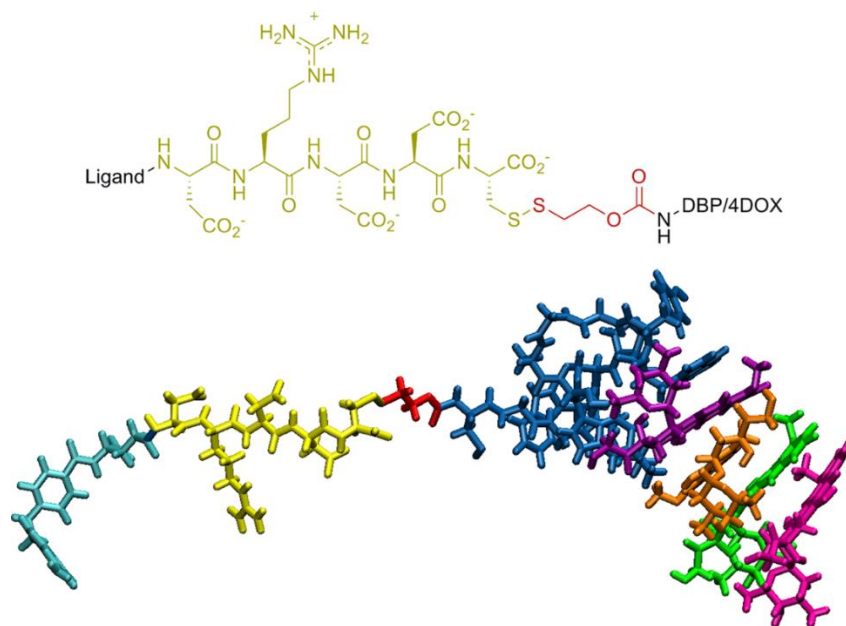
Изготвена е моделна система за доставка на лекарства, базирана на експериментално (непубликувани резултати) и теоретично [239] изследван комплекс на доксорубицин (doxorubicin, DOX) и лекарство-свързващ пептид (drug-binding peptide, DBP), представен на Фигура 16.



**Фигура 16.** (ляво) Химична формула на доксорубицин; (в средата) химична формула на изследвания лекарство-свързващ пептид; (дясно) структура на комплекс DBP-4DOX [239]; DBP е син, четирите лекарствени молекули са съответно цикламена, зелена, оранжева и лилава

Комплексът на DBP с четири молекули доксорубицин (DBP-4DOX, Фигура 16, дясно) е получен в рамките на предишно изследване [239] продължено по време на докторантурата с цел приложение в описаните тук системи. Лекарствените молекули са адсорбирани на повърхността на пептида, като взаимодействат нековалентно с един от неговите триптофанови остатъци (Trp8). Целта на DBP в рамките на изследваната лекарство-преносна система е да служи като носител на повече от една лекарствена единица, с което се повишава допълнително ефективността на доставка.

Друг важен аспект от конструирането на системи за насочен транспорт е начинът на свързване между прицелващата молекула и лекарствения товар. В настоящата работа е избран свързващия фрагмент използван от Vlahov и сътр. [246]. За построяване на свързаните към векторен лиганд пептид-лекарствени комплекси (Фигура 17) е използвана най-заселената геометрия на лигандите, получена от МД симулациите.  $\gamma$ -карбоксилната група на всяка молекула е свързана с Asp от удължителя, следван от мостовия фрагмент свързан с N-края на DBP. Комплексите са означени като L-DBP-4DOX, като „L“ е един от лигандите (FA, MTHF, RTX или RTX). Всеки от четирите комплекса е поставен в кубична периодична кутия с дължина на ръба 7.0 nm. За неутрализиране на зарядите са добавени  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  противойони. Физиологичният разтвор е пресъздаден чрез  $\sim 11000$  водни молекули и 150 mM NaCl. Моделите съдържат общо около 33500 атома.



**Фигура 17.** (горе) Химична формула на изследваните пептид-лекарствени комплекси; удължителят и мостовата част са оцветени съответно в жълто и червено; (долу) начална геометрия на FA-DBP-4DOX; FA е циан, удължителят е жълт, мостовата част е червена, DBP е син, четирите лекарствени молекули са съответно цикламена, зелена, оранжева и лилава

#### 4.1.4. Мембрана с вграден $\alpha$ -фолатен рецептор и лекарство-преносни системи

За конструиране на последния тип модели са използвани най-високозаселените структури (получени чрез клъстерен анализ) от симулациите на лекарство-преносните системи и кадър (при 200 ns) от траекторията на вградения в мембраната рецептор генерирана в NPT ансамбъл. Взета е солватната обвивка на всеки пептид-лекарствен комплекс, като е изрязана кутия с размери 4.4 x 3.4 x 4.3 nm около него. По този начин е включено и най-близкото му водно обкръжение в конфигурация изгодна за молекулите. Избрана е случайна позиция във водната среда над външния монослой на мембраната. Премахнати са съответните водни молекули и на тяхно място са поставени солватирани структури на комплексите. Моделите съдържат около 184000 атома.

#### 4.2. Изчислителен протокол

За описание на лигандите и хлоридните аниони по време на **конформационното търсене** е използвано силово поле AMBER99 [250], а за водната среда – модел TIP3P [206]. Извършено е едновременно случайно въртене около деветте прости връзки означени в структурата на FA на Фигура 13. Конформерите са приемани според критерия на Metropolis при температура 310 K. След 5000 геометрични оптимизации с градиент  $0.4 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$  са намерени между 33 и 51

нискоенергетични структури на всеки лиганд. Те са групирани по структурно подобие по метода на Jarvis-Patrick [216] с гранично разстояние 0.16 nm.

RESP заряди изведени от получените нискоенергетични клъстери са използвани в **МД симулациите на лигандите** в комбинация с параметри от силовото поле CGenFF [202]. Неорганичните йони са описани с CHARMM36 [203], а водната среда – с TIP3P [207]. Симулациите следват стандартен протокол. Продуктивните симулации са проведени при постоянна температура 310 K и постоянно налягане от 1 bar. Температурата е поддържана постоянна чрез стохастичен Velocity rescaling термостат [214], а налягането – чрез баростат на Berendsen [215]. Използвана е изотропна схема за скалирането на обема на кутията. Достигнатото равновесие е удостоверено чрез наблюдаваните постоянни флуктуации на общата енергия, температурата, налягането и RMSD на координатите на атомите от лиганда спрямо тези в минимизираната структура. Уравненията за движение са интегрирани с метода leap-frog с времева стъпка 2 fs. Генерирани са продуктивни МД траектории с дължина 100 ns, като са записвани кадри на всеки 0.2 ps. На статистически анализ са подложени последните 50 ns от всяка траектория. 50000 кадъра, извлечени от тези последни 50 ns през интервал от 1 ps, са използвани за клъстерен анализ по метода на Jarvis-Patrick [216]. Групирането е извършено само по координатите на лиганда с гранично разстояние 0.05 nm. Клъстерите със заселеност над 500 структури са считани за значими, а тези с над 5000 представителя – за представителни.

**Квантово-химичните пресмятания** са извършени с хибридният DFT функционал B3LYP [254] в комбинация с базис 6-311+G\*\* [255]. Влиянието на водната среда е отчетено имплицитно с PCM [252].

За описание на различните компоненти на системата при **МД симулациите на моделната мембрана с вграден  $\alpha$ -фолатен рецептор** са използвани различни набори от параметри на CHARMM36 – за липиди [203], аминокиселини [256] и противойони [203] и олигозахариди [257]. Водните молекули са TIP3P [207]. По време на минимизацията и нагряването върху атомите на протеина са наложени ограничения. Достигането на целевата температура е удостоверено и симулациите са продължени в NPT ансамбъл, като са използвани три различни схеми за поддържане на желаното налягане (1 bar) – NPT-iso, NPT-semi и NP $\gamma$ T. Повърхностното напрежение в NP $\gamma$ T е избрано така, че да съответства на експериментално измереното повърхностно налягане на живи клетъчни мембрани  $\pi = 30$  mN/m [199]. Останалите параметри са същите като в симулациите на лигандите. Продуктивната траектория на всяка от трите симулации е с дължина 1000 ns, като кадри са записвани през 10 ps. Анализирани са четири етапа от по 100 ns - 150 до 250 ns, 450 до 550 ns, 650 до 750 ns и 900 до 1000 ns. Те са избрани според особеностите в еволюцията на RMSD координатите на атомите от FR- $\alpha$  спрямо началната структура (т. 6).

За **МД симулациите на пептид-лекарствените комплекси** за пептидните фрагменти е използвано силовото поле описващо FR- $\alpha$  [256] в комбинация с CGenFF

параметри [202] за доксорубин, насочващия лиганд и моста. Следван е изчислителен протокол аналогичен на този от симулациите на лигандите. Генерираните траектории са с дължина 100 ns и имат за цел да еквилибрират структурите във физиологичен разтвор. Енергията, температурата и налягането флукуират около постоянни средни стойности, еволюцията на RMSD е описана в т. 7.1. Структурите на ковалентно свързаните елементи от комплексите в последните 50 ns (кадри са извлечени през 1 ps) са подложени на клъстерен анализ по метода на Jarvis-Patrick [216] с гранично разстояние 0.09 nm. Получени са между 883 и 5155 клъстера за четирите системи.

**МД симулациите на пептид-лекарствените комплекси в присъствие на рецептора и мембраната** са предшествани от минимизация на ,вншната‘ за мембраната и рецептора вода с енергетичен градиент от  $100 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$ . След това скоростите на всички молекули са генерирани наново от Maxwell-Boltzmann разпределение при температура 310 K, като системата е оставена да релаксира в продължение на 10 ns. След този етап са генерирани продуктивни траектории с дължина 300 ns за всяка от системите, като са записвани кадри през 10 ps.

Конформационното търсене е проведено с програмния пакет HyperChem 7.0 [258], а извеждането на зарядите – с Amber 8 [259]. За всички етапи от МД симулациите, както и за част от следващите статистически анализи, са използвани две версии на програмен пакет Gromacs – 5.1.2 [260] за лигандите и Gromacs 2016.3 [260] за всички останали модели. За визуализиране на траекториите е избран VMD 1.9.1 [261]. Квантовохимичните пресмятания са направени с Gaussian 09 [262]. Анализът на Вороной е проведен с APL@Voro [220]. Обемът на лиганд-свързания джоб на рецептора е изчислен с `trj_cavity` 2.0 (с разстояние 0.07 nm между точките в grid) [224]. Самите пресмятания са проведени на суперкомпютърните системи Avitohol (София, приложение MULTIDRUG по проект VI-SEEM) и ARIS (Атина, приложение Surf\_rgor по проект VI-SEEM), и на GPU машина, закупена по проект с ФНИ, договор ДН09/14 от 16. 12. 2016 г.

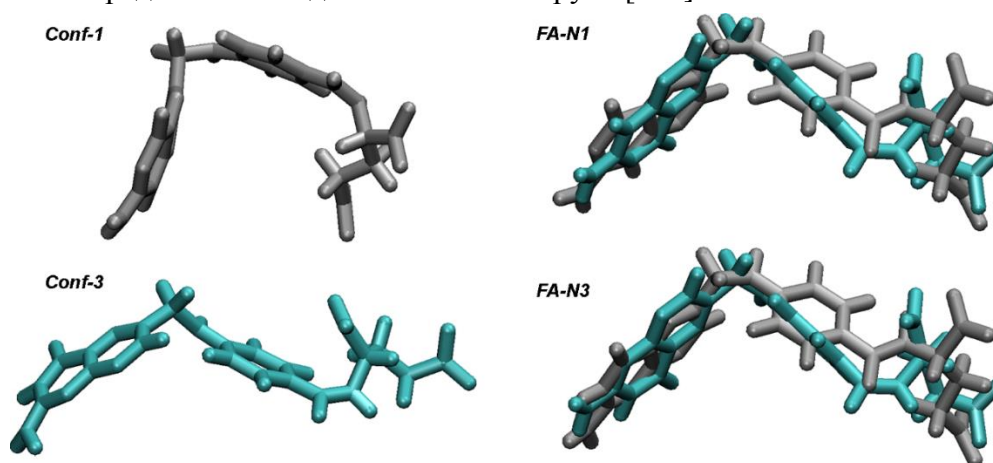
## 5. Насочващи лиганди

Изследвана е структурата на избраната серия от лиганди на FR- $\alpha$  (т. 4.1.1) във физиологичен разтвор. Първо, с комбинация от *ab initio* и класически подходи е характеризирана енергетичната стабилност и динамиката на двата позиционни изомера на фолиева киселина. След това е съпоставено поведението по време на МД симулациите на най-стабилния от тях с това на останалите молекули. Направеният анализ включва изследване на някои геометрични параметри (RMSD на атомните координати, разстояние глава-опашка, торзионни ъгли), в допълнение е оценено и вътрешно- и междумолекулното водородно свързване.



## 5.1. Позиционна изомерия на фолиева киселина

Структурите на FA-N1 (Conf-1) и FA-N3 (Conf-3), получени от конформационното търсене, са представени на Фигура 18, ляво. Докато Conf-1 има U-образна форма и се характеризира с *trans* амидна връзка, Conf-3 е квази-линеен и е с *cis* амидна връзка. Всички получени геометрии са по-изпънати в сравнение с Conf-1 и имат почти Z-образна форма. Структурите на позиционните изомери, генерирани от една и съща начална конформация (отбелязани в светлосиво и циан на Фигура 18, дясно), са много близки помежду си. Разликата между двете серии от изомери се състои в позицията на фениловия пръстен спрямо птерина и в ориентацията на глутаматната част, направлявана от конформацията на амидната връзка. Последното е свързано с относително високата бариера за ротация около връзката ( $24.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) получена в предишно изследване на нашата група [263].



**Фигура 18.** (ляво) Стабилни структури на Conf-1 (горе, в сиво) и Conf-3 (долу, в циан) получени от конформационното търсене; (дясно) насложени структури на (горе) FA-N1 и (долу) FA-N3 получени чрез геометрична оптимизация на конформерите; изомерът, получен от Conf-1, е оцветен в светлосиво, а този, получен от Conf-3, в циан

В Таблица 2 са представени относителните свободни енергии на оптимизираните фолати.  $\Delta G_{\text{set}}$  е изчислена спрямо най-стабилния позиционен изомер в дадения набор от геометрии, произхождащи от един и същ начален конформер (Conf-1 или Conf-3), а  $\Delta G_{\text{all}}$  – спрямо най-стабилния сред всички разглеждани структури. Данните показват, че FA-N3 има най-ниска енергия, което е в съгласие с предишни изследвания върху птерин [232]. Това е вярно и за двете серии от структури. Разликата в свободните енергии на двата позиционни изомера (от 10.2 до  $11.4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) подсказва, че FA-N1 може да се засели при определени условия, но това ще се осъществи трудно само вследствие на термичните флуктуации при телесна температура. Влиянието на различната начална конформация се изразява в малка ( $1.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) енергетична стабилизация или дестабилизация на дадения изомер в рамките на серията.



**Таблица 2.** Относителна свободна енергия  $\Delta G_{\text{set}}$ , оценена спрямо най-стабилния позиционен изомер за дадената серия, или  $\Delta G_{\text{all}}$ , пресметната спрямо най-стабилния от всички изследвани изомери

Конформер	Позиционен изомер	$\Delta G_{\text{set}}$ [kJ.mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_{\text{all}}$ [kJ.mol <sup>-1</sup> ]
Conf-1	FA-N3	0	0
	FA-N1	10.2	10.2
Conf-3	FA-N3	0	52.3
	FA-N1	11.4	63.7

При сравнение на стойностите на  $\Delta G_{\text{all}}$  се вижда, че свободните енергии на изомери получени от Conf-3 са отместени с около 53 kJ.mol<sup>-1</sup> спрямо тези получени от Conf-1. Възможна причина за това е различната конформация на амидната връзка в стартовите структури, която е отразена и в енергетична разлика между *trans* и *cis* формите на FA симулирана във физиологичен разтвор при телесна температура [263].

От направения дотук анализ на свободната енергия на позиционните изомери може да заключим, че FA-N3 е най-подходящ за моделиране на поведението на фолиева киселина във физиологичен разтвор. Оттук нататък ще се разглежда единствено тази форма на молекулата и ще бъде означена с „FA“. На базата на описаните данни, водородният атом е поставен на позиция N3 и при останалите лиганди.

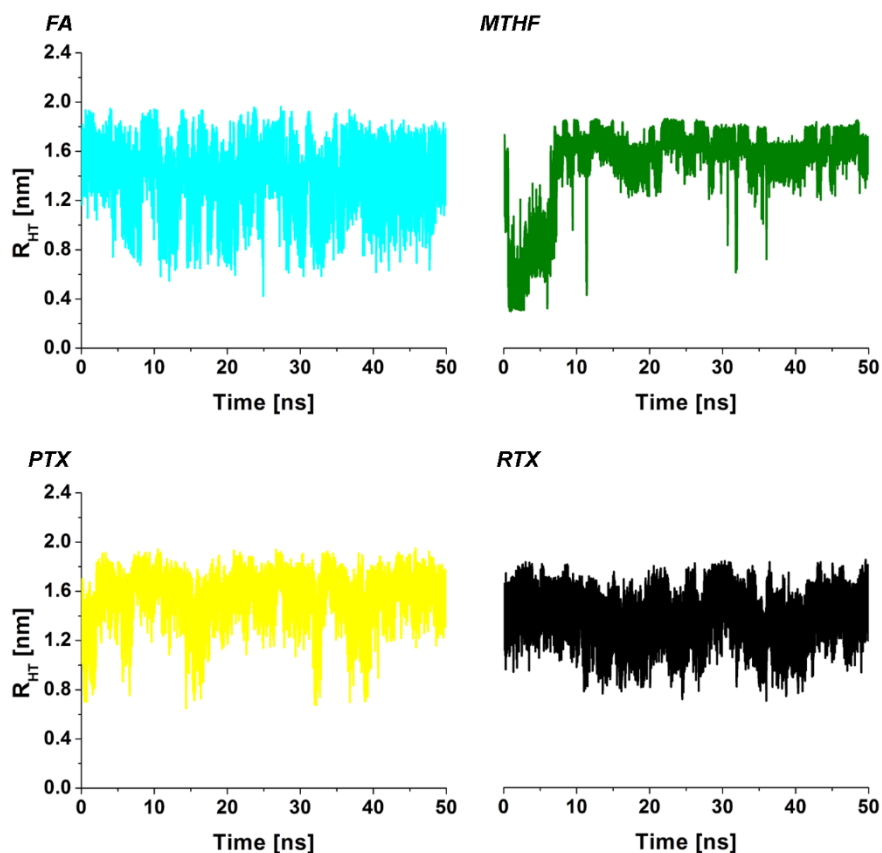
## 5.2. Структура на фолиева киселина и нейни аналози

Преди да се изследва способността на избраните лиганди (FA, МТНФ, РТХ, РТХ, Фигура 13 от т. 4.1.1) да насочват лекарствен товар към целевия рецептор, е разгледано тяхното поведение в несвързано състояние в условия близки до физиологичните.

### 5.2.1. Разстояние глава-опашка

Кадрите от последните 50 ns от симулациите, по време на които всички системи са напълно еквилибрирани, са подложени на по-подробен анализ. Първо е проследено изменението на разстоянието глава-опашка,  $R_{\text{HT}}$ , дефинирано чрез два атома в двата края на молекулите (азот от аминокислотната група в птерин и въглерод от  $\gamma$ -

карбоксилната група в глутаматната част, означени на Фигура 13 от т. 4.1.1). Данните са представени на Фигура 23.



**Фигура 23.** Еволюция на разстоянието глава-опашка на лигандите по време на последните 50 ns от МД симулациите

За три от лигандите (FA, PTX и RTX)  $R_{HT}$  варира между  $\sim 0.80$  и  $\sim 1.80$  nm, като по-дългите разстояния са предпочетени. Стойностите близки до горната граница на интервала (над около 1.40 nm) могат да се считат за характеристични за по-удължени конформации, докато тези под 1.40 nm – за по-компактни (сгънати) геометрии. Поведението на FA съответства на съществена подвижност на този лиганд с многократни преходи най-вероятно между две подструктури: с  $R_{HT}$  около 1.00 и 1.55 nm.  $R_{HT}$  на PTX и RTX флукутира съответно  $\sim 1.55$  nm и  $\sim 1.4$  nm, като са регистрирани и моментни отклонения от тези стойности. PTX заема и по-сгъната конформация ( $R_{HT} \sim 1.10$  nm), но доста по-рядко отколкото FA. Промените спрямо средната стойност при RTX настъпват по-плавно, както се вижда от еволюцията на  $R_{HT}$ , като са основно към по-малки дължини и отклоненията от средното са най-малки. Поведението на MTHF обаче се различава от това на другите лиганди. Това е единствената молекула, при която се срещат и стойности под 0.80 nm съответстващи на много компактна структура. В разглеждания отрязък от траекторията обаче тази геометрия е относително краткоживуща (до около 6 ns), като след това се заселват много по-изпънати конформации. Молекулата преминава между две от тях характеризиращи се с  $R_{HT} \sim 1.50$  nm и  $R_{HT} \sim 1.75$  nm. Този процес обаче е по-бавен

отколкото при FA, като се наблюдават редуващи се (макар и малки) участъци с предпочетеност на едната от двете структури. Вижда се, че за много кратки интервали от време се получава и доста компактна геометрия.

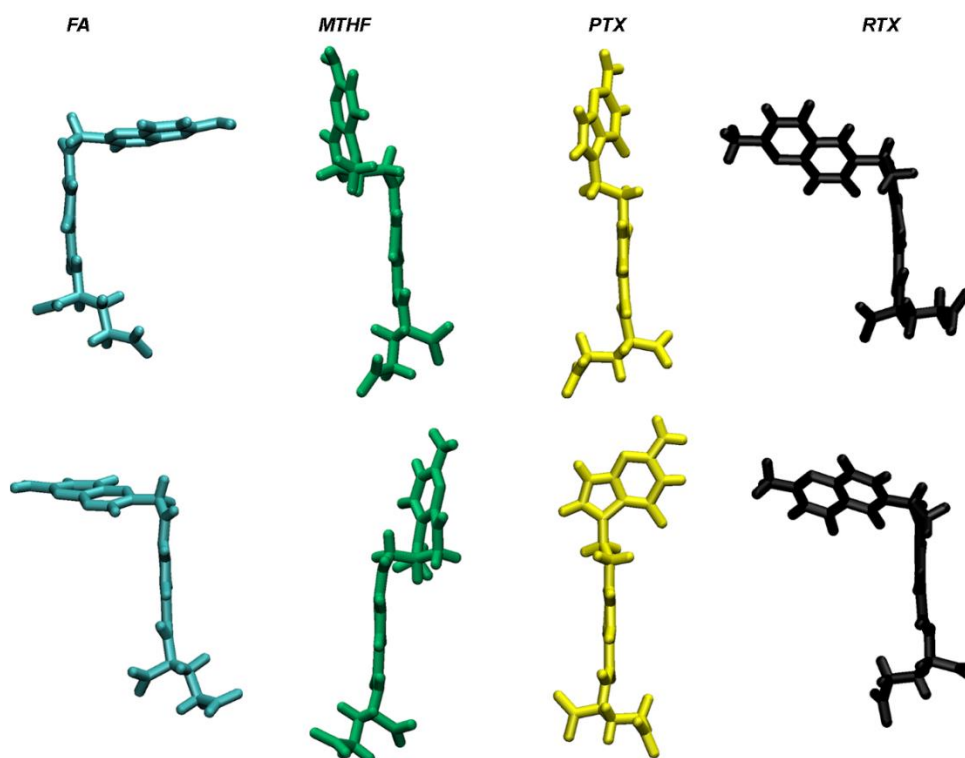
Като цяло поведението на  $R_{HT}$  показва, че при всички лиганди може да се стабилизира повече от една конформация. За да се определи как изглеждат тези представителни геометрии е проведен клъстерен анализ.

### 5.2.2. Клъстерен анализ

Геометриите, заселени по време на анализирания отрязък от траекториите на четирите лиганда, са групирани по структурно подобие. Независимо от общия брой значими клъстери при всеки лиганд са формирани по два клъстера с представителна (над 10 %) заселеност. Донякъде изключение прави FA, тъй като втората такава група представлява 9 % от общия брой анализирани структури, но въпреки това е включена в настоящите разглеждания. Геометриите на представителните клъстери са дадени на Фигура 25.

Получените представителни клъстери са разделени условно според формата им дефинирана чрез специфичната ориентация на птериновия фрагмент и глутаматната опашка спрямо равнината на ароматното ядро в средата на молекулата. Така структурите на FA и RTX могат да се определят като сгънати (U- или Z-образни), а тези на MTHF и PTX – като квази-линейни. Съответните особености са характерни и за двете представителни геометрии, т.е. двата клъстера на всеки лиганд се различават един от друг единствено по локална конформация непосредствено до ароматните цикли.

Специфичната динамика, отразена в изменението на  $R_{HT}$ , се открива и в резултатите от клъстерния анализ. U-образните форми, реализирани при FA и RTX, съответстват на по-малкото разстояние глава-опашка, а Z-образните – на по-голямото. Поради мобилността на FA и бързото преминаване между подструктурите с различно  $R_{HT}$  представителните клъстери са по-ниско заселени. Плавната промяна в RTX свидетелства за по-голяма стабилност на дадените геометрии, която е видна от големия брой структури в клъстерите. По-бавният в сравнение с FA обмен между двете подструктури на MTHF с относително близки  $R_{HT}$  обяснява заселеността на представителните клъстери на тази молекула, аналогично на ситуацията с RTX. Колкото до PTX, относително краткото заселване на структура с по-близко разположени глава и опашка, е видно от процентното съдържание на получените клъстери.



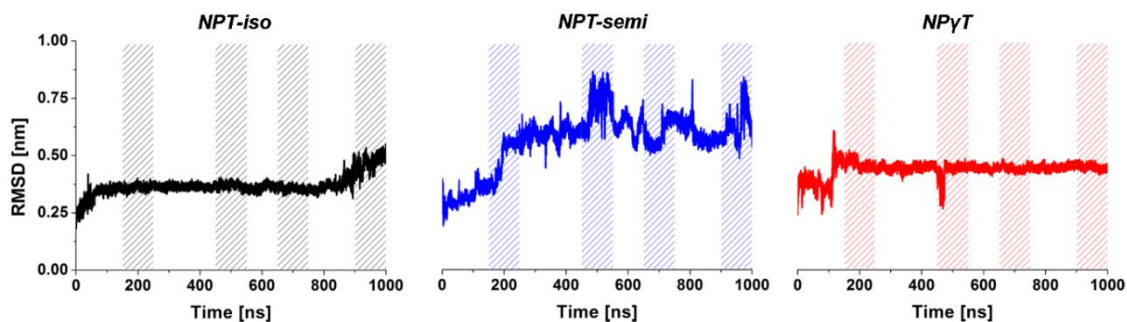
**Фигура 25.** (горе) Най-високо заселени и (долу) втори по заселеност представителни структури на лигандите получени от клъстерен анализ; структурите са ориентирани с еднакво странично разположение на ароматното ядро в средата на веригата; FA е циан, MTHF е тъмно зелен, PTX е жълт, RTX е черен

Като обобщение може да се каже, че изследваните лиганди имат подвижна молекулна структура, като динамиката им е отличителна за всеки от тях. Наблюдава се спонтанно превръщане на различни конформации, като този процес е най-бърз при FA. MTHF проявява екстремно поведение в това отношение. Наситената част от бицикъла позволява по-засилена гъвкавост на молекулата, която се проявява за кратко, но не се открива при останалите лиганди. При PTX промените са чести и краткотрайни, като различните геометрии са относително близки. Динамиката на RTX пък е доста по-плавна. За FA и RTX са предпочетени по-компактни форми, а за MTHF и PTX – по издължени. Моментните геометрии се стабилизират основно от водородни връзки с водните молекули и частично от вътрешномолекулни такива. Предпочетените форми на FA и RTX са U- или Z-образни, а на PTX и MTHF – квази-линейни.

## 6. Мембрана с вграден $\alpha$ -фолатен рецептор

При симулациите на моделната система мембрана/рецептор е проверено влиянието на три метода за скалиране на налягането в изобарно-изотермичен ансамбъл – изотропно, полу-изотропно и полу-изотропно с постоянно повърхностно напрежение (описани в т. 3.1.4 и означени като NPT-iso, NPT-semi и NPT $\gamma$ T). Въпреки

че в литературата NPT-semi е препоръчван за симулации на липидни бислоеве, изследваните до този момент системи имат значително по-опростен състав в сравнение с предложения от нас мултимолекулен модел (т. 4.1.2). За очакване е и характеристиките на вградения в мембраната  $\alpha$ -фолатен рецептор да бъдат повлияни от различните изчислителни параметри. От една страна, анализът на тези резултати ще послужи за валидиране на моделната мембрана. От друга, той ще предостави информация, на базата на която да бъде избран оптималният изчислителен протокол за симулациите на следващия тип моделни системи, чрез които ще се изследва процесът на разпознаване на лекарство-преносната система от целевия рецептор.



**Фигура 27.** Еволюция на RMSD на атомните координати на  $\alpha$ -фолатния рецептор спрямо началната минимизирана структура в симулациите в NPT-iso, NPT-semi и NP $\gamma$ T (отляво надясно); разглежданите по-нататък времеви периоди са защриховани

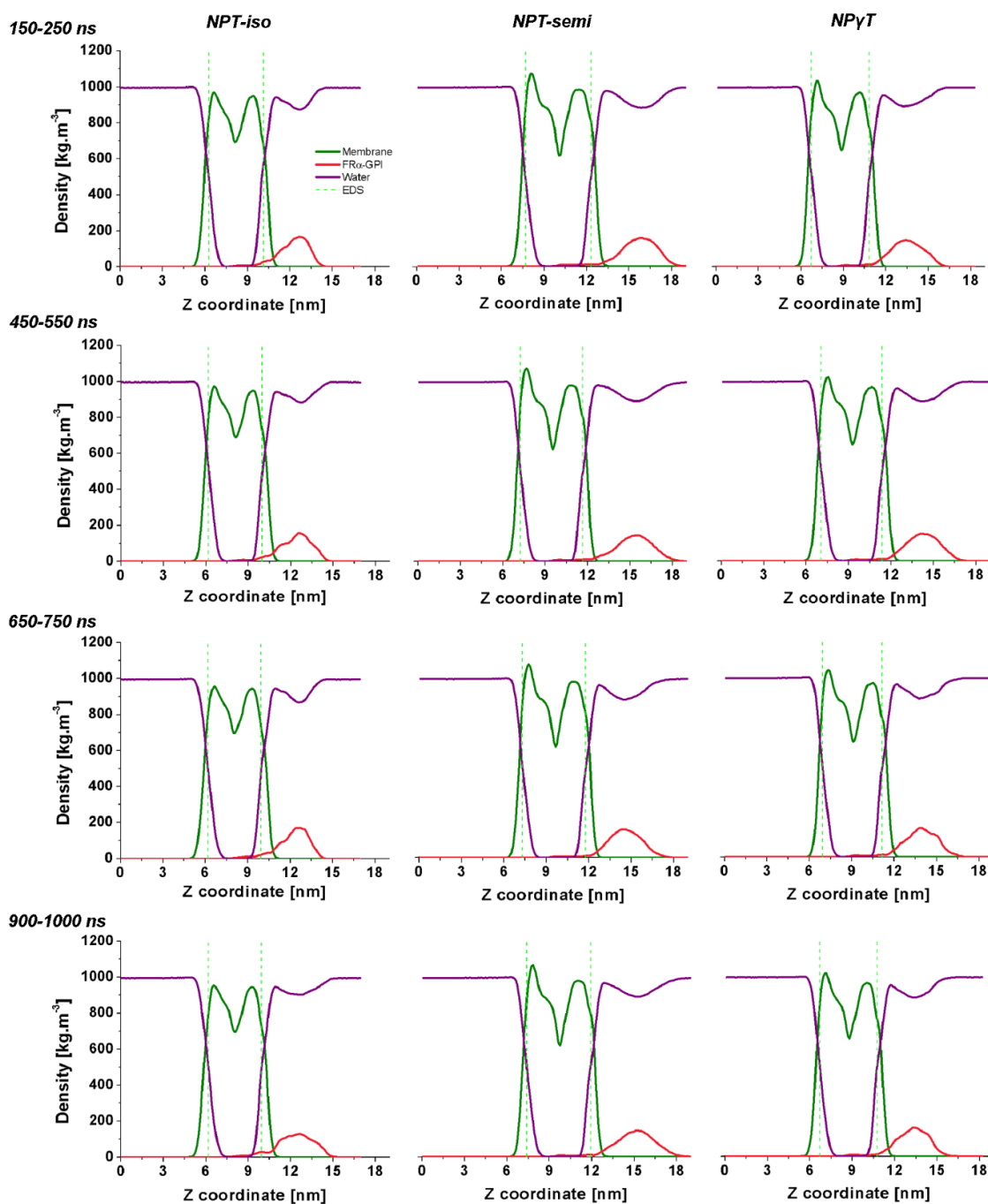
Тъй като структурата на FR- $\alpha$  е от особено значение за настоящата работа, изборът на времеви периоди за анализ от всяка траектория е продиктуван от неговото поведение във всяка от тях. RMSD на атомните координати на рецептора спрямо началната енергетично минимизирана структура са представени на Фигура 27. Очевидно в трите симулации структурата на протеина се изменя по различен начин. В NPT-semi промяната от началната геометрия е най-голяма, като след 200 ns се установява квазистационарен ход на кривата. Има обаче множество отклонения достигащи дори над  $\sim 0.25$  nm. Такива се реализират и в последните 100 ns от траекторията, което свидетелства за особено динамичната структура на рецептора, получаваща се вследствие на начина на скалиране на налягането в системата. Подобно поведение не е регистрирано в другите два случая. Дори напротив, в NPT-iso и NP $\gamma$ T RMSD достига до постоянен ход след 62 ns и 200 ns, съответно. В първия случай изключение от стационарното поведение правят последните 160 ns от симулацията, по време на които настъпва значителна промяна в геометрията на протеина. Във втория се наблюдава преход към различна подструктура в отрязъка между 450 и 475 ns. Затова за анализ са подбрани четири времеви периода от по 100 ns (150-250 ns, 450-550 ns, 650-750 ns и 900-1000 ns), които да обхващат както (квази)равновесни етапи от еволюцията на FR- $\alpha$ , така и измененията в неговата геометрия.

Първо са дискутирани някои ключови свойства на липидния бислой. Структурата му е характеризирана чрез профилите на масова плътност нормално на повърхността на мембраната, площта на липид получена чрез Вороной анализ и деутериевите параметри на порядък на липидните опашки. След това е разгледано по-детайлно поведението на FR- $\alpha$ . Промяната в неговата компактност и форма е оценена чрез разпределенията по стойности на инерчния радиус и еволюцията на отношенията на инерчните моменти. Средно-квдратичните флуктуации (root-mean square fluctuations, RMSFs) на позициите на АК остатъци от протеина показват кои части от него са по-подвижни. Измененията във вторичната му структура са проследени чрез карти на Ramachandran и DSSP анализ. Проследена е еволюцията на обема на лиганд-свързващия джоб на рецептора. В допълнение е разгледана и ориентацията на протеина по отношение на мембраната. Всички промени са коментирани спрямо началната енергетично минимизирана структура на системата, т.е. кристалографската геометрия на FR- $\alpha$  [30]. По време на дискусиата е сравнявано и поведението на трите схеми за скалиране на налягането.

## 6.1. Профили на масовата плътност

Разгледани са профилите на масовата плътност на различните компоненти от системата в направление нормално на мембранната повърхност. Данните за четирите времеви периода от трите траектории са представени на Фигура 28. Най-общо, за двата монослоя се наблюдават ясно оформени пикове, докато кривите за водната среда плавно достигат характерни за обемна вода стойности далеч преди краищата на симулационната кутия. Според максималната плътност, сравнена с тази на обемна вода, структурирането на липидите в мембраните съответства на течна фаза. Разликите, които се откриват между симулациите с трите схеми за скалиране на налягането, се състоят основно в нееднаквата форма на профилите на плътността на бислоевите. Финалните кадри от траекториите са представени на Фигура 29.

Плътността на мембраната в NPT-iso е малко по-ниска от тази на водните молекули. Освен това плътностите на двата монослоя са много близки. Разликата между тях в първия времеви период (ВП) от траекторията е  $20 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , а в края спада до под  $10 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , основно поради понижаване на плътността на вътрешния монослой. Като цяло масовата плътност на липидния бислой в NPT-iso предполага липса на порядък и дори 'стапяне' на алкиловите вериги. Кривата за FR- $\alpha$ -GPI в първите три ВП е доста подобна – наблюдават се два (почти слети) максимума на около 1 nm един от друг. В последния отрязък от траекторията те се сливат и оформят доста по-уширен профил, разположен по-близо до мембранната повърхност. Мобилността на рецептора очевидно е засилена, както се вижда и от еволюцията на RMSD на координатите му (Фигура 27), като той се е приближил към бислоя в дискутирания времеви период.

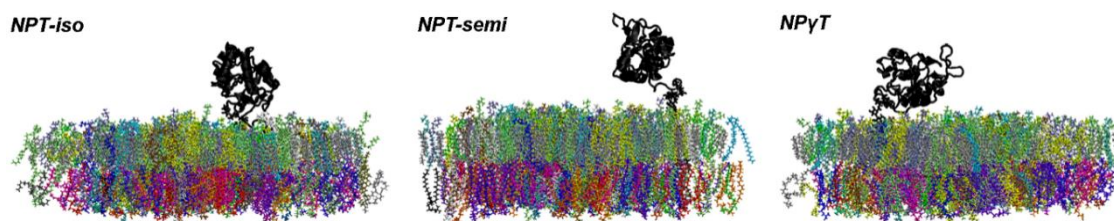


**Фигура 28.** Профили на масовата плътност в направление нормално на мембранната повърхност в четирите времеви периода (отгоре надолу) от симулациите в NPT-iso, NPT-semi и NPT-T (отляво надясно); еквимолекулярните разделителни повърхности са отбелязани със зелени пунктирани линии

За разлика от NPT-iso, в NPT-semi симулацията двата монослоя са ясно разграничими. Това вероятно се дължи на по-доброто му структуриране (с между 71 и 81  $\text{kg.m}^{-3}$  по-плътен от обемна вода) вследствие на наличието на липиди с отрицателно заредени глави. Забелязва се също и специфично подреждане на липидните опашки, изразено в рамото на левия пик, което е много по-слабо забележимо в графиките за NPT-iso. Външният монослой обаче все още се

характеризира с плътност по-ниска от тази на водата. Все пак полу-изотропното скалиране води до по-плътна опаковка на липидите в мембраната в сравнение с изотропното. Пиковите надвишават тези в NPT-iso с повече от  $100 \text{ kg.m}^{-3}$  за вътрешния и повече от  $30 \text{ kg.m}^{-3}$  за външния монослой. Тази подчертана компресия на липидите в NPT-semi е в съгласие с предишни наблюдения за ефекта на скалиране на налягането върху бислоя съставен изцяло от DPPC и върху смесен такъв наподобяващ състава на еритроцитна мембрана на здрава клетка [189]. Профилите на плътността на закотвения рецептор са по-симетрични и широки, което говори за хомогенни флуктуации спрямо нормалата на бислоя и увеличена подвижност на GPI. Частта от кривата, която попада под еквимолекулярната разделителна повърхност (equimolecular dividing surface, EDS), е по-ниско интензивна, отколкото тази в NPT-iso, следователно движенията на FR- $\alpha$ -GPI се осъществяват над нея.

Поведението на системата по време на симулацията в NP $\gamma$ T е междинно на това в другите две. Формата на кривите е идентична на реализираната в NPT-semi, като отново се наблюдава специфичното структуриране на вътрешния монослой. То обаче е малко по-слабо изразено. Подобно на другите две симулации, стойностите са най-ниски в последния ВП. Най-общо, представената картина отговаря на течно състояние на мембраната с измеримо ниво на порядък. В първата половина на траекторията кривата на рецептора с котвата оформя широк и гладък пик. След 650 ps обаче явно настъпва изменение в протеина, което променя профила на масовата плътност, който вече свидетелства за оформянето на в известна степен предпочетени позиции на FR- $\alpha$  спрямо бислоя. Навлизането на FR- $\alpha$ -GPI сред липидните глави е доста по-малко, отколкото при NPT-iso, но по-съществено от това при NPT-semi.



**Фигура 29.** Финални кадри на симулациите в NPT-iso, NPT-semi и NP $\gamma$ T; молекулите от бислоя са оцветени според типа липид, FR- $\alpha$ -GPI е черен, водата и противойоните са премахнати за яснота

## 6.2. Средна площ за липид

Средната площ за липид, определена чрез Вороной анализ, в четирите времеви периода от трите траектории е представена графично на Фигура 30. Получените стойности съвпадат в рамките на стандартното отклонение. Флуктуациите и в двата монослоя са значителни, като това е валидно за трите симулации и е постоянно във времето. Така отново се потвърждава изразената течливост на разглежданите бислоеве.





Има обаче някои моментни изключения от хомогенното поведение в долния монослой. Те обаче не бележат определена качествена или времева тенденция. Следователно могат да се определят като малко по-дългоживущи флукуации, които нямат трайно отражение върху структурата на мембраната. Трябва да се отбележи по-голямата средна площ на цвистерйонните липиди във вътрешния монослой в сравнение с външния, което най-вероятно се дължи на стремежа за намаляване на електростатичното отблъскване между анионните липиди там.

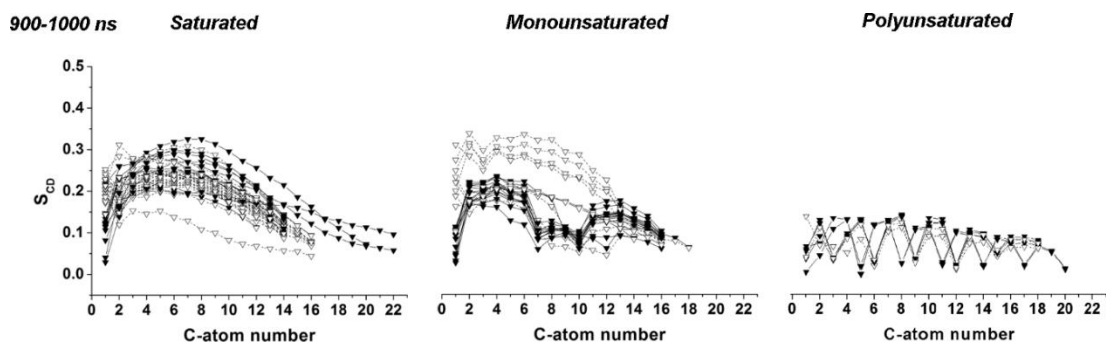
Необходимо е да се поясни, че експерименталните стойности, представени на Фигура 30, са получени за бислоеве съставени от един до три типа липиди, повечето от тях с еднакъв липиден състав в двата монослоя. Следователно сравнението с изчислените средни площи не трябва да се приема буквално, а да се разглежда като качествена оценка. Все пак, първоначално зададената площ на холестерол ( $0.40 \text{ nm}^2$  [270]) се запазва по време на трите симулации. При 150-250 ns в NPT-iso средната стойност е по-голяма –  $0.54 \text{ nm}^2$ , като стандартното отклонение също е значително ( $0.36 \text{ nm}^2$ ). След това в хода на траекторията стойността спада до  $0.43\text{-}0.44 \text{ nm}^2$ , а стандартното отклонение до  $0.15\text{-}0.18 \text{ nm}^2$ . Това е знак за по-бавното достигане на подходяща подредба на CHL сред останалите липиди в тази симулация. Експерименталната площ на DPPC в смесен бислой с CHL при 310 K е  $\sim 0.55 \text{ nm}^2$  [271]. Средните стойности в NPT-iso и NPγT, получени за липидите в горния монослой, съвпадат добре с нея. В NPT-semi обаче те не надвишават  $0.49 \text{ nm}^2$ . Площта на PSM в смесен с CHL бислой е  $0.47 \text{ nm}^2$  [272]. Тя е пресъздадена добре в трите траектории, единствено в първите два ВП в NPT-iso средната стойност е леко завишена. Доброто съвпадение с експеримента служи за валидация на моделната мембрана. Като цяло, правилното описание на поведението на холестерол и сфингомиелините е важно за моделирането на FR-α-GPI, тъй като рецепторът преимуществено се локализира в липидните салове, богати точно на тези типове липиди [183, 236].

### **6.3. Деутериеви параметри на порядък на липидните опашки**

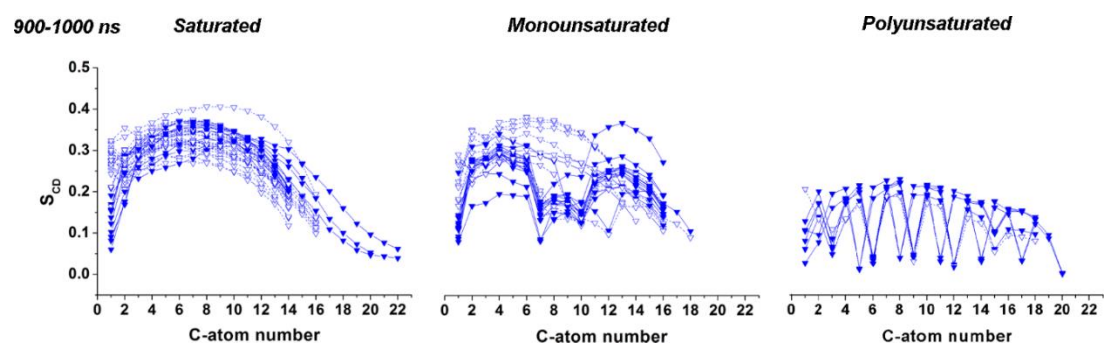
Деутериевите параметри на порядък на въглеродните атоми от липидните опашки,  $S_{CD}$ , са използвани като индикатор за степента на подредба на молекулите в бислоеве. Когато  $S_{CD}$  е равен на 0 системата е неподредена, на 1 – опашките са ориентирани паралелно на нормалата на мембраната, а на -0.5 – латерално на повърхността. Резултатите, получени в последния времеви период от трите симулации, са представени на Фигура 31 до Фигура 33. Данните са организирани според вида на опашките – наситени, мононенаситени и полиненаситени. Очакваната тенденция в стойностите на  $S_{CD}$  е спазена, а именно наситените вериги са по-подредени, а при ненаситените се наблюдава значителна липса на порядък. Като цяло профилите свидетелстват за течно подредено фазово състояние на мембраните, като степента на подредба зависи от симулационните параметри.

Вариацията в параметрите на порядък е специфична за всяка симулация. В NPT-iso (Фигура 31) стойностите са най-ниски, което означава, че липидните опашки са най-неподредени. Може да се очертае специфичното поведение на опашките с двойна връзка близо до липидната глава в BSM, PSM, LSM и единствената опашка на SPC. Те се характеризират с по-високи стойности на  $S_{CD}$  в сравнение с останалите, които поддържат по-ниско ниво на порядък. Освен това, спадът, който се наблюдава за атомите участващи в двойната връзка, е доста по-малък. Това е за очакване, тъй като е много по-трудно да се осъществи завъртане около съседна проста връзка, когато двойната е близо до главата и конформационната промяна предполага разместване на почти цялата опашка. Същото важи и за подобните опашки от двата плазмалогена, които обаче се характеризират с по-ниски  $S_{CD}$ . Тези особености се откриват и в другите две симулации. Силно подчертаната мобилност на полиненаситените опашки ( $S_{CD}$  не надвишава 0.16) остава непроменена по време на цялата траектория. Мембраната в NPT-semi очевидно е различна. Стойностите на всички параметри на порядък са по-високи отколкото при NPT-iso (Фигура 32). Това показва по-силно изразена подредба на хидрофобната част на бислоя и може да се свърже с наблюдавания максимум в профилите на плътността (Фигура 28). Отново може да се направи паралел между настоящото изследване и предишната разработка на нашата група, в която е съпоставяно влиянието на NPT-iso и NPT-semi върху DPPC или смесен бислой [189]. Текущите резултати са в съгласие с получените по-рано, където при полу-изотропното скалиране опашките на липидите са по-изправени и мембраната е по-подредена (макар и не толкова колкото в по-простите системи). Постоянното повърхностно напрежение, поддържано в симулацията с NPγT, прави липидните опашки малко по-неподредени в сравнение с NPT-semi, но порядъкът в системата не е толкова нисък, колкото при NPT-iso. Профилите (Фигура 33) са много по-хомогенни. Според близките до нула  $S_{CD}$  на най-дългите наситени опашки можем да заключим, че тук се наблюдава по-изразено втечняване на вътрешността на бислоя. Това пресъздава добре експериментално наблюдаваното поведение на клетъчни мембрани [265].

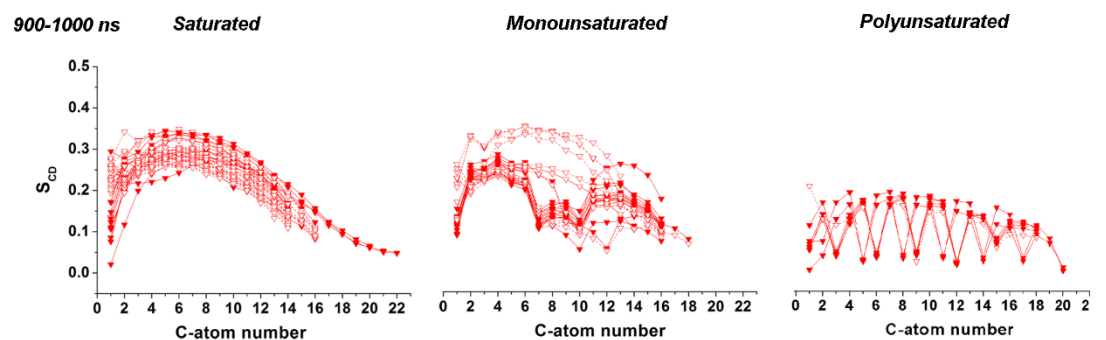
Най-общо, по време на траекториите  $S_{CD}$  варира между типичните за течно неподредено ( $L_d$ , за ненаситените опашки в NPT-iso и NPγT) и за течно подредено състояние ( $L_o$ , за всички останали). През последните 100 ps стойностите за съответните типове въглеродородни вериги се приближават до тези характерни за  $L_o$  и в трите симулации. Трябва да се отбележи обаче, че в ансамбъла с изотропно скалиране на налягането те все още са най-ниски, а в този с полу-изотропно – най-високи.



**Фигура 31.** Деутериеви параметри на порядък на въглеродните атоми от липидните опашки в последния времеви период от симулацията в NPT-iso; въглеродородните вериги от тип sn1 са представени с плътни триъгълници свързани с непрекъсната линия, а тези от тип sn2 и единичните опашки – с празни триъгълници свързани с пунктирана линия; номерацията на въглеродните атоми започва от главата на липидите



**Фигура 32.** Деутериеви параметри на порядък на въглеродните атоми от липидните опашки в последния времеви период от симулацията в NPT-semi; въглеродородните вериги от тип sn1 са представени с плътни триъгълници свързани с непрекъсната линия, а тези от тип sn2 и единичните опашки – с празни триъгълници свързани с пунктирана линия; номерацията на въглеродните атоми започва от главата на липидите



**Фигура 33.** Деутериеви параметри на порядък на въглеродните атоми от липидните опашки в последния времеви период от симулацията в NPT; въглеродородните вериги от тип sn1 са представени с плътни триъгълници свързани с непрекъсната линия, а тези от тип sn2 и единичните опашки – с празни триъгълници свързани с пунктирана линия; номерацията на въглеродните атоми започва от главата на липидите

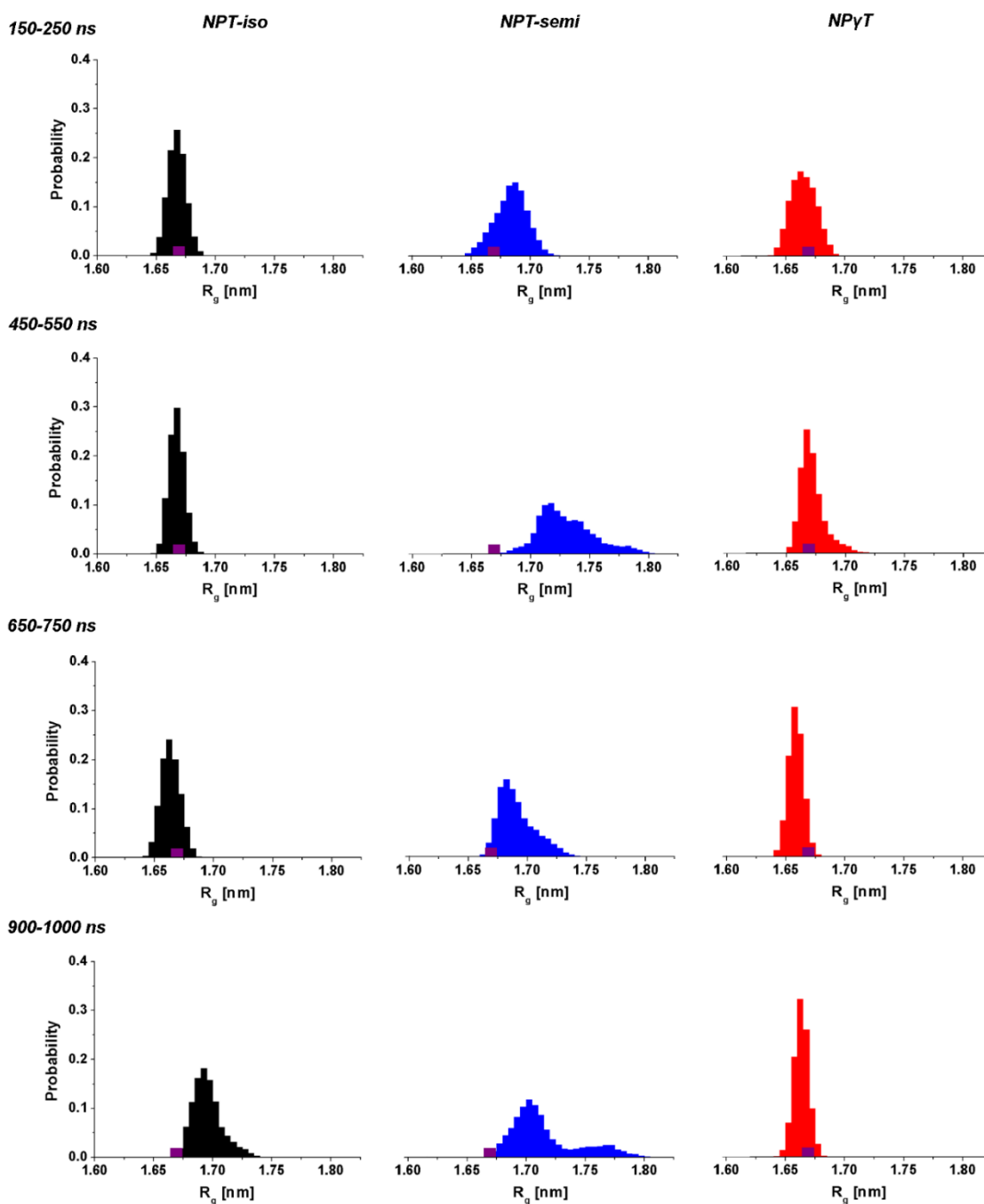
Изчислените в настоящото изследване параметри на порядък могат да се сравнят и с тези от МД симулации на други мултимолекулни мембрани. Най-близките в термини на липиден състав и приложена изчислителна процедура са моделите на плазмени мембрани на ракови клетки извлечени от тимусна жлеза [191] и черен дроб [192] на мишки. В тези изследвания  $S_{CD}$  са осреднени по всички опашки с еднакъв брой двойни връзки. Тези за наситените опашки в левкемичният GRSL бислой, съдържащ подобно количество холестерол на представения тук модел, са сравними с получените през всички ВП в NPT и в последните 100 ns от траекторията в NPT-semi –  $S_{CD}$  е до около 0.26. Стойностите за мононенаситените (в интервала 0.14 – 0.2) и полиненаситените ( $< 0.1$ ) обаче са по-ниски и по-близки до тези в NPT-iso. В модела на чернодробна ракова клетка съдържанието на CHL е 50 mol %. Това е причината всички вериги, освен полиненаситените, да са по-подредени, като  $S_{CD}$  са съизмерими с тези получени в NPT-semi.

Накратко, резултатите показват, че параметрите на порядък получени в NPT-iso и NPT са най-близки до желаните стойности за предложената моделна мембрана.

#### **6.4. Инерчен радиус на $\alpha$ -фолатния рецептор**

Още в еволюцията на RMSD на атомните координати на  $\alpha$ -фолатния рецептор (Фигура 27) са открити някои различия в поведението, което той проявява при симулациите с различните схеми за скалиране на налягането. За охарактеризиране на промените, които настъпват, е изследван инерчният му радиус,  $R_g$ , който е индикатор за промени в компактността и размера на протеина. Разпределението по стойности е представено на Фигура 34.

В симулацията в NPT-iso инерчният радиус е постоянен през първите три ВП. Освен това пиковете в разпределението му попадат много близо до стойността измерена за кристалографската структура на рецептора,  $R_g = 1.67$  nm. Следователно до 750 ns от траекторията вариациите в компактността на протеина са минимални. През последните 100 ns обаче се наблюдава промяна в размера му видна от значително изместеното разпределение, чийто максимум е с  $\sim 0.2$  nm над експеримента. Реализира се дори (макар и по-слабо) заселване на по-високи стойности на  $R_g$  отчетени в уширението в края на пика. Възможно е тези промени да са свързани с движението на FR- $\alpha$  към повърхността на бислоя забелязано в профилите на плътността (т. 6.1). Най-общо данните потвърждават предположението, че протеинът претърпява структурна промяна в края на симулацията и като резултат в последния времеви период значимо увеличава размера си.

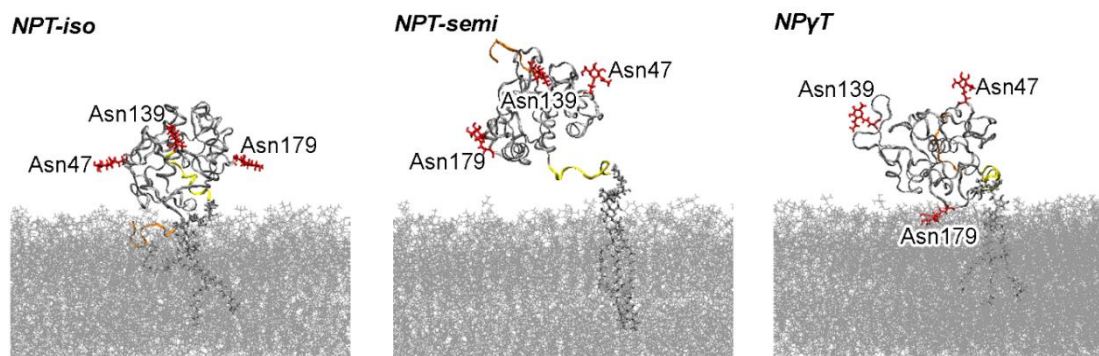


**Фигура 34.** Разпределение по стойности на инерчния радиус на  $\alpha$ -фолатния рецептор в четирите времеви периода (отгоре надолу) от симулациите в NPT-iso, NPT-semi и NPT (отляво надясно); стойността на инерчния радиус на експерименталната структура на протеина е представена с лилаво квадратче

При NPT-semi се наблюдава качествено различна картина. В първия ВП пикът на разпределението е изместен към по-големи  $R_g$ , но все още се намира близо до този на експерименталната геометрия. При 450-550 ns разпределението се характеризира с особен профил, напълно отместен от стойността измерена за кристалографската структура. Това поведение отлично кореспондира със скока в RMSD (Фигура 27) и свидетелства за възникването на сериозни структурни изменения. Изненадващо този

период е последван от преход към размер на протеина подобен на началния. Това обаче е нетрайно, тъй като разпределението в последните 100 ns отново е отместено към по-високи  $R_g$ . Освен това се характеризира с два ясно оформени пика с различен интензитет. Следователно в края на симулацията се реализира и втора по-слабо застъпена структура, значително различаваща се от експерименталната. Като цяло профилите отговарят на преход на протеина между две глобални конформации, които са доста по-големи по размер от кристалографската структура. Освен това, подобни драстични промени предполагат вероятно разгъване на протеина. То е потвърдено визуални наблюдения на траекторията (илюстрирано на Фигура 37, в средата) и е дискутирано по-подробно в следващата точка от анализа.

Подобно на NPT-iso, разпределенията на  $R_g$  по време на разгледаните ВП в NPT са центрирани около стойността измерена за кристалографската структура. Наблюдава се отстраняването им към малко по-малки стойности във втората половина от симулацията. Тази промяна е в съгласие с наблюдаваните изменения в профила на масовата плътност на FR- $\alpha$ -GPI (т. 6.1). Отклонението на RMSD в периода 450-550 ns (Фигура 27) е съпроводено с леко разширяване на протеина, последвано от малко намаляване на размера му в следващия ВП. След това той се запазва постоянен и близък до експерименталния до края на тази траектория. Изменението в пространствената структура обаче е доста по-малко от това в другите две системи. Пиковете на  $R_g$  в NPT са тесни и интензивни, което подсказва, че в различните ВП протеинът не променя драстично размера си.



**Фигура 37.** Финални кадри на симулациите в NPT-iso, NPT-semi и NPT илюстриращи промените в структурата на протеина; молекулите от бислюа са оцветени в сиво, FR- $\alpha$ -GPI е представен в по-дебели сиви линии, N-краят на протеина е оцветен в оранжево, а C-краят – в жълто, N-гликозилираните Asn остатъци са червени, водата и неорганичните йони са премахнати за яснота

## 6.5. Вторична структура на $\alpha$ -фолатния рецептор

За детайлизиране на направените до момента изводи за общата подвижност на  $\alpha$ -фолатния рецептор е изследвана неговата вторична структура (secondary structure, SS). Проведен е DSSP анализ [221], чрез който да се проследи еволюцията ѝ.

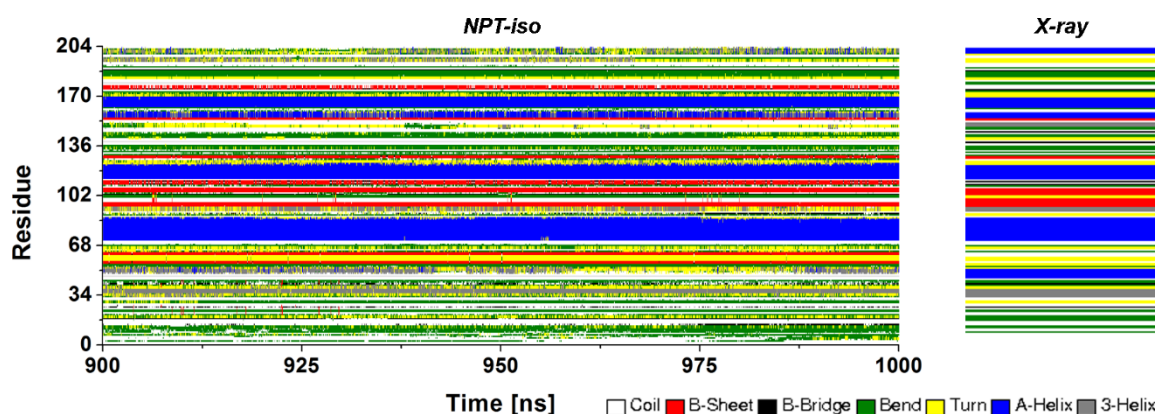
Промяната в последния времеви период от трите симулации е представена на Фигура 39 до Фигура 41. Отдясно на всяка от тях е дадена тази на кристалографската геометрия за сравнение.

Експерименталната структура на рецептора се характеризира с шест  $\alpha$ -спирали, четири  $\beta$ -нишки (организираны в две антипаралелни двойки, едната от които разделена от извивка, т.е. нишките са разположени през (два) АК остатъка една от друга) и множество примки. Започвайки от N-края на протеина, първата  $\alpha$ -спирала е напълно разгъната в симулацията с NPT-iso. Най-добре е запазена в NPT-semi, а в NP $\gamma$ T  $\alpha$ -спиралата е с редуциран размер. Следващите четири  $\alpha$ -спирали са стабилни и в трите траектории, но петата, разположена в C-края на протеина, изчезва напълно. Това вероятно е свързано с взаимодействие с GPI или с липидите от мембраната, тъй като именно C-краят е свързващата точка между рецептора и котвата. Що се отнася до четирите  $\beta$ -нишки, те са запазени по време на симулациите, единствено размерът на двете съседни е намален за сметка на свързващата ги извивка, която се е преструктурирала в по-голяма примка следвана от сгъвка. Формирани са допълнителни  $\beta$ -нишки – четири в NPT-iso и NP $\gamma$ T и шест в NPT-semi на сходни позиции в аминокиселинната последователност. Протеинът е нагънат така, че (заедно с първоначалните) те формират общо четири (NPT-iso и NP $\gamma$ T) или пет двойки (NPT-semi). Две съседни в последователността къси  $\beta$ -нишки, разделени от извивка, са стабилно оформени от аналогични АК остатъци в протеина в траекториите в NPT-iso и NPT-semi. Те не присъстват в структурата на FR- $\alpha$  в NP $\gamma$ T. В нея се забелязва единствено „опит“ за подобно нагъване от други АК, но формулировката е непостоянна. Тя се появява и в NPT-semi, където успява да се стабилизира по-добре.

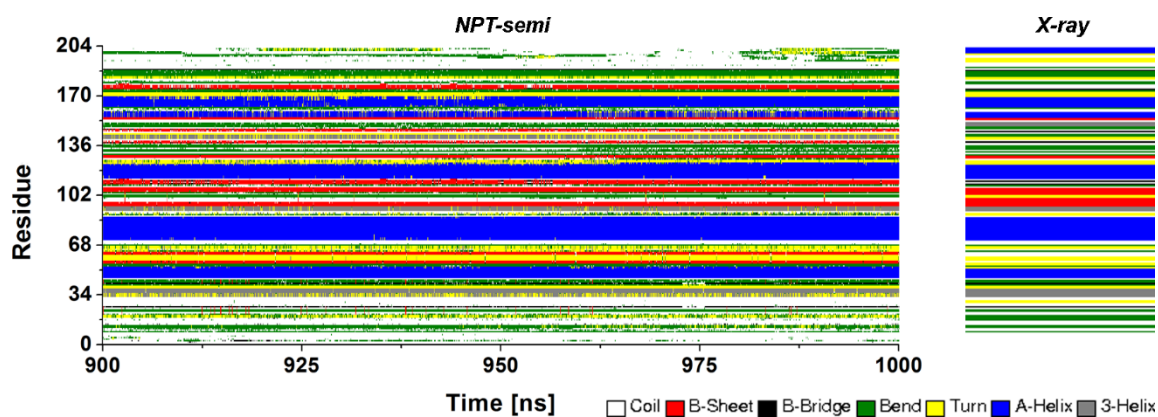
Вторичната структура на N-края се променя и в трите симулации, но в различна степен. Във финалните 100 ns в NPT-iso се наблюдава значително структуриране изразено в оформянето на допълнителни сгъвки от първите аминокиселини. Резултатът от тези промени е даден на Фигура 37, ляво, където се вижда, че N-краят (оцветен в оранжево) се намира сред липидните глави. Промени в N-края има и по време на симулацията с NPT-semi, но вторичната структура е по-близка до началната в последния ВП. В NP $\gamma$ T картината е сходна с експериментално наблюдаваната.

В началната геометрия на рецептора GPI-свързаният C-край на протеина е оформен като  $\alpha$ -спирала. В NPT-iso симулацията тя се заменя от преминаващи една в друга извивка и 3-спирала. По подобен начин е пертурбирана и SS на съседните АК. През финалните 100 ns в NPT-semi C-краят е разгънат до последните около 15 ns, по време на които отново се наблюдава известно структуриране (оцветен в жълто на Фигура 37, в средата). В последния ВП от NP $\gamma$ T C-краят е по-стабилно структуриран.

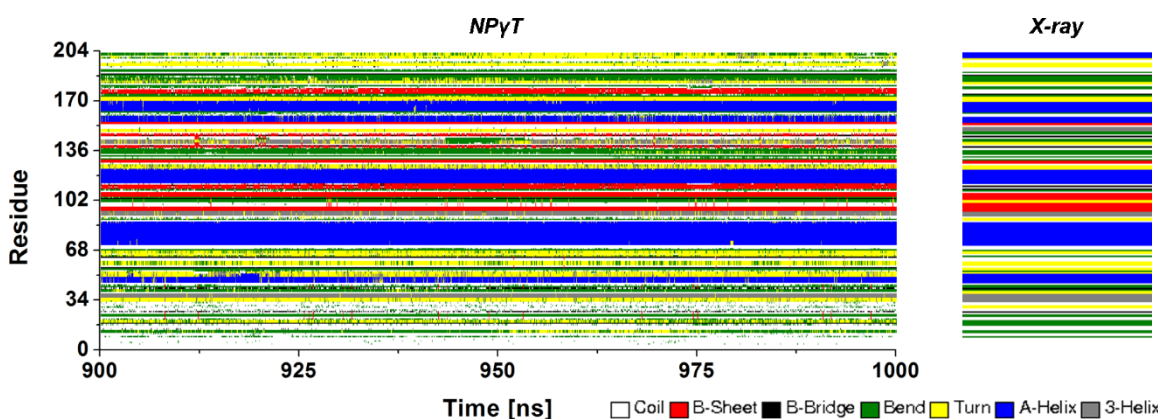




**Фигура 39.** Еволюция на вторичната структура на  $\alpha$ -фолатния рецептор в последния времеви период от NPT-iso симулацията; отдясно е дадена вторичната структура на кристалографската геометрия на рецептора; с червено е обозначена всяка  $\beta$ -нишка, която участва в  $\beta$ -лист



**Фигура 40.** Еволюция на вторичната структура на  $\alpha$ -фолатния рецептор в последния времеви период от NPT-semi симулацията; отдясно е дадена вторичната структура на кристалографската геометрия на рецептора; с червено е обозначена всяка  $\beta$ -нишка, която участва в  $\beta$ -лист



**Фигура 41.** Еволюция на вторичната структура на  $\alpha$ -фолатния рецептор в последния времеви период от NPT-gamma симулацията; отдясно е дадена вторичната структура на кристалографската геометрия на рецептора; с червено е обозначена всяка  $\beta$ -нишка, която участва в  $\beta$ -лист

Повече от очевидно е, че най-значителните промени в SS на  $\alpha$ -фолатния рецептор са реализирани в краищата му. Това е в съгласие с измененията в GPI-свързания човешки прион протеин изследван от Wu и сътр. [273]. Като цяло FR- $\alpha$  е най-динамичен в NPT-semi, където и влиянието на GPI или мембраната е най-силно изразено. АК остатъци от сърцевината на FR- $\alpha$ , включително тези оформящи лиганд-свързващия джоб, обаче изглеждат почти неповлияни от останалите промени дори и в тази симулация. Кристалографската геометрия се запазва по-добре в NP $\gamma$ T.

### 6.6. Обем на лиганд-свързващия джоб

От направените дотук анализи става ясно, че  $\alpha$ -фолатният рецептор претърпява промени свързани с позицията му над мембранната повърхност, с неговата компактност, форма и вторична структура. Индикациите са, че тези изменения се дължат предимно на движение на краищата на протеина или на цялата молекула. Интересно е да се провери дали те засягат лиганд-свързващия джоб. За тази цел е проследен обемът на кухината по време на трите симулации. Средните стойности са дадени в Таблица 8, а джобът е показан на Фигура 42.

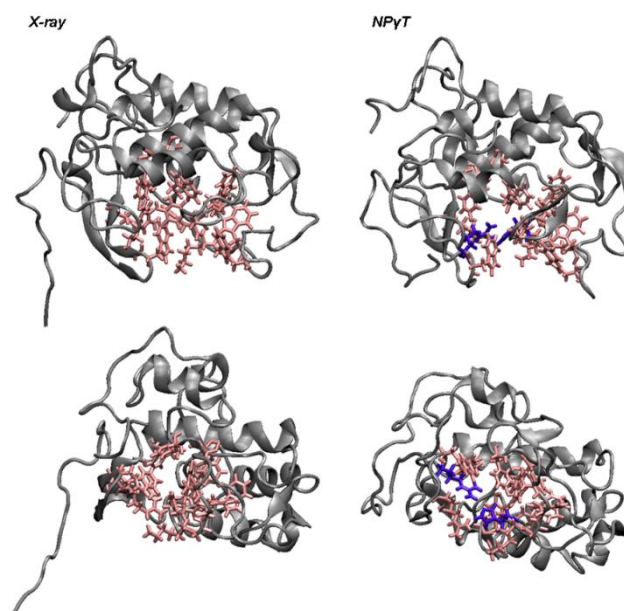
**Таблица 8.** Средни стойности (със стандартно отклонение) на обема на лиганд-свързващия джоб на  $\alpha$ -фолатния рецептор в четирите времеви периода от симулациите в NPT-iso, NPT-semi и NP $\gamma$ T

Времеви период [ns]	Обем [nm <sup>3</sup> ]		
	NPT-iso	NPT-semi	NP $\gamma$ T
150-250	0.380 ± 0.083	0.363 ± 0.099	0.353 ± 0.076
450-550	0.359 ± 0.057	0.393 ± 0.091	0.275 ± 0.070
650-750	0.342 ± 0.079	0.408 ± 0.097	0.278 ± 0.058
900-1000	0.308 ± 0.060	0.370 ± 0.098	0.296 ± 0.052

Кристалографска структура: 0.326 nm<sup>3</sup>

Обемът на кухината в кристалографската структура (Фигура 42, ляво) е 0.326 nm<sup>3</sup>. Според средните стойности обемът в разглежданите времеви периоди от симулациите съвпада с експерименталния в рамките на стандартното отклонение. В NPT-iso се наблюдава систематично намаляване на най-вероятния обем с времето. В ансамбъла с полу-изотропно скалиране на налягането по-високите средни стойности (със значително стандартно отклонение) говорят за възможно разширяване на кухината. В NP $\gamma$ T средният обем е най-малък, с изключение на последния ВП. Подобно свиване на джоба може би е свързано с липсата на лиганд в него. Въпреки

това в изследването си Wibowo и сътр. [274] сравняват *apo* и *holo* формите на  $\beta$ -фолатния рецептор и откриват противоположна зависимост. Джобът е по-отворен в *apo* структурата ( $0.371 \text{ nm}^3$ ) отколкото в *holo* ( $0.305 \text{ nm}^3$ ). За илюстриране на ситуацията тук са съпоставени кухините на FR- $\alpha$  в кристалографската и финалната за траекторията в NP $\gamma$ T геометрия (Фигура 42). Обемът в симулираната структура наистина е по-голям ( $0.377 \text{ nm}^3$ ). Оказва се обаче, че по време на динамиката някои АК остатъци от входа и средната част на кухината (Tyr60, Trp102, Arg103, His135, Trp140) често заемат позиции, които я блокират и по този начин намаляват обема ѝ. Те обаче са краткотрайни и в голяма част от траекторията отворът на джоба е свободен. С оглед на биологичната функция на рецептора, а именно свързването на фолиева киселина или нейни производни, може да се предположи съществуването на начален (вероятно къс) период, по време на който джобът ще се прегрупира в изгодна за навлизане на лиганда конфигурация. Друга възможност е, предвид непренебрежимите флуктуации в обема, лигандът да се свърже в момент, в който кухината е достатъчно отворена.

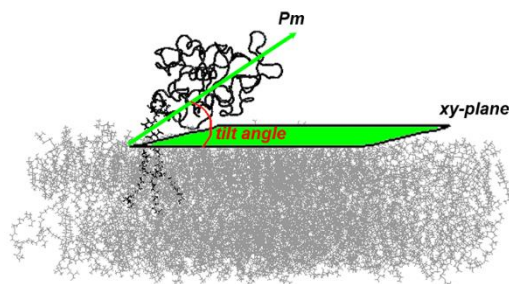


**Фигура 42.** Изглед (горе) отстрани и (долу) отпред на лиганд-свързващия джоб на  $\alpha$ -фолатния рецептор от (ляво) експерименталната структура и (дясно) последния кадър на симулацията в NP $\gamma$ T; протеинът е представен с плътни сиви линии, АК остатъците, формиращи джоба, са в розово, двата остатъка (Arg103 и His135), които намаляват обема му в този кадър, са във виолетово

## 6.7. Ориентация на рецептора спрямо мембраната

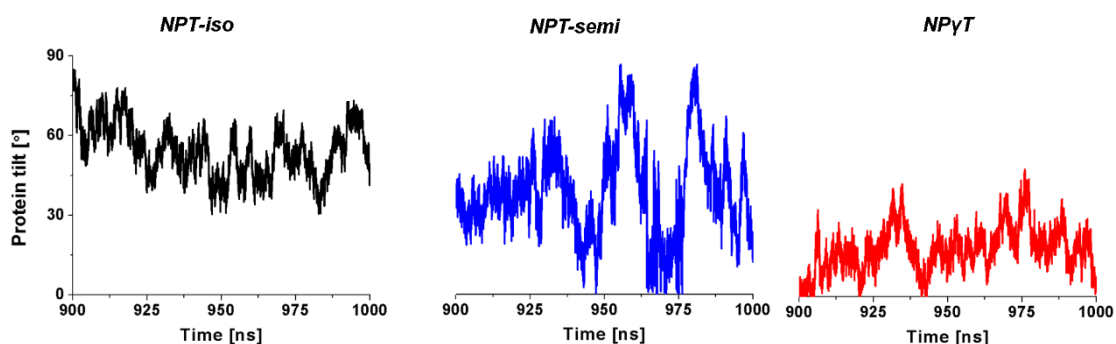
До този момент свойствата на  $\alpha$ -фолатния рецептор и мембраната са анализирани поотделно. Данните обаче показват, че взаимодействията между тях вероятно влияят върху структурата на протеина (т. 6.5). Изчислен е наклонът на FR- $\alpha$  спрямо равнината на мембранната повърхност, като са проследени измененията на

Ъгъла сключен между главната инерчна ос на протеина ( $P_m$  на Фигура 44) и равнината  $xy$ . Еволюцията му по време на последния времеви период от трите траектории е представена на Фигура 45.



**Фигура 44.** Схематично представяне на ъгъла между главната ос на  $\alpha$ -фолатния рецептор,  $P_m$ , и равнината  $xy$

Стойностите, заемани от ъгъла на наклон, обхващат целия достъпен интервал от  $0$  до  $90^\circ$ . Това означава, че FR- $\alpha$  се „люлее“ над мембраната, като може да е разположен както тангенциално на повърхността ѝ, така и нормално на нея. Амплитудата и периодът на изменение на ъгъла силно зависят от скалирането на налягането в симулацията. По време на тази в NPT-iso вариациите са най-малки и реализираните ориентации на протеина са стабилни за по-дълго време отколкото в останалите траектории. През последните 100 ns се реализира наклон от  $\sim 60^\circ$ , който вероятно е свързан със структурните преобразувания в края на траекторията дискутирани по-горе. От еволюцията на ъгъла в NPT-semi се вижда, че ориентацията на рецептора спрямо бислоя е особено непостоянна. Стойностите на ъгъла се изменят бързо от горната до долната граница на интервала и обратно – редуват се нормално и тангенциално разположение.



**Фигура 45.** Еволюция на ъгъла на наклон на  $\alpha$ -фолатния рецептор (дефиниран на Фигура 44, ляво) в последния времеви период от симулациите в NPT-iso, NPT-semi и NPT (отляво надясно)

Във финалния ВП в NPT рецепторът е ориентиран почти тангенциално на равнината на бислоя (среден наклон  $\sim 20^\circ$ ). Като цяло обаче промените в структурата на протеина и в двата случая (след 840 ns в NPT-iso и между 450 и 475 ns в NPT, Фигура 27) се характеризират с по-изправена ориентация, следователно не са

провокирани от взаимодействия с липидния бислой. Напротив, в NP $\gamma$ T такива се осъществяват по-интензивно след структурната пертурбация.

Представените в тази глава от дисертацията симулации показват, че мембраната се намира в течно състояние независимо от метода за скалиране на налягането. Специфичната подредба на липидите обаче е повлияна от него. В NPT-iso плътността е най-ниска, като двата монослоя се характеризират с близки стойности. Размерът на мембраната в нормално направление попада (леко) извън долната граница на експерименталните измервания. Най-плътна опаковка на молекулите и най-голяма дебелина на бислоя се реализира в NPT-semi, където вътрешният монослой е специфично структуриран. Подобно поведение се наблюдава и в NP $\gamma$ T, но масовата плътност и дебелината на бислоя са малко по-ниски. Средните площи на липидите съвпадат в рамките на стандартното отклонение и в трите траектории, а съпоставката с експерименталните стойности показва добро съвпадение и валидира предложения модел. Деутериевите параметри на порядък на липидните опашки определят фазовото състояние на мембраната като течно подредено. В съгласие с профилите на масовата плътност най-високо ниво на порядък в хидрофобната част на мембраната се реализира в NPT-semi, най-ниско – в NPT-iso и междинно – в NP $\gamma$ T. В допълнение, вътрешността на бислоя е доста по-течна от периферията му в NP $\gamma$ T.

Основната разлика между трите траектории се състои в поведението на  $\alpha$ -фолатния рецептор. То е най-динамично в NPT-semi, където се наблюдават сериозни промени в размера и формата на протеина, докато те са запазени по-близки до началната кристалографска структура в другите две симулации. RMSF на аминокиселините показват, че основно се засягат краищата на рецептора, а сърцевината му е по-малко мобилна. Това е особено изразено в ансамбъла с полуизотропно скалиране на налягането. Отчетена е и очаквана подвижност на трите N-гликозилирани остатъка, моментно ограничена от други повърхностни АК основно в NPT-iso и NP $\gamma$ T. Има и изменение във вторичната структура – броят на  $\alpha$ -спиралите намалява, а този на  $\beta$ -листове нараства. Като цяло SS на кристалографската начална геометрия се запазва по-добре в NP $\gamma$ T. Наблюдава се допълнително структуриране на N-края на протеина в края на симулацията с NPT-iso и в първите три времеви периода от тази в NPT-semi. При изотропното скалиране N-краят взаимодейства с липидите, а в другите две симулации е разположен отстрани на протеина. GPI-свързаният C-край се разплита почти напълно в NPT-semi, а се преструктурира по време на другите две траектории. Това може да се обясни със стремежа към нулево повърхностно напрежение в NPT-semi, който не е естествен за мембраната и води до възникване на цялостна нестабилност в системата. Тя се разпределя по 'най-меките' степени на свобода, т.е. тези на протеина. Това е и вероятна причина за динамичните промени в ориентацията му спрямо мембраната в

тази траектория в сравнение с регулярното му поведение в NPT-iso и втората половина на симулацията в NP $\gamma$ T. Описаните дотук изменения обаче не влияят особено на обема на лиганд-свързващия джоб на протеина. Главно в NPT-iso, движенията на рецептора за кратко ориентират отвора на кухината му към мембраната, което е възможно да ограничи достъпа до нея. В допълнение, позицията на GPI котвата спрямо EDS не винаги е корелирана с наклона на рецептора.

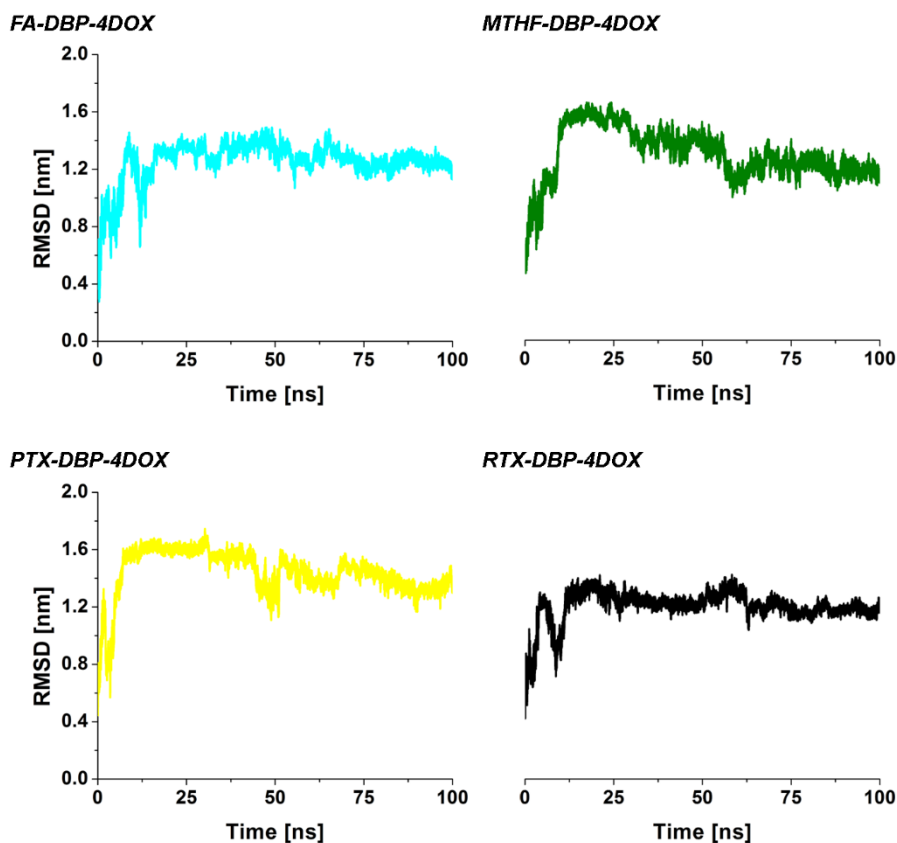
От казаното дотук изглежда, че в ансамбъла с полу-изотропно скалиране на налягането и постоянно ненулево повърхностно напрежение свойствата на системата са най-близки до експериментално наблюдаваните. Поради тази причина NP $\gamma$ T е избран за изследване на процеса на насочване на лекарство-преносните системи към  $\alpha$ -фолатния рецептор.

## **7. Лекарство-преносни системи**

Основна цел на МД симулациите на лекарство-преносните системи е да се еквилибрират структурите във физиологичен разтвор и да се даде предварителна оценка на поведението на молекулите след включването им в комплексите L-DBP-4DOX. Данните ще предоставят и информация за стабилността на формулировките в кръвния поток. Очертана е подвижността на различни елементи от конюгатите, както и структурната реорганизация, която настъпва в тях.

### **7.1. Структурна подвижност на лиганда и част от комплексите**

Разгледана е еволюцията на RMSD на атомните координати на ковалентно свързаните елементи (лиганд-удължител-мост-пептид) от комплексите (Фигура 50). Според хода на кривите в системите настъпват значителни промени спрямо началната им изпъната геометрия (Фигура 17, долу от т. 4.1.3). Те са инициирани още по време на етапа на нагриване (RMSD започва от ненулеви стойности в интервала между 0.44 и 0.60 nm) и продължават и през продуктивната част от траекториите. Степента на структурни изменения е различна за всяка система, като между първите 7 и 16 ns са регистрирани средно-квадратични отклонения от порядъка на 0.8 до 1.0 nm. В комплексите с FA и RTX се наблюдава сходен мотив в еволюцията на RMSD. След първоначалния период на релаксация конюгатите проявяват квазистационарно поведение специфично за всеки от тях. Еквилибрирането на MTHF-DBP-4DOX протича по-бавно отколкото това на комплекса с FA. Може да се приеме, че поведението на системата през последните 40 ns от траекторията е устойчиво. Системата RTX-DBP-4DOX най-бавно достига равновесно поведение. В първите 12 ns се забелязва много стръмно покачване на RMSD последвано от около 20 ns стационарно поведение. След това започва по-бавно, но постоянно стъпаловидно понижаване на RMSD почти до края на симулацията. Едва в последните 20 ns координатите на комплекса се изменят по-хомогенно.



**Фигура 50.** Еволюция на RMSD на атомните координати на ковалентно свързаните елементи от комплексите L-DBP-4DOX спрямо началната минимизирана структура

## 7.2. Междумолекулна ориентация в комплексите

Описаната в предишната точка структурна динамика на комплексите е свързана със сериозни реорганизационни процеси протичащи в тях. Регистрирано е дори напускане на лекарствени молекули на този с RTX, но и повторната им адсорбция след 12 до 21 ns. Промените в комплексите спрямо началния им облик на (Фигура 17, долу от т. 4.1.3) са очаквани и за появата им могат да се открият следните причини. Анализът на DBP-4DOX посочва  $\pi$ -стекинг взаимодействията с ароматните АК от пептида (три триптофана и един тирозин) като основна движеща сила както за формиране на агрегатите, така и за поддържане на тяхната цялост [239]. Очаква се внасянето на допълнителни спрегнати фрагменти от молекулите на лигандите да измени геометрията на комплексите L-DBP-4DOX поради възникване на конкурентни невалентни взаимодействия. Наблюдавани са стекове с участие на MTHF, PTX и RTX като доказателство за това. Гъвкавостта на пептидния удължител, чиято цел е да намали стеричното пречене при евентуално свързване с рецептора, лесно може да осигурява близостта между молекулите необходима за реализиране на такива контакти. Друг фактор е концентрацията на DOX, която е отбелязана като медиатор на начина на разпределяне на лекарствените молекули по повърхността на DBP [239]. При повишаването ѝ при телесна температура се активират повече

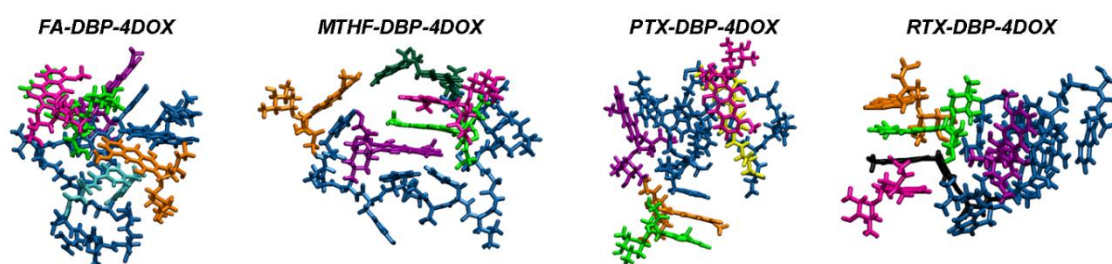


адсорбционни позиции, включващи не само  $\pi$ -стекинг със спрегнати системи (в този случай, АК и птерин и фенил (тиофен) от лигандите), но и подобни взаимодействия с пептидния скелет и неспецифични контакти свързани с дисперсионни и солватационни ефекти. В разглежданите системи концентрацията на DOX е около 3.5 mM, т.е. съизмерима с тази, при която са наблюдавани споменатите ефекти. В настоящите симулации се забелязва именно това – подредените първоначално една върху друга лекарствени молекули се преразпределят по повърхността на конюгата и взаимодействат с различни елементи от него, като в повечето случаи включват във взаимодействието и насочващия лиганд.

Въпреки моментното отделяне на лекарствени молекули от повърхността на един от комплексите, количественият състав и на четирите остава непроменен до края на симулациите. Тази кратковременна десорбция може да се разгледа като следствие от реорганизационните процеси протичащи в системите. Може да се предположи, че при продължаване на симулациите поведението на конюгатите ще се запази. Тези резултати са (поне отчасти) свидетелство за целостта на комплексите в кръвния поток. Много е важно, че включването на насочваща част в лекарство-преносната система не води до загуба на лекарствен товар.

### 7.3. Клъстерен анализ на комплексите

За извличане на начални структури за следващия тип моделни системи и за очертаване на преимуществено заселените конфигурации на комплексите по време на симулациите е проведен клъстерен анализ на последните 50 ns. Представителните геометрии са показани на Фигура 54.



**Фигура 54.** Структури на най-заселените значими клъстери на комплексите; FA е циан, MTHF е тъмно зелен, PTX е жълт, RTX е черен, DBP, пептидният удължител и мостовия фрагмент са сини, четирите лекарствени молекули са съответно цикламена, зелена, оранжева и лилава

Като цяло получените структури на лекарство-преносните системи в разтвор са подходящи за проверка на поведението им в присъствие на вградения в мембрана рецептор.



## 8. Насочване на лекарствен товар

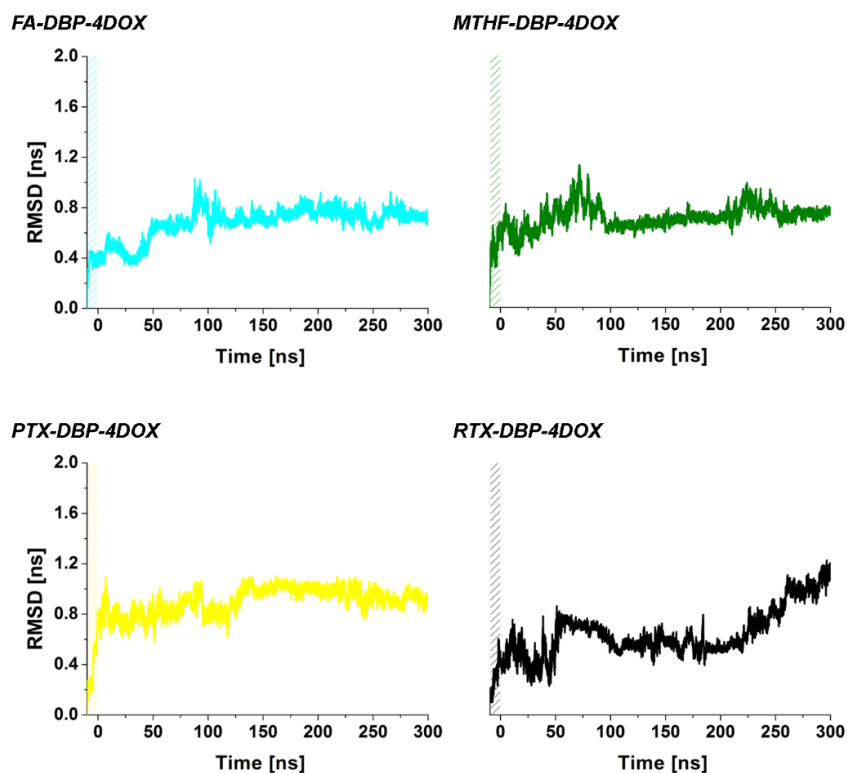
Чрез МД симулациите, представени в настоящата глава, е изследвано поведението на конструираните лекарство-преносни системи в присъствие на вградения в мембрана  $\alpha$ -фолатен рецептор. По аналогия с предишната точка е разгледана подвижността на различни елементи от комплексите, както и промените, които протичат в тяхната структура и състав. Проследено е приближаването на конюгатите към протеина, като е направена връзка между взаимодействието (ако има такова) и реорганизацията в рамките на всеки от тях. Отделно е обследвано и специфичното поведение на доксорубицин проявено по време на симулациите. Накратко е очертано и влиянието, което комплексите оказват върху рецептора и мембраната. Поради ограничената дължина на траекториите и динамичното поведение на конюгатите, направените анализи описват главно кинетиката на процесите.

### 8.1. Структурна подвижност

За оценка на подвижността на различните компоненти от моделните системи е разгледана еволюцията на RMSD на атомните координати на ковалентно свързаните елементи на комплексите (Фигура 55). Чрез визуално наблюдение на траекториите е установено, че конюгатите достигат до протеина за различен период от време – тези с FA и MTHF при около 30 ns, с RTX – при ~57 ns, а този с PTX не влиза в контакт с протеина. В последните кадри от траекторията той се приближава за кратко, като на този етап може само да се спекулира дали при продължаване на симулацията подобно поведение ще се запази.

Скоро след релаксационния етап на симулацията на FA-DBP-4DOX ковалентно свързаните части от комплекса реализират нова подструктура, която бързо се променя след контакта с FR- $\alpha$ , характеризиращ се с ясно изразен минимум в RMSD профила. Малко преди 100 ns се наблюдава нова флуктуация в RMSD, след което се установява стационарно поведение. Ходът на кривата за конюгата с MTHF обаче е различен, въпреки че достига до протеина по същото време. До 95 ns се наблюдават по-значителни изменения в структурата, като подобно 'раздвижване' се реализира и между 206 и 260 ns. През останалото време RMSD флукутира в малки граници, но се забелязва слабо покачване на стойностите. Следователно, вероятно поради взаимодействията с рецептора, различаващи се от тези при FA-DBP-4DOX, системата все още не е достигнала до равновесно положение. Възможно е да настъпват и по-сериозни изменения в състава на комплекса. Тъй като при PTX-DBP-4DOX не се наблюдава взаимодействие с рецептора, промените в хода на RMSD кривата следва да се отнасят към реорганизационни процеси настъпващи в рамките на самия комплекс. Структурата на конюгата с RTX претърпява значителни промени до момента на приближаване към протеина. След това определена подструктура се

реализира за кратко, но настъпват следващи изменения (вероятно свързани с контакта с FR- $\alpha$ ). След  $\sim 220$  ns се наблюдава плавно покачване на RMSD, което продължава до края на симулацията и протича с краткотрайно (за между 10 и 20 ns) стабилизиране на различни подструктури.



**Фигура 55.** Еволюция на RMSD на атомните координати на ковалентно свързаните елементи от комплексите L-DBP-4DOX спрямо началната структура; данните, получени по време на предварителния релаксационен етап от 10 ns, са заштриховани

Като обобщение на структурната динамика на комплексите може да се каже, че те са много подвижни по време на целите симулации. За разлика от стабилността им във физиологичен разтвор, в близост до рецептора и мембраната лекарствените молекули показват явна склонност да се десорбират от повърхността на пептида. Това може да е свързано или с понижен афинитет поради конкурентни взаимодействия с другите биомолекули, или да е просто реорганизация, която цели да 'освободи' молекулата на лиганда, така че тя да е по-достъпна за свързване с рецептора.

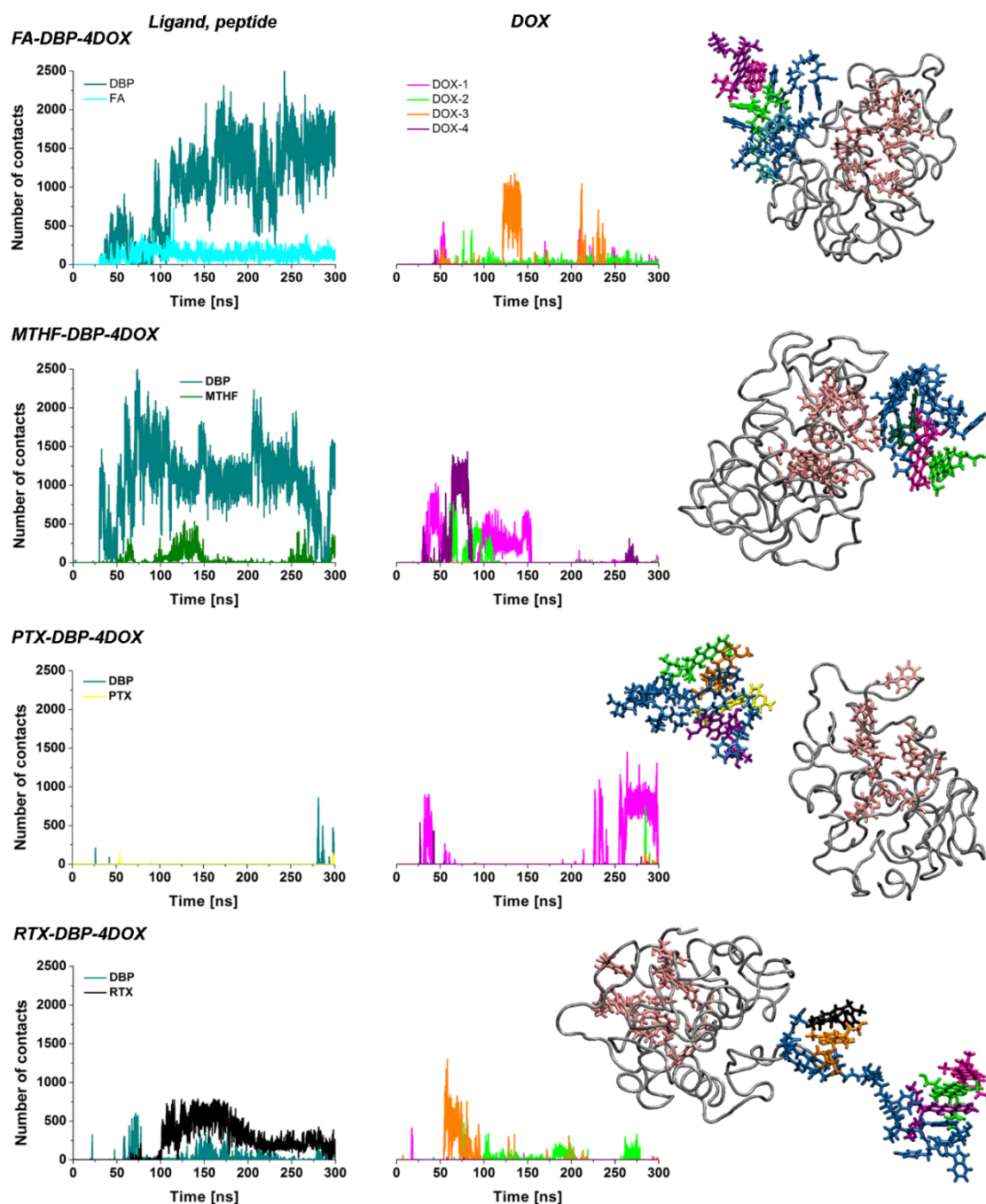
## 8.2. Приближаване към $\alpha$ -фолатен рецептор

За да се оцени най-общо механизмът на приближаване на пептид-лекарствените комплекси към молекулата на рецептора, е проследена еволюцията на броя контакти (под гранично разстояние 0.6 nm) между FR- $\alpha$  и лиганда, пептида (Фигура 59, ляво) и четирите молекули доксорубин (Фигура 59, в средата). Структурите от финалните кадри на симулациите са показани на Фигура 59, дясно.

FA-DBP-4DOX „атакува“ рецептора с лиганда, следван от пептида, който осъществява контакт около 2 ns по-късно. Броят на контактите между FA и FR- $\alpha$  се стабилизира на около 120 и флукутира около тази стойност до края на симулацията. Може да се изкаже предположението, че лигандът е ситуиран в дадена област до рецептора и се движи, без да променя локацията си. По-големият брой контакти между DBP и FR- $\alpha$  подсказва, че основните взаимодействия се осъществяват между тях. В началото обаче този брой е непостоянен. Това поведение може да се свърже с наблюдаваното напускане на лекарствени молекули от комплекса. Покачване се наблюдава в момента, в който DOX1 и DOX4 се завръщат. След този момент броят на контактите започва да се увеличава и достига до постоянна стойност. По време на последните 50 ns от симулацията средният им брой е около 1500. Във финалния кадър ясно се вижда, че основната контактна повърхност е реализирана между DBP и протеина, докато адсорбираните лекарствени молекули са ориентирани към водната среда. Комплексът е разположен отстрани на лиганд-свързващия джоб на FR- $\alpha$ . FA се намира в периферията на пептида, като това разположение очевидно ѝ предоставя възможност да контактува с FR- $\alpha$ .

При MTHF-DBP-4DOX ролите са разменени и пептидът първо се приближава до рецептора, а лигандът – близо 20 ns по-късно. Като цяло взаимодействията между MTHF и протеина изглеждат са възпрепятствани и се осъществяват за относително кратки периоди от време, като в различните етапи се реализират средно между 150 и 250 контакта. По време на симулацията протичат особено динамични процеси, загатнати вече от непостоянния ход на RMSD. Флукуациите в структурата на ковалентно свързаните елементи от комплекса по време на първите ~95 ns от траекторията най-вероятно са свързани с приближаването и първоначалното му взаимодействие с рецептора. Максимумът в RMSD съвпада с първия и най-висок пик в броя на контактите с FR- $\alpha$  (почти 2500). Следователно в този период основно се изменя неговата структура. Между ~150 и 250 ns с рецептора взаимодейства най-вече пептидът. Може да се предположи, че лигандът е заграден от DBP, изолирайки го от FR- $\alpha$ , докато самият пептид се движи по повърхността на протеина. Тази своеобразна конкуренция при взаимодействието с рецептора е вероятна причина за реализирания по-малък брой контакти между пептида и протеина в сравнение с конюгата с FA. След 250 ns възниква момент, който води до отдалечаване на DBP от рецептора и продължава до 295 ns, след което има нов пик на броя контакти. В последния кадър от симулацията комплексът е разположен близо до джоба на рецептора, като лигандът и пептидът „споделят“ контактната повърхност. Двете лекарствени молекули, останали в състава на конюгата, са изложени към водната среда, подобно на симулацията с FA-DBP-4DOX. Те влизат в контакт с протеина в няколко етапа в първата половина на траекторията, но тъй като не са откъснати от пептида по това време, тези контакти следва да са следствие от близостта на DBP и FR- $\alpha$ .

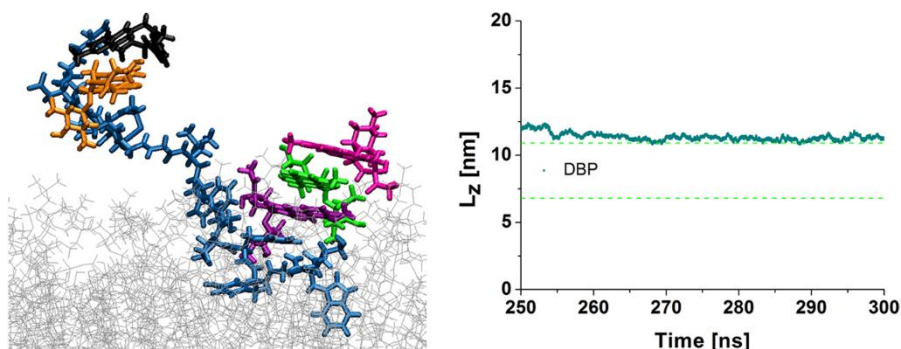
Като обобщение на данните дотук може да се каже, че двете форми на фолиева киселина (FA и MTHF) проявяват чувствителност към рецептора и способност да доведат товара в близост до мястото за свързване. Това най-вероятно се дължи на много силния им афинитет към този протеин [229].



**Фигура 59.** Брой контакти между  $\alpha$ -фолатния рецептор и (ляво) лиганда и пептида и (в средата) всяка от молекулите DOX; (дясно) структури на комплексите и рецептора от финалния кадър на симулациите; рецепторът е сив, АК остатъци, дефиниращи свързващия джоб, са бледо розови, FA е циан, MTHF е тъмно зелен, PTX е жълт, RTX е черен, DBP, пептидният удължител и мостовия фрагмент са сини, четирите лекарствени молекули са съответно цикламена, зелена, оранжева и лилава

Комплексът с RTX за съжаление не е привлечен към фолатния рецептор до края на проведената симулация. В последните 20 ns се наблюдават малък брой контакти между комплекса и FR- $\alpha$ . Това показва, че взаимодействието не е невъзможно, но не се запазва.

При RTX-DBP-4DOX се наблюдава картина различна от тази при останалите комплекси. Пептидът се приближава до рецептора между 57 и 78 ns, като в края на този период се реализират и минимален брой контакти с лиганда. DOX3 напусна комплекса при 63 ns и моментният спад в броя контакти с FR- $\alpha$  точно преди това може да е свързан с реорганизацията в конюгата. Следва период на слаба пространствена близост между рецептора и комплекса. Това се променя при около 100 ns, когато контактите между RTX и FR- $\alpha$  се увеличават, следвани от тези с пептида, но почти 40 ns по-късно. Особеното в случая е, че очевидно лигандът осъществява основните взаимодействия с рецептора, докато DBP се намира зад или до него. Това поведение се запазва до края на траекторията, независимо от специфичния ход на кривите. Във финалния кадър на симулацията DBP е максимално разпънат, като частта му свързана с RTX се намира пред рецептора (далеч от джоба му), а другата е натоварена с три молекули доксорубин и отдалечена от мястото на взаимодействие. Установено е, че тази част от пептида се е приближила до мембраната (Фигура 60, ляво). Най-общо, в конюгата с RTX настъпват преобразувания, засягащи състава, структурата и взаимодействията му с рецептора (и мембраната), но не променят специфичната му ориентация спрямо протеина. На този етап обаче е трудно да се определи дали това насочване на RTX към FR- $\alpha$  се дължи на силен афинитет или е просто случайност.



**Фигура 60.** (ляво) Близък план на взаимодействието на DBP с мембраната от последния кадър на симулацията на системата с RTX-DBP-4DOX; (дясно) еволюция на z координатата на центъра на масите на пептида по време на последните 50 ns от симулацията; еквимолекулярните разделителни повърхности са изобразени със зелени пунктирани линии

Може да се каже, че двете производни на фолиевата киселина не могат да локализират лиганд-свързващия джоб на протеина, когато към тях има прикачен товар. Това се различава значимо от поведението им в несвързано състояние [226],

където се знае, че имат измерим афинитет към FR- $\alpha$ , РТХ даже по-силен от този на фолата. Прикачането на комплексите към тях обаче възпрепятства сериозно взаимодействието им с рецептора, за разлика от това на бионаличните лиганди.

### 8.3. Самостоятелно движение на лекарствените молекули

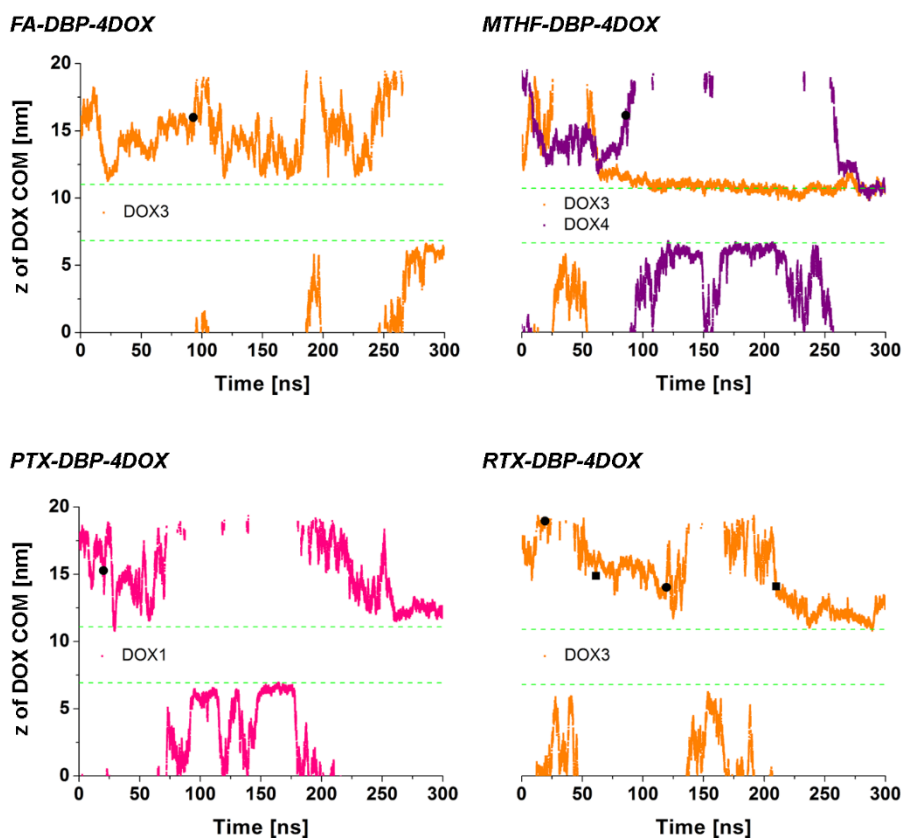
Дотук беше отбелязано, че една или две лекарствени молекули се отделят от комплексите. Интересно е да се проследи движението на тези молекули във времето, през което не са част от тях. На Фигура 62 са изобразени промените в позицията на центъра на масите (СОМ) на съответните лекарствени молекули по z оста на периодичната кутия, т.е. по направление нормално на равнината на мембраната, а на Фигура 63 са дадени последните кадри от траекториите.

Графиките показват движение на молекулите DOX основно в разтвора над мембраната, но понякога и под вътрешния монослой. Последното е недостатък на 3D периодичните гранични условия. Когато молекула премине горния ръб на симулационната кутия, образът ѝ влиза отново от долната ѝ страна. В този случай обаче, предвид конструкцията на модела (бислоят е разположен в средата на кутията), тази част всъщност съответства на вътрешността на клетката. Следователно точките под долната еквимолекулярна разделителна повърхност показват нефизични ефекти.

Отделеният от FA-DBP-4DOX DOX3 е една от молекулите, които преминават от долната част на мембраната. След две краткотрайни ‚визити‘ молекулата прекарва последните 50 ns от траекторията от вътрешната страна на бислоя. Вероятно е тя да е задържана там от електростатичното привличане към отрицателно заредените липидни глави и положително натоварения ѝ захарен остатък. Особено интересна е картината, която се наблюдава в симулацията с конюгата с МТНФ. DOX3, който напуска комплекса още по време на релаксационния етап, започва да навлиза в горния монослой на мембраната при около 105 ns. Според позицията му спрямо еквимолекулярната разделителна повърхност той дори се движи между липидните глави. Най-голямо ‚потопяне‘ се забелязва при 229 ns, където центърът на масите на DOX3 се намира около 0.90 nm под EDS. Той остава в бислоя, както е видно и от последния кадър на симулацията. Поведението на DOX4 е малко по-различно. Молекулата се отделя от МТНФ-DBP-4DOX при 86 ns и много скоро след това преминава от долната страна на периодичната кутия. Прекарва там повече от 150 ns, като близостта ѝ с мембраната вероятно, подобно на DOX3 от комплекса с FA, също е направлявана от електростатични взаимодействия. Пресичане на EDS обаче не се наблюдава. След 255 ns DOX4 отново се намира над външния монослой. Любопитно е, че приближаването ѝ до липидите индуцира и моментно отдръпване на DOX3, която флукутира между главите им вече повече от 150 ns. Скоро след този скок и двете лекарствени молекули отново са заровени в мембраната (илюстрирано с последния кадър на Фигура 63), като DOX4 прониква 0.85 nm под

еквимолекулярната разделителна повърхност при 287 ns. Тези резултати потвърждават силното привличане на доксорубицин от клетъчните мембрани, през които той може да преминава самостоятелно чрез пасивна дифузия [276]. От финалния кадър се вижда, че молекулите DOX са разположени хоризонтално в равнината на мембраната, което допълва вече познатото в литературата схващане [276].

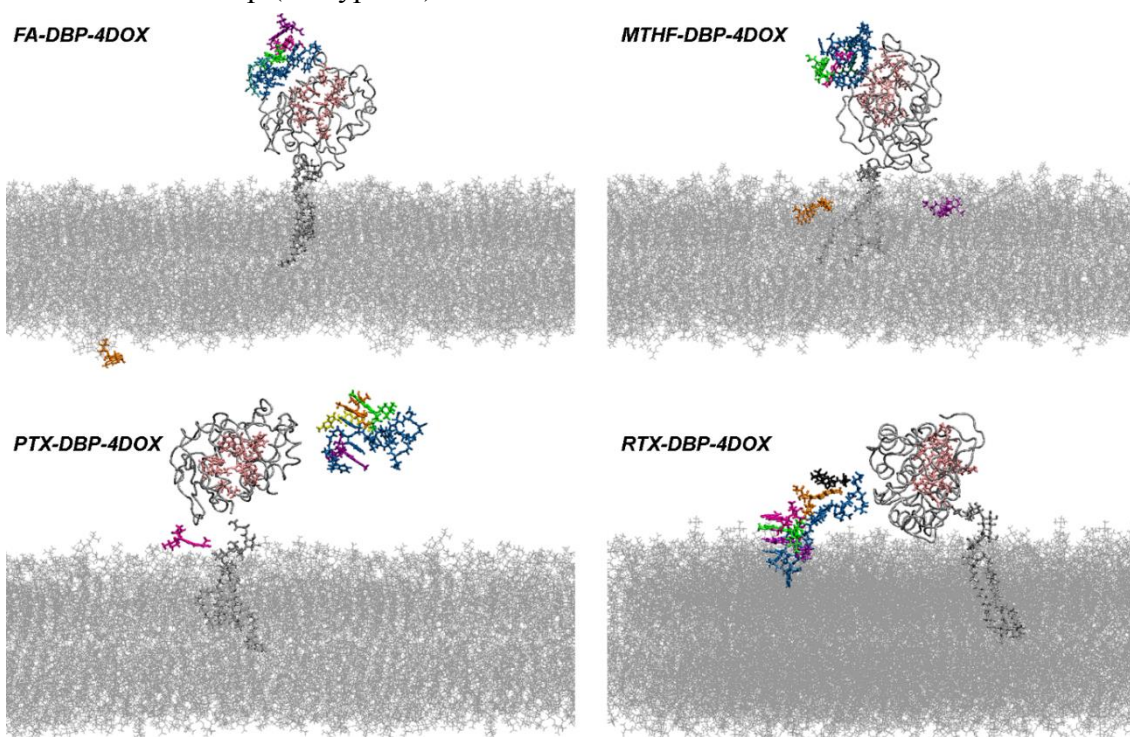
DOX1 напуска комплекса с PTX в началото на продуктивната траектория. Малко след този момент се наблюдава много кратък контакт между него и липидите от мембраната. След това той прекарва известно време над горния монослой. По-късно преминава от другата страна на периодичната кутия, където отново се доближава до мембраната. Това обаче се оказва явно неизгодна ориентация и след 210 ns отново се намира от страната на  $\alpha$ -фолатния рецептор. В самия ѝ край обаче лекарството се отдръпва и се насочва към мембраната. На Фигура 63 виждаме, че DOX1 се намира в „подножието“ на FR- $\alpha$  близо до GPI котвата.



**Фигура 62.** Еволюция на z координатата на центъра на масите на определени лекарствени молекули откъснати от комплексите по време на траекториите; с черни точки са маркирани моментите, в които молекулите се отделят от повърхността на комплексите, а с черни квадрати – моментите, в които DOX3 се връща в състава на RTX-DBP-4DOX; еквимолекулярните разделителни повърхности са изобразени със зелени пунктирани линии



Комплексът с RTX е особено интересен поради наблюдаваното реадсорбиране на отделена вече лекарствена молекула, като това се случва дори два пъти. Графиката показва, че по време на първия по-кратък етап DOX3 се е намирала от страната на рецептора, което е спомогнало за по-бързото ѝ завръщане. По време на следващия обаче тя преминава в долната част на периодичната кутия, на което се дължи и забавянето на повторното ѝ включване в състава на комплекса. В този момент той вече взаимодейства с рецептора. Видими са дори и два момента на приближаване до EDS на мембраната. Отчетено е фиксирането на финалната ѝ позиция, а именно  $\pi$ -стекинг с RTX непосредствено до рецептора. Това потвърждава предположението, че (поне в последните 10 ns от траекторията) ориентацията на комплекса спрямо рецептора остава непроменена. Трябва да се отбележи и накланянето на FR- $\alpha$  видно от последния кадър (Фигура 63).



**Фигура 63.** Структури на системите във финалните кадри от симулациите; рецепторът, GPI котвата и мембраната са сиви, АК остатъци дефиниращи свързващия джоб са бледо розови, FA е циан, MTHF е тъмно зелен, PTX е жълт, RTX е черен, DBP, пептидният удължител и мостовия фрагмент са сини, четирите лекарствени молекули са съответно цикламена, зелена, оранжева и лилава

Като цяло, от направеното дотук разглеждане могат да се направят следните изводи за поведението на доксорубин след включването му в състава на лекарствените системи: (i) за пореден път се потвърждава способността му да участва в  $\pi$ -стекинг взаимодействия с други спрегнати системи, но и да образува собствени агрегати; (ii) DOX не проявява афинитет към  $\alpha$ -фолатния рецептор, но е толерантен към всички насочващи лиганди; (iii) част от молекулите на DOX предпочитат да се



отделят от комплексите и да се насочат към независимо преминаване през мембраната.

Представените в тази точка резултати свидетелстват за ‚спорния успех‘ на предложените лекарство-преносни системи. Три от четирите комплекса влизат в контакт с целевия рецептор относително бързо (от 30 до 60 ns). Конюгатите с FA и МТНФ дори се разполагат до джоба му, но не се наблюдава свързване към него до края на траекториите (300 ns). Възможно е при продължаването им МТНФ-DBP-4DOX, който е най-близо до него, да взаимодейства с аминокиселините от кухината, но това изисква по-дълги симулационни времена. Комплексът с RTX се ситуираща в различна област от протеина, а този с РТХ не е трайно привлечен от него.

Вижда се, че във всеки от комплексите се реализират сериозни изменения засягащи както структурата, така и съставът им. Геометрията им значително се променя вследствие на силни  $\pi$ -взаимодействия между ароматните АК от пептида, спрегнатите фрагменти във всеки лиганд и кондензираните ядра в молекулите доксорубицин. Поведението на РТХ-DBP-4DOX подкрепя най-силно това твърдение, тъй като при него не се наблюдават особени контакти с рецептора. При конюгатите, които достигат до FR- $\alpha$ , влияние може да оказват и аминокиселините от самия протеин. Всички тези фактори допринасят и за трайната дисоциация на една или две лекарствени молекули от повърхността на ковалентно свързаните елементи. Единствено в FA-DBP-4DOX и РТХ-DBP-4DOX някои от тях се включват отново в състава му. Останалите се движат самостоятелно в периодичната кутия, като някои от тях осъществяват навлизане в мембраната, в съгласие с ‚предпочитанието‘ на лекарството към липидните бислоеве [276]. То може да е допълнителна причина за напускане на комплексите. Не са установени трайни контакти между DOX и протеина въпреки моментните взаимодействия от електростатичен характер. Комбинация от всички взаимно конкуриращи се процеси вероятно стои в основата на необичайното поведение на комплекса съдържащ РТХ. То, от своя страна, влияе върху наклона на FR- $\alpha$  и (навярно) върху самата мембрана.

## 9. Заключение

Основна цел на дисертационния труд е да се оценят взаимодействията протичащи между системи за насочен лекарствен транспорт и рецептор характерен за мембраните на раковите клетки. Избран е  $\alpha$ -фолатният рецептор, а за преносните системи – серия от негови лиганди (FA, МТНФ, РТХ, RTX) и пептид-лекарствен комплекс (DBP-4DOX) предложен при предишно изследване проведено в нашата група [239]. За пресъздаване на естественото обкръжение на рецептора в организма е конструиран модел на неопластична клетъчна мембрана. Съставът ѝ (35 различни вида липиди) е базиран на експериментално определен такъв, като са съобразени и известните в литературата специфики, а именно характеристикната зарядова

асиметрия на биологичните бислоеве и съдържание на сфингомиелини и холестерол съответстващо на липидните салове, в които се среща FR- $\alpha$ .

Чрез атомистични молекулно-динамични симулации, подкрепени от квантово-химични пресмятания, е определен най-вероятният позиционен изомер на фолиева киселина – този, в който има свързан водороден атом към N3. Чрез МД е изследвано поведението на набора от лиганди във физиологичен разтвор. Открити са нееднаквите по форма предпочетени геометрии стабилизиращи от водородни връзки с водните молекули и частично от вътрешномолекулни такива. На базата на тези резултати (в комбинация с различните експериментално измерени афинитети лиганд-рецептор) е предположено различно отнасяне на всеки от лигандите към рецептора.

Върху модела на вграден в липиден бислой  $\alpha$ -фолатен рецептор е проверено влиянието на три различни схеми за скалиране на налягането в системата – изотропно (NPT-iso), полу-изотропно (NPT-semi) и полу-изотропно с поддържано постоянно повърхностно напрежение (NP $\gamma$ T). Показано е, че и в трите случая мембраната се намира в течно състояние, но с различна степен на междумолекулна подредба. Най-висока плътност и най-голяма дебелина е отчетена в NPT-semi, а най-малки – в NPT-iso. Средните площи на липидните молекули съвпадат в рамките на стандартното отклонение и в трите симулации, като стойностите са в съгласие и с експериментално определените. Значителните флуктуации на тази величина потвърждават течливостта на мембраната. Според параметрите на порядък подредбата на липидните опашки съответства на течно подредено фазово състояние. Най-високо ниво на подредба е отчетено в NPT-semi, а най-ниско – в NPT-iso. Поведението на бислоя в NP $\gamma$ T е междинно на това в другите две траектории, като в тази се наблюдава по-изразено втечняване на вътрешността му.

Динамиката на  $\alpha$ -фолатния рецептор по време на трите симулации е различна. В NPT-semi са регистрирани най-големи изменения в компактността и формата му в сравнение с експеримента, докато в другите две симулации тези промени не са толкова драстични. Средно-квадратичните флуктуации на аминокиселините показват очакваната мобилност на N-гликозилираните Asn остатъци на повърхността на рецептора и относително слаба подвижност на АК от сърцевината му. Анализът на вторичната структура свидетелства за разплитане на С-края на протеина вследствие на взаимодействия с липидите. Това е най-силно изразено при полу-изотропното скалиране на налягането и по-слабо в NPT-iso и NP $\gamma$ T. Отбелязани са и други промени под действие на различните симулационни условия, включително допълнително структуриране на N-крайните АК в някои времеви периоди от симулациите. Вторичната структура на кристалографската начална геометрия се запазва по-добре в NP $\gamma$ T. Обемът на лиганд-свързващия джоб флукутира по време на траекториите (най-много в NPT-semi), но тези изменения не са свързани с останалите структурни отклонения. FR- $\alpha$  може да заема както тангенциални, така и нормални на

равнината на мембраната позиции, като преходите са най-чести и динамични в NPT-*semi* и първата половина на симулацията в NPT, но затихват след наблюдаваните структурни промени. Тези глобални движения на протеина повлияват относително слабо лиганд-свързващия джоб на рецептора, но са реализирани и (краткотрайни) ориентации, в които той е блокиран от мембраната (основно в NPT-*iso*). Въз основа на цялостния изход от анализа на модела мембрана/рецептор е определено, че структурата на системата е най-близка до експерименталната в NPT и тези условия са избрани за изследване на поведението на лекарство-преносните системи в присъствие на рецептора.

Симулациите на лекарство-преносните системи във физиологичен разтвор са показателни за поведението им в кръвния поток. И в четирите конюгата настъпва сериозна структурна реорганизация свързана с преразпределянето на лекарствените молекули по повърхността на пептида. В някои случаи във взаимодействията участват и насочващите лиганди, като подвижността им е очаквано променена в сравнение с тази в свободно състояние. Забелязани са само временни напускания на DOX от комплексите. Въз основа на това може да се заключи, че системата за лекарствена доставка се очаква да бъде стабилна в кръвния ток.

Присъствието на вградения в мембраната рецептор очаквано влияе върху динамиката на лекарство-преносната система. Три от комплексите достигат до FR- $\alpha$  в рамките на проведените симулации, но за различно време (от 30 до около 60 ns). Двата конюгата с фолат като молекула-вектор се ориентират в близост до лиганд-свързващия джоб на протеина, но лигандът не се свързва с него във времевата скала (300 ns) на симулациите. Най-голяма близост между него и комплекса се регистрира в системата с MTHF в последните наносекунди от симулацията, което дава основание да се предположи, че може да има развитие в динамиката на взаимодействие лиганд-рецептор при по-дълги времена.

Наблюдавана е сериозна дълготрайна промяна в структурата и състава на всички конюгати в близост до рецептора и/или мембраната. По една или две молекули DOX се дисоциират от всеки от тях, като единствено в комплексите с FA и с RTX някои от тях се адсорбират повторно. Възможно е част от измененията да са свързани с взаимодействията с рецептора. Реорганизация се забелязва обаче и при комплекса, който не достига до него. Следователно структурните промени са характеристични по-скоро за самите лекарствени формулировки. Най-общо, те вероятно са причинени от различен набор от фактори: конкурентно привличане между  $\pi$ -спрегнатите фрагменти вътре в конюгата, пертурбация вследствие на присъствието на мембранните липиди или от взаимодействие с рецептора. Самостоятелното движение на лекарствени молекули в периодичната кутия, и то в посока навлизане/взаимодействие с мембраната, потвърждава афинитета на DOX към клетъчните мембрани [276], към който може да се добави липса на такъв към  $\alpha$ -фолатния рецептор. Измененията в наклона на последния са подобни на тези, които

той претърпява в системата без комплексите, но допълнени с някои специфични дължащи се на присъствието им. Например периодът им е по-голям в симулацията с конюгата с МТНФ. Специфичните взаимодействия едновременно между рецептора и мембраната и комплекса с RTX също така ограничават подвижността на FR- $\alpha$ .

От тази част на изследването може да се заключи, че наличието на товар повлиява способността за насочване на молекулите-вектори. Само някои от тях успяват да доставят лекарствената подсистема до рецептора, като това важи в най-голяма степен за естествените за протеина лиганди. Нито една от молекулите-вектори обаче не се свързва в кухината на протеина. Основното „пречещо“ взаимодействие е конкурентен  $\pi$ -стекинг с ароматни странични вериги на аминокиселини от пептида, както и с  $\pi$ -спрегнатата част на доксорубицин. Поради това за оптимизиране на ефективността на насочване може да се препоръча включване на антибиотика в друг тип формулировка, която се основава например на ковалентното му свързване към наситен носител.

## 10. Приноси

Като резултат от извършената работа могат да бъдат формулирани следните научни приноси:

1. Допринесено е за конструиране на нов атомистичен модел на мембрана на ракова клетка с по-разнообразен липиден състав в сравнение с публикуваните досега в литературата модели, който освен това е изцяло базиран на експериментални данни.

2. Проведени са първите МД симулации на  $\alpha$ -фолатен рецептор в мембранно обкръжение.

3. Описано е поведението на моделната мембрана и вградения в нея  $\alpha$ -фолатен рецептор по време на симулации с различни подходи за поддържане на постоянно налягане, т.е. в различни експериментални лабораторни или физиологични постановки. Доказано е, че резултатите варират значимо в зависимост от симулационните условия и е потвърдена важната роля на внимателната настройка на изчислителния протокол при изследването на биологични процеси.

4. Изследвана е кинетиката на приближаване на моделни лекарство-преносни системи към  $\alpha$ -фолатния рецептор, като са идентифицирани взаимодействия между тях. Потвърден е афинитетът на доксорубицин към преминаване през клетъчните мембрани чрез пасивна дифузия. В допълнение е показана липсата на такъв към рецептора.

5. Получена е информация на молекулно ниво, която дава насоки за по-ефективно конструиране на лекарство-преносни системи базирани на фолиева киселина.

### Списък с публикации по дисертацията:

- 1. A look at receptor-ligand pairs for active-targeting drug delivery from crystallographic and molecular dynamics perspective**  
Gergana Gocheva, Anela Ivanova  
*Molecular Pharmaceutics* **2019**, *16*, 3293-3321  
DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00250
- 2. Tautomerism in folic acid: combined molecular modelling and NMR study**  
Gergana Gocheva, Nikolay Petkov, Andrea Garcia Luri, Stoyan Iliev, Nikoleta Ivanova, Jasmina Petrova, Yavor Mitrev, Galia Madjarova, Anela Ivanova  
*Journal of Molecular Liquids* **2019**, *292*, 111392  
DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111392
- 3. Molecular simulation of the structure of folate and antifolates at physiological conditions**  
Jasmina Petrova, Gergana Gocheva, Nikoleta Ivanova, Stoyan Iliev, Boyana Atanasova, Galia Madjarova, Anela Ivanova  
*Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2019**, *87*, 172-184  
DOI: 10.1016/j.jmgm.2018.11.018
- 4. Self-assembly of doxorubicin and a drug-binding peptide studied by molecular dynamics**  
Gergana Gocheva, Kalina Peneva, Anela Ivanova  
*Chemical Physics* **2019**, *525*, 110380  
DOI: 10.1016/j.chemphys.2019.05.007
- 5. Characteristics of a folate receptor- $\alpha$  GPI-anchored into a multilipid bilayer obtained from atomistic molecular dynamics simulations**  
Gergana Gocheva, Nikoleta Ivanova, Stoyan Iliev, Jasmina Petrova, Galia Madjarova, Anela Ivanova  
*Journal of Chemical Theory and Computation*, приета за печат; Manuscript ID: ct-2019-008727

### Представяне на резултати от работата по дисертацията на научни конференции:

- 1. XVIII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 15-17. 05. 2019 г., София, България**  
Молекулно-динамични симулации на фолатен рецептор вграден в моделна клетъчна мембрана  
Г. Гочева, Н. Иванова, Ст. Илиев, Ж. Петрова, Г. Маджарова, А. Иванова  
(устен доклад)
- 2. Научна сесия на Факултет по химия и фармация, 23. 11. 2018 г., София, България**

- In silico evaluation of the drug-binding and receptor targeting ability of a model drug delivery system  
G. Gocheva, N. Ivanova, J. Petrova, S. Iliev, G. Madjarova, A. Ivanova (*poster*)
3. **Workshop “Two Years Avitohol: Advanced HPC applications”**, October 29-31, 2017, Panagyurishte, Bulgaria  
Folic acid and anifolates in aqueous solution – a molecular dynamics study  
G. Gocheva, S. Iliev, B. Atanasova, N. Ivanova, J. Petrova, G. Madjarova, A. Ivanova (*oral presentation*)
4. **International Workshop “Advanced Materials”**, September 10-13, 2017, Pomorie, Bulgaria  
Structural characterization of folic acid and antifolates in aqueous solution  
G. Gocheva, S. Iliev, B. Atanasova, N. Ivanova, J. Petrova, A. Garcia Luri, G. Madjarova, A. Ivanova (*short oral presentation*)
5. **Computational Advances in Drug Discovery**, September 05-08, 2017, Lausanne, Switzerland  
Computational investigation of the molecular structure of folic acid and antifolates in aqueous solution  
G. Gocheva, S. Iliev, B. Atanasova, N. Ivanova, J. Petrova, A. Garcia Luri, G. Madjarova, A. Ivanova (*poster*)
6. **XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти**, 17-19. 05. 2017 г., София, България  
Оценка на молекулната структура на фолиева киселина и антифолати във водна среда  
Г. Гочева, Ст. Илиев, Б. Атанасова, Н. Иванова, Ж. Петрова, Г. Маджарова, А. Иванова (*устен доклад*)

**Участие в проекти по темата на дисертацията:**

1. **Лекарствени вектори-бионосители: ефективност чрез разбиране**, Фонд „Научни изследвания“, № ДН09/14 от 16.12.2016 г. (участник)
2. Horizon 2020 project **VI-SEEM**, applications MULTIDRUG and Surf\_prop (Grant agreement number: 675121) (член на работен екип по приложенията)
3. **Постигане на оптимална среда за обучение, научни изследвания, иновации и устойчиво развитие на човешкия капитал в сферата на химическите науки: Адаптиране на образованието днес за утрешния ден**, ОП „Наука и образование за интелигентен растеж“, № BG05M2OP001-2.009-0028 (участник)
4. Horizon 2020 project **Materials Networking** (Grant agreement number: 692146) (участник)

## Други публикации и участия:

- 1. Identification and computational characterization of isomers with cis and trans amide bonds in folate and its analogues**  
Stoyan Iliev, Gergana Gocheva, Nikoleta Ivanova, Boyana Atanasova, Jasmina Petrova, Galia Madjarova, Anela Ivanova  
*Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*, 28818-28831  
DOI: 10.1039/C8CP04304C
- 2. Characterization of the interaction forces in a drug carrier complex of doxorubicin with a drug-binding peptide**  
Gergana Gocheva, Nina Ilieva, Kalina Peneva, Anela Ivanova  
*Chemical Biology & Drug Design* **2018**, *91*, 874–884  
DOI: 10.1111/cbdd.13151
  
- 1. XVII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 16-18.05.2018 г., София, България**  
Взаимодействие на фолиева киселина и антифолати с фолатен рецептор вграден в моделна клетъчна мембрана  
Г. Гочева, Ст. Илиев, Н. Иванова, Ж. Петрова, Г. Маджарова, А. Иванова  
(устен доклад)
- 2. e-Infrastructures for excellent science in Southeast Europe and the Eastern Mediterranean, May 15-16, 2018, Sofia, Bulgaria**  
Structural differences between trans and cis folic acid and antifolates in physiological environment: a theoretical study  
G. Gocheva, S. Iliev, B. Atanasova, N. Ivanova, J. Petrova, G. Madjarova, A. Ivanova (oral presentation)
- 3. Научна сесия на Факултет по химия и фармация, 24.11.2016 г., София, България**  
Молекулно-динамично изследване на самоорганизацията на комплекс доксорубицин-пептид  
Г. Гочева, Н. Илиева, К. Пенева, А. Иванова (постер)
- 4. Ninth National Conference on Chemistry: Science and Technology for Better Life, September 29 – October 1, 2016, Sofia, Bulgaria**  
Molecular dynamics assessment of the interactions between doxorubicin and a drug-binding peptide  
G. Gocheva, N. Ilieva, K. Peneva, A. Ivanova (oral presentation)
- 5. XV Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 18-20.05.2016 г., София, България**  
Характеризиране на пептид-базиран комплекс като компонент в системи за доставка на лекарства

- Г. Гочева, Н. Илиева, К. Пенева, А. Иванова (*устен доклад*)
6. **20th International Workshop on Quantum Systems in Chemistry and Physics (QSCP-XV)**, September 14 - September 20, 2015, Varna, Bulgaria  
Molecular dynamics assessment of the interactions between doxorubicin and a drug-binding peptide  
G. Gocheva, N. Pieva, K. Peneva, A. Ivanova (*poster*)
7. **XV. demon Developers Workshop**, May 28–31, 2015, Sofia, Bulgaria  
Evaluation of the interactions between doxorubicin and a drug-binding peptide via molecular dynamics simulations  
G. Gocheva, N. Pieva, K. Peneva, A. Ivanova (*poster*)
1. Обучителна школа „**PRACE Winter School 2018 - Computational Chemistry, Biochemistry and Medicinal chemistry – Methods and Tools**“, 26-29. 11. 2018 год., ИИКТ-БАН, София, България. Подпомагане на провеждането на практическо занятие за МД симулации
2. Обучителна школа "**Bio – Comp – Chem**" по проект **BG05M2OP001-2.009-0028 "Постигане на оптимална среда за обучение, научни изследвания, иновации и устойчиво развитие на човешкия капитал в сферата на химическите науки: Адаптиране на образованието днес за утрешния ден"**, 24-28. 09. 2018, Банско, България
3. Обучителна школа 2 "**Кариерно развитие на младия учен**" по проект **BG05M2OP001-2.009-0028"Постигане на оптимална среда за обучение, научни изследвания, иновации и устойчиво развитие на човешкия капитал в сферата на химическите науки: Адаптиране на образованието днес за утрешния ден"**, 16-20. 04. 2018, Трявна, България
4. Обучителна школа „**Bio-materials: synthesis and characterization School**“ по проект **No 692146 „Materials Networking“**, 21-23. 03. 2018, София, България
5. Обучителна школа „**Computational modeling of materials school**“ по проект **No 692146 „Materials Networking“**, 04-05. 12. 2017, София, България
6. Научен семинар „**BioExcel Community Forum**“, 22-23. 11. 2017, Amsterdam, Netherlands

## 11. Списък със съкращения

АК – аминокиселина;  
 ВП – времеви период;  
 МД – молекулна динамика;  
 ПМ – плазмена мембрана;  
 Вt – biotin, биотин;  
 Сbl – cobalamin, кобаламин;



CD44 – cluster of differentiation 44;  
CHL – cholesterol, холестерол;  
COM – center of mass, център на масите;  
DBP – drug-binding peptide, лекарство-свързващ пептид;  
DOPC – 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine;  
DOX – doxorubicin, доксорубин;  
EDS – equimolecular dividing surface, еквимолекулярна разделителна повърхност;  
EGF – epidermal growth factor, епидермален растежен фактор;  
EGFR или HER – epidermal growth factor receptor, рецептор за епидермални растежни фактори;  
FA – folic acid, фолиева киселина;  
FR – folate receptor, фолатен рецептор;  
GLs – glycolipids, гликолипиди;  
GPI – glycosyl-phosphatidylinositol, гликозилфосфатидилинозитол;  
HA – hyaluronic acid, хиалуронова киселина;  
HC – haptocorrin, хаптокорин;  
Kd – дисоциационна константа;  
KD – kinase domain, киназен домен;  
MTHF – 5-methyltetrahydrofolate, 5-метилтетраhydrofolat;  
PA – phosphatidic acid, фосфатидинова киселина;  
PC – phosphatidylcholine, фосфатидилхолин;  
PDB – Protein data bank;  
PE – phosphatidylethanolamine, фосфатидилетаноламин;  
PG – phosphatidylglycerol, фосфатидилглицерол;  
PI – phosphatidylinositol, фосфатидилинозитол;  
PL – plasmalogen, плазмалоген;  
PS – phosphatidylserine, фосфатидилсерин;  
PTX – pemetrexed, пеметрексед;  
PUFA – polyunsaturated, полиненаситен;  
RMSD – root-mean-square deviation, средно-квадратично отклонение;  
RMSF – root-mean square fluctuation, средно-квадратична флуктуация;  
RTX – raltitrexed, ралтитрексед;  
SM – sphingomyelin, сфингомиелин;  
SMVT – sodium-dependent multivitamin transporter, натриево-зависим мултивитаминен транспортер;  
SS – secondary structure, вторична структура;  
TC – transcobalamin, транскобаламин;  
TCR – transcobalamin receptor, транскобаламинов рецептор;  
Tf – transferrin, трансферин;  
TfR – transferrin receptor, трансферинов рецептор.

## 12. Литература

- [1] Liu, D.; Yang, F.; Xiong, F.; Gu, N. *Theranostics* **2016**, *6*, 1306-1323.
- [2] Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63*, 136-151.
- [5] Kue, C. S.; Kamkaew, A.; Burgess, K.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Lee, H. B. *Med. Res. Rev.* **2016**, *36*, 494-575.
- [11] Yan, J. J.; Liao, J. Z.; Lin, J. S.; He, X. X. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 55-67.
- [12] Todorova, R. *Drug. Deliv.* **2011**, *18*, 586-598.
- [13] Prasad, P. D.; Ganapathy, V. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2000**, *3*, 263-266.
- [14] Russell-Jones, G.; McTavish, K.; McEwan, J.; Rice, J.; Nowotnik, D. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1625-1633.
- [15] Patel, M.; Vadlapatla, R. K.; Shah, S.; Mitra, A. K. *Int. J. Pharm.* **2012**, *436*, 324-331.
- [16] Wang, H.; Huang, W.; Fei Y. J.; Xia, H.; Yang-Feng, T. L.; Leibach, F. H.; Devoe, L. D.; Ganapathy, V.; Prasad, P. D. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14875-14883.
- [22] Zhong, Y.; Meng, F.; Deng, C.; Zhong, Z. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1955-1969.
- [23] Maiti, S.; Paira, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 206-223.
- [24] Lei, Y.; Li, H.; Zhang, R.; Han, S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10131-10137.
- [26] Wu, Z.; Li, X.; Hou, C.; Qian, Y. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, *55*, 3958-3961.
- [27] Zhao, R.; Matherly, L. H.; Goldman, I. D. *Expert Rev. Mol. Med.* **2009**, *11*, e4.
- [30] Chen, C.; Ke, J.; Zhou, X. E.; Yi, W.; Brunzelle, J. S.; Li, J.; Yong, E. L.; Xu, H. E.; Melcher, K. *Nature* **2013**, *500*, 486-489.
- [31] Brown, D.; Waneck, G. L. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1992**, *3*, 895-906.
- [32] Duthie, S. J. *Br. Med. Bull.* **1999**, *55*, 578-592.
- [33] McGuire, J. J. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2593-2613.
- [43] Flodh H.; Ullberg, S. *Int. J. Cancer* **1968**, *3*, 694-699.
- [44] Quadros, E. V. *Br. J. Haematol.* **2010**, *148*, 195-204.
- [45] Wuerges, J.; Garau, G.; Geremia, S.; Fedosov, S. N.; Petersen, T. E.; Randaccio, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4386-4391.
- [46] Amagasaki, T.; Green, R.; Jacobsen, D. W. *Blood* **1990**, *76*, 1380.
- [47] Alam, A.; Woo, J. S.; Schmitz, J.; Prinz, B.; Root, K.; Chen, F.; Bloch, J. C.; Zenobi, R.; Locher, K. P. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12100.
- [49] Pettenuzzo, A.; Pigot, R.; Ronconi, L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 1625-1638.
- [50] Clardy, S. M.; Allis, D. G.; Fairchild, T. J.; Doyle, R. P. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 127-140.
- [51] Petrus, A. K.; Fairchild, T. J.; Doyle, R. P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 1022-1028.
- [52] Shane, B.; Stokstad, E. L. *Annu. Rev. Nutr.* **1985**, *5*, 115-141.
- [66] Ponka, P.; Lok, C. N. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 1111-1137.
- [67] Qian, Z. M.; Li, H.; Sun, H.; Ho, K. *Pharmacol Rev.* **2002**, *54*, 561-587.
- [68] Yang, N.; Zhang, H.; Wang, M.; Hao, Q.; Sun, H. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 999.
- [72] Shen, Y.; Li, X.; Dong, D.; Zhang, B.; Xue, Y.; Shang, P. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, *8*, 916-931.
- [77] Cheng, Y.; Zak, O.; Aisen, P.; Harrison, S. C.; Walz, T. *Cell* **2004**, *116*, 565-576.
- [78] Daniels, T. R.; Delgado, T.; Helguera, G.; Penichet, M. L. *Clin. Immunol.* **2006**, *121*, 159-176.
- [89] Laurent, T. C.; Fraser, J. R. E. *FASEB J.* **1992**, *6*, 2397-2404.
- [90] Volpi, N.; Schiller, J.; Stern, R.; Soltés, L. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1718-1745.
- [91] Aruffo, A.; Stamenkovic, I.; Melnick, M.; Underhill, C. B.; Seed, B. *Cell* **1990**, *61*, 1303-1313.
- [94] Chen, C.; Zhao, S.; Karnad, A.; Freeman, J. W. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 64.
- [97] Banerji, S.; Wright, A. J.; Noble, M.; Mahoney, D. J.; Campbell, I. D.; Day, A. J.; Jackson, D. *G. Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 234-239.
- [98] Arpicco, S.; Milla, P.; Stella, B.; Dosio F. *Molecules* **2014**, *19*, 3193-3230.
- [99] Misra, S.; Hascall, V. C.; Markwald, R. R.; Ghatak, S. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 201.

- [100] Mattheolabakis, G.; Milane, L.; Singh, A.; Amiji, M. M. *J. Drug Target.* **2015**, *23*, 605-618.
- [112] Campbell, I. D.; Humphries, M. J. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a004994.
- [113] Hynes, R. O. *Cell* **2002** *110*, 673-687.
- [114] Schwartz, M. A.; Schaller, M. D.; Ginsberg, M. H. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1995**, *11*, 549-599.
- [116] Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785-21788.
- [118] Desgrosellier, J. S.; Cheresch, D. A. *Nat. Rev. Cancer*, **2010**, *10*, 9-22.
- [123] Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R. G.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. *Science* **2002**, *296*, 151-155.
- [127] Wang, X.; Li, S.; Shi, Y.; Chuan, X.; Li, J.; Zhong, T.; Zhang, H.; Dai, W.; He, B.; Zhang, Q. *J. Control. Release* **2014**, *193*, 139-153.
- [144] Bianco, R.; Gelardi, T.; Damiano, V.; Ciardiello, F.; Tortora, G. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1416-1431.
- [145] Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1995**, *19*, 183-232.
- [146] Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Amon, A.; Martin, K. C. Signaling pathways that control gene expression. In *Molecular Cell Biology*, 8<sup>th</sup> ed.; W.H. Freeman & co.: New York, **2016**.
- [148] Lu, H. S.; Chai, J. J.; Li, M.; Huang, B. R.; He, C. H.; Bi, R. C. *J. Biol. Chem.* **2001** *276*, 34913-34917.
- [149] Herbst, R. S.; Langer, C. J. *Semin. Oncol.* **2002**, *29*, 27-36.
- [150] Lu, C.; Mi, L. Z.; Grey, M. J.; Zhu, J.; Graef, E.; Yokoyama, S.; Springer, T. A. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 5432-5443.
- [151] Ogiso, H.; Ishitani, R.; Nureki, O.; Fukai, S.; Yamanaka, M.; Kim, J. H.; Saito, K.; Inoue, M.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. *Cell* **2002**, *110*, 775-787.
- [174] (a) Luhers, C. A.; Slomiany, Br. L. *A J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21446-21449; (b) Sabharanjak, S.; Mayor, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1099-1109; (c) Vishwakarma, R.; Ruhela, D. Chemical Synthesis of Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors. In *The Enzymes*, vol. 26. Elsevier: Amsterdam, 2009.
- [175] Stillwell, W. *An introduction to biological membranes. Composition, Structure, and Function*. Elsevier: Amsterdam, **2016**.
- [176] Harayama, T.; Riezman, H. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 281-296.
- [177] Casares, D.; Escribá, P. V.; Rosselló, C. A. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2167.
- [178] Sanderson, J. M. *Mol. Membr. Biol.* **2012**, *29*, 118-143.
- [179] Marquardt, D.; Geier, B.; Pabst, G. *Membranes* **2015**, *5*, 180-196.
- [180] Ramstedt, B.; Slotte, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1945-1956.
- [181] Wood, W. G.; Igbavboa, U.; Müller, W. E.; Eckert, G. P. *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 684-689.
- [182] Kobayashi, T.; Menon, A. K. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, R386-R391.
- [183] Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 361-374.
- [184] Marrink, S. J.; Corradi, V.; Souza, P. C.; Ingólfsson, H. I.; Tieleman, D. P.; Sansom, M. S. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 6184-6226.
- [189] Ivanova, N.; Ivanova, A. *J. Comput. Chem.* **2018**, *39*, 387-396.
- [191] Andoh, Y.; Okazaki, S.; Ueoka, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 1259-1270.
- [192] Andoh, Y.; Aoki, N.; Okazaki, S. *J. Chem. Phys.* **2016**, *144*, 085104.
- [196] Feigenson, G. W. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 560-563.
- [199] Marsh, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286*, 183-223.
- [202] Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; MacKerell Jr., A. D. *J. Comp. Chem.* **2010**, *31*, 671-690.
- [203] Klauda, J. B.; Venable, R. M.; Freites, J. A.; O'Connor, J. W.; Tobias, D. J.; Mondragon-Ramirez, C.; Vorobyov, Jr., I.; MacKerell Jr., A. D.; Pastor, R. W. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 7830-7843.
- [206] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.

- [207] MacKerell Jr., A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack Jr., R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 3586-3616.
- [214] Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101.
- [215] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.
- [216] Jarvis, R.A.; Patrick, E.A. *IEEE Trans. Comput.* **1973**, *C22*, 1025-1034.
- [220] Lukat, G.; Krüger, J.; Sommer, B. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 2908-2925.
- [221] Kabsch, W.; Sander, C. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577-2637.
- [224] Paramo, T.; East, A.; Garzón, D.; Ulmschneider, M. B.; Bond, P. J. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 2151-2164.
- [226] Jackman, A. L.; Theti, D. S.; Gibbs, D. D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1111-1125.
- [229] Wang, X.; Shen, F.; Freisham, J. H.; Gentry, L. E.; Ratnam, M. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1898-1901.
- [232] Soniat, M.; Martin, Chr. B. *Pteridines* **2008**, *19*, 120-124.
- [233] Merchant, Th. E.; Kasimos, J. N.; Vroom, Th.; de Breed, E.; Iwata, J. L.; de Graaf, P. W.; Glonek, Th. *Cancer Lett.* **2002**, *176*, 159-167.
- [234] Yu, Y.; Skočaj, M.; Kreft, M. E.; Resnik, N.; Veranič, P.; Franceschi, P.; Sepčič, Kr.; Guella, Gr. *Mol. BioSyst.* **2016**, *12*, 3266-3279.
- [235] Jo, S.; Lim, L. B.; Klauda, J. B.; Im, W. *Biophys. J.* **2009**, *97*, 50-58.
- [236] Saha, S.; Anilkumar, A. A.; Mayor, S. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 159-175.
- [237] Sharma, P.; Varma, R.; Ira R. C. S.; Gousset, K.; Krishnamoorthy, G.; Rao, M.; Mayor, S. *Cell* **2004**, *116*, 577-589.
- [238] Jhaveri, M. S.; Rait, A. S.; Chung, K.-N.; Trepel, J. B.; Chang, E. H. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1505-1512.
- [239] Gocheva, G.; Peneva, K.; Ivanova, A. *Chem. Phys.* **2019**, *525*, 110380.
- [246] Vlahov, I. R.; Santhapuram, H. K. R.; Kleindl, P. J.; Howard, S. J.; Stanford, K. M.; Leamon, C. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5093-5096.
- [250] (a) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M., Jr.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179-5197. (b) Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049-1074.
- [252] (a) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999-3094; (b) Scalmani, G.; Frisch, M. J. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 114110.
- [254] (a) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100; (b) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652; (c) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789; (d) Miehlich, B.; Savin, A.; Stoll, H.; Preuss, H. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, 200-206.
- [255] Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724-728.
- [256] Best, R. B.; Zhu, X.; Shim, J.; Lopes, P.; Mittal, J.; Feig, M.; MacKerell Jr., A. D. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 3257-3273.
- [257] Guvench, O.; Mallajosyula, S. S.; Raman, E. Pr.; Hatcher, E.; Vanommeslaeghe, K.; Foster, Th. J.; Jamison II, Fr. W.; MacKerell Jr., A. D. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 3162-3180.
- [258] HyperChem 7.0; Hypercube: Gainesville, FL, **2001**.
- [259] Amber 8, Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E., III.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Merz, K. M.; Wang, B.; Pearlman, D. A.; Crowley, M.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Beroza, P.; Schafmeister, C.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Kollman, P. A. University of California: San Francisco, CA, **2004**.
- [260] Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. *Software X* **2015**, *1*, 19-25.
- [261] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Molec. Graph.* **1996**, *14*, 33-38.

- [262] Gaussian 09, Revision D.01 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- [263] Iliev, S.; Gocheva, G.; Ivanova, N.; Atanasova, B.; Petrova, J.; Madjarova, G.; Ivanova, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 28818–28831.
- [265] Yeagle, P. L. *The membranes of cells*. Elsevier: Amsterdam, **2016**.
- [270] Raja, N. S.; Sankaranarayanan, K.; Dhathathreyan, A.; Nair, B. U. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 332-340.
- [271] Vacklin, H. P.; Tiberg, F.; Fragneto, G.; Thomas, R. K. *Langmuir* **2005**, *21*, 2827-2837.
- [272] Craven, B. M. *Acta Crystallogr. B* **1979**, *35*, 1123-1128.
- [273] Wu, E.; Qi, Y.; Park, S.; Mallajosyula, S. S.; MacKerell, Jr., A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. *Biophys. J.* **2015**, *109*, 2090-2100.
- [274] Wibowo, A. S.; Singh, M.; Reeder, Kr. M.; Carter, J. J.; Kovach, A. R.; Meng, W.; Ratnam, M.; Zhang, F.; Dann, Ch. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 15180-15188.
- [276] (a) Awasthi, S.; Sharma, R.; Awasthi, Y. C.; Belli, J. A.; Frenkel, E. P. *Cancer Lett.* **1992**, *63*, 109-116; (b) Speelmans, G.; Staffhorst, R. W.; Steenbergen, H. G.; de Kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1284*, 240-246.