

РЕЗЮМЕТА ОТ ПУБЛИКАЦИИ

за участие в конкурс за професура

на доц. д-р Петър Миланов

(СЕЛЕКТИРАНА ИЗДВАДКА)

A. ОПТИМАЛНОСТ НА ГЕНЕТИЧНИЯ КОД.

Trenchev I., Milanov P., Pencheva N. (2002) The genetic code optimality. **Proceeding of the sixth Intern. conf. Discrete Math. and Appl.** Aug. 29- Sep. 2, 2001, Blagoevgrad. 179-191.

The genetic code could be considered as a system of storage, transmission, execution and regulation of the information encoded in the genes. The notion of resistance of the genetic code against the effect of mutations, which are equivalent of the errors inherent to all information systems, is analyzed. It is to be expected that contemporary genetic code is a structure ensures maximum resistance to mutation effects. So it is worthy to analyze this problem. It is can be shown that different theoretical codes built from a fixed number of triplets resist to the effect of mutations differently depending on the relative positions of their codons in the 64 possible divisions The previous works in this area analyzed the optimality of groups of triplets into the same amino acid. It hasn't been measured correctly the resistance of the whole genetic code to the creation of non-synonym mutations. In the present paper we define measures of - resistance of the genetic code and corresponding optimization principles It is observed a good correspondence between the contemporary genetic code and the theoretical ones.

Съвременният генетичен код е важен за правилното декодиране на информацията записана в гените. С решението на оптимизационни задачи с подходящо избран от нас критерии са изследвани свойствата на генетичния код. Като оптимизационни критерии са използвани вероятността за появата на една аминокиселина в усреднен белтък, вероятностите за появата на прости мутации в първата, втората или третата позиция на кодона.

Milanov P., Trenchev I., Pencheva N. (2003) Explicit description of the set of all theoretical genetic codes., **Mathematica Balkanica**, Vol. 17(1-2), 157-165.

An aspect of the evolution of the genetic code is to minimize the number of the errors during transcription and translation. In the pertinent literature this problem is analyzed by comparing of the genetic code and the set of theoretical codes generated randomly. In this study we present an explicit description of the set of all theoretical genetic codes as a convex polytope and prove that the characteristic vectors of these codes are vertices of this polytope. Thus, the modelling, obtained by us, threw a new light on the mathematical analyze of the optimality of the genetic code, and allow a new classes of optimization problems to be formulated and investigated, including the minimization of the errors.

At the same time the natural genetic code reveals the maximum resistance towards the translation errors. The polytope description obtained by us, gives a possibility to analyze the properties of all theoretical genetic codes, to characterize their translation errors and to compare them with those of the contemporary genetic code. Our calculations confirm that the classical genetic code is closed to the optimal one, with respect to point mutations. However, the further analysis does not give much information about the mechanism of this evolution with respect to the minimization of the mutation errors.

В статия е предложено експлицитно описание на множеството на всички теоретични генетични кодове като изпъкнал многостен и върховете му са всички теоретичните генетични кодове. Това дава възможност да се решават широк кръг от оптимизационни задачи с различни целеви функции и да се разкрият по добре свойствата на съвременния генетичния код. Като допълнителен факт е доказано, че многостенът е сечение на два полиматроида.

Велков Ж., Тренчев И., Таджер А., Пенчева Н., **Миланов П.** (2006) Стабилност на олигонукелотиди, кодиращи [Met⁵] енкефалин. **Сборник от международната научна конференция на ПМФ, 09-11.06.2005**, Благоевград, България, 116-120

По чисто математичен път са формулирани критерии за устойчивост (изменчивост) на генетичната информация заложена в първичната структура на

нуклеиновите киселини. В тази работа се прави опит за оценка на тези критерии чрез съпоставянето им със свойства на олигонуклеотиди получени чрез молекулно-механични изчисления.

За получаването на адекватни молекулни модели на олигонуклеотиди, кодиращи структурата на [Met⁵]-енкефалин, е използван програмния пакет Hyperchem 7.0 и силовото поле AMBER 96. Оптимизирана е структурата на моделите и изчислена тяхната потенциалните енергии.

Сравнението на изчислените по този начин енергии дава възможност да се проверят изведените критерии и да се оцени еволюционния потенциал на изследваните олигонуклеотиди.

Keywords: устойчивост на генетичната информация, олигонуклеотиди, молекулна механика,

Trenchev I., **Milanov P.**, Velkov Z., Pencheva N., & Tadjer A. (2009) Stability of oligonucleotides as a criterion for resistance of the genetic code. **Scientific Research Journal of South-West University**, Vol. 2(1): 11-19.

Different criteria for gene stability have been derived mathematically. To our knowledge, there has been no experimental or theoretical support of these criteria so far. This study presents the results of an attempt to evaluate the mathematical criteria for gene stability based on the potential energy of the coded oligonucleotides. This energy strongly depends on the code considered: contemporary (CGC) or theoretical genetic code, because nucleotides sequences coding particular chains define specific internucleotide interactions. Mathematical modeling of CGC, algorithm for solving of the discrete optimization problems and fully parametrized computational chemistry methods are employed. Methionine enkephalin coding oligonucleotides are used as model systems. Parameters of the mathematically generated and natural oligonucleotides, including the potential energy, were calculated and analyzed. Additional search in biological databases for the occurrence of the nucleotide sequences in biological species was also undertaken. Optimal oligonucleotide sequences for various codes, including CGC, were established and compared in various species. The resistance of the code against point mutations was evaluated. The results obtained make it feasible to suggest that: (i) the computational chemistry methods together with appropriate mathematical modeling are useful tools for the investigation of genetic code stability; (ii) the lowest species reveal the highest values of the "average potential energy", while the lowest values are typical for

humans and mammals; thus the methodology presented allows investigations on the evolution of the biological species.

Keywords: contemporary genetic code; potential energy; resistance; mathematical modeling; discrete optimization

За да анализираме стабилността на ДНК молекулата, са сравнени потенциалните енергии на нуклеотидните последователности, които кодират един и същ късоверижен белтък, но са генерирани от съвременен генетичен код (СГК) и „оптимален“ теоретичен генетичен код (ТГК), получен при решаването на някои от екстремалните задачи от изследване на свойствата на СГК. За моделиране на ДНК фрагменти използвахме метода на молекулната механика, като оптимизацията на енергията на моделните олигонуклеотиди се извършва във вакуум. Този подход е единствено възможен за молекули с такъв размер (съдържащи около 1000 атома). Изчисляването на оптимална структура на моделните олигонуклеотиди с помощта на по-точни квантовохимични методи или пресмятане на енергията във водна среда изисква огромни изчислителни ресурси. При изчисления чрез молекулна механика (ММ) могат да бъдат сравнявани потенциалните енергии само на молекули с еднакъв атомен (нуклеозиден) състав. Изследвахме късоверижен белтък, защото нуклеотидните последователности, които го кодират, са също къси и можем да изчислим тяхната потенциална енергия.

Причината, поради която се спряхме върху белтъка ([Met⁵]) енкефалин е, че: (а) е късоверижен, т.е. изграден е от само от 5 АК, и (б) може да се открие в различни видове, принадлежащи към гръбначните животни. [Met⁵] енкефалин с аминокиселини секвенции Н -Тур – Gly – Gly – Phe – Met-ОН, е ендегенен пептид с морфино-подобно действие. Той произлиза от молекула предшественик, наречен прекурсор, който се кодират от различни гени в ДНК. От прекурсора проенкефалин се фрагментират 6 копия на [Met⁵] енкефалин и 1 копие на [Leu⁵] енкефалин, и други аналози с по-слабо действие. Продинорфинът е източник на динорфин А, динорфин В, и др., и съдържа 5 копия на [Leu⁵] енкефалин.

За да изследваме устойчивостта на ДНК молекулата, респективно предаването на наследствената информация в първия биологичен канал, ние следвахме следния алгоритъм: (а) генерирахме всички възможни комбинации на [Met⁵] енкефалин, съгласно СГК и избран от нас ТГК; (б) определихме кои от комбинациите реално съществуват в природата чрез търсене в БД с нуклеотидни и аминокиселини секвенции за енкефалини, чрез техните прекурсорни молекули; (в) формулирахме комбинации,

които имат един и същ брой нуклеотиди и еднакъв атомен състав; (г) изследвахме молекулно-механичните параметри на секвенциите с един и същи брой нуклеотиди чрез софтуерно моделиране на ДНК; и (д) анализирахме връзката между реалните и някои теоретични варианти на нуклеотидни секвенции на [Met⁵]енк и молекулно механични параметри на тези ДНК сегменти, като критерии за конформационна устойчивост на молекулата и респективно като условие за оптималност на ГК.

В. МАТЕМАТИЧЕСКО МОДЕЛИРАНЕ НА ФАРМАКОЛОГИЧНИЯ АГОНИЗЪМ

Milanov P. Pencheva N., Barthova J., Barth T., Milanov A. (2003) Affinity and agonist efficacy of mu-selective Dalargin analogs. **Compt. Rend. Acad. Sci. Bulg.**, Vol.56 (1), 93-98, (IF = 0.219)

Abstract. [D-Ala²,Leu⁵]-enkephalyl-Arg (dalargin) and its analogues [D-Ala²,Leu⁵]-enkephalyl-Arg-NH₂ and [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Leu⁵]-enkephalyl-Arg-NH₂ have been found to possess high potency and selectivity for mu-opioid receptors. The purpose of this study was to estimate the receptor affinity and relative agonist efficacy of these peptides in in vitro functional bioassay. The guinea-pig-isolated ileum-longitudinal muscle preparations were used. Cumulative dose-response relations obtained, were analysed by a procedure derived from a hyperbolic model of pharmacological agonism, which allows to calculate by explicit formulas agonist affinity (K_A) and relative efficacy (e_A) of the peptides. Dose-response curves were approximated with two- and three-parametric hyperbolic functions. The results obtained showed: (i) two-parametric hyperbolic function with a constraint for more potent compounds allows a good approximation of the dose-response relations obtained and easy calculation of the parameters K_A and e_A; (ii) substitution of COOH terminal in the molecule of dalargin with NH₂ group increased about two times the potency and five times the efficacy of [D-Ala²,Leu⁵]-enkephalyl-Arg-NH₂, as compared with dalargin; as light decrease of affinity is also observed; (iii) N-methylation of the aromatic group of Phe⁴ together with CONH₂ terminal extremely increase the potency (about 34 times), affinity (4.4 times) and efficacy (six times) of the analogue [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Leu⁵]-enkephalyl-Arg-NH₂, as compared with dalargin. The results of these analyses permitted us to observe the effect of structural modification on both receptor affinity and

relative agonist efficacy to mu-opioid receptors. Affinity and efficacy should be incorporated as a drug design considerations for the selective opioid agonists.

Key words: opioids, enkephalins, dalargin, affinity, efficacy, curve fitting

Milanov P., Pencheva N., Trenchev I., Milanov A., (2004) Molecular design of selective enkephalin analogues by neural network modeling. **Compt. Rend. Acad. Sci. Bulg.** Vol 57. 27-29, (IF = 0.219).

Abstract. The theory of artificial neural networks as an interconnected assembly of simple processing units (whose functionality is loosely based on the animal neuron) is briefly reviewed focusing on techniques which have great impact on current chemical applications. The objects of neural network modelling in this study are endogenous peptides and their analogues with morphine-like properties (enkephalins). Explicit formulas for calculation of the pharmacological agonism of these peptides were presented. Design of network type and architecture for modelling of sequence-activity, sequence-selectivity and sequence-efficacy relationships in enkephalin analogues is further developed by nonlinear modelling of quantitative structure-activity relationships using a multilayered feed forward network. The type of the so-called transfer or fitness functions are determined in the different layers of the network. Advantages of more complex network architecture which allow to predict potency, efficacy and selectivity of the enkephalins were characterized.

Key words: neural networks, molecular design, drug design, network architecture, transfer function

Milanov P., Pencheva N., (2011) Theoretical hyperbolic model of a partial agonism: explicit formulas for affinity, efficacy and amplification. **Serdica Journal of computing**, 2011, Vol. 5(4), 333-358

Abstract. The quantitative analysis of receptor-mediated effect is based on experimental concentration-response data in which the independent variable, the concentration of a receptor ligand, is linked with a dependent variable, the biological response. The steps between the drug-receptor interaction and the subsequent biological effect are to some extent unknown. The shape of the fitting curve of the experimental data may give some in-sights into the nature of the concentration-receptor-response (C-R-R)

mechanism. It can be evaluated by non-linear regression analysis of the experimental data points of the independent and dependent variables, which could be considered as a history of the interaction between the drug and receptors. However, this information is not enough to evaluate such important parameters of the mechanism as the dissociation constant (affinity) and efficacy. There are two ways to provide more detailed information about the C-R-R mechanism: (i) an experimental way for obtaining data with new or selective or inactive compounds; and (ii) a theoretical way by making additional assumptions and experimental observations about some elements of the C-R-R mechanism. Using the second way and basic postulates of the so-called occupation theory, a Theoretical Hyperbolic Model (THM) was developed in this study, in order to justify the nature of partial agonism in in-vitro bioassay studies. The model could be used for sensitive analysis of the partial agonist's behavior from the experimental dose-response data. The explicit formulas derived from the model describe the affinity and relative Stephenson's efficacy. Moreover, THM allows estimation of the receptor reserve of the almost full agonists under the assumption presented. When the design of the in-vitro bioassay allows assessing the maximal possible effect of a given isolated tissue, the affinity and relative efficacy of the respective partial agonists could be calculated from the experimental dose-response data. It was proved theoretically that the partial agonists have no receptor reserve. This finding confirms experimental results for partial agonists with varying potency. The THM is used further to explain the C-R-R mechanism and to understand more deeply the character of the affinity and efficacy of the agonists by introduction of a new agonist feature called amplification and the parameter amplifier. The THM is compared with other models related with the occupation theory of agonism. The differences and limitations of the application of THM are discussed.

Mialnov P., Pencheva N., Trenchev I., Vitanov A. (2008) The slope as a parameter in fitting of concentration-response relations. **Proceeding of the fourth International Bulgarian-Greek Conference - Computer Science' 2008**, 18 – 19.09.2008, Kavala, Greece, Vol.1, 90-97.

Abstract: To elucidate the role of the slope as a parameter in fitting of concentration-response curves in the quantitative pharmacology, four enkephalin analogues were tested for their effectiveness in depressing electrically evoked contractions in some isolated tissues, containing specific receptors for the enkephalins. The experimentally obtained inhibitory

effects in a form of curves and two computer's simulated data points, were approximated with both - two- parametric hyperbolic function (TPH: $E = \frac{a_0[A]}{[A] + [A]_{50}}$) and three parametric hyperbolic- function (THPH: $E = \frac{a_0[A]^p}{[A]^p + [A]_{50}^p}$): A - opioid agonist; [A] - concentration of the agonist; E - the measured inhibitory effect; a_0 - the asymptote ($a_0 = E_m$ where E_m maximum response of A and E^A potential response of the tissue); $[A]_{50}$ - a location parameter, which is the concentration of an agonist, which produces $0.5 E_m$; and p-the slope parameter The obtained results suggest that: (i) the approximation with TPH and THPH is appropriate when the value of slope belongs to the interval (0.70, 1.30). additional procedure's have to be applied for these cases when the differences between theoretical E_m and experimental E_{Am} are significant: (ii) when the value of slope belongs to the interval (0.00, 0.60) the fitting with THPH is better than TPH; (iii) the value of slope is less than 0.30 for partial agonists with E^A lower than 0.30 and low efficacy, the fitting functions for these cases could be THPH or straight line, which depends from the distribution of the experimental data points The dissociation constant K_A and relative efficacy em_i were determined using explicit formulas derived by fitting of the data points with TPH.

Keywords: Concentration-response curves; Affinity; Efficacy; Slope; Partial agonist.

В настоящата разработка е направено изследване, което цели да се изясни ролята на наклонът като параметър при фитване на криви, съответстващи на концентрацията на активно вещество при количествената фармакология. Бяха тествани четири енкефалинови аналози за тяхната ефективност чрез електрически предизвикани контракции в някои изолирани тъкани, съдържащи специфични рецептори за енкефалина. Експериментално полученият инхибиторен ефект е представен във формата на криви и двете компютърно симулирани точки с данни, които са апроксимирани с две: дву- параметрична хиперболична функция (TPH; $E = \frac{a_0 [A]}{[A]_{50} + [A]}$) и три параметрична хиперболична функция (THPH; $E = \frac{a_0 [A]^p}{[A]_{50}^p + [A]^p}$); A- агонист опиоид; [A] – концентрация на агониста; E- измереният инхибиторния ефект; a_0 , и са асимптоти (E_m^A - максимум отговор от A, $[A]_{50}$ е локален параметър (концентрация на агонист, който произвежда $0.5 E_m^A$ и p наклона на кривата. Параметрите IC_{50} - концентрация на агонист, който произвежда $0.5 E_m^T$ (потенциалния максимум отговор на тъканта) и A_{50} , също са изчислени. Полученият резултат предполага, че: (i) Приближаването с TPH и THPH е подходящо, когато стойността на наклона принадлежи на интервала (0.70, 1.30). Трябва да се приложат допълнителни процедури, когато разликите между теоретичните и експериментални E , A_m са значителни (ii)

Когато стойността на наклона принадлежи на интервала (0.00, 0.60) използването на ТНРН е по добро, отколкото с ТРН, (iii) Когато стойността на наклона е по-малка 0.30 за частични агонисти с E_m^A по-ниско от 0.30 и ниска e_{rel} . Функциите за фитване при тези случаи трябва да са ТНРН или права линия, което зависи от разположението на експерименталните точки с данни.

С. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОСТРАНСТВЕНАТА СТРУКТУРА НА ПРОТЕИНИТЕ

Yanev N., **Milanov P.**, Trenchev I., Mirchev I. Integer programming approaches to HP folding // [poster] Eight European Workshop in Drug Design, Certosa di Pontignano, Siena – Italy, May 22nd-29th, 2011

Protein is a biological macromolecule compounded of a sequence of amino acids. The functional properties of a protein are based on its three-dimensional (3D) structure. One of the most popular protein structure prediction methods, called hydrophobic-hydrophilic (HP) model is based on the observation, that in a polar environment, peptides hydrophobic amino-acids are in a kernel of the molecule – in contact between them and more polar amino-acids in contact with the polar environment. The fold spaces are integer lattices of various kind.

For this problem, we propose a new integer programming model, whose LP relaxation provides sharp upper bound for the maximum number of contacts and allowing for solving the problem by the usage of conventional tools such as CPLEX solver. The proposed model is easily adaptable to arbitrary search space: square or cubic lattices, face centered cubic lattice, etc. Comparative results for two concrete peptides: orexin and hypotensive hormone will be presented as well.

Протеините са биологични макромолекули от последователност от аминокиселини. Свойствата на протеините зависят от 3D структурата на протеините. Един от най-разпространените методи за предсказване на пространствената структура на белтъците е HP модела. Той е базиран на свойството хидрофилност на аминокиселините т.е. хидрофобните аминокиселини се позиционират вътре в ядрото на молекулата.

В това изследване е представен нов целочислен модел, за който LP релаксацията осигурява горна граница на максималния брой контакти и позволява

решаването на проблема с традиционни инструменти като CPLEX. Предложеният модел е лесно приспособим за различни пространства: двоична или кубична решетка. За проверка на модела избрахме два реални протеина от биологични бази от данни. Превърнахме първичната им структура в HP последователност и изчислихме оптималната им 3D структура и я сравнихме с реалната.

От направеното сравнение за orexin peptide и за hypotensive peptide може да се направим следните изводи:

- Предсказването на 3D структурата на протеин с HP folding е реална и може да се използва в практиката;
- Този начин на моделиране трябва да се комбинира с модели базиращи се молекулната механика за по голяма точност.

Yanev N., Milanov P., **Trenchev I. A new integer programming model for HP problem** // International conference on Mathematical Methods and Models in Biosciences and School for Young Scientists: Biomath 2011, Sofia, June, 2011, p. 72

Представени са нови резултати върху нагъването на протеини базирани на HP фолдинг. Показани са резултати за подобряване на изчислителната сложност на разработеният от нас математически модел. и новите числени резултати пресметнати със сървър на Югозападен университет „Неофит Рилски“.

Yanev N., **Milanov P.**, Mirchev I., (2011) Integer programming approach to HP folding. **Serdica Journal of computing**. Vol. 5 (4), 359-366.

One of the most widely studied protein structure prediction models is the hydrophobic-hydrophilic (HP) model, which explains the hydrophobic interaction and tries to maximize the number of contacts among hydrophobic amino-acids. In order to find a lower bound for the number of contacts, a number of heuristics have been proposed, but finding the optimal solution is still a challenge. In this research, we focus on creating a new integer programming model which is capable to provide tractable input for mixed-integer programming solvers, is general enough and allows relaxation with provable good upper bounds. Computational experiments using benchmark problems show that our formulation achieves these goals.

Key words: Protein folding, HP model, integer programming.

Белтъците са един от основните градивни компоненти на живите клетки, както и на вирусните частици. Притежават сложна пространствена структура и изпълняват разнообразни биологични функции — от типично структурни, защитни, транспортни до каталитични и регулаторни. Предсказването на третичната структура на даден протеин по неговата аминокиселинна последователност е изключително трудна задача и е един от най-важните научни проблеми на настоящото съвремие.

Идеята е получена от наблюдението, че хидрофобните взаимодействия между аминокиселините остатъци са главната сила, която предизвиква сгъването на протеините в тяхното природно състояние.

Методът на НР нагъването на протеини в решетка се основава на наблюдението че, в полярна среда, пептидите се нагъват по начин в който има повече хидрофобни аминокиселини в ядро – при контакт между тях – и повече полярни аминокиселини в контакт с полярната среда. Такава форма на сгънатия пептид е с минимална енергия и е по-стабилен, така че може да очакваме, че този случай на 3D структура ще бъде реалния случай .

Разработен е математически модел за предсказване на третичната структура на протеините, основаващ се на НР модела.

D. ОЦЕНКА НА ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДОКИНГ

Dzimbova T., Mavrevski R., Pencheva N., Rajpanova T., **Milanov P.** (2012) Computer modeling of ligand-receptor interaction – encephalin analogues delta-opioid receptor. **Bulgarian chemical communications**, (accepted), (IF = 0.234).

Since, Hughes determined endogenous opioid pentapeptides – enkephalins, large number of synthetic analogues were prepared. Many analogues of enkephalins were synthesized by our group in addition. In our previous study we established a relationship between the replacement in position 2 in endogenous enkephalins and their δ -opioid receptor selectivity.

Computer modeling was used in this study to analyze binding affinity of a series of δ -opioid selective enkephalin analogues to the model of δ -opioid receptor, published in PDB (id: 1OZC). MolDoc SE algorithm implicated in the software program Molegro Virtual Docker was used.

Basing on docking results was established that: 1) all enkephalin analogues have good binding affinity to δ -opioid receptor by forming H-bonds with specific amino acid residue in the receptor pocket; and 2) the rank of the derivatives obtained with this approach is rather different compared with the rank of their biological *in vitro* assay activity. These results reveal further steps for the computer modeling of selective enkephalin analogues such as: 1) development of a novel optimization procedure; and 2) application of a different algorithm and software.

Key words: enkephalins, delta-opioid receptor, computer modeling, docking

Компютърното моделиране на съединения с т.нар. „docking” е биоинформатичен подход, който бързо се развива и популяризира през последните години. Методът обединява усилията на специалисти от различни области на познанието като: информатици, математици, специалисти по компютърни системи и технологии, биолози и физиолози, лекари, фармаколози и химици и пр. Ние приложихме този иновативен подход към различни класове химически съединения. Данни върху пептиди с опиоидно действие и афинитет към делта-опиоидния рецептор са представени в [27], където е представен структура-активност анализ на афинитета на серия от делта-селективни енкефалинови аналози към делта-опиоиден рецептор. Понеже липсват кристалографски данни за делта-опиоидния рецептор, за структурата на рецептора са използвани данни, публикувани в Интернет (база данни за протеини PDB – protein data base) чрез специализиран алгоритъм (MolDoc SE algorithm), а софтуерната програма за докинг беше Molegro Virtual Docker. Установено беше, че: - всички аналози показват висок афинитет към т.нар. джоб на рецептора, като образуват много водородни връзки; и – подредбата на аналозите показва някои различия в сравнение с това, което се базира на тяхната биологична активност. Това провокира по-нататъшни изследвания чрез компютърното моделиране на селективни аналози, развиване на нови оптимизационни процедури и приложение на различни алгоритми и на друг софтуер GOLD, който беше инсталиран в новосъздадения център за биоинформатични изследвания в ЮЗУ „Н. Рилски”.

Киоторфинови аналози - в опит да се установи връзката между структура и активност на киоторфинови аналози с неприродната аминокиселина норсулфоаргинин е използван докинг. В резултат на работата не бяха изведени никакви категорични изводи за връзката между тяхната структура и биологичното им действие, тъй като според докинга по-активни са аналози, които иначе не проявяват силен *in vivo* ефект.

Вероятно това се дължи на факта, че използваният модел не е точен или е необходим друг алгоритъм, който би дал по-добри резултати.

Dzimbova T., Pajpanova T., **Milanov P.** (2011) Synthesis and computer modeling of new chiral PNA analogues. COST-CMO8OI -**Annual meeting new drugs for neglected diseases Medicinal Chemistry in Parasitology**, 5-7 October, Modena, Italy, (poster) (abstract p. 81).

Peptide nucleic acid (PNA) is a lab-created analogue of DNA, in which the nucleic bases (adenine, guanine, thymine and cytosine) are attached to a pseudopeptide backbone. PNA can hybridize to its complementary DNA target in a sequence dependent manner. Unlike most of oligonucleotides analogues, PNA binds very tightly to double-stranded DNA as well. Because of this property, PNA molecules are intensively exploited in gene chemistry – a novel, straightforward, and versatile approach for permanently attaching proteins, peptides, fluorophores, and other molecules to plasmid DNA without interfering with transcriptional activity. these molecules are of interest in many areas of chemistry, biology, and medicine including drug discovery, genetic diagnostics, molecular recognition and the origin of life¹.

Antisense therapy is a form of treatment for genetic disorders or infections. When the genetic sequence of a particular gene is known to be causative of a particular disease, it is possible to synthesize a strand of nucleic acid (DNA, RNA or a chemical analogue) that will bind to the messenger RNA (mRNA) produced by that gene and inactivate it, effectively turning that gene "off"².

Here we presented the synthesis of new chiral analogues of PNA. Some new methods and strategies for their preparation were applied. Binding affinity of new analogues with DNA or RNA was predicted with a help of computer calculations and modeling. Some molecular dynamic stimulations were performed with the aim to predict conformations of newly synthesized PNA analogues.

Пептид-нуклеиновите киселини (ПНК) са миметици на ДНК с псевдопептиден скелет. Те могат да образуват стабилна двойна спирала с ДНК и РНК.

Тук е представен синтез на нови хирални аналози на ПНК. Приложени са нови методи и стратегии за тяхното получаване. Направен е опит да се предскаже тяхната способност да се свържат с комплементарни участъци от ДНК и РНК. С помощта на молекулно-динамични симулации е предсказани възможните конформации на

новосинтезираните ПНК. Резултатите от теоретичните изследвания ще бъдат потвърдени с помощта на различни методи – PCR и електрохимично.

Dzimbova T., **Milanov P.**, Pajpanova T. (2011) Comparative Study of Computer Modeling and Biological Testing of New Kyotorphin Analogues Peptides: Building Bridges. **Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium** June 25 - 30, San Diego, CA, U.S.A. 362-363

The most important thing is to know with which receptor interact kyotorphin, respectively its analogues. Kyotorphin (KTP) was isolated from bovine brain by Takagi and co-workers (1,2). This endogenous dipeptide (L-Tyr-L-Arg) belongs to the neuropeptide family due to its opiate-like activity. The Tyr-Arg motif exists widely through-out the brain, not only as KTP, but also as the N-terminal part of several endogenous analgesic peptides (3, 4). This peptide is very rapidly degraded by aminopeptidases (5), also. Many of these properties are typical for neurotransmitters, and it is not surprising that KTP has also nonopioid action independent of enkephalin release (6). There is evidence suggesting that KTP does not bind the opiate receptors (μ , δ , κ), but that it exerts Met-enkephalin-release force (7). These results led to the suggestion that the dipeptide bind to a specific receptor (KTP receptor, KTPr) (8), triggering a cascade of events that leads to strong analgesia in the brain (9, 10). Despite the fact that several studies (7, 11, 12) confirm the existence of a KTPr, it has not yet been identified. There is still the question of whether the KTPr is specific (11), or the result of mixed oligomerization of μ - and δ -opioid receptors (13). The L-Tyr residue at first position of the peptide presented in most of the opioid peptides. It is believed to be crucial for receptor recognition (14, 15) due to both π -stacking (16) and hydrogen-bonding with the alcohol of the phenol group (17). A protonable N-terminal group is also present in KTP and, when protonated, can form a salt bridge with an anionic group in the receptor, which is typical for the morphine/ μ -receptor interaction (17). Another important aspect of the KTP-receptor interaction is orientation. By fitting the KTP conformations to the structure of morphine, Machuqueiro et al. (18) tried to exclude the hypothesis that the KTPr pocket is similar to that of the μ - receptor. They observed exactly opposite. The best-fitted KTP conformations revealed several nonobvious aspects: 1), there was no preference for any N-terminus charge or cis/trans conformation in the set; and 2), the predominance of the extended conformations (both cis and trans) results in the Arg side chain not invading the vicinities of

the phenol group of the Tyr, allowing this to be presented to the receptor without any hindering effects. These results suggest that, despite the fact that KTP does not bind to the opioid receptors, there is no indication for the KTPr pocket to be very different from those of the opioid receptors. Using all this data we can consider that the receptor pocket is the same as in μ -receptor, and to try to explain biological effect of analogues using computational methods.

В опит да се установи връзката между структура и активност на на киоторфинови аналози с неприродната аминокиселина норсулфоаргинин е използван докинг. Тъй като няма публикувана кристална структура на μ -опиоидният рецептор изследванията са проведени с модела на рецептора, публикуван в PDB (id: 2iqo). Като лигандни са използвани киоторфин и неговите производни, съдържащи норсулфоаргинин, които имат вече доказан *in vivo* ефект при плъхове.

В резултат на работата не бяха изведени никакви категорични изводи за връзката между тяхната структура и биологичното им действие, тъй като според докинга по-активни са аналози, които иначе не проявяват силен *in vivo* ефект. Вероятно това се дължи на факта, че използваният модел не е точен или е необходим друг алгоритъм, който би дал по-добри резултати.

Dzimbova T., Pencheva N., Pajpanova T., **Milanov P.** (2011) Computer modeling of ligand-receptor interactions - enkephalin analogues and delta-opioid receptor. **6th Bulgarian Peptide Symposium**, 29.09-1.10.2011, Panichishte, Bulgaria, (poster), (abstract), p. 40

ABSTRACT. Since, Hughes determined endogenous opioid pentapeptides – enkephalins, large number of synthetic analogues were prepared. Many analogues of enkephalins were synthesized by our group in addition. In our previous study we established a relationship between the replacement in position 2 in endogenous enkephalins and their δ -opioid receptor selectivity. Computer modeling was used in this study to analyze binding affinity of a series of δ -opioid selective enkephalin analogues to the model of δ -opioid receptor, published in PDB (id: 1OZC). MolDoc SE algorithm implicated in the software program Molegro Virtual Docker was used. Basing on docking results was established that: 1) all enkephalin analogues have good binding affinity to δ -opioid receptor by forming H-bonds with specific amino acid residue in the receptor pocket; and 2) the rank of the derivatives obtained with this approach is rather different compared with the rank of their biological *in*

vitro assay activity. These results reveal further steps for the computer modeling of selective enkephalin analogues such as: 1) development of a novel optimization procedure; and 2) application of a different algorithm and software.

Key words: enkephalins, delta-opioid receptor, computer modeling, docking

В тази публикация е представен структура-активност анализ на афинитета на серия от делта-селективни енкефалинови аналози към делта-опиоиден рецептор, публикуван в Интернет (база данни за протеини PDB) чрез специализиран алгоритъм (MolDoc SE algorithm) и софтуерна програма за докинг, наречена Molegro Virtual Docker. Установено е, че: - всички аналози показват висок афинитет към т.нар. джоб на рецептора; и – подреждането на аналозите показва някои различия в сравнение с това, което се базира на тяхната биологична активност. Това провокира по-нататъшно изследване компютърното моделиране на селективни аналози, развиване на нови оптимизационни процедури и приложение на различни алгоритми и друг софтуер. Новият момент, в сравнение с дългогодишните ни *in vitro* изследвания е факта, че подобни данни на молекулно ниво не изискват средства и човешки ресурс за органични синтези на големи серии от съединения или фармакологични и физиологични експерименти с изолирани препарати