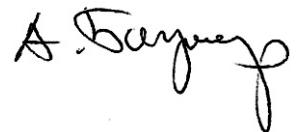


НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗИКИ КОНДЕНСОВАНИХ СИСТЕМ

БАУМКЕТНЕР Андрій Богданович



УДК 538.9; 539.2; 577; 544

НОВІ АСПЕКТИ ЗГОРТАННЯ ТА АГРЕГАЦІЇ БІЛКІВ:
ТЕОРІЯ ТА КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ

01.04.24 – фізика колоїдних систем

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук

ЛЬВІВ – 2018

Дисертацію є рукопис.

Робота виконана в Інституті фізики конденсованих систем Національної академії наук України

Науковий консультант – доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Брик Тарас Михайлович**, Інститут фізики конденсованих систем НАН України (м. Львів), завідувач відділу комп’ютерного моделювання багаточастинкових систем, заступник директора з наукової роботи

Офіційні опоненти

- член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор **Корнелюк Олександр Іванович**, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ), завідувач відділу білкової інженерії та біоінформатики
- доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Шестопалова Ганна Вікторівна**, Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України (м. Харків), завідувач відділу біологічної фізики
- доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Єсилевський Семен Олександрович**, Інститут фізики НАН України (м. Київ), провідний науковий співробітник відділу фізики біологічних систем

Захист відбудеться “3” травня 2018 року о 15 год. 30 хв. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.156.01 при Інституті фізики конденсованих систем Національної академії наук України за адресою:

79011, м. Львів, вул. Свенціцького, 1.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту фізики конденсованих систем НАН України за адресою:

79026, м. Львів, вул. Козельницька, 4.

Автореферат розісланий “2” квітня 2018 року.

Учений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 35.156.01,
доктор фіз.-мат. наук

А.М. Швайка

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним з найважливіших напрямків фізики колоїдних систем є дослідження біологічних молекул у водних розчинах та кінетики утворення білкових агрегатів. Зацікавленість біологічними макромолекулами сягає далеко поза межі біології. Для низки суміжних дисциплін, що включають фізику, хімію та математику, фундаментальні властивості білків, як колективні так і індивідуальні, представляють значний науковий інтерес.

Зокрема, однією зі слабо вивчених проблем є фазове розшарування типу рідини-рідина у водних розчинах білка.¹ Фаза з високим вмістом білка, або по-іншому рідка фаза, яка виникає в розчині внаслідок охолодження, зустрічається в багатьох контекстах. Наприклад, вона виступає в ролі кінетичного прекурсора для кристалізації² в розчинах альбуміну. В кристалику ока³ рідка фаза білка кристаліну асоціюється з явищем холодної катаракти. Також вважається, що утворення крапель концентрованої білкової рідини лежить в основі механізму, за допомогою якого у цитоплазмі живих клітин з'являються такі немембрани утворення, як ядерця або центросоми.⁴ Для фізики колоїдних систем явище фазового розшарування - це одна з найбільш актуальних проблем. Досі залишається незрозумілим, який опис білка необхідно використовувати для того, щоб вірно описати особливості фазової поведінки при зміні зовнішніх умов, таких як рівень pH.⁵ Більше того, модель білка, яка правильно описує, як фазову поведінку розчину, так і його структуру - не існує.

Також значний інтерес викликають білкові кластери.⁶ Крім білків кластери спостерігаються в багатьох інших колоїдних системах, наприклад синтетичних клеях⁷ та металічних наночастинках.⁸ За відповідних умов кластери приходять у стан термодинамічної рівноваги з іншими компонентами системи. Вони також можуть з'являтися тимчасово, внаслідок незавершеного фазового переходу.⁹ Як частковий випадок явища самоорганізації, процес утворення кластерів є однією з центральних проблем фізики колоїдних систем. На жаль наші теперішні знання про цей процес є достатньо обмеженими.¹⁰ На сьогодні відомо про два типи між-частинкових потенціалів, що приводять до утворення рівноважних кластерів: а) потенціали з конкуруючими притяганням та відштовхуванням, та б) суто відштовхувальні потенціали. Незрозуміло чи цей список є вичерпним. Також бракує інформації про термодинамічні фактори, що контролюють збірку кластерів. Без цього буде важко передбачити

¹ C. Ishimoto and T. Tanaka, Phys. Rev. Lett. **39**, 474 (1977), *ibid*.

² F. Zhang, R. Roth, M. Wolf, F. Roosen-Runge *et al*, Soft Matter **8**, 1313 (2012).

³ G. Benedek, Human Cataract Formation, 237 (1984).

⁴ A. A. Hyman, C. A. Weber, and F. Jülicher, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **30**, 39 (2014).

⁵ M. C. Abramo, C. Caccamo, D. Costa, G. Pellicane *et al*, J. Chem. Phys. **136**, 035103 (2012).

⁶ A. Stradner, H. Sedgwick, F. Cardinaux, W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf, and P. Schurtenberger, Nature **432**, 492 (2004).

⁷ A. K. Atmuri and S. R. Bhatia, Langmuir **29**, 3179 (2013).

⁸ J. M. Tam, A. K. Murthy, D. R. Ingram, R. Nguyen, K. V. Sokolov, and K. P. Johnston, *ibid*.**26**, 8988 (2010).

⁹ E. Janai, A. B. Schofield, and E. Slutskin, Soft Matter **8**, 2924 (2012).

¹⁰ A. D. Dinsmore, P. L. Dubin, and G. M. Grason, J. Phys. Chem. B **115**, 7173 (2011).

вплив кластерів на різноманітні нові властивості розчинів, як наприклад ріст в'язкості, що спостерігається в розчинах моноклонних антитіл.¹¹ Ще важче собі уявити раціональне використання кластерів в практичних застосуваннях, зокрема для адресної доставки ліків.¹²

Останнім часом дуже великі зусилля спрямовуються на з'ясування принципів, що лежать в основі згортання білків.¹³ Незважаючи на це, все ще залишається велике коло задач, для яких рівень розуміння є далеким від задовільного. Зокрема, це стосується процесу згортання за посередництва молекулярних шаперонів. Добре відомо, що лише від 65 до 80% новосинтезованих в живій клітині білків здатні згортатися спонтанно. Всі інші потребують зовнішньої допомоги, зокрема від шаперонів.¹⁴ Шаперони, такі як комплекс GroEL/ES¹⁵ в бактерії кишкової палички, надають порожнину (комірку) в яку поміщаються ті білки які не можуть згорнутися самостійно. Структура комірки відома з кристалографічних досліджень. Однак механізм її роботи залишається нез'ясованим. Вхід в комірку періодично відкривається та закривається, що дає білкам декілька спроб згорнутися успішно. Підтримувана гідролізом АТФ циклічність лягла в основу моделі ітеративного відпалу(IAM)¹⁶ функціонування шаперона. Альтернативна теорія, так звана модель Анфінсена, стверджує, що мета з якою білок поміщається в комірку – це ізоляція від інших молекул в клітинному середовищі, що дозволяє уникнути непродуктивних взаємодій, в першу чергу агрегації. Котра з цих моделей краще узгоджується з експериментом, і насکільки вона є універсальною, на даний момент – незрозуміло. Ключовим аспектом, в якому дві моделі відрізняються, є роль комірки: активна комірка, яка механічно впливає на білок у випадку IAM, та пасивна комірка, яка слабо взаємодіє з білком в моделі Анфінсена.

Багато білих плям також існує в нашому розумінні роботи моторних білків. Зокрема, для м'язового білка міозину структурні стани M* та M**, між якими відбувається перехід, що відновлює здатність білка генерувати силу - так-званий стрибок відновлення, - відомі з кристалографічних досліджень. У стані зі зв'язаним АТФ,¹⁷ стрибок відновлення є зворотнім та контролюється термодинамічними факторами, такими як температура чи тиск.¹⁸ На жаль мікроскопічні деталі переходу в кристалографічних дослідженнях недоступні. Багато чого про динаміку переходу можна довідатись за допомогою спектроскопічних методів, що вимірюють відстань між вибраними залишками, такими як флуоресцентний резонансний перенос енергії¹⁹ чи

¹¹ E. J. Yearley *et al.*, *Biophys. J.* **106**, 1763 (2014).

¹² S. Xu, C. Sun, J. Guo, K. Xu, and C. Wang, *J. Mater. Chem.* **22**, 19067 (2012).

¹³ S. W. Englander and L. Mayne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15873 (2014).

¹⁴ F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl, *Science* **295**, 1852 (2002).

¹⁵ H. R. Saibil, A. L. Horwich, and W. A. Fenton, *Allostery and protein substrate conformational change during GroEL/GroES-mediated protein folding* (Academic Press, 2002), Vol. 59.

¹⁶ M. J. Todd, P. V. Viitanen, and G. H. Lorimer, *Science* **265**, 659 (1994).

¹⁷ A. Malnasi-Csizmadia, D. S. Pearson, M. Kovacs *et al.*, *Biochemistry* **40**, 12727 (2001).

¹⁸ *Ibid.*

¹⁹ R. V. Agafonov, I. V. Negashov, Y. V. Tkachev *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21625 (2009).

спінове ехо.²⁰ Проте ці методи не мають атомної роздільної здатності, що робить інтерпретацію їх результатів утрудненою. Без з'ясування механізму переходу відновлення важко зрозуміти які взаємодії чи залишки його контролюють. Серед інших негативних наслідків, це унеможливлює з'ясування механізму виникнення кардіоміопатій - хвороб, спричинених мутаціями в первинній структурі міозину, - без чого марно сподіватися на розробку необхідних ліків.

Мабуть найбільш актуальною проблемою на даний час є агрегація білків²¹ – явище утворення макромолекулярних комплексів внаслідок само-асоціації. Спостерігаються як невпорядковані, у формі неструктурованого преципітату, так і впорядковані агрегати. До останніх належить амилоїд. Історично амилоїд вперше викликав науковий інтерес завдяки своєму зв'язку з хворобами головного мозку,²² коли було встановлено, що мозок людей з хворобою Альцгеймера (AD), Паркінсона та низки інших нейродегенеративних розладів містять нерозчинні плашки багаті на β -структуру, амилоїдні фібрили, що складаються з білка певного типу, різного для різних хвороб. Для хвороби Альцгеймера, наприклад, це амилоїд β -пептид, А β . Вже зараз число хворих з AD вимірюється багатьма мільйонами а з часом - лише різко збільшується, оскільки наступ хвороби пов'язаний з віком, а середній вік населення росте. Подібна картина спостерігається для інших споріднених розладів. Тому проблема винайдення ліків від цієї недуги стоїть дуже гостро. Першим і необхідним кроком на цьому шляху є зрозуміти фізику утворення фібріл. До найбільш нагальних задач належать: 1) встановлення мікроскопічної структури фібрили та факторів, що її контролюють, 2) з'ясування механізму утворення, 3) дослідження впливу середовища, наприклад змінного pH, та варіацій первинної структури, що виникають зокрема у вроджених формах хвороби.

Масштаб окреслених проблем значний і вимагає комплексних підходів для досягнення помітного прогресу. Важливе місце в таких підходах займає комп'ютерне моделювання. Дуже часто моделювання виступає як самостійний дослідницький інструмент, наприклад для встановлення структури фібріл.²³ В інших випадках моделювання доповнює та підсилює експериментальні підходи, яким бракує атомної роздільної здатності.²⁴ В усіх випадках успіх моделювання залежить від якості розрахункової моделі. В застосуванні до фібріл, ключовою вимогою до моделі є її атомне представлення, оскільки хімічні деталі сильно впливають на шляхи агрегації.²⁵ Водночас, модель має бути достатньо простою, щоб дозволити оперативні чисельні розрахунки. На даний час існує лише невелике число таких моделей, що здатні відтворити спонтанне утворення β -листів.²⁶ Проте наразі невідомо до яких систем ці мо-

²⁰ R. V. Agafonov, Y. E. Nesmelov, M. A. Titus, and D. D. Thomas, *ibid.* **105**, 13397 (2008).

²¹ L. M. Luheshi, D. C. Crowther, and C. M. Dobson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 25 (2008).

²² O. S. Makin, P. Sikorski, and L. C. Serpell, *ibid.* **10**, 417 (2006).

²³ B. Y. Ma and R. Nussinov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14126 (2002).

²⁴ D. B. Teplow *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **39**, 635 (2006).

²⁵ G. Bitan, M. D. Kirkpatrick, A. Lomakin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 330 (2003).

²⁶ A. Irback and S. Mitternacht, *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **71**, 207 (2008).

делі застосовні. Тому тут чітко прослідковується потреба в подальшому розвитку теоретичних моделей. При цьому найбільша необхідність виникає в моделях, що роблять акцент на великих білкових системах та їх агрегатах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в Інституті фізики конденсованих систем НАН України. Представлені результати отримані в рамках наступних бюджетних тем НАН України: “Немарківські кінетичні та гідродинамічні процеси у конденсованих системах” (2002-2004 рр., № держреєстрації 0102U000216), “Розвиток та застосування статистико-механічних підходів у теорії складних рідин” (2005-2007 рр., 0105U002082), “Статистико-механічні та комп’ютерні дослідження властивостей складних рідин” (2008 р., 0108U001153), “Розвиток теорії складних плинів і міжфазних областей: фазова поведінка, структурні, термодинамічні та динамічні властивості” (2009-2013 рр., 0109U001058), “Багатомасштабність і структурна складність конденсованої речовини: теорія і застосування” (2012-2016 рр., 0112U003119), “Вплив молекулярної структури і процесів локального впорядкування на фізичні властивості багаточастинкових систем” (2014-2018 рр., 0114U001048), “Нові концепції статистичного опису і їх застосування у теорії багаточастинкових систем” (2017-2018 рр., 0117U002093). Автор також брав участь у виконанні програмно-цільової та конкурсної тематики НАН України за темами: “Західний грід-центр УНГ: розвиток технічного потенціалу, комп’ютерне моделювання у грід-середовищі та підготовка кадрів”. Етап 1(2014 р., 0114U002631), Етап 2 (2015 р., 0115U001291), Етап 3 (2016 р., 0116U005785), Етап 4 (2017 р., 0117U000954).

Мета та задачі дослідження. Метою цієї роботи є розвиток теоретичних методів та моделей для досліджень білків. В рамках цієї мети вирішуються наступні конкретні задачі:

- Дослідження колективних властивостей білків. Встановлення необхідного рівня опису та запровадження необхідних моделей.
- Опис процесів утворення кластерів у білкових розчинах.
- З’ясування ролі обмежуючої комірки в процесі згортання білків за допомогою шаперонів.
- Розробка моделі для агрегації білків, яка має атомну роздільну здатність, проте є достатньо простою і реалістичною для моделювання малих пептидів.
- Дослідження ролі зовнішнього електричного поля в процесах згортання та агрегації білків.
- З’ясування деталей структурного переходу стрибка відновлення в моторному білку міозину.
- Дослідження структури на вплив зовнішніх факторів на амілоїдні фібрили.

Вибір цих задач продиктований наступними критеріями. 1) Наявна певна інформація про досліджуваний процес, що спирається на експериментальні джерела. Бажано, щоб була сформована чітка гіпотеза, яка потребує перевірки. 2) Експеримен-

тальні підходи зустрічаються з непереборними труднощами в дослідженнях процесу чи явища. Це можуть бути обмеження, пов'язані з об'єктом досліджень, наприклад, відсутність основного стану пептиду, що робить структурні дослідження методом ЯМР неоднозначними; або недостатня роздільна здатність експериментального підходу, наприклад, вимірювання лише однієї відстані між залишками в методі спінового ехо, що не дозволяє однозначно встановити структурні зміни на атомному рівні.

Об'єктом досліджень є білки, олігомери та амілоїдні фібрили.

Предметом досліджень є структура білків, механізм згортання та структурних переходів білків, структура амілоїдних фібріл, залежність структури фібріл від умов середовища, вплив мутацій на згортання та агрегацію, вплив електричного поля на білки.

Методи досліджень. В першу чергу це аналітичні підходи статистичної фізики, такі як кумулянтні розклади, теорія фазових переходів, моделі статичної та динамічної поведінки, та кінетичні явища. По-друге, це методи комп'ютерного моделювання, включаючи стандартний метод молекулярної динаміки, підходи з вузькою спеціалізацією, що розвинуті для конкретних задач, як наприклад метод Монте Карло в ансамблі Гіббса, чи метод обміну репліками.

Наукова новизна отриманих результатів.

В роботі запропоновано нові підходи та моделі для дослідження білків. Зокрема:

Вперше отримано ефективний потенціал міжбілкової взаємодії безпосередньо з експериментального структурного фактора без використання наближень.

Запропоновано нову несферичну модель білка, яка адекватно описує структуру білкового розчину та його фазову діаграму.

Вперше показано, що ефективний потенціал із локальним мінімумом утворює рівноважні кластери. Пояснено статистику цих кластерів і причини виникнення.

Вперше показано, що вплив обмежуючої комірки на кінетику згортання білка залежить від рівня фрустрації його поверхні вільної енергії.

Запропоновано новий механізм пришвидшення реакції згортання в комірках із притягальними стінками, що базується на утворенні проміжного стану.

Впроваджено нову модель для моделювання агрегації білків (єдину на даний час), яка коректно описує різні аспекти агрегації поліаланінових ланцюгів.

Вперше запропоновано використання електричного поля з метою контролю амілоїдних фібріл. Отримано нові аналітичні наближення для розрахунку впливу поля на переход клубок-спіраль.

На основі молекулярно-динамічного моделювання вперше показано, що події замикання ключа II та повороту домена конвертора не є механічно пов'язаними.

Вперше отримано розрахункову модель міозину, яка має функціонально-справний структурний переход.

Запропоновано новий механізм впливу мутації E22Q на агрегацію А β пептиду, який добре узгоджується з експериментом.

Вперше пояснено мікроскопічні причини зміни реєстру β -листів зі зміною рН у фібрілах фрагменту 11-25 пептиду А β .

Практичне значення отриманих результатів. Робота поглиблює розуміння функціонування біологічних систем на атомарному рівні і буде корисною для багатьох технологій в сучасному світі, які використовують принципи та механізми, запозичені з біології і може бути використаною для вдосконалення сучасних біотехнологій. Насамперед, це стосується застосування в нанотехнологіях амілоїдних фібріл, які завдяки своїм відмінним механічним властивостям вже починають використовуватися в якості будівельного матеріалу для нанопристроїв,²⁷ нарівні з вуглецевими нанотрубками. Значна перевага фібріл полягає в їх біосумісності.

Низка отриманих в дисертаційній роботі результатів може мати застосування в медицині. В першу чергу це стосується робіт із дослідження білка міозину, для якого з'ясовано деталі структурного переходу. Запропонована модель для цього білка містить залишки, які є критично важливими для його функціонування. Це, зокрема, стосується мутацій E490D, E493A, R695L, F506C, L508R та M486K, які спричиняють вроджену кардіоміопатію.²⁸ З'ясування механізму дії цих мутацій дозволить розробити нові лікарські засоби для цієї хвороби.

Досліджені в роботі принципи утворення білкових кластерів теж можуть виявитися корисними в медицині. В даний час стрімко розвиваються лікувальні засоби на основі пептидів та білків – біологіки. Одне з застосувань кластерів у таких сполуках – це адресна доставка ліків²⁹, яка використовує ключову перевагу кластерів у тому, що вони створюють високу концентрацію активної речовини локально, лише в потрібному місці, замість високої загальної концентрації ліків, яка спостерігається в традиційних підходах і може бути шкідливою.

Також в контексті застосувань слід згадати хворобу Альцгеймера та інші подібні неврологічні розлади. Хоча точні причини цих хвороб на сьогодні невідомі, але роль білкових агрегатів у їх виникненні, таких як олігомери чи фібрили, встановлена беззаперечно. Отримані в роботі результати, які проливають нове світло на властивості відповідних білків, безумовно можуть бути використані при встановленні повної патологічної картини.

Особистий внесок здобувача. В публікаціях [1-3,5-7,12,14,19,20,23] здобувач є автором ідеї досліджень та виконавцем усіх наукових завдань, включно з виконанням комп’ютерного моделювання. Інші автори брали участь в аналізі результатів та

²⁷ M. Reches and E. Gazit, Nano Lett. **4**, 581 (2004), K. Rajagopal and J. P. Schneider, Curr. Opin. Str. Biol. **14**, 480 (2004).

²⁸ P. Richardson *et al.*, Circulation **93**, 841 (1996), B. J. Maron, JAMA: The Journal of the American Medical Association **287**, 1308 (2002).

²⁹ K. P. Johnston, J. A. Maynard, T. M. Truskett, A. U. Borwankar, M. A. Miller, B. K. Wilson, A. K. Dinin, T. A. Khan, and K. J. Kaczorowski, ACS Nano **6**, 1357 (2012).

написанні статей. У теоретичних роботах [4,13,21] здобувач брав участь в аналізі результатів та написанні статей. Статті [8,10,11] одноосібні. В статтях [9,15-18], в яких теорія поєднується з експериментом, здобувач виконував моделювання, проводив аналіз результатів та долучився до написання статей. В роботі [22], де теж присутні як теорія, так і експеримент, здобувач проводив аналіз результатів моделювання та брав участь у написанні статті.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, представлених у дисертації, неодноразово доповідались на різноманітних вітчизняних та міжнародних конференціях. Серед них: Різдвяні дискусії (Львів, Україна, 11-12 січня 2017) [24], Ulam Computer Simulations Workshop “Challenges & Opportunities in Molecular Simulations” (Львів, Україна, 21-24 червня 2017) [25; 26], Summer Short Course “Monte Carlo Methods and Applications” (Beijing, China, 26-28 June 2016) [27], X Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини (Львів, Україна, 6 листопада 2015) [28], XV Всеукраїнська школа-семінар і Конкурс молодих вчених зі статистичної фізики та теорії конденсованої речовини (Львів, Україна, 4-5 червня 2015) [29], Фестиваль науки в Інституті фізики конденсованих систем НАН України (Львів, Україна, 19-21 травня 2015) [30], IX Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини (Львів, Україна, 7 листопада 2014) [19], VIII Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини (Львів, Україна, 1 листопада 2013) [31], Workshop on Protein and Peptide Interactions in Cellular Environments (Telluride, CO, USA, 19-23 July 2010), 238th ACS meeting (Washington, DC, USA, 16-20 August 2009) [32], International conference on statistical physics “StatPhys-2009” (Lviv, Ukraine, 23-25 June 2009) [33], USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Multidisciplinary Approaches to Protein folding (Mexico City, Mexico, 25-27 March 2009), Computational Biophysics with Chemical Accuracy, Zing-series conference (Jolly Beach Resort, Antigua, 14-17 January 2008), Protein folding dynamics, GRC-series conference (Ventura, CA, USA, 6-11 Jan 2008) [34]. Результати також представлялись на семінарах в Інституті фізики конденсованих систем НАН України та наступних запрошених семінарах: Jiao Tong University, Shanghai, China, 1 July 2016, Fudan University, Shanghai, China, 2 July 2016, Західний науковий центр, Львів, Україна, 10 вересня 2015, Beijing Computational Science Research Center, Beijing, China, 6 July 2015, Український католицький університет, семінар “Обрії науки”, 10 червня 2015.

Публікації. Матеріали дисертації представлені в 23 статтях у фахових реферованих журналах [1-23] та 11 матеріалах конференцій [24-34].

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, п'яти розділів, в кожному з яких розглядається і вирішується конкретна проблема або низка пов'язаних задач, висновків, списку цитованих джерел та додатку. Роботу викладено на 288 сторінках (разом із переліком джерел 336 сторінок). Бібліографічний список містить 443 посилань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Перший розділ є оглядом літератури за п'ятьма проблемами, що безпосередньо вирішуються в роботі. У *підрозділі 1.1* дано короткий вступ до проблеми моделювання колективної поведінки білка лізоциму. Описано відомі підходи та виклики, з якими вони зустрічаються. Дано коротку характеристику методам теорії інтегральних рівнянь до опису розчинів лізоциму. *Підрозділ 1.2* присвячений згортанню білків за допомогою механізму шаперонів. Приведено короткий опис існуючих теорій щодо ролі шаперонів у реакції згортання. Вказано на проблеми, які виникають як в експериментальних, так і теоретичних підходах для з'ясування цієї ролі. В *підрозділі 1.3* описано стан досліджень, що концентруються на побудові спрощених моделей білка. Акцент робиться на моделях в атомному представленні для дослідження процесу агрегації. Коротко описано основні труднощі, з якими такі моделі зустрічаються. В *підрозділі 1.4* описано підходи в атомному представленні, розвинуті для дослідження моторного білка міозину. Коротко висвітлено проблеми, які існують у такому моделюванні і спрогнозовано шляхи їх вирішення. Насамкінець, *підрозділ 1.5* стосується теоретичних підходів до дослідження реакції агрегації. Спершу описано існуючі підходи/роботи до дослідження згортання пептиду, пов'язаного з хворобою Альцгеймера, Аβ. Зокрема, акцент зроблено на синергії експерименту та теорії у таких дослідженнях. Даліше розглянуто проблеми утворення фібрил. Подано короткий огляд робіт, що були зроблені в цьому напрямі. Детально обговорено задачі впливу мутацій та фрагментів Аβ.

Другий розділ присвячений дослідженню колективних властивостей білків. В першу чергу акцент робиться на процесах фазового розшарування у водяних білкових розчинах, зокрема в розчинах білка лізоциму. Незважаючи на те, що перші повідомлення про розшарування рідина-рідина в таких розчинах з'явились майже 40 років тому,³⁰ інтерес до цієї системи досі не згасає.

Для теоретичного опису лізоциму найчастіше використовуються модельні потенціали, які адекватно відтворюють фазові діаграми,³¹ за умови, що параметризація проводиться відносно 2-го віріального коефіцієнту. Проте структурні функції білка цим потенціалом описуються не дуже коректно.³² Щоб усунути цей недолік, потенціал взаємодії виводиться безпосередньо з експериментальних структурних функцій за допомогою теорії рідкого стану.³³ Такі дослідження базуються на теоріях інтегральних рівнянь, які є наближеними. Як наслідок, відомі на сьогодні моделі опису лізоциму³⁴ нездатні одночасно відтворювати структуру та фазову поведінку.

³⁰ C. Ishimoto and T. Tanaka, Phys. Rev. Lett. **39**, 474 (1977), *ibid.*

³¹ G. Pellicane, D. Costa, and C. Caccamo, J. Phys.: Condens. Matter **15**, 375 (2003), G. Pellicane, D. Costa, and C. Caccamo, The Journal of Physical Chemistry B **108**, 7538 (2004).

³² G. Pellicane, J. Phys. Chem. B **116**, 2114 (2012).

³³ M. C. Abramo, C. Caccamo, M. Cavero, D. Costa, G. Pellicane, R. Ruberto, and U. Wanderlingh, J. Chem. Phys. **139**, 054904 (2013), T. Sumi, H. Imamura, T. Morita, Y. Isogai, and K. Nishikawa, Phys. Chem. Chem. Phys. **16**, 25492 (2014).

³⁴ M. C. Abramo, C. Caccamo, M. Cavero, D. Costa, G. Pellicane, R. Ruberto, and U. Wanderlingh, J. Chem. Phys. **139**, 054904 (2013), T. W. Rosch and J. R. Errington, The Journal of Physical Chemistry B **111**, 12591 (2007), F. Carlsson, M.

В дисертаційній роботі отримано потенціал взаємодії для лізоциму з експериментального структурного фактора, не вдаючись до жодних наближень. Для цього застосовано метод інверсії Больцмана в поєднанні з методом молекулярної динаміки. Використано ітераційний алгоритм:³⁵

$$v_{l+1}^s(r) = v_l^s(r) - \lambda_l k_B T \log \left[\frac{g_R(r)}{g_l(r)} \right], \quad (1)$$

де $v_l^s(r)$ - потенціал на етапі l , $g_l(r)$ - відповідна парна функція розподілу, а $g_R(r)$ - експериментальна базова функція розподілу. Тут k_B - стала Больцмана, T - температура, а параметр λ застосовується для досягнення бажаної швидкості збіжності. Узгодження між експериментальною функцією розподілу $g_R(r)$ та $g(r)$, отриманою у моделюванні MD, можна оцінити з Рис. 1. Ці два набори даних у масштабі рисунка розділити неможливо. Те саме стосується і порівняння експериментальних та теоретичних структурних факторів $S(k)$, зображених на тому ж рисунку.

Отриманий ефективний потенціал має основний мінімум при $r=32\text{\AA}$, який виникає внаслідок конкуренції між відштовхувальними та притягальними взаємодіями, та хвіст, який швидко затухає до нуля на великих відстанях. Фазова діаграма, отримана для цього потенціалу, зображена на Рис. 2. Для порівняння також наведено експериментальні дані Таратути *et al.*³⁶ з яких видно, що узгодженість між теорією та експериментом є дуже слабкою. Після технічних тестів, спрямованих на з'ясування причин розбіжності, зроблено висновок, що необхідно вдосконалювати модель білка, яка базується на гіпотезі сферичної симетрії потенціалу взаємодії. З цією метою запроваджено нову, несферичну (NS), модель. Вона складається з трьох вузлів взаємодії, що знаходяться на відстані L один від одного. Додаткові вузли взаємодіють через такий самий відштовхувальний м'який потенціал, як і частинки в сферичній моделі. Взаємодія між центральними вузлами є притягальною, її параметри отри-

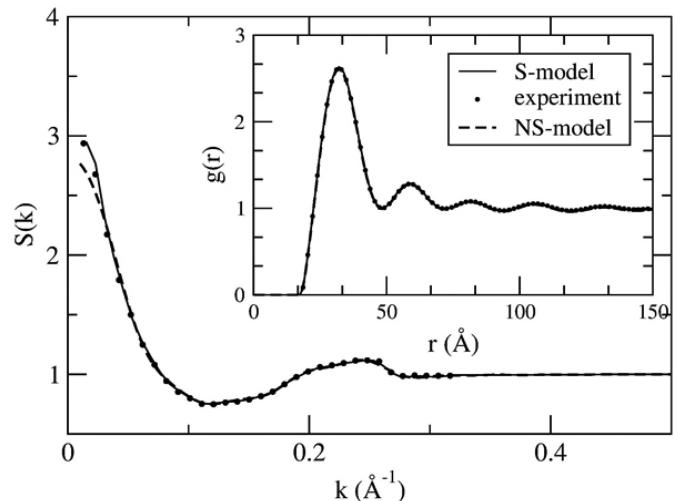


Рисунок 1. Структурні функції розчину лізоциму при $\text{pH}=6$ та температурі $T=298\text{K}$. Основний графік показує статичний структурний фактор $S(k)$: символи – експериментальні дані, суцільна лінія – результати моделювання MD сферичної S-моделі, пунктирна лінія – те саме для несферичної NS-моделі. У вставці відображені відповідні парні функції розподілу.

1. Ці два набори даних у масштабі рисунка розділити неможливо. Те саме стосується і порівняння експериментальних та теоретичних структурних факторів $S(k)$, зображених на тому ж рисунку.

Отриманий ефективний потенціал має основний мінімум при $r=32\text{\AA}$, який виникає внаслідок конкуренції між відштовхувальними та притягальними взаємодіями, та хвіст, який швидко затухає до нуля на великих відстанях. Фазова діаграма, отримана для цього потенціалу, зображена на Рис. 2. Для порівняння також наведено експериментальні дані Таратути *et al.*³⁶ з яких видно, що узгодженість між теорією та експериментом є дуже слабкою. Після технічних тестів, спрямованих на з'ясування причин розбіжності, зроблено висновок, що необхідно вдосконалювати модель білка, яка базується на гіпотезі сферичної симетрії потенціалу взаємодії. З цією метою запроваджено нову, несферичну (NS), модель. Вона складається з трьох вузлів взаємодії, що знаходяться на відстані L один від одного. Додаткові вузли взаємодіють через такий самий відштовхувальний м'який потенціал, як і частинки в сферичній моделі. Взаємодія між центральними вузлами є притягальною, її параметри отри-

Malmsten, and P. Linse, *ibid.* **105**, 12189 (2001).

³⁵ W. Schommers, Phys. Lett. A **43**, 157 (1973), W. Schommers, Phys. Rev. A **28**, 3599 (1983), A. K. Soper, Chem. Phys. **202**, 295 (1996).

³⁶ V. G. Taratuta, A. Holschbach, G. M. Thurston, D. Blankschtein, and G. B. Benedek, J. Phys. Chem. **94**, 2140 (1990).

муються з експериментальної функції $g(r)$. Попарну енергію взаємодії несферичних колоїдів можна записати у вигляді: $v(r) = \frac{1}{9} \sum_{i,j=1}^3 v^r(r_{ij}) + v^{ns}(r)$, де r_{ij} - відстань між вузлами взаємодії i першого колоїду та вузлом взаємодії j другого колоїду, r - відстань між центрами частинок, а потенціал $v^{ns}(r)$ отримується з (1) так само, як для потенціалу сферичної моделі $v^s(r)$. Відштовхувальна частина потенціалу $v^s(r)$ отримана шляхом розділення на відштовхувальну і притягальну компоненти в точці першого мінімуму. Далі відштовхувальна компонента була зміщена до нуля і замінена степеневою функцією. В результаті отримано вираз $v^r(r) = \left(\frac{\sigma}{r}\right)^n$, де $\sigma = 26\text{\AA}$, $n = 6.6$ та $v(r)$ прямує до $v^s(r)$ в границі $L \rightarrow 0$.

Фазову діаграму проаналізовано як функцію відстані L , яка є єдиним вільним параметром несферичної моделі. Найкраще узгодження з експериментом досягається при $L = 18\text{\AA}$, для якого критична температура складає $T_c = 272\text{K}$. Відповідна фазова діаграма зображена на Рис. 2. Очевидно, що нова модель суттєво покращує діаграму в порівнянні зі сферичним представленням. Отже, форма молекули та м'якість міжмолекулярного потенціалу взаємодії є двома суттєвими чинниками, що забезпечують правильний опис мікроскопічної структури та фазової поведінки розчинів лізоциму. Ці висновки допомагають краще зрозуміти, як потрібно моделювати білки в їх природному водному середовищі і є суттєвими для теоретичного дослідження різних супра-молекулярних процесів, в яких задіяні білки, зокрема, мережі взаємодій білок-білок або розробки терапії на основі біологічних молекул.

Окрім фазового розшарування білки можуть утворювати менші за розмірами комплекси – кластери. Як і в простих колоїдних суспензіях, у білкових розчинах кластери – це різноманітні мультимери, які утворюються внаслідок самоасоціації колоїду та перебувають у рівновазі з мономерами. Попередньо встановлено, що кластери в колоїдних розчинах виникають у системах, що взаємодіють через

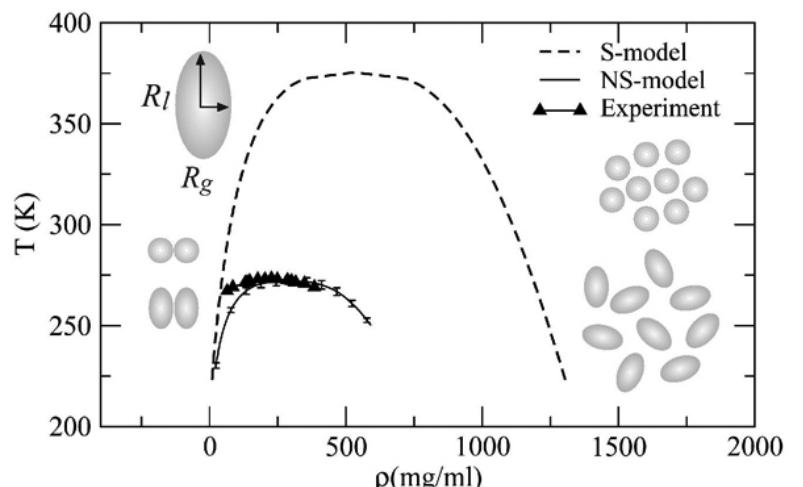


Рисунок 2. Фазова діаграма розчину лізоциму при $\text{pH}=6$. Показано експериментальні дані, а також результати сферичної та несферичної моделей з $L = 18\text{\AA}$. Символи – це густини співіснування газоподібних та рідкоподібних фаз, а лінії – екстраполяція, отримана з даних моделювання на основі правила прямолінійного діаметру. Несферична модель демонструє суттєве покращення кривої співіснування.

два типи потенціалів, SALR та HCSS. Перший потенціал має короткосяжну притягальну частину (short-range attraction SA) та далекосяжну частину (long-range repulsion LR). Другий потенціал має тверде ядро (hard core HC) та м'яке плече (soft shoulder SS). Для кількісного опису таких систем у дисертаційній роботі впроваджено модельний потенціал, схематично зображеній на Рис. 3, та досліджено його за допомогою комп'ютерного моделювання для широкого спектру параметрів. Показано, що новий потенціал, який не належить до жодного зі згаданих відомих класів, також може приводити до утворення рівноважних кластерів. Конкретно йдеться про потенціал, в якому замість *глобального* мінімуму, як у схемі SALR, є *локальний* мінімум (local attraction LA) з додатньою енергією, який відокремлений від станів з нульовою енергією на великих відстанях бар'єром скінченої величини. Аналіз кластерів, що утворюються таким LALR потенціалом, у порівнянні з іншими вивченими системами, приведено на Рис. 4(a). Тут радіус гірації $R_g(s)$ використовується для того, щоб охарактеризувати залежність розміру кластера від кількості його частинок s . Представлені дані отримано для всіх систем при густинах, що знаходиться трохи нижче за їхню густину перколяції. Добре видно, що кластери вивчених систем відрізняються за поведінкою в залежності від свого розміру.

Для великих s можна встановити статистику масштабування $R_g(s) \sim s^n$. Поведінка всіх систем, за винятком SALR, задається показником $n = 0.33$, як показано для HCSS, що відповідає максимально компактному об'єкту. Для тієї ж системи в межах малих s показник збільшується до $n = 1.13$. Зауважимо, що для лінійного розташування частинок найменших кластерів, димера та тримера, показник $n = 1.2$. Тому HCSS веде себе як лінійний ланцюг при малих значеннях s . HCLR, LASS та LALR потенціали також демонструють майже лінійне масштабування, але з показником, специфічним для кожної системи. Подібно до моделі HCSS, кластери, що утворюються за допомогою цих потенціалів, демонструють перехідну ділянку від лінійного режиму для малих кластерів до компактного ланцюга для великих кластерів. Переход відбувається поступово і в два етапи.

Істотно відмінна поведінка спостерігається для системи SALR. На Рис. 4(b) показано $R_g(s)$ для цієї моделі для кількох значень густини ρ . При низьких густинах

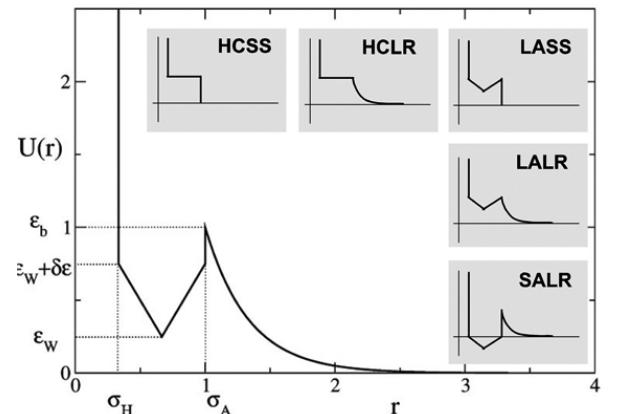


Рисунок 3. Схематичне зображення потенціалу, розглянутого в даній роботі. Залежно від вибору параметрів можуть бути вивчені різні типи систем м'якої речовини. П'ять конкретних форм, що детально досліджені, показані як піктограми.

відстані з нульовою енергією на великих відстанях бар'єром скінченої величини. Аналіз кластерів, що утворюються таким LALR потенціалом, у порівнянні з іншими вивченими системами, приведено на Рис. 4(a). Тут радіус гірації $R_g(s)$ використовується для того, щоб охарактеризувати залежність розміру кластера від кількості його частинок s . Представлені дані отримано для всіх систем при густинах, що знаходиться трохи нижче за їхню густину перколяції. Добре видно, що кластери вивчених систем відрізняються за поведінкою в залежності від свого розміру.

Для великих s можна встановити статистику масштабування $R_g(s) \sim s^n$. Поведінка всіх систем, за винятком SALR, задається показником $n = 0.33$, як показано для HCSS, що відповідає максимально компактному об'єкту. Для тієї ж системи в межах малих s показник збільшується до $n = 1.13$. Зауважимо, що для лінійного розташування частинок найменших кластерів, димера та тримера, показник $n = 1.2$. Тому HCSS веде себе як лінійний ланцюг при малих значеннях s . HCLR, LASS та LALR потенціали також демонструють майже лінійне масштабування, але з показником, специфічним для кожної системи. Подібно до моделі HCSS, кластери, що утворюються за допомогою цих потенціалів, демонструють перехідну ділянку від лінійного режиму для малих кластерів до компактного ланцюга для великих кластерів. Переход відбувається поступово і в два етапи.

Істотно відмінна поведінка спостерігається для системи SALR. На Рис. 4(b) показано $R_g(s)$ для цієї моделі для кількох значень густини ρ . При низьких густинах

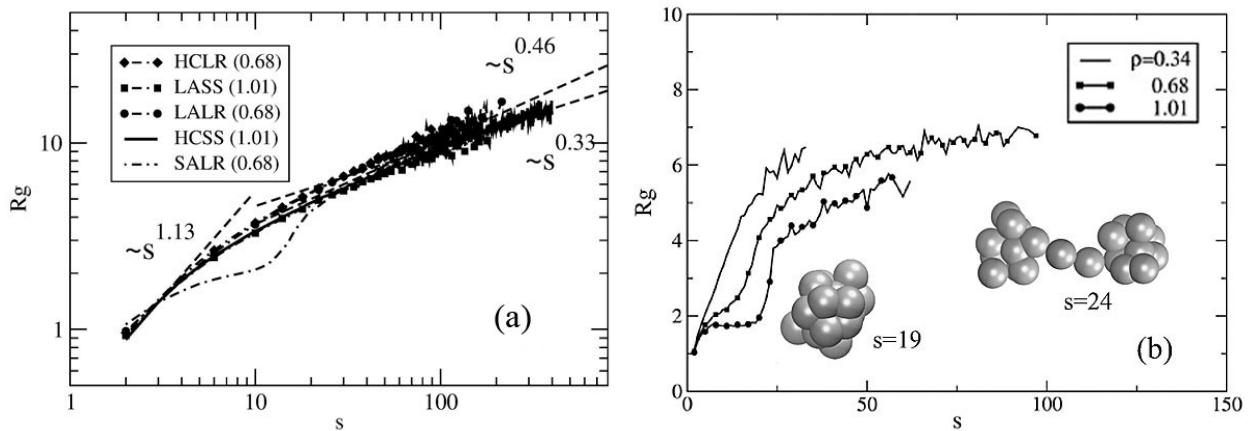


Рисунок 4. Радіус гірації R_g як функція кількості частинок. Всі потенціали з відповідними густинами (вимірюними в умовних одиницях) показано на (а). Дані для SALR показано на (б).

радіус гірації є монотонною функцією кількості частинок. Починаючи з $\rho=0.68$, починає розвиватися плато, що сигналізує про настання конфігураційної зміни.

При $\rho = 1.01$ $R_g(s)$ залишається незмінним для $3 < s < 19$, а потім зростає вдвічі для $s > 23$. Легко з'ясувати, що відбувається в точці переходу, вивчаючи форму кластерів. Приклади кластерів для $s = 19$, що зустрічаються безпосередньо перед переходом, і $s = 24$, що є одразу ж після нього, показані на Рис. 4(b). Малі, або первинні, кластери утворюють компактні і майже сферичні скupчення частинок. Більші кластери складаються з двох (або більше) таких комбінацій. Отже, утворення кластерів відбувається згідно принципу ієрархічної самоорганізації: малі кластери збираються на початкових етапах і надалі служать будівельними блоками для більших кластерів. Цей сценарій пояснює раптове збільшення $R_g(s)$ при певному значенні переходу s_c . В границі великого кластера радіус гірації має степеневу залежність з $n = 0.46$, що не залежить від густини. Цей показник близький до $n = 0.5$, яке спостерігається для ідеальних або гаусових полімерних ланцюгів, у яких відсутні об'ємні взаємодії і дозволяється проникнення частинок одна в одну. Пояснити майже ідеальну поведінку системи SALR можна тим, що її кластери можуть проникати один в одного через механізм обміну частинками, хоча самі частинки мають виключений об'єм. З тієї ж причини кластери не відчувають стиснення з навколошнього середовища, як HCSS, і залишаються видовженими, порівняно з максимально компактними станами.

Порівняльний аналіз термодинаміки утворення кластерів для усіх трьох схем – LALR, SALR і HCSS – показує, що LALR слугує мостом між двома іншими. Як і в моделі HCSS, потенціали LALR приводять до утворення кластерів за допомогою ентропійного механізму, однак лише за низької загальної густини й лише для невеликих кластерів. Зі зростанням густини в системі LALR, як і в її аналогі SALR, виникають кластери великих розмірів за допомогою ентальпійного механізму. По-

двійна природа моделі LARL проявляється і в її температурній поведінці. Малі кластери в такій системі стають більш стабільними з ростом температури, як і в моделі HCSS, а велики кластери – менш стабільні, подібно до моделі SALR.

Третій розділ присвячений процесам згортання білків, що відбуваються за допомогою молекулярних шаперонів. Шаперони, такі як комплекс GroEL бактерій E. Coli, підтримують згортання білків у несприятливих умовах, надаючи комірку, в якій ново-синтезований білок може бути ізольований. Молекули АТФ приєднуються до шаперонів і підтримують їхню роботу внаслідок гідролізу. Чи відіграє шаперонова комірка пасивну роль у захисті білка від агрегації, чи активну роль у прискоренні темпів згортання, залишається предметом дискусії. У цій роботі досліджено роль конфайнменту (просторового обмеження) в реакції згорання методом моделювання молекулярної динаміки. Розглянуто модельний білок типу α/β -сендвіч, який є типовим структурним елементом для субстратів системи GroEL/ES, і поміщено його в сферичну гідрофільну комірку, яка імітує внутрішню поверхню комплексу шаперона. Використано модель, в якій амінокислотні залишки представлені однією частинкою на позиції альфа вуглецю. Схематичне зображення використаної моделі показано на Рис. 5. Вплив конфайнменту шаперонової комірки на термодинамічні властивості білка досліджувався за допомогою молекулярної динаміки в широкому спектрі температур, починаючи від підвищених температур, при яких білок переважно розгорнутий, до нижчих температур, при яких білок перебуває в природному стані. За умов відсутності комірки, при температурі T_c спостерігається перехід типу колапс, внаслідок якого радіус гірації молекули стрімко зменшується. За колапсом слідує наступний структурний перехід, внаслідок якого компактні конформації трансформуються в природний стан. Температуру згортання T_f визначено з флюктуацій параметра структурного перекриття χ , який вимірює структурну різницю між даною конформацією та природним станом. Виявилось, що комірка має різний вплив на ці два переходи. Тоді як температура колапсу поступово збільшується внаслідок просторового обмеження, температура згортання залишається майже незмінною.

Час згортання τ_f показано на Рис. 6(а) в залежності від температури та радіуса обмежувальної сфери. Криві мають V-подібну форму, що виникає внаслідок сильного сповільнення згортання при високих і низьких температурах. При високих температурах статистична вага природної конформації є низькою в порівнянні з конформаціями розгорнутого ансамблю, а отже термодинамічний стимул до згортання

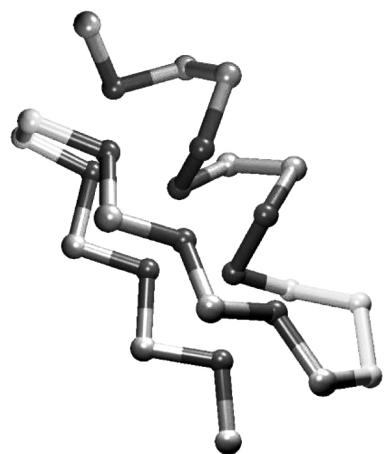


Рисунок 5. Природний стан моделі α/β -сендвіча, розглянутого в даній роботі. Залишки забарвлені відповідно до їхнього типу: гідрофобні – темно-сірі, гідрофільні – світло-сірі, нейтральні – білі.

відсутній. При низьких температурах, з іншого боку, статистична вага природного стану висока, проте в динаміці білка переважають попадання в кінетичні пастки, створені локальними енергетичними мінімумами. Час звільнення з мінімумів а, отже, час згортання, зростає, коли температура знижується. Ці дві взаємно протилежні сили – термодинамічне тяжіння до природного стану та повільна структурна динаміка, зумовлена локальними мінімумами, врівноважують один одного при деякій проміжній температурі T_m , де білок згортається швидше, ніж при будь-якій іншій температурі.³⁷

З Рис. 6(а) видно, що конфайнмент не змінює V-подібну форму кривої згортання, а також не впливає на мінімальний час згортання. Мінімальна температура згортання T_m , з іншого боку, сильно залежить від шаперонової комірки. Коли радіус комірки R зменшується, T_m монотонно зсувається в бік вищих температур. Із практичної точки зору важливо зрозуміти, як обмеження в порожнині шаперона впливає на час

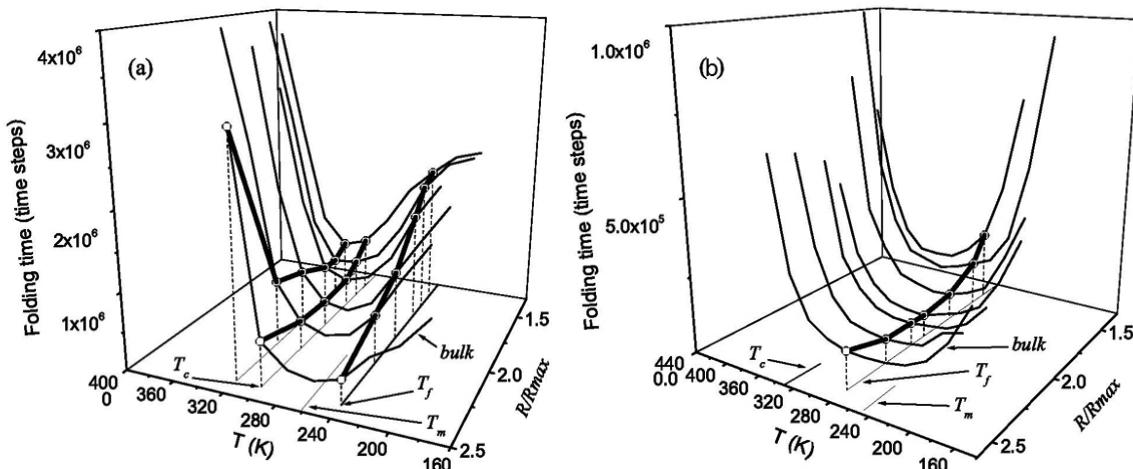


Рисунок 6. Час згортання α / β моделі, дослідженої в даній роботі. На (а) показано час згортання як функцію температури T та радіуса комірки R . Для порівняння також зображено криву, отриману за відсутності комірки (bulk). Показано значення трьох характерних температур T_c , T_f та T_m . Видно, що T_f лежить нижче T_m . Ті ж дані для моделі зі зменшеним рівнем фрустрації показано на рис. (б).

згортання субстрату при біологічно важливих температурах. Виходячи з поведінки T_m в залежності від радіуса R , можна стверджувати, що при температурах $T < T_m$, конфайнмент приведе до сповільнення згортання незалежно від розміру комірки. При низьких температурах компактні структури, як правило, домінують над видовженими конформаціями з високою енергією і білок проводить більшу частину свого часу в пастці в глобулярному, неправильну згорнутому, стані. Конфайнмент нічого не може зробити, щоб перешкодити білку приймати ці компактні неправильно складені конформації, а в деяких випадках навіть може перешкоджати втечі з цих пас-

³⁷ N. D. Soccia and J. N. Onuchic, J. Chem. Phys. **101**, 1519 (1994), C.-L. Lee, G. Stell, and J. Wang, ibid. **118**, 959 (2003), M. Cieplak, T. X. Hoang, and M. S. Li, Phys. Rev. Lett. **83**, 1684 (1999).

ток. Отже, в умовах низької температури просторове обмеження, швидше за все, перешкоджає, а не сприяє згортанню.

При температурах, вищих T_m ($T > T_m$), з іншого боку, ми очікуємо прискорення згортання для R , вище певного порогового значення, і сповільнення – нижче цього значення. Точне значення радіуса комірки, при якому спостерігається найбільше прискорення, залежить від розглянутої температури. Таким чином температура T_m може служити індикатором того, чи просторове обмеження може допомогти згортанню, чи ні. Зауважимо, що пришвидшене згортання в умовах термодинамічної стабільності при $T < T_f$ можливе лише, коли $T_m < T_f$. Як видно з Рис. 6(а), ця умова не виконується для досліджуваного білка.

Як T_m , так і T_f сильно залежать від рівня фрустрації, або шорсткості, поверхні потенціальної енергії білка. Поверхні з великою кількістю мінімумів, розділених високими максимумами, називаються фрустрованими. Поверхні з протилежними властивостями – нефрустровані. Дослідження, проведені Волинесом³⁸ та Тірумала-ем³⁹ для граткових моделей, показали, що чим менша шорсткість поверхні, тим вища її температура згортання T_f . Шорсткість також впливає на час втечі з кінетичних пасток, а отже, на T_m . В нашій роботі детально досліджено залежність кінетики згортання від ступеня фрустрації поверхні вільної енергії для простих аланінових пептидів.⁴⁰ Зокрема, було описано ефект сповільнення згортання і появу неекспоненціальної кінетики в моделях із великим рівнем фрустрації. Загалом, чим меншим є рівень фрустрації, тим менше білок попадає в кінетичні пастки, тим швидше відбувається згортання і тим нижче T_m . Керуючись цими міркуваннями, було модифіковано вихідну модель α/β білка з тим, щоб зменшити її ступінь фрустрації. Для цього було підсилено вплив певних локальних доданків у потенціальній енергії, які перешкоджають утворенню невірно-згорнутих конформацій. Час згортання, а також нові значення для температур переходів, показано на Рис. 6(б). Згідно з очікуваннями, температура згортання підвищилася, а температура найшвидшого згортання – впала. Як наслідок, для модифікованого білка отримано $T_m < T_f$. Як видно з рисунка, при температурі згортання $T = T_f$ спостерігається пришвидшення згортання. Отже, вплив гідрофільної комірки на кінетику згортання білків залежить від їхнього рівня фрустрації. Пришвидшене згортання спостерігається для нефрустрованих білків і навпаки, фрустровані білки сповільнюються коміркою. В подальшому аналізі вдалося встановити, що прискорення з'являється завдяки механічному відсіканню структур із великим радіусом гірації, що відповідають мінімумам потенціальної енергії.

³⁸ J. D. Bryngelson and P. G. Wolynes, J. Phys. Chem. **93**, 6902 (1989).

³⁹ D. K. Klimov and D. Thirumalai, Phys Rev Letters **76**, 4070 (1996).

⁴⁰ A. Baumketner and J.-E. Shea, Condensed Matter Physics **7**, 421 (2004), A. Baumketner and J. E. Shea, Phys. Rev. E **68**, 051901 (2003).

Нешодавні експерименти виявили, що існують білки, для яких не потрібна циклічна робота шаперона, щоб згортатися ефективно. Для таких білків достатньо одиночної взаємодії з шапероном і попадання в його комірку, щоб безперешкодно досягнути природного стану. Це спостереження робить актуальним питання про можливість шаперона відігравати активну роль у процесі згортання білків, шляхом, можливо, прямого втручання в конформації білків. Щоб дослідити вірогідність такого сценарію, проведене моделювання було поширене на випадок, коли стінка комірки є притягальною. На Рис. 7 показано залежність часу згортання від параметра h , який характеризує рівень гідрофобності поверхні. Добре видно, що згортання протикає швидше для всіх h . Мінімум спостерігається при $h=0.47$, де прискорення є п'ятикратним.

Для того, щоб зрозуміти механізм спостережуваного прискорення, всі конформації, збережені в моделюванні, були розбиті на кластери. В результаті було знайдено стан, який відрізняється від природного стану, але в якому система проводить значний обсяг часу. Цей альтернативний стан слугує кінетичною пасткою, що сповільнює процес згортання. Щоб краще зрозуміти вплив комірки на білок, цей стан було включено в статистичний аналіз. Для цього було спроектовано весь конформаційний простір білка на дві змінні: середньо-квадратичне відхилення (RMSD) до природного стану та до альтернативного стану. Відповідна карта вільної енергії показана на Рис. 8. Згідно з очікуваннями, карта чітко демонструє розбиття всього простору на кластери. Найнижчий вільній енергії відповідає кластер природного стану. Інший кластер включає в себе альтернативні конформації. Він складається з двох менших мінімумів, які є дуже подібними між собою. Вільна енергія альтернативного мінімуму не набагато вища за енергію природного стану. Важливо, що два мінімуми з'єднані між собою досить високим бар'єром. З Рис. 8(a) добре видно, що будь-який шлях, який пролягає зі стану M в стан N, повинен пройти найвищу точку з енергією порядку $2.5k_B T$. Цим пояснюється довгий час звільнення білка з кінетичної пастки і, відповідно, довгий час згортання. Поміщення білка в комірку шаперона викликає значні зміни вільної енергії. Відповідна карта вільної енергії показана на Рис. 8(b). Мінімуми, що відповідають природному та альтернативному станам, існують і надалі. Проте тепер спостерігається поява нового стану B, якого не було раніше, і який теж має низьку вільну енергію. Візуальний огляд показує, що цей

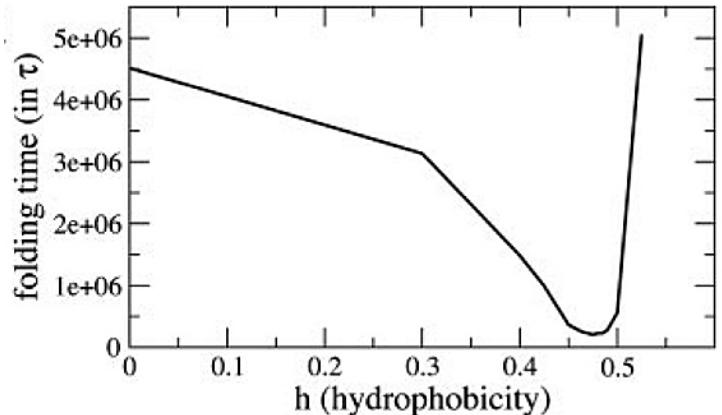


Рисунок 7. Час згортання білка як функція гідрофобності поверхні h шаперонової комірки. Для певних значень h можливе 5-кратне прискорення згортання.

стан відповідає білку, прикріпленому до стінки комірки через свої гідрофобні залишки. Цікаво, що новий мінімум з'являється на місці, де раніше був максимум вільної енергії. Як наслідок, відкриваються нові шляхи згортання, які пролягають через цей мінімум. Отже, пришвидшення досягається завдяки появи в шляхах згортання нового проміжного стану.

У четвертому розділі представлено дослідження агрегації білків за допомогою моделі скороченого опису. Оскільки в агрегації задіяна велика кількість молекул білків, теоретичний опис цього процесу зустрічається зі значними викликами. По-перше, моделі що використовуються для досліджень білків, повинні бути достатньо простими, щоб їх можна було використовувати на сучасних комп’ютерах. Проте, по-друге, в багатьох випадках необхідно застосовувати опис на атомному рівні, оскільки досліджувані процеси дуже чутливі до хімічної будови молекул білка. Зокрема, це стосується утворення білкових олігомерів, таких як, наприклад, проміжні олігомери в А β пептидах.⁴¹ З огляду на ці дві вимоги існує велика потреба в спрощених моделях для дослідження агрегації, які, проте, мають точну хімічну структуру. В даному розділі приведено результати досліджень процесу утворення фібрил за допомогою спрощеної моделі.

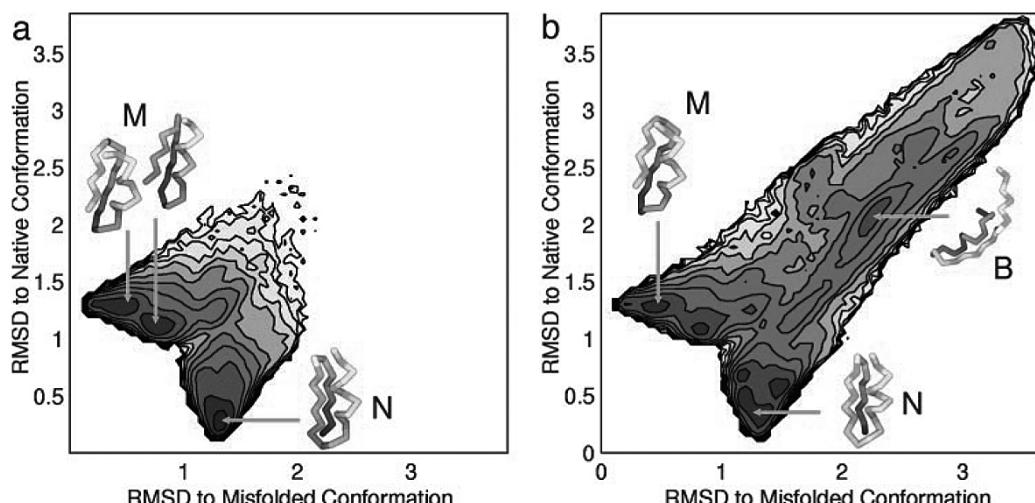


Рисунок 8. Карта згортання для моделі білка з альтернативною (М) незгорнутою конформацією, отримана (а) за відсутності комірки та (б) всередині комірки. Природний стан позначено як N. Енергія вказана в одиницях $k_B T$.

Спершу запроваджено модель для дослідження довгих поліпептидів та їх комплексів на основі схеми ефективної парної взаємодії (RAPID). Модель використовує атомну архітектуру білка, зв’язану зі стандартним силовим полем,⁴² а вплив розчинника описується за допомогою ефективних потенціалів або неявного розчинника. Повна потенціальна енергія в цій схемі $U = U_0 + \Delta G_{sol}$ включає в себе енергію пе-

⁴¹ G. Bitan, S. S. Vollers, and D. B. Teplow, J. Biol. Chem. **278**, 34882 (2003).

⁴² G. A. Kaminski, R. A. Friesner, J. Tirado-Rives, and W. L. Jorgensen, J. Phys. Chem. B **105**, 6474 (2001).

птиду у вакуумі U_0 та енергію сольватациї ΔG_{sol} . Остання розбивається на електростатичну ΔG_{el} та неполярну ΔG_{np} частини, $\Delta G_{sol} = \Delta G_{el} + \Delta G_{np}$. Для електростатичної частини використовується парно-адитивне наближення $\Delta G_{el} = \sum_{i < j} \left(\frac{1}{\epsilon(r_{ij})} - 1 \right) \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$, де q_i - заряд частинки i , r_{ij} - відстань між частинками i та j , $\epsilon(r) = 3r$ - залежна від відстані діелектрична стала,⁴³ яка наближено описує екранування зарядів на великих відстанях у водному розчині та широко використовується в сучасному біомолекулярному моделюванні.⁴⁴ Неполярна вільна енергія $\Delta G_{np} = \sum_{\alpha, i < j} u_{\alpha}(r_{ij})$ складається з ефективних потенціалів $u_{\alpha}(r)$, які діють на вибрані атоми пептиду, у випадку аланину – бета углеці. Okрім опису гідрофобних взаємодій, ΔG_{np} включає в себе можливі похибки, що містяться в ΔG_{el} . Ефективні потенціали вводяться для кожної пари частинок та отримуються з умови, що парні функції розподілу в неявному розчиннику співпадають з тими ж функціями в явному розчиннику. Для цієї мети використовується метод інверсії Больцмана. Загалом, для N залишків необхідно ввести $N(N-1)/2$ потенціалів. Проте у випадку гомополімерів не всі з цих потенціалів будуть відмінними.

На основі загальних міркувань можна прийти до висновку, що потенціали для пари i та j повинні залежати від відстані між цими залишками вздовж послідовності $u_{i,j}(r) = u_{j-i}(r)$. Крім цього, ці потенціали повинні збігатися до певної граничної форми у випадку, коли $|i-j|$ великі. Також гранична форма потенціалу повинна описувати взаємодії між залишками, що знаходяться на різних пептидних ланцюгах. В результаті, для гомо-полімерів повинен існувати мінімальний набір потенціалів, який якісно вірно описує їхню статистику. Для поліаланіну було встановлено, що такий набір складається з 11 потенціалів, серед яких 6 діють на бічні групи залишків, а 5 – отримані для взаємодій N-терміналу. На Рис. 9 показано потенціали, що були отримані в моделюванні дека-пептиду аланину. Сильна залежність від індексів частинок (контактного номера) спостерігається для потенціалів найближчих сусідів та наступних за найближчими сусідами, $u_{1-2}(r) - u_{1-4}(r)$, а також їхніх відповідників для N-кінцевої групи, $u_{0-1}(r) - u_{0-3}(r)$. Починаючи з дальніх тричастинкових сусідів, $u_{1-k}(r), k \geq 5$ і $u_{0-k}(r), k \geq 4$, потенціали починають виглядати однаково. Їх основними загальними рисами є наявність першого мінімуму при $r \sim 0.33$ нм і широкого максимуму при $r \sim 0.65$ нм. Мінімум відповідає близько-контактним конфігураціям залишків, тоді як максимум являє собою бар'єр для утворення/дисоціації контактів. Бар'єр частково обумовлений сольватаційними ефектами у воді,⁴⁵ але він також містить усереднений внесок від гідрофобних груп, а також інших частинок, присутніх у пе-

⁴³ J. Guenot and P. A. Kollman, Protein Sci. **1**, 1185 (1992).

⁴⁴ S. Kim, T. Takeda, and D. K. Klimov, Biophys. J. **99**, 1949 (2010), M. Cecchini, R. Curcio, M. Pappalardo, R. Melki, and A. Caflisch, J. Mol. Biol. **357**, 1306 (2006).

⁴⁵ M. S. Cheung, A. E. Garcia, and J. N. Onuchic, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99**, 685 (2002).

птиді. Десольватаційний бар'єр є надто низьким, меншим за 3 кДж/моль, щоб суттєво впливати на динаміку пептидів.

Конформаційна статистика пептиду, що спостерігалася в моделюванні з явним розчинником, наприклад заселеність α -спірального стану, добре відтворюється в моделюванні з ефективними потенціалами. Достовірність отриманої моделі додатково перевірено в дослідженнях довших пептидів. Показано, що вона якісно вірно представляє згортання поліаланінового ланцюга з 25 залишками.

Подальші тести, проведені для кількох пептидних ланцюгів, показують, що отримана модель правильно відтворює експериментально спостережувану тенденцію поліаланінів до зростаючої тенденції збиратися в β -листи зі зростаючою довжиною пептидного ланцюга. В своїй сукупності представлені результати свідчать, що запропонована модель придатна для того, щоб використовуватись для моделювання згортання та агрегації дрібних пептидів з атомною роздільною здатністю.

Модель RAPID також була застосована для дослідження впливу зовнішнього електричного поля. Використовуючи алгоритм обміну репліками, спочатку досліджено згортання пептиду в статичному зовнішньому полі і показано, що поле може спричинити перехід у α -спіральний стан. Вплив електричного поля на конформаційний стан a можна оцінити за допомогою термодинамічного інтегрування:

$$\Delta F_a(E) = F_a(E) - F_a(0) = - \int_0^E \langle d \rangle_a(E) dE, \text{ де } \langle d \rangle_a(E) - \text{середній дипольний момент},$$

$\Delta F_a(E) = -kT \log(Z_a(E)/Z_a(0))$ - вільна енергія та $Z_a(E) = \int_{\Omega_a} e^{-\beta(H-dE)} d\Gamma$ - конфігураційний інтеграл в полі E для стану a . Тут k - стала Больцмана, T - температура, $\beta = 1/kT$, H - Гамільтоніан системи, Ω_a визначає межі стану a , а інтегрування відбувається в конфігураційному просторі Γ . Символ $\langle \dots \rangle_a$ вказує на усереднення за конформаціями стану a . Застосовуючи інтегрування окремо для згорнутого f та розгорнутого u станів, можна отримати наступний вираз для відносної вільної енергії:

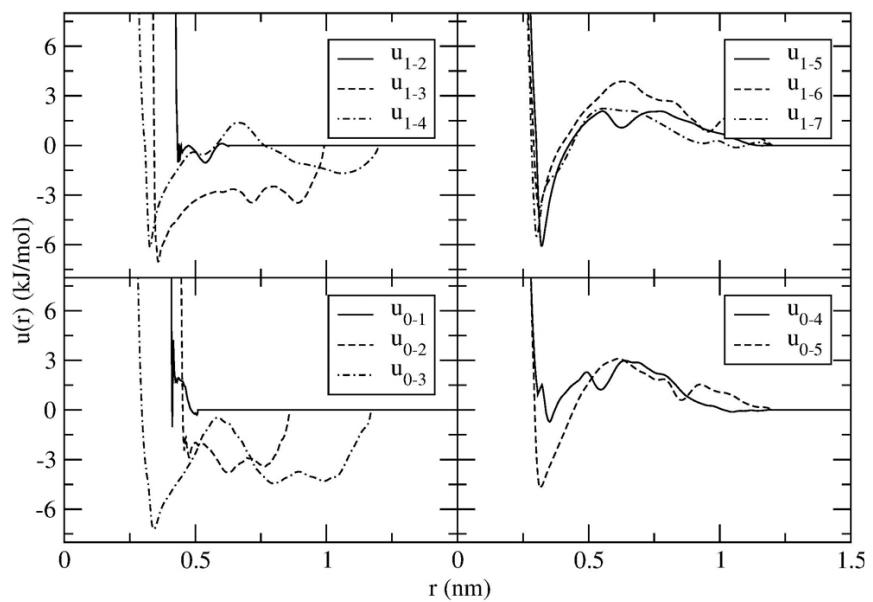


Рисунок 9. Ефективні потенціали, отримані для моделі поліаланіну.

На рисунку 9 представлені ефективні потенціали, отримані для моделі поліаланіну. Всі потенціали показують сильну залежність від відстані r , з підходом до мінімуму при $r \approx 0.4$ нм та згодом зростанням потенціалу з віддаллю.

$$\Delta\Delta F(E) = \Delta F_f(E) - \Delta F_u(E) = -\int_0^E [\langle d \rangle_f - \langle d \rangle_u](E)dE = \\ -kT \log\left(\frac{Z_f(E)Z_u(0)}{Z_u(E)Z_f(0)}\right) = -kT \log\left(\frac{P_f}{1-P_f}\right) - \Delta F_0 \quad (2)$$

де P_f - заселеність природного стану в полі E , ΔF_0 - різниця вільної енергії між згорнутим та розгорнутим станами за відсутності поля. З цього виразу видно, що наявність поля може понизити вільну енергію згорнутого стану, якщо $\langle d \rangle_f$ більше за $\langle d \rangle_u$.

Зрозуміло, що ця умова виконується для спіральних конформацій, в яких всі пептидні зв'язки орієнтовані однаково і їхні дипольні моменти додаються. Кількісно зміну вільної енергії можна оцінити в квадратичному наближенні як $\Delta\Delta F_c = -\frac{1}{2}\Delta d_0 E^2$, де $\Delta d_0 = \left(\frac{\partial \langle d \rangle_f}{\partial E} - \frac{\partial \langle d \rangle_u}{\partial E}\right)|_{E=0}$ - певний емпіричний коефіцієнт. Зміну заселеності природного стану, спровоковану полем і пораховану з рівняння (2), для квадратичного наближення показано на Рис. 10. Добре видно, що під дією поля P_f збільшується від ~0.2 до одиниці, тобто спостерігається індукований перехід у спіральний стан. У порівнянні з результатами моделювання, квадратичне наближення якісно вірно описує поведінку P_f , проте спостерігаються кількісні відмінності для полів $E > 0.2$ В/нм. Якщо використати кумулянтні розклади і обмежитися членами другого порядку, то для коефіцієнта Δd_0 можна отримати наступний аналітичний вираз: $\Delta d_0^a = \beta \frac{1}{3} P_n^2 \left(1 - \frac{1}{\cos^2(\phi)} \frac{1}{N}\right)$, в якому присутні лише кількість залишків N і дипольний момент природного стану P_n , як вхідні параметри. Кут ϕ є характерним для геометрії природного стану і для використаної α -спіралі був оцінений як 150° . Заселеність P_f , яку передбачає цей вираз, показано на Рис. 10. Спостерігається добре узгодження з числовими результатами, що свідчить про високу якість цього наближення. Було здійснено повний термодинамічний аналіз спостережуваного переходу.

У наступних дослідженнях попередньо сформовані β -листи, утворені пептидом, у рівновазі вивчаються як функція напруженості поля. Проведене моделювання показує, що індуковане згортання приводить до дисоціації β -листа. Результати, отримані для тестового пептиду, потім екстраполюються на вихідні розгорнуті пептиди довільної довжини N для того, щоб зрозуміти їхню поведінку. Виходячи з цієї екстраполяції, зроблено висновок, що дезагрегаційна сила електричного поля зростає зі збільшенням N . Оцінки, отримані за допомогою виведеного аналітичного наближення, показують, що при $N = 30$ та більше, значення напруженості поля, необхідне для дисоціації амілоїдів, наближається до межі біологічно важливих полів, визначеній явищами діелектричного пробою та електропорациї мембрани.

У підсумку, отримані результати дозволяють стверджувати, що а) електричне поле може використовуватися як засіб для контролю агрегації невпорядкованих довгих пептидів в умовах лабораторного експерименту *in vitro*, можливо, в експериментах на живих клітинних культурах; б) ендогенні поля можуть мати значний вплив на згортання та агрегацію білків, особливо, що стосується інтегральних мембраних білків.

У **п'ятому розділі** проведено дослідження стрибка відновлення міозину, який є ключовим етапом у функціональному циклі цього білка. Міозин – це ключовий моторний білок, що відповідає за скорочення м'язів. Стрибок відновлювання полягає у переході з перед-відновлюальної конформації M^* в активну пост-відновлюальну конформацію M^{**} , готову застосовувати силу. Перехід є оборотним⁴⁶ і може контролюватися температурою та тиском.⁴⁷ Кристалографічні дослідження⁴⁸ показують три області, де структура конформацій M^* та M^{**} відрізняється. Як видно з Рис. 11, це 1) місце зв'язування з АТФ, 2) домен-конвертор та 3) релейна спіраль. На місці зв'язування АТФ сегмент ключа II, який називається петлею, знаходитьться в закритому стані в конфігурації M^{**} , де залишок G457 утворює водневий зв'язок з гама фосфатом АТФ, а у відкритому стані – в конформації M^* , де водневий зв'язок відсутній. Домен-конвертор, що хімічно з'єднаний з “шийним” доменом (важелем), який відповідає за передачу сили, під час етапу відновлення зазнає значного повороту навколо релейної спіралі. Релейна спіраль спочатку має пряму форму в конформації перед-відновлення M^* , але у стані пост-відновлення M^{**} утворює петлю або злам. Крім того, невелика спіраль Src-1 гомологічного домену (SH1) зсувається приблизно на 4\AA до домену-конвертора вздовж релейної спіралі при переході від M^* до M^{**} .

Хоча кінцеві точки стрибка відновлення, M^* та M^{**} , доступні, перехід між ними залишається погано зрозумілим. В даній роботі вивчено мікроскопічні деталі цього

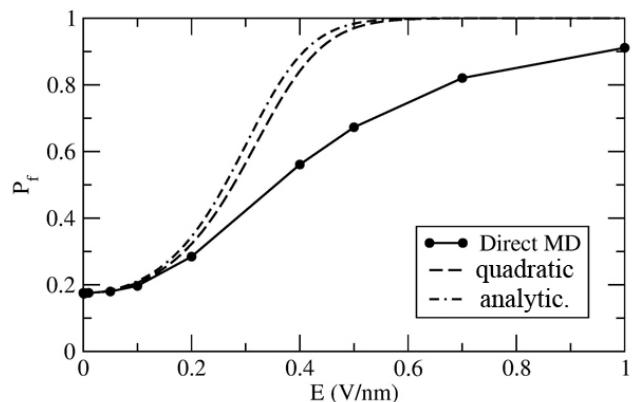


Рисунок 10. Заселеність природного стану як функція E , отримана для а) безпосередньо в моделюванні, б) використовуючи квадратичне наближення для вільної енергії, с) з використанням аналітичного виразу для Δd_0 в наближенні другого кумулянта.

пост-відновлюальну конформацію⁴⁶ і може контролюватися температурою та тиском.⁴⁷ Кристалографічні дослідження⁴⁸ показують три області, де структура конформацій M^* та M^{**} відрізняється. Як видно з Рис. 11, це 1) місце зв'язування з АТФ, 2) домен-конвертор та 3) релейна спіраль. На місці зв'язування АТФ сегмент ключа II, який називається петлею, знаходитьться в закритому стані в конфігурації M^{**} , де залишок G457 утворює водневий зв'язок з гама фосфатом АТФ, а у відкритому стані – в конформації M^* , де водневий зв'язок відсутній. Домен-конвертор, що хімічно з'єднаний з “шийним” доменом (важелем), який відповідає за передачу сили, під час етапу відновлення зазнає значного повороту навколо релейної спіралі. Релейна спіраль спочатку має пряму форму в конформації перед-відновлення M^* , але у стані пост-відновлення M^{**} утворює петлю або злам. Крім того, невелика спіраль Src-1 гомологічного домену (SH1) зсувається приблизно на 4\AA до домену-конвертора вздовж релейної спіралі при переході від M^* до M^{**} .

Хоча кінцеві точки стрибка відновлення, M^* та M^{**} , доступні, перехід між ними залишається погано зрозумілим. В даній роботі вивчено мікроскопічні деталі цього

⁴⁶ A. Malnasi-Csizmadia, D. S. Pearson, M. Kovacs, R. J. Woolley, M. A. Geeves, and C. R. Bagshaw, Biochemistry **40**, 12727 (2001), R. V. Agafonov, Y. E. Nesmelov, M. A. Titus, and D. D. Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**, 13397 (2008).

⁴⁷ A. Malnasi-Csizmadia, D. S. Pearson, M. Kovacs, R. J. Woolley, M. A. Geeves, and C. R. Bagshaw, Biochemistry **40**, 12727 (2001).

⁴⁸ H. L. Sweeney and A. Houdusse, Annual Review of Biophysics, Vol 39 **39**, 539 (2010).

переходу, використовуючи моделювання методом молекулярної динаміки для атомістичних моделей в неявних і явних розчинниках. З огляду на великий розмір молекули міозину пряме моделювання переходу відновлення в атомному представлений дуже складне. Найдовше моделювання для цієї системи, виконане дотепер, вимірюється кількома наносекундами.⁴⁹ Автором було значно розширено цей масштаб. В моделюванні сукупною тривалістю більше ніж 2 мікросекунди отримано докази того, що стрибок відновлення — це дво-кроковий процес, який складається з двох етапів, розділених часовим інтервалом. У проведенному моделюванні безпосередньо простежено перший етап, при якому петля ключа II закривається за присутності АТФ у місці приєдання нуклеотидів, так званому нуклеотидному жолобі. Спостережувана конфігурація області взаємодії з нуклеотидами — ідентична експериментальній. Розподіл відстані між амінокислотними залишками, виміряний в області білка, що генерує силу, добре узгоджується з експериментальними даними. Другий етап структурного переходу стрибка відновлення, поворот домену-конвертора, не був спостережений у проведенному моделюванні. Очевидно, він виникає на довших часових масштабах.

Враховуючи, що переход відновлення — це багато-кроковий процес, в якому головні події відбуваються в областях, що фізично відокремлені одна від одної, є зміст

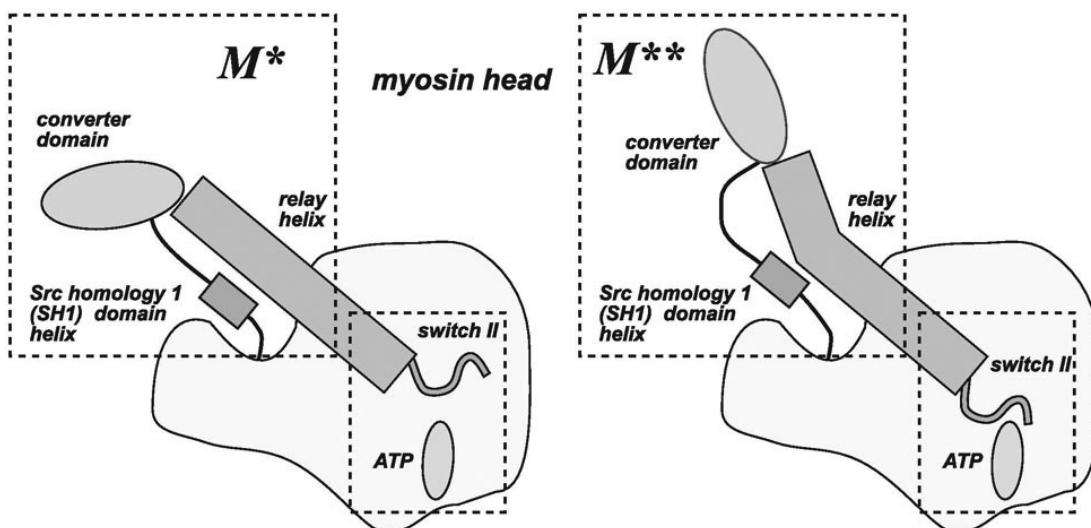


Рисунок 11. Схема, що пояснює два альтернативних стани “головки” міозину, що зв’язана з АТФ: стан перед-відновлення M^* та стан пост-відновлення M^{**} . Стрибок відновлення складається з двох етапів: 1) закриття петлі ключа II в стані M^* ; 2) результатуючий каскад конформаційних змін, що приводить до згину релейної спіралі та повороту домену-конвертора в стані M^{**} . Дві події відбуваються в фізично різних місцях, виділених квадратами, що знаходяться один від іншого на відстані 40 Å.

⁴⁹ S. Koppole, J. C. Smith, and S. Fischer, *J. Mol. Biol.* **361**, 604 (2006), K. Yamanaka, N. Okimoto, S. Neya, M. Hata, and T. Hoshino, *Journal of Molecular Structure-Theochem* **758**, 97 (2006).

поставити питання про існування автономного існування цих областей. Зокрема, викликає інтерес, чи область генерації сили посідає певну під-частину, яка є меншою за розмірами від повного білка, проте демонструє біологічні функціонально важливі переходи. Знайти таку мінімальну модель, яка демонструє експериментальний переход $M^* - M^{**}$, буде наступною метою даної роботи. Зокрема, є цікавою роль різних структурних елементів, що беруть участь у цій моделі. Проведене моделювання показує, що ізольований міозиновий фрагмент, що містить релейну спіраль, має незначний структурний ухил до спірального стану. Додавання до цього фрагмента релейної петлі суттєво підвищує спіральність, що збільшує подібність до стану M^* , але не допомагає утворювати злам чи вигин, який існує в стані M^{**} . Домен-конвертор хоч і повинен прикріплюватися до релейної спіралі під час ходу відновлення для запобігання непродуктивним взаємодіям зі спіраллю SH1, також не сприяє утворенню зламу. З проведеного моделювання видно, що взаємодія зі спіраллю SH1 є критичною для цієї мети. Положення SH1 сильно корелює з конформацією релейної спіралі та кутом повороту домену-конвертора. Якщо припустити, що зв'язок між жолобом зв'язування АТФ і областю, що генерує силовий поштовх, проходить через SH1, на що вказує багато досліджень,⁵⁰ проведено моделювання відповідає наступній новій моделі стрибка відновлення. Першим кроком є закриття ключа II. Це викликає зміщення в SH1, що згодом викликає переваження релейної спіралі з переважно M^* -подібної до переважно M^{**} -подібної конформації. Нарешті, релейна спіраль обертає прикріплений до неї конвертор, завершуючи структурний переход.

В подальшому, після скасування обмеження на положення SH1 спіралі з'ясовано в точному моделюванні методом обміну реплік, що модель, яка утворюється (MRSM), має лише два стабільні стани. На Рис. 12 показано спостережуваний розподіл торсійного кута Θ , утвореного атомами C_α залишків K477, Q479, T742 та A748. Кут характеризує орієнтацію домен-конвертора відносно N-кінцевої частини

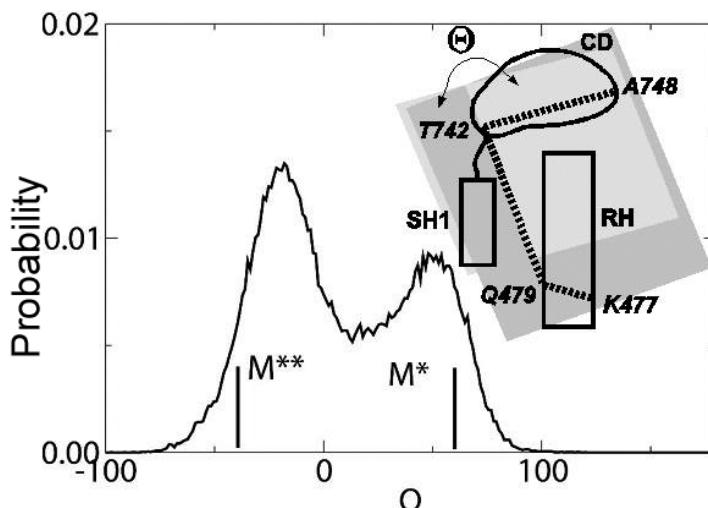


Рисунок 12. Розподіл імовірності торсійного кута Θ , отриманого для моделі MRSM. Кут, утворений C_α залишків K477, Q479, T742 і A748, характеризує орієнтацію домену-конвертора відносно релейної спіралі. Значення кристалографічних станів M^* та M^{**} показані як товсті лінії.

⁵⁰ K. M. Ruppel and J. A. Spudich, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **12**, 543 (1996).

релейної спіралі. В кристалографічних структурах він приймає значення -38 градусів у M^{**} -стані та 57 градусів у M^* -стані. Функція розподілу, отримана в моделюванні, має два максимуми, що вказує на те, що розроблена модель має два основні стани. Аналіз розташувань цих максимумів, -20 та 50 градусів, говорить про те, що ці стани відповідають експериментальним структурам M^* та M^{**} . Таким чином зроблено висновок, що побудована модель являє собою функціональний мотив міозину. Невеликий розмір моделі дозволив вперше дослідити на атомному рівні поворот домену-конвертора, відповіального за змах важеля. Проведене моделювання виявило критичну роль SH1. Незначне зміщення цієї спіралі в бік від релейної спіралі змінює популяцію переважно з M^* до переважно M^{**} -стану. Баланс між двома станами контролюється взаємодією між ключовими залишками, F487, F506 та I687, що лежать між релейною спіраллю, релейною петлею та SH1. Конфігурація цих трьох залишків змінюється у відповідь на зміщення SH1 під час обертання, керованого гідрофобними взаємодіями. Вкорочений міозиновий фрагмент, введений у цій роботі, добре підходить для вивчення мутацій в області генерації сили міозину, включаючи мутації, пов'язані з гіпертрофічною кардіоміопатією.⁵¹

У шостому розділі висвітлено результати досліджень процесу агрегації білків в атомних підходах. Агрегація білків – це складний багато-кроковий процес. Умовно всі кроки можна розділити на три стадії. На першій стадії мономери проходять через процес згортання. На другій стадії утворюються перші агрегати в формі білкових комплексів, що містять кілька молекул, так звані олігомери. На останній стадії спостерігається утворення дозрілих фібріл. Хоча загалом білки за своїми розмірами недоступні для безпосередніх досліджень у рамках атомних теоретичних моделей, існує широке коло проблем, де такі моделі можуть виявитися досить корисними. Автором виконано ряд робіт, в яких досліджуються всі три стадії агрегації, використовуючи атомні підходи. Зокрема, встановлено природу прискореного утворення олігомерів у пептидах типу $K\text{-}XX\text{-}E$, коли в ролі залишки X використовується фенілаланін.⁵² Також досліджено процес утворення димера в гідрофобному середовищі.⁵³ Такі модельні дослідження напряму пов'язані з біологічними об'єктами, де гідрофобні групи зустрічаються природно, як, наприклад, всередині клітинних мембран.

Також у цьому розділі приведено приклади досліджень структури і механізму утворення фібріл. Розглянуто дві системи. Перша – це пептид повного розміру $\text{A}\beta40$, для якого викликає інтерес вплив мутації E22Q, яка носить назву голландської і пов'язана з вродженою формою AD, на процес утворення фібріл. Експеримен-

⁵¹ P. Richardson *et al.*, Circulation **93**, 841 (1996), B. J. Maron, JAMA: The Journal of the American Medical Association **287**, 1308 (2002), S. L. Van Driest, S. R. Ommen, V. C. Vasile, M. L. Will, A. J. Tajik, B. J. Gersh, and M. J. Ackerman, J. Am. Coll. Cardiol. **43**, 165a (2004).

⁵² A. Baumketner and J. E. Shea, Biophys. J. **89**, 1493 (2005).

⁵³ P. Soto, A. Baumketner, and J. E. Shea, J. Chem. Phys. **124**, 134904 (2006).

ти Маджіо *et al.*⁵⁴ вказують на те, що швидкість осідання мутованого мономеру Аβ на вільний кінець фібрили підвищується, порівняно з послідовністю дикого типу.

Початковою точкою агрегації завжди є згортання мономерного пептиду. Тому при з'ясуванні ролі мутації, необхідно встановити, як E22Q впливає на: 1) конформації мономеру Аβ та 2) на реакцію осідання мономерів на фібрили.

У першому випадку увагу зосереджено на впливі мутації на дві важливі області, пов'язані зі згортанням та агрегацією Аβ мономерів, сегменти E22-K28 та центрального гідрофобного кластеру L17-A21 (СНС). Моделювання, виконане нашою групою, спільно з експериментами по іонній мобільноті, виконаними нашими співавторами,⁵⁵ чітко вказують на те, що конформації Аβ та деяких його мутантів не є повністю випадковими. Ці висновки добре узгоджуються з результатами ЯМР та молекулярно-динамічних досліджень інших груп, в яких, зокрема показано, що область 22-28 набуває структури згину в контексті протеолітично стійкого фрагмента 21-30 Аβ⁵⁶ і, ймовірно, є найбільш структурованою областю пептиду⁵⁷. В подальшому було дуже детально досліджено цей фрагмент у послідовності дикого типу,⁵⁸ а також вивчено вплив на нього різних середовищ⁵⁹ та мутацій, пов'язаних із вродженими формами хвороби.⁶⁰ Ці дослідження були розширені для фрагментів Аβ12-28⁶¹ та Аβ10-35,⁶² в яких згин було також виявлено. Порівняння результатів наших досліджень для різних сегментів можна знайти в нашій нещодавній статті.⁶³

СНС, з іншого боку, здається не має сформованої структури і, радше, служить місцем стикування мономерів із фібрилою. Мутації в цьому сегменті (наприклад, F19T) повністю скасовують ріст фібрил.⁶⁴

З огляду на виявлені особливості згортання Аβ пептиду розглянуто дві модельні системи: фрагменти 21-30 та 15-28. Перша модель дозволяє вивчити вплив мутації E22Q на структурований згин, тоді як друга – на структуру області СНС. Хоча фрагменти, що містять залишки, віддалені вздовж послідовності від залишку 22, не розглядаються, все ж очікується належне відтворення ефекту мутації E22Q. Дійсно, ек-

⁵⁴ W. P. Esler *et al.*, *J. Str. Biol.* **130**, 174 (2000).

⁵⁵ A. Baumketner, S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, G. Bitan, D. B. Teplow, M. T. Bowers, and J.-E. Shea, *Protein Sci.* **15**, 420 (2006), S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, A. Baumketner, J. E. Shea, G. Bitan, D. B. Teplow, and M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2075 (2005).

⁵⁶ N. D. Lazo, M. A. Grant, M. C. Condron, A. C. Rigby, and D. B. Teplow, *Protein Sci.* **14**, 1581 (2005), W. Chen, N. Mousseau, and P. Derreumaux, *J. Chem. Phys.* **125**, 084911 (2006), J. M. Borreguero, B. Urbanc, N. D. Lazo, S. V. Buldyrev, D. B. Teplow, and H. E. Stanley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6015 (2005).

⁵⁷ N. D. Lazo, M. A. Grant, M. C. Condron, A. C. Rigby, and D. B. Teplow, *Protein Sci.* **14**, 1581 (2005).

⁵⁸ A. Baumketner, S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, N. D. Lazo, D. B. Teplow, M. T. Bowers, and J. E. Shea, *ibid.* **15**, 1239 (2006).

⁵⁹ M. M. Murray *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **113**, 6041 (2009).

⁶⁰ M. G. Krone, A. Baumketner, S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, N. D. Lazo, D. B. Teplow, M. T. Bowers, and J. E. Shea, *J. Mol. Biol.* **381**, 221 (2008).

⁶¹ A. Baumketner and J.-E. Shea, *ibid.* **362**, 567 (2006).

⁶² A. Baumketner and J.-E. Shea, *J. Mol. Biol.* **366**, 275 (2007).

⁶³ D. B. Teplow *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **39**, 635 (2006).

⁶⁴ W. P. Esler, E. R. Stimson, J. R. Ghilardi, Y.-A. Lu, A. M. Felix, H. V. Vinters, P. W. Mantyh, J. P. Lee, and J. E. Maggio, *Biochemistry* **35**, 13914 (1996).

сперименти для А β 12-28⁶⁵ та А β 10-35⁶⁶ показали, що мутація E22Q викликає лише локальні зміни структурних властивостей пептиду, які не виходять за межі сусідніх залишків до E22. Проведене моделювання включає явний розчинник і протокол обміну репліками для досягнення більш повного охоплення конформаційного простору.

У другому випадку досліджено, як мутація E22Q впливає на швидкість осідання пептиду на існуючі амілоїдні фібрили. Для цього визначено ансамбль перехідного стану (TS) для реакції росту фібрили та обчислено вільну енергію активації осідання мономеру на попередньо вирощені фібрили для випадків мутованої послідовності та послідовності дикого типу.

Моделювання дисоціації А β з фібріл вказує на те, що контакти, які містять залишки L17-F20, є останніми, що розриваються в дисоціативних умовах. Ці висновки добре узгоджуються зі сценарієм, в якому залишки СНС, які піддаються впливу розчинника в мономері, слугують місцем стикування молекули А β , що осідають на фібріли. Після приєднання до фібріли, молекулі А β необхідно пройти додаткову конформаційну трансформацію для того, щоб стати її частиною. Аналіз моделювання як мономерного пептиду, так і фібрильної структури приводить до висновку, що вільна енергія активації для осідання мономеру на фібріли, ΔG^\ddagger , має дві складові: вклад від переходу сегмента L17-F20 в структуру β -нитки та вклад від упорядкування сегментів H14-K16 та A30-V36 (які є невпорядкованими в мономері),⁶⁷ але набувають конформації β -нитки в перехідному стані. Схема, яка ілюструє таку модель, показана на Рис. 13. Оскільки сегменти H14-K16 та A30-V36 набувають подібні конформації в мономерах А β 40E22Q та А β 40WT,⁶⁸ вільна енергія, потрібна для їх згортання в конформації β -нитки, характерної для фібріл, однакова для обох цих пептидів. Отже, ефект мутацій E22 на енергію активації процесу осідання в А β 40 зосереджений, перш за все, на зміні структури сегмента L17-F20. Для того, щоб оцінити вільну енергію згортання L17-F20 в потрібний стан, обчислено профіль вільної енергії як функцію відхилення RMSD в А β 15-28WT і А β 15-28E22Q від конформації TS для позиції С α атомів. Результати цих розрахунків показують, що більшість спостережуваних конформацій відхиляються менше, ніж на 0.5 Å від структури β -нитки перехідного стану для послідовності дикого типу. Оцінюється, що втрата вільної енергії при досягненні цієї структури становить $\Delta G^\ddagger = 1.3$ кКал/моль. Після вивчення профілю вільної енергії для пептиду А β E22Q виявлено, що його енергетичний бар'єр є нижчим, з відповідним $\Delta G^\ddagger = 1.1$ кКал/моль. Якщо припустити, що швидкість осідання описується виразом перехідного стану $k \sim e^{-\Delta G^\ddagger/kT}$, то приходимо до висновку, що співвідношення швидкості осідання k_m у мутованому А β до

⁶⁵ S. S. Zhang, N. Casey, and J. P. Lee, Fold. Des. **3**, 413 (1998).

⁶⁶ W. P. Esler *et al.*, J. Str. Biol. **130**, 174 (2000).

⁶⁷ L. Hou *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **126**, 1992 (2004).

⁶⁸ W. P. Esler *et al.*, J. Str. Biol. **130**, 174 (2000).

його послідовності дикого типу k : $k_m/k = e^{\Delta\Delta G^\dagger/kT}$, де $\Delta\Delta G^\dagger = \Delta G^\dagger - \Delta G_m^\dagger$ - різниця в енергії активації, T - температура. При температурі $T = 277\text{K}$ цей вираз передбачає, що $\text{A}\beta 15-28\text{E}22\text{Q}$ повинен осідати на фібрили в 1.4 рази швидше, ніж $\text{A}\beta 15-28$. Для порівняння, пришвидшення за рахунок мутації $\text{E}22\text{Q}$, поміряне для фрагменту $\text{A}\beta 10-35$, становить 2.15 рази.⁶⁹ Тобто видно, що вплив $\text{E}22$ на структурні властивості фрагмента СНС досить добре описує фізику, яка лежить в основі підвищення ступеня осідання в пептиді $\text{A}\beta 40$.

Друга система, досліджена в даній роботі, це фрагмент $\text{A}\beta 11-25$. Структуру фібрил для цього фрагмента було вивчено в рамках повно-атомного підходу, який широко та успішно застосовується у дослідженнях структури амілоїду.⁷⁰ Конкретною метою було визначення взаємодій, які встановлюють регістр фібрилі при кислому та нейтральному pH. Шляхом розрахунку вільних енергій спочатку було показано, що β -нитки димерів, які є мінімальним будівельним блоком β -листів, переважно заповнюють так званий $17 + k \leftrightarrow 20 - k$ регістр, незалежно від pH. Для нейтрального середовища це означає, що структура фібрил задається на найнижчому рівні її ієрархічної будови. В кислому ж середовищі, з іншого боку, виявляється що взаємодія між β -листами, що утворюють фібрилу, є важливою для визначення регістру. Було побудовано по декілька моделей β -листів для кислого та нейтрального pH і досліджено їх за допомогою короткого молекулярного динамічного моделювання в явній воді в масштабі наносекунди. Моделі приводять до оцінки вільних енергій, отриманих із використанням узагальненої схеми Борна неявної сольватациї та моделі доступної поверхні. Конформації з найменшою вільною енергією відбираються як структури справжніх фібрил при відповідному значенні pH. Видно, що регістр сформованих структур при pH=2 та 7 добре узгоджується з регіс-

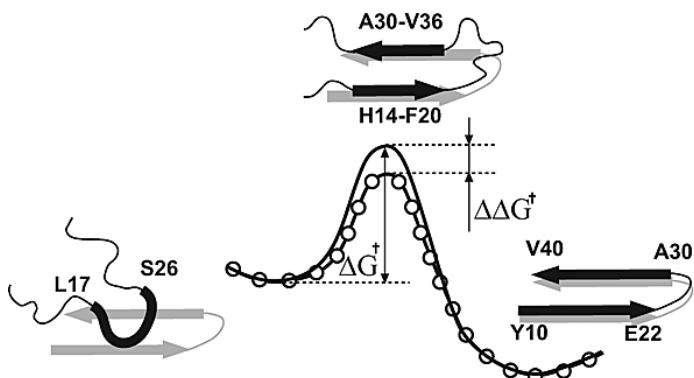


Рисунок 13. Схема, що ілюструє, як мономери $\text{A}\beta 40$ осідають на амілоїдні фібрилі. Часовий масштаб цього процесу регулюється різницею вільної енергії між перехідними станами та мономерними стикованими станами, або вільною енергією активації ΔG^\dagger . Вільна енергія активації в $\text{A}\beta 40$ з мутацією $\text{E}22\text{Q}$, позначена символами, знижується в порівнянні з послідовністю дикого типу, $\Delta\Delta G^\dagger > 0$. Визначальними характеристиками конформацій перехідного стану є β -нитки в сегментах $\text{H}14-\text{F}20$ і $\text{A}30-\text{V}36$. Для досягнення цих конформацій $\text{A}\beta 40$ має змінити структуру центрального сегмента гідрофобного кластера $\text{L}17-\text{F}20$.

⁶⁹ Ibid.

⁷⁰ D. K. Klimov and D. Thirumalai, Structure **11**, 295 (2003).

тром, визначенім експериментально. З допомогою отриманих моделей встановлено, що при $\text{pH}=7$ основний внесок у різницю енергії між регістрами $17+k \leftrightarrow 22-k$ та $17+k \leftrightarrow 20-k$ вносять електростатичні взаємодії. Водночас гідрофобні взаємодії та можливі взаємодії між ароматичними залишками стають визначальними у встановленні регістру фібрил у кислому середовищі. Важливу роль у визначенні структури фібрил відіграє взаємодія між K16 і E22. Ці два залишки заряджені при нейтральному pH і утворюють солевий місток, що робить великий вклад в електростатичну енергію регістру $17+k \leftrightarrow 20-k$. При низькому pH цей вклад нівелюється, оскільки бічний ланцюг глутамінової кислоти стає нейтральним. Встановлено, що такий самий стабілізуючий вплив має електростатична взаємодія між C- та N-термінальними групами. Грунтуючись на цьому спостереженні, висловлено припущення, що модифікація С-кінця А β 11-25 шляхом приєднання нейтралізуючої групи може впливати на регістр фібрил при $\text{pH}=7$, можливо, повертаючи його до $17+k \leftrightarrow 22-k$ конфігурації, яка спостерігається при $\text{pH}=2$. Це припущення було перевірено та підтверджено за допомогою комп'ютерного моделювання пептиду А β 11-25 з амідованим карбоксильним кінцем.

ВИСНОВКИ

В дисертації досліджено механізми, що лежать в основі згортання та агрегації білків. Для цього розвинуто нові теоретичні методи та моделі, які дозволили отримати низку оригінальних результатів. Зокрема, вдалося пояснити фізику функціонального переходу в моторному білку міозин; з'ясувати роль комірки в згортанні білків шаперонами GroEL/ES; описати механізм утворення амілоїдних фібрил на атомному рівні для фрагментів А β пептиду. Поставлену в роботі мету повністю виконано та всі заплановані задачі розв'язано. Як підсумок одержаних результатів можна навести наступні висновки.

1. Метод інверсії Больцмана кількісно правильно описує структуру водяних розчинів лізоциму.
2. Фазова діаграма білкових розчинів дуже сильно залежить від моделі, яка використовується для білка. Для задовільного опису фазової рівноваги білка лізоциму необхідно вводити несферичні моделі. На додачу до фазової діаграми, такі моделі здатні правильно описати структуру білкового розчину.
3. Існує третій тип систем, здатних утворювати рівноважні кластери, крім двох вже раніше відомих. В системах цього типу частинки взаємодіють через глобально відштовхувальний потенціал, який має локальний мінімум на коротких відстанях.
4. Вплив комірки шаперона GroEL/ES на процес згортання сильно залежить від рівня фрустрації поверхні вільної енергії білка. Прискорене згортання за умов термодинамічної стабільності можливе лише для систем з мінімальним рівнем фрустрації.

5. Комірки з притягальними стінками здатні пришвидшувати згортання білків через новий механізм – утворення комплексу шаперон-білок, який слугує проміжним станом на шляху згортання. Ступінь пришвидшення контролюється силою притягальної взаємодії та може досягати одного порядку величини.

6. Підхід до моделювання великих білків та білкових комплексів з атомною точністю, в якому використовується парний розклад вільної енергії сольватациї, є достатньо точним для того, щоб вірно описати конформаційну статистику пептидів на основі амінокислоти аланіну.

7. В рамках цього підходу, 11 різних потенціалів, що описують взаємодії між амінокислотними залишками, є достатніми для того, щоб отримати переносний набір. Моделювання за допомогою цього набору довших ланцюгів, наприклад тих що містять 25 залишків, приводять до якісно правильних результатів, в порівнянні з моделюванням у явному розчиннику.

8. Пептиди на основі амінокислоти аланіну демонструють підвищенну схильність до утворення амілоїдних фібрил зростом довжини ланцюга. Цей висновок добре узгоджується з експериментальними спостереженнями.

9. Електричне поле здатне індукувати переход у спіральний стан у переважно невпорядкованих білках. Переход наступає при менших напруженостях поля чим довшим є поліпептидний ланцюг.

10. Електричне поле приводить до розпаду β -листів. Цей процес супроводжується переходом у спіральний стан.

11. Електричне поле можна використовувати як засіб для контролю над агрегацією білків у *in vitro* умовах. Увімкнення або вимкнення поля може привести до призупинення чи активації агрегації в експериментах із розділенням у часі.

12. Переход відновлення в м'язовому білку міозину містить, як мінімум, два послідовні кроки. Перший крок полягає в замиканні ключа II, який знаходиться на великій відстані від області генерації сили. Наступні кроки приводять до повороту домену конвертора.

13. Поворот домену конвертора спричинений взаємодіями всередині невеликого фрагмента білка, що містить сам конвертор, релейну спіраль, релейну петлю, та спіраль 1 гомологій до Src (SH1). Поворот керується кластером гідрофобних залишків I687, F487 та F506.

14. Дія заміни E22Q, що пов'язана з вродженою формою хвороби Альцгеймера, на процес осідання відповідного пептиду $A\beta$ на край ростучої фібрили передається через вплив цієї мутації на згортання цього пептиду в мономерному стані. Ключовим фактором тут є взаємодія між двома структурованими ділянками в $A\beta$, що містять сегменти 12-28 та 17-21. Мутація послаблює цю взаємодію, що приводить до пониження бар'єру вільної енергії для процесу осідання.

15. Структуру фібрили фрагмента $A\beta$ 11-25 пептиду хвороби Альцгеймера контролюють електростатичні взаємодії між зарядженими залишками пептиду.

16. Визначальний внесок у стабільність фібрил роблять взаємодії між зарядженими С- та N-кінцями. Нейтралізація С-кінця з допомогою амідної групи приводить до зміни реєстру β -листів фібрили.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Baumketner A. Softness and non-spherical shape define the phase behavior and the structural properties of lysozyme in aqueous solutions / **A. Baumketner**, R. Melnyk, M.F. Holovko, W. Cai, D. Costa [et al.] // J. Chem. Phys. — 2016. — Vol. 144. — № 1. — P. 015103 (4 pages).
2. Baumketner A. Equilibrium clusters in suspensions of colloids interacting via potentials with a local minimum / **A. Baumketner**, W. Cai // Condens. Matter Phys. — 2016. — Vol. 19. — № 1. — P. 13605 (12 pages).
3. Baumketner A. Effects of confinement in chaperonin assisted protein folding: rate enhancement by decreasing the roughness of the folding energy landscape / **A. Baumketner**, A. Jewett, J.-E. Shea // J. Mol. Biol. — 2003. — Vol. 332. — № 3 — P. 701-713.
4. Jewett A. Accelerated folding in the weak hydrophobic environment of a chaperonin cavity: Creation of an alternate fast folding pathway / A. Jewett, A. **Baumketner**, J.E. Shea // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101. — № 36. — P. 13192-13197.
5. Baumketner A. Effects of frustration on the kinetics of helix formation in alanine polypeptides / **A. Baumketner**, J.-E. Shea // Condens. Matter Phys. — 2004. — Vol. 7. — № 2. — P. 421–434.
6. Baumketner A. Kinetics of the coil-to-helix transition on a rough energy landscape / **A. Baumketner**, J.E. Shea // Phys. Rev. E. — 2003. — Vol. 68. — № 5. — P. 051901 (10 pages).
7. Ni B. Reduced atomic pair-interaction design (RAPID) model for simulations of proteins / B. Ni, **A. Baumketner** // J. Chem. Phys. — 2012. — Vol. 138. — № 6. — P. 064102 (12 pages).
8. Baumketner A. Electric Field as a Disaggregating Agent for Amyloid Fibrils / **A. Baumketner** // J. Phys. Chem. B. — 2014. — Vol. 118. — № 50. — P. 14578-14589.
9. Baumketner A. Early stages of the recovery stroke in myosin II studied by molecular dynamics simulations / **A. Baumketner**, Y. Nesmelov // Protein Sci. — 2011. — Vol. 20. — № 12. — P. 2013-2022.
10. Baumketner A. Interactions between relay helix and Src homology 1 (SH1) domain helix drive the converter domain rotation during the recovery stroke of myosin II / **A. Baumketner** // Proteins Struct. Funct. Bioinf. — 2012. — Vol. 80. — № 6. — P. 1569-1581.

11. Baumketner A. The mechanism of the converter domain rotation in the recovery stroke of myosin motor protein / **A. Baumketner** // Proteins Struct. Funct. Bioinf. — 2012. — Vol. 80. — № 12. — P. 2701-2710.
12. Baumketner A. Free energy landscapes for amyloidogenic tetrapeptides dimerization / **A. Baumketner**, J.E. Shea // Biophys. J. — 2005. — Vol. 89. — № 3. — P. 1493-1503.
13. Soto P. Aggregation of polyalanine in a hydrophobic environment / P. Soto, A. **Baumketner**, J.E. Shea // J. Chem. Phys. — 2006. — Vol. 124. — № 13. — P. 134904 (7 pages).
14. Baumketner A. Folding landscapes of the Alzheimer amyloid- β (12-28) peptide / **A. Baumketner**, J.-E. Shea // J. Mol. Biol. — 2006. — Vol. 362. — № 3. — P. 567-579.
15. Bernstein S.L. Amyloid beta-protein: Monomer structure and early aggregation states of A beta 42 and its Pro(19) alloform / S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, A. **Baumketner**, J.E. Shea, G. Bitan [et al.] // J. Am. Chem. Soc. — 2005. — Vol. 127. — № 7. — P. 2075-2084.
16. Baumketner A. Structure of the 21-30 fragment of amyloid beta-protein / **A. Baumketner**, S.L. Bernstein, T. Wyttenbach, N.D. Lazo, D.B. Teplow [et al.] // Protein Sci. — 2006. — Vol. 15. — № 6. — P. 1239-1247.
17. Baumketner A. Amyloid β -protein monomer structure: a computational and experimental study / **A. Baumketner**, S.L. Bernstein, T. Wyttenbach, G. Bitan, D.B. Teplow [et al.] // Protein Sci. — 2006. — Vol. 15. — № 3. — P. 420-430.
18. Teplow D.B. Elucidating amyloid beta-protein folding and assembly: A multidisciplinary approach / D. B. Teplow, N.D. Lazo, G. Bitan, S. Bernstein, T. Wyttenbach, M. T. Bowers, **A. Baumketner** [et al.] // Acc. Chem. Res. — 2006. — Vol. 39. — № 9. — P. 635-645.
19. Baumketner A. The structure of the Alzheimer amyloid- β (10-35) peptide probed through replica-exchange molecular dynamics simulations in explicit solvent / **A. Baumketner**, J.-E. Shea // J. Mol. Biol. — 2007. — Vol. 366. — № 1. — P. 275-285.
20. Baumketner A. Role of the familial Dutch mutation E22Q in the folding and aggregation of the 15-28 fragment of the Alzheimer amyloid-beta protein / **A. Baumketner**, M.G. Krone, J.E. Shea // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2008. — Vol. 105. — № 16. — P. 6027-6032.
21. Krone M.G. Effects of familial Alzheimer's disease mutations on the folding nucleation of the amyloid beta-protein / M. G. Krone, **A. Baumketner**, S.L. Bernstein, T. Wyttenbach, N.D. Lazo [et al.] // J. Mol. Biol. — 2008. — Vol. 381. — № 1. — P. 221-228.
22. Murray M.M. Amyloid beta-Protein: Experiment and Theory on the 21-30 Fragment / M. M. Murray, M.G. Krone, S.L. Bernstein, **A. Baumketner**, M.M.

- Condron [et al.] // J. Phys. Chem. B. — 2009. — Vol. 113. — № 17. — P. 6041-6046.
23. Negureanu L. Microscopic Factors that Control beta-Sheet Registry in Amyloid Fibrils Formed by Fragment 11-25 of Amyloid beta Peptide: Insights from Computer Simulations / L. Negureanu, **A. Baumketner** // J. Mol. Biol. — 2009. — Vol. 389. — № 5. — P. 921-937.
 24. Баумкетнер А. Дослідження білків методом комп'ютерних симуляцій/ А. **Баумкетнер** // Програма, Різдвяні дискусії, Львів, Україна, 11-12 Січня, 2017. — Журн. фіз. дослідж. Vol.21. — № 1/2. — Р. 1998-8.
 25. Stelmakh A. Effective attraction between like-charged macroions in aqueous medium/ A. Stelmakh, **A. Baumketner** // Book of Abstracts, Ulam Computer Simulations Workshop, Lviv, Ukraine, 21-24 June, 2017. — Lviv, 2017. — P. P26.
 26. Baumketner A. Monte Carlo study of cluster crystals stabilized by hydrophobic and electrostatic interactions/ **A. Baumketner** // Book of Abstracts, Ulam Computer Simulations Workshop, Lviv, Ukraine, 21-24 June, 2017. — Lviv, 2017. — P. T1.
 27. Baumketner A. Biomolecular simulations in generalized non-Boltzmann ensembles/ **A. Baumketner** // Book of Abstracts, Summer Short Course on Monte Carlo Methods and Applications, Beijin, China, 26-28 June, 2016. — Beijin, 2016. — P. 45-58.
 28. Баумкетнер А. Кластери білка лізозиму у водному середовищі / А. **Баумкетнер** // Програма, Х Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини, Львів, Україна. 6 Листопад, 2015. — Львів, 2015. — Р. 1.
 29. Баумкетнер А. Комп'ютерне моделювання проблеми агрегації білків / А. **Баумкетнер** // Програма, XV Всеукраїнська школа-семінар і Конкурс молодих вчених зі статистичної фізики та теорії конденсованої речовини, Львів, Україна. 4-5 Червня, 2015.- Львів, 2015. — Р. 1.
 30. Баумкетнер А. Комп'ютерне моделювання біофізичних процесів / А. **Баумкетнер** // Програма, ФЕСТИВАЛЬ НАУКИ в Інституті фізики конденсованих систем НАН України Львів, Україна. 19-21 Травня, 2015. — Львів, 2015. — Р. 1.
 31. Баумкетнер А. Згортання та агрегація амілоїдного бета пептиду хвороби Альцгеймера / А. **Баумкетнер** // Програма, VIII Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини, Львів, Україна. 1 Листопад, 2013. — Львів, 2013. — Р. 1.
 32. Baumketner A. Microscopic factors that control beta-sheet registry in amyloid fibrils formed by 11-25 fragment of amyloid beta peptide/ **A. Baumketner** // Book of Abstracts, 238-th ACS National ACS meeting, Washington, DC, USA, 16-20 August, 2009. — Washington, 2009. — P. Phys 269.
 33. Baumketner A. Microscopic factors that control β -sheet registry in amyloid fibrils formed by 11-25 fragment of amyloid β peptide: Insights from computer simulations/ **A. Baumketner** // Book of Abstracts, Statistical Physics: Modern

- Trends and Applications, Львів, Україна, 23-25 Червня, 2009. — Львів, 2009. — P. 18.
34. Baumketner A. Dutch and Italian type substitutions in the 15-28 fragment of Alzheimer's disease Amyloid protein studied by molecular dynamics simulations/ **A. Baumketner** // Book of Abstracts, Protein Folding Dynamics, Gordon Research Conference Venture, CA, USA, 6-8 January, 2008. — Venture, 2008. — P. 1.

АНОТАЦІЯ

Баумкетнер А. Б. Нові аспекти згортання та агрегації білків: Теорія та комп’ютерне моделювання. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.24 – фізики колоїдних систем. – Інститут фізики конденсованих систем Національної академії наук України, Львів, 2018.

Білки це один із трьох основних типів біологічних молекул. Вслід за розшифруванням геному людини, проблема з’ясування того як білки згортання та як взаємодіють один з одним стала дуже нагальною. Теоретичні методи мають низку переваг над експериментальними підходами і за останні роки почали широко застосовуватися в дослідженнях білків.

В даній дисертації представлені результатів низки робіт із вивчення проблем згортання та агрегації білків. Зокрема, досліджено колективні властивості білків, такі як фазова поведінка чи процес утворення кластерів. Також з’ясовано деталі процесу згортання всередині обмежуючої сфери, що імітує комірку шаперона. Запропоновано нову модель для дослідження агрегації. Досліджено стрибок відновлення в моторному білку міозин. Вивчено властивості амілоїдних фібрил.

Ключові слова: білки, теоретичні дослідження, комп’ютерне моделювання, амілоїд, агрегація, згортання

АННОТАЦИЯ

Баумкетнер А. Б. Новые аспекты сворачивания и агрегации белков: Теория и компьютерное моделирование. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.24 – Физика коллоидных систем. – Институт физики конденсированных систем НАН Украины, Львов, 2018.

Белки это один из трех основных видов биологических молекул. Вслед за расшифровкой генома человека, проблема выяснения того, как белки сворачиваются и как взаимодействуют друг с другом стала очень актуальной. Теоретические методы имеют ряд преимуществ над экспериментальными подходами и за последние годы начали широко применяться в исследованиях белков.

В данной диссертации представлены результаты ряда работ по изучению проблем свертывания и агрегации белков. В частности, исследованы коллективные свойства белков, такие как фазовое поведение или процесс образования кластеров. Также выяснены детали процесса свертывания внутри ограничивающей сферы, имитирующей ячейку шаперона. Предложена новая модель для исследования агрегации. Исследован скачок восстановления в моторном белке миозин. Изучены свойства амилоидных фибрил.

Ключевые слова: белки, теоретические исследования, компьютерное моделирование, амилоид, агрегация, свертывание

ABSTRACT

A. B. Baumketner. New aspects of protein folding and aggregation: Insights from theory and computer simulations. – Manuscript.

Thesis for the Degree of Doctor of Sciences in Physics and mathematics on the specialty 01.04.24 – Physics of Colloids. – Institute for Condensed Matter Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2018.

Proteins are one of the three main types of biological molecules. Recently, the problem of how proteins fold and interact with one another has gained a heightened sense of urgency, especially so after the completion of the human genome decoding. Theoretical approaches play a key role in the studies of proteins, as they offer a number of unique advantages over the alternative methods.

In this dissertation, we present the results of a number of our theoretical projects aimed specifically at the problems of protein folding and aggregation. The specific tasks were chosen using the following criteria. First, we asked that certain experimental information be available for the problem under study, sufficient to lead to the formulation of physical hypotheses. Second, experimental approaches to the chosen problem had to meet significant challenges. These could be, for instance, difficulties stabilizing the object of the study long enough to perform measurements; insufficient resolution of the method; or ambiguity in the interpretation of the results. Under the targeted conditions, theoretical approaches, primarily computer simulations, offer a competitive advantage over the experimental methods, and can play a key role in solving the problem.

We use a wide range of theoretical models in our study that vary greatly in their resolution depending on the specific problem. While one interacting particle is used to represent an entire protein in the studies of collective properties of proteins in aqueous solutions, more advanced models are employed to study protein folding and aggregation. Our main results can be summarized as follows.

Boltzmann inversion is applied in conjunction with molecular dynamics simulations to derive inter-molecular potential for protein lysozyme in aqueous solution directly from experimental static structure factor. The potential has a soft repulsion at short distances and an attraction well at intermediate distances that give rise to the liquid-liquid phase separation. Gibbs ensemble Monte Carlo simulations reveal that in order to achieve good agreement with experiment for the phase diagram, a non-spherical description of lysozyme has to be adopted.

In protein solutions, clusters are various multimers that result from protein self-assembly and exist in equilibrium with monomers. There are two types of potentials that lead to clusters: a) potentials with a *global* minimum and a repulsive tail that result from the competition between short-range attraction and long-range repulsion and b) purely repulsive potentials which have a soft shoulder. Using computer simulations we demonstrate in this work that potentials with a *local* minimum and a repulsive tail that do not belong to either of the known types, are also able to generate clusters. An in-depth

comparative analysis shows that the new type of cluster-forming potential serves as a bridge between the other two types. The new clusters are expanded in shape while their assembly is driven by entropy, like in the purely repulsive systems but only at low densities. At high densities, clusters are collapsed and stabilized by enthalpy, in common with the systems with competing attractive and repulsive interactions.

Computer simulations were used to study folding of proteins mediated by molecular chaperonin GroEL/ES. A repulsive and an attractive chaperonin cavity were considered. The effect of the repulsive cavity is found to be strongly influenced by the level of frustration in the protein folding free energy landscape. Accelerated folding inside the cavity was seen only for proteins with minimal frustration. For the attractive cavity, folding acceleration is achieved by the creation of an additional intermediate structure that appears when the protein is bound to the chaperonin.

A new model for the simulations of protein aggregation was introduced. The model uses all-atom architecture but treats electrostatic and non-polar interactions in approximate ways. When tested for alanine polypeptides, the model correctly reproduces the increasing tendency of these systems for aggregation with the growing size of the peptide chain. The model was used to study the effect of external electric field on folding and aggregation. It is seen that the field induces a coil-helix transition in a single peptide, and destabilizes β -sheets in multi-peptide configurations.

Computer simulations are used to study the recovery stroke in myosin motor protein. In more than $2\mu\text{s}$ of aggregate simulation time, we uncover evidence that the recovery stroke is a multi-step process consisting of at least two stages separated by a time delay. The first stage consists of switch II loop closing at the nucleotide binding site, in the presence of ATP. The second stage involves the rotation of the convertor domain. We introduce a reduced model in explicit solvent that is able to reproduce correctly this structural transition.

The effect of the Dutch type E22Q mutation on the adsorption of Alzheimer's disease peptide A β on pre-seeded amyloid fibrils is studied in computer simulations within the all-atom approach. It is shown that this effect is entropic, in agreement with experiment, and it leads to the accelerated deposition.

To elucidate the mechanism by which pH controls the registry of β -sheets in amyloid fibrils, we studied the fibrils made by 11-25 fragment of A β peptide. Several structural models were built and examined in short molecular dynamics simulations in explicit water. The models with the lowest free energy were selected as representative of the true fibrillar structure. It is shown that the registry of these models agrees well with the experimental evidence. At neutral pH, the main contribution to the free energy difference between the two registries comes from the electrostatic interactions. The charge group of the carboxy terminal makes a large contribution to these interactions and thus appears to play a critical role in determining the registry.

Key words: proteins, theoretical studies, computer simulations, amyloid, aggregation, protein folding