

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Рябухін С.В.

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ГНУЧКОСТІ
ДІАРИЛЕТИЛЕНМІСНИХ ПЕПТИДІВ НА
МЕМБРАНОПРОНИКНІСТЬ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ
ДИНАМІКИ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра

студентки спеціальності 102 Хімія

ОП «Високі технології (хемоінформатика)»

Варжель Надії Ростиславівни

Науковий керівник

проф., д.х.н. **Комаров Ігор Володимирович**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

Анотація

Варжель Н.Р. Дослідження впливу гнучкості діарилетиленмісних пептидів на мембранопроникність методами молекулярної динаміки. – Випускна кваліфікаційна робота за спеціальністю 102 Хімія ОП «Високі технології (хемоінформатика)». У даній роботі проведено розрахунки молекулярної динаміки для взаємодій мембранопроникних пептидів з мембраною у відкритій та закритій формах. Отримані результати вказують на значні відмінності у стабільності та конформаційній гнучкості пептидів у відкритій та закритій формі. Зокрема, встановлено, що пептиди у відкритій формі проявляють більшу стабільність та меншу схильність до конформаційних змін порівняно з пептидами у закритій формі. Розуміння властивостей пептидів у водному та мембранному оточенні може мати важливе значення для розробки нових лікарських засобів, а отже ці результати важливі для подальшого розуміння механізмів взаємодії пептидів з мембранами, що може бути корисним для розвитку медичної хімії, біотехнології та фармацевтичної галузі.

Ключові слова: молекулярна динаміка, пептиди, мембрана, проникність, стабільність.

Зміст

Вступ.....	4
Розділ 1	5
Літературний огляд.....	5
Огляд загальних властивостей та застосування мембранпроникних пептидів	5
Розвиток та значення мембранпроникних пептидів (СРР).....	6
Проблеми та недоліки застосування мембранпроникних пептидів	9
Дослідження мембранпроникних пептидів методами молекулярної динаміки	13
Розділ 2	23
Експериментальна частина	23
Визначення та побудова структури мембранпроникних пептидів	23
Побудова системи з мембраною для молекулярної динаміки	25
Молекулярна динаміка	26
Аналіз результатів молекулярної динаміки	28
Висновки	43
Список використаних джерел	44
Додатки.....	47
Додаток 1.....	47
Вигляд пептидів на початку та на кінці траєкторії молекулярної динаміки	47

Вступ

Мембранопроникні пептиди (СРР) – невеликі за розміром пептиди (5-30 амінокислот), які мають позитивний заряд, що сприяє їх проникненню в клітини через клітинну мембрану. Це робить мембранопроникні пептиди дуже цінними для медичної хімії і фармакології. Ці пептиди можуть бути використані для транспортування лікарських засобів, зокрема протеїнів та нуклеїнових кислот. Не дивлячись на значну перспективу застосувань, механізми дії мембранопроникних пептидів та взаємодії з клітинними мембранами залишаються не до кінця вивченими. Дослідження властивостей СРР є потрібним для подолання низки перешкод, пов'язаних із їхньою ефективністю та безпечністю застосування. Методи молекулярної динаміки (МД) є важливим методом для дослідження поведінки молекул на атомарному рівні. За допомогою МД можна моделювати процеси, що відбуваються у біосистемах, зокрема, взаємодії між пептидами та клітинними мембранами. Це дозволяє отримати глибше розуміння структури і конформаційної динаміки СРР, а також їхньої здатності проникати крізь мембрани.

Дослідження за допомогою молекулярної динаміки дозволяють вивчити важливі аспекти поведінки СРР, такі як утворення і руйнування водневих зв'язків, зміни в конформації та взаємодії з ліпідними шарами мембран. Це є важливим для оптимізації дизайну пептидів, підвищення їхньої стабільності та проникності, а також для розробки більш ефективних систем доставки терапевтичних агентів.

Дуже важливим є вивчення впливу конформаційної гнучкості пептидів на їхню здатність проникати через мембрани. Відкриті та закриті форми пептидів можуть по-різному взаємодіяти із мембранами, а дослідження методами молекулярної динаміки можуть сприяти у вивченні цих відмінностей.

Розділ 1

Літературний огляд

Огляд загальних властивостей та застосування мембранпроникних пептидів

Завдяки здатності транспортувати молекули через клітинні мембрани з низькою токсичністю пептиди, що проникають у клітини (CPP), стали перспективними кандидатами як вектори доставки ліків на основі пептидів. За останні три десятиліття з моменту відкриття першого CPP було проведено велику роботу над механізмами поглинання клітинами та застосуванням для доставки терапевтичних молекул, і було досягнуто значних успіхів [1].

Мембранні білки, розташовані на поверхні клітини, є основними мішенями для лікарських засобів, але всередині клітини розташовано набагато більше «лікарськоподібних» біомолекул. Доставка молекул лікарських засобів до їхніх специфічних внутрішньоклітинних мішеней може підвищити терапевтичну ефективність і зменшити токсичність ліків [2]. Доставка молекул лікарських засобів до їхніх специфічних внутрішньоклітинних мішеней може підвищити терапевтичну ефективність і знизити токсичність препаратів.

Пептиди, що проникають у клітину (CPP), а також домени білкової трансдукції (PTD), зазвичай є амфіфільними та/або катіонними молекулами, що складаються з 5~30 амінокислотних залишків. Вони багаті на основні амінокислоти, як-от аргінін і лізин [1].

Мембраноактивні пептиди поділяються на дві основні категорії: антимікробні пептиди (antimicrobial peptides (AMPs)) і пептиди, що проникають у клітини (cell-penetrating peptides (CPPs)). CPP зазвичай неструктуровані у водних розчинах, але згортаються в чітко визначену вторинну структуру поблизу мембрани [1]. У порівнянні з AMP, CPP можуть проникати через клітинні мембрани, не порушуючи їхньої цілісності. Крім того, CPP можуть не тільки перетинати клітинні мембрани, але й транспортувати ковалентно або нековалентно зв'язані біоактивні речовини: білки [1], пептиди, ДНК, РНК, флуоресцентні мітки, наночастинки [1], віруси, ліпосоми [1], олігонуклеотиди

[1] та лікарські засоби - у клітини. На відміну від АМР, пептиди, що проникають у клітину здатні транслокуватися в живі клітини та їх органели без тривалого пошкодження за фізіологічних умов [3]. Ця особливість робить пептиди, що проникають у клітину, придатними для доставки ліків та інших сполук до внутрішньоклітинних мішеней або через гематоенцефалічний бар'єр.

Відповідно, відкриття пептидів, що проникають у клітину викликало великий інтерес у фармакології та медичній хімії, оскільки такі пептиди можуть бути універсальними засобами для полегшення внутрішньоклітинної доставки біологічно активних частинок.

Розвиток та значення мембранопроникних пептидів (CPP)

З моменту відкриття CPP у 1988 тисячі CPP було відкрито або синтезовано. CPPsite 2.0, база даних CPP, зараз містить 1855 структур разом з їхніми вторинними та третинними структурами [1].

Візьмемо як приклад пептид HIV-1 Tat (GRKKRRQRRRPPQ) [1]. Пептид містить 8 позитивно заряджених амінокислотних залишків і не має регулярної структури ані у розчині, ані на мембрані. Проте було виявлено, що цей тип пептиду може сприяти поглинанню великих біологічно активних молекул клітинами ссавців та опосередковувати доставку різних вантажів у тканини живих організмів. Наразі пептиди Tat успішно використовуються для внутрішньоклітинної доставки широкого спектру вантажів, включно із різноманітними наночастковими фармацевтичними носіями (ліпосоми, міцели, наночастинки) [1]. Іншим типовим прикладом є пенетратин (RQIKIWFQNRRMKWKK) [1]. Пенетратин має 7 позитивно заряджених залишків і може проникати безпосередньо в гігантські монолітні везикули.

Варто зазначити: і Tat, і пенетратин є багатими на аргінін пептидами. Це свідчить про те, що аргінін відіграє важливу роль у механізмі поглинання через бідентатну взаємодію водневих зв'язків між гуанідиновими групами залишків аргініну та фосфатними групами в мембрані. Наприклад, було продемонстровано, що послідовності поліаргініну (Arg8) достатньо для

переміщення молекул у клітини [1]. Крім аргініну, лізин також відіграє важливу роль у процесі проникнення CPP, наприклад Transportan 10 (TP10) (AGYLLGKINLKALAALAKKIL) [1], який є багатим на лізин химерним CPP і приймає альфа-спіральну вторинну структуру на поверхні мембрани. Порівняно з Tat і пенетратином, TP10 має більш спіральну структуру та демонструє вищу ефективність у клітинному поглинанні, оскільки збільшення спіральності CPPs може сприяти здатності проникнення в клітину. Після попередніх відкриттів все більше і більше CPP було розроблено для полегшення проникнення клітин через мембрани в цитоплазму. Як відомо, CPP мають спільну здатність проникати через клітинні мембрани, хоча вони відрізняються за довжиною, електричним зарядом, гідрофобністю/гідрофільністю, гнучкістю тощо. Існують різноманітні методи класифікації CPP [1]. Один з них ґрунтується на походженні CPP. Отже, CPP поділяються на природні CPP, розроблені CPP і CPP, отримані з бібліотек пептидів [1].

Типовим прикладом розроблених CPP є транспортан, який був розроблений за допомогою злиття амфифільного пептиду мастопарану з бджолиної отрути із фрагментом людського нейропептиду галаніну. Було запропоновано низку методів дизайну щоб надалі покращувати властивості CPP шляхом інтеграції кількох різних білкових фрагментів у химерні послідовності або включення неприродних амінокислот у пептиди та створення численних ефективних CPP, таких як CADY (GLWRALWRLLRSLWRLWRA) [1] і КАРТА (KLALKLALKALKAALKLA) [1]. Через складний механізм дії CPP та факт, що кількісне розуміння їхнього зв'язку послідовність-структура-функція відсутнє у їхньому випадку важко досягти раціонального дизайну та оптимізації. Один із можливих підходів - це отримання CPP з бібліотек пептидів завдяки високопродуктивному скринінгу бажаних властивостей, як-от таргетинг та доставка. Другий метод класифікації базується на фізико-хімічних властивостях (рис. 1.1), а CPP можна розділити на катіонні, амфипатичні та гідрофобні [1].

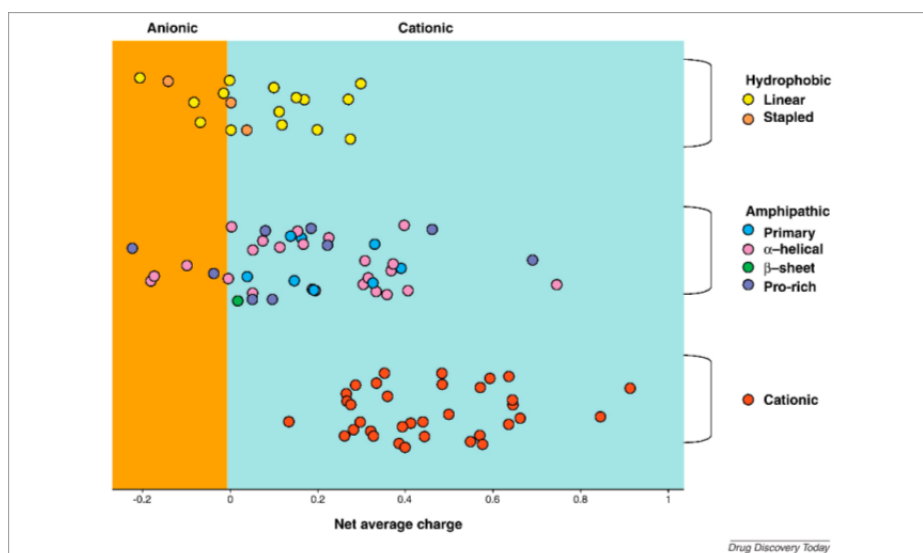


Рис. 1.1 Діаграма розподілу пептидів розділити на катіонні, амфінатичні та гідрофобні.

Навіть через 30 років після першого описаного CPP (HIV-TAT), жодної комбінації CPP-препаратів (cell-penetrating proteins) клінічно не застосовано та затверджено [4]. Неприятливі фармакокінетичні характеристики CPP є основною проблемою, адже CPP, як правило, мають низький рівень біодоступності через їх високу полярність і чутливість до *in vivo* протеолізу. Існує кілька принципів аби пом'якшити ці проблеми, а саме: N-метилування скелета пептиду, [4] макроциклізація, [4] зокрема «степлінг» бокового ланцюга [4] використання міцних каркасів, подібних до «вузлів», [4] та/або оснащення пептидів «хамелеоновими» властивостями, динамічне викриття/екранування хімічні компоненти, що сприяють поглинанню.

Було продемонстровано, що численні структурно неспоріднені послідовності є ефективними як пептиди, що проникають у клітину, від гідрофобних і амфифільних до високополярних катіонних пептидів. Показано, що пептиди, що проникають у клітину є ефективними як ковалентні кон'югати або в нековалентних групах з різноманітними біологічно активними макромолекулами та наночастинками.

Є недолік, властивий багатьом пептидам, що проникають у клітину за умови застосування *in vivo*: вони зазвичай мають низьку селективність за типом

клітин. Пептиди, що проникають у клітину можуть ефективно транспортувати лікарські засоби до клітин, але несприятливий біорозподіл пептидів здатний призвести до доставки в неправильні органи і тканини, тобто до небажаних місць дії. Відтак існує ризик посилення небажаних побічних ефектів і системної токсичності [5,6].

Проблеми та недоліки застосування мембранпроникних пептидів

Проблема селективності є спільною для багатьох макромолекулярних лікарських засобів на основі пептидів. З нею можна боротися шляхом кон'югації з молекулами-мішенями, наприклад, з антитілами [7] шляхом прищеплення елементів послідовності, що володіють підвищеною спорідненістю до клітинного типу, органу та/або тканини [7] або шляхом розробки пептидів, що можуть бути селективно активовані зовнішніми або внутрішніми подразниками в бажаному місці дії [8]. Останній підхід був успішно застосований до пептидів, що проникають у клітину. Наприклад, заряджені аміни або гуанідинієві залишки в катіонних пептидів були тимчасово заблоковані карбоксильними групами залишків глутамату або аспаргінової кислоти у спосіб, подібний до «charge-zipper». Нейтралізація заряду робить полярні пептиди, що проникають у клітину клітинонепроникними. Два протилежно заряджені пептидні фрагменти в цих структурних елементах сполучені через лінкер, що селективно розкладається в певному місці *in vivo*, наприклад, за допомогою відновлення мікрооточення, шляхом кислотного гідролізу або селективного протеолізу в пухлинах.[9] Полікатіонна послідовність пептидів, що вивільняється після розщеплення лінкера, стає проникною для клітини, тож може доставляти ковалентно кон'югований фрагмент всередину оточуючих клітин.

Вивільнення біоактивних молекул, викликане різними зовнішніми подразниками, було широко досліджено. Останнім часом використання неіонізуючого світла для цієї мети привернуло особливу увагу через високу просторову та часову точність світлового випромінювання та його ортогональність до більшості біологічних процесів [4]. Був запроваджений

підхід до контролю біологічної активності сполук за допомогою світла, із використанням фотохромних молекул, які можуть бути зворотно ізомеризовані. (Рис.1.2) Ці молекули, які називаються молекулярними фотоперемикачами, змінюють колір, геометрію, гнучкість, полярність або заряд під час фотоіндукованої ізомеризації.

Деякі типи СРР з фотоперемиканням було описано в дослідженнях. Зокрема було використано азобензольний фрагмент як фотоперемикаючий лінкер між двома лінійними поліпептидними ланцюгами для фотоконтролю клітинного поглинання [2]. Азобензольний лінкер у цис-конфігурації безпосередньо наблизив олігоглутаматний ланцюг до послідовності олігоаргініну, сприяючи утворенню внутрішньомолекулярної Arg-Glu-«charge zipper», яка запобігає поглинанню клітиною. Опромінення видимим світлом перетворювало лінкер на транс-ізомер, розтягуючи «застібку заряду» на частини й запускаючи транслокацію мембрани. Фрагменти, отримані з азобензолу, також використано як «скріпки» бічних ланцюгів для спіральних пептидів, що забезпечило фотоконтроль їхньої вторинної структури та проникнення в клітину [2]. Також було досліджено азобензол-«зшиті» інгібітори білок-білкової взаємодії та продемонстрували фоторегуляцію ендоцитозу [2]. Було повідомлено про проникаючий у клітину амфіфільний пептид «зшитий» азобензольним фрагментом. Проникна для клітини α -спіраль могла утворюватися лише тоді, коли азобензольний фрагмент був у цис-конфігурації, тому індукований УФ-випромінюванням перехід від транс- до цис-конфігурації сприяв клітинній пермеабілізації пептиду. Це відрізняється від конструкції, описаної Prestel і Möller [2], де цис-ізомер був менш проникним для клітин. Велика кількість досліджень повідомляє про потенціал СРР як переносників для лікування різних захворювань, зокрема раку [1].

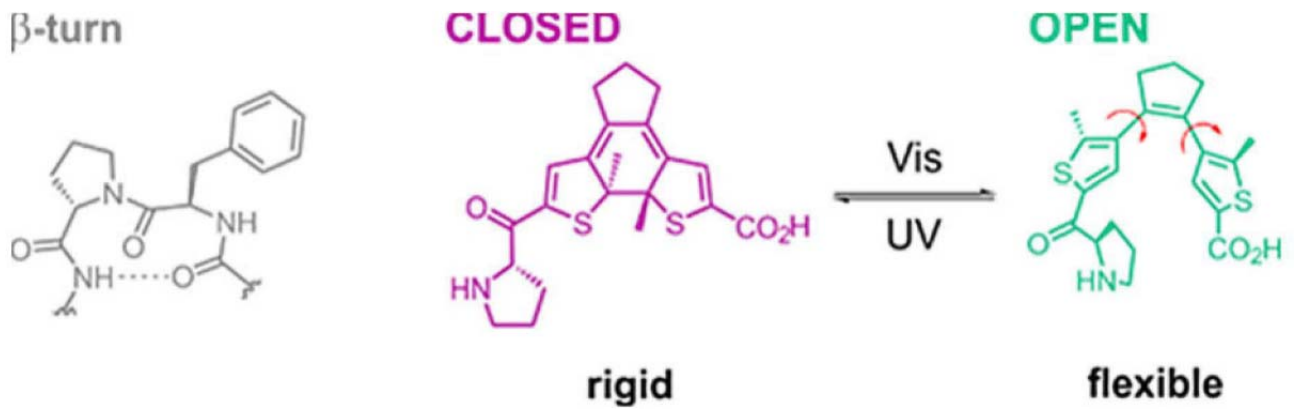


Рис. 1.2 Фотоперехід між відкритою та закритою формою пептидів

Для дослідження механізму проникнення та галузей потенційних застосувань CPP використовувались різні експериментальні методи, такі як експерименти з ядерним магнітним резонансом (ЯМР) (Окрім молекулярної структури, ЯМР-спектроскопія може визначати фазові зміни, конформаційні модифікації, розчинність і потенціал дифузії), спектроскопія кругового дихроїзму (CD), калориметрія ізотермічного титрування (ІТС), одномолекулярна флуоресцентна мікроскопія, флуоресцентна спектроскопія, динамічне розсіювання світла [1]. Наприклад, модельна система, що містить CPP, глікан і ліпід, контролювалася різними методами ЯМР, серед яких ^1H -ЯМР, протон-протонна корельована спектроскопія (^1H - ^1H COSY), повна кореляційна спектроскопія (TOCSY), спектроскопія Оверхаузера з обертовою рамкою (ROESY) і ^{13}C для визначення механізму проникнення в клітину [10].

Хоча CPP були предметом численних досліджень, механізми, за допомогою яких вони проникають у клітини, залишаються не повністю вивченими, а в деяких випадках суперечливими. Розуміння механізмів поглинання CPP клітинами має вирішальне значення для оптимізації ефективності та безпеки внутрішньоклітинної доставки, яка також може відповідати конкретному вантажу. Шляхи клітинної абсорбції CPPs включають неендоцитарні (або енергонезалежні) шляхи та ендоцитарні шляхи, кожен з яких має свої особливості. [10]

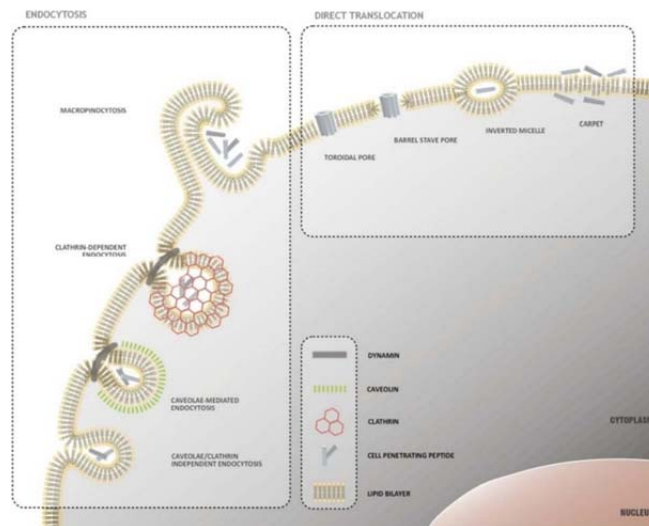


Рис. 1.3 Механізми інтерналізації СРР

На механізми поглинання СРР, впливають як їх фізико-хімічні характеристики, так і вибрані експериментальні параметри. Дослідження взаємозв'язків між структурою та активністю підкреслили важливість позитивних зарядів, зокрема залишків аргініну, і гідрофобних альфа-спіральных структур у механізмі поглинання. Більшість СРР мають кілька залишків аргініну, які є кращими, ніж лізин, для доставки пептидів і дії СРР. Конформація СРР і довжина послідовності також відіграють важливу роль, як показано різницею в поглинанні між рVEC і зашифрованим рVEC. Неамфіпатичні СРР здебільшого залежать від ендоцитозу при низьких дозах, тоді як первинні та вторинні амфільні СРР можуть безпосередньо перетинати клітинну мембрану при низьких мікромольних концентраціях. Наприклад, початкові дослідження механізму інтерналізації пептидів, збагачених аргініном, продемонстрували безпосередню транслокацію через клітинну мембрану, що минає ендоцитоз і залучення специфічних рецепторів. Проте пізніші дослідження показали, що поглинання багатих на аргінін пептидів може бути комбінацією прямої транслокації та ендоцитозу [10]. Перемикання між різними механізмами поглинання може залежати від концентрації. Було показано, що при низькій концентрації СРР, збагачені аргініном, переважно піддаються ендоцитозу, тоді як при вищій концентрації відбувається швидке проникнення в цитоплазму. Загалом, експериментальні умови, такі як концентрація СРР, тип

клітин, температура та інкубаційний період, можуть впливати на механізм надходження СРР. Тип, розмір і стратегія зв'язування також можуть впливати на процес транслокації СРР, при цьому менші корисні навантаження призводять до цитоплазматичного перерозподілу ТАТ. Мічення СРР різними флуорофорами також може змінити механізм їх поглинання, внутрішньоклітинний розподіл і цитотоксичність [10].

Дослідження мембранпроникних пептидів методами молекулярної динаміки

Метод молекулярної динаміки (MD) дозволяє виявлення взаємодії пептид–мембрана на атомному рівні та став ефективним доповненням до експериментальних методів [1].

Загалом, MD — це метод моделювання молекулярного руху на основі механіки Ньютона. Сили, що діють на кожен атом, можна отримати відповідно до функції молекулярного потенціалу, і, враховуючи початкову швидкість і положення, ми можемо отримати траєкторію частинок як функцію часу. MD-моделювання може надати динамічну та термодинамічну інформацію про систему в атомістичних деталях і стало ефективним інструментом для розуміння структури та функціонування біосистем. Класичне моделювання MD з усіма атомами має вищу роздільну здатність, але потребує багато часу та обчислень. Щоб зменшити витрати на обчислення, підвищити ефективність вибірки та пришвидшити обчислення, деякі дослідники використовують грубозернисті (coarse-grained) моделі для виконання моделювання [1].

Першу MD-симуляцію було використано в 1957-го року для вивчення руху спрощеної системи твердих сфер [1]. У 1964 році Рахман моделював систему з 864 атомів Ag з потенціалом Леннарда-Джонса [1], отримав радіальну функцію розподілу, константу дифузії, автокореляційну функцію швидкості й середній азимутальний зсув системи та порівняв їх із експериментальними результатами. Протягом десятиліть методи молекулярного моделювання досягли значного прогресу завдяки розробці алгоритмів моделювання, силових полів і обчислювальних ресурсів. MD моделювання дозволяє нам суворо

контролювати склад і стан системи, стежити за еволюцією системи та аналізувати взаємодії на атомному або молекулярному рівні. У підсумку, завдяки детальному моделюванню ми можемо отримати багато мікроскопічних деталей інтерналізації СРР шляхом моніторингу різних показників [1]: еволюція конформації та орієнтації пептиду, залежність від часу відстані та площі контакту між пептидом і мембраною, глибина вбудовування пептиду в мембрану, функції радіального розподілу, профіль щільності системи, розподіл заряду, деформація та реорганізація ліпідного бішару, індукована вставкою пептиду. Крім того, ми також можемо отримати точні взаємодії пептид–мембрана та ландшафт вільної енергії, аналізуючи гідрофобні/гідрофільні властивості, електростатичні взаємодії, водневі зв'язки, енергії взаємодії, потенціал середньої сили (PMF) тощо. Молекулярна динаміка може доповнити наше розуміння інформацією, що важко отримати від експериментів, і збудити нові ідеї в експериментах для подальшого вивчення результатів моделювання. Ми також повинні взяти до уваги, що результати МД моделювання залежать від початкових умов, ступеня рівноваги, розміру системи та умов, за яких виконується моделювання [1].

Для крупнозернистого моделювання [1] групи атомів відображаються на різних кульках взаємодії, це дозволяє масштабувати моделювання до більших систем і довших часових масштабів, але за рахунок точності моделі буде важко дослідити деякі поведінки та властивості, як-от конформаційний перехід пептидів, події згортання білка, спрямованість патернів водневих зв'язків, що лежить в основі конформаційної стабільності білка [1]. Незважаючи на те, що молекулярна динаміка є ефективним доповненням до експериментального підходу, дотепер існує багато обмежень, наприклад складність відбору енергетичних ландшафтів, надмірне спрощення моделі мембрани та обмежена точність силових полів [1].

Більше того, час, який потрібен СРР для спонтанного переміщення через клітинну мембрану, становить близько хвилин, чого майже неможливо досягти в моделюванні MD, якщо процес інтерналізації не прискорюється штучно. Тому

у дослідженнях пептидно-мембранної системи часто використовуються деякі розширені підходи до відбору зразків, як-от керована молекулярна динаміка (steered MD, SMD), парасольковий відбір, метадинаміка та методи обміну репліками (umbrella sampling, metadynamics, and replica exchange methods). SMD зазвичай прискорює процес, забезпечуючи зовнішній керуючий потенціал або силу для переміщення системи по визначеному шляху [1], а в системі пептид-мембрана SMD переважно використовується для протягування пептидів через мембрану для прискорення процесу проникнення. Були проаналізовані методи молекулярної динаміки використані для дослідження мембранопроникних пептидів, описані в літературі (Табл. 1).

Табл. 1 Літературні дані щодо застосування різних методів молекулярної динаміки для вивчення пептидів

Метод MD	Особливості	Приклади використання	Переваги	Недоліки
Атомістична молекулярна динаміка	Неупереджена часова еволюція атомів у молекулярній системі	Для дослідження пептидів, що міжфазно взаємодіють з ліпідним бішаром; Якщо є попередні знання, то може використовуватися для підтвердження результатів;	Конфігурації зразків базуються на силових полях та стартових координатах; Просто аналізувати;	Висока computational вартість; Проблема ковергенції; Малоймовірно відобразити всі транслокаційні події;

HT-MD	Здійснення моделювання при фіксованій температурі	Для вивчення відомих термостабільних спіралей	Пришвидшує проникнення пептиду у мембрану; Пептид здатний кілька разів перемикається між термодинамічними мінімумами, що дозволяє екстраполювати рівняння Арреніуса для розрахунку енергетичних бар'єрів при відповідних температурах;	Нереалістична динаміка пептиду у воді; Силкові поля не були параметризовані або протестовані при високих температурах; Потрібно довести термостабільність пептидів мембрани з використанням експериментальних підходів, щоб переконатися, що симуляція зразків відповідає відповідним станам;
Керована атомістична молекулярна динаміка		Щоб забезпечити початкові конфігурації для парасолькового відбору: пептиду, що	Може проштовхувати пептид через подвійний ліпідний шар; Прискорює транслокацію;	Нерівноважна динаміка; Повільні зміни в конформації пептиду під час його взаємодії з мембраною будуть упущені;

		проходить через мембрану; пептидів, що об'єднуються під час агрегації;		
Umbrella sampling		Для відбору пептиду, що рухається через бішар; Для відбору пептидів, що ідуть разом під час агрегації;	Збільшує вибірку вздовж координати реакції; Змушує систему відбирати несприятливі ділянки енергетичного ландшафту (energetic landscape);	Часто потрібно багато вікон Umbrella sampling, що призводить до великих обчислювальних витрат;
Метадинамік а	Змусити систему відбирати невіддані ділянки енергетичного ландшафту, додавши зміщення, що	Для відбору пептиду, що рухається через бішар; Для відбору подій фолдингу пептидів;	Збільшує вибірку вздовж координати реакції; Змушує систему відбирати несприятливі	Важко вибрати інші параметри, наприклад, висоту або ширину енергетичного зміщення та швидкість, з якою зміщення додається;

	залежить від історії;		ділянки енергетичного ландшафту;	Важко знати, коли всі області енергетичного ландшафту досліджені;
Метод обміну копій	Симуляція копій системи паралельно, масштабуючи властивості (наприклад, температуру чи енергію взаємодії) копій вищого порядку, щоб забезпечити більшу вибірку.	Для відбору подій згортання пептидів; Для відбору подій агрегації пептидів;	Неупереджено збільшує конформаційну вибірку;	Використання кількох копій призводить до збільшення обчислювальних витрат;
Грубозерниста МД	Моделювання груп атомів як кульок взаємодії.	Вивчення великих пептидно-ліпідних систем протягом більш тривалого часу	Зменшена обчислювальна вартість; Може вивчати великі системи та тривалий час;	Нижча роздільна здатність; Енергетичний ландшафт згладжується, тому кінетика масштабується непередбачуваним чином; Параметризація та нереалістичне

				групування атомів можуть призвести до артефактів;
Неявна мембрана	Моделювання розчинника і подвійних шарів суцільного середовища.	Вивчення поведінки пептиду при його взаємодії із середовищами з різною діелектричною проникністю.	Обчислювальні витрати значно зменшені;	Надмірне спрощення мембрани; Важливі атомістичні взаємодії нехтуються;

Щоб краще розвивати та оптимізувати стратегії застосування CPP, важливо розуміти механізми клітинного поглинання CPP. Усі CPP розділяють деякі спільні властивості щодо клітинного проникнення, проте різні пептиди мають різні моделі взаємодії із мембранами, мембранні відповіді викликані проникненням пептидів та транслокаційні механізми (Рис.1.4).

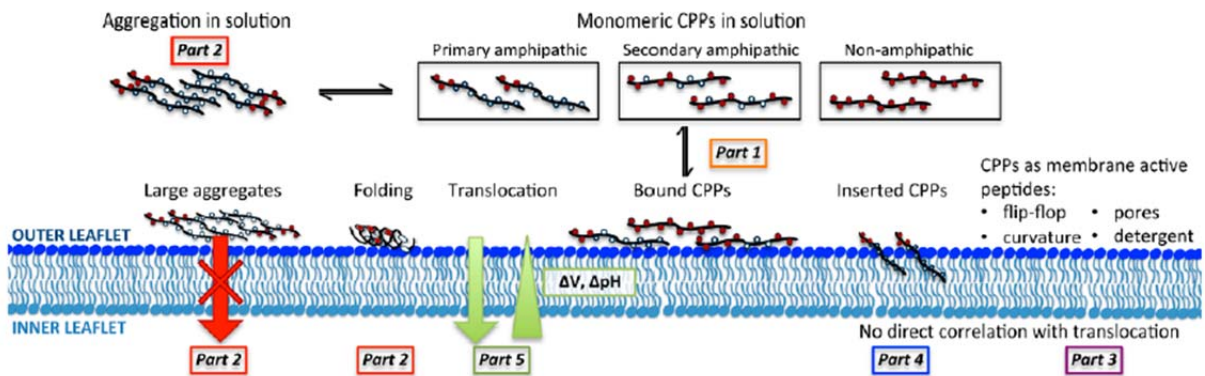


Рис.1.4 Різні механізми взаємодії CPP з мембраною [11]

Взаємодія між CPP і мембраною може виникати через різні ефекти: електростатичні взаємодії, гідрофобні взаємодії та водневі зв'язки. Крім того, залежно від умов експерименту, більшість CPP можуть проникати в клітини різними шляхами. Хоч зараз і існує безліч експериментальних методів для

дослідження запропонованого механізму інтерналізації CPP і різноманітних теоретичних моделей, досі необхідно перевірити ці висновки та дослідити механістичні деталі з точки зору моделювання. MD-симуляції дають змогу зрозуміти взаємодії пептид–мембрана, допомагають нам глибоко проаналізувати динаміку процесів інтерналізації, надають інформацію про заряд, водневі зв'язки, орієнтацію та спіральні властивості пептидів, які можуть бути точними до конкретних залишків, і демонструють важливість певні специфічні залишки або події під час проникнення.

Загалом, CPP не мають гомологій послідовностей, і різні залишки та розташування послідовностей можуть відігравати певну роль у процесі проникнення. Ця структурна різноманітність зумовлює різні моделі поглинання. У більшості механізмів поглинання CPP звичайним початковим етапом є електростатична взаємодія позитивно заряджених CPP з негативно зарядженими компонентами мембрани, як-от фосфатні групи, що впливає на організацію молекул ліпідів і призводить до збурення мембрани. Повідомлялося: ефективне проникнення CPP вимагає принаймні восьми позитивних зарядів [1]. Добре відомо, що позитивно заряджені залишки аргініну відіграють важливу роль у процесі поглинання завдяки сильній взаємодії між гуанідиною групою Arg і фосфатними групами ліпідів, тобто утворенню бідентатних водневих зв'язків та електростатичних взаємодій між гуанідиновими і сульфатними, фосфатними або карбоксилатними фрагментами мембрани, поліаргінінові CPPs можуть більш ефективно перетинати мембрану. Ця сильна взаємодія дестабілізує упаковку ліпідів і спотворить структуру мембрани, а заряджені амінокислотні залишки направляють молекули води в гідрофобне ядро ліпідного подвійного шару, індукуючи у такий спосіб гідрофільні пори в мембрані та полегшуючи перенесення CPP. Як ми знаємо, антимікробні пептиди здатні транслокуватися через мембрану та утворювати стабільні пори на рівні мілісекунд під час транслокації [1]. Збагачені аргініном CPP можуть також утворювати короткоживучий гідрофільний канал у плазматичній мембрані клітин під час транслокації [1]. Було вивчено взаємодію

пенетратину та Tat пептидів з DPPC та DOPC фосфоліпідними подвійними шарами за допомогою MD моделювання за нижчого співвідношення пептиду до ліпиду 1:64 [1]. На відміну від інших робіт з використанням молекулярної динаміки, трансмембранних пор не спостерігалося, що свідчить про те, що утворення пор може бути викликане лише за перевищення певного порогу концентрації.

Рисунок (Рис. 1.3) ілюструє загальну концепцію дизайну, яка була використана для конструювання молекул. Основна ідея полягала в тому, щоб обмежити дві короткі лінійні поліпептидні нитки між двома витками, один з яких є фрагментом DAE, а інший – мотивом β -витка D-Xxx-L-Pro (D-Xxx є α -D-амінокислотою, залишок, наприклад, D-Тур). В якості вантажу було вибрано отриману флуоресцеїнову похідну (використану пізніше як флуоресцентний репортер поглинання клітиною), який був приєднаний через ковалентний лінкер до тирозилового кисню в β -повороті. (Рис. 1.5) Добре відомо, що флуоресцеїн як вантаж CPP може перешкоджати проникності клітин, але він приєднаний до пептиду через досить довгий і стабільний лінкер, щоб принаймні уникнути стеричного впливу на фрагмент пептиду.

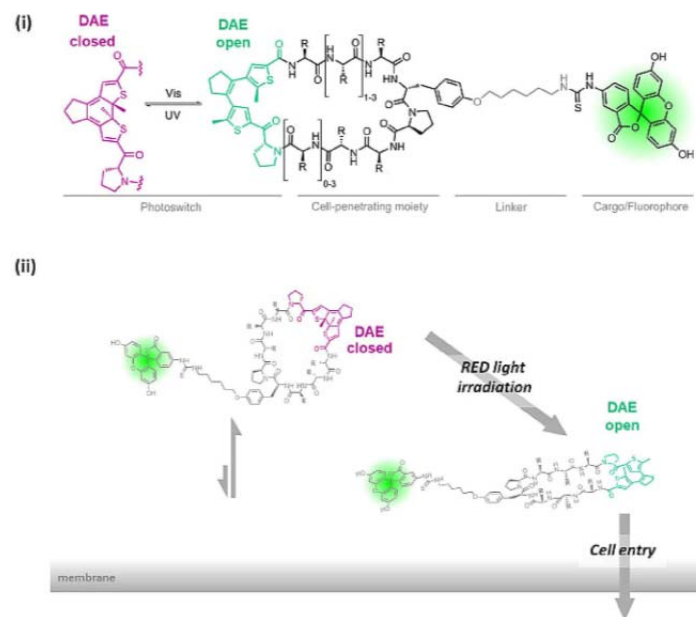


Рис. 1.5 Структурний темплат досліджених CPP і ii) загальна концепція їх використання як CPP, що запускаються червоним світлом. Загальна кількість амінокислот у фрагменті, що проникає в клітину, і бічних ланцюгах

змінюється. Усі пептиди містять частину, отриману від флуоресцеїну (як флуорофор), з'єднану через аміногексильований бічний ланцюг тирозину (лінкер) для відстеження поглинання клітиною. Усі скелетні циклізовані пептиди створені для утворення β -шпилькових структур. Фрагмент, що містить фотоперемикач (кольоровий), імітує блок β -повороту.

Також повідомлялося, що протеолітично стабільні та відносно жорсткі циклічні олігоаргініни є кращими CPP, ніж їхні гнучкі лінійні аналоги [2]. Згідно з цим спостереженням, інше дослідження продемонструвало, що жорстко орієнтовані бічні ланцюги, що несуть гуанідинієві групи, можуть посилити поглинання [2] олігоаргінін-подібного полікатіонного CPP, за умови, що відстані між позитивними зарядами всередині пептидоміметика відповідають відстані між негативними зарядами.

Розділ 2

Експериментальна частина

Визначення та побудова структури мембранопроникних пептидів

Амінокислотні послідовності двох модифікованих МПП, пептиду 1 та пептиду 2 такі: Φ RRFYPNalRR та Φ RRFYRWRR. Де Φ це фотосвіч, Nal це 2-нафтилаланін. Для побудови тривимірної структури було вирішено вже відомого мембранопроникного пептиду, для якого відома кристалічна структура. Таким пептидом виявився Граміцидин С. Граміцидин С (Рис. 2.1) - це антибіотик, ефективний проти деяких грампозитивних і грамнегативних бактерій, а також деяких грибів. Граміцидин С є циклодекапептидом, побудованим у вигляді двох ідентичних пентапептидів, з'єднаних головою до хвоста, формально записаних як $\text{cyclo}(-\text{Val}-\text{Orn}-\text{Leu}-\text{D}-\text{Phe}-\text{Pro}-)_2$.

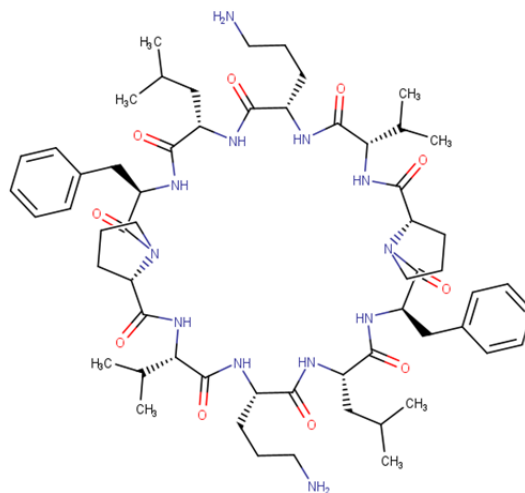


Рис. 2.1 Граміцидин С

Структура пептиду 1 (Рис. 2.2) та 2 (Рис. 2.3) була побудована шляхом заміни амінокислотних залишків в структурі Граміцидину С на амінокислотні залишки 1 та 2 відповідно. Фотосвіч був поміщений на місці бетта-повороту. Утворені структури 1 та 2 були мінімізовані в силовому полі. Силове поле було обрано OPLS3e [15], розчинник – вода.

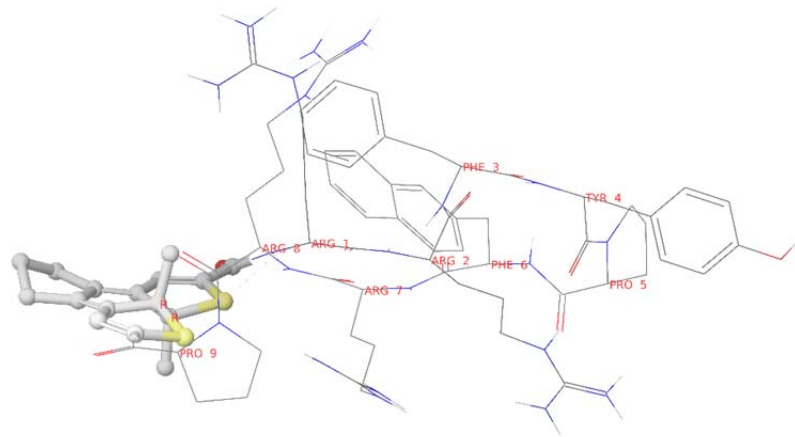


Рис.2.2 Структура Пептиду 1 у закритій формі

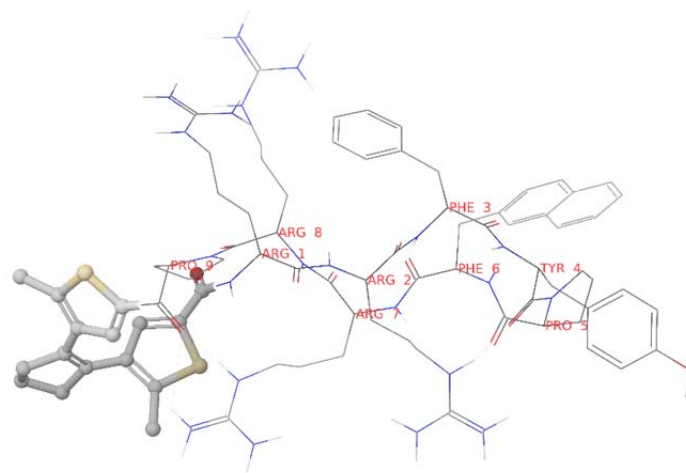


Рис.2.3 Структура Пептиду 2 у закритій формі

Пептиди мають конформацію антипаралельного β -листа.

Пептид 1 у відкритій формі утворює внутрішньомолекулярні водневі зв'язки між PRO9-ARG7 і ARG2-TYR4. Два залишки аргініну розташовані з одного боку площини пептиду, інші два залишки аргініну - з іншого. Міжмолекулярні зв'язки між ARG1 і ARG8 не утворюються через стеричні ускладнення, викликані об'ємним фотосвічем, а також через розташування карбонільної групи ARG1 назовні від площини пептиду. У водному середовищі

пептид частково зберігає свою конформацію і залишається стабільним. Пептид 2 за структурою подібний до пептиду 1, але відрізняється одним амінокислотним залишком. Закрита форма пептидів є менш впорядкованою порівняно з відкритою. Пептид 1 у закритій формі утворює внутрішньомолекулярні водневі зв'язки між PRO9 і ARG7. Закрита форма значно відрізняється від нативної. У мембрані пептид зберігає більш впорядковану структуру, тоді як у воді повністю змінює конформацію і стає неупорядкованим. У мембрані пептид утворює два міжмолекулярних водневих зв'язки.

Щоб якісно охопити хімічний простір, OPLS3e використовує на порядок більше довідкових даних і пов'язаних типів параметрів порівняно з іншими широко використовуваними силовими полями малих молекул. Як наслідок, OPLS3e досягає високого рівня точності в тестах продуктивності, які оцінюють конформаційні схильності та сольватацію малих молекул.

Структури пептидів було мінімізовано за допомогою методу PRCG (Polak-Ribier Conjugate Gradient) [16]. Алгоритм Полака–Ріб'єра–Поляка (PRCG) є одним із найстаріших і найпопулярніших алгоритмів спряженого градієнта для вирішення нелінійних задач необмеженої оптимізації.

Побудова системи з мембраною для молекулярної динаміки

Мінімізовані структури пептидів 1 та 2 у відкритій та закритій формі бралися для побудови системи для молекулярної динаміки. Було вирішено зробити симуляцію пептидів в мембрані та в воді та порівняти їх структури протягом траєкторій. Була обрана POPC (Рис. 2.4) модель мембрани. POPC модель мембрани симулює мембрану еукаріотичних клітин. POPC (1-пальмітоїл-2-олеоїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін) є фосфатидилхоліном. Це фосфоліпід діацилгліцерину. Це важливий фосфоліпід для біофізичних експериментів і використовувався для вивчення різних предметів, таких як ліпідні плоти. POPC також використовується в системах, що імітують клітинну мембрану, таких як нанодиски. Він комерційно доступний і природним чином присутній у мембранах еукаріотичних клітин.

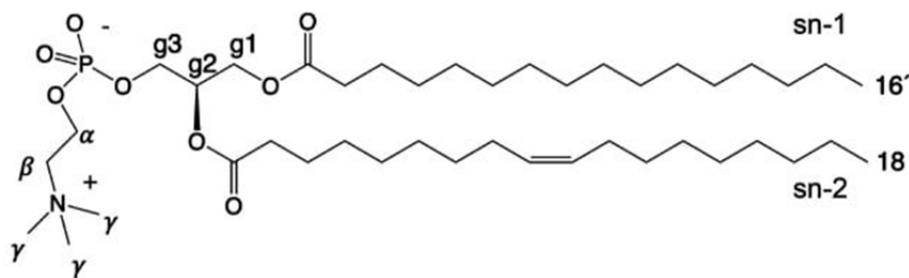


Рис. 2.4 1-пальмітоїл-2-олеїл-*sn*-гліцєро-3-фосфохолін

За допомогою System Builder на вкладці Set Up Membrane обрали мембрану POPC. Пептид знаходиться всередині мембрани вертикально. Мембрана оточена водою. Була обрана TIP3P модель води. До води додана NaCl в концентрації 0.15M, що симулює природне середовище у плазмі крові та у клітинах (Рис. 2.5).

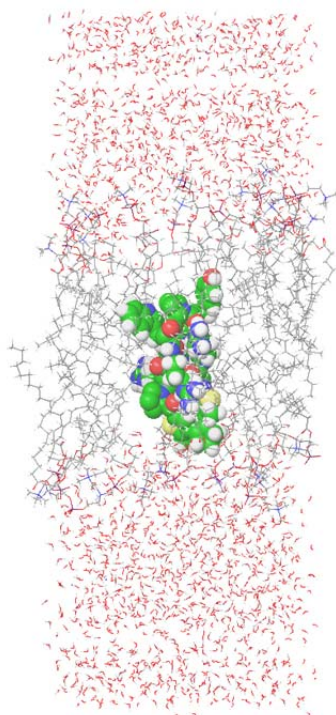


Рис. 2.5 Пептид 2 у відкритій формі у мембрані POPC

Молекулярна динаміка

Молекулярна динаміка побудованих систем пептидів 1 та 2 у відкритій та закритій формах рахувалася за допомогою модуля Desmond в програмі Schrodinger [17,18]. Час симуляції 100 нс, що є достатнім для врівноваження

такої невеликої молекули, як циклічний пептид який складається із десяти амінокислот. Температура була обрана 300K, тиск в 1 атм, ансамбль NPT.

Перед стартом симуляції був задіяний стандартний протокол релаксації системи в Desmond [17,18].

RMSD - (root mean square deviation) середньоквадратичне відхилення у молекулярній динаміці є мірою середньої відстані між атомами (зазвичай атомами ланцюга) накладених молекул. При вивченні конформацій глобулярних білків зазвичай вимірюють подібність тривимірної структури за допомогою середньоквадратичного значення атомних координат $C\alpha$ після оптимальної суперпозиції твердого тіла.

Коли динамічна система коливається навколо певної чітко визначеної середньої позиції, RMSD від середнього за час може називатися RMSF або середньоквадратичним коливанням. RMSF (Root Mean Square Fluctuation) є мірою середнього відхилення атомних положень від їх середнього положення з часом у молекулярно-динамічному моделюванні. Це надає інформацію про гнучкість і динаміку структури. Розмір цього коливання можна виміряти, наприклад, за допомогою мессбауерівської спектроскопії або ядерного магнітного резонансу, і він може надати важливу фізичну інформацію. Індекс Ліндемана — це метод розміщення RMSF у контексті параметрів системи.

Широко використовуваним способом порівняння структур біомолекул або твердих тіл є переміщення та обертання однієї структури відносно іншої для мінімізації середньоквадратичного значення. Coutsias та ін. представив простий висновок, заснований на кватерніонах, для оптимального перетворення твердого тіла (обертання-трансляції), який мінімізує середньоквадратичне відхилення між двома наборами векторів [19]. Вони довели, що метод кватерніонів еквівалентний відомому алгоритму Кабша [20]. Розв'язок, наданий Кабшем, є прикладом розв'язку d-вимірної проблеми, введеної Герлі та Кеттеллом [19]. Кватерніонне рішення для обчислення оптимального обертання було опубліковано в додатку до статті Петіджана [20]. Цей кватерніонний

розв'язок і розрахунок оптимальної ізометрії в d -вимірному випадку були розширені до нескінченних множин і до безперервного випадку в додатку А іншої статті Петіджана [21].

Аналіз результатів молекулярної динаміки

Дослідження поведінки пептидів у різних середовищах є важливим для розуміння їх функціональних властивостей. У даній роботі було проаналізовано пептид 1 та пептид 2 у закритій та відкритій формах за допомогою методів молекулярної динаміки.

На початку та в кінці траєкторії пептид 1 у закритій формі в мембрані було досліджено за допомогою графіків RMSD та RMSF. RMSD (root mean square deviation) – це середньоквадратичне відхилення у молекулярній динаміці, яке є мірою середньої відстані між атомами накладених молекул. Коли динамічна система коливається навколо певної середньої позиції, RMSD від середнього за час може називатися RMSF (root mean square fluctuation) або середньоквадратичним коливанням.

Аналіз графіку RMSD для закритої форми пептиду 1 у POPC мембрані показав, що конформація не є стабільною і значно відрізняється від нативної. Графік RMSD не досягає плато, що свідчить про те, що система не повністю врівноважена. Це може вказувати на триваючі структурні перебудови, коливання або переходи в біомолекулярній системі (Рис. 2.6).

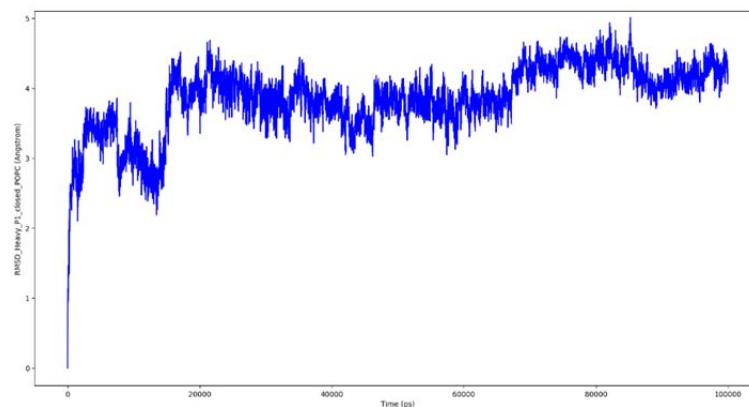


Рис. 2.6 Графік RMSD для пептиду 1 у закритій формі у мембрані POPC

Графік RMSF виявив ділянки біомолекули, які мають вищий рівень гнучкості або флуктуації. Ці області часто відповідають петлям, гнучким сегментам або областям, відкритим для розчинника. Було помічено піки на графіку RMSF для закритої форми пептиду 1 у POPC мембрані для залишків ARG2, PHE6, ARG8. Спостережувані коливання ARG2, PHE6 і ARG8 можуть свідчити про їх участь у динамічних взаємодіях із сусідніми молекулами 1-пальмітоїл-2-олеїл-sn-гліцеро-3-фосфохоліну (Рис.2.7).

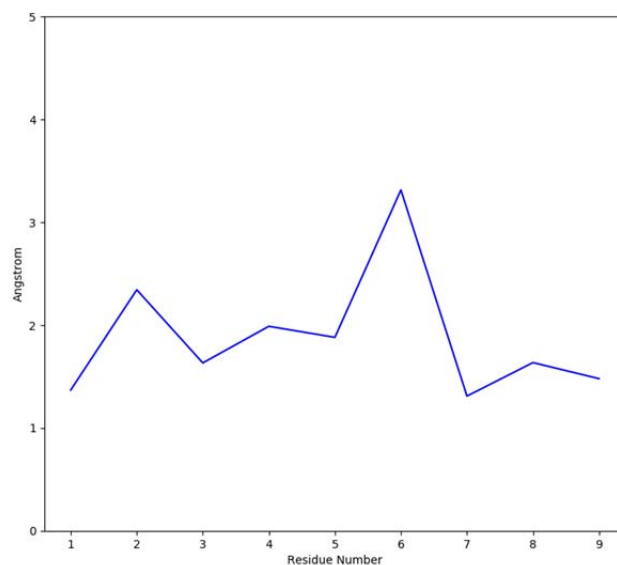


Рис.2.7 Графік RMSF для пептиду 1 у закритій формі у мембрані POPC

Графік водневих зв'язків ілюструє динаміку їх кількості у системі протягом траєкторії. Більшу частину часу спостерігається наявність одного водневого зв'язку, а на певних доволі тривалих відрізках часу усі водневі зв'язки розірвані, що свідчить про те, що система не є стабільною та втрачає структуру бета-листа (Рис.2.8).

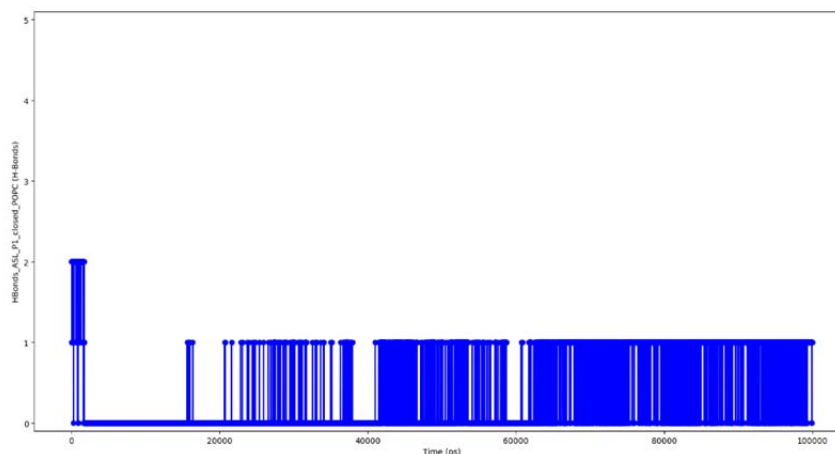


Рис.2.8 Діаграма водневих зв'язків для пептиду 1 у закритій формі у мембрані POPC

На початку та в кінці траєкторії було вивчено поведінку пептиду 1 у відкритій формі в мембрані. У відкритій формі пептид 1 розташовувався близько до центру мембрани, при цьому залишки аргініну перебували всередині мембрани. З часом спостерігалось поступове виходження пептиду на зовнішню сторону мембрани за допомогою фотосвітчів та ліпофільних залишків. Процес виходження з мембрани у водну фазу відбувався частково, при цьому пептид взаємодіяв з поверхнею мембрани.

Аналіз графіку RMSD для відкритої форми пептиду в мембрані показує, що ця конформація виявляє більшу стабільність протягом траєкторії порівняно із закритою формою. Це підтверджується меншою амплітудою коливань між мінімальним та максимальним значеннями на графіку в порівнянні з аналогічним графіком для закритої форми (Рис.2.9).

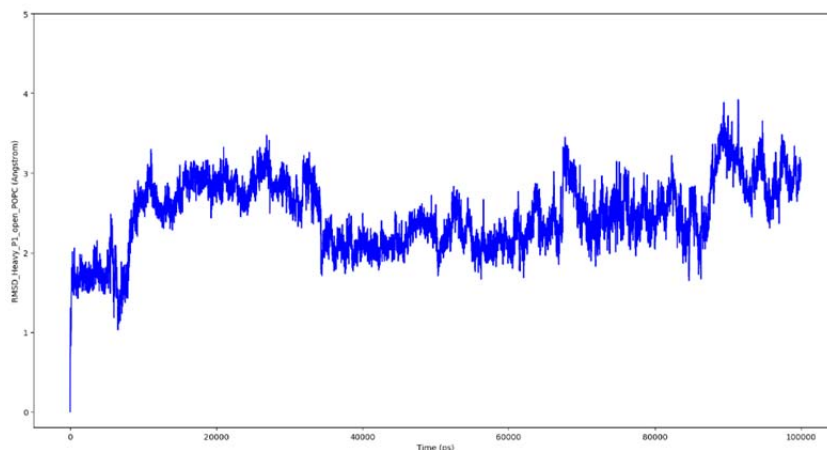


Рис.2.9 Графік *RMSD* для пептиду 1 у відкритій формі у мембрані *POPC*

Аналіз графіку *RMSF* показує, що амінокислотні залишки відкритої форми демонструють меншу мобільність у порівнянні із закритою формою. Це підтверджується тим, що максимальне значення *RMSF* для PHE6 знаходиться на нижчому рівні (Рис.2.10).

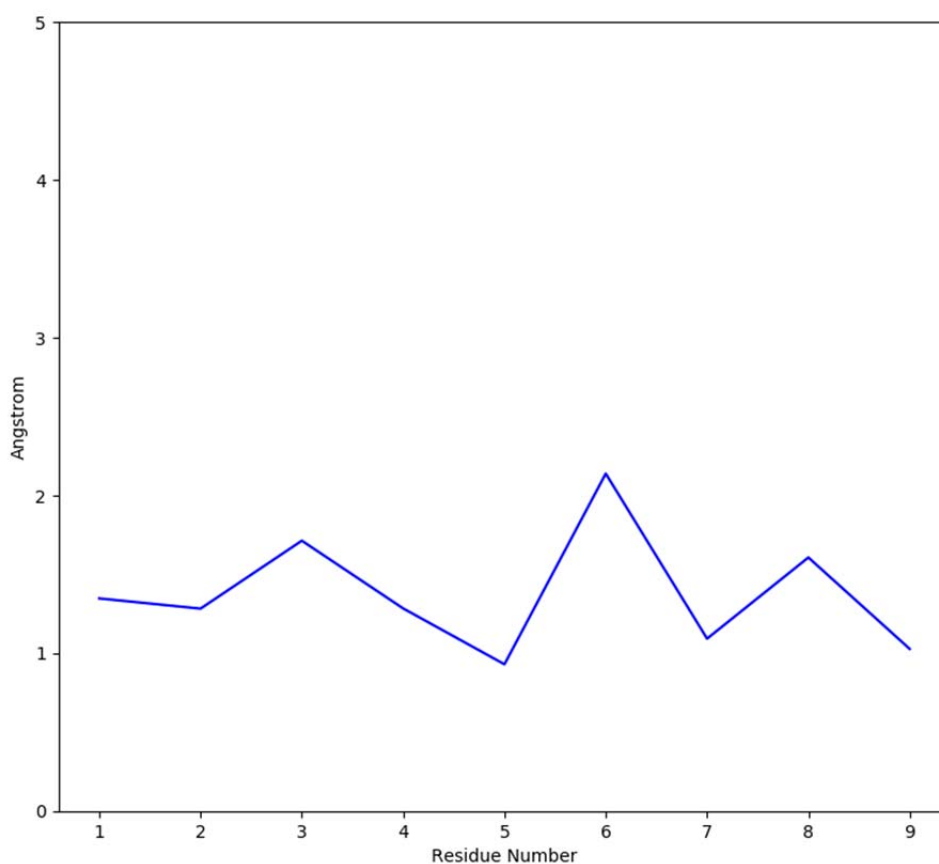


Рис.2.10 Графік *RMSF* для пептиду 1 у відкритій формі у мембрані *POPC*

Графік (Рис.2.11) ілюструє динаміку кількості водневих зв'язків у системі протягом траєкторії. Більшу частину часу можна спостерігати наявність двох водневих зв'язків, на певних ділянках їх кількість зростає до трьох, а ділянок, де водневі зв'язки повністю розірвані, значно менше порівняно із закритою формою пептиду.

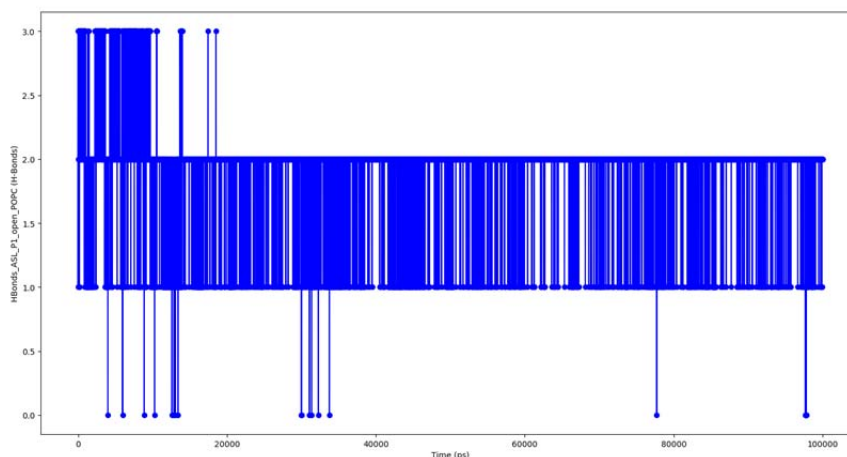


Рис.2.11 Діаграма водневих зв'язків для пептиду 1 у відкритій формі у мембрані POPC

Було досліджено поведінку пептиду 2 у закритій формі в мембрані на початку та в кінці траєкторії. Аналіз графіку RMSD для закритої форми пептиду 2 у мембрані показав, що система виявляє значну гнучкість, проте різниця в цих змінах менш помітна порівняно з аналогічною формою пептиду 1 (Рис. 2.12).

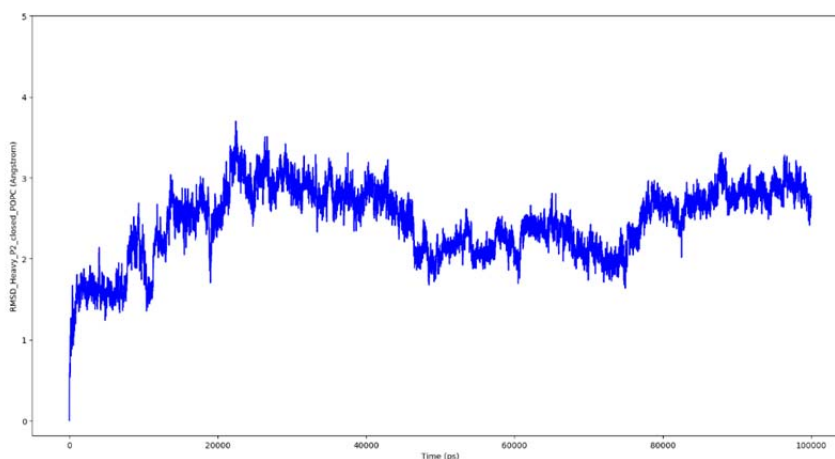


Рис. 2.12 Графік RMSD для пептиду 2 у закритій формі у мембрані POPC

Аналіз графіка RMSF показує, що амінокислотні залишки пептиду 2 у відкритій формі проявляють меншу мобільність, ніж у закритій формі пептиду 1 (Рис. 2.13).

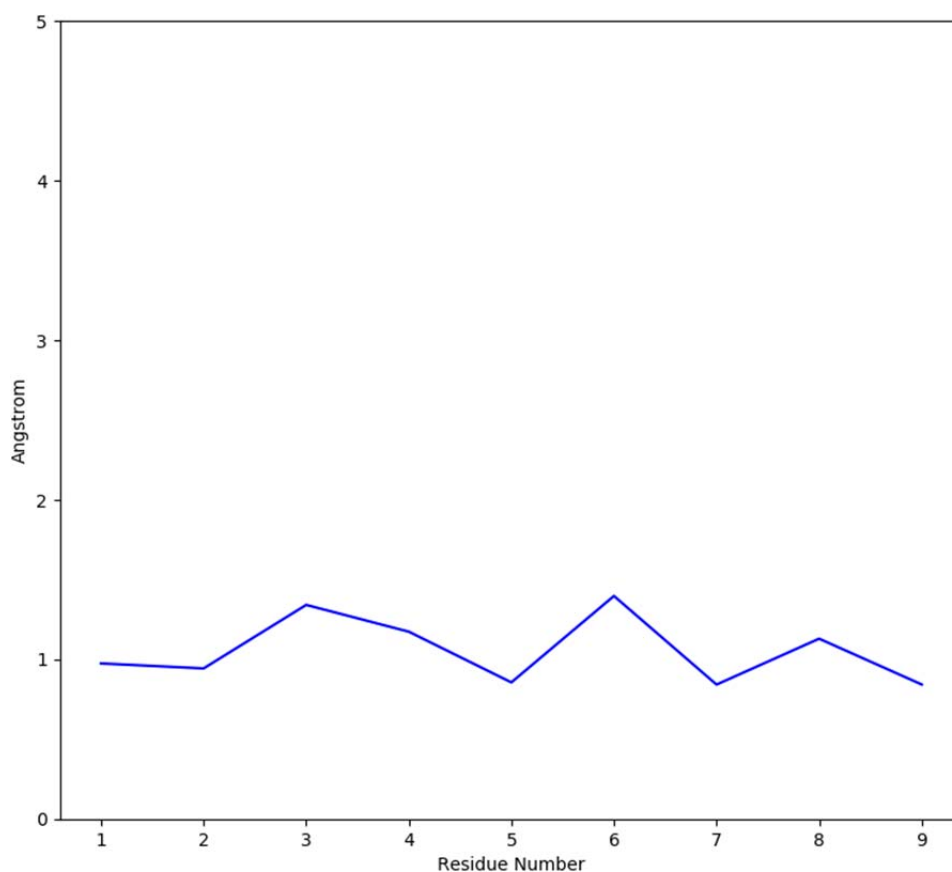


Рис. 2.13 Графік RMSF для пептиду 2 у закритій формі у мембрані POPC

Протягом більшої частини часу в системі спостерігалось наявність двох водневих зв'язків, рідко траплялися моменти, коли всі водневі зв'язки розривалися (Рис. 2.14).

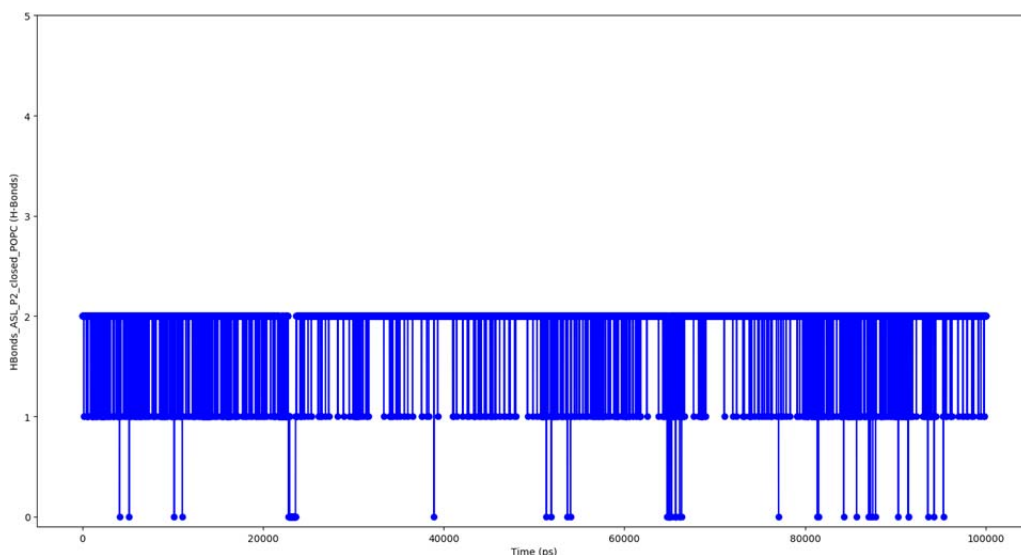


Рис. 2.14 Діаграма водневих зв'язків для пептиду 2 у закритій формі у мембрані POPC

Було проаналізовано вигляд пептиду 2 у відкритій формі в мембрані на початку та в кінці траєкторії.

Менша різниця між екстремумами на графіку RMSD для пептиду 2 у відкритій формі вказує на меншу змінливість або коливання в системі протягом часу. Це може свідчити про більшу стабільність конформації або меншу динамічність молекулярної системи (Рис. 2.15).

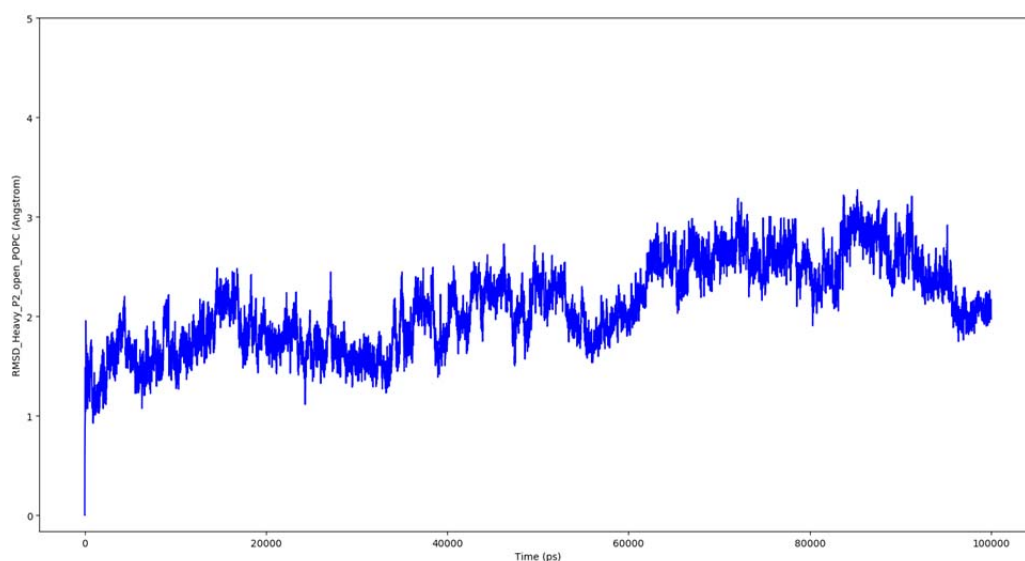


Рис. 2.15 Графік RMSD для пептиду 2 у відкритій формі у мембрані POPC

Графік RMSF для пептиду 2 у відкритій формі показує меншу мобільність амінокислотних залишків, причому найбільш рухливим є 4-ий залишок, на відміну від 6-го у закритій формі пептиду 2 та у закритій і відкритій формах пептиду 1 (Рис. 2.16).

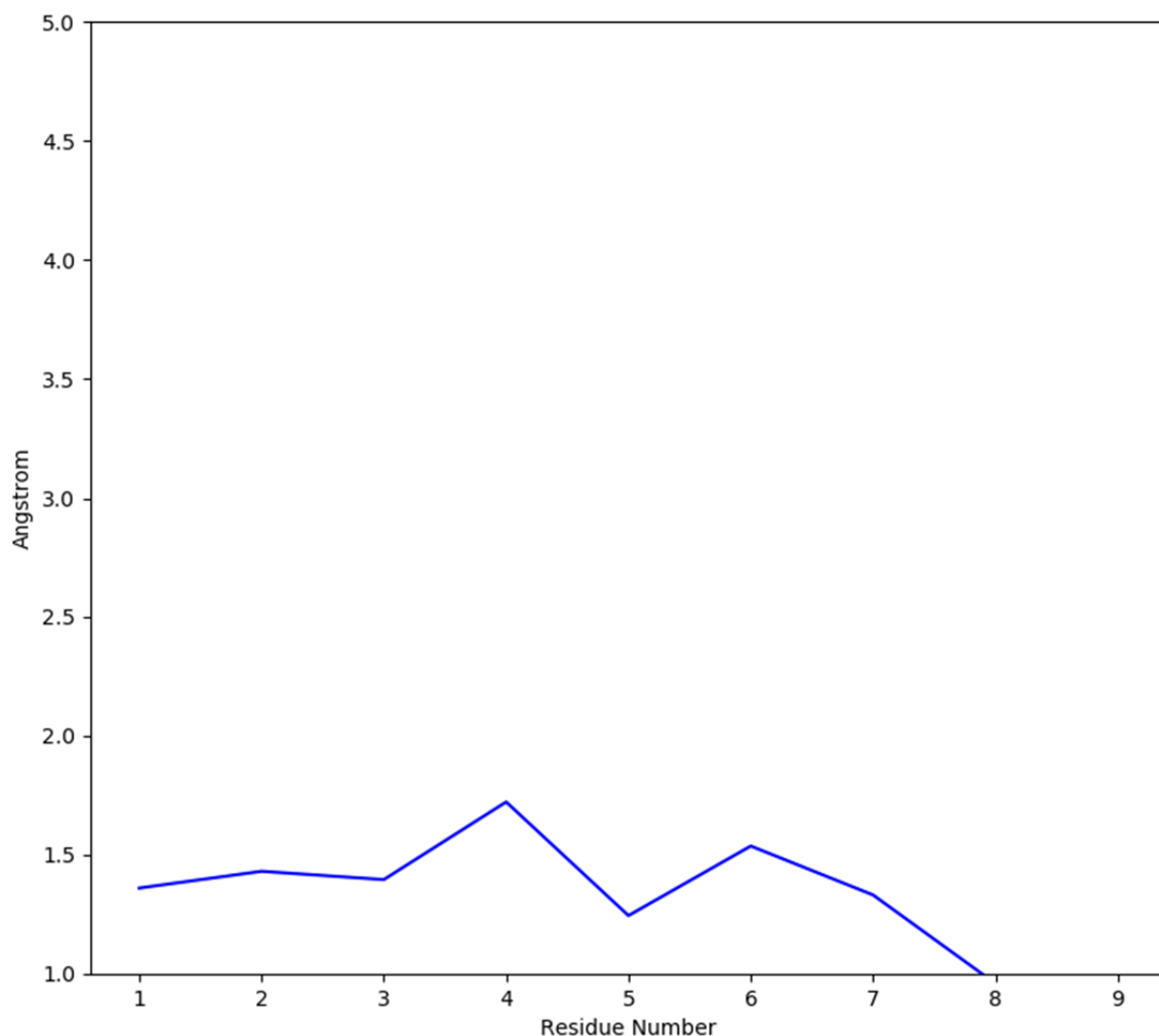


Рис. 2.16 Графік RMSF для пептиду 2 у відкритій формі у мембрані POPC

Діаграма водневих зв'язків у відкритій формі пептиду 2 у мембрані POPC показує, що на значному проміжку часу кількість водневих зв'язків становить 3, що помітно відрізняється від закритої форми пептиду 2, для якої кількість водневих зв'язків не перевищує 2 (Рис.2.17).

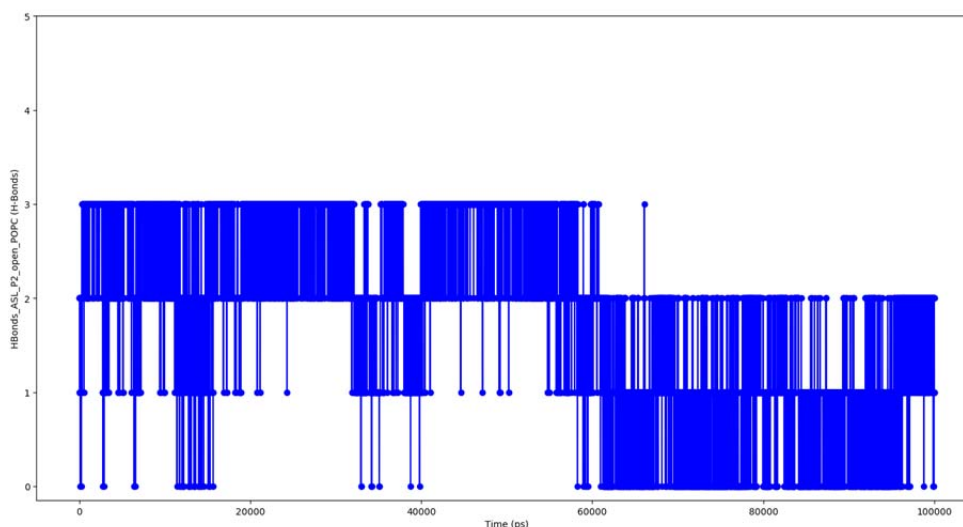


Рис. 2.17 Діаграма водневих зв'язків для пептиду 2 у відкритій формі у мембрані POPC

Аналіз вигляду пептиду 1 у закритій формі у воді на початку та наприкінці траєкторії показує, що на кінці траєкторії структура є значно менш впорядкованою. Графік RMSD для закритої форми пептиду 1 у воді демонструє різкий стрибок на початку, що може вказувати на нестабільну конформацію під час запуску симуляції. Подальша висока амплітуда коливань свідчить про значну динамічність системи протягом всієї траєкторії, а відсутність стійкого плато вказує на те, що система не досягла статичного стану протягом проведеної симуляції (Рис.2.18).

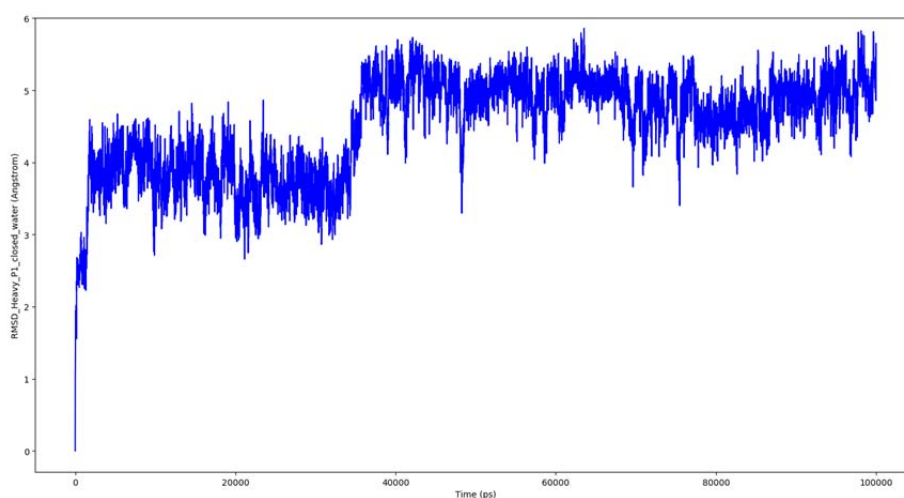


Рис. 2.18 Графік RMSD для пептиду 1 у закритій формі у воді

Графік RMSF для закритої форми пептиду 1 у воді показує, що амінокислотні залишки мають високу рухливість, що свідчить про нестабільність системи (Рис. 2.19).

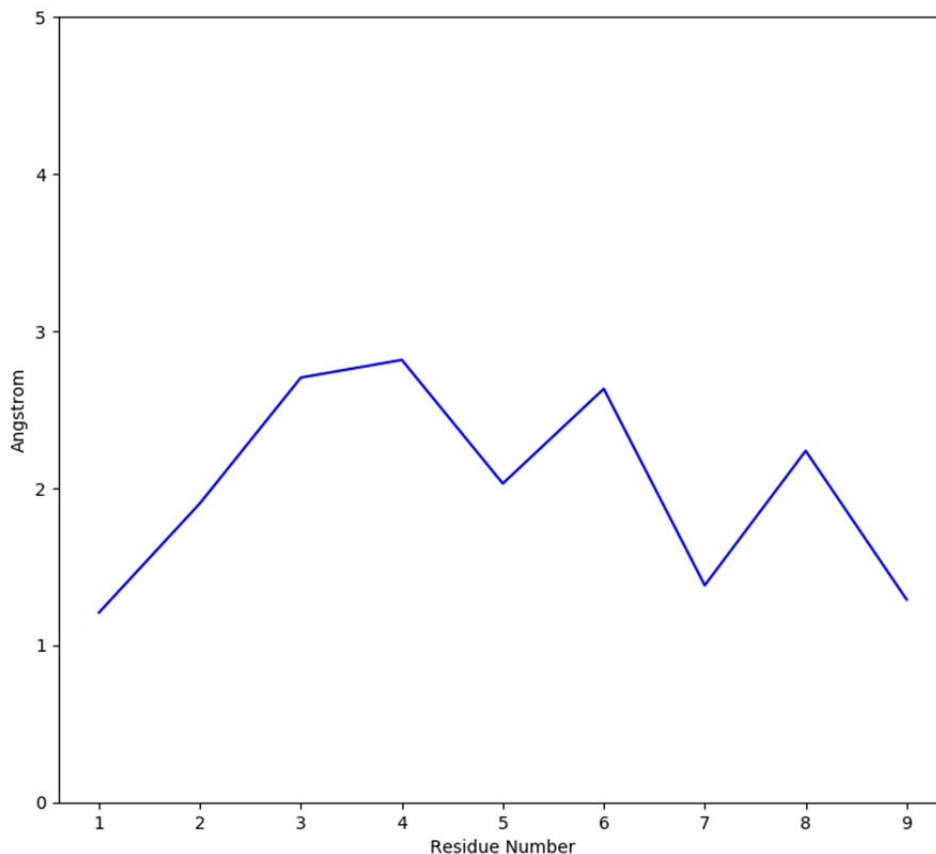


Рис. 2.19 Графік RMSF для пептиду 1 у закритій формі у воді

Діаграма водневих зв'язків для закритої форми пептиду 1 у воді показує, що водневі зв'язки присутні лише на початку траєкторії та повністю руйнуються в ході динаміки (Рис.2.20).

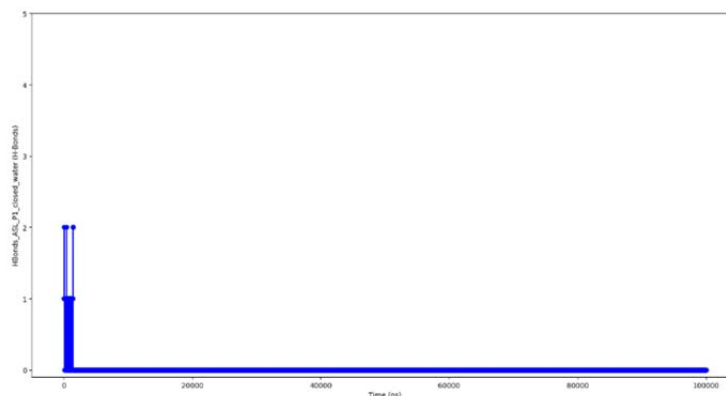


Рис. 2.20 Діаграма водневих зв'язків для пептиду 1 у закритій формі у воді

На початку та кінці траєкторії пептид 1 у відкритій формі у воді зберігає певну структурну стабільність. Коливання графіка RMSD для відкритої форми пептиду 1 у воді свідчать про значну динамічність системи протягом симуляції. Порівняно з іншими графіками, коливання можуть бути більш вираженими, що може вказувати на більшу гнучкість або рухливість молекулярної структури в умовах водного середовища. Проте, відносно менш помітний стрибок на початку траєкторії, порівняно з графіком для закритої форми у воді, може свідчити про меншу структурну перебудову або ініційну реорганізацію системи в початковій фазі симуляції (Рис.2.21).

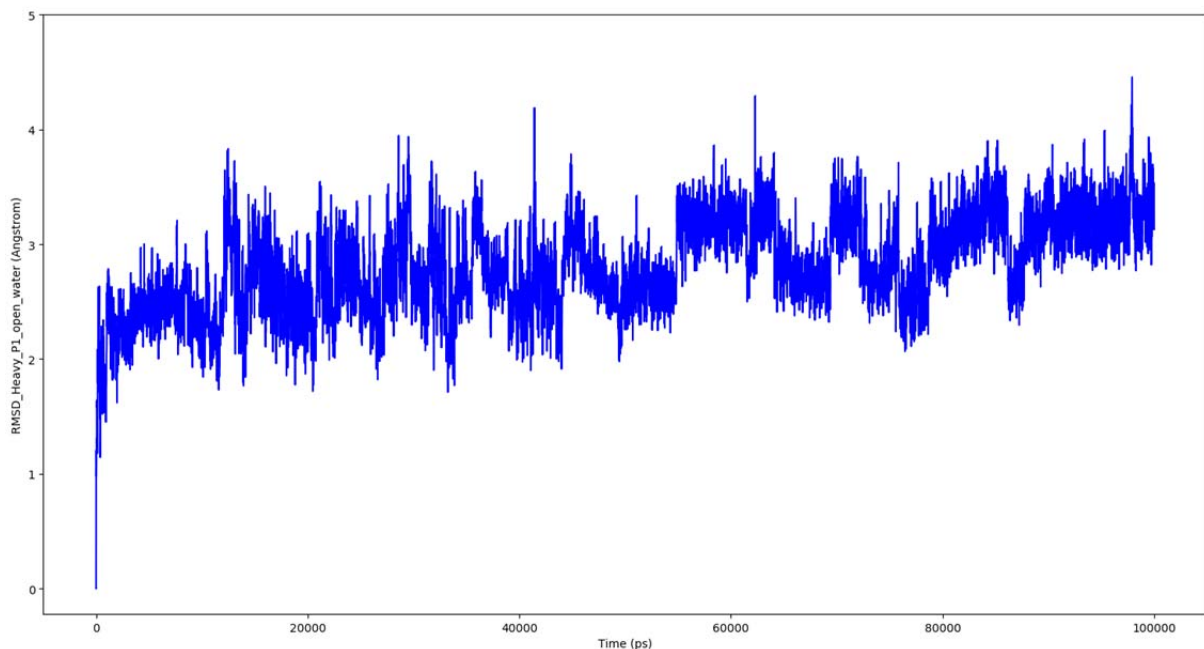


Рис. 2.21 Графік RMSD для пептиду 1 у відкритій формі у воді

У відкритій формі пептиду 1 у воді залишки фенілаланіну та тирозину не проявляють високої рухливості, як у закритій формі, а пролін є ще менш рухливим, ніж у закритій формі, що свідчить про меншу конформаційну рухливість пептиду загалом (Рис.2.22).

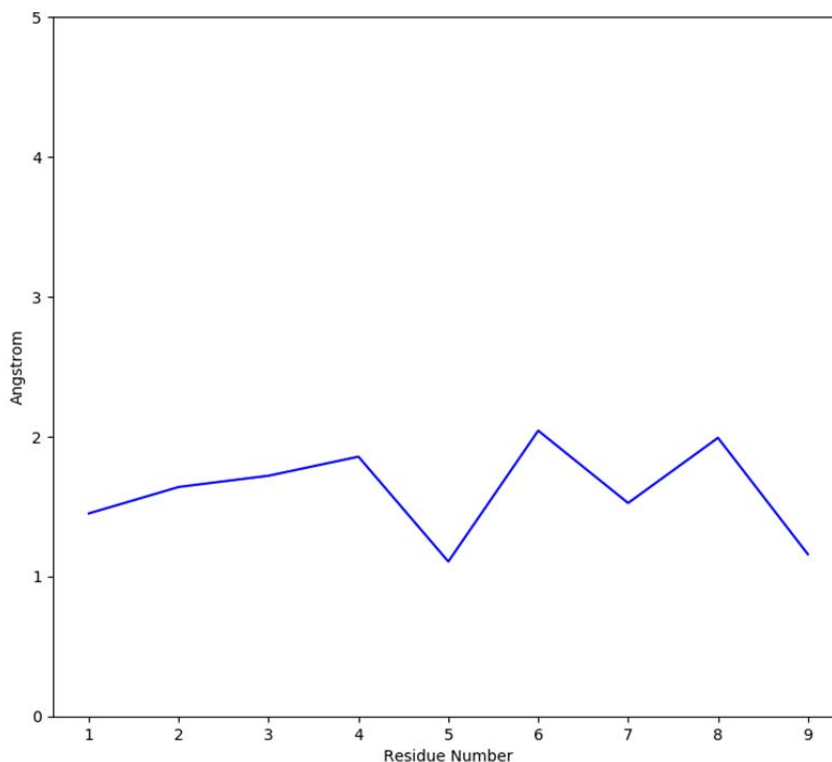


Рис. 2.22 Графік RMSF для пептиду 1 у відкритій формі у воді

Під час молекулярної динаміки у відкритій формі пептиду 1 у водному середовищі спостерігається стабільність водневих зв'язків на більшості проміжків, зазвичай до 2, іноді до 3 або навіть 4 зв'язків. Дуже рідко всі водневі зв'язки руйнуються. У порівнянні, у закритій формі пептиду 1 спостерігається руйнування всіх водневих зв'язків на початку динаміки. Це може вказувати на більшу стабільність та меншу схильність до змін конформації у відкритій формі порівняно зі закритою (Рис.2.23).

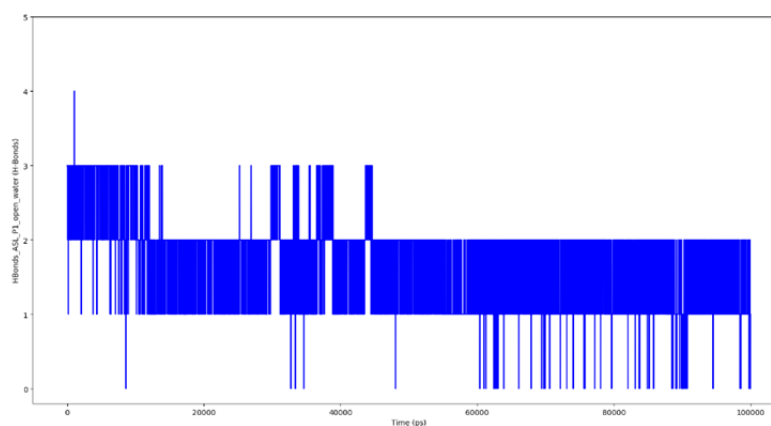
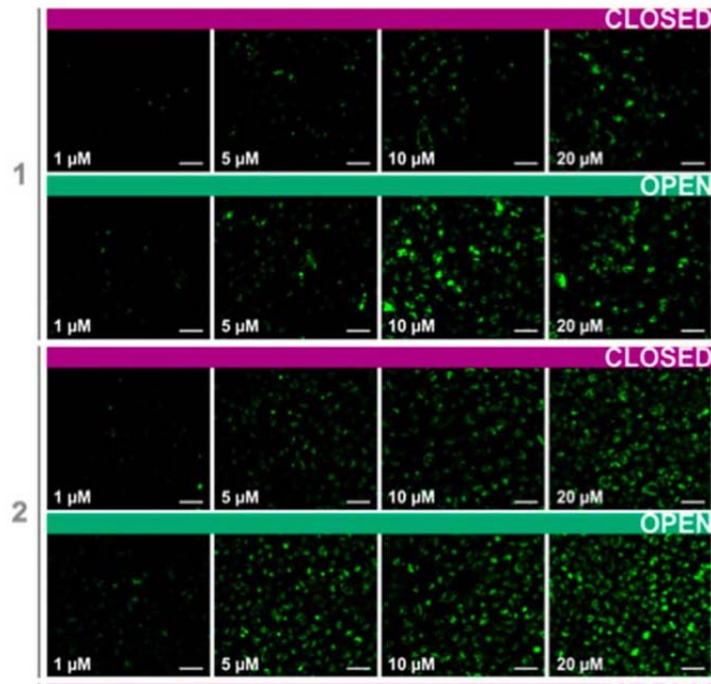


Рис. 2.23 Діаграма водневих зв'язків для пептиду 1 у відкритій формі у воді

Таким чином встановлено, що закрита форма пептидів менш стабільна і більш схильна до конформаційних змін, ніж відкрита форма, що підтверджується високими амплітудами коливань на графіках RMSD та RMSF. Продемонстровано, що у водному середовищі у закритій формі пептиду 1 руйнуються водневі зв'язки, а також пептид демонструє значну рухливість амінокислотних залишків, що свідчить про нестабільність конформації. Відкрита форма пептиду 1 у мембрані проявляє більшу стабільність протягом симуляції, з меншою амплітудою коливань на графіках RMSD та RMSF, а також більш стабільними водневими зв'язками порівняно з закритою формою. Встановлено, що пептид 2, як у закритій, так і у відкритій формах, демонструє меншу рухливість та коливання порівняно з пептидом 1, що вказує на його вищу стабільність у мембранному середовищі. З'ясовано, що відкрита форма пептидів у мембрані має вищу стабільність водневих зв'язків, що зберігаються протягом більшої частини симуляції, на відміну від закритої форми, де водневі зв'язки більшою мірою руйнуються на початку траєкторії.

Отримані дані молекулярної динаміки можуть доповнити раніше отримані дані конфокальної мікроскопії (Рис.2.24). Для пептиду 2, згідно даних конфокальної мікроскопії, не вдалося виявити істотної різниці в поглинанні між закритою і відкритою формами. Проте помітно, що для пептиду 1 спостерігалось збільшення поглинання у відкритій формі. Це може вказувати на те, що структурні зміни, характерні для відкритої форми пептиду 1, сприяють його кращому проникненню в клітини. Результати досліджень методами молекулярної динаміки дозволяють розуміти молекулярні механізми, що лежать в основі цих відмінностей у поглинанні.



*Рис. 2.24 Зображення конфокальної мікроскопії, що демонструють залежне від концентрації поглинання живими клітинами HeLa. Масштабні смужки 50 мкм. Клітини ($1,5 \times 10^4$ на лунку) інкубували протягом трьох годин при 37°C з пептидами у вказаній концентрації, промивали три рази перед додаванням ТВ для гасіння неінтерналізованої флуоресценції. Забарвлені ядра та світлі зображення опущені для ясності. Відкриті форми готували *in situ* зі світлом 590 нм, щоб забезпечити ідентичність концентрацій відповідних фотоформ пептидів.*

Згідно експериментальних даних (Рис. 2.25), флуоресцентна інтенсивність відкритої пептиду 1 була низькою, але для закритої форми виявилася вищою в 3.8 рази. Для відкритої форми пептиду 2 флуоресцентна інтенсивність є в 2 рази вищою ніж для закритої форми. Хоча експериментальні дані і показують значну відмінність у флуоресцентній інтенсивності між відкритою і закритою формою пептидів, симуляції молекулярної динаміки можуть допомогти дослідити молекулярні механізми, які є причиною таких відмінностей.

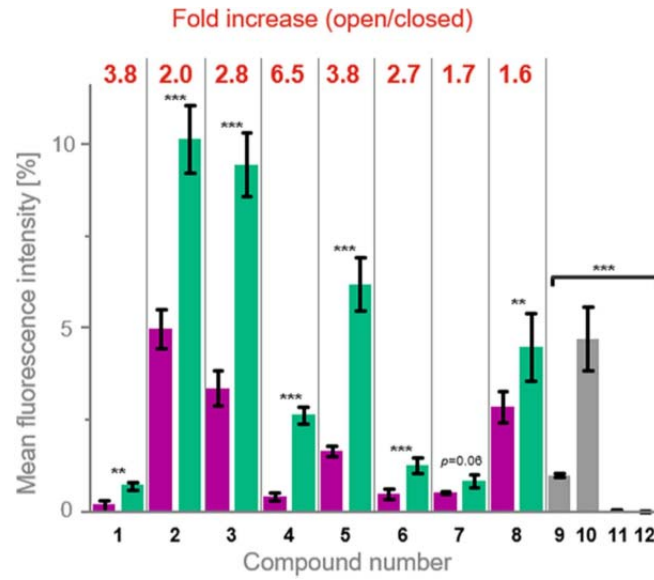


Рис.2.25 Інтенсивність флуоресценції відкритої та закритої фотоформ пептидів 1–12 і співвідношення між відкритою та закритою формами для фотоперемикаючих пептиди 1-8, що проникли в клітини HeLa.

Висновки

1. Дослідження мембранопроникних пептидів показало, що пептиди у закритій формі більш схильні до конформаційних змін і гірше проникають в мембрани, що обмежує їхню ефективність як транспортерів для доставки біоактивних молекул.
2. Пептиди у відкритій формі демонструють кращу стабільність і часткове збереження конформації, тоді як закриті форми пептидів повністю втрачають свою структурну цілісність у водному середовищі.
3. Встановлено, що пептид 1 у відкритій формі поступово виходить з мембрани у водну фазу, частково взаємодіючи з поверхнею мембрани.
4. Було продемонстровано важливу роль конформації пептидів у їх здатності до проникнення через клітинні мембрани. Пептиди у відкритій формі виявилися перспективними кандидатами для використання у доставці ліків та інших біологічно активних молекул у клітини.
5. Застосування молекулярної динаміки для вивчення поведінки мембранопроникних пептидів дозволяє глибше розуміти механізми їхньої взаємодії з мембранами, що може сприяти розробці нових ефективних засобів для внутрішньоклітинної доставки.
6. Отримані результати підкреслюють важливість подальших досліджень у для оптимізації розробки мембранопроникних пептидів та підвищення їхньої ефективності у медичній хімії та фармацевтиці.

Список використаних джерел

1. Recent Advances of Studies on Cell-Penetrating Peptides Based on Molecular Dynamics Simulations Jun Ouyang 1,2, Yuebiao Sheng 2,3,* and WeiWang 2,*
2. J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nature Rev. Drug Discov.* 2006, 5, 993–996; b) A. L. Hopkins, C. R. Groom, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2002, 1, 727–730; c) A. P. Russ, S. Lampel, *Drug Discovery Today*, 2005, 10, 1607–1610; d) R. Santos, O. Ursu, A. Gaulton, A. P. Bento, R. S. Donadi, C. G. Bologna, A. Karlsson, B. Al-Lazikani, A. Hersey, T. I. Oprea, J. P. Overington, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2017, 16, 19–34.
3. Derossi, D.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. Trojan peptides: The penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 1998, 8, 84–87
4. Controlling the Uptake of Diarylethene-Based Cell-Penetrating Peptides into Cells Using Light Tim Schober, Ilona Wehl, Sergii Afonin, Oleg Babii, Anna Iampolska, Ute Schepers, Igor V. Komarov, and Anne S. Ulrich
5. a) A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* 1988, 55, 1189–1193; b) Collado Camps, R. Brock, *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26, 2780–2787.
6. S. Dissanayake, W. A. Denny, S. Gamage, V. Sarojini, *J. Controlled Release* 2017, 250, 62–76.
7. a) R. R. Sawant, N. R. Patel, V. P. Torchilin, *Eur. J. Nanomed.* 2013, 5, 141–158; b) L. Fei, L. P. Yap, P. S. Conti, W. C. Shen, J. L. Zaro, *Biomaterials* 2014, 35, 4082–4087; c) C. Sun, W. C. Shen, J. Tu, J. L. Zaro, *Mol. Pharm.* 2014, 11, 1583–1590; d) H. Cheng, J. Y. Zhu, X. D. Xu, W. X. Qiu, Q. Lei, K. Han, Y. J. Cheng, X. Z. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 6061–16069; e) K. Kurrikoff, M. Gestin, Ü. Langel, *Expert Opin. Drug Delivery* 2016, 13, 373–387.
8. S. A. Bode, D. W. P. M. Löwik, *Drug Discovery Today Technol.* 2017, 26, 33–42.
9. G. Lättig-Tünnemann, M. Prinz, D. Hoffmann, J. Behlke, C. Palm-Apergi, I. Morano, H. D. Herce, M. C. Cardoso, *Nat. Commun.* 2011, 2, 453

10. Cell Penetrating Peptides: Classification, Mechanisms, Methods of Study, and Applications Dr. Alessandro Gori, Dr. Giulia Lodigiani, Dr. Stella G. Colombarolli, Dr. Greta Bergamaschi, Dr. Alberto Vitali, 2023

11. Di Pisa, M.; Chassaing, G.; Swiecicki, J.M. Translocation Mechanism(s) of Cell-Penetrating Peptides: Biophysical Studies Using Artificial Membrane Bilayers. *Biochemistry* 2015, 54, 194–207.

12. a) K. M. Stewart, K. L. Horton, S. O. Kelley, *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 2242–2255; b) M. Pooga, Ü. Langel in *Cell Preserv. Technol.*, (Eds.: Ü.Langel), Springer Science+Business, New York, 2015, pp. 3–28; c) F. Milletti, *Drug Discovery Today* 2012, 17, 850–860; d) V. Biju, T. Itoh, M.Ishikawa, *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 3031–3056; e) T. Serdiuk, I.Bakanovich, V. Lysenko, S. A. Alekseev, V. A. Skryshevsky, S. Afonin, E.Berger, A. Géloën, I. V. Komarov, *RSC Adv.* 2015, 5, 20498–20502.

13. a) Y. Gilad, M. Firer, G. Gellerman, *Biomedicine* 2016, 4, 11; b) V. Le Joncour, P. Laakkonen, *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26, 2797–2806.

14. Bashyal, S.; Noh, G.; Keum, T.; Choi, Y.W.; Lee, S. Cell penetrating peptides as an innovative approach for drug delivery; then, present and the future. *J. Pharm. Investig.* 2016, 46, 205–220.

15. OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules

Katarina Roos, Chuanjie Wu, Wolfgang Damm, Mark Reboul, James M. Stevenson, Chao Lu, Markus K. Dahlgren, Sayan Mondal, Wei Chen, Lingle Wang, Robert Abel, Richard A. Friesner, and Edward D. Harder *Journal of Chemical Theory and Computation* 2019 15 (3), 1863-1874

16. Mishra, S.K., Chakraborty, S.K., Samei, M.E. et al. A q-Polak–Ribière–Polyak conjugate gradient algorithm for unconstrained optimization problems. *J Inequal Appl* 2021, 25 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13660-021-02554-6>

17. Bowers, K. J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R. O.; Eastwood, M. P.; Gregersen, B. A.; Klepeis, J. L.; Kolossvary, I.; Moraes, M. A.; Sacerdoti, F. D.; Salmon, J. K.;

Shan, Y.; Shaw, D. E., “Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters”

18. Schrödinger Release 2024-2: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2024. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2024.

19. "Molecular docking, estimating free energies of binding, and AutoDock's semi-empirical force field". Sebastian Raschka's Website. 2014-06-26. Retrieved 2016-06-07.

20. Coutsias EA, Seok C, Dill KA (2004). "Using quaternions to calculate RMSD". *J Comput Chem.* 25 (15): 1849–1857. doi:10.1002/jcc.20110. PMID 15376254. S2CID 18224579.

21. Kabsch W (1976). "A solution for the best rotation to relate two sets of vectors". *Acta Crystallographica.* 32 (5): 922–923. Bibcode:1976AcCrA..32..922K. doi:10.1107/S0567739476001873.

Додатки

Додаток 1

Вигляд пептидів на початку та на кінці траєкторії молекулярної динаміки

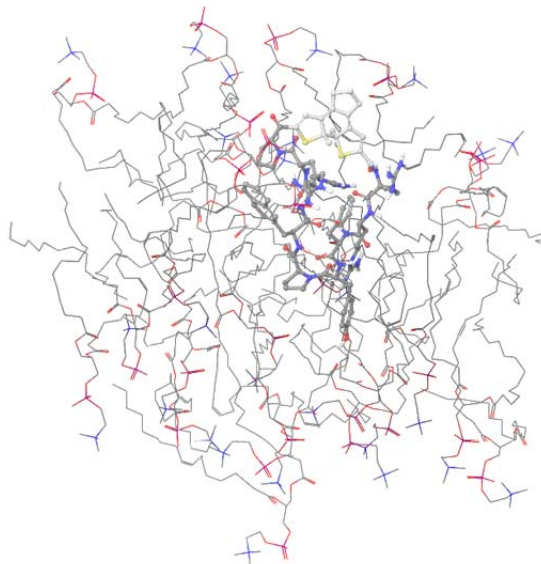


Рис. 3.1 Пептид 1 у закритій формі у мембрані POPC на початку траєкторії

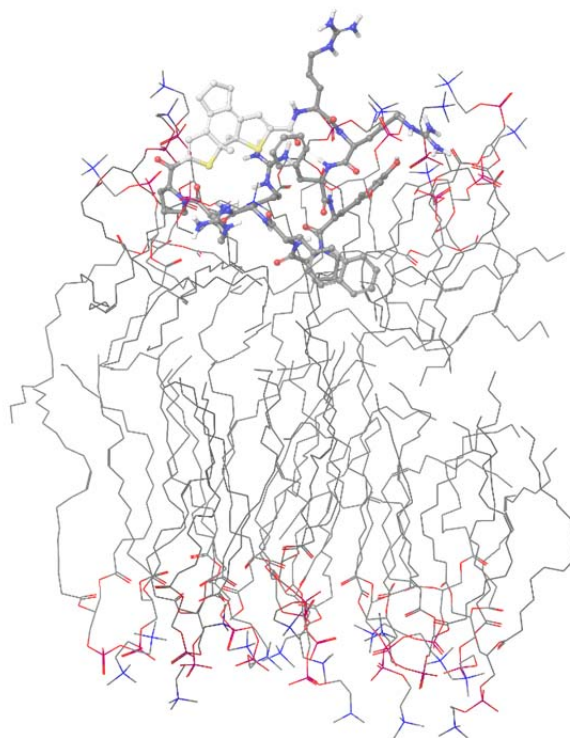


Рис. 3.2 Пептид 1 у закритій формі у мембрані POPC на кінці траєкторії

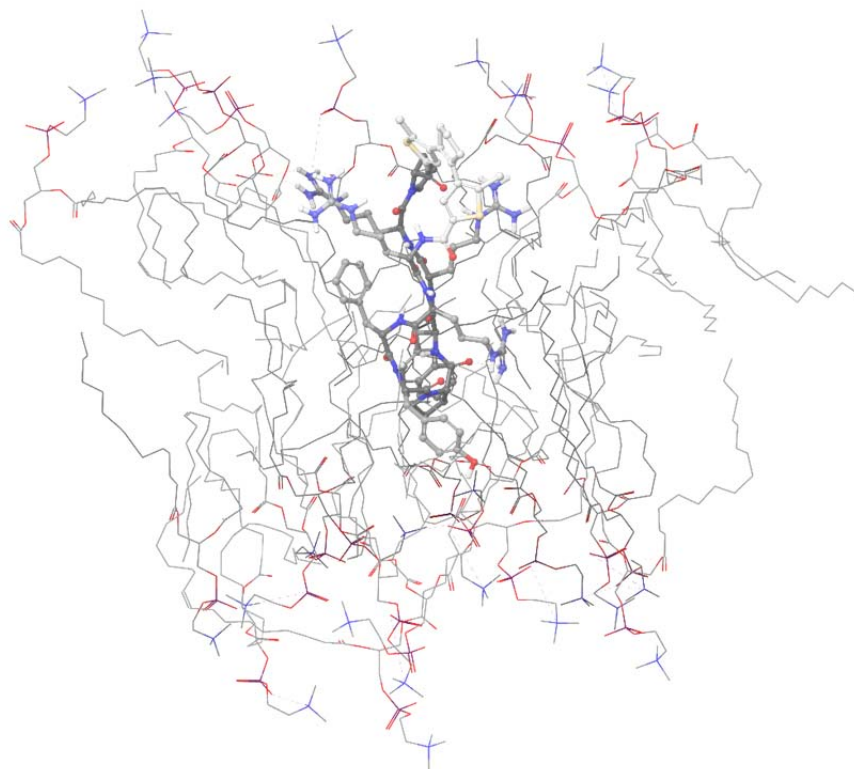


Рис. 3.3 Пептид 1 у відкритій формі у мембрані POPC на початку траєкторії

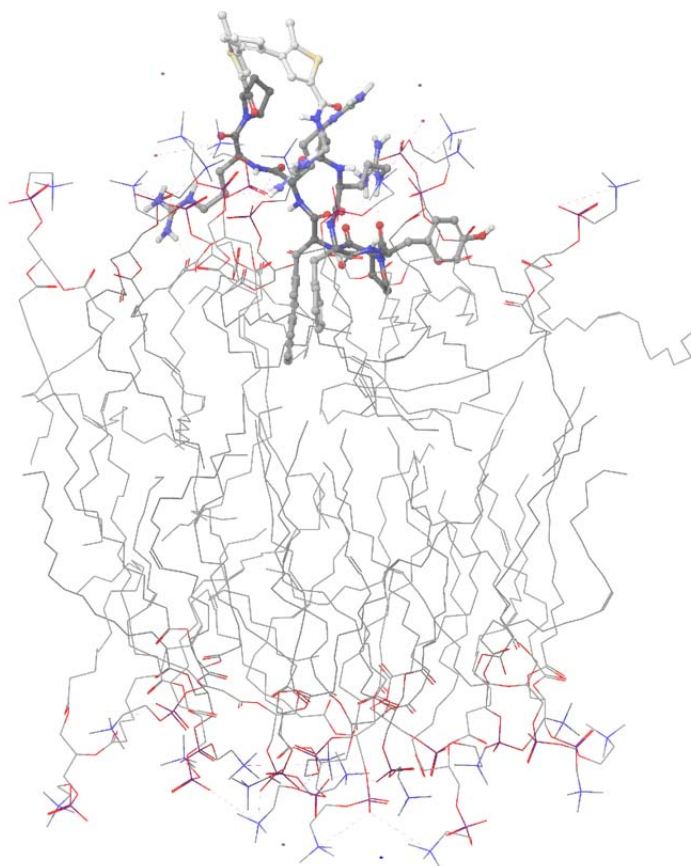


Рис. 3.4 Пептид 1 у відкритій формі у мембрані POPC на кінці траєкторії

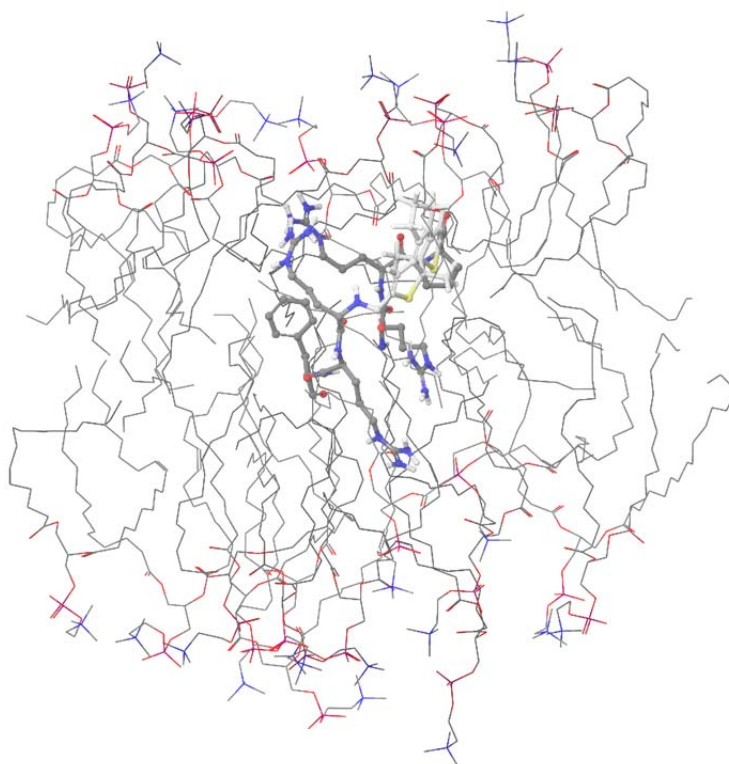


Рис. 3.5 Пептид 2 у закритій формі у мембрані POPC на початку траєкторії

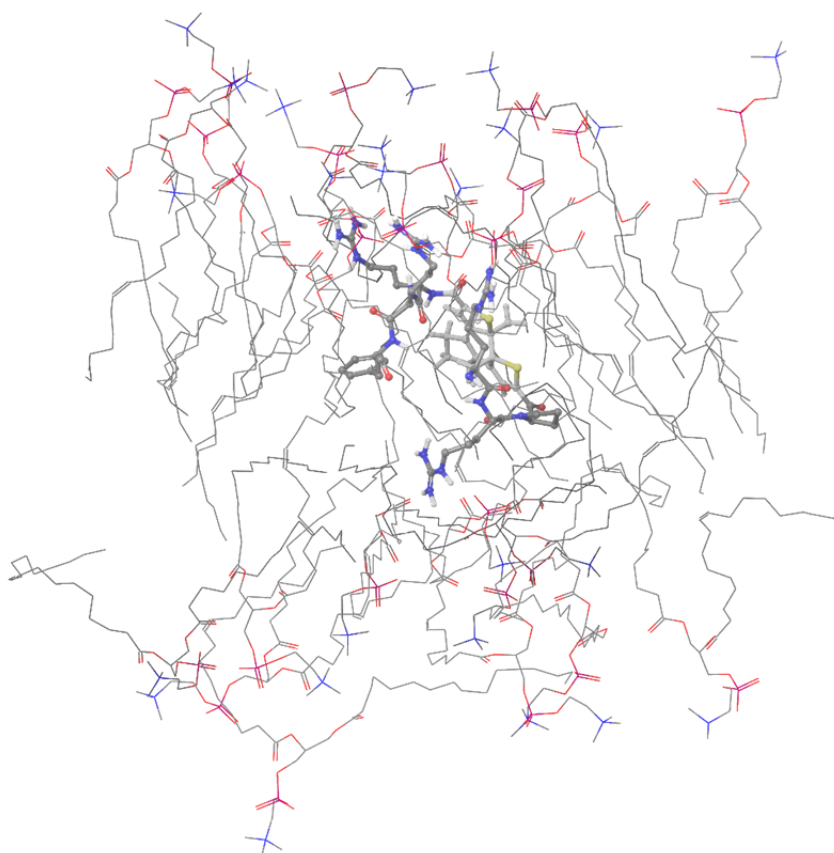


Рис. 3.6 Пептид 2 у закритій формі у мембрані POPC на кінці траєкторії

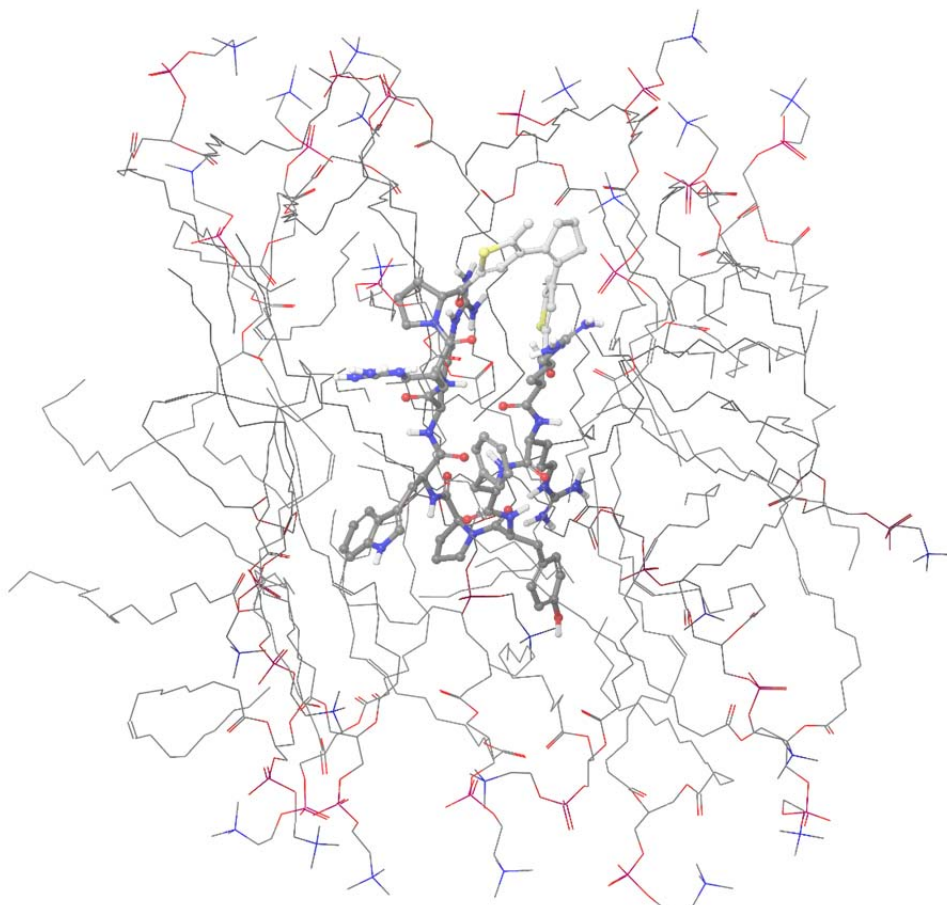


Рис. 3.7 Пептид 2 у відкритій формі у мембрані POPC на початку траєкторії

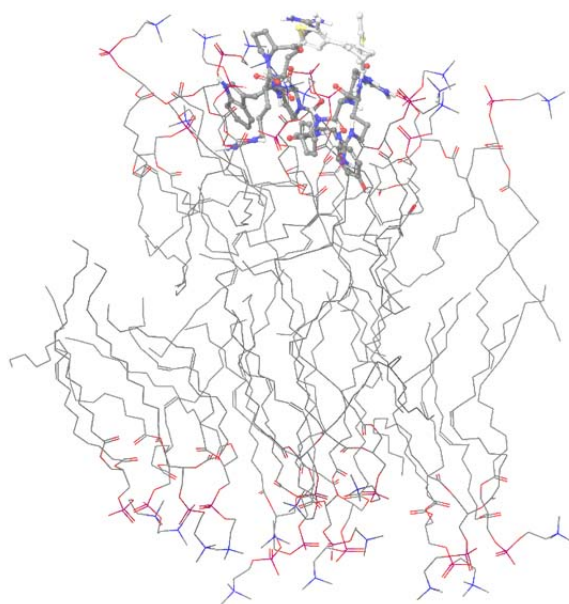


Рис. 3.8 Пептид 2 у відкритій формі у мембрані POPC на кінці траєкторії

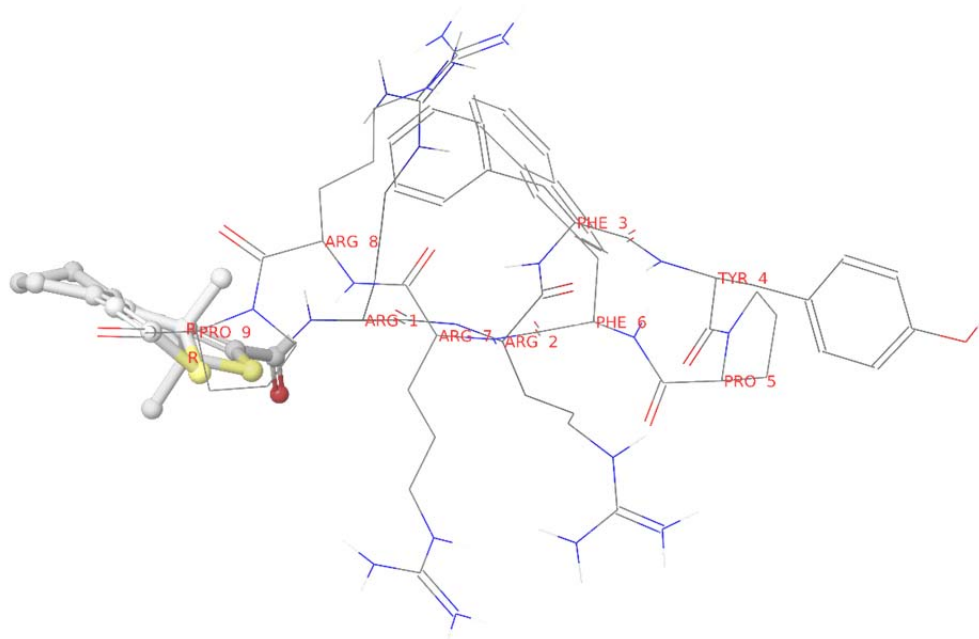


Рис. 3.9 Пептид 1 у закритій формі у воді на початку траєкторії

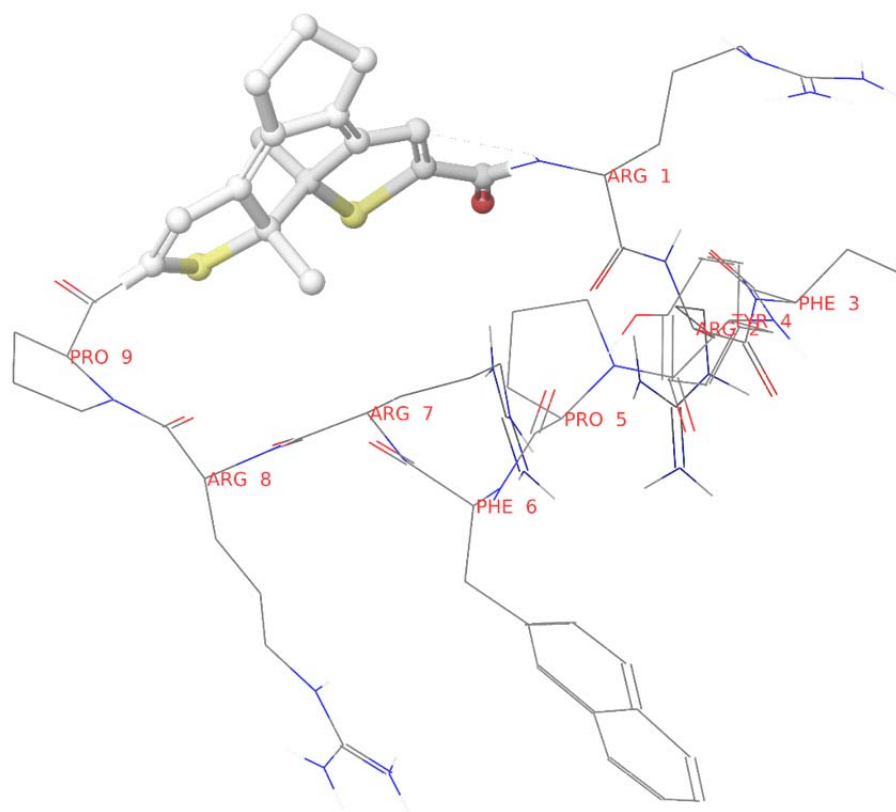


Рис. 3.10 Пептид 1 у закритій формі у воді на кінці траєкторії

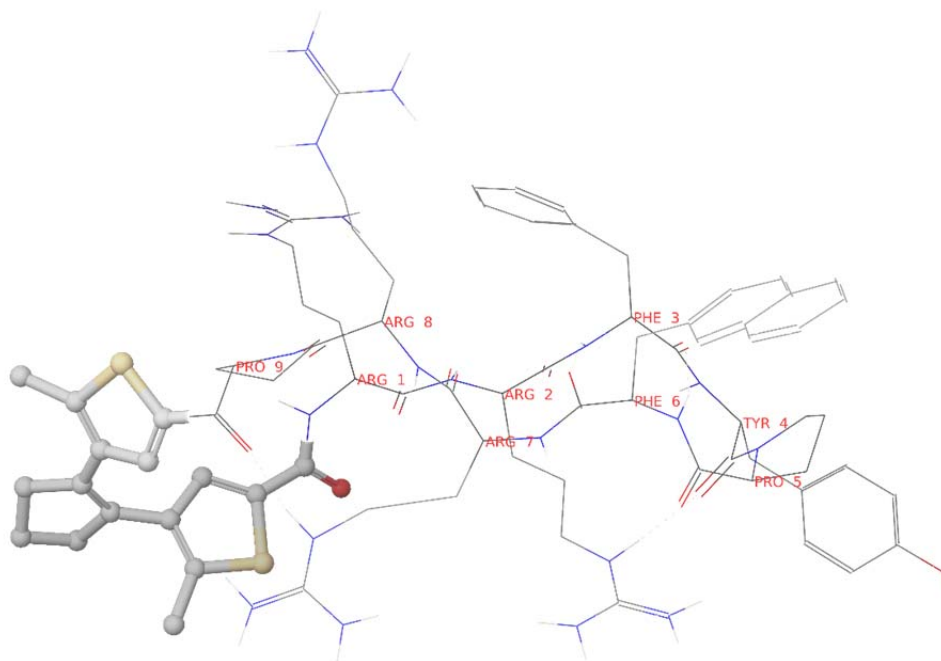


Рис. 3.11 Пептид 1 у відкритій формі у воді на початку траєкторії

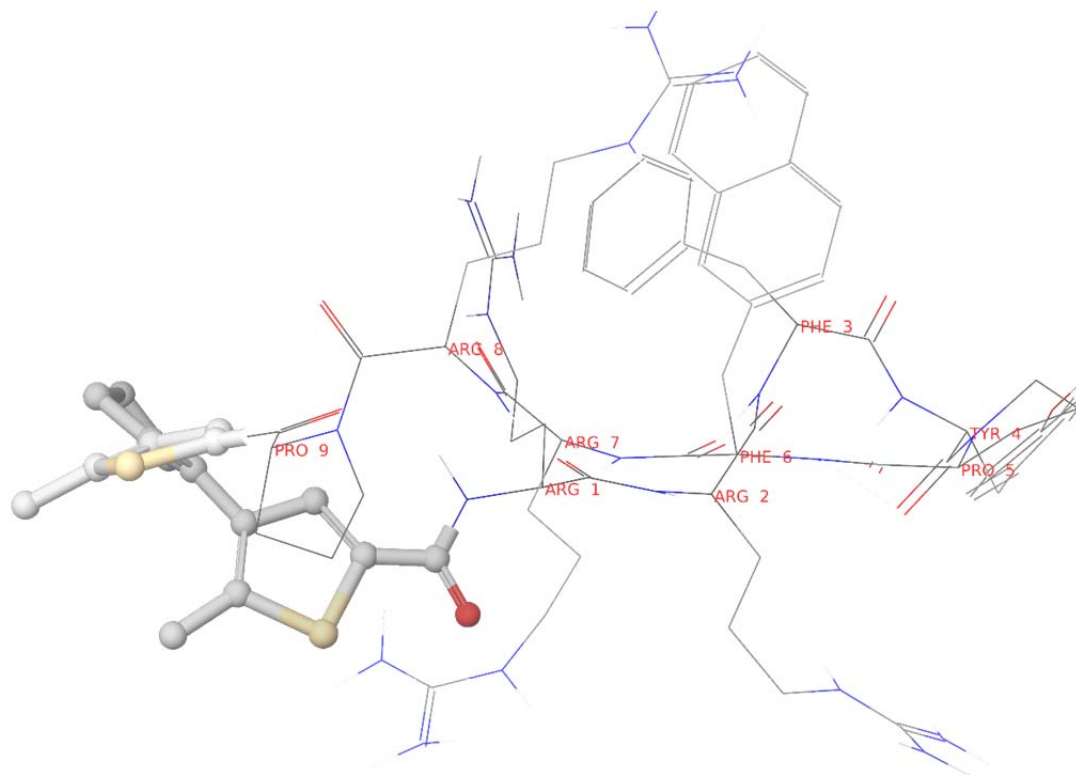


Рис. 3.12 Пептид 1 у відкритій формі у воді на кінці траєкторії