

## معرفی مدل‌های غشای سلول سرطانی و ارزیابی عملکردی آن‌ها در تقابل با پپتید زیست-فعال، با استفاده از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی تمام-اتمی و هدایت شده

سمیه دباغ صادق پور<sup>۱</sup>، محبوبه ضرابی<sup>۱\*</sup>، سعید بلالایی<sup>۲</sup> و ریحانه رضانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>ایران، تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه زیست‌شناسی محاسباتی

<sup>۲</sup>ایران، تهران، دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی، دانشکده شیمی، گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات شیمی پپتید

<sup>۳</sup>ایران، تهران، دانشگاه الزهرا، پژوهشکده مطالعات خانواده، آزمایشگاه بیومدیکال

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱

### چکیده

با توجه به اهمیت انکوزوم‌های سرطانی در پیشروی سلول‌های سرطانی، دو مدل غشای انکوزوم ایستا(صلب) و پویا(سیال) ساخته شد و نقش درجه‌ی اشباع دو لایه‌ی لیپیدی، بواسطه ایجاد تنوع در دنباله‌های اسیدچرب واجد چند پیوند دوگانه در مدل پویا با پپتید GL13K و توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد. تراجکتوری‌های شبیه‌سازی، ناهمواری‌های سطحی بیشتر انکوزوم پویا را نسبت به ایستا نشان داد. فسفولیپیدها در مدل ایستا بسته بندی بهتری نسبت به پویا دارد. مقایسه‌ی ماژول‌های تراکم پذیری سطحی در هر دو غشاء مقاومت بیشتر مدل ایستا را در برابر نیروهای خارجی نسبت به مدل پویا، نشان داد. نتایج حاصل از آرایش اسیدهای چرب اولئیک بعنوان فراوانترین نوع اسیدچرب در هر دو غشای مدل، سیالیت مدل پویا نسبت به ایستا را تأیید کرد. انکوزوم پویا با فراهم کردن فضای سطحی بیشتر برای جذب سطحی و نفوذ پپتید، تعاملات پایدارتری را شکل داد. تعاملات وابسته به ساختار ماریچ آلفا در مدل ایستا تا ۵۰ نانوثانیه ابتدایی بوده ولی در مدل پویا تا ۱۷۵ نانوثانیه نیز حفظ شد و در ادامه پپتید ساختار خود را از دست داد. رصد برهم کنش‌ها در طی بازه‌های زمانی ۲۵ نانوثانیه‌ای، نقش کلیدی رزبجوهای KIIKLKA و آمینو اسید لیزین ۵ را نشان داد. فسفولیپیدهای SDPE و SAPE در مدل پویا نقش ویژه‌ای در ثبات برهم کنش‌ها دارد. مقایسه‌ی نیروهای دینامیک مولکولی هدایت شده تمایل بالای جذب سطحی پپتید به دو لایه‌ی مدل پویا را بواسطه‌ی آنالیزهای هدایت شده تأیید کرد. پژوهش حاضر با نتایج آزمایشگاهی مبنی بر خواص ضد سرطانی پپتید GL13K هم راستا می باشد.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب غیر اشباع- انکوزوم - زیست محاسباتی

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [mzarrabi@alzahra.ac.ir](mailto:mzarrabi@alzahra.ac.ir)

### مقدمه

نیم لایه‌ی داخلی غشاء حضور دارند (۳۶). گروه ویژه‌ای از پروتئین‌های ناقل غشایی مسئولیت حفظ عدم تقارن دو لایه را بر عهده دارد (۵۶). این وجه از عدم تقارن غشایی در طی فرایندهای فیزیولوژیکی گوناگون از جمله آپوپتوز و نکروپتوز فرو می‌باشد (۱۰، ۵۵). در چنین شرایطی با قرارگیری فسفولیپیدهای آمین دار در نیم لایه‌ی خارجی،

بسیاری از فعالیت‌های بیوشیمیایی سلول نیازمند حضور فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی است (۱۷). عدم تقارن فسفولیپیدها ما بین دو نیم لایه‌ی غشایی وجود دارد و فراوانی فسفاتیدیل کولین و اسفنگولیپیدها در نیم لایه‌ی خارجی غشاء بیشتر بوده و فسفولیپیدهایی با گروه سر آمینی از جمله سرین و اتانول آمین، به نسبت بیشتری در

خوش‌خیم، نشان داده است (۸). فسفاتیدیل اتانول‌آمین، از دمتیلاسیون و دکربوکسیلاسیون فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل سرین شکل می‌گیرد و با توجه به عملکرد افتراقی آنزیم‌های مربوط و همچنین هموستازی نامتعادل سلولی، توزیع فسفاتیدیل اتانول‌آمین، بین دو نیم لایه تغییر کرده و اتانول‌آمین برای حضور در نیم لایه‌های خارج سلولی تمایل بیشتری پیدا می‌کند (۵۱). سطوح بالای فسفاتیدیل اتانول‌آمین در طی تنش‌های استرس‌زا همچون تولید گونه‌های فعال اکسیژن و عوامل پرتوزا در محیط توموری و همچنین سلول‌های رگ‌زایی توموری نیز به اثبات رسیده است (۵۰). با توجه به نقش چاپرونی فسفاتیدیل اتانول‌آمین در کمک به تا شدن پروتئین‌های غشایی و لنگراندازی پروتئین‌های محیطی غشایی بواسطه‌ی آمین انتهایی لیپید، افزایش حضور آن در نیم لایه‌ی خارجی سلول سرطانی، با سمی کردن ساختار پروتئین‌های عملکردی غشاء و ایجاد اختلال در سیستم‌های پیام‌رسانی سلولی، از شکل‌گیری صحیح آپوپتوز ممانعت کرده و بدین روش در پیشبرد روند سرطان‌زایی نقش ویژه‌ای ایفا می‌کند (۵۳). مشخص شده است که فسفاتیدیل سرین و اتانول‌آمین، بعنوان لیگاندهای مهارتی پروتئین‌های پیام‌رسان موجود در غشای گروهی از سلول‌های لنفاوی از جمله سلول‌های کشته‌ی طبیعی عمل کرده و با ممانعت از روند فاگوسیتوز کامل سلول‌های سرطانی، از عملکرد صحیح و کامل سیستم ایمنی جلوگیری می‌کند (۲۹). از دیگر عوامل بروز تغییرات غشایی در طی سرطانی شدن یک سلول، تغییر در متابولیسم اسیدهای چرب یا آنزیم‌های درگیر در متابولیسم لیپیدها می‌باشد (۳). افزایش بیان آنزیم اسیدچرب سنتاز با افزایش لیپوژنز سلول‌های سرطانی ارتباط مستقیم داشته و با اشباع کردن اسیدهای چرب فسفولیپیدهای غشایی در برخی از مراحل سرطان‌زایی، از روند اکسیداسیون سلول‌های سرطانی ممانعت می‌کند. نوسان در میزان کلسترول غشای سرطانی و کاهش آن در طی مراحل متاستاز پیشرفته‌ی عبور سلول متاستاتیک از

سلول‌ها برای فرایندهای ایمونولوژیکی آتی از جمله فاگوسیتوز و افروسیتوز برچسب‌گذاری شده (۴) و با برهم‌کنش ما بین فسفولیپیدهای آمین‌دار نیم لایه‌ی خارج سلولی و سلول‌های لنفاوی، پاسخ ایمنی را مهار کرده و روند آپوپتوز را پیش می‌برند (۲۹). طبق پژوهش‌های مولکولی و ایمنی‌شناسی، سلول‌های سرطانی با استفاده از استراتژی‌های مشابه و با سرکوب سیستم ایمنی، تهاجم خود به بافت‌ها را گسترش می‌دهند (۲۴). مطالعات تجربی نشان داده است که در روند سرطان‌زایی، متابولیسم لیپیدها تغییر می‌کند و بدنال آن آرایش لیپیدهای غشای پلاسمایی نیز دست‌خوش تغییر می‌شود (۳). آنالیزهای لیپیدومی متعدد، تغییرات محتوای لیپیدی غشای سلول‌های سرطانی را در مقایسه با سلول‌های سالم تأیید کرده است (۱۱، ۲۵). از مهم‌ترین آن‌ها، ایجاد آسیب در مکانیسم‌های مربوط به حفظ عدم تقارن غشایی بویژه عاملی که پخش فسفاتیدیل سرین در نیم لایه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، می‌باشد (۳۵). فسفاتیدیل سرین تنها سه درصد از لیپیدهای سلولی را تشکیل می‌دهد و همانند سایر لیپیدهای غشایی با عملکرد آنزیم فلیپاز بین دو نیم لایه‌ی جا به جا می‌شود (۴۸). در سلول‌های سرطانی با ایجاد تغییر در هموستازی کلسیم درون سلولی و بدنال آن تغییر در عملکرد افتراقی آنزیم فلیپاز میزان بالایی از فسفاتیدیل سرین در نیم لایه‌ی اگزوپلاسمی غشاء جای می‌گیرد. وجود هموستازی بالایی کلسیم درون سلولی بواسطه‌ی تغییر در پروتئین‌های درگیر در این مسیر از یک سو و افزایش pH درون سلولی از سوی دیگر، نه تنها تقارن نسبی دو نیم لایه‌ی غشای سلول سرطانی را تضمین می‌کند، بلکه با کاهش دافعه‌ی ما بین سرهای فسفاتیدیل سرین در نیم لایه‌ی اندوپلاسمی غشاء افت سیالیت و تنگ‌شدگی بیشتر نیم لایه‌ی درونی غشای سرطانی را در پی داشته و سبب بروز پدیده‌ی مقاومت دارویی می‌شود (۴۸، ۵۸). نتایج اسپکتروسکوپی جرمی، سطوح بالایی از فسفولیپیدهای کولین و اتانول‌آمین دار را در انواع بدخیمی‌ها در مقایسه با انواع سلول‌های

دیواره‌ی اندوتلیال عروقی و لانه‌گزینی در جایگاه ثانویه است. در حالی که میزان بالای کلسترول در سلول‌های مقاوم به دارو، عاملی مهم در افت سیالیت غشایی و مهار نفوذ انواع گوناگون داروهای شیمی درمانی وابسته و غیر وابسته به ناقل‌های غشایی می‌باشد (۴۳). علاوه بر کلسترول، متابولیسم سرآمیدها نیز بعنوان یک مکانیسم مقاومتی در سرطان مطرح شده است. تداخل در عملکرد آنزیم اسفنگومیلیناز سلول‌های سرطانی، تعادل ما بین تولید سرآمید و اسفنگومیلین را بر هم می‌زند و بدلیل پایین بودن میزان تولید سرآمید از شکل‌گیری صحیح نانودمین‌های قرارگیرنده‌ی پروتئین‌های غشایی واجد نقش در آپوپتوز جلوگیری شده و مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز مختل می‌شود (۶۲). بدلیل وجود موانع در ردیابی تجربی ساختارهای تغییر یافته‌ی غشای سلول سرطانی از رویکردهای جایگزین همانند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای رصد تغییرات غشایی و تعاملات اجزای لیپیدی آن با پروتئین‌های داخلی، محیطی و همچنین پپتیدها و مولکول‌های کوچک ضد سرطانی، استفاده می‌شود. تاکنون انواع گوناگونی از مدل‌های غشای سرطانی معرفی شده است (۴۱). در اکثریت مدل‌های معرفی شده، روی سیالیت غشاء بواسطه‌ی افزایش و کاهش کلسترول و بهره‌گیری از فسفولیپیدهای واجد بار منفی، تأکید شده است (۴۱،۴۳،۵۲). بعنوان نمونه در سال ۲۰۱۳، تیم تحقیقاتی کلن با استفاده از اطلاعات پایه‌ای از محتویات لیپیدی غشای گلبول قرمز، مدلی از غشای سلول سرطانی را ارائه دادند که در آن بواسطه‌ی افزایش ۸ برابری فسفاتیدیل سرین در نیم لایه‌ی خارج سلولی، نامتقارن بودن غشاء برهم زده شد و سپس دینامیک مولکولی تمام اتمی و هدایت شده‌ی نفوذ ذره‌ی کاتیونی OMIM به غشای مدل مورد بررسی قرار گرفت (۲۵). در سال ۲۰۱۹، ریول اثر تقارن غشای سلول سرطانی را در نفوذ داروی سیسپلاتین مورد بررسی قرار داد. نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تمام-اتمی و هدایت شده‌ی گروه مذکور، نقش تقارن و

درجه‌ی سیالیت غشای سلول سرطانی را بواسطه‌ی افت کلسترول در میزان نفوذ داروی سیسپلاتین ارزیابی کرده و مقاومت سلول‌های صلب با درجه‌ی بالاتری از میزان کلسترول را در برابر نفوذ سیسپلاتین نشان داد (۴۳). از دیگر مطالعات این حوزه، می‌توان به پژوهش‌های مهرنژاد در سال ۲۰۲۱ اشاره کرد. این گروه برای بررسی نقش محتوای لیپیدی غشاء روی عملکرد دندریم‌های PAMPAM، از مدل غشایی ترکیبی فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل گلیسرول، بعنوان نماینده‌ای از مدل غشای سرطانی واجد بار منفی استفاده کردند (۲۲). آنچه که از این مطالعات استنتاج می‌شود، اهمیت محتوای لیپیدی غشاء در تأثیرگذاری بر عملکرد حامل‌ها و داروهای ضد سرطانی است (۴۶). محتوای لیپیدی غشای سلولی نه تنها در بین سرطان‌های مختلف متفاوت است، بلکه در طی روند سرطان‌زایی نیز تغییر می‌کند (۱۵). مطالعات مرتبط با چیپ‌های میکروفلوییدیکی بر روی دو رده‌ی سرطان سینه، مهاجرت متغیر رده‌های MCF-7 و MDA-MB-231 را اثبات کرده است (۱۴). در نگاهی جزئی‌تر، مطالعات تجربی حاصل از طیف سنجی جرمی سلول‌های سرطانی افزایش حضور فسفولیپیدهای آمین دار در نیم لایه‌ی خارجی غشای پلاسمایی و تغییر سیالیت غشایی را بواسطه‌ی حضور انواع متنوعی از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع و درجه‌های متغیری از کلسترول در هر دو نیم‌لایه‌ی غشایی، اثبات کرده است (۴۴). درک صحیح از محتوای لیپیدی غشایی و دخالت دادن هر یک از این موارد در مدل‌های غشای سلول سرطانی می‌تواند نگرش واقع بینانه‌تری از مکانیسم عملکردی پپتید یا سایر داروهای شیمی درمانی را ارائه دهد چرا که ارتباط ساختار-عملکرد پپتید، مفهوم مستقلی نبوده و به محتوای لیپیدی غشایی نیز بستگی دارد (۱۵). بر همین اساس، پژوهش حاضر با تکیه بر اطلاعات تجربی حاصل از نتایج آنالیز محتوای لیپیدومی غشای سلول‌های سرطانی جامد، بر بررسی سیالیت غشای سلول سرطانی و بواسطه‌ی حضور اسیدهای چرب اشباع و

## مواد و روشها

دو لایه‌های غشایی شبیه‌سازی شده: در این پژوهش، دو مدل غشای سلول سرطانی مبتنی بر پژوهش‌های تجربی، ساخته شد. بطور معمول، در غشای پلاسمایی پستانداران، فسفاتیدیل سرین در نیم لایه‌ی داخلی و اتانول آمین با فراوانی نسبی (۱:۴)، در هر دو نیم لایه‌های خارجی و داخلی حضور دارد (۵۳). پژوهش‌های مرتبط با تکنیک‌های برچسب گذاری بواسطه‌ی نشانگرهای اتانول آمین همچون دورامایسین، افزایش بیان این فسفولیپید را از حالت معمول سلولی، به ۷۰٪ تا ۹۰٪ در نیم لایه‌ی خارجی غشاء تأیید کرده است (۵۰). افزایش حضور فسفولیپیدهای اتانول آمین دار در غشای پلاسمایی سلول سرطانی، در سایر مطالعات بیوشیمیایی نیز اثبات شده است (۱۱، ۵۰، ۵۱). افزایش ۱۰ تا ۲۵ درصدی از فسفولیپید سرین در سلول‌های توموری، بواسطه‌ی نشان گرهای مبتنی بر آنتی بادی بویتاکسیمب، با سایر نتایج مرتبط با تقارن فسفاتیدیل سرین در هر دو نیم لایه هم راستا است (۵۰). پروفایل لیپیدومی طیف سنجی جرمی در رده‌های سرطانی سلول‌های جامد، ازدحام اسیدهای چرب غیر اشباع را نشان داده و با تهاجمی‌تر شدن سلول، نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به کل اسیدهای چرب کمتر می‌شود (۱۳، ۳۷). در سلول‌های تهاجمی سرطانی تنوع خاصی از اسیدهای چرب غیر اشباع و فسفولیپیدهایی با اتصالات اتری نیز یافت شده است (۱۱). این اتصالات بیشتر در فسفولیپیدهای اتانول آمین دار بوده و دنباله‌های فسفاتیدیل سرین بیشتر از اولئیک اسید و استتاریک اسید، شکل گرفته است (۱۱، ۱۳). با در نظرگیری موارد عنوان شده و حذف سایر فسفولیپیدهای غشایی، دو مدل غشایی مبتنی بر استفاده از فسفولیپیدهای اتانول آمین و سرین با نسبت (۲:۱) ساخته شد. در مدل (۱) که آنکوزوم ایستا نام دارد، از دنباله‌های اسید چربی فیزیولوژیکی معمول پالمیتیک اسید (۱۶:۰) و اولئیک اسید (۱۸:۱) استفاده شده است (۲۵). در مدل (۲) که آنکوزوم

همچنین غیر اشباع واجد چند پیوند دوگانه، متمرکز شده است. با توجه به اهمیت افزایش حضور فسفولیپیدهای آمین‌دار در نیم‌لایه‌ی خارج سلولی و همچنین ریز محیط توموری، دو لایه‌های غشایی از فسفولیپیدهای یکسان از نظر گروه سر (واجد فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل سرین) و متغیر از نظر دنباله‌ی اسیدچرب، دو نوع مدل غشایی سرطانی با عناوین آنکوزوم ایستا (Static Oncosome) و آنکوزوم پویا (Dynamic Oncosome) مدلسازی شد. آنکوزوم‌ها، وزیکول‌های تولید شده توسط سلول‌های توموری است که محتوای لیپیدی غشای آن‌ها نسبت به آنکوزوم‌های تولیدی توسط سلول‌های سالم متفاوت بوده و افزایش حضور لیپیدهای آمین‌دار و کاهش حضور کلسترول در آن‌ها نسبت به سلول‌های منشأ یافته از آن، مشاهده شده است (۴۹). با توجه به افت کلسترول و اهمیت حضور لیپیدهای آمین دار (۳۲)، در این مطالعه تلاش شد تا سیالیت غشاهای مدل از طریق حضور اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع مورد بررسی قرارگیرد و پس از بررسی و تحلیل ویژگی‌های بیوفیزیکی حاصل از شبیه سازی دو لایه‌های واحد، دینامیک مولکولی برهم کنشی تمام-آتمی و هدایت شده‌ی آن‌ها با پپتید زیست-فعال GL13K ارزیابی شود (۲۵). ویژگی ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی پپتید GL13K مورد ارزیابی قرار گرفته است (۲، ۱۲). اخیراً روی ویژگی‌های ضد سرطانی این پپتید و آرایه‌های تغییر یافته‌ی آن مطالعات تجربی گوناگونی صورت گرفته است (۵۲). نتایج بیوفیزیکی حاصل از شبیه سازی دینامیک مولکولی GL13K با مدل‌های آنکوزوم ایستا و پویا و بررسی نقش سیالیت غشایی در عملکرد پپتید، زمینه‌ساز پیشبرد اهداف آتی در تغییر احتمالی ساختار پپتیدهای ضد سرطانی موجود - طراحی پپتیدهای جدید - مدل سازی و ساخت سازه‌های مورد نیاز برای انتقال هدفمند داروهای ضد سرطانی خواهد بود.

شده است (جدول ۱). دو لایه‌های متقارن غشایی انکوزوم ایستا و پویا (۱۰۰ واحد)، توسط سرور Charmm-Gui (۳۰) و با هدف شبیه‌سازی تمام-آمی در نرم افزار گرومکس، در غلظت نمکی ۰٫۱۵ مولار سدیم کلرید و دمای ۳۱۰٫۱۵ درجه ی کلونین، ساخته شد.

پویا نام دارد، با حفظ نسبت (۲:۱) فسفولیپیدهای اتانول آمین به سرین، از اسیدهای چرب اشباع استئاریک اسید (۱۸:۰)، انواع غیر اشباع واجد چند پیوند دوگانه شامل آراشیدونیک اسید (۲۰:۴) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (۲۲:۶) و همچنین از دنباله‌های اتصالی اتری نیز استفاده

جدول ۱- نوع و تعداد فسفولیپیدهای مورد استفاده در مدل‌های غشایی

تعداد		مشخصات ساختاری	انواع لیپید
انکوزوم ایستا	انکوزوم پویا		
۱۸	۶۶	POPE(16:0/18:1)	۱-پالمیتوئیل-۲-اولئیل-sn-گلیسر-۳-فسفواتانول آمین
۱۶	۰	SOPE(18:0/18:1)	۱-استئاروئیل-۲-اولئیل-sn-گلیسر-۳-فسفواتانول آمین
۱۶	۰	SAPPE(18:0/20:4)	۱-استئاروئیل-۲-آراشیدونیل-sn-گلیسر-۳-فسفواتانول آمین
۸	۰	SDPE(18:0/22:6)	۱-استئاروئیل-۲-دوکوزاهگزانوئیل-sn-گلیسر-۳-فسفواتانول آمین
۸	۰	POPEE(16:0/18:1)	۱-پالمیتوئیل-۲-اولئیل-sn-گلیسر-۳-فسفواتانول آمین
۲۶	۰	SOPS(18:0/18:1)	۱-استئاروئیل-۲-اولئیل-sn-گلیسر-۳-فسفسورین
۸	۳۴	POPS(16:0/18:1)	۱-پالمیتوئیل-۲-اولئیل-sn-گلیسر-۳-فسفسورین

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تمام-آمی: میدان نیروی تمام-اتم charmm36m برای همه مولکول‌ها در سیستم‌های شبیه‌سازی استفاده شد (۱۹). تمامی شبیه‌سازی‌ها با بسته شبیه‌سازی گرومکس (۱) (۲۰۱۸) انجام شد. در طی مرحله کمینه‌سازی انرژی (Energy minimization)، محدودیت‌های مورد نیاز برای جلوگیری از فروپاشی احتمالی در فرآیند شبیه‌سازی اعمال شد. مراحل تعادل‌رسانی بر اساس دستورالعمل‌های سرور Charmm-Gui برای فایل‌های ورودی گرومکس و در هنگرد هم‌دم-هم فشار، انجام گرفت و دما در ۳۱۰٫۱۵ درجه ی کلونین در ثابت زمانی یک فمتو ثانیه و سیستم کوپلینگ برندنسن انجام گرفت.

آماده‌سازی ساختار پپتید: پپتید ۱۳ واحدی GL13K با توالی آمینواسیدی N-GKIIKLKASLKL-C، توسط سرور PEPFOLD3 مدل سازی شد (۴۷) و بر اساس امتیاز DOPEE، بهترین مدل انتخاب شد. پس از کمینه‌سازی انرژی، ۲۰ نانوثانیه، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تمام-آمی پپتید، انجام گرفت (۶۱). آنالیز ساختارهای ثانویه محتمل برای این پپتید را مشخص کرد.

آماده‌سازی دولا‌ی‌های غشاء-پپتید: ساختار پپتید مدل سازی شده بصورت موازی با صفحه ی X\*Y و در فاصله ی تقریبی ۱-۲ نانومتری از لایه‌ی فوقانی دو لایه‌های مدل انکوزوم ایستا و پویا، قرار داده شد.

مولکولی عنوان شده است.

**مقایسه‌ی ویژگی‌های مدل‌های غشائی:** تمامی آنالیزهای مدل‌های انکوزوم ایستا و پویا، بر اساس تراجکتوری‌های حاصل از ۲۰۰ نانو ثانیه از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تمام-آتمی انجام گرفت. در این پژوهش، ویژگی‌های هندسی غشاء از جمله مساحت غشاهای مدل، ناحیه‌ی سطحی هر لیپید در غشاها، ضخامت و فاصله‌ی هسته‌های آبگریز میانی دو لایه‌های مدل غشایی، میزان تراکم پذیری غشاهای مدل و همچنین ویژگی‌های فازی غشاء از جمله آرایش دنباله‌های اسیده‌های چرب و تعداد پیوندهای هیدروژنی درون زنجیره‌ای، مورد محاسبه قرار گرفت.

**آنالیز مساحت و ناهمواری‌های سطحی غشاهای مدل:** حضور کلسترول در دو لایه‌های غشایی و بواسطه‌ی کاهش دافعه‌ی وان دروالسی ما بین دنباله‌های اسیده‌های چرب فسفولیپیدی، سبب بسته بندی بهتر غشاء شده و مساحت غشاء ( $X*Y$ )، بدلیل کاهش ۱۰ الی ۲۰ درصدی ناحیه‌ی سطحی فسفولیپیدها، کم می‌شود (۳۰). با توجه به عدم حضور کلسترول در مدل‌های غشایی انکوزوم ایستا و پویا، نقش اسیده‌های چرب واجد چند پیوند دوگانه، بر اثرگذاری روی مساحت و ناحیه‌ی سطحی هر لیپید و همچنین میزان فرورفتگی و برآمدگی‌های سطح غشاء مورد بررسی قرارگرفت (جدول ۳). در میان گروه‌های سر فسفولیپیدها، کولین بزرگترین و اتانول آمین کوچکترین گروه را به خود اختصاص می‌دهد. در پژوهش حاضر نیز SOPE کمترین میزان اشغال فضای سطح را داشته و تفاوت در ناحیه‌ی سطحی هر فسفولیپید، به هنگام حضور اسیده‌های چرب واجد چند پیوند دو گانه، اندکی چشم گیر می‌شود. تفاوت زیادی ما بین فسفولیپیدهای سرین دار مشاهده نمی‌شود. در جدول ۳، میانگین مساحت غشاء و ناحیه‌ی سطحی هر غشاء، در ۲۰۰ نانو ثانیه از شبیه‌سازی، گزارش شده است که با نتایج تجربی مربوط به تک تک فسفولیپیدها همخوانی دارد. نتایج نشان داد که علی‌رغم یکسان بودن

پیوندهای هیدروژنی با استفاده از الگوریتم لینک محدود شد. برهم کنش‌های غیر پیوندی در فاصله‌ی ۱,۲ نانومتری محاسبه شد. مدل‌های غشایی و دولایه‌های مدل با پپتید، هر یک به مدت ۲۰۰ نانوثانیه در گام‌های زمانی ۲ فمتوثانیه‌ای شبیه سازی شد. با استخراج فایل‌های تراجکتوری حاصل، ویژگی‌های هندسی مدل‌های ایستا و پویا بررسی شده و بیوشیمی برهم‌کنش رزیجوهای آمینو اسیدی با فسفولیپیدهای مدل‌های غشایی تحلیل شد. مصور سازی نتایج و آنالیزهای هندسی غشاء، به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای VMD(1.9.3) و UCSF Chimera (1.16) و FATSLiM، انجام گرفت (۵، ۲۰، ۳۹).

**شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده:** دینامیک مولکولی هدایت شده، تقلیدی از عملکرد میکروسکوپ نیروی اتمی است که در آن مرکز جرم تابع هدف اولیه (پپتید) توسط فنری مجازی و با سرعتی ثابت به سمت مرکز جرم تابع هدف ثانویه (دولایه‌ی مدل)، کشیده می‌شود (۱۸). در چنین شرایطی نیروی جابجایی، ارتباط مستقیمی با گرادیان انرژی پتانسیل ( $\Delta U$ ) داشته و بر اساس رابطه‌ی زیر محاسبه می‌شود که در آن  $U$  انرژی پتانسیل،  $k$  ثابت نیروی فنر،  $v$  سرعت کشش،  $t$  زمان،  $r$  موقعیت برداری لحظه‌ای اتم مرکز جرم و  $r_0$  موقعیت برداری اولیه‌ی اتم مرکز جرم و  $n$  تعداد جهت‌های کشش است:

$$F = -\Delta U$$

$$U = k [vt - (r-r_0) \cdot n]^2$$

در این شبیه‌سازی، مرکز جرم پپتید GL13K با سرعت ثابت ۰,۰۱ نانومتر بر پیکوثانیه، به سمت مرکز جرم دو لایه‌های مدل کشیده شد. با مقایسه‌ی نتایج حاصل از منحنی‌های تغییرات نیرو در طی کشش، عملکرد پپتید در قبال هر دو مدل ایستا و پویا مورد بررسی قرار گرفت.

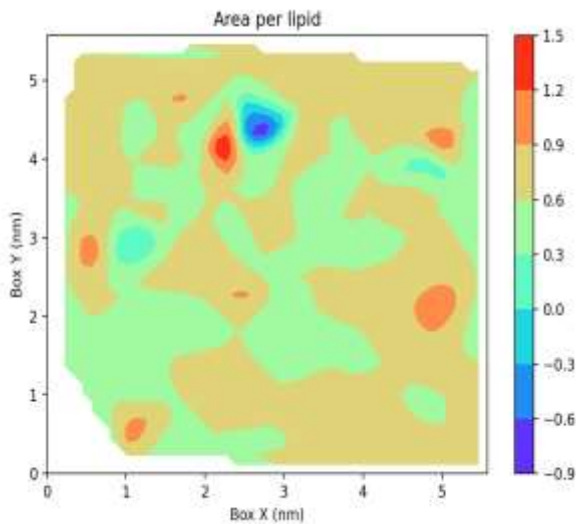
## نتایج

در بخش‌های زیر، به تفصیل نتایج شبیه‌سازی دینامیک

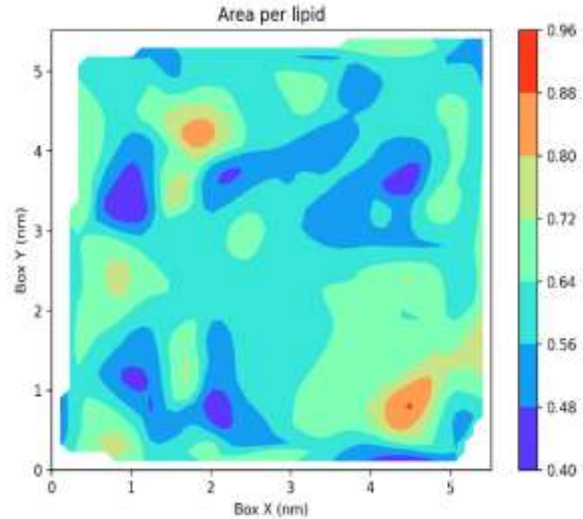
گروه‌های سر در هر دو مدل غشایی، درجه‌ی اشباع اسیدهای چرب فسفولیپیدها، تأثیر ویژه‌ی در ناحیه‌ی سطحی فسفولیپیدها داشته و مساحت دو لایه‌ی انکوزوم پویا، اندکی بیشتر از مدل ایستا است. همین امر روی هندسه‌ی سطحی غشاء نیز تأثیر گذار است. پلات‌های

کانتور مربوط به تراجکتوری های ۲۰۰ نانوثانیه ای از مدل‌های ایستا و پویا، تفاوت‌های موضعی بین دو مدل را نشان می‌دهد (شکل ۱). همین میزان از درجه‌ی غیر اشباع بودن و تعدد پیوندهای دوگانه، روی ناهمواری‌های سطح غشاء نیز تأثیر می‌گذارد (شکل ۲).

انکوزوم پویا



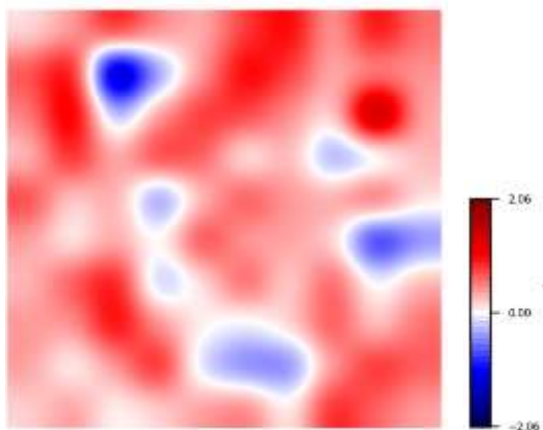
انکوزوم ایستا



شکل ۱ توپوگرافی سطحی از مدل‌های غشایی انکوزوم ایستا و پویا در ۱۵۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی با استفاده از نقطه‌گذاری اتم‌های فسفر گروه‌های سر فسفولیپیدها در نرم افزار FATSIM. با توجه به هر دو مدل، بیشتر ناحیه‌ی سطحی لیپیدی در مدل ایستا، محدوده‌ی ۰٫۶ تا ۰٫۵ را در بر می‌گیرد و در مدل پویا محدوده‌ی ۰٫۶ تا ۰٫۹ غالب است. اختلاف ارتفاع در مقیاس  $Z$  (۰٫۹۶-۰٫۴) در مدل ایستا نسبت به مدل پویا (۰٫۹-۱٫۵) کمتر بوده که می‌تواند نشان دهنده‌ی نزدیک تر بودن گروه‌های سر نسبت به هم و بسته بندی بهتر فسفولیپیدها در مدل ایستا باشد.

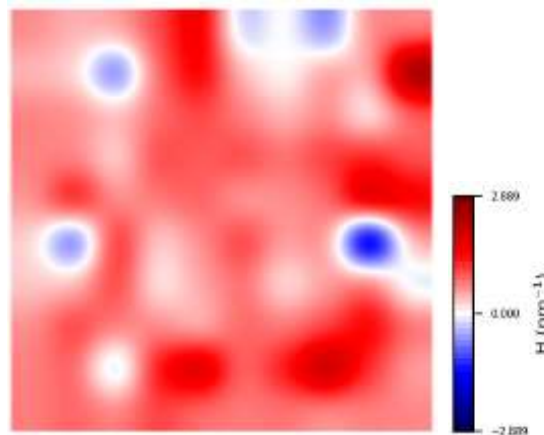
انکوزوم پویا

Mean-Curvature



انکوزوم ایستا

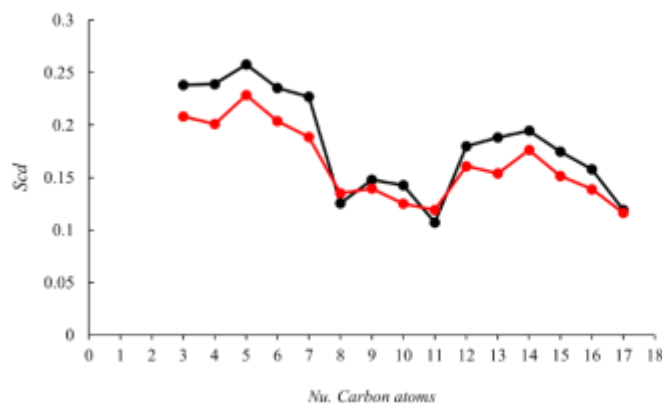
Mean-Curvature



شکل ۲ نمودار انحناهای متوسط، اطلاعاتی را از شکل معکوس سطح در اختیار می‌گذارد. اطلاعات حاصل بر اساس موقعیت گروه‌های فسفات فسفولیپیدها و توسط نرم افزار FATSIM بدست آمده است. نواحی قرمز رنگ نشان‌دهنده‌ی برآمدگی‌ها، آبی رنگ نشان‌دهنده‌ی فرورفتگی‌ها و

نواحی سفید رنگ ( $H=0$ )، نشان‌گر نقاط هموار است. علی‌رغم بالا بودن ارتفاع و عمق برآمدگی و فرورفتگی‌ها در مدل ایستا، تعدد و میزان فرورفتگی‌های غشایی در مدل پویا نسبت به مدل ایستا بیشتر است.

مربوط به بررسی ضخامت هسته‌ی هیدروفوبی دو لایه‌ی های مدل انکوزوم ایستا و پویا، نشان‌دهنده‌ی نازک بودن هسته‌ی هیدروفوبی در مدل انکوزوم پویا و بسته‌بندی منظم‌تر دنباله‌های چربی در مدل ایستا، است. نتایج مذکور که بر اساس محاسبه‌ی میانگین فاصله‌ی برداری گروه‌های کربن هسته‌ی هیدروفوب (Dc-c) که در مدت زمان ۲۰۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی انجام گرفته است، با نتایج حاصل از میزان تراکم پذیری سطحی دو لایه‌ی غشایی، همخوانی دارد. شاخص تراکم پذیری سطحی غشاء (Area compressibility module) ( $K_A$ )، بیان‌گر میزان مقاومت غشاء، نسبت به فشرده‌سازی یا انبساط سطحی است و نسبت مستقیم با دمای محیط و مساحت کلی نیم‌لایه‌ی غشایی و نسبت معکوس با تعداد فسفولیپیدها در هر نیم‌لایه را دارد (۴۰). بر همین اساس، برای ایجاد تنش برشی در مدل انکوزوم پویا با حالت فازی ژل و هسته‌ی هیدروفوبی ضخیم، نیروی کمتری نسبت به مدل ایستا نیاز است. در معنی دیگر، مدل ایستا، مقاومت بیشتری در برابر انبساط و فشرده‌سازی سطحی را دارد (جدول ۴).



**آنالیز حالت‌های فازی، ضخامت و تراکم‌پذیری سطحی غشاهای مدل:** بدلیل تنوع دنباله‌های اسیدهای چرب در مدل‌های غشایی و بمنظور بررسی صحیح‌تر، فراوانترین نوع اسید چرب در هر دو مدل ایستا و پویا (اولئیک اسید ۱۸:۱)، جهت بررسی شرایط فازی غشاء، انتخاب شد. بر اساس نتایج، اولئیک اسید در مدل انکوزوم ایستا، نسبت به مدل انکوزوم پویا، ساختار منظم‌تری دارد (شکل ۳). نتایج در طی ۲۰۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی و با تکرارهای ۵۰ نانوثانیه‌ای، تأیید شد. حضور فسفولیپیدهای واجد اسیدهای چرب غیر اشباع چند گانه در مدل انکوزوم پویا، سبب القای خمیدگی‌ها و پیچ خوردگی‌های دنباله‌های لیپیدی در هسته‌ی هیدروفوبی غشاء شده، که با افزایش دافعه‌ی وان دروالسی و بی‌نظم‌تر کردن آرایش اسیدهای چرب در مرکز دو لایه، حالت فازی ژل را در مدل پویا، اعمال می‌کند (۵۹). چنین حالت‌هایی از دو لایه‌های غشایی در سلول‌های سرطانی مهاجم و متاستاتیک مفروض بوده و آرایه‌های اثباتی آن در برخی از مطالعات تجربی، مورد پژوهش و تحلیل قرار گرفته است (۳۶). آنالیزهای

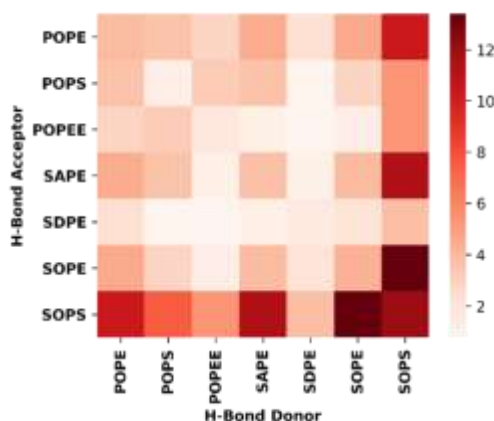
مدل	اسید چرب	تعداد
ایستا	16:0	100
	18:1	100
	16:0	34
پویا	18:1	76
	18:0	66
	20:4	16
	22:6	8

شکل ۳ مقایسه‌ی رفتار فازی اولئیک اسید (۱۸:۱) بر اساس سنجش فراوانی در هر دو مدل غشایی انکوزوم ایستا (رنگ سیاه) و انکوزوم پویا (رنگ قرمز).

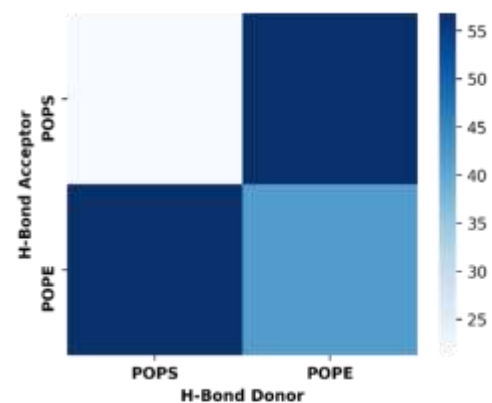
**تقابل غشاهای مدل با پپتید و ارزیابی عملکردی آن‌ها:** نتایج حاصل از شبیه‌سازی در غشاهای مدل، سیالیت بالای مدل انکوزوم پویا نسبت به مدل ایستا را تأیید کرد. در گام بعدی، تعامل ما بین غشاهای مدل با پپتید هدف GL13K به مدت ۲۰۰ نانو ثانیه شبیه‌سازی شد و رفتار اولیه پپتید (فرایند جذب سطحی) در تقابل با هر دو مدل صلب و سیال مورد بررسی قرار گرفت.

**بررسی ویژگی‌های پپتید:** پپتید زیست‌فعال GL13K با ۱۳ آمینو اسید (N-GKIIKCLKASLKL-C)، واجد ساختار مارپیچ آلفا، مشتق شده از پروتئین‌های ترشحی غدد بنا گوشی، دارای خواص انتخابی ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی است (۲) (شکل ۶). اخیراً مطالعاتی پیرامون خواص ضد سرطانی آن انجام گرفته و میزان اثر بخشی آرایه‌های انانتیومری D و L از آن، روی رده‌های سلولی گوناگون و همچنین اریتروسیت‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج شبیه‌سازی اهمیت محتوای لیپیدی در نحوه برهم‌کنش پپتید با غشاهای سرطانی را برجسته کرد (۵۲).

**آنالیز پیوندهای هیدروژنی در نیم لایه‌ها:** با هدف بررسی نقش هر یک از فسفولیپیدها در برقراری پیوندهای هیدروژنی درون زنجیره‌ای و مقایسه‌ی فراوانی پیوندها بین هر دو مدل انکوزوم ایستا و پویا، گروه بندی لیپیدی انجام شد و تعداد پیوندهای هیدروژنی بین تک تک گروه‌ها در طی ۲۰۰ نانوثانیه از زمان شبیه‌سازی، محاسبه شد (شکل ۴). با توجه به نقشه‌ی حرارتی، فراوانی گروه‌های مشارکت‌کننده در تشکیل پیوند هیدروژنی در مدل انکوزوم پویا بیشتر از مدل انکوزوم ایستا است. در هر دو مدل فسفولیپیدهای واجد گروه سر سرین نقش بیشتری را دارند. در مدل پویا، SOPS (با وجود تعداد کمتر نسبت به فسفولیپیدهای اتانول آمین دار)، در مشارکت حداکثری با SOPE، بیشترین نقش را در شکل دهی پیوندهای هیدروژنی داشته، در مقابل فسفولیپیدهای SDPE و POPEE، حضور کم‌رنگ‌تری در ایجاد پیوندهای هیدروژنی دارد. در شکل ۵، ساختار فسفولیپیدهای مذکور نشان داده شده است. این چنین بنظر می‌رسد که علی‌رغم یکسان بودن ساختار گروه‌های سر فسفولیپیدی در هر دو مدل، نوع و آرایش اسیدهای چرب نیز در شکل‌گیری پیوندهای هیدروژنی تأثیر گذار باشد.

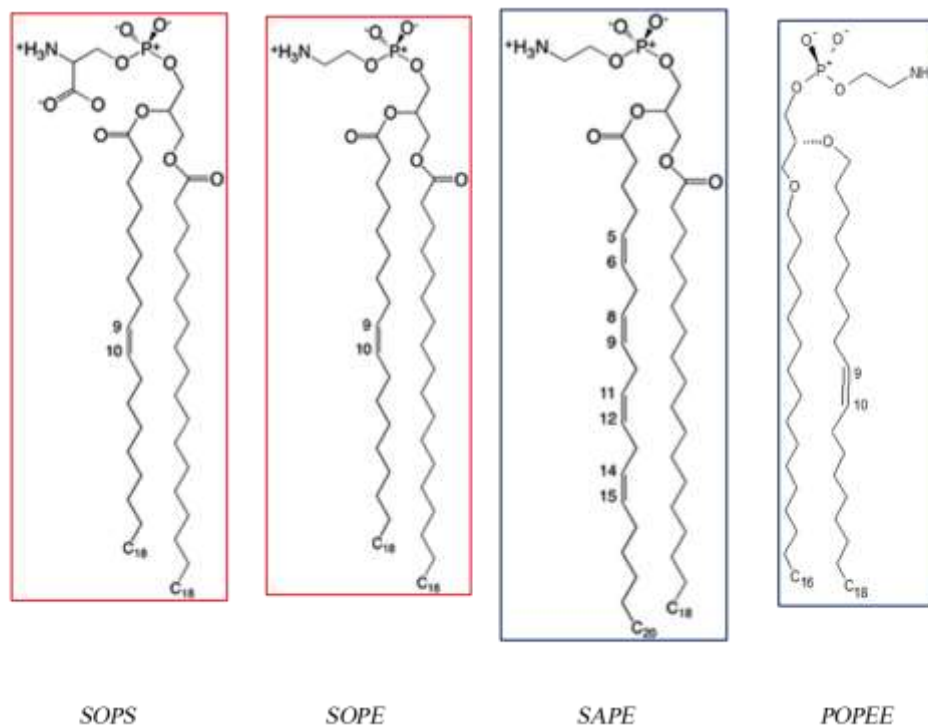


انکوزوم پویا

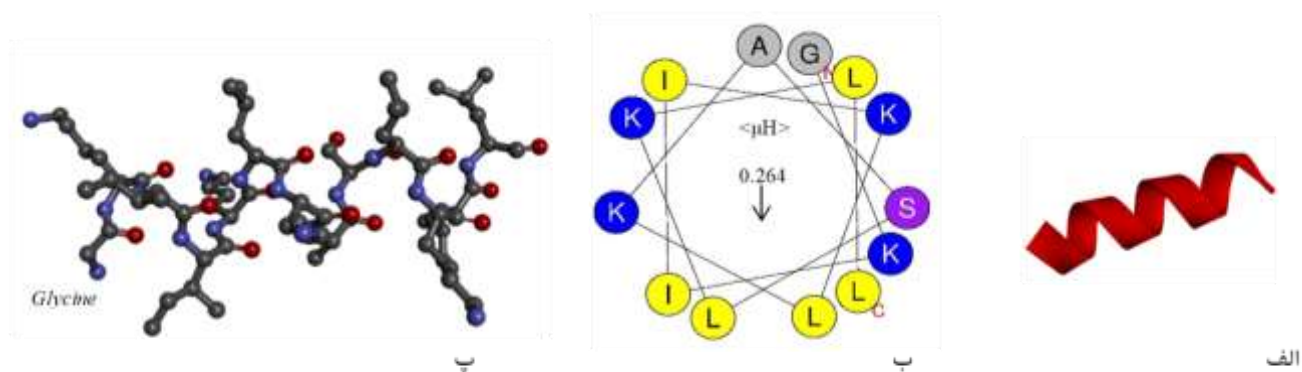


انکوزوم ایستا

شکل ۴ خوشه بندی فسفولیپیدها بواسطه ی نقشه‌ی حرارتی از تعداد پیوندهای هیدروژنی محتمل ما بین گروه های فسفولیپیدی در ۲۰۰ نانوثانیه از شبیه سازی تمام اتمی. نقاط پر رنگ، نشان دهنده‌ی ازدیاد گروه های درگیر در شکل دهی پیوند هیدروژنی است.



شکل ۵ ساختار فسفولیپیدهای مدل غشای انکوزوم پویا که بیشترین (کادر قرمز) و کمترین (کادر آبی) مشارکت را در شکل دهی پیوندهای هیدروژنی درون غشایی دارند.



شکل ۶ مشخصه‌های ساختاری پپتید GL13K (الف) ساختار سه بعدی پپتید (مارپیچ آلفا) بر اساس مطلوب‌ترین امتیاز مدلسازی (ب) چرخه‌ی مارپیچی پپتید GL13K؛ ممان آبگریزی ۰،۲۶۴، آبگریزی ۰،۵۱۶ و بار خالص مثبت ۴، (پ) مدل اتمی پپتید GL13K. (<https://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr>) . (ب) چرخه‌ی مارپیچی پپتید GL13K؛ ممان آبگریزی ۰،۲۶۴، آبگریزی ۰،۵۱۶ و بار خالص مثبت ۴، (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin>) . (پ) مدل اتمی پپتید GL13K

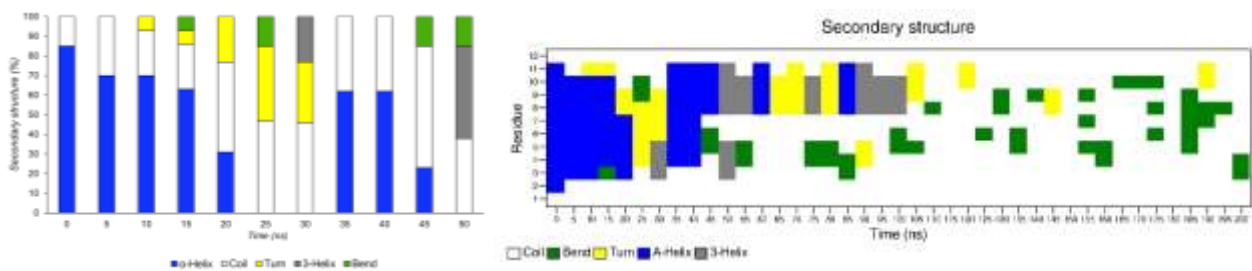
بررسی برهم‌کنش GL13K با مدل‌های انکوزوم ایستا و پویا: پپتید GL13K بصورت موازی و در فاصله‌ی تقریبی یک تا دو نانومتر بر فراز دو لایه‌های مدل قرار داده شد و روند برهم‌کنشی آن با هر دو لایه در طی ۲۰۰ نانو ثانیه،

با هدف بررسی رفتار ساختاری پپتید منفرد در حلال، شبیه‌سازی تمام اتمی پپتید انجام گرفت. آنالیز ساختار ثانویه‌ی پپتید در بازه‌ی زمانی ۲۰ نانوثانیه، حضور غالب آمینو اسیدها در ساختارهای مارپیچی را تأیید کرد (شکل ۷-الف).

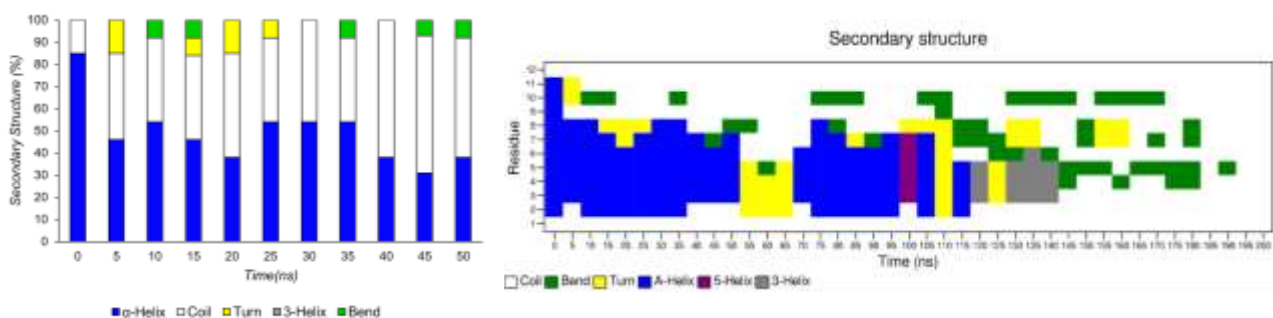
اسیدچرب فسفولیپیدها)، بر نحوه‌ی شکل‌گیری ساختار ثانویه‌ی پپتید، تأثیر دارد. پپتید GL13K همانند دیگر پپتیدهای زیست-فعال، در شرایط عادی، ساختار مشخصی ندارد و ویژگی‌های مارپیچی خود را تنها در ۲۰ نانوثانیه‌ی ابتدایی از زمان شبیه‌سازی در حلال آبی، حفظ می‌کند (۱۲).

رصد شد. آنالیز DSSP، گویای شکل‌گیری ساختارهای ثانویه‌ی متفاوت پپتید در روند شبیه‌سازی با غشاهای مدل است (شکل ۷ ب و پ). همان‌گونه که در (شکل ۷) مشخص شده است، مشارکت آمینواسیدهای انتهای N پپتید در ساختارهای مارپیچی بیشتر بوده و محتوای لیپیدی و درجه‌ی سیالیت غشاء (میزان اشباع بودن دنباله‌های

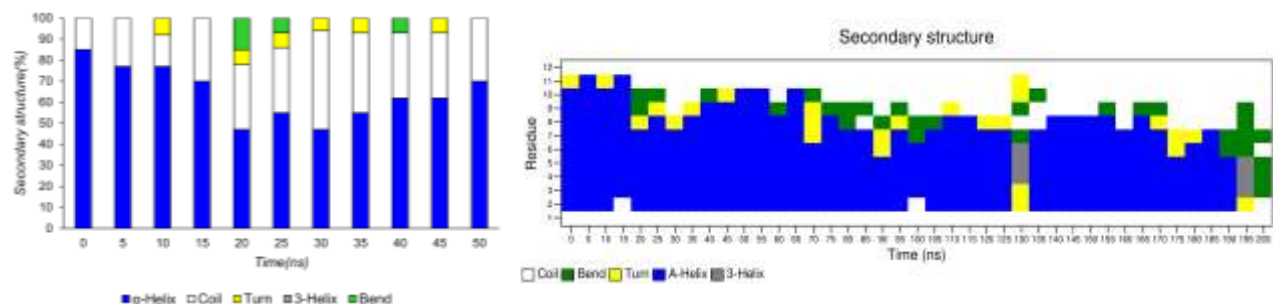
الف



ب



پ

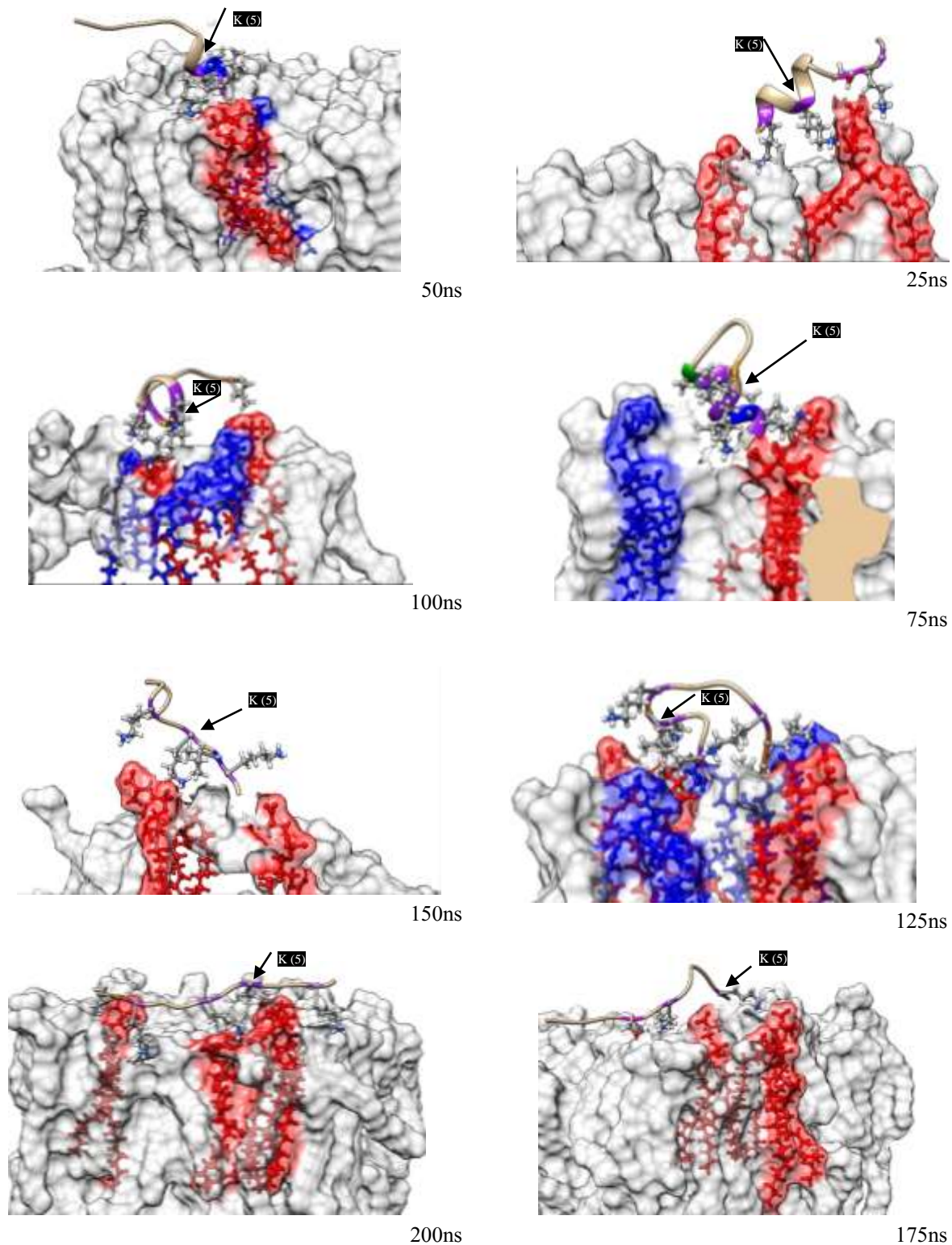


شکل ۷ بررسی ساختار ثانویه‌ی پپتید در سه شرایط گوناگون، تصاویر سمت راست آنالیز DSSP و تصاویر سمت چپ بیانگر درصد حضور هر یک از ساختارهای ثانویه‌ی محتمل در ۵۰ نانوثانیه‌ی ابتدایی از روند شبیه‌سازی. الف) پپتید در حلال آبی و شرایط فیزیولوژیک بدن انسان ب) پپتید در تعامل با غشای مدل انکوزوم ایستا پ) پپتید در تعامل با غشای مدل انکوزوم پویا



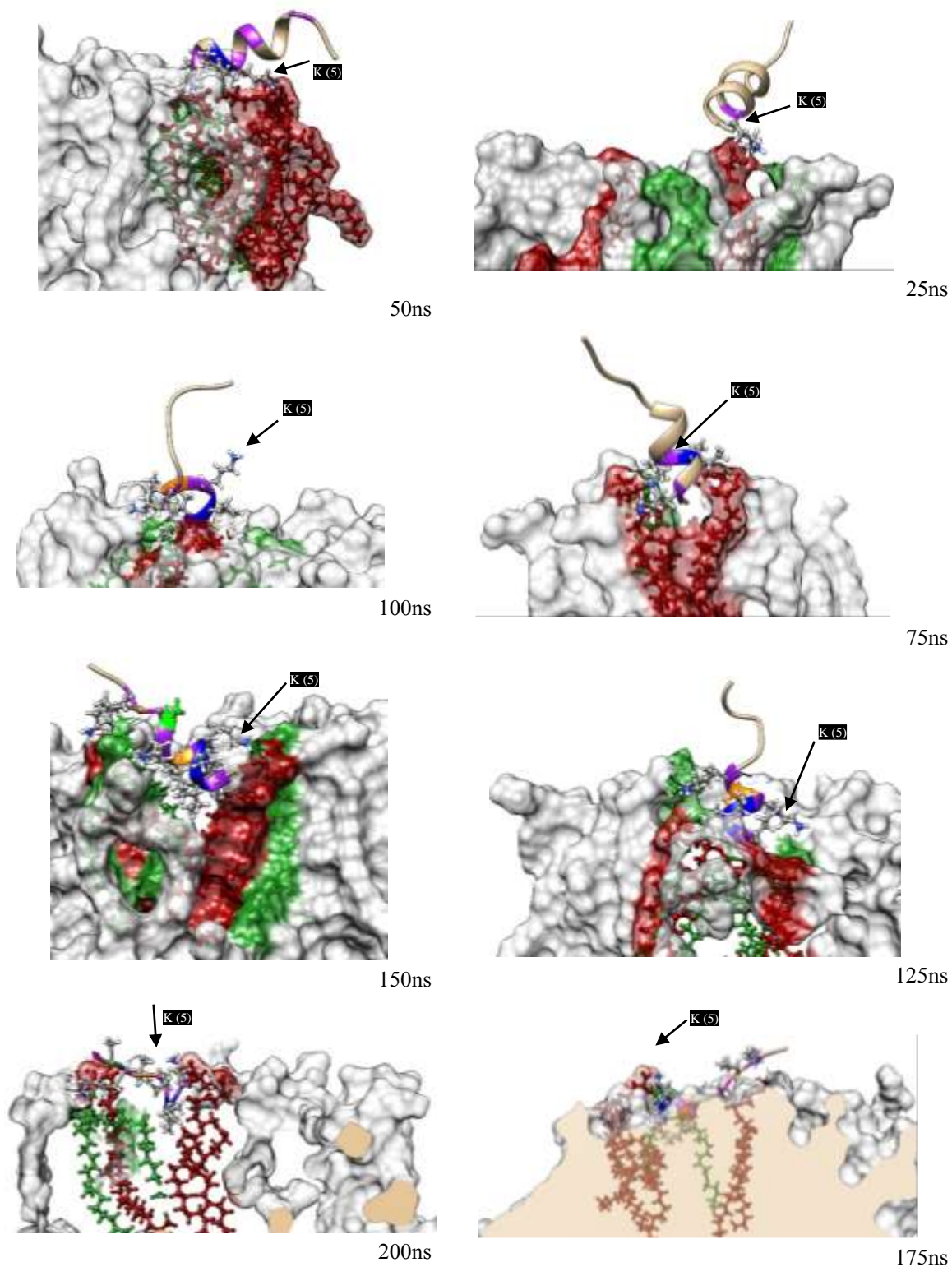
آمینواسیدهای قطبی و غیر قطبی پیش می‌برد (شکل ۹-۲۰۰ نانوثانیه).

زاویه گرفته و با سپری شدن زمان شبیه سازی (شکل ۹-۱۷۵ نانوثانیه)، ساختار ماریچی خود را از دست داده، با سطح غشاء موازی می‌شود و نفوذ خود را بواسطه‌ی



شکل ۸ برهم کنش پپتید (GLI13K) با غشای مدل انکوزوم ایستا (POPE:POPS)، در طی فواصل زمانی ۲۵ نانوثانیه از شبیه

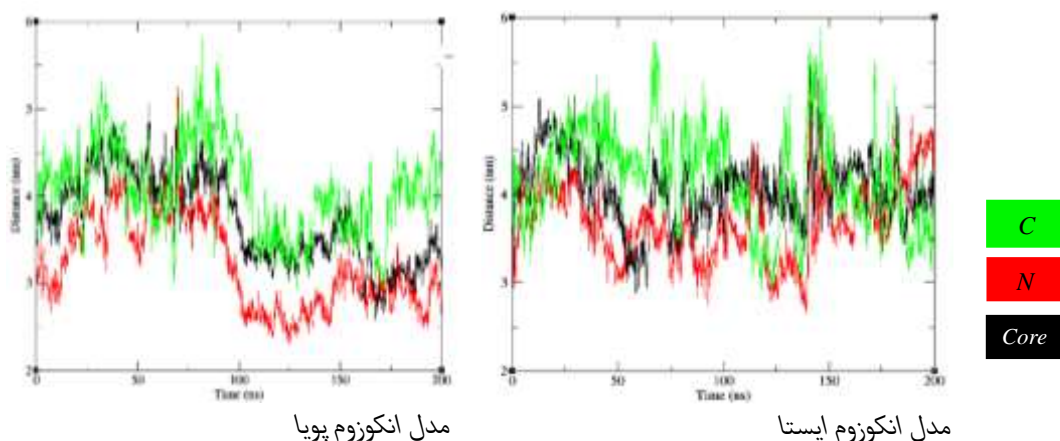
سازی تمام اتمی. رنگ بندی آمینو اسیدهای پپتید: لیزین (بنفش) - سرین (صورتی) - ایزولوسین (آبی) - لوسین (نارنجی). رنگ بندی فسفولیپیدها: POPE (آبی) - POPS (قرمز).



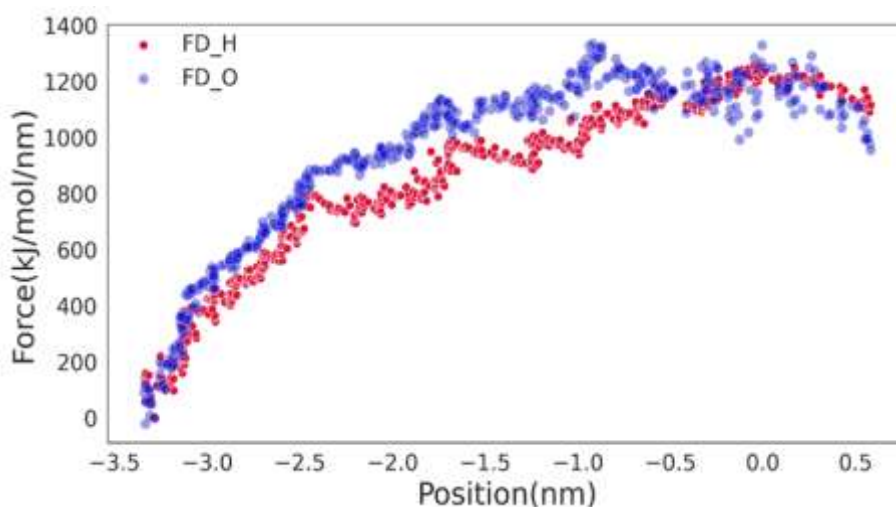
شکل ۹ برهم کنش پپتید GLI3K (GKIIKPKASLKL) با غشای مدل انکوزوم پویا در طی فواصل زمانی ۲۵ نانوثانیه از شبیه سازی تمام اتمی. رنگ بندی آمینو اسیدهای پپتید: لیزین (بنفش) - سرین (صورتی) - ایزولوسین (آبی) - لوسین (نارنجی). رنگ بندی فسفولیپیدها: SOPS (قرمز تیره) - SAPE (سبز)

حفظ ساختار مارپیچی KIKLKA پپتید در حین برهم کنش، نقش ویژه ای را ایفا می‌کند.

نتایج حاصل از برهم کنش‌های پپتید با هر دو مدل در فواصل زمانی ۲۵ نانوثانیه، اهمیت سیالیت غشاء بر نحوه‌ی برهم کنش را نشان می‌دهد. در هر دو مدل لیزین ۵ و



شکل ۱۰ میانگین فاصله‌ی پپتید GL13K با گروه‌های فسفات نیم‌لایه‌ی بالایی غشاهای مدل در طی ۲۰۰ نانوثانیه از زمان شبیه‌سازی. رنگ سبز نشان دهنده‌ی فاصله‌ی رزیجوهای انتهایی C، رنگ قرمز نشانگر رزیجوهای انتهایی N و رنگ مشکی نشان دهنده‌ی فاصله‌ی رزیجوهای میانی با غشاء.



شکل ۱۱ نمودار نیرو-جابجایی، رنگ قرمز نشان دهنده‌ی کشش پپتید به سمت مرکز جرم مدل ایستا و رنگ آبی نشان دهنده‌ی کشش پپتید به مرکز جرم مدل پویا است.

در چنین شرایطی پپتید برهم کنش و نفوذ بهتری را به نواحی سر و میانی غشای مدل پویا خواهد داشت. حضور فعال فسفولیپید غیراشباع SAPE با فضای سطحی بالا (جدول ۲) در روند برهم کنش‌های پپتید-غشاء نیز گویای این مطلب است. نتایج حاصل از آنالیز فاصله‌ی رزیجوهای

سیالیت بالای مدل انکوزوم پویا نسبت به مدل ایستا، سبب شده است که گروه‌های سر فسفولیپیدی، فضای سطحی بیشتری را احاطه کنند و بیشتر در معرض تعاملات محیطی (حلال-پپتید) قرار گیرند و از این رو مقاومت کمتری نسبت به تنش‌های برشی محیط داشته باشند (جدول ۴).

مرکزی، انتهای N و انتهای C پپتید با گروه‌های فسفات نواحی سر غشاهای مدل، اهمیت رزیجوه‌های دنباله N را تأیید می‌کند (شکل ۱۰).

پپتید در برهم‌کنش با هر دو مدل غشایی و بویژه مدل پویا

**جدول ۲- مساحت سطحی هر فسفولیپید**

POPS	SOPS	POPEE	SDPE	SAPE	SOPE	POPE	نوع فسفولیپید
۰,۶۰	۰,۵۹	۰,۶۰	۰,۶۴	۰,۶۴	۰,۵۶	۰,۵۸	مساحت سطحی (nm <sup>2</sup> ) ~

**جدول ۳- میانگین مساحت و ناحیه سطحی غشاء**

جدول ۳	میانگین مساحت و ناحیه سطحی غشاء	مدل
	میانگین مساحت غشاء (Y×X) ~ (nm <sup>2</sup> )	میانگین ناحیه ی سطحی هر فسفولیپید ~ (nm <sup>2</sup> )
ایستا	۲۸,۵	۰,۵۷
پویا	۲۹,۳	۰,۵۹

سرطان (۲۳)، نحوه ی برهم‌کنش پپتید زیست‌فعال GL13K با هر دو غشاء، توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**جدول ۴- ضخامت و شاخص تراکم پذیری سطحی مدل‌های غشایی**

مدل	D <sub>P-P</sub> (nm)	D <sub>C-C</sub> (nm)	K <sub>A</sub> (N/m)
انکوزوم ایستا	۴,۲۵	۳,۱۴	۱,۷۰
انکوزوم پویا	۴,۳۲	۳,۲۹	۱,۳۳

**دلایل ساخت دو لایه‌های مدل غشای سرطانی:**  
سلول‌های سرطانی، تحت تأثیر تغییرات متابولیکی و سطحی قرار می‌گیرند که می‌توان از این ویژگی‌ها برای توسعه‌ی درمان هدفمند سرطان استفاده کرد. در نگاه کلی دو ویژگی برجسته‌ی سلول‌های سرطانی از جمله تغییر شیب پروتون است که در مقایسه با سلول‌های سالم، pH درون سلولی و برون سلولی را غیرطبیعی می‌کند و مورد دیگر از دست دادن عدم تقارن چربی‌های غشایی است که

دینامیک مولکولی هدایت شده‌ی پپتید-غشاء: مقایسه‌ی نتایج حاصل از دینامیک مولکولی هدایت شده، تفاوت نیروی مورد نیاز برای کشش مرکز جرم پپتید به مرکز دو لایه را مشخص کرد. بررسی نمودار نیرو-جابجایی، تمایل برهم‌کنشی بالای پپتید GL13K را به غشای مدل انکوزوم پویا نسبت به مدل ایستا، نشان داد. این تمایل بویژه در نواحی سطحی غشاء و گروه‌های سر فسفولیپیدی بیشتر است (شکل ۱۱). همان‌طور که از شکل مشخص است، در مراحل اولیه‌ی برهم‌کنش، نیروهای زیادی حاکم نیست و رفته رفته با نزدیک شدن پپتید به سطح غشاء و شکل‌گیری برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی، نمودار حالت صعودی پیدا می‌کند. مقایسه‌ی هر دو روند شدت بالای نیرو را در برهم‌کنش‌های پپتید با مدل پویا و بویژه در فواصل |۱,۵-| تا |۱-| نشان می‌دهد (۲۷).

## بحث

در پژوهش حاضر، دو مدل از غشای سلول سرطانی انکوزوم در دو فاز صلب (ایستا) و سیال (پویا)، معرفی شد و با توجه به اهمیت پپتیدهای درمان‌گر در توسعه و درمان

اطلاعات حاصل از پروفایل لیپیدومی رده‌ی سلولی تومورهای جامد استفاده شود و نقش اسیدهای چرب غیر اشباع در سیالیت این غشاء مورد بررسی قرارگیرد. مقایسه‌ی نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دو مدل ایستا و پویا و همچنین نتایج مربوط به برهم‌کنش هر دو مدل با پپتید GL13K که در گروه پپتیدهای تخریب‌کننده‌ی غشاء جای دارد، اهمیت مدل‌های واقعی‌تر غشاء را در طراحی و یا تغییر آرایش پپتیدهای تخریب‌کننده برجسته کرد.

**تحلیل هندسه‌ی مدل‌های غشایی:** دینامیک مولکولی ۲۰۰ نانوثانیه‌ای از دولایه‌های منفرد غشایی، نقش اسیدهای چرب واجد چند پیوند دوگانه را در افزایش مساحت و ناحیه‌ی سطحی لیپیدها برجسته کرد. مقایسه‌ی آرایش فراوان‌ترین نوع اسیدهای چرب (اولئیک اسید-۱۸:۱) در هر دو مدل غشایی توسط آنالیز Scd، بی‌نظمی بیشتر این دنباله‌ها را در مدل انکوزوم پویا نسبت به مدل ایستا نشان داد. چنین روندی سیالیت بالای دو لایه‌ی پویا نسبت به دو لایه‌ی ایستا را بیان می‌کند که بواسطه‌ی حضور دیگر دنباله‌های اسید چربی آراشیدونیک (۲۰:۴) و دوکوزاهگزانوئیک (۲۲:۶) در این غشاها است. بطور معمول از هر فسفولیپید غشایی در مدل‌های انکوزومی، یک اسید چرب اشباع است و اسید چرب غیراشباع دیگر، یک یا چند پیوند دوگانه‌ی سیس را دارد. به ازای هر پیوند دوگانه، یک پیچ خوردگی کوچک در دم فسفولیپیدی ایجاد می‌شود و با ایجاد تغییر در هندسه‌ی سه بعدی اسیدچرب، فضای وان‌دروالسی بیشتری را در تقابل با اسیدچرب کناری اشغال کرده و با برقراری دافعه‌ی وان‌دروالسی بر نحوه‌ی در هم تنیدگی مولکول‌های فسفولیپید و در نتیجه سیالیت غشایی تأثیر می‌گذارد (۱، ۵۹). در این میان اهمیت PUFA ها دو چندان است. پژوهش‌های میکا و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی رده‌ی سلول‌های سرطان کلورکتال و همچنین پروفایل لیپیدومی حاصل از پژوهش‌های دوریا و همکاران روی سلول‌های سرطانی

منجر به در معرض قرارگیری فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل سرین در نیم‌لایه‌ی خارج سلولی غشاء می‌شود (۲۶، ۳۸، ۵۴). افزایش حضور فسفولیپیدهای آمین‌دار در نیم‌لایه‌های خارج سلولی، تراکم حضور اسید سیالیک، گلیکوپروتئین‌ها و هیپران سولفات‌ها را به همراه داشته و فضایی با بار منفی را شکل می‌دهد (۵۲). بررسی پروفایل لیپیدومی سلول‌های سرطانی از جمله سرطان‌های سینه (انواع خوش‌خیم و بدخیم)، همچنین سرطان‌های ریه (انواع مقاوم و حساس به سیسپلاتین) و سرطان‌های پروستات، نشان‌دهنده‌ی تفاوت محتوای لیپیدی غشاء از هر دو نظر تراکم فسفولیپیدهای آمین‌دار و همچنین درجه‌ی اشباع دنباله‌های اسیدچربی است (۱۱، ۳۱-۳۲). مشخص شده است که این میزان اختلاف در محتوای لیپیدومی غشای سلولی بین تومورهای ساکن با تومورهای تهاجمی بیشتر است (۴۴). دیگر بررسی‌ها، نشان دهنده‌ی حضور وزیکول‌هایی در محیط‌های توموری است که محتوای غشایی آن‌ها غنی از فسفولیپیدهای آمین‌دار بوده و به میزان کمتری از کلسترول را دارا هستند. این گروه از وزیکول‌های یک تا ۱۰ میکرومتری که انکوزوم نام دارند، جوانه‌های حاصل از سلول‌های توموری می‌باشند که محتوای فسفاتیدیل سرین و اتانول آمین آن‌ها از سلول‌های سرطانی مشتق شده نیز بیش‌تر است و با داشتن پویایی زیاد، ترکیبات بیواکتیو و فاکتورهای پیام‌رسان در متابولیسم سلولی از جمله برخی از نشان‌گرهای سرطانی همچون Cav-1 را در خود حمل می‌کنند (۳۲، ۳۴، ۴۹). در همین راستا مشخص شده است که انکوزوم‌های مربوط به سرطان سینه، می‌تواند مقاومت دارویی را در سلول‌های حساس به دوستاکسول (Docetaxol) ایجاد کند (۶-۷). بطور جالبی نشان داده شده است که تخریب این گروه از انکوزوم‌ها مانع از گسترش و تهاجم تومور به سایر سلول‌ها می‌شود (۳۴). با در نظرگیری موارد عنوان شده، در پژوهش حاضر دو نوع غشای انکوزوم ایستا و پویا مدل‌سازی شد. سعی بر این شد که در مدل پویا از

**تحلیل مکانیسم برهم‌کنشی پپتید با هر دو غشای مدل:**

پپتید زیست-فعال GL13K با داشتن ۱۳ آمینواسید و بار خالص +۵ در pH فیزیولوژیکی و ممان آبگریزی ۰،۲۶۴، در گروه پپتیدهای میکروبی تخریب‌کننده‌ی غشاء قرار می‌گیرد (۱۲). (شکل ۶). این پپتید بواسطه‌ی آمینواسیدهای لیزین موقعیت‌های ۲-۵-۱۱، بار کاتیونی را به پپتید اعمال کرده و از طریق آمینواسیدهای ایزولوسین و چهار رزیجوی لوسین، توزیع آمفی پاتیک پپتید را فراهم می‌کند (۲). پژوهش‌های صورت گرفته، نقش آمینواسید شماره‌ی ۶ (لوسین) و شماره‌ی ۹ (سرین) این پپتید را به ترتیب در مکانیسم‌های ضد بیوفیلمی و مهار لیپوبلی ساکاریدهای باکتریایی، اثبات کرده است (۵۲،۲). تشابه الکترواستاتیکی غشای سلول سرطانی با غشای باکتریایی و همچنین سمی نبودن علیه گلبول‌های قرمز انسان (دوزهای تأثیرگذار در غلظت‌های بالای ۷۰۰ میکرومولار)، پپتید GL13K را بعنوان پپتیدی موثر برای بررسی پتانسیل‌های ضد سرطانی مطرح کرده است (۴۲). بطورکلی، مکانیسم عملکرد پپتیدهای تخریب‌کننده‌ی غشایی، غیروابسته به گیرنده‌ی اختصاصی است و علاوه بر ساختار و ویژگی‌های بیوفیزیکی پپتید، به محتوای لیپیدی غشایی نیز وابسته بوده و از طریق مکانیسم‌های گوناگون از جمله بشکه-منافذ توروئیدال- مدل‌های کارپت و ایجاد تجمعات میسلی، غشای هدف خود را تخریب می‌کند (۵۲،۱۵). صرف نظر از نوع مکانیسم عملکردی، وجه مشترک تمام روش‌های تخریب، جذب سطحی اولیه‌ی آن‌ها به غشای هدف و شکل دهی تغییرات کنفورماسیونی احتمالی تا رسیدن به حد آستانه‌ی تخریب، بسیار حائز اهمیت است (۹). محتوای لیپیدی غشاء، در پایش چنین روندی تأثیرگذار است. بر همین اساس نتایج حاضر با تأیید نظریه‌ی وابسته بودن عملکرد پپتید به محتوای غشاء (۱۵)، نقش سیالیت غشای هدف را در نحوه‌ی جذب سطحی و تخریب آرایش دو لایه، نشان داد، به این صورت که تمایل پپتید GL13K برای برهم‌کنش با گروه‌های سر غشای انکوزوم پویا و نفوذ در

سینه، افزایش حضور اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه را در ساختارهای فسفولیپیدهای غشایی تأیید کرد (۱۱)، (۳۳). بر اساس تحقیقات انجام شده در سال ۲۰۱۴ در دانشگاه پورتلند که بر اهمیت حضور فسفولیپیدهایی با اسیدچرب دودکاهگزانوئیک (۲۲:۶) و نقش آن‌ها در ایجاد حالت‌های فازی در دو لایه‌های حاوی فسفاتیدیل کولین، متمرکز بود، تغییر در بسته بندی دولایه‌های کولین واجد دودکاهگزانوئیک اسید و افت نظم غشایی نسبت به دو لایه‌های ساده، اثبات شد. حضور اسیدچرب دودکاهگزانوئیک، با بی‌نظم‌تر کردن هسته‌ی هیدروفوبی غشاء، میزان نفوذ آب به دولایه‌ی غشایی را تسهیل می‌بخشد (۱۶). افزایش نفوذپذیری غشاهای واجد اسیدهای چرب چند پیوند دوگانه نسبت به مولکول‌های آب توسط هاستا و با تکنیک NMR-17O نیز اثبات شده است (۲۱). نتایج حاصل از مطالعات محاسباتی مدل‌های انکوزوم ایستا و پویا با یافته‌های تجربی همخوانی دارد. ضخامت بیشتر مدل ایستا و بواسطه‌ی تراکم هسته‌ی هیدروفوبی، نشان دهنده‌ی بسته بندی بهتر این دو لایه نسبت به مدل پویا است (۱). در سال ۲۰۱۷ پژوهشی توسط وانگ و همکاران انجام شد که در آن ناهمواری‌های سطحی و ویسکوالاستیسیته‌ی (Viscoelasticity) سلول‌های سرطانی سینه (انواع خوش خیم و بدخیم)، مورد بررسی قرار گرفت (۵۷). این گروه نشان داد که میزان ناهمواری‌های سطحی در رده‌های بدخیم و در مقایسه با رده‌های خوش خیم بیشتر بوده و سلول‌های تهاجمی، الاستیسیته‌ی کمتری دارند (۵۷). یافته‌های این گروه با نتایج تراجکتوری‌های شبیه سازی شده مبنی بر ناهمواری‌های غشایی (شکل ۲) و شاخص تراکم‌پذیری سطحی غشایی همخوانی دارد (جدول ۴). با جمع‌بندی نتایج شبیه‌سازی مدل‌های غشایی منفرد و تحلیل یافته‌های تجربی مشابه، می‌توان انکوزوم پویا را بعنوان وزیکول تغییرشکل یافته‌ی مشتق شده از سلول‌های سرطانی تهاجمی، معرفی کرد.

زمانی ۲۰۰ نانوثانیه، نشان می‌دهد. دینامیک مولکولی برهم‌کنش GL13K با مدل‌های غشایی و برهم‌کنش موثر آن با مدل پویا با نتایج حاصل از سنجش سلول‌های زنده (Cell viability assay) متاستاتیک رده‌ی سینه (MDA-MB-231) و گلوبول‌های قرمز همخوانی دارد (۵۲). نتایج مذکور اهمیت مدل‌های واقعی‌تر را در ردیابی برهم‌کنش‌های پپتید-غشاء، نشان می‌دهد و مدل پویا را بعنوان نماینده‌ای از غشاهای سرطانی تهاجمی و در طی بررسی‌های اولیه‌ی محاسباتی معرفی می‌کند. از سوی دیگر، آنالیز تراجکتوری‌های برهم‌کنش پپتید-غشاء، نقش بخشی از رزیجوهای درگیر (KPKLKA) و بویژه آمینواسید لیزین ۵ را برجسته کرد. جستجوی توالی عنوان شده در پایگاه داده‌ی پروزیت Prosite (<https://prosite.expasy.org>) نقش عملکردی برای این توالی را نشان نداد. بر این اساس، توالی مذکور می‌تواند بعنوان ساختار رهبر برای تغییر آرایش‌های گوناگون در راستای بهبود عملکرد و طراحی پپتیدهای کوچک ضد سرطانی، مورد ارزیابی قرار گیرد. در همین راستا، مدل‌های غشایی انکوزوم ایستا و پویا، بسته به نوع تابع هدف اولیه، می‌تواند فضای اولیه‌ی محاسباتی را شکل داده و روند غربالگری را تسهیل بخشد.

**چشم انداز آتی:** به منظور بررسی‌های بیشتر، پیشنهاد می‌شود، اجزای تأثیرگذار دیگر لیپیدی در روند سرطان‌زایی نیز وارد ساختار مدل‌های ایستا و پویا شده و نقش صلبیت غشایی در حضور سایر فسفولیپیدها و استرول‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد.

**تضاد منافع:** نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

نواحی درونی‌تر آن، بیشتر از مدل ایستا است. در بررسی‌های جزئی‌تر، اهمیت برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک در فرایند جذب سطحی پپتید (بعنوان اولین مکانیسم همگانی تعریف شده تاکنون) و نقش فضای در دسترس برای شکل دهی این برهم‌کنش‌ها، توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد بررسی و بحث واقع شد (۲۸، ۴۵). نکته‌ی قابل توجه در برهم‌کنش پپتید با هر دو مدل غشایی و از سمت N ترمینال است، روندی که در تلاش است بواسطه‌ی رزیجوهای KIKLKA، پایداری و نفوذ خود را تا پایان شبیه‌سازی در هر دو مدل استمرار دهد، با این حال جزء غشایی سرنوشت برهم‌کنشی را تغییر می‌دهد. در این پژوهش، اهمیت آمینواسیدهای کاتیونی از جمله لیزین ۵ و آمینواسیدهای هیدروفوب کناری در پیش‌برد برهم‌کنش‌های هیدروفوبی اثبات شد (۶۰). در همین راستا، حضور فسفولیپیدهای واجد اسیدهای چرب آراشیدونیک (SAPE) و دوکوزاهگزانوئیک (SDPE) در مدل انکوزوم پویا، با ایجاد فضای سطحی بیشتر غشایی نسبت به انکوزوم ایستا، پایداری برهم‌کنشی GL13K را تضمین می‌کنند. نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده با نمایش اختلاف نیروی کشش اعمالی در مسیر جابجایی پپتید به سمت مرکز جرم غشاء، اهمیت محتوای لیپیدی غشاء را در ایجاد تفاوت در نیروهای اعمالی، نشان می‌دهد (شکل ۱۱). در سال ۲۰۲۰ گروه تحقیقاتی رضانی، از این روش برای غربالگری ترکیبات موثر در گیاه زعفران، جهت نفوذ به غشای پلاسمایی ویروس کرونا استفاده کرد (۲۷). در همین راستا، پژوهش حاضر تمایل بالای جذب سطحی GL13K به دولایه‌ی انکوزوم پویا را نسبت به انکوزوم ایستا و در بازه

## منابع

- Baccouch R, Shi Y, Vernay E, Mathelié-Guinlet M, Taib-Maamar N, Villette S, Alves I. D (2022). The impact of lipid polyunsaturation on the physical and mechanical properties of lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1865(2):184084. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184084>.
- Balhara V, Schmidt R, Gorr SU, DeWolf C (2013). Membrane selectivity and biophysical studies of the antimicrobial peptide GL13K. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(9): 2193-2203. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.027>.

3. Bian X, Liu R, Meng Y, Xing D, Xu D, Lu Z (2021). Lipid metabolism and cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 218 (1):e20201606. <https://doi.org/10.1084/jem.20201606>.
4. Birge R, Boeltz S, Kumar S, Carln J, Wanderley J, Calianese D, Barcinski M, Brekken R, Huang X, Hutchins J (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death & Differentiation*, 23(6): 962-978. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.11>.
5. Buchoux S (2017). FATSLim: a fast and robust software to analyze MD simulations of membranes. *Bioinformatics* 33(1): 133-134. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw563>.
6. Chen W X, Cai YQ, Lv MM, Chen L, Zhong SL, Ma T F, Tang J H (2014). Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. *Tumor Biology*, 35: 9649-9659. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2242-0>.
7. Chen WX, Liu XM, Lv MM, Chen L, Zhao JH, Zhong SL, Tang, JH (2014). Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PloS one*, 9(4):e95240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095240>.
8. Cheng M, Bhujwalla ZM, Glunde K (2016). Targeting phospholipid metabolism in cancer. *Frontiers in oncology*, 6: 266. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00266>.
9. Ciumac D, Gong H, Hu X, Lu JR (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of colloid and interface science*, 537:163-185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>.
10. Dhuriya YK, Sharma D (2018). Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0>.
11. Dória ML, Cotrim CZ, Simões C, Macedo B, Domingues P, Domingues MR, Helguero LA (2013). Lipidomic analysis of phospholipids from human mammary epithelial and breast cancer cell lines. *Journal of Cellular Physiology*, 228(2):457-468. <https://doi.org/10.1002/jcp.24152>.
12. Ebrahimi F, Zarrabi M, Sharbatdar M, Abdi Ali A (2023). Biomechanical Investigation of Bacterial Biofilm Membrane and Assessment of the Anti-Biofilm Peptide Effects on Molecular and Biomechanical Characteristics of the Membrane: A Molecular Dynamics Investigation. *Cellular and Molecular Research Iranian Journal of Biology*. (-), -.
13. Eiriksson FF, Nøhr MK, Costa M, Böldvarsdóttir SK, Ögmundsdóttir HM, Thorsteinsdóttir M (2020). Lipidomic study of cell lines reveals differences between breast cancer subtypes. *PLoS One*, 15(4): e0231289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231289>.
14. Ghorbani, M, Soleymani H, Allahverdi A (2022). Design and Fabrication of a Microfluidic Device for Quantitative Analysis of Single Cell Migration and Invasive Assay. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(4), 483-498.
15. Gabernet G, Müller AT, Hiss JA Schneider G (2016). Membranolytic anticancer peptides. *MedChemComm*, 7(12): 2232-2245. <https://doi.org/10.1039/C6MD00376A>.
16. Gu Y (2014) The Effect of Docosaheptaenoic Acid (DHA)-Containing Phosphatidylcholine (PC) on Liquid-Ordered and Liquid-Disordered Coexistence. Portland State University
17. Harayama T, Riezman H (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(5): 281-296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
18. Herce HD, Garcia AE, (2007). Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52): 20805-20810. <https://doi.org/10.1073/pnas.070657410>.
19. Huang J, MacKerell AD (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of computational chemistry*, 34(25): 2135-2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.
20. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1): 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
21. Huster D, Jin AJ, Arnold K, Gawrisch K, (1997). Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by <sup>17</sup>O NMR. *Biophysical journal*, 73(2): 855-864.
22. Jafari M, Mehrnejad, F, Talandashti, R, Doustdar F, Vakili M. R, Lavasanifar A. (2021). Effect of the lipid composition and cholesterol on the membrane selectivity of low generations PAMAM dendrimers: A molecular dynamics simulation study. *Applied Surface Science*, 540: 148274.
23. Kharazmi-khorassani J, Asoodeh A. (2022). The use of anticancer and cell-penetrating peptides in the treatment of cancer. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 35(2), 183-197.
24. Kim SK, Cho SW (2022). The evasion mechanisms of cancer immunity and drug intervention in the tumor microenvironment. *Frontiers in Pharmacology*, 13: 868695. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.868695>.
25. Klähn M, Zacharias M (2013). Transformations in plasma membranes of cancerous cells and resulting consequences for cation insertion studied with molecular dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(34): 14427-14441. <https://doi.org/10.1039/C3CP52085D>.

26. Koltai T, Reshkin SJ, Harguindey S (2020). An innovative approach to understanding and treating cancer: targeting pH: from etiopathogenesis to new therapeutic avenues. Academic Press.
27. Kordzadeh A, Saadatabadi AR, Hadi A (2020). Investigation on the penetration of saffron components through lipid bilayer bound to spike protein of SARS-CoV-2 using steered molecular dynamics simulation. *Heliyon*, 6(12): e05681. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05681>.
28. Lamaziere A, Burlina F, Wolf C, Chassaing G, Trugnan G, Ayala-Sanmartin J (2007). Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides. *PLoS One*, 2(2): e201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000201>.
29. Lankry D, Rovis TL, Jonjic S, Mandelboim O (2013). The interaction between CD 300a and phosphatidylserine inhibits tumor cell killing by NK cells. *European Journal of Immunology*, 43(8): 2151-2161 <https://doi.org/10.1002/eji.201343433>.
30. Lee J, Patel DS, Stähle J, Park SJ, Kern NR, Kim S, Lee J, Cheng X, Valvano MA, Holst O (2018). CHARMM-GUI membrane builder for complex biological membrane simulations with glycolipids and lipoglycans. *Journal of chemical theory and computation*, 15(1): 775-786. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01066>.
31. Liang X, Huang, Y. (2002). Physical state changes of membrane lipids in human lung adenocarcinoma A549 cells and their resistance to cisplatin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(10): 1248-1255.
32. Llorente A, Skotland T, Sylvänn, T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, Sandvig K (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(7): 1302-1309.
33. Mika A, Pakiet A, Czumaj A, Kaczynski Z, Liakh I, Kobiela J, Sledzinski T (2020). Decreased triacylglycerol content and elevated contents of cell membrane lipids in colorectal cancer tissue: a lipidomic study. *Journal of clinical medicine*, 9(4):1095.
34. Minciacchi V R, Freeman MR, Di Vizio D (2015). Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. In *Seminars in cell & developmental biology* 40: 41-51.
35. Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T (2016). Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death & Differentiation*, 23(6): 952-961. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.7>.
36. Nicolson GL (2015). Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis. *Cancer Research*, 75(7): 1169-1176. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3216>.
37. Nieva C, Marro M, Santana-Codina N, Rao S, Petrov D, Sierra A (2012). The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *Plos one*, 7(10):e46456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046456>.
38. Parks SK, Chiche J, Pouysselgur J (2013). Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(9): 611-623.
39. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13): 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
40. Pogozheva ID, Armstrong GA, Kong L, Hartnagel TJ, Carpino CA, Gee SE, Picarello DM, Rubin AS, Lee J, Park S (2022). Comparative molecular dynamics simulation studies of realistic eukaryotic, prokaryotic, and archaeal membranes. *Journal of chemical information and modeling*, 62(4): 1036-1051. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01514>.
41. Radhakrishnan N, Kaul SC, Wadhwa R, Sundar D (2022). Phosphatidylserine exposed lipid bilayer models for understanding cancer cell selectivity of natural compounds: A molecular dynamics simulation study. *Membranes*, 12(1): 64 <https://doi.org/10.3390/membranes12010064>.
42. Riedl S, Zwegtlick D, Lohner K (2011). Membrane-active host defense peptides—challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and physics of lipids*, 164(8): 766-781.
43. Rivel T, Ramseyer C, Yesylevskyy S (2019). The asymmetry of plasma membranes and their cholesterol content influence the uptake of cisplatin. *Scientific Reports*, 9(1): 5627. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41903-w>.
44. Sampaio JL, Gerl, MJ, Klose C, Ejsing CS, Beug H, Simons K, Shevchenko A. (2011). Membrane lipidome of an epithelial cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5): 1903-1907.
45. Seelig J. (2004). Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1666(1-2): 40-50 <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.004>.
46. Sevcsik E, Pabst, G, Jilek A, Lohner K. (2007). How lipids influence the mode of action of membrane-active peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(10): 2586-2595.
47. Shen Y, Maupetit J, Derreumaux P, Tufféry P (2014). Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. *Journal of chemical theory and computation*, 10(10): 4745-4758. <https://doi.org/10.1021/ct500592m>.

48. Simon, S, Roy D, Schindler M (1994). Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(3): 1128-1132. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.112>.
49. Srivatsav AT, Kapoor S. (2021). The emerging world of membrane vesicles: Functional relevance, theranostic avenues and tools for investigating membrane function. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8: 640355.
50. Stafford HJ, Thorpe PE (2011). Increased exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of tumor vascular endothelium. *Neoplasia*, 13(4): 299-IN292. <https://doi.org/10.1593/neo.101366>.
51. Stoica C, Ferreira AK, Hannan K, a Bakovic M (2022). Bilayer forming phospholipids as targets for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9): 5266. <https://doi.org/10.3390/ijms23095266>.
52. Suardiaz PJ, (2021). A mechanistic approach to studying the antimicrobial and anticancer activity of GL13K-based peptides through their interaction with model membranes. Concordia University, Doctoral dissertation.
53. Tan L, Chan KG, Pusparajah P, Lee WL, Chuah LH, Khan TM, Goh BH. (2017). Targeting membrane lipid a potential cancer cure? *Frontiers in pharmacology*, 8(12).
54. Van EM, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1996). A novel assay to measure the loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 24(2): 131-139
55. Van MG (2011). Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(5): a004671. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004671>.
56. Van MG (2011). Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(5): a004671. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004671>.
57. Wang Y, Xu, C, Jiang N, Zheng L, Zeng J, Qiu C, Xie S. (2016). Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy. *Scanning*, 38(6): 558-563.
58. Wang X, Zhang H, Chen X (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2): 141. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>.
59. Yang J, Jin J, Li S (2021). Role of polyunsaturated phospholipids in liquid-ordered and liquid-disordered phases. *RSC advances*, 11(44): 27115-27120. <https://doi.org/10.1039/D1RA02692E>.
60. Yang Y, Dias DL (2023). Peptide-Membrane Binding: Effects of the Amino Acid Sequence. *The Journal of Physical Chemistry B*, 127(4): 912-920. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c06404>.
61. Zaeifi D, Najafi A, Mirnejad R. (2023). Molecular Dynamics Simulation of Antimicrobial Peptide CM15 in Staphylococcus Aureus and Escherichia coli Model Bilayer Lipid. *Iranian Journal of Biotechnology*, 21(2): e3344.
62. Zalba S, Hagen TLT (2017). Cell membrane modulation as an adjuvant in cancer therapy. *Cancer treatment reviews*, 52: 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008>.

# Introducing membrane models for cancer cell and evaluating their functional role in response to bioactive peptides, using All-atom and Steered molecular dynamic simulations

Dabbagh Sadeghpour S.<sup>1</sup>, Zarrabi M.<sup>1</sup>, Balalaei S.<sup>2</sup> and Ramezani R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bioinformatic Lab, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Peptide Chemistry Research Institute, Khajeh Nasir Toosi University of Technology, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Biomedical Lab, Famil Research Center, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

## Abstract

Molecular dynamic simulation provides computational insights into membrane alterations during interaction with peptides and chemical drugs. In such a case, modeling realistic bilayers is critical because the peptide-membrane interactions depend on bilayer lipid compositions. According to these facts, in this project two cancerous bilayers as static(solid) and dynamic(fluid) models, constructed and the effect of saturation degree on bilayer function was analyzed by incorporating polyunsaturated fatty acids on bilayer hydrophobic core. Then their interaction with GL13K peptide were evaluated using All-atom and Steered molecular dynamic simulations. Based on results, dynamic model, provides acceptable surface area for primary interaction, surface adsorption, and peptide penetration during 200ns than static one. The persistence of these interactions in static models changed after 50 ns of simulation and after that time, the peptide lost its dominant helical structure. Steered MD simulation, also demonstrated the high binding affinity of peptide to the surface of dynamic model. Tracking interactions during 25ns intervals, revealed the key function of Lysine5 in peptide structure and highlighted the importance of realistic model bilayers in forming stable peptide-bilayer interactions.

**Keywords:** Computational biology-Oncosome-Polyunsaturated fatty acids