Інститут фізики конденсованих систем Національної академії наук України Інститут фізики конденсованих систем Національної академії наук України

> Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

БАУМКЕТНЕР Андрій Богданович

УДК 538.9; 539.2; 577; 544

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

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

01.04.24 - фізика колоїдних систем

(104 – фізика та астрономія)

10 – природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ А. Б. Баумкетнер

Науковий консультант БРИК Тарас Михайлович, д.ф.-м.н., ст. наук. сп.

Львів - 2018

#### АНОТАЦІЯ

Баумкетнер А. Б. Нові аспекти згортання та агрегації білків: Теорія та комп'ютерне моделювання. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.24 «Фізика колоїдних систем» (104 – Фізика та астрономія). – Інститут фізики конденсованих систем Національної академії наук України, Львів, 2018.

Білки є одним з трьох основних видів біологічних молекул. З'ясування того як білки згортаються та взаємодіють один з одним - проблема що постала особливо гостро після нещодавнього розшифрування геному людини - є ключем до розуміння живої матерії на мікроскопічному рівні. Схожість білкових розчинів з колоїдними суспензіями робить підходи розвинуті у фізиці колоїдних систем надзвичайно привабливими в дослідженнях поведінки білків. Особливе місце в таких дослідженнях займають теоретичні методи, зокрема комп'ютерне моделювання, які володіють низкою важливих переваг над своїми експериментальними аналогами.

Дана дисертація присвячена вивченню поведінки білків методами теоретичного аналізу та комп'ютерного моделювання. Для висвітлення маловивчених аспектів згортання та агрегації білків, було розглянуто низку задач на різних просторових та часових масштабах. Особливий акцент зроблено на взаємодії теорії та експерименту. Основною метою було отримати теоретичну інтерпретацію для тих експериментальних спостережень, для яких сформовані певні фізичні гіпотези. При цьому вибір робився на користь тих задач, для яких експериментальні підходи зустрічаються з істотними викликами. Зокрема, це були труднощі стабілізувати об'єкт досліджень на протязі часу достатнього для вимірювань, брак роздільної здатності методу та неоднозначність у інтерпретації вимірювань.

Розглянуто моделі, які сильно відрізняються за своєю роздільною здатністю, в залежності від того чи об'єктом досліджень є окремі білки, наприклад у випадку згортання, чи білкові розчини, в яких білкові молекули демонструють колективні властивості, такі як агрегація. Зокрема, в дослідженнях колективної поведінки, що приводить до фазового розшарування та утворення кластерів, було використано одну частинку для представлення молекули білка. З іншого боку, процеси згортання та агрегації досліджувалися з використанням моделей з більшою деталізацією, в тому числі на атомному рівні. Основні результати отримані в даній дисертації можна підсумувати наступним чином.

Метод інверсії Больцмана застосовано, у поєднанні з методом молекулярної динаміки, до експериментального статичного структурного фактора білка лізоциму у водному розчині для виведення потенціалу міжмолекулярної взаємодії. Отриманий потенціал, який описує взаємодію двох колоїдних частинок сферичної форми, має м'яке відштовхування на коротких відстанях і притягальну яму на проміжних відстанях. Зі збільшенням густини, цей потенціал приводить до фазового переходу типу рідина-рідина. Критичні параметри цього переходу, однак, погано узгоджуються з експериментом. Встановлено, що несферична модель краще підходить для опису лізоциму. Крім структури, на якій грунтується виведення, така модель дозволяє правильно описати також фазову діаграму білкового розчину.

Показано, що системи які взаємодіють через глобально відштовхувальний потенціал з локальним мінімумом на коротких відстанях утворюють рівноважні кластери - мультимери різного розміру, які з'являються у простих колоїдних суспензіях внаслідок само-асоціації колоїду та перебувають у рівновазі з мономерами. Два інші типи потенціалів, що приводять до утворення кластерів, це: а) потенціали з глобальним мінімумом і відштовхувальним хвостом, що виникають внаслідок конкуренції короткосяжного притягання й далекосяжного відштовхування, та б) суто відштовхувальні потенціали, що мають м'яке плече. Детальний порівняльний аналіз за допомогою комп'ютерного моделювання показує, що новий тип кластеротворних потенціалів служить містком між цими двома відомими типами. Нові кластери мають видовжену форму і ентропійний механізм утворення, як і в суто відштовхувальних системах, але лише при низьких густинах. При високих густинах, кластери переходять у компактний стан і їх стабілізує ентальпія, як і в системах з конкурентними притягальною та відштовхувальною взаємодіями.

Досліджено процес згортання білка що відбувається за посередництва молекулярного шаперона GroEL/ES. Розглянуто комірку шаперона яка має як відштовхувальні так і притягальні стінки. Виявлено, що вплив комірки дуже сильно залежить від рівня фрустрації поверхні вільної енергії білка. Комірки з відштовхувальними стінками можуть прискорювати згортання білків з гладкими поверхнями, що мають мінімальний рівень фрустрації. Механізм прискорення полягає у механічному відсіканні конформацій з великим радіусом гірації, що потрапляють у локальний мінімум потенціальної енергії. Притягальні стінки комірки, з іншого боку, демонструють ширший спектр поведінки. Крім обмежень на ансамбль розгорнутого стану, комірка здатна тимчасово утворювати комплекс з білком у невірно згорнутих конформаціях. За рахунок цього відбувається пришвидшення реакції згортання, яке може сягати одного порядку величини в залежності від сили притягання. Порівняння результатів моделювання для обох типів комірок проливає нове світло на роль просторового обмеження в процесі згортання за посередництва шаперонів.

Запропоновано нову модель скороченого опису для дослідження процесу агрегації білків. Модель протестовано для пептидів поліаланіну, для яких вона правильно описує тенденцію до посилення агрегації з розміром пептидного ланцюга. Досліджено вплив зовнішнього електричного поля та показано, що поле стимулює перехід в спіральний стан та може спричинити розпад фібрил.

Досліджено стрибок відновлення, ключового етапу в функціональному циклі м'язового моторного білка міозину, протягом якого пасивна перевідновлювальна конформація змінюється в активну поствідновлювальну конформацію, готову до генерації сили. В моделюванні тривалістю більш ніж 2µs сукупного часу, було встановлено, що стрибок відновлення - це двокроковий процес, який складається з двох етапів розділених часовим інтервалом. Безпосередньо в симуляціях спостерігався перший етап, при якому петля ключа ІІ закривається за присутності АТФ в місці зв'язування з нуклеотидами. При цьому, отримана конфігурація ділянки, що взаємодіє з нуклеотидами, була ідентичною до конфігурації, що спостерігається експериментально. Також добре узгодження з експериментом спостерігалося для розподілу міжзалишкових відстаней в області генерації сили. Другий етап структурного переходу стрибка відновлення – це поворот доменуконвертора. Напряму в симуляціях він не спостерігався, з чого було зроблено висновок, що поворот a) не пов'язаний механічно із закриттям ключа II та b) відбувається на часах довших ніж тривалість симуляцій. Шляхом комбінаторного пошуку було встановлено основні структурні компоненти білка з області генерації сили, які відповідають за появу двох кутів повороту. Для цього було збудовано низку моделей скороченого опису, які були досліджені в атомному передставленні в явній воді. Встановлено, що перехід між двома станами контролюється невеликою спіраллю (SH1), розташованою поруч з релейною спіраллю та релейною петлею. Виявлено, що зсув у позиції SH1 у напрямку від релейної спіралі викликає перехід від одного стану до іншого. Перехід контролюється кластером гідрофобних залишків I687, F487 та F506, які роблять значний внесок у стабільність обох станів. Спостережуваний механізм добре узгоджується з наявними структурними та мутаційними дослідженнями.

Досліджено вплив мутації E22Q на ріст амилоїдних фібрил пептиду хвороби Альцгеймера АВ. Розглянуто процес осідання мономерного АВ на край модельної фібрили. Часовий масштаб цього процесу керується бар'єром вільної енергії, що відповідає структурному переходу пептиду від конформацій мономерного стану до конформацій перехідного стану. Для вивчення конформацій мономерного стану, з яких відбувається початкове стикування пептиду з фібрилою, були використані фрагменти Аβ різної довжини. Зокрема, було розглянуто фрагмент 21-30, який містить структурований згин що охоплює сегмент 22-28. Інший сегмент, що демонструє тенденцію до структурного впорядкування в загалом невпорядкованому пептиді, це 17-21, який складається, в основному, з гідрофобних залишків, через що носить назву центральний гідрофобний кластер (СНС). Довжина Аβ фрагменту слабо впливає на структуру СНС, як було встановлено нами для Аβ12-28 та Аβ10-35. Для того, щоб врахувати вплив обох структурованих ділянок, було досліджено фрагмент Аβ15-28. В симуляціях методом обміну репліками у явній воді було встановлено, що, в порівнянні з послідовністю дикого типу, Е22Q мутація не змінює структуру згину 22-28, проте послаблює його взаємодію з СНС. Це приводить до збільшення частки β-структури в СНС, яка є визначальною характеристикою конформацій перехідного стану для фібрил. Як наслідок, Е22Q зменшує бар'єр вільної енергії для процесу осідання пептиду, що приводить до його пришвидшення. Термодинамічні ознаки ефекту пришвидшення отримані в симуляціях добре узгоджуються з експериментальними даними.

Побудовано мікроскопічні моделі фібрили фрагменту Аβ пептиду що містить залишки 11-25. Цей фрагмент відомий тим, що змінює регістр β-листів зі зміною рН середовища фібрили. Після коротких симуляцій в явному розчиннику, проведених з метою досягнення рівноваги, вільна енергія моделей була оцінена за допомогою теорії неявного розчинника. Встановлено, що регістр моделей з найнижчою вільною енергією добре узгоджується з експериментальними спостереженнями. В нейтральному середовищі основним внеском у різницю вільної енергії між двома регістрами є електростатична взаємодія. Зокрема, група зарядів карбоксильного кінця робить великий внесок у ці взаємодії і, отже, грає ключову роль у визначенні регістру.

Ключові слова: білки, комп'ютерне моделювання, агрегація, згортання

#### ABSTRACT

*Baumketner A. B.* New aspects of protein folding and aggregation: Insights from theory and computer simulations. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for the Degree of Doctor of Sciences in Physics and mathematics on the specialty 01.04.24 "Physics of Colloids" (104 – Physics and Astronomy). – 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. Finding out how proteins fold and interact with one another – the problem that has gained urgency following the decoding of the human genome – is a key to our understanding of the living matter at the microscopic level. Strong similarities between protein solutions and colloidal suspensions make approaches developed for the latter very useful in the studies of the former. A key role in such studies belongs to theoretical methods, which offer a number of unique advantages over their experimental counterparts.

In this dissertation the properties of proteins are studied by analytical theory and computer simulations. In order to shed light on little-known aspects of protein folding and aggregation, we consider a number of projects involving proteins, on multiple time and length scales. The focus is placed on the synergetic interaction between theory and experiment. The main goal is to provide microscopic interpretation for those experimental observations, for which specific physical hypotheses are available. Experimental approaches to the studied systems meet with significant challenges, such as difficulties stabilizing the object of the study long enough to perform measurements, insufficient resolution of the method and ambiguity in the interpretation of the results.

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. Moreover, Gibbs ensemble Monte Carlo simulations demonstrate that a non-spherical description of lysozyme is better suited to correctly reproduce the experimentally observed properties, such as phase separation. Our findings shed new light on the common problem in molecular and cell biology: "How to model proteins in their natural aqueous environments?"

It is shown that systems interacting via a globally repulsive potential with a local minimum at short distances form equilibrium clusters - various multimers that result from colloid self-association and exist in equilibrium with monomers. The other two types of potentials that produce clusters are: 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. A detailed comparative analysis shows that the new type of cluster-forming potential serves as a bridge between the other two. The new clusters are expanded in shape and 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.

Folding of proteins mediated by molecular chaperonin GroEL/ES is studied by computer simulations. A repulsive and an attractive chaperonin cavity are 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. It is seen that cavities with repulsive walls are able to accelerate folding for proteins with smooth free energy landscapes only. The mechanism by which acceleration is achieved is the elimination by the cavity of the extended protein conformations that correspond to local potential energy minima. Attractive walls, on the other hand, demonstrate a richer pattern of behaviors. In addition to eliminating certain conformations, the cavity is also able to bind protein in incorrectly folded states, depending on the strength of the attraction. A new intermediate state is created, which lowers the free energy barrier to folding and which can accelerate this reaction by as much as an order of magnitude. A comparison of the effect of the cavities of both types sheds new light on the chaperon-mediated folding.

A new model for simulations of protein aggregation is introduced. The model uses all-atom architecture but treats electrostatic and non-polar interactions in approximate ways. For alanine polypeptides, the tendency toward aggregation with the growing size of the peptide chain is correctly reproduced. Effect of external electric field on folding and aggregation is studied. It is shown that the field is able to induce a helix-coil transition in natively disordered proteins and, also, cause layered  $\beta$ -sheets, which are used as a model of amyloid fibrils, to fall apart. It is suggested that the electric field be used as an external agent with which to control the progress of aggregation. In particular it can be used to switch on/off aggregation-inducing conditions.

Recovery stroke - a key step in the functional cycle of muscle motor protein myosin, during which pre-recovery conformation of the protein is changed into the active post-recovery conformation, ready to exersice force - is studied by computer simulations. In more than  $2\mu s$  of aggregate simulation time, we uncover evidence that the recovery stroke is a two-step process consisting of two stages separated by a time delay. In our simulations we directly observe the first stage at which switch II loop closes in the presence of ATP at the nucleotide binding site. The resulting configuration of the nucleotide binding site is identical to that detected experimentally. Distribution of inter-residue distances measured in the force generating region of myosin is in good agreement with the experimental data. The second stage of the recovery stroke structural transition, rotation of the converter domain, was not observed in our simulations, which led us to conclude that it occurs on a longer time scale. We determine factors that control the rotation of the converter by designing a series of simplified models, which contain certain parts of the myosin head. Spefically, by conducting an exhaustive combinatorial search among different models we find that the transition between the two rotation states is controlled by a small helix (SH1) located next to the relay helix and relay loop. A small translation in the position of SH1 away from the relay helix is seen to trigger the transition from one state to the other. The transition is driven by a cluster of hydrophobic residues I687, F487 and F506 that make significant contributions to the stability of both states. The proposed mechanism agrees well with the available structural and mutational studies.

The effect of E22Q mutation on growth of amyloid fibrils of Alzheimer's disease peptide A $\beta$  is studied in computer simulations within all-atom approaches. Specifically, adsorption of an A $\beta$  monomer onto the edge of a growing amyloid is considered. The time scale of this process is controlled by the free energy barrier associated with the transition from conformations populated by the peptide in solution as a monomer into conformations of the transition state of the fibril. The monomer conformations, in which peptides undergo initial docking with the fibril, are studied with the help of A $\beta$  fragments. In particular, fragment 21-30 is considered in which a structured bend is observed for residues 22-28. Another structured segment that was identified is 2130, which contains mostly hydrophobic residues and, hence, is known as the central hydrophobic cluster (CHC). Simulations of A $\beta$ 12-28 and A $\beta$ 10-35 indicate that CHC is little influenced by the length of the fragment. To incorporate the effect of both segments, we considered fragment A $\beta$ 15–28, for which conformations were studied by replica-exchange simulations for both WT sequence and E22Q mutant. It is found that the mutation does not change the structure of the 22-28 bend but weakens its interaction with the CHC. As a consequence, the latter populates more  $\beta$ -structure, which is a key characteristic of the transition state conformations. This results in a lower free energy barrier toward fibril deposition and, as a result, higher growth rate. Thermodynamic signatures of the acceleration are in good agreement with experiment.

Microscopic models are built for fibrils made by 11-25 fragment of A $\beta$ . This fragment is known to change the registry of the fibrils in response to changing pH. The models were studied is short simulations in explicit solvent, after which stage their free energy was evaluated with the help of implicit solvent models. It is seen that the registry of the models with the lowest free energy is in good agreement with experiment. At neutral pH a key contribution to the relative free energy between the different registries comes from electrostatic energy. Charged C-terminal group has a particularly large effect on that energy and, thus, is suggested to control the registry of the fibril.

Keywords: proteins, computer simulations, aggregation, folding

### Список публікацій здобувача за темою дисертації

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

- 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 // Proteins Struct. Funct. Bioinf. 2012. Vol. 80, no. 6. P. 1569-1581.
- Baumketner A. The mechanism of the converter domain rotation in the recovery stroke of myosin motor protein // Proteins Struct. Funct. Bioinf. 2012. Vol. 80, no. 12. P. 2701-2710.
- 12. *Baumketner A., Shea J.E.* Free energy landscapes for amyloidogenic tetrapeptides dimerization // *Biophys. J.* 2005. Vol. 89, no. 3. P. 1493-1503.
- 13. *Soto P., Baumketner A., Shea J.E.* Aggregation of polyalanine in a hydrophobic environment // *J. Chem. Phys.* 2006. Vol. 124, no. 13. P. 134904 (7 pages).
- 14. *Baumketner A., Shea J.-E.* Folding landscapes of the Alzheimer amyloid-β(12-28) peptide // *J. Mol. Biol.* 2006. Vol. 362, no. 3. P. 567-579.
- Bernstein S.L., Wyttenbach T., Baumketner A., Shea J.E., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T. Amyloid beta-protein: Monomer structure and early aggregation states of A beta 42 and its Pro(19) alloform // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127, no. 7. P. 2075-2084.
- Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Lazo N.D., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. Structure of the 21-30 fragment of amyloid beta-protein // Protein Sci. 2006. Vol. 15, no. 6. P. 1239-1247.
- Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.-E. Amyloid β-protein monomer structure: a computational and experimental study // Protein Sci. 2006. Vol. 15, no. 3. P. 420-430.
- Teplow D.B., Lazo N.D., Bitan G., Bernstein S., Wyttenbach T., Bowers M.T., Baumketner A., Shea J.E., Urbanc B., Cruz L., Borreguero J., Stanley H.E. Elucidating amyloid beta-protein folding and assembly: A multidisciplinary approach // Acc. Chem. Res. 2006. Vol. 39, no. 9. P. 635-645.

- Baumketner A., Shea J.-E. The structure of the Alzheimer amyloid-β(10-35) peptide probed through replica-exchange molecular dynamics simulations in explicit solvent // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 366, no. 1. P. 275-285.
- Baumketner A., Krone M.G., Shea J.E. Role of the familial Dutch mutation E22Q in the folding and aggregation of the 15-28 fragment of the Alzheimer amyloid-beta protein // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, no. 16. P. 6027-6032.
- Krone M.G., Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Lazo N.D., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. Effects of familial Alzheimer's disease mutations on the folding nucleation of the amyloid beta-protein // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 381, no. 1. P. 221-228.
- Murray M.M., Krone M.G., Bernstein S.L., Baumketner A., Condron M.M., Lazo N.D., Teplow D.B., Wyttenbach T., Shea J.E., Bowers M.T. Amyloid beta-Protein: Experiment and Theory on the 21-30 Fragment // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, no. 17. P. 6041-6046.
- Negureanu L., Baumketner A. Microscopic Factors that Control beta-Sheet Registry in Amyloid Fibrils Formed by Fragment 11-25 of Amyloid beta Peptide: Insights from Computer Simulations // J. Mol. Biol. 2009. Vol. 389, no. 5. P. 921-937.
- Баумкетнер А. Дослідження білків методом компютерних симуляцій // Різдвяні дискусії. Book of Abstracts. Львів, Україна, 11-12 Січня 2017. Журн. фіз. дослідж. 2017. Vol.21. no.1/2. Р. 1998-8.
- 25. *Stelmakh A., Baumketner A.* Effective attraction between like-charged macroions in aqueous medium // Ulam Computer Simulations Workshop. Book of Abstracts. Lviv, Ukraine, 21-24 June 2017. 2017. P. P26.
- 26. *Baumketner A.* Monte Carlo study of cluster crystals stabilized by hydrophobic and electrostatic interactions // Ulam Computer Simulations Workshop. Book of Abstracts. Lviv, Ukraine, 21-24 June 2017. 2017. P. T1.

- Baumketner A. Biomolecular simulations in generalized non-Boltzmann ensembles // Summer Short Course on Monte Carlo Methods and Applications. Book of Abstracts. Beijin, China, 26-28 June 2016. P. 45-58.
- Баумкетнер А. Кластери білка лізоциму у водному середовищі // Х Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини. Програма. Львів, Україна. 6 Листопад 2015. Р. 1.
- 29. Баумкетнер А. Комп'ютерне моделювання проблеми агрегації білків // XV Всеукраїнська школа-семінар і Конкурс молодих вчених зі статистичної фізики та теорії конденсованої речовини. Програма. Львів, Україна. 4-5 Червня 2015. Р. 1.
- Баумкетнер А. Комп'ютерне моделювання біофізичних процесів // ФЕС-ТИВАЛЬ НАУКИ в Інституті фізики конденсованих систем НАН України Програма. Львів, Україна. 19-21 Травня 2015. Р. 1.
- 31. Баумкетнер А. Згортання та агрегація амилоїдного бета пептиду хвороби Альцгеймера // VIII Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини. Програма. Львів, Україна. 1 Листопад 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 // 238-th ACS National ACS meeting. Book of Abstracts. Washington, DC, USA, 16-20 August 2009. Vol.238. 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 // Statistical Physics: Modern Trends and Applications. Book of Abstracts. Львів, Україна, 23-25 Червня 2009. Р. 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 // Protein Folding Dynamics, Gordon Research Conference Book of Abstracts. Venture, CA, USA, 6-8 January 2008. P. 1.

## 3MICT

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ
ВСТУП23
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ48
1.1. Фазова поведінка білків48
1.2. Білкові кластери49
1.3. Згортання білків за посередництвом шаперонів
1.4. Моделі для дослідження агрегації білків
1.5. Фібрили в електричному полі58
1.6. Структурні переходи моторного білка міозину
<ol> <li>Фібрили пептиду хвороби Альцгеймера Аβ63</li> </ol>
1.8. Висновки розділу67
2 КОЛЕКТИВНА ПОВЕДІНКА БІЛКІВ
2.1. Дослідження білка лізоциму69
2.1.1. Структурні функції сферичної моделі
2.1.2. Фазова поведінка72
2.1.3. Побудова несферичної моделі73
2.2. Рівноважні білкові кластери75
2.2.1. Всі вивчені моделі утворюють рівноважні кластери
2.2.2. Статистика кластерів суттєво залежить від типу потенціалу77
2.2.3. Два класи кластер-формуючих систем використовують різні механізми утворення кластерів
2.2.4. Модель з локальним мінімумом демонструє подвійну ідентичність

2.2.5. Методи та моделі	87
2.3. Висновки розділу	
З ЗГОРТАННЯ БІЛКІВ ЗА ПОСЕРЕДНИЦТВА ШАПЕРОНІВ	90
3.1. Гідрофільна комірка	91
3.1.1. Модель з високим ступенем фрустрації	91
3.1.2. Модель з пришвидшеним згортанням	98
3.1.3. Характеристики моделі зі зменшеною фрустрацією	101
3.1.4. Механізм зменшення рівня фрустрації	102
3.2. Прискорення згортання завдяки гідрофобним взаємодіям	107
3.2.1. Час згортання	107
3.2.2. Механізм прискорення	108
3.2.3. Створення проміжного стану на шляху згортання	109
3.3. Моделі та методи	111
3.3.1. Вибір моделі білка	111
3.3.2. Взаємодії між мономерами	112
3.3.3. Взаємодія з коміркою шаперона	115
3.3.4. Деталі проведених симуляцій	116
3.4. Висновки розділу	118
4 АГРЕГАЦІЯ БІЛКІВ В СПРОЩЕНИХ ПІДХОДАХ	120
4.1. Модель спрощеного опису RAPID	122
4.1.1. Теорія	122
4.1.1.1. Структурні методи для визначення ефективних потенці	алів122
4.1.1.2. Потенціали для гомополімерів	124
4.1.1.3. Застосування до поліаланінових пептидів	127

4.1.2. Застосування129
4.1.2.1. Неявна модель для декапептиду з 19 потенціалами
4.1.2.2. Властивості згортання в явних та неявних розчинниках
4.1.2.3. Переносна модель неявного розчинника
4.1.2.4. Тести на переносність
4.1.2.5. Застосування до декількох ланцюгів139
4.1.3. Моделі, методи та технічні деталі143
4.2. Дослідження білків у зовнішньому електричному полі145
4.2.1. Оцінка впливу поля з комп'ютерних симуляцій145
4.2.1.1. Електричне поле індукує дипольні моменти способом
специфічним для конформаційних станів145
4.2.1.2. Згортання у спіральну структуру під дією поля
4.2.1.3. Аналітичне наближення для впливу електричного поля155
4.2.1.4. Електричне поле викликає дезагрегацію β-листів160
4.2.1.5. Пептидам потрібно бути згорнутими, щоб уникнути агрегації .163
4.2.1.6. Довші пептиди згортаються в присутності поля меншої
інтенсивності166
4.2.2. Методи, моделі та технічні деталі170
4.3. Висновки розділу171
5 СТРУКТУРНІ ПЕРЕХОДИ БІЛКА МІОЗИНУ176
5.1. Перехід відновлення як двокроковий процес178
5.1.1. Симуляції в атомному представленні178
5.1.1.1. Динаміка міжзалишкових відстаней в некерованих симуляціях 178

5.1.1.2. Симуляції в неявному розчиннику свідчать про закриття ключа
петлі II
5.1.1.3. Події в нуклеотидному жолобі183
5.1.1.4. Конформаційні стани релейної спіралі та домену-конвертора186
5.1.2. Аналіз результатів
5.1.3. Несуттєва взаємодія між областю приєднання нуклеотидів та
областю генерації сили189
5.1.3.1. Чи є закриття SWII однокроковою реакцією?
5.1.3.2. Замикання SWII в контексті експериментальних даних
5.1.4. Методи і моделі193
5.2. Фактори, що обумовлюють двостанову поведінку області генерації
сили194
5.2.1. Умови для існування повороту домену-конвертора в стані М**194
5.2.1.1. Мінімальна модель для переходу від конформації М* до М**194
5.2.1.2. Фрагмент релейної спіралі має незначну схильність до α-
спіральних станів
5.2.1.3. Релейна петля посилює спіральність у релейній спіралі, але не
утворює злам198
5.2.1.4. Домен-конвертор стабілізує стан М*
5.2.1.5. Наявність SH1 спіралі - необхідна, але не достатня умова для
стабілізації стану М**
5.2.1.6. Для появи стану поствідновлення М** необхідні домен-
конвертор та SH1 спіраль203
5.2.1.7. SH1 діє шляхом прямої взаємодії з релейною спіраллю206
5.2.1.8. Положення SH1 визначає кут повороту домену-конвертора207

5.2.2. Аналіз результатів
5.2.3. Методи та моделі
5.2.3.1. Комбінаторний підхід до побудови моделі
5.2.3.2. Технічні деталі
5.3. Мінімальна модель переходу відновлення
5.3.1. Підхід скороченого опису до побудови моделі
5.3.1.1. Область генерації сили згортається в два альтернативні стани .216
5.3.1.2. Домен SH1 надає початковий поштовх стрибку відновлення218
5.3.1.3. Гідрофобні взаємодії приводять до повороту домену-конвертора
5.3.2. Аналіз результатів
5.3.2.1. Область генерації сили в контексті повного міозину
5.3.2.2. Роль спіралі SH1
5.3.2.3. Механізм змаху важеля в ході відновлення
5.3.3. Методи та моделі
5.3.3.1. Дизайн моделі мінімального стрибка відновлення
5.3.3.2. Технічні деталі
5.4. Висновки розділу
6 АГРЕГАЦІЯ БІЛКІВ В АТОМНИХ ПІДХОДАХ
6.1. Дослідження голландської мутації
6.1.1. Вплив мутації на амилоїдні фібрили
6.1.1.1. Мутація E22Q не змінює структурованого згину в Аβ21-30235
6.1.1.2. В згортанні пептидів Аβ15-28 і Аβ15-28Е22Q переважає мотив
згину Е22-К28

6.1.1.3. Мутація E22Q приводить до ослаблення взаємодій між СНС та
згином 22-28
6.1.1.4. Сегменти 14-20 та 30-36 мають структуру β-нитки в перехідному
стані реакції росту фібрил239
6.1.1.5. Мутація E22Q приводить до зменшення бар'єру вільної енергії
для осідання мономеру на фібрили240
6.1.2. Механізм впливу мутації
6.1.3. Методи та моделі
6.1.3.1. Динаміка дисоціації мономерів Аβ з моделей фібрилярних 246
6.1.3.2. Технічні деталі251
6.2. Структура фібрил Аβ11-25253
6.2.1. Антипаралельні β-нитки обирають pericтp 17+k↔20-k при
низькому та нейтральному рН253
6.2.2. Регістр фібрил Аβ11-25 з моделі β-листів
6.2.2.1. Структурні та геометричні параметри β-листів
6.2.2.2. Модель фібрили, отримана при pH=7259
6.2.2.3. Модель фібрили для pH=2267
6.2.3. Фактори що контролюють регістр фібрил
6.2.4. Методи та моделі
6.2.4.1. Ієрархічна архітектура амилоїдних фібрил
6.2.4.2. Побудова обчислювальних моделей фібрил
6.2.4.3. Обчислення вільної енергії для двох антипаралельних β-ниток 281
6.2.4.4. Симуляція β-листових моделей фібрил

6.2.4.5. Оцінка вільної енергії β-листів	283
6.3. Висновки розділу	284
ВИСНОВКИ	286
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	289
ДОДАТОК	337
А. Список публікацій здобувача за темою дисертації	337
В. Апробація результатів дисертації	341
С. Список публікацій здобувача	342

### СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ΑΤΦ-	аденозинтри	ифосфат

- МД- молекулярна динаміка, метод комп'ютерних симуляцій
- МС- Монте Карло, метод комп'ютерних симуляцій
- СЕ- спінове ехо
- ЯМР- ядерний магнітний резонанс
- Аβ- амилоїдний бета пептид
- AD- хвороба Альцгеймера
- AMBER- силове поле для проведення моделювання білків
- С<sub>а</sub>- альфа-атом вуглецю в остові пептиду
- СНАRMM- силове поле для проведення моделювання білків
- СНС- центральний гідрофобний кластер в Аβ
- GB- узагальнена модель сольватації Борна
- Go- модель білка Нобухіро Го
- GroEL/ES- тип молекулярного шаперона
- М\*- позначення передвідновлювального стану білка міозину
- М\*\*- позначення поствідновлювального стану білка міозину
- PDB- база даних структур білків
- RAPID- модель для симуляцій агрегації білка
- RMSD- середньоквадратичне зміщення
- SA- модель сольватації, що ґрунтується на доступній поверхні молекули
- SALR- тип потенціалу з короткосяжним притяганням та далекосяжним відштовхуванням
- SANS- метод нейтронного розсіяння на малих кутах
- SH1- спіраль 1 гомології до Src в білку міозин
- SWII- позначення ключа в білку міозин

#### ВСТУП

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 рідина-рідина у водних розчинах білка[1]. Фаза з високим вмістом білка, або поіншому рідка фаза, яка виникає в розчині внаслідок охолодження, зустрічається в багатьох контекстах. Наприклад вона виступає в ролі кінетичного прекурсора для кристалізації[2] в розчинах альбуміну. В кристалику ока[3] 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 немембранні 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 клеях [7] 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 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/ES[15] в бактерії кишко-

## 

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 наскільки 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 М\* та М\*\*, 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 [17]. 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 енергії[18] чи спінове ехо[19]. 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 білків[20] – 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[21], 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, Аβ. Вже зараз число хворих з AD вимірюється багатьма мільйонами а з часом - лише різко збільшиться, 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 фібрил. 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 фібрил[22]. В інших випадках, моделювання доповнює та підсилює експериментальні підходи, яким бракує атомної роздільної здатності[23]. В усіх випадках успіх моделювання залежить від якості розрахункової моделі. В застосуванні до фібрил, ключовою вимогою до моделі є її атомне представлення, оскільки хімічні деталі сильно впливають на шляхи агрегації[24]. 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  $\beta$ -листів[25]. Проте наразі невідомо, до яких систем ці моделі 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.

Таким чином, вивчення білків та білкових комплексів методами аналітичної теорії та комп'ютерного моделювання є актуальним та важливим завданням.

26

Дослідження фізичних механізмів, які лежать в основі згортання та агрегації білків має як фундаментальне так і практичне значення.

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., № держрегістрації 0102U000216)", "Розвиток та застосування статистико-механічних підходів у теорії складних рідин (2005-2007 рр., № держрегістрації 0105U002082)", "Статистико-механічні та комп'ютерні дослідження властивостей складних рідин (2008 р., № держрегістрації 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 (2013-2016 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 посередництва 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 амилоїдні фібрили.

В довготерміновій перспективі зазначені задачі поєднані спільною темою: з'ясувати що з себе представляють білки, або більш конкретно, наскільки наші уявлення про них відповідають експериментальним спостереженням. На молекулярному рівні, білки це біополімери що складаються з амінокислотних залишків. Як синтезуються білки в живій клітині та що з ними відбувається в подальшому схематично показано на Рис. 1. Білки з'являються як лінійні послідовності аміно кислот внаслідок синтезу в молекулярному комплексі рибосоми. Початково, ланцюжок знаходиться у випадковій конфігурації, яка носить назву розгорнутого стану. Спрощено, всі процеси що відбувається з білком після синтезу можна розділити на дві групи. Перша – це перехід у функціонально справний основний, або по-іншому природний, стан. Процес переходу з розгорнутого стану в згорнутий носить назву реакції згортання білків (protein folding). Друга – це взаємодія білків один з одним, внаслідок якої утворюються складні багатомолекулярні макро-комплекси, або агрегати. Процес утворення агрегатів розпочинається з розгорнутого стану і носить назву агрегації білків (protein aggregation).

Кожна з цих двох груп може бути розділена на кілька простіших процесів. Зокрема процес згортання протікає спонтанно лише для 65-80% білків тоді як для всіх решта необхідне сприяння спеціальних допоміжних комплексів. Відповідно утворюються два незалежних канали реакції згортання. Більше того, не всі білки що згортаються спонтанно можуть успішно досягти основного стану. Утворені як наслідок помилкові стани мають бути знищені і розкладені до рівня аміно кислот в процесі протеолізу. Існує ціла низка ензимів для цієї мети які також потрібно включити до складових реакції згортання в широкому розумінні.

З іншого боку, реакція агрегації теж має дві основні складові, які відрізняються свої кінцевим продуктом. Перша – це утворення невпорядкованих агрегатів



**Рис.1** Схема різноманітних явищ, що протікають за участі білків. Показано що відбувається з білком після синтезу. Приведено приклади як індивідуальних так і колективних процесів. Білим кольором виділено ті процеси, що досліджувались в даній дисертації.

які не мають якоїсь визначеної структури. Такий процес завершується утворенням преципітату, який теж підлягає вторинній переробці до рівня аміно кислот. Друга форма агрегації завершується утворенням впорядкованих структур. Однією з таких структур, найбільш відомою на даний час, є амилоїдні фібрили. Вперше амилоїди привернули до себе увагу завдяки низці нейродегенеративних хвороб, зокрема в пацієнтів що страждають на хворобу Альцгеймера, в котрих амилоїд спостерігається в корі головного мозку.

Що стосується взаємодії між білками, то вона спостерігається як в розгорнутому так і в згорнутому станах. У згорнутому стані такі взаємодії приводять до низки цікавих явищ, таких як утворення кластерів чи фазове розшарування білкового розчину.

На Рис. 1 показані, схематично, процеси за участю білків що описані вище. Загалом, існує широке велике коло питань і задач стосовно цих процесів, які на даний час залишаються без відповіді. Ті процеси, які досліджуються в даній дисертації, виділені на рисунку білим кольором. Необхідно вказати принципи за якими відбувався відбір досліджуваних задач:

- Наявна мінімальна інформація про процес що спирається на експериментальні джерела. Бажано щоб була сформована певна гіпотеза яка потребує перевірки.
- 2) Експериментальні 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 ядерного магнітного резонансу (ЯМР) неоднозначними. Або недостатня роздільна здатність експериментального підходу. До прикладу, вимірювання лише однієї міжзалишкової відстані в методі спінового ехо (СЕ), що не дозволяє однозначно встановити структурні зміни на атомному рівні.

Теоретичні методи залишаються чи не єдиними які можуть досягти значного прогресу у дослідженні задачі.

Об'єктом досліджень є білки, олігомери, амилоїдні фібрили.

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

Методи досліджень. В роботі використано методи та моделі розвинуті в теоретичній фізиці та фізиці м'якої речовини. Це в першу чергу аналітичні підходи статистичної фізики до опису фазових переходів, статичних та динамічних властивостей рідкого стану та кінетичні явища. Для прикладу можна згадати кумулятивні розклади для побудови теорії впливу електричного поля на конформації білків. Проте левова частка досліджень спирається на методи комп'ютерного моделювання. Ці методи включають в себе як прості числові експерименти, що використовують алгоритми молекулярної динаміки (МД) для дослідження часової еволюції, так і підходи з вузькою спеціалізацією, що розвинуті для конкретних задач, як наприклад метод Монте Карло в ансамблі Гіббса в дослідженнях фазових діаграм.

Вибір методу та моделі диктуються метою яку необхідно досягти в кожній конкретній задачі. Ключовим в побудові математичної моделі є масштаб досліджуваного об'єкту. Лише для дуже маленьких білків, довжиною ланцюга порядку 20 аміно кислот і менше[26; 27], можна на сьогодні отримати термодинаміку згортання за допомогою моделей з атомною роздільною здатністю в явному розчиннику. Проте навіть в таких задачах, мова не йде про часи важливі з біологічної точки зору. З огляду на надзвичайно великий необхідний час числових розрахунків, для всіх інших задач потрібно будувати моделі скороченого опису. Існує чимало таких моделей, що сильно відрізняються по своїй структурі та, відповідно, простоті розрахунків. Для наглядності, на Рис. 2 показана ієрархія моделей що використовуються в даній дисертації, разом з коротким описом процесів до яких вони можуть бути застосованими.

Найпростішими є моделі що використовують лише один силовий центр. Білок в таких моделях представлений сферичними частинками, що взаємодіють через певний потенціал. На великих відстанях, таке представлення виправдане і широко використовується для інтерпретації білкових розчинів у стані розрідження. Проте при зростанні густини розчину, форма білка може відігравати суттєву роль. Такий висновок був зроблений нами, наприклад для білка лізоциму[28], як буде обговорено в деталях пізніше.



**Рис. 2** Теоретичні моделі для досліджень білків. В залежності від поставленої мети використовуються а) представлення білка як однієї частинки, b) представлення аміно кислот як однієї частинки в рамках так-званої мінімальної моделі, або с) моделі з атомною роздільною здатністю.

Наступними по складності є моделі які зображають цілі амінокислоти як одиничні силові центри. Існує велика різноманітність таких моделей, в залежності від того де силовий центр розміщений[29]. В більшості досліджень центр знаходиться на позиції альфа вуглецю ( $C_{\alpha}$ ). Відповідно, моделі носять назву мінімальні  $C_{\alpha}$  моделі, як показано на Рис. 2. Доповнені потенціалами взаємодії, що будуються з певних феноменологічних принципів, такі моделі дозволяють проводити дослідження великих білкових систем. До прикладу, це можуть бути як великі за розміром білки так і білкові комплекси чи агрегати[30]. Основним недоліком мінімальних моделей є їхня недостатня точність.

Для випадків коли потрібна найвища роздільна здатність, існують атомні моделі білків. Всі атоми в таких моделях представлені окремими силовими центрами, які взаємодіють через потенціал з певного емпіричного набору. Таких наборів існує велика кількість, в залежності від методу параметризації, наприклад CHARMM[31] чи AMBER[32]. Всі біологічні процеси протікають у воді, тому атомні моделі білків переважно використовують разом з атомною моделлю води, або у так званому явному розчиннику. Прикладом такого розчинника може бути модель TIP3P[33], в якій молекула води представлена трьома силовими центрами що несуть заряд. Існують також моделі, в яких розчинник враховується неявно, через спрощені потенціали ефективних взаємодій. Модель RAPID[34] запропонована в наших роботах є прикладом такого неявного типу розчинника. В явному чи неявному розчиннику, атомні моделі білків все рівно є дуже складними для числових розрахунків[35]. На даний час, комп'ютерні симуляції таких моделей обмежені пептидами що містять кілька десятків аміно кислотних залишків[26; 27]. Для всіх інших задач, необхідно розробляти моделі скороченого опису. Важливо зауважити що такі моделі можуть мати атомне представлення, проте розглядати лише частину модельованого білка.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, п'яти розділів, в кожному з яких розв'язується конкретна задача, або низка пов'язаних задач, висновків, списку цитованих джерел та додатків. Роботу викладено на 288 сторінках (разом з переліком джерел 336 сторінок). Бібліографічний список містить 443 покликів.

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. Дальше розглянуто проблеми утворення фібрил. Подано короткий огляд робіт, що були зроблені в цьому напрямі. Детально обговорено задачі впливу мутацій та фрагментів Аβ.

Другий розділ має на меті дослідження колективних властивостей білків. Для цього застосовується метод інверсії Больцмана у поєднанні з методом молекулярної динаміки для виведення потенціалу взаємодії між молекулами білка лізоциму, що знаходиться у водному розчині. Виведення здійснюється на основі експериментальних даних для статичного структурного фактора. Потенціал взаємодії має м'яке відштовхування на коротких відстанях і притягальну яму на проміжних відстанях, що призводить до фазового розшарування рідина-рідина. Більше того, Монте-Карло моделювання методом ансамблю Гіббса демонструє, що несферичний опис лізоциму краще підходить для правильного відтворення експериментально спостережуваних властивостей такого фазового поділу. Наші висновки дозволяють отримати відповідь на актуальне в молекулярній та клітинній біології запитання: "Як моделювати білки у їхньому природному водному середовищі?"

Крім фазового розшарування, білки можуть утворювати менші за розмірами комплекси, кластери. Як і у простих колоїдних суспензіях, у білкових розчинах кластери – це різноманітні мультимери, які утворюються внаслідок самоасоціації колоїду та перебувають у рівновазі з мономерами. Відомо два типи потенціалів, що призводять до утворення кластерів: а) потенціали з глобальним мінімумом і відштовхувальним хвостом, що виникають внаслідок конкуренції короткосяжного притягання й далекосяжного відштовхування, та б) суто відштовхувальні потенціали, що мають м'яке плече. За допомогою комп'ютерних симуляцій ми показуємо, що потенціали з локальним мінімумом і відштовхувальним хвостом, які не належать до жодного з відомих типів, також здатні породжувати кластери. Детальний порівняльний аналіз показує, що новий тип кластеротворних потенціалів служить містком між двома відомими типами. Нові кластери мають видовжену форму і ентропійний механізм утворення, як і в суто відштовхувальних системах, але лише для низьких густин. Для високих густин,
кластери переходять у компактний стан і їх стабілізує ентальпія, як і в системах з конкурентними притягальною та відштовхувальною взаємодіями.

Третій розділ присвячений керованим процесам згортання білків, що відбуваються за посередництва молекулярних шаперонів. Шаперони, такі як комплекс GroEL бактерій Е. Coli, допомагають згортати білки у несприятливих умовах, надаючи порожнину в якій ново-синтезований білок може бути ізольований. Чи відіграє шаперонова комірка пасивну роль у захисті білка від агрегації, чи активну роль, у прискоренні темпів згортання, залишається незрозумілим. В даній дисертації ми досліджуємо роль конфайнменту (просторового обмеження) в реакції згорання методом моделювання молекулярної динаміки. Ми розглянули модельний білок типу α/β-сендвіч, який є типовим структурним елементом характерним для системи GroEL/ES, і помістили його в сферичну гідрофільну комірку, яка імітувала внутрішню поверхню комплексу шаперону. Термодинаміка та кінетика згортання вивчалися в широкому діапазоні температур та радіуса комірки. Було встановлено, що просторове обмеження значно підвищує температуру колапсу білка, Т<sub>с</sub>, внаслідок втрати ентропії розгорнутого стану. З іншого боку, температура згортання T<sub>f</sub> залишалася незмінною, що є наслідком складного механізму згортання цього білка, який передбачає початковий колапс до компактного, невірно згорнутого стану, за яким слідує перевпорядкування у природний стан. Спостерігалося як прискорення так і сповільнення згортання, в залежності від встановленої температури. Прискорення спостерігалося лише при температурах вищих температури Т<sub>m</sub>, що відповідає температурі, при якій білок згортається найшвидше. Для досліджуваного білка  $T_m > T_f$ , вказуючи на те що сам по собі конфайнмент не може призвести до пришвидшення згортання за умов коли білок стабільний, *T* < *T*<sub>f</sub>. Для того щоб конфайнмент міг пришвидшити згортання, необхідно щоб виконувалась умова  $T_m < T_f$ . Було встановлено що співвідношення  $T_m/T_f$  залежить від того, наскільки складною є поверхня потенціальної енергії білка. Поверхні з великою кількістю мінімумів розділених високими максимумами називаються фрустрованими. Поверхні з протилежними властивостями – нефрустровані. Було показано, що для моделей з нефрустрованими поверхнями  $T_m < T_f$ . В побудованій моделі, що має таку властивість, спостерігалося двократне прискорення згортання. Вдалося встановити, що прискорення з'являється завдяки механічному відсіканню структур з великим радіусом гірації, що відповідають мінімумам потенціальної енергії. Відповідно, для нефрустрованих білків конфайнмент може відігравати активну роль в згортанні.

Нещодавні 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 досягти природного стану. Це спостереження порушує питання про можливість шаперону відігравати активну роль в процесі згортання білків, шляхом, можливо, прямого втручання у конформації білків. Щоб дослідити вірогідність такого сценарію, наші симуляції були поширені на випадок коли стінка комірки є притягальною. Встановлено, що в умовах помірно притягальної стінки, згортання може протікати більш ніж на порядок швидше. Виявлено, що пришвидшення досягається завдяки появі в шляхах згортання нового проміжного стану з низькою енергією, в якому білок перебуває у зв'язаному з коміркою стані. Спостережуваний механізм надає підтримку теорії ітераційного відпалу роботи шаперона.

В четвертому розділі представлено дослідження агрегації білків за допомогою моделі скороченого опису. Наголос на системах зростаючого розміру – це тенденція яка спостерігається останнім часом в теоретичних дослідженнях білків. Вона вимагає розробки швидких обчислювальних моделей, здатних подолати зростаючу складність та, водночас, не втратити фізичну точність. В руслі цієї тенденції, в даній дисертації ми запроваджуємо модель білка, яка використовує атомну архітектуру для того, щоб досягти високої хімічної точності, та ефективні парні потенціали замість явного розчинника, для того щоб досягти максимальної швидкості обрахунків. Ефективні потенціали, що діють на амінокислотні залишки, будуються з тої умови що модель, яка не містить розчинника, відтворює відповідні парні функції розподілу, що спостерігається в симуляціях з явним розчинником. В якості тесту, модель застосовується до поліпептидів аланіну. Для ланцюга з 10 амінокислотних залишків, модель, як показують розрахунки, належним чином відтворює природний стан та його заселеність. Малі розбіжності спостерігаються для інших властивостей і можуть бути пояснені апроксимаціями, що застосовані в моделі. Переносність згенерованих ефективних потенціалів оцінюється в моделюванні довшого пептиду, що містить 25 залишків. В результаті встановлено мінімальний набір потенціалів, що приводить до якісно правильних результатів у порівнянні з явним розчинником. Подальші тести, проведені для кількох пептидних ланцюгів, показують, що переносна модель вірно відтворює експериментально спостережувану тенденцію поліаланінів збиратися в β-аркуші зі зростаючою довжиною пептидного ланцюга. В своїй сукупності, представлені результати свідчать, що запропонована модель може бути використана для успішного моделювання згортання та агрегації дрібних пептидів з атомною точністю. Водночас, необхідно провести додаткові тестування, щоб більш ретельно оцінити сильні та слабкі сторони запропонованої моделі.

Згортання та агрегація білків тісно переплетені один з одним. Зміна ймовірності одного процесу автоматично передається до другого, що зрештою приводить до зміщення балансу між двома реакціями. Зокрема, відомо, що стабілізація природного стану через мутації або зміну розчинника, здатна зупинити процес агрегації. Нами досліджено можливість використання зовнішнього електричного поля як чинника, що запобігає агрегації шляхом сприяння процесу згортання. Запроваджена модель для агрегації білка використовується, в поєднанні з комп'ютерним моделюванням, для дослідження згортання та агрегації аланінових поліпептидів у електричному полі різної напруженості. Досліджені пептиди в основному неструктуровані за відсутності поля, але зазнають переходу у  $\alpha$ спіральний стан при застосуванні поля. Перехід супроводжується руйнуванням заздалегідь сформованих  $\beta$ -листів, які використовуються як модель амилоїдних фібрил, що дозволяє припустити, що електричне поле може бути використане для контролю над агрегацією внутрішньо невпорядкованих пептидів. Згідно з нашими підрахунками, інтенсивність поля, необхідна для дезагрегації, підходить як для контрольних експериментів в умовах *in vitro*, так і для експериментів на живих клітинах. Крім того, за нашими оцінками, ендогенні електричні поля можуть мати значний вплив на формування амилоїду *in vivo*.

П'ятий розділ має на меті дослідження стрибка відновлення, протягом якого перед-відновлювальна пасивна конформація моторного білка міозину змінюється в активну, пост-відновлювальну конформацію, яка має здатність генерувати силу. Ми вивчаємо мікроскопічні деталі цього ключового етапу у функціональному циклі білка використовуючи моделювання молекулярної динаміки атомних моделей в неявних і явних розчинниках. В моделюванні тривалістю більш ніж 2µs сукупного часу, знайдено докази того, що стрибок відновлення — це дво-кроковий процес, який складається з двох етапів розділених часовим інтервалом. В наших симуляціях було безпосередньо простежено перший етап, в якому петля ключа II закривається за присутності АТФ в місці приєднання нуклеотидів. Спостережувана модельна конфігурація області взаємодії з нуклеотидами є ідентичною до експериментальної. Розподіл міжзалишкових відстаней, виміряний в області білка що генерує силу, добре узгоджується з експериментальними даними. Другий етап структурного переходу стрибка відновлення, поворот домену-конвертора, не був спостережуваний в нашому моделюванні. Очевидно, він виникає на довших часових масштабах. Грунтуючись на цьому спостережені, нами запропоновано використовувати окремі розрахункові моделі для вивчення двох частин стрибка відновлення.

Визначальною особливістю пост-відновлювального стану є злам в релейній спіралі, яка є ключовою частиною білка, що бере участь у генерації сили. В цьому розділі ми визначаємо взаємодії, які відповідають за появу зламу. Ми розробляємо серію обчислювальних моделей, що містять три інші сегменти, релейну петлю, конвертер-домен та спіраль 1 гомології до Src (SH1), з якою взаємодіє релейна спіраль, і визначаємо їх структуру в точному моделюванні методом молекулярної динаміки в явному розчиннику. Провівши вичерпний комбінаторний пошук серед всіх можливих моделей, ми виявили, що: 1) доменконвертор повинен бути прикріплений до релейної спіралі під час переходу, щоб уникнути втручання в роботу інших частин білка; 2) структура релейної спіралі контролюється спіраллю SH1. Злам у її структурі пов'язаний зі специфічним розміщенням спіралю SH1. Він виникає в результаті прямої взаємодії між SH1 і релейною спіраллю та призводить до обертання С-кінцевої частини релейної спіралі, і згодом передається до домену-конвертора.

Дослідження були розширені на випадок коли положення спіралі SH1 по відношенню до релейної спіралі необмежене в просторі. Виявляється що модель яка утворюється таким чином, має рівно два відмінні стани повороту конвертора. Наші симуляції показують, що перехід між цими двома станами контролюється спіраллю SH1, розташованою поруч з релейною спіраллю та релейною петлею. Виявляється, що незначний зсув у позиції SH1 у напрямку протилежному до релейної спіралі викликає перехід від стану "вверх" у стан "вниз". Перехід керується кластером гідрофобних залишків I687, F487 та F506, які роблять значний внесок у стабільність обох станів. Встановлений механізм добре узгоджується з наявними структурними та мутаційними дослідженнями. Отримана модель утворює укорочену версію головки білка міозин, яка демонструє функціонально вірний структурний перехід.

Результати досліджень амилоїдних фібрил представлені в **шостому розділі.** Амилоїдні фібрили, великі впорядковані агрегати амилоїдних β-пептидів (Аβ) є клінічними ознаками хвороби Альцгеймера (AD). Початковим кроком в процесі агрегації є згортання пептиду в мономерному стані. Нами було детально досліджено конформаційні стани Аβ в комп'ютерних симуляціях. Оскільки пептид повної довжини не має природного стану, фрагменти Аβ використовують як модель для дослідження локальної структури. Нами було розглянуто цілу низку таких фрагментів різної довжини. Зокрема найдовший з них, Аβ10-35, був досліджений методом обміну репліками в явному розчиннику. Цьому фрагменту притаманні багато амилоїдогенних властивостей його повнорозмірного аналога Аβ40/42. При фізіологічній температурі і тиску наші симуляції показують, що Авто-35 пептид не має єдиного унікального згорнутого стану. В певній мірі, цей пептид існує як суміш компактних глобулярних станів, які перебувають у швидкій динамічній рівновазі один з одним. У цьому конформаційному ансамблі переважають випадкові клубки та структури згину, з незначним вмістом α-спіралі або β-листа. Як слідує з симуляцій, 3D-структура Аβ10-35 визначається солевим містком, утвореним між бічними ланцюгами амінокислот К28 і D23. Цей солевий місток також спостерігається у Аβ-фібрилах, і наші симуляції дозволяють припустити, що мономерні конформації Аβ10-35 пептиду містять попередньо сформовані структурні мотиви, що сприяють швидкій агрегації цього пептиду.

В Аβ-пептидах схильність до агрегації сильно залежить від одиничних точкових мутації в послідовності амінокислот на позиціях 22 та 23. Мутація яка включає заміщення глутамінової кислоти на позиції 22 на глутамін, E22Q, і відома під назвою "Голландська", призводить до збільшення швидкості осідання пептиду АβE22Q на амилоїдні фібрили. Шляхом моделювання методом молекулярної динаміки та алгоритму обміну репліками (replica-exchange) ми дослідили ефект мутації E22Q на дві ключові області Аβ пептиду, що беруть участь у складанні та агрегації, використовуючи фрагмент що включає залишки від 15 до 28 (А $\beta$ 15-28) як модельну систему. Пептид А $\beta$ 15-28 охоплює ділянку 22-28, яка являє собою найбільш структуровану частину пептиду А $\beta$  (згин E22-K28), а також центральний гідрофобний кластер (СНС) (ділянка 17-21), основне місце стикування А $\beta$  мономерів з амилоїдними фібрилами. Наші симуляції показують, що згин 22-28 зберігається в пептиді А $\beta$ (15-28) і що СНС, який в основному неструктурований, істотно взаємодіє з цією ділянкою. Мутація E22Q не впливає на структуру згину, але послаблює його взаємодію з СНС. Це приводить до збільшення заселеності  $\beta$ -структури в СНС. Наш аналіз реакції видовження фібрильного волокна показує, що СНС приймає конформацію  $\beta$ -нитки в ансамблі перехідного стану, і що мутація E22Q збільшує швидкість агрегації шляхом зниження бар'єру для осідання мономерів на фібрили. Термодинамічні ознаки цього процесу підсиленої фібриляції, отримані в наших симуляціях, добре узгоджуються з експериментальними спостереженнями.

Короткі фрагменти амилоїдогенних білків широко використовуються як модельні системи у вивченні процесу утворення амилоїду. Нещодавно було продемонстровано, що фрагмент 11-25 β-амилоїдного пептиду, причетний до хвороби Альцгеймера (Аβ11-25), утворює амилоїдні фібрили, що складаються з антипаралельних β-листів. Цікавим є те, що фібрили, вирощені в нейтральному та кислому середовищах, мають різні регістри В міжниткових водневих зв'язків. Намагаючись пояснити мікроскопічне походження рН залежності, ми вивчили Аβ11-25 фібрили методом теоретичного моделювання. Було побудовано декілька структурних моделей для фібрил при низьких та нейтральних значеннях рН та досліджено їх в короткій молекулярно-динамічній симуляції з використанням явного розчинника. Моделі, що показали найнижчу вільну енергію, оцінену за допомогою неявної моделі розчинника, були обрані в якості зразків структури справжньої фібрили. Було показано, що регістр цих моделей добре узгоджується з експериментальними спостереженнями. В нейтральному середовищі основним внеском у різницю вільної енергії між двома регістрами є електростатична взаємодія. Група зарядів карбоксильного кінця робить великий внесок у ці взаємодії і, отже, грає важливу роль у визначенні регістру.

## Наукова новизна отриманих результатів.

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

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

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

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

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

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

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

7) Вперше запропоновано використання електричного поля з метою контролю амилоїдних фібрил. Отримано нові аналітичні наближення для розрахунку впливу поля на перехід клубок-спіраль.

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

9) Вперше отримано розрахункову модель міозину, яка має функціональносправний структурний перехід. 10) Запропоновано новий механізм впливу мутації E22Q на агрегацію Aβ пептиду, який добре узгоджується з експериментом.

Вперше пояснено мікроскопічні причини зміни регістру β-листів зі зміною рН у фібрилах фрагменту 11-25 пептиду Аβ.

**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 йдеться про використання в нанотехнологіях амилоїдних фібрил, які завдяки своїм відмінним механічним властивостям вже починають використовуватися в якості будівельного матеріалу для нанопристроїв[36; 37], нарівні з вуглецевими нанотрубками. Значна перевага фібрил 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 відновлення. 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[38; 39]. 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 ліків[40], 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  $\epsilon$  автором ідеї досліджень та виконавцем всіх наукових завдань, включно з виконанням симуляцій. Інші автори долучились до аналізу результатів та написання статей. В теоретичних роботах [4,13,21] здобувач брав участь в аналізі результатів та написанні статей. Статті [8,10,11] одноосібні. В статтях [9,15-18] теорія поєднується з експериментом. Здобувач виконував симуляції, проводив аналіз результатів та долучився до написання статей. В роботі [22], де теж присутні як теорія так і експеримент, здобувач допоміг з аналізом даних симуляцій та написанні статті.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень представлених в дисертації неодноразово доповідались на різноманітних вітчизняних та міжнародних конференціях. Зокрема, наші дослідження були представлені на: 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 on "Monte Carlo Methods and Applications", (Веіјіп, 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 23-25 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 численних 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, Західно-Український 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].

**Подяки.** Висловлюю щиру подяку професору Тарасу Брику за підтримку і сприяння під час написання дисертації. Особлива подяка належиться Олесю Іванківу, Роману Мельнику, Андрію Стельмаху, Катерині Лопушанській та Юрію Дубленичу, за консультації та допомогу в оформленні дисертації. Дякую також моїм багаторічним співробітникам Джоан Ши та Вей Каю за можливість працювати разом та щиру особисту підтримку на різних стадіях моєї кар'єри.

Насамкінець, виконання цієї роботи було б неможливим без терплячості та розуміння моє сім'ї, дружини Галини та дітей Марії та Олекси. Велике всім дякую.

### РОЗДІЛ 1.

# ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

## 1.1. Фазова поведінка білків

Незважаючи на те, що пройшло вже майже 40 років з часу опублікування перших повідомлень про розшарування рідина-рідина у водних розчинах білка [1], зацікавленість дослідників у вивченні цього явища залишається незмінно високою. Розуміння того, як метастабільна рідинна фаза спонтанно виникає з розрідженої газоподібної фази при охолодженні, є важливим в багатьох областях наукових досліджень, включаючи кристалографію білка [2], де рідка фаза вважається проміжною в критичній області фазового переходу кристалізації, медичні дослідження [3], де рідка фаза асоціюється з виникненням холодної катаракти та біологію [4], де вважається, що утворення крапель рідини лежить в основі механізму, за допомогою якого у цитоплазмі живих клітин описуються такі немембранні утворення, як ядерця або центросоми.

Існує консенсус [41; 42] щодо того, що притягальні взаємодії між молекулами білка спричиняють перехід у рідиноподібну фазу, але конкретні деталі цього процесу залишаються нез'ясованими. Вагомих результатів вдалось досягнути на основі моделей і методів, розроблених у фізиці колоїдів, зокрема, відомої моделі Дерюгін-Ландау-Верві-Овербека (DLVO)[43; 44; 45], де білки моделюються сферичними частинками, що взаємодіють через конкуруючі відштовхувальні Кулонівські та притягальні ван-дер-Ваальсівські потенціали. Впродовж років [45] ця модель неодноразово модифіковувалась. Найбільш суттєві зміни було внесено на основі параметризації результатів експериментів з рентгенівськими променями з малим кутом розсіювання (SAXS / SANS) [46; 47]. Білок лізоциму є однією з найбільш досліджених методами SANS системою[48; 49; 50; 51; 52].

Для теоретичного опису цього білка найчастіше використовується потенціал подвійної Юкави, що імітує DLVO. Отриманий на основі параметризованих

даних для 2-го віріального коефіцієнта цей потенціал успішно прогнозує фазові діаграми [53; 54], однак структурні функції описуються не дуже коректно [55]. Для вирішення цієї проблеми пропонується виведення форми потенціалу взаємодії з експериментальних структурних функцій за допомогою теорії рідкого стану, як це було зроблено в недавніх і точних дослідженнях [56; 57]. Однак такі дослідження базуються на відповідних теоріях інтегральних рівнянь, які, в свою чергу, мають власні обмеження. Більше того, залишається незрозумілим, наскільки добре виведена модель відтворює фазову поведінку білкового розчину, зокрема фазове розшарування. Слід також зауважити, що відомі на сьогодні моделі опису молекули білка [56; 58; 59] не здатні одночасно відтворювати структуру та фазову поведінку білкових розчинів.

### 1.2. Білкові кластери

Термін кластер стосується великого розмаїття об'єктів від малих мономерів до мезоскопічних доменів [60], що виникають в результаті асоціації мономерів у різноманітних м'яких матеріалах[10]. Про кластери найчастіше говорять у зв'язку з колоїдними суспензіями [61], де кластери перебувають у рівновазі з мономерами, проте їх спостерігають також в білках [6], синтетичних клеях [7] та металічних наночастинках [8]. За відповідних умов, кластери можуть досягати стану термодинамічної рівноваги та утворювати найбільш заселені компоненти в розчині. Вони також можуть виникати тимчасово, наприклад внаслідок фазового переходу[9]. Як частковий випадок процесу самоорганізації, утворення кластерів є особливо цікавим для фундаментальних досліджень, зокрема у фізиці конденсованої речовини. До того ж воно має цінні практичні застосування, приміром, як засіб для доставки ліків[12]. Кластери можуть значно змінювати механічні властивості водних розчинів, де вони утворюються. Так відбувається, приміром у розчинах, що містять такі відомі білки як моноклонні антитіла, які демонструють значне зростання в'язкості внаслідок присутності кластерів [11]. Отже, існує нагальна потреба в розумінні принципів, що лежать в основі утворення кластерів для того, щоб їх використовувати на практиці, зокрема з терапевтичною метою.

Історично можливість утворення кластерів в однорідних плинах вперше розглядалася у рамках концепції конкуруючих взаємодій. Вивчаючи фазові переходи у системах з притягальним потенціалом взаємодії, Лебовіц і Пенроуз [62], поставили питання про роль додаткової відштовхувальної частини в потенціалі, радіус якої більший, аніж притягальної. Автори зробили висновок, що рідина, яка утворюється в результаті нормального фазового переходу першого роду газрідина завдяки притяганню між частинками, розіб'ється на краплі, розмір яких більший від розміру колоїдних частинок, але менший від радіуса відштовхування. Протягом останніх сорок років цей сценарій було виявлено в різноманітних системах з різноманітними потенціалами. Так Кендрик та ін. [63] розглядали систему колоїдів, які взаємодіють через відштовхувальні Кулонові і притягальні Ван-дер-Ваальсові сили й дійшли висновку, що конкуренція між цими двома взаємодіями призводить до того, що критичну точку між рідинною фазою з малою густиною і рідинною фазою з великою густиною «витісняє критична точка зі скінченним хвильовим вектором» [63]. У результаті цього нового фазового переходу утворюються макрофази з неоднорідним розподілом густини. Та сама ідея конкуренції між короткосяжною притягальною і далекосяжною відштовхувальною взаємодією в простому плині згодом лягла в основу досліджень Сіра та ін.[64; 65] колоїдів на поверхні розділу повітря-вода. Аналітична теорія середнього поля[65] і комп'ютерні симуляції [64] показують, що й справді замість розшарування фаз рідина-рідина (LLPS) колоїди утворюють різноманітні модульовані фази, серед яких і скінченні кластери. У багатьох відношеннях вони подібні на узори, що виникають унаслідок конкуренції між притяганням і відштовхуванням, і які повідомляли раніше для складних плинів[66; 67]. Наступний крок було зроблено в роботі Грьонвольда та Кегеля [68], які показали, що багаторівнева модель, яка описує кількість заряду на поверхні колоїду, може приводити до стабілізації кластерів великого розміру. Після цієї публікації появилася велика кількість робіт про кластери SALR (див. [69; 70] і посилання в них), в яких основну увагу було звернуто на те, як розривається чи змінюється лінія LLPS через присутність відштовхування в потенціалі. Група Pearto[71; 72] використала складне й точне самоузгоджене наближення Орштейна-Церніке (SCOZA) в рамках теорії рідкого стану на основі інтегральних рівнянь, щоб знайти лінію, яка на фазовій діаграмі відокремлює фазу однорідного плину від фази кластерного плину, так звану  $\lambda$ -лінію. Передбачення SCOZA згодом порівняли з результатами на основі теорії функціоналу густини [73] і результатами симуляцій [74]. Неповний список інших розглянутих тем містить: а) вплив радіуса притягання [75; 76], б) висоти бар'єру [77] і с) роль хвоста потенціалу [78; 79; 80; 81; 82].

Ще один клас систем, де знайшли кластери, – це колоїди з відштовхувальним потенціалом взаємодії з м'яким плечем[10]. Стелл і Геммер у своїй фундаментальній роботі [83] показали, що завдяки додатковому масштабу довжини (один масштаб визначається розміром частинки колоїду, а другий – розміром плеча) такий потенціал має особливі властивості. Окрім звичного переходу газ - рідина, що закінчується в критичній точці, потенціал з плечем може призводити до переходу рідина-рідина, що також закінчується в критичній точці. Були проведені численні дослідження особливостей нових фазових переходів, а також того, чи ця модель здатна пояснити термодинамічні аномалії води в рідкому стані [84; 85; 86; 87; 88]. Проте, до роботи Кляйна та інших [89] кластери не були особливим предметом цих досліджень. Використовуючи аналітичну теорію та комп'ютерні симуляції, автори показали, що частинки колоїду, які взаємодіють через потенціали з твердим ядром і м'яким плечем, утворюють у рідинній фазі сферичні кластери . За низьких температур ці кластери формують кластерні кристали, кластерне скло, полікристалічні матеріали [89]. Для того самого потенціалу, але у двовимірному випадку, Норізо і Кавакацу [90; 91] згодом також продемонстрували утворення подовгастих або подібних на струни кластерів. Подовгасті, подібні на ланцюжки кластери спостерігав і Камп [92], для відштовхувального потенціалу з плечем (відмінного від HCSS) і показав, що саме плече призводить до утворення кластерів. Окрім кластерів, HCSS приводять до утворення різноманітних упорядкованих фаз при низьких температурах. Меласіо і Пелікане [93] знайшли звичайні стрічкові фази, а Глейсер та інші [94] за допомогою симуляцій методом Монте-Карло виявили кластерні кристали і кластерні плини. Кластерні плини знайшли також Младек та інші [95], стрічки – Форнляйтнер і Каль [96], а ламели, гексагональні стовпчасті й об'ємноцентровані кубічні фази, а також асоційовані інверсні структури – Шін *та інші* [97]. Дотера та інші [98] описав розмаїті двовимірні квазікристалічні структури, що утворюються за низьких температур.

Треба зауважити, що колоїди з відштовхувальною взаємодією насправді не мусять мати твердого ядра, щоб утворювати кластери. Лікос та інші [99] розглядали обмежені в початку координат потенціали, що мають пласку частину HCSS без твердого ядра, і запровадили критерій того, чи система з таким потенціалом зазнаватиме мікроскопічного фазового розшарування на ґраткові стани, в яких багато колоїдних частинок займають той самий вузол ґратки. Цей критерій згодом успішно перевірили за допомогою комп'ютерних симуляцій[100], які і справді виявили кластерні кристали. В лабораторних експериментах було показано, що відштовхувальні [9; 61], а також притягальні [101] колоїди утворюють кластери.

### 1.3. Згортання білків за посередництвом шаперонів

Молекулярні шаперони - клас великих багато-доменних білків, що знаходяться в достатньо великих концентраціях в цитозолі - полегшують згортання новосинтезованих білків в умовах, коли їх спонтанне згортання або заборонене або повільне[14]. Найбільш ретельно вивченою є система шаперонів з бактерії кишкової палички E.Coli, GroEL / ES[15]. Даний шаперон це комплекс що складається з двох структурних одиниць: великого кільця GroEL яке містить порожнину та меншого кільця GroES яке слугує як ковпак для порожнини. Існує два симетричні, сполучені кільця GroEL в одному комплексі, нижнє та верхнє. Білок у розгорнутих конформаціях може зв'язуватися з прикінцевим доменом одного з цих кілець через неспецифічні гідрофобні взаємодії. Прикріплення АТФ призводить до накриття кільця ковпаком GroES, внаслідок чого приєднаний субстрат витісняється в порожнину, об'єм якої подвоюється а поверхня стає гідрофільною[14]. Подальший гідроліз приєднаної молекули АТФ та зв'язування нової молекули до протилежного кільця, дестабілізує GroEL/ES комплекс та приводить до його дисоціації[14]. Білок-субстрат вивільняється з порожнини або в природному стані, у випадку успішного згортання, або в розгорнутому стані, в протилежному випадку. Розгорнуті білки можуть бути приєднані шапероном ще раз і пройти повторну спробу згортання. З іншого боку, природним структурам білків бракує гідрофобних поверхонь тому вони не взаємодіють з шапероном.

Незважаючи на те, що структура комплексу GroEL/ES зараз вже добре відома[14; 102], точний механізм, за допомогою якого шаперони допомагають згортати білки залишається предметом постійних дебатів. Було висунуто дві теорії для пояснення згортання опосередкованого шапероном: механізм ітераційного відпалу (IAM) [16; 103; 104; 105], та модель комірки Анфінсена (ACM) [106; 107; 108]. IAM спирається на експериментальні спостереження, що декілька раундів асоціації та дисоціації GroEL/GroES, керовані АТФ, можуть знадобитися, щоб цілком перетворити розгорнуті / неправильно сформовані білки у природний стан в умовах коли спонтанне згортання неможливе[16; 109]. Вважається, що реакцію згортання можна розділити на швидкий та повільний канал. В повільному каналі згортання сповільнюється через існування складних проміжних (не повністю згорнутих) структур що мають довгий час життя[103]. IAM передбачає, що шаперони активно розгортають неправильно сформовані проміжні структури, можливо шляхом прикладання механічної сили[105], ти самим перерозподіляючи їхню популяцію поміж двох каналів. Сукупний результат дії шаперону - це прискорення швидкості згортання за рахунок перетікання білків з повільного до швидкого каналу. Нещодавні теоретичні дослідження та комп'ютерне моделювання, що використовують граткові моделі білків [110; 111; 112; 113; 114; 115], підтримують висновок що циклічна дія шаперону може підвищити швидкість згортання. За однією версією розгортання субстрату може бути результатом повороту прикінцевого домену GroEL після його зв'язування зі спів-шапероном GroES. Проте детальна роль механічної деформації білка залишається незрозумілою. Хоча велика кількість білків демонструє прискорення темпів згортання в присутності GroEL, примусове розгортання було чітко продемонстровано лише для одного субстрату[105], залишаючи відкритим можливість того, що інші причини можуть бути відповідальними за дію шаперона.

Альтернативна теорія згортання опосередкованого шаперонами, модель комірки Анфінсена (АСМ), стверджує що неефективне згортання в цитосолі відбувається за рахунок агрегації білків, а не утворення довго-живучих кінетичних пасток. Білки, які вільно згортаються в розрідженому середовищі лабораторних експериментів, можуть зіткнутися з різними перешкодами у густому середовищі клітини. В умовах високої макромолекулярної концентрації, взаємодії між білками стають все більш важливими[116], а білки можуть незворотньо злипатися через оголені гідрофобні поверхні. Якщо таке трапиться, процес згортання може бути повністю припинений, оскільки шаперони взагалі не здатні взаємодіяти з білковими агрегатами, на відміну від природних мономерних станів[117]. Все більше експериментальних даних вказує на те, що агрегація білка, а не утворення проміжних структур, може бути відповідальною за повільну кінетику згортання деяких білків[118; 119].

Модель комірки Анфінсена передбачає, що шаперони "рятують" білки, прикріпившись до них перш ніж вони мають шанс агрегувати. Після поміщення в порожнину субстрат має можливість самостійно згорнутися, в середовищі захищеному від інших білків. Нещодавні експерименти Гартла та співробітників [108] розглянули ряд ключових питань, пов'язаних з АСМ. Зокрема, вони продемонстрували, що не тільки згортання в природний стан відбувається цілком у шапероновій порожнині, але й те, що АТР-керований шапероновий цикл не потрібен для ефективного згортання. Мутовані нециклічні одно-кільцеві "GroEL" шаперони (присутні в достатній концентрації) змогли конвертувати неправильно згорнуті конформації у природний стан з однаковою швидкістю і тією ж вихідною здатністю, що й у циклічному комплексі GroEL/ES. Зазначимо, що було доведено[120], що згортання білка Rubisco в GroEL є граничним випадком IAM, в якому для повної реакції потрібно лише один цикл. Іншим важливим висновком дослідження Гартла та співробітників є те, що ізолювання в шапероновій порожнині приводить до посилення швидкості складання лише для певних білків[108]. Розміщення в порожнині GroEL привело до 4-кратного прискорення темпу згортання для Rubisco, тоді як для меншого білка rhodanese не спостерігалося жодних ефектів. Автори[14; 108] припускають, що збільшення швидкості згортання певних білків-субстратів може бути пов'язане з впливом обмеженого середовища на поверхню вільної енергії білка. Зокрема, вони пропонують що інкапсуляція в гідрофільній порожнині шаперона може усувати локальні мінімуми потенціальної енергії, тим самим зменшуючи шорсткість відповідної поверхні вільної енергії та прискорюючи швидкість згортання. Оскільки гіпотеза Гартла надзвичайно складна для експериментальної перевірки, прямих її доказів на даний час не існує.

### 1.4. Моделі для дослідження агрегації білків

Триваючий прогрес у розвитку комп'ютерних технологій та наявність швидкодіючих та апаратно-пристосованих симуляційних пакетів[121] дають змогу в сучасних обчислювальних дослідженнях білків все більше зосереджуватися на великих системах [122]. Особливий інтерес у даному контексті викликають ве-

ликі багато-доменні білки, в тому числі шаперони чи моторні білки [123], білкові комплекси [124] та агреговані білки [125]. Успіх обчислювальних підходів до великих систем залежить від звичного компромісу між складністю використовуваних білкових моделей та їх швидкодією. Білкові моделі з атомістичними деталями є найповільніші та такі що можуть бути використаними в явному розчиннику для часових масштабів не більше кількох наносекунд [126; 127; 128]. Сконструйовані моделі зі спрощеним представленням структури призводять до значного прискорення, що дозволяє вивчати події на часових масштабах від мікросекунд до мілісекунд. Виникає відповідне запитання при розробці таких моделей, які дуже різняться у складності [129; 130; 131; 132; 133]: " Який рівень спрощення виправданий для даної проблеми? " Існує все більша кількість доказів того, що шляхи і згортання, і агрегації є дуже чутливі до хімічних деталей первинної послідовності білка. Наприклад, консервативна мутація F-на-A у критичному місці в моторному білку міозин, як видно, повністю усуває моторну функцію, відокремлюючи активний центр від сило-генеруючої області[134]. Агрегаційні дослідження амилоїдного β-пептиду[135] демонструють співмірний за величиною ефект, де мутації А-на-І або V-на-І викликають значний перерозподіл у рівноважній заселеності різних олігомерних компонент. Малі хімічні відмінності між відповідними залишками в обох випадках вказують на те, що атомістичне представлення білка є необхідним для правильного відтворення спостережуваної поведінки, якщо не кількісно, то, принаймні, якісно.

Спрощення на атомарному рівні стосується лише розчинника, в якому моделюються білки. Розчинник, як правило вода, може розглядатися у різний спосіб, але найчастіше він повністю усувається і замінюється ефективними потенціалами  $\Delta G$ , що діють на білкову молекулу і відомі як сольватаційна вільна енергія [136]. Незважаючи на велике число сольватаційних моделей, введених для моделювання біомолекулярних симуляцій [137], схема, що розділяє  $\Delta G$  на електростатичні  $\Delta G_{el}$ , і неполярні  $\Delta G_m$  компоненти, базується на фізичних принципах і вважається найбільш успішною. В рамках цієї схеми доступні дуже точні наближення для  $\Delta G_{el}$ , отримані за допомогою неперервної електростатичної моделі[138], тоді як теорія неполярної сольватації відносно менш розвинена [139; 140; 141; 142]. Найширше вживана модель[141; 143] неполярної сольватації базується на доступній для розчинника площі поверхні (SASA). Важливо, що обидві ці моделі, електростатична та неполярна, містять багаточастинкові взаємодії, що призводить до дуже повільних обчислень. Для великих білків [144], симуляції неявних розчинників із використанням цих моделей можуть працювати навіть повільніше, ніж відповідні симуляції в явному розчиннику.

Альтернативою фізично обгрунтованій сольватаційній вільній енергії є статистичні потенціали. Замість забезпечення універсальної моделі сольватації, яка відповідає всім білкам, ці потенціали вводяться спеціально для заданої системи та залежать від її термодинамічного стану, включаючи температуру. Найважливіше, що статистичні потенціали можна вибрати короткодіючими попарно аддитивними, що не дає додаткових витрат на обчислення до тих, які вже містяться в дисперсійних взаємодіях. Таким чином, симуляції, що використовують такі потенціали, працюють максимально швидко у відповідності з обраною білковою архітектурою. Попарне наближення, звичайно, має свої обмеження; однак воно успішно застосовується в різних конденсованих речовинах, колоїдних та полімерних системах [145; 146]. Зокрема, нещодавно були отримані статистичні парні потенціали для розчинів електролітів [147], нуклеїнових кислот[148], малих пептидів[149; 150], ліпідів [151] і великої кількості синтетичних полімерів [152; 153; 154; 155]. При дослідженнях великих білків та їх комплексів статистичний підхід є доречним принаймні у двох контекстах. По-перше, він дозволяє вивчати великі білки, що складаються з менших повторюваних фрагментів, шляхом отримання ефективних потенціалів для цього фрагмента в симуляціях явного розчинника. Прикладами таких систем є гомополіпептиди, у тому числі поліаланін (полі-А), поліглутамін (полі-Q) та поліаспарагін (полі-N) - пептиди, всі з

яких є біологічно важливими[156; 157]. По-друге, статистичні потенціали можуть бути отримані для коротких пептидів для вивчення процесу їх агрегації. Хоча ціла низка нещодавно введених моделей може імітувати спонтанне збирання пептидів в агрегати багаті на  $\beta$ -структуру [158; 159; 160; 161; 162], лише невелика кількість з них може це робити на атомному рівні [25; 163; 164; 165; 166; 167; 168]. З цих останніх досліджень лише одна модель [25; 167; 168] має швидкість і точність, необхідні для моделювання самоорганізованих багатошарових  $\beta$ -листів, що нагадують протофібрили і спостерігаються експериментально [169; 170].

### 1.5. Фібрили в електричному полі

Амилоїдні  $\phi i \delta p u n u$  – це макромолекулярні комплекси в наномасштабі, які утворюються в результаті агрегації білків[171]. Багаті на β-структуру, амилоїдні фібрили мають чітко визначені та специфічні біологічні функції у природі[172; 173]; однак, вони найбільш відомі з огляду на причетність до безлічі нейродегенеративних захворювань[171]. Хоча точна причина цих захворювань залишається незрозумілою, дезагрегація амилоїдних фібрил є одним з найважливіших терапевтичних напрямків[174; 175; 176]. Завдяки високо-упорядкованій структурі, амилоїдні фібрили стали також новим і перспективним матеріалом у нанотехнологіях[37]. Здатність контролювати формування амилоїдів важлива як в медичній, так і в технологічній перспективах.

Агрегація та згортання білків тісно переплетені один з одним[177]. Хоча точне співвідношення між двома процесами залишається предметом активних дебатів[178; 179; 180; 181], добре відомо, що білки повинні розгорнутися, перед тим як вони можуть сформувати амилоїд [182; 183; 184; 185; 186; 187]. Розгортання збільшує кількість неупорядкованих або частково згорнутих станів [180] які, на відміну від природного стану, сумісні зі структурою амилоїду. Розділення на шляхи згортання та агрегації контролюється ділянками залишків, які не перекривають один одного в первинній структурі білка[188]. Якщо дестабілізація природного стану посилює агрегацію[186; 187] то від стабілізації очікується протилежний ефект. Дійсно, роблячи природний стан глобально більш стабільним через сприятливі мутації [186] або зв'язування з лігандом[189; 190], спостерігається пригальмування формування амилоїдів. Аналогічно, мутації, які впливають на структуру локально, також можуть зменшити схильність до агрегації[191]. Як саме стабільність природного стану впливає на агрегаційні шляхи, може залежати від природи досліджуваного білка. Наприклад, в білках, чий агрегат з фібрил використовує спіральні проміжні сполуки, підвищене згортання прискорює агрегацію, а не сповільнює її[192]. Проте, в загальному очікується, що стабілізація спричиняє дезагрегацію фібрил, оскільки природні конформації несумісні зі структурою фібрил. Підвищення ефективності згортання було запропоновано як засіб для запобігання формування амилоїду[189; 191].

В даній дисертації ми представляємо розрахунки на підтримку можливості використання електричного поля як чинника, здатного дезагрегувати амилоїдні фібрили шляхом стабілізації згорненої спіральної конформації. Вплив зовнішнього електричного поля на біологічні молекули широко вивчався протягом більше п'яти десятиліть [193; 194; 195]. Ці дослідження привели до двох відомих механізмів взаємодій молекул з полем. *По-перше*, це вирівнювання макромолекул з сталими або індукованими диполями вздовж осі прикладеного поля. Для підтвердження цього механізму були виміряні сталі дипольні моменти для коротких послідовностей ДНК [196] та білків[197], уможливлюючи спостереження селективного орієнтування у зовнішньому полі. *По-друге*, було висловлено припущення, що конформаційні переходи можуть відбуватися завдяки безпосередній взаємодії молекулярних диполів з полем. Цей механізм базується на простому спостереженні, що завдяки взаємодії з полем, конформації з більшими дипольними моментами набувають вищої статистичної ваги ніж конформації з меншими моментами. Очікуваним результатом є зміщення рівноваги, кероване по-

лем, у напрямку станів з найбільшими моментами. Незважаючи на свою простоту, цей сценарій протягом довшого часу залишався спірним. Перші докази прямого впливу поля знаходимо в роботах Шварца та Сіліга[198], які інтерпретували результати своїх вимірювань діелектричної дисперсії для синтетичного пептиду на основі глутамінової кислоти, як такі що свідчать про перехід типу клубок-спіраль. Для пояснення спостережень було використано кінетичну теорію, розроблену Шварцем [199] для переходу в спіральний стан. Вимірювання, що призвели до подібних висновків, пізніше були представлені іншою групою для іншого пептиду (похідного аспартату)[200]. Проте їхня інтерпретація з точки зору конформаційного переходу була піддана сумніву Маршалом[201], який наполягав, що спостережуваний спектр можна пояснити і виключно орієнтаційними ефектами. Однак, пізніші дослідження, здійснені декількома групами та за допомогою різних експериментальних методів, надають додаткову підтримку механізму прямої взаємодії. Експерименти з електричними імпульсами Сано і Ясунага[202] однозначно встановили процес релаксації, який спостерігався в пептидах на основі глутамінових кислот, що відповідає конформаційному переподвійним ходу. Експерименти 3 електричним променезаломленням Поршке[203] повідомляють про перший випадок розгортання білка електричним полем. Розгортання також було виявлено в дослідах з капілярним електрофорезом непов'язаного білка[204]. В підсумку, накопичені експериментальні докази однозначно демонструють конформаційні переходи під дією електричного поля. При дослідженні мембранних білків це явище називається електроконформаційним з'єднанням[205]. У теорії згортання білків також зазначається ефект стабілізації спірально-дипольних взаємодій на природний стан[206].

# 1.6. Структурні переходи моторного білка міозину

Міозин II - це моторний білок, який залучений до виконання скорочувальної функції м'язів. Відповідно до кінетичних досліджень Лина та Тейлора[207], функціональний цикл міозину включає кілька стадій, що складаються з конформаційних переходів та моментів зв'язування з аденозинтрифосфатом (АТФ) та актиновими філаментами. Ключовим серед цих стадій є стрибок (або хід) генерації сили, що генерується в актин-зв'язаному міозині після гідролізу АТФ. Функціональною протилежністю цій стадії є відновлювальний стрибок, або хід, що повертає міозин до його продуктивної стану - готового до генерації сили. Цей стан виникає, коли міозин зв'язаний з АТФ, але не зв'язаний з актином. Початкові та кінцеві конформації стадії відновлення називаються, відповідно, стадіями передвідновлення, М\*, та пост-відновлення - М\*\*. Мікроскопічні деталі переходу між цими двома станами, які є оборотними [17; 19] і можуть контролюватися температурою та тиском [17], погано зрозумілі на сьогоднішній день [208; 209; 210; 211; 212; 213; 214; 215; 216].

Кристалографічні дослідження [217] каталітичного домену міозину - міозинової голівки, які тут для простоти будуть називатися міозином, показують три області, де структура конформацій М\* та М\*\* відрізняється. Як показано на **Puc. 1.1**, 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, знаходиться в закритому стані в конфігурації М\*\*, де залишок G457 утворює водневий зв'язок з гамма фосфатом АТФ, а у відкритому стані - в конформації М\*, де водневий зв'язок відсутній. Домен-конвертор, що хімічно з'єднаний з "шийним" доменом (важелем), який є відповідальний за передачу сили, під час етапу відновлення зазнає значного повороту навколо релейної спіралі. Релейна спіраль спочатку має пряму форму в конформації перед-відновлення М\*, але у стані пост-відновлення М\*\* утворює петлю або злам. Крім того, невелика спіраль Src-1 гомологічного домену (SH1) зсунута при переході від М\* -до -М\*\* приблизно на 4Å до домену-конвертора вздовж релейної спіралі.

Хоча кінцеві точки стрибка відновлення, М\* та М\*\*, доступні з кристалографічних досліджень [217], перехід між ними залишається нез'ясованим. Численні недавні експериментальні [17; 18; 19; 218] та теоретичні [144; 208; 219; 220; 221;



**Рис. 1.1** Схема, що пояснює два альтернативних стани "головки" міозину, що зв'язана з АТФ: стан передвідновлення М\* та стан поствідновлення М\*\*. "Стрибок відновлення" складається з двох етапів: 1) закриття петлі ключа ІІ в стані М\*; 2) результуючий каскад конформаційних змін, що приводить до згину релейної спіралі та повороту домену-конвертора в стані М\*\*. Дві події відбуваються в фізично різних місцях, виділених квадратами, та віддаленими один від іншого на відстань 40 Å.

222; 223; 224; 225; 226; 227; 228] дослідження дали нове бачення того, як відбувається перехід, проте не змогли пояснити мікроскопічний механізм на атомному рівні. Експериментальні підходи [18; 19] зазвичай не мають достатньої роздільної здатності, щоб надати необхідні деталі. Вимірюючи розподіл відстані між вибраними парами залишків, наприклад, нещодавні дослідження методом парамагнітного резонансу (EPR) та флуоресценційним переносом енергії (FRET) [18; 19; 229; 230], підтверджують, що існує два альтернативних стани міозину, зв'язаного з АТФ, але не можуть запропонувати відповідну мікроскопічну інтерпретацію.

З іншого боку, теоретичні методи стикаються з викликом великого розміру білка, який містить більше 700 амінокислотних залишків. Спостереження переходу відновлення, яке відбувається на мілісекундній шкалі часу[19], безпосе-

63

редньо в симуляції, наразі є неможливим. Найтриваліші симуляції, про які повідомлялося на сьогоднішній день, обмежені діапазоном 1-5*нс* [222; 224].

Оскільки безпосереднє спостереження за стрибком відновлення неможливе в моделях з використанням атомного представлення білка, активно робляться спроби знайти альтернативні підходи[208; 209; 210; 211; 212; 213; 214; 215; 216]. Одна група дослідників спрощує представлення білка, щоб пришвидшити вирішення проблеми. Два важливих недавніх досягнення в цьому напрямку - це дослідження методом еластичних мереж [209; 213; 215] та симуляції з використанням скорочених(спрощених) моделей типу Го[211]. Хоча й корисні для прогнозування загальної функціональної динаміки, ці моделі не мають мікроскопічної роздільної здатності, необхідної для відтворення стрибка відновлення. Інша група методів спирається на атомну будову білка, але застосовує засоби прискореної динаміки, такі як генерація перехідних шляхів. Незважаючи на те, що в цих дослідженнях спостерігається стрибок відновлення, на реактивні шляхи сильно впливає специфіка використаного методу і, таким чином, вони залишаються наближеними[220; 225]. Третя група складається з підходів, які також використовують атомну будову, проте, перехід між кінцевими точками реакції моделюється за допомогою скеровуючих парасолькових потенціалів, що застосовуються уздовж попередньо узгодженої координати реакції [208; 226; 228]. Багато чого можна дізнатися про стрибок відновлення в цих моделюваннях, проте вибір координат реакції залишається неоднозначною задачею.

# 1.7. Фібрили пептиду хвороби Альцгеймера Аeta

Наявність амилоїдних фібрил в головному мозку є клінічною ознакою хвороби Альцгеймера (AD). Фібрили складаються з великих впорядкованих агрегатів амилоїд-β (Aβ) пептидів, протеолітичних побічних продуктів ферментативного розщеплення амилоїдного білка-прекурсора (APP). Хвороба Альцгеймера може бути спорадичною (зустрічається у літніх пацієнтів і характеризується повільним прогресуванням) або вродженою (спадкова форма, що характеризується раннім початком захворювання та значними ускладненнями). Більшість вроджених форм AD включають одиничні точкові мутації у сегменті 22-23 пептиду A $\beta$ . Однією з найбільш поширених є голландська форма, яка включає мутацію, кодовану парою заміщення G-C на кодоні 693 амилоїдного білка-прекурсора. Як наслідок, з'являється пептид A $\beta$ , в якому глутамінова кислота на позиції 22, залишок E22, заміщуються на глутамін Q22 (мутація E22Q). Пацієнти, які мають цю мутацію, піддаються ризику розвитку церебральної амилоїдної ангіопатії, що зазвичай призводить до мозкового кровотечі та інсульту. Багато лабораторних експериментів показують, що пептид A $\beta$ E22Q агрегує набагато швидше, ніж його аналог дикого типу[231; 232; 233].

Перша стадія агрегації Аβ-пептиду передбачає згортання цього пептиду у структуру, відповідальну за подальший ріст у олігомери і фібрили. Для повного розуміння механізму агрегації необхідна характеристика цієї мономерної структури. В розчині Аβ пептид дикого типу здебільшого неструктурований, з залишковою структурою, що спостерігається локально в декількох областях первинної послідовності[234]. Проте, через схильність Аβ-пептидів до агрегації, експериментальні дослідження їхньої мономерної форми € надзвичайно утрудненими[234; 235; 236; 237]. В останні роки кілька експериментальних груп почали працювати з фрагментами повнорозмірних Аβ-пептидів, які агрегують не так швидко і, отже, можуть бути більш придатними для вивчення[238]. Одним з таких пептидів є фрагмент довжиною в 26 амінокислот, що охоплює залишки від 10-го до 35-го (послідовність: Y<sup>10</sup>EVHHQKL<sup>17</sup>VFFA<sup>21</sup>EDVGSNKGA<sup>30</sup>I-IGLM<sup>35</sup>). Ця модельна система є особливо привабливою, оскільки вона містить як 21-30 сегмент, який, як вважають, розпочинає згортання повнорозмірного Аβпептиду, так і сегмент гідрофобного ядра 17-21, який є критичним для агрегації.

Лі і співробітники вивчали цей пептид експериментально, використовуючи метод ЯМР[235]. Їхні дослідження показали, що Аβ10-35 у фізіологічних умовах набуває переважно конформації компактного клубка, з добре структурованим

ядром, розташованим в районі гідрофобного сегмента 17-21 (L<sup>17</sup>VFFA<sup>21</sup>). Залишки, що не належали до ядра, складалися зі згинів і поворотів, без чітко визначеної вторинної структури. Через те, що експериментальні методи, які використовувалися для вивчення цього пептиду, по суті базуються на усередненні по ансамблю, структури з низькою заселеністю, які, тим не менш, можуть бути вадля ініціювання агрегації, не можуть бути ідентифіковані. жливими Комп'ютерні симуляції мають перевагу над такими експериментами в тому, що надають детальну інформацію на атомному рівні про конформаційний простір, притаманний цьому пептиду. Страуб та колеги [239; 240; 241] провели симуляції цього пептиду в масштабі 1нс в явній воді, ініційовані з конформацій, отриманих експериментально Лі та колегами[235]. Нещодавно Хан та Ву дослідили конформаційну динаміку цього пептиду на протязі 1.2 мкс, використовуючи явний розчинник, зі спрощеною схемою відсікання для опису електростатичних взаємодій[242]. Ці симуляції надали важливу інформацію щодо конформаційних ансамблів, заселених Аβ 10-35, а також про динаміку пептиду при кімнатній температурі. Проте, симуляції при постійній температурі, виконані на протязі часової шкали, представленої в цих роботах, навряд чи можуть виявити всі важливі конформаційні стани пептиду, часи релаксації яких, як вважають, становить порядок мілісекунд[243]. Як наслідок, в таких симуляціях досліджуються лише ті локальні мінімуми на карті вільної енергії, які знаходяться найближче до початкової конформації. Невідомо, наскільки добре ці локальні мінімуми характеризують весь конформаційний ансамбль. Інші симуляції, за допомогою яких досліджувався перехід від α-спіралі до компактного клубка, виконувалися за допомогою методу генерації перехідних шляхів та використовуючи схему неявної сольватації [241]. Схеми неявної сольватації, хоча й ефективні з погляду економного використання комп'ютерних ресурсів, проте мають ряд недоліків[244], зокрема, коли мова йде про моделювання солевих містків, які утворюються між різнойменно зарядженими бічними ланцюгами амінокислот. Такі солеві містки можуть потребувати участі проміжної молекули води і, таким чином, погано описуються схемою сольватації, яка не враховує дискретний характер води[245]. З огляду на це, підходи які використовують явний розчинник вважаються більш точними.

Пептид Аβ може утворювати різні олігомерні структури, деякі з яких можуть бути токсичними (такі як трансмембранні пори)[246], на шляху до фібрилярного стану. Після приєднання до фібрили, пептид приймає конформацію βлиста[247], що означає, що фібрилізація супроводжується великою структурною перебудовою. У випадку мутації E22Q, експерименти Маджіо et al [248] вказують на те, що швидкість осідання мономеру Аβ на фібрили підвищується в порівнянні з диким типом. Згортання мономерного Аβ в конформацію, що відповідає фібрилі, слугує бар'єром вільної енергії для росту фібрил.

Розуміння причин агрегації білків та характеристика структури фібрил - це перші кроки до розшифрування ролі цих сполук у контексті захворювань або проектування їх використання у технологічних цілях. Оскільки з білками, що спричиняють хворобу, важко працювати через високу швидкість агрегації або пов'язані з цим ризики, їхні фрагменти, з якими легше впоратися та які все ще амилоїдогенні, для стали зручною моделлю загальних досліджень амилоїдозу[249]. Твердотільні ЯМР експерименти Тико і т.д.[250], показали, що фрагмент, який містить залишки 11-25 β-амилоїдного пептиду (Аβ11-25), який провокує хворобу Альцгеймера, утворює амилоїдні фібрили. Фібрили утворюють перехресну структуру β-листа[251], яка є характерною ознакою амилоїду, в області центрального сегменту гідрофобного кластеру, що містить залишки 17-21. Хоча експериментальні обмеження були недостатніми для визначення мікроскопічної структури фібрили, вони дали суттєві докази того, що β-листи складаються з β-ниток в антипаралельному розташуванні. Крім того, регістр водневих зв'язків утворених між  $\beta$ -нитками визначили як  $17 + k \leftrightarrow 20 - k$  при pH=7, де цілі числа по обидві сторони рівняння вказують на залишки при контакті, а k – це ціле число у проміжку -6 та 8. Примітно, що неодноразові експерименти в кислому середовищі при pH=2 показали, що  $\beta$  листи залишаються антипаралельними, проте регістр змінюється на  $17+k \leftrightarrow 22-k$ , де k – ціле число у проміжку -3 та 8. Зміщення, викликане зміною pH, чітко вказує на те, що регістр  $\beta$ -листів у A $\beta$ 11-25 фібрилах визначається делікатним балансом між взаємодіями бічного та основного ланцюгів. Проте, коли атомна структура фібрили відсутня, точний механізм, за допомогою якого закодовується регістр, залишається невідомим.

### 1.8. Висновки розділу

Існує багато аспектів згортання та агрегації білків які досі нез'ясовані. Для досягнення помітного прогресу потрібні нові теоретичні моделі та методи.

## РОЗДІЛ 2.

# КОЛЕКТИВНА ПОВЕДІНКА БІЛКІВ

Хоча основний інтерес до білків виникає внаслідок їх індивідуальних властивостей, зокрема три-вимірної структури і процесу згортання в цю структуру, існують явища в яких беруть участь велика кількість білків. Це в першу чергу явище агрегації, котре вимагає щоб білок розгорнувся, або частково розгорнувся, перед тим як утворити агрегат. Але також існують колективні процеси в яких беруть участь білки в природному стані. В цьому розділі ми приводимо дослідження двох таких процесів, для яких запроваджуємо відповідний теоретичний опис.

Спочатку, ми розглядаємо проблему фазового розшарування в водних розчинах білка лізоциму. Розуміння того, як метастабільна рідинна фаза спонтанно виникає з розрідженої газоподібної фази при охолодженні, є важливим в багатьох областях наукових досліджень. Не вдаючись до жодних наближень, ми знаходимо форму міжмолекулярного потенціалу для розчину лізоциму безпосередньо з експериментального структурного фактору. Далі, ми показуємо що для коректного опису фазової рівноваги та структурних властивостей цей білок повинен бути змодельований м'якою, несферичною частинкою.

В подальшому ми вивчаємо процес утворення рівноважних кластерів в білках. Попередньо встановлено, що білкові кластери, а також, більш загально, кластери в колоїдних розчинах, виникають в системах що взаємодіють через два типи потенціалів, SALR та HCSS. Перший потенціал має короткосяжну притягальну частину (short-range attraction, SA) та далекосяжну відштовхувальну частину (long-range repulsion, LR). Другий потенціал має тверде ядро (hard core, HC) та м'яке плече (soft shoulder, SS). За допомогою комп'ютерних симуляцій ми показуємо, що потенціал, який не належить до жодного з цих класів, також може приводити до утворення рівноважних кластерів. Ми розглядаємо потенціали, в яких замість глобального мінімуму, як у схемі SALR, є локальний мінімум з додатною енергією, який відокремлений скінченним бар'єром від станів на далеких відстанях, що мають нульову енергію. Однак, на відміну від схеми SALR, потенціали з локальними притягальними мінімумами й далекосяжним відштовхуванням (LALR), не мають ентальпійного механізму асоціації частинок. Модель LALR, як і потенціал HCSS, має глобальний відштовхувальний характер і м'яке плече. Експериментально такі потенціали можуть виникати в результаті неповної компенсації притягального та відштовхувального членів. Потенціали з локальними мінімумами мало вивчені. Батен та інші [252] встановили, що такі потенціали мають унікальні конфігурації основного стану, зокрема кристали з граткою кагоме та шестикутною граткою, а також стрічкові кристали. Ліу та інші [253] досліджували конфігурації основного стану для систем LALR на площині. Однак, жодна з цих робіт не розглядає утворення кластерів. Порівняльний аналіз кластерів, утворених в усіх трьох схемах – LALR, SALR і HCSS – показує, що LALR є містком між двома іншими. Як і в моделі HCCS, потенціали LARL приводять до утворення кластерів за допомогою ентропійного механізму, однак лише за низької загальної густини системи й лише для невеликих кластерів. Зі зростанням густини в системі LALR, як і в її аналозі SALR, виникають кластери великих розмірів за допомогою ентропійного механізму. Подвійна природа моделі LARL проявляється і в її температурній поведінці. Малі кластери в такій системі стабілізуються температурою, як і в моделі HCSS, проте більші кластери - дестабілізуються, як і в моделі SALR.

# 2.1. Дослідження білка лізоциму

# 2.1.1. Структурні функції сферичної моделі

Структурний фактор, отриманий в експериментах SANS з розчинами лізоциму при pH= 6, температурі 298 К та чисельній густині білка  $\rho = 4.2 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-3}$  (концентрація 100 мг / мл) [5], зображений на Рис. 2.1. Як відомо [56], *s*(*k*) має один

 $k = 0.25 \text{\AA}^{-1}$ максимум при швидко зростає при малих знахвильового ченнях вектора. Відповідна парна функція розподілу g(r), яка генерується інверсним перетворенням Фур'є, показана у вставці на Рис. 2.1. Виділяються два явних максимуми: один – при  $r=32\text{\AA}$ , інший – при r=60Å, що відповідає розташуванню сусідніх частинок першої та другої координаційних сфер. Достатньо високий перший максимум дозробити припущення зволяє щодо існування в системі тен-



Рис. 2.1 Структурні функції розчину лізоциму при рН=6 та температурі Т=298К. Основний графік відображає статичний структурний фактор: символи – експериментальні дані, суцільна лінія – результати моделювання МД сферичної S-моделі, пунктирна лінія – те саме для несферичної NS-моделі. У вставці відображені відповідні парні функції розподілу.

денції до самоасоціації. Менші максимуми вважаються артефактами експериментальних досліджень.

Взаємодії між білками чисельно описуються ефективним потенціалом білокбілок  $v^{s}(r)$ . Виходячи з теореми унікальності [254],  $v^{s}(r)$ , можна обчислити безпосередньо з g(r) на основі ряду числових алгоритмів [255; 256; 257; 258], кожен з яких відповідає загальній схемі інверсії Больцмана [34; 259]. У цій роботі ми використали ітераційний алгоритм [255; 256; 258]:

$$v_{l+1}^{s}(r) = v_{l}^{s}(r) - \lambda_{l}k_{B}T\log\left[\frac{g_{R}(r)}{g_{l}(r)}\right]$$
(2.1)

де  $v_l^s(r)$  - це потенціал на етапі 1,  $g_l(r)$  - відповідна парна функція розподілу, а  $g_R(r)$  - експериментальна базова функція розподілу. Тут  $k_B$  - константа Больцмана, T температура, а параметр  $\lambda_l$  застосовується для досягнення бажаної швидкості збіжності. Слід зауважити, що збіжність наступає, коли  $g_l(r) = g_R(r)$  тобто  $v_{l+1}^s(r) = v_l^s(r)$ . Послідовні значення  $g_l(r)$  були обчислені з допомогою молекулярної динаміки (МД). Обрізання потенціалу



Рис. 2.2 Ефективна взаємодія білок-білок, виведена для сферичної моделі лізоциму. На вставці в логарифмічному масштабі зображена короткодіюча частина потенціалу, зміщеного в першому мінімумі. Лінія на вставці відображає нахил 6.6.

проводилось на відстані 250Å, що вважається достатнім аби уникнути артефактів. Інші параметри моделювання є такими ж, як описано в наступній роботі[34].

Узгодження між експериментальною  $g_R(r)$  та g(r), отриманою у моделюванні МД, можна оцінити з Рис. 2.1. Ці два набори даних, в масштабі рисунка, розділити неможливо. Те саме стосується і порівняння експериментальних та теоретичних S(k), зображених на основному рисунку. Отриманий ефективний потенціал показаний на Рис. 2.2. Він має форму, що характерна для DLVO-моделей [56], та складається з основного мінімуму при r = 32 Å, який, швидше за все, виникає внаслідок конкуренції між відштовхувальними та притягальними взаємодіями, та ряду побічних менших мінімумів та максимумів. Несподівана поведінка спостерігається на коротких відстанях. Вставка на Рис. 2.2 показує потенціал, зміщений до свого першого мінімуму на логарифмічній шкалі. Очікувано, потенціал має степеневу залежність  $\sim 1/r^n$ , але спостережуваний нахил n=6.6 суттєво відрізняється від усіх інших досліджень, що робились для лізоциму раніше.
Нахил є пологішим, ніж нескінченність - формальний нахил моделі DLVO - що зрозуміло з огляду на характер моделі. Але він також набагато пологіший ніж показники в інших моделях лізоциму [260]. Навіть класичний потенціал Леннард-Джонса, який типово використовується для опису інертних газів, має значно сильніший нахил – 12. З іншого боку, м'який потенціал лізоциму є в одному ряду зі спостережуваними м'якими взаємодіями в полімерних розплавах [261], де полімери мають можливість проникати один в одного. Такий самий механізм може реалізовуватись і в білках. Дійсно, білки є біологічними полімерами, що мають здатність змінювати свої конформації як у згорнутому, так і в розгорнутому стані. На близьких відстанях такі зміни обмежені виключеним об'ємом, що призводить до ентропійного (а, отже, м'якого) відштовхування. Таким чином, м'якість, як випливає з аналізу, є наслідком полімерного характеру білка. Специфіку м'якого відштовхування визначають і природа білка, і його середовище.

# 2.1.2. Фазова поведінка

Потенціал, зображений на Рис. 2.2, був використаний для побудови фазової діаграми лізоциму за допомогою моделювання Монте-Карло методом ансамблю Гіббса [262]. Результати моделювання продемонстровані на Рис. 2.4, де символи – це густини співіснування газоподібних та рідкоподібних фаз, отримані з функції розподілу густин для певних температур, а лінії представляють екстраполяції, отримані з даних моделювання на основі правила прямолінійного діаметру [262; 263].

Для порівняння ми також наводимо експериментальні дані Таратути *et al* для pH=6 [264], які були отримані в умовах, що дуже близькі до тих, в яких проводилось дослідження структурного фактора [5]. Узгодженість між теорією та експериментом є дуже слабкою. Теоретичні параметри критичної точки  $\rho_c =$ 527mg/ml та  $T_c = 375$ K є далекими від значень, отриманих експериментально [264]:  $\rho_c = 230$ mg/ml та  $T_c = 273$ K. Було проведено ряд тестів, щоб виключити вплив технічних помилок на фазову діаграму. Зокрема, ми змогли встановити, що ані а) відстань обрізання 55Å, що використовувалась в моделюванні GEMC, ані b) наявність бар'єру, який відокремлює перший мінімум потенціалу від інших відстаней, ані c) величина обрізання хвильового вектора  $k_{max}$ , застосо-



**Рис. 2.3** Форма несферичної моделі лізоциму. Порівняння потенціалів взаємодії несферичної та сферичної моделей при *L*=18 Å.

вана при обчисленні g(r) з експериментального структурного фактора, не є джерелами розбіжності між теорією та моделюванням. Результати цих тестів вказують на те, що необхідно вдосконалити базову гіпотезу сферичної симетрії потенціалу взаємодії для більш адекватного опису як структури, так і фазової поведінки реальних розчинів лізоциму (для розчину та термодинамічних умов, досліджених у даній роботі). Цей висновок узгоджується з думками, висловленими в попередніх дослідженнях таких самих [265; 266; 267] та подібних білків [268].

# 2.1.3. Побудова несферичної моделі

Сферична модель характеризується 3 ступенями вільності на один білок. Наступна по складності модель містить 5 ступенів і являє собою несферичний (анізотропний) об'єкт. Ми розробили таку модель, трактуючи додаткові ступені вільності в термінах вузлів взаємодії, а не кутів повороту [58; 59; 267], оскільки цей підхід є простішим у реалізації. Іншими вимогами було, що модель повинна: а) містити якнайменше нових параметрів, бажано лише один, б) відтворювати експериментальну структуру і в) зберігати м'якість потенціалу взаємодії. Модель, що відповідає цим критеріям показана на Рис. 2.3 і надалі називатиметься

несферичною (NS). Вона складається з трьох вузлів взаємодії, що знаходяться на відстані L один від одного. Фіксована відстань між вузлами дозволяє усунути один ступінь вільності. Ці додаткові вузли взаємодіють через такий самий відштовхувальний м'який потенціал, як і центри в сферичній моделі. Взаємодія між центральними вузлами є притягальною, її параметри отримуються з експериментальної g(r). Попарну енергію взаємодії несферичних колоїдів можна записати у такому вигляді:  $v(r) = \frac{1}{9} \sum_{i,i=1}^{3} v^r(r_{ij}) + v^{ns}(r)$ , де  $r_{ij}$ - це відстань між вузлом взаємодії *і* першого колоїду та вузлом взаємодії *ј* другого колоїду, *г* - це відстань між центрами частинок, а потенціал v<sup>ns</sup>(r) отримується з (2.1) так само як це було зроблено для потенціалу сферичної моделі v<sup>s</sup>(r). Відштовхувальна частина потенціалу  $v^{r}(r)$  була 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 було отримано вираз  $v^{r}(r) = \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{n}$ , де  $\sigma = 26$ Å та n = 6.6. Легко бачити, що v(r) прямує до  $v^{s}(r)$ в границі  $L \to 0$ , так що модель, яку вона представляє, є узагальненням сферичної моделі на випадок несферичної форми. Єдиним вільним параметром у моделі є L. Рис. 2.3 демонструє порівняння  $v^{ns}(r)$  та  $v^{s}(r)$  при L=18Å. Модель NS має глибшу яму потенціальної енергії завдяки відмінностям у геометрії порівняно з S-моделлю. Структурні функції моделі NS, зображені на Рис. 2.1, так само як і S-моделі, добре узгоджуються з експериментом.

Фазова діаграма несферичної моделі була проаналізована як функція *L*. Отримані параметри критичної точки  $\rho_c$  та  $T_c$  поступово зменшувались з ростом *L*: температура знижувалась від 348К при *L*=7Å до 249К при *L*=22Å, тоді як густина спадала від  $\rho_c = 456$  mg/ml до 246 mg/ml. Найкраща відповідність з експериментом досягається при *L* = 18Å, для якого  $T_c = 272$ K. Відповідна фазова діаграма зображена на Рис. 2.4.

Очевидно, що нова модель суттєво покращує діаграму в порівнянні зі сферичним представленням. Суттєвий вплив несферичної форми на фазову діаграму може бути пояснений наявністю в білках двох характерних радіусів. Під час парних зіткнень, що домінують в конфігураційній статистиці при низькій густині (газова фаза), білки здатні наближатися один до одно-



Рис. 2.4 Фазова діаграма розчину лізоциму при pH=6. Показані експериментальні дані, а також результати сферичної та несферичної моделей з L = 18Å. Несферична модель демонструє суттєве покращення кривої співіснування

го на найкоротші, дозволені формою, відстані  $R_g$ . З іншого боку, при великих густинах (рідинна фаза) білки більше перебувають в багатомолекулярних конфігураціях або кластерах. Оскільки кожній окремій молекулі слід дозволити вільно обертатися в таких кластерах, його характерний розмір повинен визначатися найдовшою, дозволеною формою молекули, відстанню  $R_l$ . Оскільки  $R_l > R_g$ , густина упаковки рідких кластерів утворених несферичними частинками буде нижчою, ніж у кластерах зі сферичних частинок. Цей механізм пояснює спостережуване зменшення критичної густини в несферичній моделі. Несферична форма узгоджується з кристалографічною структурою лізоциму, доступною в PDB банку PDB ID 1LYZ [269].

# 2.2. Рівноважні білкові кластери

# 2.2.1. Всі вивчені моделі утворюють рівноважні кластери

Різні моделі систем що утворюють кластери вивчалися в комп'ютерному моделюванні, про що детально описано в розділі «Методи». Щоб кількісно описати процес утворення кластерів, усі конформації збережені в симуляціях були кластеризовані. Було використано стандартний алгоритм кластеризації, який присвоює частинку заданому кластеру, якщо його відстань від будь-якої іншої частинки в кластері менше, ніж радіус обрізання  $R_c$ . В якості радіуса обрізання було використано діаметр м'якого плеча  $\sigma_A$ .

Було встановлено, що усі досліджувані системи утворюють рівноважні кластери при відповідній густині та температурі. На Рис. 2.5(а) показано P(s), співвідношення частинок, що беруть участь у кластерах розмірів *s*, до загальної кількості частинок у комірці симуляції, що спостерігається для моделі HCSS при температурі T = 0.62. При низькій густині  $\rho = 0.17$  (показано в одиницях  $\sigma_A^{-3}$ ), більшість частинок є мономерами. Коли густина збільшується, частка мономерів зменшується на користь димерів, тримерів та інших мультимерів. При  $0.34 < \rho < 0.6$  популяція мономерів опускається нижче 0.5, після чого в системі домінують кластери.

Кластеризація продовжується для більш високих густин і при  $\rho = 1.01$  кількість мономерів стає меншою, ніж кількість частинок, що утворюють димери. При ще більших густинах,  $\rho > 1.35$ , система проходить перколяційний перехід, після якого залишається лише один кластер, що охоплює всю комірку моделювання. Рис. 2.5 (б) показує P(s), отриманий для різних систем при густині трохи нижче порогу перколяції. Спільним в цих кривих є те, що всі вони демонструють, що кластери становлять найбільш заселену компоненту розчину. Проте є й специфічні особливості. По-перше, системи SALR демонструють сильне тяжіння до розміру кластера ~10 мономерів. Всі інші системи заповнюють широкий спектр розмірів з невеликим популяційним максимумом для димерів і тримерів. По-друге, в межі великих *s*, дані з моделювання HCSS демонструють чітку залежність масштабування,  $P(s) \sim 1/s^n$ . Спостережуваний показник n = 1.2 добре



**Рис. 2.5** Кількість частинок, що спостерігаються в кластерах певного типу, по відношенню до загальної кількості частинок у комірці моделювання. Показано: а) дані для моделі LALR для вибраних густин, б) дані для всіх моделей, кожна з яких розглядалась при густині, що вказана в дужках. Всі дані було отримано при зниженій температурі T = 0.62.

узгоджується з передбаченням моделі довільної перколяційної межі[91] (зверніть увагу, що звична функція розподілу кластерів n(s) пов'язана з функцією розподілу, що використовувалася P(s) як  $n(s) \sim P(s)/s$ ). У всіх інших системах P(s) спадає швидше ніж степенева залежність.

# 2.2.2. Статистика кластерів суттєво залежить від типу потенціалу

Всі вивчені системи заселяють кластери, які відрізняються за розміром і формою. Радіус гірації  $R_g(s)$  використовується для характеристики того, як розмір кластера залежить від кількості частинок, які він містить.

Найбільш цікава залежність спостерігається для потенціалу SALR. На Рис. 2.6 показано  $R_g(s)$  для цієї моделі, отриманої для кількох значень густини розчину  $\rho$ . При низьких густинах радіус гірації є монотонною функцією кількості частинок. Починаючи з  $\rho$ =0.68, в кривій 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, одразу

після нього, показані на Рис. 2.6(а). Малі або первинні кластери утворюють щільні і майже сферичні скупчення частинок. Більші кластери складаються з двох (або більше) таких комбінацій. Отже, утворення кластерів керується принципом ієрархічної будови: малі кластери збираються на початкових етапах, і надалі служать будівельними блоками для більших кластерів. Цей сценарій пояснює раптове збільшення  $R_g(s)$  при певному перехідному значенні  $s_c$ .



**Рис. 2.6** Радіус гірації  $R_g$  як функція кількості частинок. Дані для SALR показано на (а). Всі потенціали з відповідними густинами показано на (b).

Незвична статистика кластерів може бути пояснена з точки зору рівноважної термодинаміки. Спільно з іншими потенціалами, SALR [270] [271], конфігурація основного стану (GS) поточної моделі являє собою 1D спіраль Бернала. Енергія спіралі - це монотонно спадаюча функція s, яка продовжує зменшуватися, поки всі доступні мономери не абсорбуються на кластері. При нульовій і досить малій температурах, спіраль є єдиною спостережуваною конформацією. Однак при скінченних температурах, ця картина різко змінюється. Ентропія мономерів, втрачена під час збірки, стає важливою. Найменша вільна енергія досягається за допомогою комбінації як ентальпії так і ентропії. Баланс між ентальпійним та ентропійним вкладами визначає розміри первинного кластеру  $s_c$ . Втрата енергії внаслідок руйнування основного стану компенсується підсиленням ентропії, що виникає в результаті трансляційної свободи кластерів, що утворюються. Коли

густина розчину зростає (об'єм зменшується), вплив ентропійного вкладу зменшується. Таким чином виникатиме пов'язана з цим втрата енергії. Як наслідок, конформація GS буде розламуватися на меншу кількість шматочків. Це означає, що розмір первинного кластера повинен зростати з густиною. Саме така поведінка і спостерігається, як видно з Рис. 2.6 (а), якщо порівнювати  $R_g(s)$  для  $\rho = 0.68$  та 1.01.

Всі інші системи теж можна описати як полідисперсні суміші кластерів різних розмірів і форм. Як і у випадку SALR, для них розмір кластерів зменшується із збільшенням густини, але цей ефект значно менше виражений. Ніякої нової і нетривіальної поведінки не спостерігається. Детальне порівняння  $R_g(s)$ , отриманих для різних систем (розглянутих при тій же густині, як на Рис. 2.5 (b)) наведено на Рис. 2.6(b). Тут знову можна побачити плато у кривій SALR. Крім того, можна розрізнити статистику масштабування для великих кластерів. У цій межі радіус гірації має ступеневу залежність  $R_q(s) \sim s^n$  з n = 0.46, що не залежить від густини. Цей показник близький до n = 0.5, який спостерігається для ідеальних або гаусових полімерних ланцюгів, у яких відсутні об'ємні взаємодії. На перший погляд здається незрозумілим як механізм гаусових моделей може стосуватися збірки великих колоїдних кластерів. Адже колоїди що в них містяться є непроникними. Проте, для кластерів здатність "проникати" один крізь одного може реалізуватися шляхом обміну частинками. Зі статистичної точки зору, цей механізм нічим не відрізняється від взаємного фізичного проникнення частинок. З цієї ж причини кластери не відчувають стиснення з навколишнього середовища, як HCSS, і залишаються набряклими порівняно з максимально компактними станами.

Статистика інших систем у межах великого кластера задається показником n = 0.33, що відповідає максимально компактному об'єкту. Ілюстрація цієї залежності показана на Рис. 2.6(б) для потенціалу HCSS. Для тієї ж системи в ме-

жах малих s, радіус гірації виражається як  $R_g \sim s^m$ , де m = 1.13. Зауважимо, що для лінійного розташування найменших кластерів, димера та тримера, показник *m* = 1.2. Тому, HCSS веде себе як лінійний ланцюг при малих значеннях *s*. Це узгоджується з попередньою роботою для цієї системи[91], що також показує лінійне масштабування кластерів для певного набору параметрів потенціалу (відмінних від характеристик даної роботи). 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 щільного ланцюга для великих кластерів. Перехід відбувається поступово і в два етапи. Ця поведінка суттєво відрізняється від моделі SALR і може бути пояснена специфікою взаємодії HCSS. Незважаючи на те, що формування кластерів в цій моделі ґрунтується на дії ентропії (див. нижче), форма різних кластерів, що містять ту саму кількість частинок, також задається ентальпією. Оскільки взаємодія суто відштовхувальна, то частинки всередині кластера будуть вибирати положення якнайдалі один від одного, що приводить до лінійних конформацій малих кластерів, які мінімізують перекриття.

Для більших кластерів, мінімальне перекриття може бути досягнуте в гнучких струнноподібних конформаціях, аналогічно тим, що спостерігаються в самообхідних полімерах. Як і в полімерах, колоїдні кластери повинні проходити через ентропійний колапс з відповідним показником радіуса гірації m = 0.591 або приблизно 3/5, як це передбачено в теорії Флорі[272]. Той факт, що спостерігається нижчий показник, 0.33, свідчить про те, що великі кластери відчувають додаткове стиснення з навколишнього середовища, що може бути результатом лише відштовхування від інших компонентів розчину, як кластерів, так і мономерів. Ці теоретичні аргументи приводять нас до висновку, що специфіка перекриття залежить від: а) степеня м'якого плеча в потенціалі, який визначає, як сильно енергія лінійних ланцюгів росте в порівнянні з компактними ланцюгами, і б) си



Рис. 2.7 Ентальпія,  $\Delta H(x)$ , і ентропія,  $-T\Delta S(x)$ , як функція від частки мономерних частинок, отриманих в даній дисертації для різних кластерформуючих потенціалів. Всі моделі, крім SALR, демонструють кластери сформовані завдяки ентропійним вкладам. Тут, і в інших частинах дисертації, енергія вимірюється в одиницях  $\varepsilon_h$ 

ла відштовхування, яка визначає, наскільки сильно різні колоїдні види відштовхують один одного, викликаючи цим стиснення кластеру.

2.2.3. Два класи кластер-формуючих систем використовують різні механізми утворення кластерів

Наші симуляції чітко вказують, що всі вивчені системи утворюють рівноважні кластери. З огляду на це виникають наступні запитання: "Чому це відбувається? Якими є відповідні механізми?".

Мабуть найпростішим для пояснення є механізм моделі SALR. За конструкцією цей потенціал сприяє асоціації часток, забезпечуючи негативну потенційну енергію конфігураціям, в яких частинки знаходяться близько одна від одної. Відомі конфігурації основного стану різних потенціалів SALR [10; 270], в тому числі і тих, що вивчені тут, які представлені кластерами різної топології. Очікується, що збірка кластерів для цих систем керується ентальпією. Для кількісної оцінки цієї гіпотези є сенс проаналізувати профіль вільної енергії реакції кластеризації, як функцію певного параметру порядку. Оскільки нас цікавить перехід у кластерний стан взагалі, а не в стан певного типу кластерів, то найбільш зручно використовувати кількість частинок в мономерному стані в якості змінної прогресу. Щоб зробити порівняння між системами різних розмірів більш зрозумілим, потрібно щоб кількість мономерів була нормалізована до загальної кількості частинок в системі, тобто розглянути частку мономерів 0 < x < 1.

Конфігурації, що не містять жодного кластера мають x = 1, а ті, що не мають мономерів (повна трансформація в кластери), характеризуються значенням x =0. Конфігурації, збережені в симуляціях, можуть бути використані для побудови розподілу P(x), та інших термодинамічних параметрів, як функції густини. Функція розподілу визначає профіль вільної енергії  $\Delta G(x) = -k_b T log(P(x))$ , де  $k_b$ - константа Больцмана, а T - температура, яка має мінімальне значення при найбільш ймовірному значенні x. Цінність функції  $\Delta G(x)$  полягає в тому, що її можна використати для розрахунку різниці вільної енергії між конформаціями з двома різними значеннями параметра x. Наприклад,  $\Delta G(0) - \Delta G(1)$  відповідає вільній енергії, яку потрібно затратити в заданій термодинамічній точці, щоб перетворити систему в повністю мономерному стані у кластери. Вільну енергію можна розкласти на ентальпійні та ентропійні вклади, використовуючи стандартне термодинамічне співвідношення  $\Delta G(x) = \Delta H(x) - T\Delta S(x)$ . Невизначені функції  $\Delta H(x)$  і  $-T\Delta S(x)$  можна отримати, якщо температурна залежність  $\Delta G(x)$  є відомою. Спершу чисельна диференціація  $\Delta G(x)$  може дати  $-T\Delta S(x)$  (ігноруючи залежність ентропії від температури), а потім ентропія та вільна енергія можуть бути об'єднані для отримання ентальпії. Цей метод широко використовується в літературі для моніторингу прогресу різних біохімічних реакцій (див. наприклад [273] та посилання в цій роботі).

На Рис. 2.7(а) показані  $\Delta H(x)$  та  $-T\Delta S(x)$ , отримані для моделі SALR при  $\rho = 0.68$ . Як і передбачалося вище, утворення кластерів підтримується ентальпією та стримується ентропією. Обидві криві мають мінімум вільної енергії приблизно при x = 0.015.

Аналогічний аналіз проводився і для потенціалу HCSS. Звернемо увагу, що ця модель в 2D з урахуванням відповідного вибору параметрів утворює впорядковані конфігурації в основних та низькоенергетичних станах [274] та квазікристали [98]. Тому можна очікувати, що рештки впорядкованих структур виживуть при скінченній температурі, породжуючи кластери, стабілізовані ентальпією [94]. Рис. 2.7(б), що зображує  $\Delta H(x)$  і  $-T\Delta S(x)$ , показує, що це очікування не є виправданим. Кластери повністю стабілізуються ентропією і дестабілізуються ентальпією. Дві системи, SALR і HCSS, суттєво відрізняються за механізмом формування кластерів. Хоча кластери в SALR, як правило, збираються завдяки взаємному притяганню між колоїдами, кластери в моделі HCSS стають стабільними за допомогою іншого механізму. Частинки на відстанях м'якого плеча  $\sigma_H < r < \sigma_A$  не зазнають жодної сили і тому вільно рухаються один відносно одного. Частинки в мономерному стані також не зазнають сили, оскільки потенціал дорівнює нулю при  $r > \sigma_A$ . Причина чому кластери залишаються разом, в тому що об'єм, утворений об'єднанням плечових областей всіх частинок що утворюють кластери, більший, ніж об'єм доступний частинкам у мономерному стані (на відстані  $r > \sigma_A$  від будь-якого іншого мономеру чи кластеру). Це пояснення проілюстровано на Рис. 2.8. Для мономерної частинки, приєднання до існуючого кластера супроводжується збільшенням енергії, а також збільшенням ентропії. Поки переважає ентропійний внесок, частинки існують в кластерних конфігураціях. Зауважимо, що ці кластери матимуть дуже короткий час життя.

Також вони швидко розпадуться у випадку збільшення доступного об'єму, а тому й ентропії мономерного стану.

Формування кластерів в моделях HCRL і LASS керується тими самими механізмами, що і в моделі HCSS. Додавання відштовхування до потенціалу, як і в HCLR, змінює вигляд  $-T\Delta S(x)$ : при малих значеннях x починається протидія кластерам, див. Рис. 2.7(d). Проте, дестабілізуючий вплив ентальпії не суттєвий. Додатковий мінімум на м'якому плечі, як і в LASS, знижує дестабілізуючий ефект ентальпії, що видно з порівняння Рис. 2.7(с) та (b), але не на стільки щоб змінити свою роль. Утворення кластерів в обох системах визначається ентропією.

# 2.2.4. Модель з локальним мінімумом демонструє подвійну ідентичність

Модель з локальним мінімумом і відштовхувальним хвостом виділяється серед



Рис. 2.8 Ілюстрація того, як ентропія стабілізує кластери в моделі HCSS. Центральна мономерна частинка, позначена чорним колом, має наступні варіанти поведінки: а) залишатися мономером; в цьому випадку дозволяється переміщатися в просторі забарвленому в білий колір, або б) приєднатися до кластера; в цьому випадку дозволяється переміщатися в світло-сірому просторі. Темно-сірий простір недоступний частинці. Кластери стають стабільними, коли об'єм області світло-сірого кольору переважає об'єм білої області.

інших досліджених систем. На Рис. 2.9 показані ентальпія та ентропія, які оцінюються при двох різних густинах, ρ=0.34 та ρ=0.68. При меншій густині бачимо механізм, як і в системі HCSS, в якому ентропія стабілізує кластери. Для більшої густини механізм змінюється і стає подібним до потенціалу SALR, де основний внесок в збірку кластерів має ентальпія. Трансформація не є повною, оскільки ентропія все-таки сприяє кластерам з високою густиною, а не протидіє їм, як у потенціалі SALR. Тим не менше, зміна ролі ентальпії досить помітна. Ця властивість не спостерігається в будь-якому іншому потенціалі, вказуючи на те, що процес утворення кластерів в системах, що взаємодіють через потенціал з локальними мінімумами, може бути надзвичайно складним. В таких системах вимагається присутність як мономерів так і малих класте-



**Рис. 2.9** Такий як і **Рис. 2.7**, але для потенціалу з локальним мінімумом і відштовхувальним хвостом, LALR. Присутні механізми утворення кластерів як ентропії, так і ентальпії, в залежності від загальної густини розчину.

рів для того, щоб кластеризація визначалася ентальпією. Будь-яка теорія для кількісного прогнозування розподілу кластерів, повинна вміти описати цей ефект.

Це означає, що потрібен кількісно вірний опис суміші мономерів/кластерів, включаючи баланс асоціації/ дисоціації, у широкому діапазоні густин. Незрозуміло котра з теорій рідкого стану, що доступні на даний час, зможе виконати це завдання.

Роздвоєна ідентичність моделі LARL також проявляється в її температурній поведінці. Оскільки збирання кластерів для потенціалу HCSS є ентропійним за своєю природою, воно має підсилюватися з температурою. І навпаки, для моделі SALR – кластери повинні ставати менш стабільними при підвищенні температури.

Рис. 2.10, що показує частку мономерів як функцію температури та густини для різних моделей, підтверджує цю гіпотезу. Різні символи на цьому малюнку представляють різні системи, червоні лінії відповідають високій температурі 0.62, а чорні лінії - низькій температурі 0.21. Для моделі HCSS популяція мономерів при нижчій температурі є вищою ніж при вищій температурі - чорна лінія над червоною лінією - при всіх густинах, що вказує на те, що утворення кластерів підсилюється з ростом температури. Для моделі SALR навпаки, червона лінія знаходиться над чорною лінією, що свідчить про те, що температура заважає утворенню кластерів. Для потенціалу LARL червона лінія знаходиться над чорною лінією для  $\rho < 0.68$  і навпаки - для більш високих густин. Таким чином, ця модель демонструє особливості, характерні для обох класів кластерних колоїдів. Механізм керований ентропією, домінує при низьких густинах, тоді як механізм ентальпії - при високих.



Рис. 2.10 Частка мономерів у конформаційному ансамблі, отриманих для різних моделей, температур і густин. Кластери HCSS дестабілізуються з підвищенням температури. Кластери SALR стабілізуються з підвищенням температури, тоді як кластери LARL виявляють обидві властивості залежно від густини.



**Рис. 2.11** Схематичне зображення потенціалу, розглянутого в цій роботі. Залежно від вибору параметрів можна вивчати різні типи систем м'якої речовини. П'ять конкретних потенціалів, що детально досліджені, показані як піктограмами.

#### 2.2.5. Методи та моделі

У роботі розглянуто наступну модель потенціалу:

$$v(r) = \begin{cases} +\infty, & r < \sigma_{H} \\ -ar + b + \varepsilon_{w}, & \sigma_{H} < r < \frac{\sigma_{H} + \sigma}{2} \\ ar - b + \varepsilon_{w}, & \frac{\sigma_{H} + \sigma_{A}}{2} < r < \sigma \\ \varepsilon_{b} \sigma_{A} \frac{e^{-\kappa(r - \sigma_{A})}}{r}, & \sigma_{A} < r \end{cases} \qquad a = \frac{2\delta\varepsilon}{\sigma_{A} - \sigma_{H}}$$
(2.2)

Форма потенціалу визначається набором з шести основних параметрів:  $\sigma_{H}$ ,  $\sigma_{A}$ ,  $\varepsilon_{w}$ ,  $\varepsilon_{b}$ ,  $\delta\varepsilon$  та  $\kappa$ . При  $r = \sigma_{H}$  розміщена жорстка стінка. В короткосяжній частині потенціалу (SA) знаходиться мінімум (локальний або глобальний), що простягається від  $\sigma_{H}$  до  $\sigma_{A}$ . Мінімум має трикутну форму. Його значення задається параметром  $\varepsilon_{w}$ , тоді як глибина -  $\delta\varepsilon$ . Далекосяжна частина (LR), що визначається відстанями більшими за  $\sigma_{A}$ , або відсутня або дається потенціалом Юкави, що характеризується зворотною довжиною затухання  $\kappa$ . Частини SA та LR зустрічаються при  $r = \sigma_{A}$  де енергія є  $\varepsilon_{b}$ . Схема потенціал, отриманий нашою групою для водних розчинів лізоциму (дані не опубліковані).

Залежно від вибору параметрів, потенціал може представляти ряд систем м'якої речовини. Ми використовуємо  $\sigma_A$  як одиницю відстаней і  $\varepsilon_b$  як одиницю енергії. Діаметр твердого ядра встановлений на рівні  $\sigma_H = \frac{1}{3}\sigma_A$ . Інші три параметри варіюються так, щоб досягти наступних п'яти представницьких форм: 1) потенціал типу тверде ядро, м'яке плече (HCSS), що раніше широко вивчався в 2- та 3-вимірному просторі [93; 275] [90; 91; 94]; 2) потенціал твердого ядра та далекосяжного відштовхування (HCLR), який, наскільки нам відомо, ще не вивчено в цій специфічній формі, проте схожі потенціали розглядалися в минулому [92] [271]; 3) потенціал притягання на коротких відстанях та відштовхування на довгих (SALR), який теж широко вивчався, але в іншій формі [271] [10; 276]; 4) потенціал локального притягання та м'якого плеча (LASS), який має мінімум але не дальній хвіст, 5) потенціал локального притягання та відштовхування на дальніх відстанях (LALR). Останні два потенціали в цій дисертації розглядаються вперше. Стислий виклад усіх використаних параметрів показано в Таб. 2.1.

Усі системи вивчались використовуючи стандартний метод «Монте-Карло» (Metropolis Monte Carlo (MC)) [145]. Для

Модель	${\cal E}_{_W}$	δε	K
HCSS	1	0	
HCLR	1	0	4.05
LASS	0.525	0.475	
LALR	0.525	0.475	4.05
SALR	-0.475	0.475	4.05

**Таб. 2.1** Параметри п'яти моделей, які вивчалися в даній роботі. Всі енергії вимірюються в одиницях  $\varepsilon_b$  і всі відстані – в одиницях  $\sigma_A$ . Скорочення такі ж як і в основному тексті.

швидкого сканування в фазовому просторі, розглядалися симуляційні комірки з 216 частинками при 6 значеннях загальної густини. Густини коливалися в межах від 0.17 до 1.69 у скорочених одиницях. Досліджено низку температур, в залежності від потреб кожної системи, що обговорюється в основному тексті. Температура вимірюється в одиницях  $\varepsilon_b/k_b$ , де  $k_b$  – стала Больцмана. У потенціалах з хвостами, HCLR, LALR та SALR використовувалася відстань обрізання  $r_c = 2\sigma_A$ . Було виконано тести для довших  $r_c$ , щоб переконатися, що цей параметр не впливає на отримані результати. Крім того, для вибраних термодинамічних точок, додатково було проведено симуляцію з більшими комірками, що містять 5832 частинок, для оцінки статистичних даних кластерів. Максимальне переміщення частинок у рухах МС було налаштовано так, щоб кількість успішних кроків сягала 30% від загальної кількості.

#### 2.3. Висновки розділу

Показано, що проблема розрахунку фазових діаграм білкових розчинів зустрічається з несподіваними викликами. Потенціали міжбілкової взаємодії, отримані з експериментальної структури розчину, дають незадовільну фазову поведінку. Значення критичної густини та температури, отримані з їх допомогою, перевищують експериментальні відповідники принаймні вдвічі. Щоб усунути ці розбіжності запропоновано несферичну модель білка, яка є більш складною та має більше ступенів вільності, ніж сферична модель. З відповідним вибором потенціалів показано, що і структура, і фазова діаграма розчину білка лізоциму можуть бути правильно відтворені.

Встановлено, що існує третій тип систем, здатних утворювати рівноважні кластери, крім вже раніше відомих. Два інших типи це: а) системи, що взаємодіють через потенціал з глобальним мінімумом та відштовхувальним хвостом (SALR) та b) системи, що взаємодіють через відштовхувальний потенціал, який може мати різну форму, наприклад, форму сходинки (HCSS). У новому типі частинки взаємодіють через глобально відштовхувальний потенціал, який має локальний мінімум на коротких відстанях (LALR). При малих густинах такі системи утворюють кластери, подібні до кластерів HCSS. При великих густинах – до кластерів систем SALR. Таким чином нова система слугує містком між іншими двома випадками. Детально охарактеризовано термодинаміку утворення кластерів, що включало отримання ентальпійних та ентропійних внесків до вільної енергії.

#### РОЗДІЛ 3.

# ЗГОРТАННЯ БІЛКІВ ЗА ПОСЕРЕДНИЦТВА ШАПЕРОНІВ

В цьому розділі розглянуто проблему згортання білків за допомогою молекулярних шаперонів. Акцент зроблено на вивченні впливу просторового обмеження на згортання білків. Запроваджено модель, яка є найбільш придатною для дослідження процесів в цьому просторовому масштабі. Всі дослідження проводились для білку що містить 27 амінокислотних залишків і згортається в структуру  $\alpha$  /  $\beta$ -сендвіча, яка є типовою для білків-субстратів шаперона GroEL/ES. Білок представлений в рамках мінімальної моделі[132], в якій аміно кислотні залишки моделюються однією кулькою що розміщена на місці розташування  $C_{\alpha}$ атомів а відстані між залишками зафіксовані. Модель, див Рис. 2.12 для ілюстрації, містить три типи залишків: взаємно притягальні гідрофобні, відштовхувальні гідрофільні та нейтральні. Середовище шаперонової порожнини імітується сферою радіуса *R*. Для вивчення впливу конфайнменту проводилися симуляції



**Рис. 2.12** Природний стан моделі α/β-сендвіча розглянутого в даній дисертації в (а) схематичному та (б) рельєфно-кульковому представленні. Торсійні кути в (а) позначені кольором відповідно до вторинного структурного елемента: β-нитки представлені червоним, повороти позначені жовтим, а αспіралі - блакитні. Залишки в (b) забарвлені: гідрофобні - зелені, гідрофільні – жовті, нейтральні – сірі.

методом молекулярної динаміки при різних температурах та для різних обмежувальних радіусів сфери. Розглянуто як гідрофільні так і гідрофобні поверхні. Знайдено, що в гідрофільному середовищі прискорення згортання спостерігається лише для послідовностей які не мають великого ступеня фрустрації. Зауважимо, що такі послідовності і так згортаються швидко і допомоги шаперона не потребують. В гідрофобному середовищі можливе прискорення завдяки осіданню білка на поверхні комірки. Проте, гідрофобні поверхні присутні лише на початковій стадії шаперонового циклу. Як тільки кришка ковпака закривається – поверхня стає гідрофільною. Зважаючи на ці спостереження можна зробити висновок що модель ІАМ, якщо і має місце, то лише для білків які не є типовими субстратами шаперонів. Для білків, які погано згортаються і потребують допомоги шаперонів, очевидно, модель комірки Анфінсена є найбільш вірогідною.

#### 3.1. Гідрофільна комірка

### 3.1.1. Модель з високим ступенем фрустрації

Симуляції виконувались без комірки (радіус гідрофільної сфери  $R = \infty$ , далі іменується умови "в об'ємі"), а також при п'яти значеннях радіуса комірки  $R/R_{max} = 1,44, 1,55, 1,66, 1,88, 2,10$ . Величина  $R_{max}$  позначає максимальне відхилення будь-якого мономера білка від центру маси природного стану, тобто мінімальний радіус комірки, який може вмістити природну конформацію. Радіуси комірок менше  $1.44R_{max}$  ( $R < 1.44R_{max}$ ) призводять до суттєвих викривлень природного стану і не використовувалися в цьому дослідженні. Для всіх радіусів комірки відстані середньо-квадратичного відхилення між конформаціями для природних станів, RMSD, не перевищували 0.1Å.

# Термодинаміка згортання

Ефект конфайнменту шаперонової комірки на термодинамічні властивості білкового субстрату досліджувався за допомогою молекулярної динаміки в широкому спектрі температур, починаючи від підвищених температур, при яких бі лок переважно розгорнутий до нижчих температур, при яких білок перебуває в природному стані. Деталі методології моделювання наведено в розділі "Методи та моделі" цього розділу.

Спочатку було проведено дослідження за умов відсутності комірки. Для білка спостерігається перехід типу колапс, внаслідок якого радіус гірації молекули стрімко зменшується. Перехід відбувається при температурі 300 К і приводить до зміни випадкових розгорнутих конформацій великого розміру у випадкові конформації малого розміру. За колапсом слідує наступний структурний перехід, при температурі 240К, з компактних розгорнутих конформацій у



Рис. 3.1 Карта поверхні вільної енергії моделі  $\alpha/\beta$  сендвіча отримана за відсутності шаперонової комірки при температурі згортання  $T_f$ . По осях відкладені радіус гірації  $R_g$  та функція структурного перекриття  $\chi$ . Ділянки з найбільшою ймовірністю забарвлені червоним кольором. Поверхня вільної енергії має L-подібну форму, що вказує на складний механізм згортання, в якому є початковий колапс до глобулярного стану та пізніше перегрупування у природний стан.

природний стан. Температуру згортання визначено з флуктуацій параметру структурного перекриття  $\chi$ , який вимірює структурну різницю між даною конформацією та природним станом. Для станів, дуже близьких до природної конформації, структурне перекриття наближається до одиниці, тоді як в повністю розгорнутих конформації,  $\chi$  близький до нуля. Поверхня вільної енергії, розрахована при температурі згортання  $T_f$ , показана на Рис. 3.1. Він має характерну L-подібну форму[277], яка відображає механізм згортання з двома стадіями: початковий колапс до глобулярних конформацій та наступне згортання з цього



Рис. 3.2 Термодинамічні функції моделі  $\alpha/\beta$  сендвіча. В (а) показано радіус гірації в залежності від температури для декількох значень радіуса комірки R. Дані для умов "в об'ємі" представлені суцільною лінією, а радіуси гірації для білка в комірці представлені пунктирними лініями. Радіус гірації розгорнутого ансамблю зменшується зі зменшенням радіуса комірки. У графіку вказано температури колапсу  $T_c = 300 K$  та згортання  $T_f = 240 K$  за відсутності комірки, тобто для режиму "об'єм". В (б) показано температуру колапсу і згортання як функцію радіуса комірки R. Штриховою вертикальною лінією позначено значення цих параметрів за відсутності комірки. Температура колапсу  $T_c$  зростає при просторовому обмеженні в результаті зменшення ентропії розгорнутого стану. З іншого боку, температура згортання, що передбачає початковий колапс білка до компактної глобулярної структури перед переходом до природного стану.

компактного стану. Від початкових видовжених станів ( $R_g/R_{max} \sim 1$ ) білок швидко переходить до менших конформацій з  $R_g/R_{max} \sim 0.7$ , де він залишається поки процес згортання не завершиться. Як видно з відносної заповненості станів у площині  $R_g$ - $\chi$ , згортання відбувається повністю в підансамблі компактних конфігурацій. Конформації з великим  $R_g$  дуже рідко зустрічаються при температурі згортання  $T_f$ .

Про характер переходу колапсу за умов просторового обмеження можна довідатися з поведінки радіуса гірації  $R_g$  з температурою, як показано на Рис. 3.2(а). Розмір білка зменшується майже в два рази з початкового значення

 $1.1R_{max}$  при 400 К, коли температура знижується до  $T \sim 250$  К. Область найшвидшої зміни в  $R_g$  співпадає з положенням температури колапсу  $T_c$ , обчисленої з максимуму питомої теплоти як функції температури. Рис. 3.2(а) чітко показує вплив конфайнменту на структуру моделі. Як і очікувалося, радіус гірації розгорнутого ансамблю зменшується з радіусом комірки R. Рис. 3.2(b) показує температури переходів колапсу та згортання як функцію радіуса комірки *R*. Температура колапсу поступово збільшується внаслідок просторового обмеження від 300 К в умовах без комірки до 380 К для  $R/R_{max} = 1.44$ . Зростаючі значення  $T_c$ можна пояснити зміною ентропії розгорнутого ансамблю, викликаної обмеженням[278]. Температура Т<sub>с</sub> визначається за умови, що вільна енергія розгорнутого та компактного глобулярного станів однакові. Враховуючи відштовхувальний характер обмежувального потенціалу, можна сподіватися що стінка комірки не сильно впливає на потенціальну енергію обох станів. Для ентропії все відбувається навпаки, особливо для видовжених конформацій розгорнутого стану. Оскільки основна роль конфайнменту полягає у обмеженні конформаційної свободи при високих температурах, очікується, що ентропія розгорнутого стану буде зменшуватися в присутності комірки. Внаслідок цього, менша різниця ентропії між глобулярними та видовженими коформаціями в обмеженому середовищі вимагатиме вищих температур, щоб збалансувати різницю потенціальної енергії, на яку комірка не впливає.

Цікаво, що температура згортання  $T_f$ , обчислена з максимуму зміни в  $\chi$ , не залежить значно від радіуса конфігурації (Рис. 3.2(b)) і залишається майже постійною і близькою до значення "в об'ємі"  $T_f$ = 240К. Хоча така поведінка може здатися несподіваною, можна легко зрозуміти що відбувається з карти вільної енергії, побудованої як функція  $\chi$  та  $R_g$  при  $T = T_f$  (Рис. 3.1). За своєю будовою, на початкових стадіях згортання білок проходить через гідрофобний колапс, що викликає різке зменшення розміру. Таким чином, обмежувальна комірка не мо

же мати впливу на структуру білка, оскільки її радіус менший ніж розмір згорнутої глобули.

#### Кінетика згортання

Деталі того як були проведені кінетичні симуляції подано в розділі "Моделі та



Рис. 3.3 Час згортання моделі α / β білка що вивчався в даній дисертації. На (а) показано час згортання як функцію температури T та радіусу комірки R. Для порівняння показано криву часу згортання за відсутності комірки шаперона. Просторове обмеження не впливає на V-подібну форму залежності. Збільшення часу згортання при високих температурах є результатом низької статистичної ваги природного стану за цих умов, тоді як тривалий час згортання при низьких температурах спостерігається як наслідок попадання білкових конформацій у кінетичні пастки, створені локальними мінімумами потенціальної енергії. Нижня точка кривої V відповідає температурі мінімального часу згортання  $T_m$ , при якій термодинамічне тяжіння до природного стану врівноважується застряганням в локальних енергетичних мінімумах. Вказано три важливі температури: колапсу  $T_c$ , згорання  $T_f$ , та мінімальна часу згортання  $T_m$ . Для цього білка,  $T_f$  лежить нижче  $T_m$ . На (b) показано час згортання для вибраних температур ( $T = T_f = 240 \ K < T_m$ ,  $T = 300 \ K$  i T = 320 K) як функція радіуса комірки **R**. Пунктирною лінією позначаються значення за відсутності комірки. Просторове обмеження призводить лише до збільшення швидкості згортання при температурах вище  $T_m$ . Отже, прискорення не спостерігається при температурах, при яких білок термодинамічно стабільний ( $T_f < T_m$  для всіх радіусів).

методи". На Рис. 3.3 показано час згортання  $\tau_f$  в залежності від температури та радіусу обмежувальної сфери. Криві мають V-подібну форму, що виникає внаслідок сильного зростання  $\tau_f$  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 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, й 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 [279; 280; 281]. Для нашої моделі за відсутності комірки, ця мінімальна температура складає  $T_m = 260$  К.

З Рис. 3.3(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 зміщується у бік вищих температур. Починаючи зі значення в 260 К характерного для режиму "в об'ємі", температура поступово збільшується до 320 К для комірки з радіусом  $R/R_{max} = 1.44$ .

З практичної точки зору важливо зрозуміти, як розміщення в порожнині шаперона впливає на час згортання субстрату при біологічно важливих температурах. Виходячи з поведінки  $T_m$  в залежності від радіуса R, можна стверджувати, що при температурах нижчих за мінімальну температуру згортання ( $T < T_m$ ), конфайнмент призведе 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 ча-

стину свого часу в пастці в глобулярному, неправильно 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 них. Отже, в умовах низької температури просторове обмеження, швидше за все, перешкоджає, ніж сприяє згортанню. Зазначимо, що можливість зменшення швидкості згортання субстрата також передбачена в контексті ІАМ [103; 113; 282]. При температурах вище  $T_m$  ( $T > T_m$ ), з іншого боку, ми очікуємо прискорення згортання для *R* вище певного порогового значення і сповільнення - нижче. Цей сценарій проілюстровано на Рис. 3.3 (б), де час згортання показано як функцію R при вибраних  $T_f = 240$  K < $T_m$ , T = 300 K i 320 K. При температурі згортання  $T_f$  ( $T_f < T_m$ ), час згортання всередині шаперонової комірки завжди є довшим ніж за її відсутності. При підвищеній температурі (вище T<sub>m</sub>) спостерігається прискорення швидкості згортання для R у межах від 1.5 R<sub>max</sub> до 2.1 R<sub>max</sub>. Точне значення радіуса комірки, при якому спостерігається оптимальне пришвидшення згортання, залежить від розглянутої температури. У попередньому дослідженні [113] було відмічено важливість впливу температури на згортання фрустрованих послідовностей в обмежених середовищах. Зауважимо, що нами також було детально досліджено залежність кінетики згортання від ступеня фрустрації поверхні вільної енергії для простих аланінових пептидів[283; 284]. Зокрема було описано ефект сповільнення згортання, і появу не-експоненціальної кінетики, в моделях з великим рівнем фрустрації.

Оскільки температура згортання розглянутої моделі лежить нижче мінімальної температури згортання ( $T_f < T_m$ ), очевидно, що просторове обмеження в порожнині GroEL саме по собі не призведе до збільшення швидкості згортання у фізіологічних умовах ( $T < T_f$ ). Шаперонова комірка для цього білка в умовах коли стабільний природний стан, відіграватиме перш за все роль захисту від агрегації. Зрозуміло, що підвищення швидкості складання має зміст лише при температурах, де білок знаходиться в термодинамічно стабільному стані. З огляду на наше спостереження, що температура складання  $T_f$  не сильно змінюється при просторовому обмеженні, і що прискорення може бути досягнуто лише при температурах вище  $T_m$  ( $T > T_m$ ), єдиним можливим способом для білка продемонструвати підвищення швидкості згортання при біологічно значимих умовах, це якщо його мінімальна температура згортання часу лежить нижче температури згортання ( $T_m < T_f$ ). Це твердження порушує ряд питань теоретичного характеру. По-перше, як температура мінімального часу згортання  $T_m$  пов'язана з внутрішніми характеристиками білків (зокрема їхніми картами вільної енергії)? Подруге, чи можливо розробити функцію потенціальної енергії для моделі білка так, щоб його  $T_m$  було нижчим за температуру згортання  $T_f$ ? В наступних розділах показано, що зв'язок між  $T_f$  і  $T_m$  можна встановити змінюючи рівень фрустрації в поверхні потенційної енергії. Зокрема, буде показано, що шляхом побудови білків зі згладженими поверхнями, температура згортання може бути піднята вище мінімальної температури згортання.

#### 3.1.2. Модель з пришвидшеним згортанням

В даний час немає аналітичних методів здатних пов'язати характерні температури переходу модельних білків (наприклад,  $T_c$  та  $T_f$ ) з їх функціями потенціальної енергії. Хоча неможливо встановити точні співвідношення між енергетичною функцією і температурою переходу, ми тим не менш можемо виявити якісні залежності між температурою переходу та певними базовими характеристиками енергетичного ландшафту. Дослідження, проведені Волинесом[285; 286] та Тірумалаєм[287; 288; 289] для граткових моделей, показали, що температура згортання ( $T_f$ ) тісно пов'язана зі ступенем фрустрації білка. Білки з дуже фрустрованими послідовностями мають невеликі співвідношення температур згортання та переходу в склоподібний стан ( $T_f/T_g$ ) та набувають великих значень параметра  $\sigma = (T_c - T_f)/T_c$ , що поєднує температури колапсу та згортання. Виходячи з поведінки параметра  $\sigma$  [290], зниження рівня фрустрації моделі повинно привести температуру згортання ближче до температури колапсу. Оскільки  $T_c$  в основному не залежить від рівня фрустрації[291; 292],  $T_f$  буде збільшуватися коли ступінь фрустрації зменшується. Ця властивість була продемонстрована в роботі для моделі Го (тобто білка з мінімальним енергетичним розладом) [291], в якій теж відбуваються одночасно переходи згортання та колапсу.

Друга змінна, на яку впливає ступінь фрустрації, - це температура найшвидшого згортання  $T_m$ . Ця величина відображає делікатний баланс між термодинамічним тяжінням до природного стану та попаданням в кінетичні пастки. Зменшення ступеня фрустрації призведе до того, що динамічний механізм пасток стане домінуючим при більш низькій температурі, внаслідок чого отримується нижча температура  $T_m$ .

Константи	α-спіраль	β-пасмо	поворот
a (a.u.)	$3.5 \times 10^{-3} (1.0 \times 10^{-3})$	$3.0 \times 10^{-3} (1.5 \times 10^{-3})$	$3.5 \times 10^{-3} (1.5 \times 10^{-3})$
b (a.u.)	$2.0 \times 10^{-3} (2.0 \times 10^{-3})$	$3.0 \times 10^{-3} (2.0 \times 10^{-3})$	n/a

**Таб. 3.1** Параметри торсійних потенціалів, що використовуються для моделі з поверхнею гладких енергій. Як і в оригінальній моделі, потенціал для 6-го, 7-го та 13-го кута було обнулено. Значення для оригінальної моделі вказані в дужках.

Відомий спосіб усунути надлишкову фрустрацію в білках полягає у створенні моделей Го-типу [293; 294; 295]. У моделі типу Го, лише ті пари гідрофобних залишків які контактують у природному стані мають притягальні взаємодії. Гідрофобні залишки, які не беруть участі у в таких контактах, взаємодіють через потенціал відштовхування, навіть якщо вони наближаються один до одного на короткі відстані. Це дозволяє білку уникати станів, які містять неправильні гідрофобні контакти, і відносно низькі потенційні енергії, проте структурно відрізняються від природного стану.

У цій роботі ми йдемо альтернатвним шляхом побудови менш фрустрованих білкових моделей. Зазначимо, що завдяки сферичній симетрії гідрофобної сили локальні мінімуми, створені неправильними контактами, відповідають структурам із кулястими формами. Це означає, що деякі структурні елементи моделі, які мають видовжену форму в локальному мінімумі, наприклад β-нитки, повинні бути деформовані, щоб набути більш-менш кулястої форми. Оскільки ця деформація відбувається за рахунок торсійної частини потенціалу, локальні мінімуми, викликані неправильними гідрофобними контактами, можна ліквідувати шляхом зміцнення констант



Рис. 3.4 Карта вільної енергії моделі  $\alpha/\beta$  з меншим рівнем фрустрації розрахована при температурі складання  $T_f$  та без комірки. По осях відкладені  $R_g$  та  $\chi$ . Червоним кольором позначені області що мають найвищу ймовірність спостереження. Поверхня має L-подібну форму подібну до аналогічної поверхні оригінальної моделі. Відмінність полягає в тому що тут ансамбль розгорнутого стану більш заселений.

торсійного потенціалу. Різниця між цим підходом і підходом стилю Го полягає в тому, що замість підняття енергії конформацій з неправильними контактами шляхом скасування певних внесків від гідрофобної взаємодії, енергія підвищується завдяки вкладам торсійного потенціалу. Значення констант торсійного потенціалу a та b для оригінальної та модифікованої моделей білка наведено в Таб. 3.1. Більш детальні відомості про потенціал наведено в розділі "Моделі та методи".

# 3.1.3. Характеристики моделі зі зменшеною фрустрацією

Термодинаміка та кінетика згортання модифікованого білка досліджувалися способом, описаним для оригінальної моделі. Менш фрустрований білок демон-



Рис. 3.5 Час згортання  $\alpha/\beta$  моделі з малим рівнем фрустрації потенціальної енергії. На (а) показано час згортання як функцію температури **T** та радіусу комірки **R**. Для порівняння також зображено криву отриману за відсутності комірки. Показано значення трьох характерних температур  $T_c$ ,  $T_f$  та  $T_m$ . Модель зі зменшеною фрустрацією згортається значно швидше, ніж вихідна модель ( $\tau_f = 120 \times 10^3$  порівняно з  $\tau_f = 220 \times 10^3$ ). У модифікованій моделі  $T_m$  нижче температури згортання  $T_f$  для всіх розглянутих радіусів. На (б) зображено час згортання при температурі  $T = T_f$  як функцію радіуса комірки **R**. На відміну від оригінальної моделі, при цій температурі спостерігається збільшення швидкості згортання. Максимально доступне прискорення внаслідок просторового обмеження сягає 1.6 рази.

струє аналогічний механізм згортання до оригінальної моделі, з початковим колапсом, а потім перегрупуванням до природного стану. Температура колапсу  $T_c$ збільшується при використанні комірки від 340 К до 440 К для радіуса комірки  $R/R_{max}$ = 1.45, тоді як температура згортання  $T_f$  = 280K залишається незмінною.

Поверхня вільної енергії в площині  $R_g - \chi$  показана на Рис. 3.4 при  $T = T_f$ . На малюнку добре видно L-подібну форму, аналогічну до тої що спостерігається для оригінальної моделі, дивись Рис. 3.1. Єдина істотна різниця між цими двома картами - це більш висока популяція розгорнутого ансамблю в менш фрустрованій моделі. Це добре узгоджується з тим прогнозом, що збільшення сили торсійного потенціалу зменшує тенденцію до згортання в не-природний глобулярний стан.

Більш разюча різниця між двома моделями спостерігається в кінетиці. Час згортання, порахований як середній час найшвидшого пробігу, показаний на Рис. 3.5(а) як функція температури T та радіуса комірки R. Перша відмінність, що впадає в вічі, це значно коротший час згортання модифікованої моделі,  $120 \times 10^3$  порівняно з  $220 \times 10^3$  в вихідній моделі. Крім того, мінімальна температура згортання для модифікованої моделі нижча, ніж температура згортання ( $T_m < T_f$ ), для всіх радіусів комірки. Хоча температура згортання не залежить від R, мінімальна температура складання  $T_m$  збільшується, при зменшенні радіусу комірки.

Графік залежності  $T_f$  від R показано на Рис. 3.5(b). На відміну від оригінальної моделі при цій температурі, в цій моделі швидкість згортання внаслідок просторового обмеження збільшується. Максимальне підвищення швидкості, майже в 1.6 рази, спостерігається при  $R/R_{max}$ . Цікаво, що подібна величина пришвидшення була отримана в більш ранньому дослідженні моделі  $\beta$ -листа в підході Го [296], тобто моделі з сильно зниженим рівнем фрустрації. Згідно з нашою оригінальною гіпотезою, бачимо що підвищення швидкості може спостерігатися в фізіологічних умовах, в білках для яких  $T_m$  нижча за температуру згортання  $T_f$ .

# 3.1.4. Механізм зменшення рівня фрустрації

Вище було показано що пришвидшення згортання за рахунок поміщення в сферичну комірку можна досягти для білків які мають мінімальний рівень фрустрації в поверхні потенціальної енергії. В цьому розділі ми спробуємо з'ясувати механізм, завдяки якому це пришвидшення є можливим. Для цього ми проаналізуємо детально шляхи по яких відбувається згортання від розгорнутого стану до природного.

Ці шляхи розраховуються як розподіл по конформаціях, які білок відвідує в комп'ютерних симуляціях під час згортання. Отримані таким чином карти згортання показані на Рис. 3.6 (а) та (b) для моделі без, та з коміркою, відповідно. Для комірки використовувався радіус  $R/R_{max}$ =2.07, при якому спостерігається максимальне пришвидшення. Карти були створені з конформацій, що зберігалися кожних 200 часових кроків в 500 незалежних траекторіях.

Карти згортання (Рис. 3.6) істотно відрізняються від карт вільної енергії (Рис. 3.4): тоді як перші відповідають нерівноважному стану, другі представляють рі-



Рис. 3.6 Карта згортання для  $\alpha/\beta$  моделі зі зменшеним рівнем фрустрації, розрахована при  $T=T_f$ . На (а) показані результати за відсутності комірки тоді як в (b) - обмеження сферою радіуса  $R/R_{max} = 2.07$ . Області з найвищою ймовірністю позначені червоним та оранжевим кольором. Видно, що комірка вилучає видовжені конформації.

вноважну проекцію конфігураційного простору на вибрані колективні змінні. Цінність карт згортання в тому що вони надають безпосередню інформацію про те, де білок перебуває в процесі згортання, зокрема в яких областях він проводить велику частину часу. Детальний огляд карти згортання виявляє чималу різницю в конфігураціях, які білок відвідує в процесі згортання всередині комірки та поза нею. Карта моделі без комірки має два мінімуми: перший відповідає положенню видовжених конформацій,  $R_g/R_{max}=1.2$ ,  $\chi=0.2$ , тоді як другий – компактних станів,  $R_g/R_{max}=0.9, \chi=0.3$ . Ці мінімуми зникають в обмеженому просторі і замінюються новими мінімумами з низьким радіусом,  $R_g/R_{max}=0.7, \chi=0.4$ .

Очевидно, що білок більше не відвідує конформації з великим радіусом в обмеженому середовищі, і це, у свою чергу, впливає на швидкість згортання. Для того, щоб краще зрозуміти вплив просторового обмеження на швидкість згортання певних білків, слід розглянути цей процес в контексті формалізму локальних мінімумів енергії. Оскільки енергія, необхідна для знищення гідрофобного контакту, перевищує kT, такі мінімуми потенціальної енергії представлять кінетичні пастки з яких важко звільнитися, що негативно впливає на швидкість згортання.

Для того, щоб визначити, де білок проводить більшу частину свого часу в процесі згортання, ми вибрали конформації через регулярні проміжки часу з траекторій симуляцій та побудували локальні мінімуми, що їм відповідають, використовуючи метод найшвидшого спуску. Карти цих локальних мінімумів енергії при температурі складання  $T_f$  представлені на **Рис. 3.7** (a) і (b) в залежності від радіуса гірації  $R_g$  і радіуса максимального видовження  $R_{max}^s$ , відповідно. Ці карти показують, як розташування енергетичних мінімумів, так і те котрі мінімуми переважно відвідуються в процесі згортання.

Області конформаційного простору що відвідуються найчастіше, тобто ті, які впливають на час згортання, добре видно на **Рис. 3.7** за ступенем скупчення. Енергії отримані за умов відсутності комірки для вихідної моделі показані синім кольором тоді як дані для моделі з пониженим рівнем фрустрації – оранжевим.

Шкала енергії для оригінальної моделі наведена на нижній осі тоді як шкала для модифікованої моделі – на нижній.

За відсутності комірки, різниця у мінімумах енергії для оригінального і модифікованого білка досить значна. Мінімуми, які служать як кінетичні пастки знаходяться для оригінальної моделі поблизу  $R_g$  для природного стану, а отже, відповідають компактним структурам. З іншого боку, в модифікованій моделі мінімуми скупчуються в два основних кластери які мають як великі так і малі  $R_g$ . Найбільш заселені мінімуми зустрічаються при енергіях та радіусах гірації e = 0.02,  $R_g/R_{max} = 1.2$  та e = 0.007,  $R_g/R_{max} = 0.9$ . Ці кластери відповідають мінімумам, що спостерігаються в карті вільної енергії показаної на Рис.



Рис. 3.7 Карти локальних мінімумів потенціальної енергії, які зустрічаються на шляху  $\alpha/\beta$  білка в процесі згортання, показані як функція (а) радіуса обертання  $R_g/R_{max}$  та (b) радіуса максимального видовження  $R_{max}^s/R_{max}$ . Масштаб енергії, вказаний на верхній осі x, відповідає модифікованій моделі а масштаб вказаний на нижній осі x - вихідній моделі. Мінімуми енергії, спостережувані для вихідної моделі поза межами комірки, забарвлені синім, а ті, які належать модифікованій моделі червоним – всередині комірки, та оранжевим – в комірці радіусом  $R/R_{max}$ . Для модифікованої моделі виділені ділянки збігаються з найбільш заселеними областями карт згортання. Межі комірки вказані в (б) горизонтальною пунктирною лінією. Добре видно, що як тільки застосовано комірку, всі мінімуми з  $R_{max}^s/R_{max}$  більшими за 1.7 (радіус комірки мінус  $\sigma$ ) зникають.

3.6(а). Отже, модифікована модель поза коміркою відвідує конфігурації мінімумів, що мають набагато більший розмір, ніж ті, що спостерігаються в оригінальній моделі.

Мінімуми, що спостерігаються для модифікованого білка обмеженого сферою радіуса  $R/R_{max} = 2.07$  (радіус, при якому спостерігається максимальне підвищення швидкості), представлені на Рис. 3.7 червоним кольором. Видно, що вплив комірки є значним: усуваються всі мінімуми, які перевищують певне значення R<sub>a</sub>. Цей ефект можна побачити більш чітко, коли побудувати мінімуми як функцію від максимального радіусу видовження білка R<sup>s</sup><sub>max</sub>, як показано на Рис. 3.7(b). Ця проекція дозволяє нам проводити пряме порівняння конформацій, що відповідають кожному мінімуму та розміру комірки. Межі комірки зазначені на Рис. 3.7 (b) пунктирною лінією. На відміну від оригінальної моделі (синій), значна кількість мінімумів для модифікованого білка (оранжевий), відповідає конформаціям з значеннями R<sup>s</sup><sub>max</sub>, близьких або більших, ніж радіус обмежувальної сфери. Після того, як накладаються межі комірки, всі мінімуми з  $R_{max}^{s}/R_{max}$  більше, ніж 1.7 (тобто радіус комірки мінус відстань  $\sigma$ , на яку мономери можуть підійти до сфери), усуваються. Зазначимо, що локальні енергетичні мінімуми відповідають конформаціям більш-менш кулястої форми з неправильними гідрофобними контактами. Сильні локальні взаємодії можуть привести до конформації з кількома мономерами, що виступають з глобули. Достатньо, щоб стінки комірки сильно відштовхували лише один такий мономер, щоб енергія всього мінімуму була підвищена, а структура дестабілізована. Оскільки підмножина локальних мінімумів, які раніше були часто відвідувані, тепер недоступні, це приводить до прискорення згортання в обмеженому середовищі. Цей механізм підвищення швидкості згортання узгоджується з пропозицією Гартла та його колег [108], що обмеження, накладені шапероном, здатні зменшити шорсткість поверхні вільної енергії деяких білків шляхом усунення мінімумів енергії, які можуть служити кінетичною пасткою для згортання.

#### 3.2. Прискорення згортання завдяки гідрофобним взаємодіям

# 3.2.1.Час згортання

Щоб дослідити роль внутрішньої комірки шапенрона наша модель була розширена. На додачу до відштовхувальних, гідрофільних поверхонь також були розглянуті притягальні, гідрофобні поверхні. Для цього гідрофобним залишкам білка було дозволено взаємодіяти з поверхнею через притягальний потенціал. Як пояснено в розділі "Методи та моделі" більш детально, використовувався

потенціал Ленард-Джонса для взаємодії білка з шапероном. В отриманому потенціалі взаємодії міститься один невизначений параметр, h, який описує ступінь гідрофобності поверхні. Значення h=0 відповідає відштовхувальній поверхні тоді як h=1 – притягальній. Проміжні значення відповідають певному середньому ступеню гідрофобності.



**Рис. 3.8** Час згортання білка як функція гідрофобності поверхні шаперонової комірки. Для певних значень *h* можливе 10-кратне прискорення згортання.

Час згортання було отримано як функцію гідрофобності поверхні *h*. Як показано на Рис. 3.8 для температури  $T = T_f$  та радіусу комірки  $R/R_{max}$ =2.07, він спочатку плавно спадає з *h* а пізніше різко росте. Мінімум спостерігається для *h*=0.47, де гідрофобність поверхні здатна пришвидшити реакцію згортання на один порядок в порівнянні з гідрофільною поверхнею.

Слід зазначити що такий значний ефект спостерігається лише для моделі зі значним рівнем фрустрації. В нефрустрованому білку гідрофобна стінка шаперона має незначний вплив на час згортання.
## 3.2.2. Механізм прискорення

Щоб зрозуміти що впливає на час згортання в нефрустрованій моделі було проведено детальний аналіз траєкторій згортання. Для цього всі записні конформації було розбито на групи подібних структур, або кластерів. Середньоквадратична відстань між конформаціями, RMSD, була використана як міра подібності. Крім природного стану, який при температурі  $T < T_f$  є конформацією з найвищим рівнем заселення, була знайдена ще одна, відмінна конформація яка часто спостерігалася в симуляціях. Ця конформація, яку будемо називати альтернативним незгорнутим станом, показана на Рис. 3.9, у порівнянні з природним станом. Спільним в цих двох станах є існування α-спіралі та β-листа. Відмінним - те як ці два структурні мотиви складені в 3D структуру. В альтернативній конформації В-лист повернутий на 180 градусів в порівнянні з природним станом. Існує дуже мала різниця в гідрофобних контактах між двома конформаціями, що пояснює близькість їхньої потенціальної енергії. Істотна відмінність спостерігається в куті повороту. Підсилюючи константу що контролює торсійний потенціал для цього повороту можна досягти більшої різниці потенціальної енергії, і відповідно, отримати менш фрустровану модель, як вже було згадано више.

Альтернативний стан слугує кінетичною пасткою для оригінальної моделі, сповільнюючи процес її згортання. Щоб зрозуміти вплив комірки на цю модель, буде корисно включити цей стан в статистичний аналіз. Для цього було спроектовано весь конформаційний простір білка на дві змінні: RMSD до природного та до альтернативного станів. Відповідна карта вільної енергії показана на Рис. 3.10. Згідно з очікуваннями, карта чітко демонструє розбиття всього простору на кластери. Найнижчій 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 мінімуму з'єднані між собою досить високим бар'єром. З Рис. 3.10(а) добре видно що будь-який шлях який пролягає зі стану М в стан N повинен пройти найвищу точку з енергією порядку 2.5kT. Цим пояснюється довгий час звільнення білка з кінетичної пастки і, відповідно, довгий час згортання.

## 3.2.3. Створення проміжного стану на шляху згортання

Значні зміни у вільній енергії відбуваються коли білок поміщений у комірку шаперона. Карта вільної енергії отримана за цих умов при h=0.47 показана на Рис. 3.10(b). Мінімуми, що відповідають природному та альтер-



Рис. 3.9 Порівняння двох характерних конформацій білка: (а) природний стан, (b) альтернативний невірно згорнутий стан. Дві конформації відрізняються тим як  $\alpha$ -спіраль взаємодіє з  $\beta$ -листом. Перехід з одного стану в інший супроводжується переворотом кута в області повороту. Торсійний потенціал цієї області забезпечує найнижчу потенціальну енергію для природного стану.

нативному станам існують і надалі. Проте тепер з'являється новий стан В, якого не було раніше, і який теж має низьку вільну енергію. Візуальний огляд показує що цей 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, або через конформації близькі до нього структурно, і які в найвищій точці мають енергію всього порядку 1*kT*. Це значна зміна, враховуючи що в кінетичній теорії стохастичних процесів, різниця вільних енергій стоїть під експонентою.

Порівнюючи карти вільної енергії для білка всередині і поза коміркою, дивись Рис. 3.10 (a) і (b), можна прийти до наступного пояснення механізму приско



**Рис. 3.10** Карта згортання для моделі білка з альтернативною (М) незгорнутою конформацією отримана за відсутності комірки, (а), та в середині комірки, (b). Природний стан позначено як N. Енергія вказана в одиницях *kT*.

рення згортання шапероновою коміркою. За відсутності комірки, білок згортається повільно, тому що розгорнутий та природний стани розділені високим бар'єром вільної енергії. Схематично цю ситуації можна зобразити на мові одно-вимірної реакції, як показано на Рис. 3.11(а). В присутності шаперона в білка з'являється додатковий партнер для взаємодії – комірка. Тепер повна енергія системи включає не лише енергію білка, але й енергію взаємодії білка з шапероном. Для природного білка ця остання енергія є дуже малою, оскільки в цьому стані всі гідрофобні залишки заховані всередині конформації і змоги підійти близько до стінки комірки, де б вони почали взаємодіяти, не мають. Тому в природному стані енергія за наявності чи відсутності комірки є майже тою самою. Коли білок є в частково згорнутому стані, якась частина його гідрофобних залишків знаходяться на поверхні, де вони стають доступні для взаємодій з іншими гідрофобними молекулами, зокрема стінкою комірки. Загальна енергія системи внаслідок таких взаємодій понижується, що призводить до пониження вільної енергії. Оскільки частково згорнуті конформації є ані природними, ані повністю розгорнутими, на 1D карті згортання вони знаходяться десь посередині

між цими двома станами, тобто там де розміщений максимум. Цей сценарій продемонстрований на Рис. 3.11(b). Утворення додаткового стану з низькою енергією приводить до пониження вільної енергії в області бар'єру і, отже, до прискорення реакції згортання. Зрозуміло що конформація зв'язаного стану білка з шапероном є дуже специфічною для вибраного білка. Проте механізм, за яким відбувається прискорення, є цілком загальним. Гідрофобні поверхні доступні для взаємодій є найбільш важливою характеристикою частково чи невірно згорнутих станів. А тому створення коміркою проміжного стану може слугувати одним з механізмів за якими функціонують шаперони.



**Рис. 3.11** Схематичне зображення процесу згортання білка поза коміркою, (а), та всередині комірки, (b). Взаємодія з гідрофобною стінкою дозволяє понизити бар'єр для реакції згортання шляхом створення молекулярного комплексу білка з шапероном.

#### 3.3. Моделі та методи

### 3.3.1. Вибір моделі білка

Більшість чисельних досліджень білків, поміщених в порожнини[112; 113], використовують граткові моделі що досліджуються методом Монте Карло. Хоча спрощення, в порівнянні з повним атомним представленням, роблять такі моделі чисельно трактовними, вони не підходять для вивчення кінетики. Дійсно, кінетичні послідовності подій, згенеровані за допомогою граткових моделей, сильно залежать від прийнятого набору кроків Монте-Карло [297; 298]. У обмежених середовищах проблема ще більше ускладнюється наявністю відштовхувальної стінки, яка може заблокувати модель ґратки в єдиній конформації, що приводить до втрати ергодичності. Для того, щоб впоратися з цією ситуацією, потрібно впроваджувати спеціальні набори рухів, здатні переносити білок в цілому[113]. Вплив цих специфічних рухів на кінцеві результати згортання залишається незрозумілим.

З іншого боку, дослідження методом молекулярної динаміки моделей спрощеного опису позбавлені таких ускладнень. Крім того, такі моделі забезпечують більш реалістичний опис явища виключеного об'єму для мономерів білка.

#### 3.3.2. Взаємодії між мономерами

У цій роботі ми використовуємо варіант моделі білка що носить назву "бусинки на струні", який був запроваджений в роботах Хонікомба та Тірумалая[132]. У межах цієї моделі кожний амінокислотний залишок представлений одним силовим центром, бусинкою. Відстані між послідовними бусинками зафіксовані. У моделі існує три типи залишків: гідрофобні (Н), гідрофільні (Р) та нейтральні (N). Гідрофобні залишки, розділені принаймні одним залишком вздовж послідовності, притягують один одного через потенціал Ленард-Джонса:

$$U_{HH}(r) = 4e_h \left[ \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6 \right]$$
(3.1)

Нейтральні залишки взаємодіють з залишками будь-якого типу через суто відштовхувальний потенціал:

$$U_{Ni}(r) = 4 \frac{e_n + e_i}{2} \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12}, i = H, N, P$$
(3.2)

Щоб відтворити експериментально спостережувану присутність гідрофільних залишків на поверхні білка, ми накладаємо сильніше відштовхування між двома гідрофільними залишками, ніж між гідрофільним та гідрофобним залишком:

$$U_{PP}(r) = 4e_p \left[ \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} + \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6 \right]$$
(3.3)

$$U_{PH}(r) = 4 \frac{e_h + e_p}{2} \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12}$$
(3.4)

У рівнянні показаному вище параметри, що вимірюють силу взаємодій, складали:  $e_h = 3 \times 10^{-3}$  а.u.,  $e_n = 1 \times 10^{-3}$  а.u. та  $e_p = 5 \times 10^{-4}$  а.u. Параметр  $\sigma$ , який відповідає за просторову протяжність потенціалу, вважався рівним довжині пептидних зв'язків (3.8 Å). Загалом, набір гідрофобних / гідрофобних потенціалів, описаних вище, дуже подібний до багатьох інших схем, наведених у літературі[299]. Відстань між сусідніми бусинками моделі вважалася рівною  $\sigma$ .

Окрім далекосяжної взаємодії, що діє серед мономерів, існують також два типи короткосяжних взаємодій, торсійний потенціал та потенціал згину, що призначені для обмеження локальної конформаційної свободи моделі. Потенціал згину виражається через кут згину  $\Theta$ , утворений трьома послідовними бусинками вздовж ланцюга:

$$U_B = \frac{k}{2} (\Theta - \Theta_0)^2 \tag{3.5}$$

де постійна *k* була прийнята рівною  $4 \times 10^{-2}$  a.u./rad<sup>2</sup>, а кут рівноважного згину був  $\Theta_0 = 105^{\circ}$ . Торсійні потенціали включають чотири мономери вздовж послідовності. Три зв'язки, які з'єднують ці мономери, утворюють дві нееквівалентні площини. Торсійні потенціали залежать від кута, утвореного цими площинами. Оскільки наша модель містить різні елементи вторинної структури, ми розробили торсійний потенціал таким чином, щоб один з цих елементів: β-нитка, αспіраль чи поворот, були вигідними. Для сегментів β-нитки потенціал був таким:

$$U_T = a(1 + \cos(\phi)) + b(1 + \cos(3\phi))$$
(3.6)

де константи *a* та *b* контролюють відносну енергію трьох мінімумів цього потенціалу: один *транс* і два *гош* стани. Для α-спіральних конформацій потенціал повинен сприяти одному зі станів *гош* і таким чином повинен бути асиметричним. Асиметрія досягається додаванням синусоїдального потенціалу:

$$U_T = a(1 - \cos(\phi) + \cos(3\phi)) - b(\sin(\phi) - 1)$$
(3.7)

Насамкінець, в ділянках з поворотом, замість *транс*- або *гош*- станів, переважають конформації з кутом 90°. Відповідно ми використовували для цих ділянок такий потенціал:

$$U_{T} = \begin{cases} 2a\cos^{2}(\phi), & 0 < \phi \le \pi\\ 2a(2 - \cos^{2}(\phi)), & \pi < \phi \le 2\pi \end{cases}$$
(3.8)

Звернемо увагу, що вказаний вище потенціал має лише один мінімум при  $\phi = 90^{\circ}$ , а не в еквівалентній точці 270°. Це зроблено для того, щоб запобігти утворенню неправильно "згорнутих" дзеркальних зображень β-листів, що приводять до створення глибокого потенціального мінімуму, що може конкурувати з конформацією природного стану.

Основний стан досліджуваної моделі показано на Рис. 2.12. Схематичне зображення показує всі використані торсійні кути. Наприклад, кут, що охоплює мономери 1,2,3 і 4, має номер 1 і так далі. Окрім того, всі кути зображені різним кольором для різних елементів вторинної структури.

Усього в моделі є 3 повороти, 10  $\beta$ -ниткових областей та 11  $\alpha$ -спіральних областей. Області поворотів знаходяться в місцях, де з'єднуються дві  $\beta$ -нитки та де  $\alpha$ -спіраль з'єднана з  $\beta$ -ниткою. Конкретні значення, прийняті для параметрів *а* та *b* торсійних потенціалів, наведені в Таб. 3.2.

Константи	α-спіраль	β-пасмо	поворот
a (a.u.)	$1.0 \times 10^{-3}$	$1.5 \times 10^{-3}$	$1.5 \times 10^{-3}$
b (a.u.)	$2.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$	n/a

**Таб. 3.2** Параметри торсійних потенціалів, що використовуються в оригінальній моделі. На додаток до перерахованих значень, потенціал для 6-го, 7-го та 13-го повороту було прийнято рівним нулю

Послідовність гідрофобних, гідрофільних та нейтральних залишків показана на Рис. 2.12 (б).  $\beta$  -лист містить *H* та *P* мономери, тоді як  $\alpha$ -спіраль складається з пар *HH* або *PP* мономерів. Нейтральні мономери розміщуються на ділянках повороту. Загальний результат розподілу мономерів полягає в тому, що білок володіє двома гідрофобними гранями: одна створюється сегментом  $\beta$ -нитки, а інша -  $\alpha$ -спіраллю. У природному стані взаємно привабливі грані розміщені одна напроти одної, але в розгорнутому стані вони, принаймні частково, повинні бути піддані дії розчинника та інших гідрофобних агентів у розчині [15]. Гідрофільні залишки знаходяться переважно на поверхні моделі, згідно з експериментами [300].

## 3.3.3. Взаємодія з коміркою шаперона

Після поміщення в комірку, білок субстрату піддається впливу переважно гідрофільного середовища[14; 15] всередині порожнини GroEL. Раніше було запропоновано кілька типів обмежувальних потенціалів [301; 302] для моделювання цієї гідрофільної порожнини. Зокрема, було зазначено [302], що взаємодії між обмеженим білком та навколишньою порожниною повинні бути короткочасними за характером. Поки білок повністю знаходиться всередині обмежувальної сфери, на його мономерах не повинна діяти додаткова сила. Відповідно, для взаємодії білка з коміркою було розроблено короткосяжний експоненціальний потенціал. В іншій нещодавній роботі [301] було розглянуто степеневу залежність сили та встановлено, що до тих пір, поки потенціал залишається короткосяжним, точне значення показника використовуваного степеня не впливає на остаточні результати. У даній роботі ми припускаємо, що всі мономери взаємодіють через  $1/r^{12}$  відштовхування. При інтегруванні по всій сферичній поверхні ця взаємодія дає кінцевий вираз для потенціалу комірки і білків[30; 301]:

$$U_c(\vec{r}) = 4e_p \frac{\pi R}{5r} \left[ \left( \frac{\sigma}{r-R} \right)^{10} - \left( \frac{\sigma}{r+R} \right)^{10} \right]$$
(3.9)

Тут  $\vec{r}$  це радіус-вектор будь-якого мономеру моделі, який вимірюється з положення центру маси, а R – радіус комірки. Загальна енергія білка, обмежена сферою, складається з усіх згаданих вище термінів.

В симуляціях з гідрофобною поверхнею комірки потенціал взаємодії було отримано в аналогічний спосіб. Замість 1/ $r^{12}$  відштовхування було застосовано повний Ленард-Джонсівський потенціал. Після інтегрування по поверхні сфери, було отримано наступний вираз для взаємодії білка з коміркою[303]:

$$U_{c}(\vec{r}) = 4e_{h}\frac{\pi R}{r}\left(\frac{1}{5}\left[\left(\frac{\sigma}{r-R}\right)^{10} - \left(\frac{\sigma}{r+R}\right)^{10}\right] - \frac{h}{2}\left[\left(\frac{\sigma}{r-R}\right)^{4} - \left(\frac{\sigma}{r+R}\right)^{4}\right]\right)$$
(3.10)

Тут змінна h описує ступінь гідрофобності поверхні. Вона змінюється від 0, коли комірка є повністю відштовхувальною, до 1, коли спостерігається максимальне притягання. Також зауважимо відмінну константу енергії  $e_h$  у виразі (3.10), тоді як в формулі (3.9) використовується константа  $e_p$ .

## 3.3.4. Деталі проведених симуляцій

Процес згортання білків субстрату, обмежених сферичною порожниною, досліджувався методом молекулярної динаміки. Детальніше, положення мономерів та швидкості отримуються за допомогою алгоритму динаміки Ланжевена[145]. Використання цього протоколу має подвійну мету. По-перше, траєкторія, сформована в симуляціях, відтворює канонічний ансамбль, який відповідає умовам постійної температури в реальних експериментах. По-друге, стохастичні члени в алгоритмі допомагають емулювати вплив молекул розчинника на динаміку білка. У виконаних симуляціях єдиний вільний параметр, коефіцієнт тертя, був вибраний таким чином, щоб мономери відчували близько однієї десятої сили тертя, що впливає на амінокислотний залишок невеликого розміру, такого як аланін, у воді при кімнатній температурі. Цей вибір дозволяє значно прискорити кінетичні симуляції, але не впливає істотно на механізм складання[304].

Координати білка для кожної симульованої температури були записані кожні 100 часових кроків і використовувались для побудови гістограм потенціальної енергії, а також спільних гістограм радіуса гірації R<sub>a</sub> та структурної функції перекриття  $\chi$ [288; 305] з потенціальною енергією. Ці гістограми служили в якості вхідних даних в методі множинного зважування гістограм[306], який використовувався для обчислення всіх термодинамічних величин, що представляють інтерес, як функції температури: середньої потенціальної енергії, радіусу гірації та структурного перекриття. Початкові структури для моделювання кінетики згортання були отримані з тривалих симуляцій при T = 700 K, що є значно вищою ніж температура колапсу та згортання. 500 конформацій були відібрані протягом достатньо довгих інтервалів, щоб забезпечити статистичну незалежність. Ці конформації вважаються репрезентативними для розгорнутого ансамблю моделі та були використані для ініціювання моделювання згортання при заданій температурі T і радіуса обмеження R. Під час моделювання функція структурного перекриття моніторилась. У точках, де х досягало 0.9, симуляція зупинялась, і час, що минув від її початку (перший час проходження), фіксувався. Час згортання моделі  $\tau_f$  приймається середнім по всіх 500 попередньо записаних часів першого проходження. Симуляції згортання проводилися для  $\tau_{max}$  =

 $5 \times 10^6$  часових кроків. Якщо протягом цього часу система не досягала свого природного стану, її перший прохід був прийнятий за  $\tau_{max}$ . Таким чином, час складання, отриманий у цьому дослідженні, слід розглядати як нижню межу фактичного часу згортання моделі.

## 3.4. Висновки розділу

У цій роботі ми розглянули роль конфайнменту у процесі згортання білків за посередництва молекулярних шаперонів. Запропоновано нове співвідношення між ступенем фрустрації білка субстрату та відповідним впливом просторового обмеження на механізм та швидкість згортання.

Ми використали спрощене представлення як білка так і шаперона, що зробило проблему такою що може бути розв'язаною чисельними методами, але, тим не менш, дозволила нам відтворити суть згортання в комірці. Шаперонова комірка була змодельована відштовхувальною сферою, яка імітувала гідрофільне покриття порожнини GroEL/ES. Експериментальні дослідження Гартла показали, що певні білки[108] не вимагають кількох раундів зв'язування / вивільнення, щоб досягти покращеного згортання. Приєднавшись до шаперона лише один раз, такі білки згортаються повністю всередині його комірки. Наше дослідження зосередило увагу на розумінні того, як конфайнмент впливає на згортання білків після того, як відбулося попадання в комірку. Спочатку ми розглянули білок з високим ступенем фрустрації, що виникає внаслідок неспецифічних гідрофобних взаємодій. Цей білок згортається в два етапи, з початковим колапсом до компактного глобулярного стану при температурі колапсу  $T < T_c$ , після чого відбувається перегрупування до природного стану при температурі  $T < T_f$ . Залежність часу згортання від температури була V-подібною для всіх радіусів комірки, що характеризується двома областями сильного зростання при високих і низьких температурах. Зовнішня комірка не вплинула на температуру згортання цього білка, проте змістила температуру найшвидшого згортання Т<sub>т</sub> до більш високих значень. В усіх випадках температура згортання виявилася нижчою  $T_m$ , що означає що присутність комірки не призведе до збільшення швидкості згортання в умовах, коли природний стан є термодинамічно стабільним.

Для того, щоб спостерігати покращене згортання в біологічно значущих умовах, необхідно щоб температура згортання білка була вищою за його температуру мінімального часу згортання. Ми збудували модель із такою властивістю, збільшивши силу торсійного потенціалу оригінальної моделі. Як наслідок, модифікований білок мав таку ж топологію, що і вихідний білок, але використовував іншу схему взаємодії. Дана схема приводить до менш фрустрованої поверхні потенціальної енергії за рахунок дестабілізації конформацій з неправильними локальними гідрофобними контактами. Аналіз карт локальних енергетичних мінімумів показав, що мінімуми які слугують кінетичними пастками, вилучаються в присутності комірки. Ці результати підтверджують нещодавню гіпотезу Гартла[108] про те, що просторове обмеження збільшує швидкість згортання білківсубстратів GroEL/ES, зменшуючи шорсткість енергетичного ландшафту.

Для притягальної стінки, комірка може відігравати активну роль, безпосередньо впливаючи на процес згортання. Встановлено, що можна знайти такі параметри системи, за яких згортання всередині комірки може протікати принаймні на порядок величини швидше. Спостережуваний механізм пришвидшення добре узгоджується з моделлю ітеративного відпалу для шаперонів і полягає у створенні альтернативних шляхів згортання завдяки утворенню комплексів білокшаперон.

#### РОЗДІЛ 4.

## АГРЕГАЦІЯ БІЛКІВ В СПРОЩЕНИХ ПІДХОДАХ

Оскільки в агрегації задіяна велика кількість білків, теоретичний опис цього процесу зустрічається з низкою викликів. 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 структури молекул білка. Це стосується, зокрема, утворення білкових олігомерів, таких як, наприклад, проміжні олігомери в Аβ пептидах[135]. З огляду на ці дві вимоги, існує велика потреба в спрощених моделях для симуляцій агрегації, які мають правильну хімічну будову. В даному розділі ми приводимо результати наших досліджень процесу утворення фібрил за допомогою спрощеної моделі.

Спершу, ми запроваджуємо модель для симуляцій довгих поліпептидів та їх комплексів на основі схеми ефективної парної взаємодії (RAPID). Запропонована модель використовує атомну архітектуру білка та стандартне силове поле [307]. Електростатична складова  $\Delta G_{el}$  вільної енергії сольватації враховується через дистанційно-залежну діелектричну сталу. Всі інші складові повної енергії сольватації, яка включає в себе неполярну енергію та можливі похибки в  $\Delta G_{el}$ , представлена парними потенціалами взаємодії, прикладеними до гідрофобних фракцій пептиду. Потенціали отримуються систематично, шляхом підбору парних функцій розподілу між гідрофобними ділянками, отриманими при неявному та явному моделюванні розчинника. Модель застосовується для декапептиду поліаланіну, сольватованого у воді. Пептид, розглянутий у симуляції явного розчинника, залишається переважно у випадкових конформаційного простору спостерігаються в неявній моделі розчинника. Невеликі розбіжності між явними

та неявними моделі спостерігаються в розподілі спіральної структури вздовж ланцюжка. Достовірність отриманої моделі неявної сольватації перевіряється в моделюванні більших пептидів. Знайдено модель з мінімальним числом доданків у потенціальній енергії, яка задовільно описує згортання поліаланінового ланцюга з 25 залишками. У згоді з експериментом [157; 308], спостерігається що 8 поліаланінових ланцюгів різної довжини утворюють подвійно-шарові β-листи як найбільш заселений стан. Як наслідок, можна стверджувати, що запропонована модель є придатною для симуляції агрегації білків.

В подальшому, ми застосовуємо модель RAPID для дослідження впливу зовнішнього електричного поля на білки. Використовуючи алгоритм обміну репліками, ми спочатку досліджуємо згортання пептиду в статичному зовнішньому полі і показуємо, що поле може спричиняти перехід у  $\alpha$ -спіральний стан. Проведено повний термодинамічний аналіз спостережуваного переходу. Далі, попередньо сформовані  $\beta$ -листи, утворені пептидом у рівновазі з мономерами, досліджуєюване згортання призводить до дисоціації  $\beta$ -листа. Результати, отримані для тестового пептиду, екстраполюються на природно розгорнуті пептиди довільної довжини *N* з тим, щоб зрозуміти їхню поведінку в зовнішньому полі. Виходячи з цієї екстраполяції, ми робимо висновок, що дезагрегаційна здатність поля зростає із збільшенням *N*. При *N* = 30 та більше, значення напруженості поля, необхідне для дисоціації амилоїдів, наближається до характерної межі, що притаманна біологічним системам.

У підсумку, наші результати дозволяють припустити, що а) електричне поле може використовуватися як засіб для контролю агрегації невпорядкованих 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 якщо це стосується інтегральних мембранних білків.

## 4.1. Модель спрощеного опису RAPID

#### 4.1.1. Теорія

## 4.1.1.1. Структурні методи для визначення ефективних потенціалів

Енергія сольватації білка обчислюється в цій роботі за допомогою методів структурно-базованих статистичних потенціалів, розроблених в теоретичній фізиці м'якої речовини [259]. Основна мета полягає в апроксимуванні фактичної функції потенціальної енергії складної системи, що може включати багаточастинкові доданки:  $U_T = \sum_{i,j} u^2(r_{ij}) + \sum_{i,j,k} u^3(r_{ijk}) + \dots$ , де  $u^2$ та  $u^3$  представляють 2частинкові і З-частинкові вклади, ефективними парними потенціалами  $U_{e} = \sum_{i,j} u_{eff}(r_{ij})$ , які однозначно визначаються парною функцією розподілу g(r) досліджуваної системи [254]. Історично, вперше ефективні потенціали були отримані для рідин із відомими експериментальними структурними функціями [257; 258]. Зовсім недавно та сама методика була застосована для побудови спрощених, або огрублених, моделей систем, які надто складні для вивчення на атомному рівні [148; 149; 150; 151]. У підході огрублення, спрощені моделі вводяться лише з окремими ознаками, збереженими від атомної архітектури, тоді як ефект від ступенів свободи, якими знехтувано, включається через ефективні потенціали. В обох контекстах теорема однозначності [254] використовується для виведення ефективних потенціалів шляхом розв'язку зворотньої задачі статистичної механіки, яка може бути сформульована наступним чином: "Виходячи з відомої структури, g(r), яким є відповідний потенціал u(r)?".

Для розв'язання цієї проблеми було отримано низку числових рішень, включаючи як старі підходи, що базуються на теорії інтегральних рівнянь рідкого стану [257], так і недавні[258; 309], що спираються на числову інверсію МонтеКарло. Ми будемо використовувати методи на основі методу Монте-Карло з огляду на їхню високу точність, продемонстровану в застосуваннях до широкого кола систем, включаючи розчини електролітів [147], нуклеїнові кислоти [148], пептиди [149; 150], ліпіди [151], а також багато синтетичних полімерів [152; 153; 154; 155]. У багатокомпонентній системі потенціал  $u^{\alpha\beta}(r_{ij})$ , що діє між частинкою *i* сорту  $\alpha$  і частинкою *j* сорту  $\beta$ , буде визначатися ітераційно, з використанням рекурентного співвідношення[258]:

$$u_{l+1}^{\alpha\beta}(r_{ij}) = u_l^{\alpha\beta}(r_{ij}) - \lambda_l kT \log(\frac{g_R^{\alpha\beta}(r_{ij})}{g_l^{\alpha\beta}(r_{ij})}) , \qquad (4.1)$$

де індекс *l* позначає послідовні ітерації,  $g_{R}^{\alpha\beta}(r)$  є парною функцією розподілу системи відліку, отриманою в атомних симуляціях вищого рівня, *k* - константа Больцмана, *T* - температура і  $g_{l}^{\alpha\beta}(r)$  - функція розподілу, отримана для поточної ітерації. Коефіцієнт Дзмінюється в інтервалі від 0 до 1 з тим, щоб контролювати швидкість збіжності ітерацій. Його точне числове значення не впливає на збіжний потенціал, так як цьому випадку  $g_{R}^{\alpha\beta}(r) = g^{\alpha\beta}(r)$ , і логарифм у рівнянні (4.1) зникає.

Як видно з рівняння (4.1), статистичні потенціали залежать від базової функції розподілу  $g_R^{\alpha\beta}(r)$ та через неї, від термодинамічних змінних досліджуваної системи, таких як температура та густина. Густина входить через багаточастинкові взаємодії, які апроксимуються в статистичному потенціалі на парному рівні. У конденсованих фазах, де зіткнення між більше ніж 2 частинками є звичним, багаточастинкові потенціали відіграють важливу роль. Коли густина спадає, їх вплив зменшується, оскільки багаточастинкові конфігурації мають місце набагато рідше, ніж бінарні зіткнення. В границі низької густини (газова фаза) внесок багаточастинкових потенціалів є незначним. В цій границі, ефективні потенціали дають інформацію про справжні, фізично обгрунтовані парні потенціали, характерні для досліджуваної системи:  $u_{eff}(r) = u^2(r)$ . Цей факт може бути використаний для знаходження  $u^2(r)$ , незалежної від густини, із досліджень, в яких густина систематично зменшується.

Заради повноти викладу, слід згадати альтернативний підхід до проблеми огрублення, який базується на алгоритмі підпасування сили, введеному Ерколезі та Адамсом [310] для отримання класичних потенціалів із квантово-механічних симуляцій. Цей підхід був пізніше розвинений Вотом та співробітниками [311] і застосовувався до великого класу біомолекулярних систем, включаючи пептиди [312], цукри[313] та фосфоліпіди [314].

#### 4.1.1.2. Потенціали для гомополімерів

Той факт, що ефективні потенціали залежать від термодинамічних параметрів, має важливі наслідки при застосуванні огрублюючих підходів до полімерів. Розпростоти гомополімери, глянемо для створені реакцією полімеризації деякої хімічної сполуки, наприклад, амінокислот у поліпептидах. Хоча всі елементи такого полімеру є хімічно еквівалентними, вони повинні розглядатися як окремі компоненти при огрублюючому моделюванні через присутність ланцюгового зв'язку. Розглянемо ілюстрацію на Рис. 4.1, яка показує полімер з частинками, пронумерованими від 1 до N. Зосереджуючи увагу на



Рис. 4.1 Ефективні внутрімолекулярні потенціали в гомополімерах. Залежність від того, наскільки далеко один від одного залишки знаходяться вздовж послідовності зникає для достатньо довгих послідовностей. В цьому випадку лише один потенціал описує взаємодію з залишками як на тому самому, так і на інших пептидах.

частинці 1, легко побачити, що локальна густина, утворена частинкою з номером 2, буде відрізнятись від такої ж частинки номер 3, частинки 4 і т. д. Такий же аргумент застосовуємо до будь-якої частинки *i*, генеруючи загальну кількість

N (N-1)/2 потенціалів, характерних для кожної пари залишків,  $u_{i,j}$ , i = 1, N-1, j = i+1, N.

Загалом, всі ці потенціали слід розглядати як окремі. Однак різниця між деякими з них буде малою або неважливою. Розглянемо доданки з найближчими сусідами  $u_{i,i+1}$ . Зрозуміло, що ці потенціали залежатимуть від точного розташування  $u_{i,i+1}$  в послідовності. Через скінченну довжину полімеру,  $u_{1,2}$  на початку послідовності, наприклад, буде відрізнятися від  $u_{N/2,N/2+1}$  всередині послідовності. Крайовий ефект, однак, не буде сильно впливати на загальну конформаційну статистику полімеру в межах великого N, тому ним можна знехтувати. Припустимо, що ті самі аргументи застосовуються до всіх інших сусідів і розглянемо потенціал  $u_{i,j}$ як залежний тільки від кількості залишків, що розділяють *i* та *j*, а саме  $u_{i-j}$ . Це припущення зменшує кількість незалежних потенціалів з N(N-1)/2до N-1.

Крім того, легко побачити, що не всі ці потенціали відмінні. Зосередимось на потенціалах, прикладених до частинки 1, ще раз, як показано на Рис. 4.1. Другі сусіди по ланцюгу створять меншу ефективну густину, порівняно з першими. Ця тенденція продовжуватиметься і для дальших сусідів, які будуть демонструвати все більш низьку густину з віддаленням від залишку 1. Починаючи з певної позиції, сусіди стають некорельованими, займаючи відстань (вздовж ланцюга) довшу, ніж довжина стійкості [272]. Такі сусіди будуть ефективно поводитися однаково, що означає, що вони повинні взаємодіяти з таким самим потенціалом. Таким чином, для достатньо великих відстаней, починаючи з числа  $K_{\text{max}}$  повинна спостерігатись збіжність в ефективних потенціалах [153; 154] так, що  $u_{i-j} = u_{1.K_{\text{max}}}$ ,  $i - j \ge K_{\text{max}} - 1$ . Важливою відмінністю тут у порівнянні з рідиною є те, що граничний ефективний потенціал в полімерах не дорівнює фізичномотивованому парному потенціалу, діючому між складовими одиницями полі-

меру  $u_{1-K_{max}}(r) \neq u^2(r)$ . Хоча густина віддалених сусідів прямує до нуля, відносний внесок багаточастинкових конфігурацій ненульовий у зв'язку з існуванням пептидного ланцюга. Кожного разу, коли сусід  $j > K_{max}$  взаємодіє з частинкою 1, він також взаємодіє із сильно скорельованими з нею частинками, такими як 2, 3 і так далі. Отже, на відміну від рідин, вплив багаточастинкових потенціалів у полімерах не зникає. Як наслідок, ефективні потенціали, отримані для полімерів, завжди містять багаточастинкові внески.

Як довжина збіжності, так і загальна кількість визначених потенціалів залежать від основних властивостей досліджуваного полімеру, таких як хімічний склад амінокислотних залишків, довжина і термодинамічний стан. Якщо полімер використовується для визначення ефективних потенціалів, його розмір  $N_t$ повинен бути більшим за  $K_{max}$ . Тільки в цьому випадку отримані потенціали будуть переносними, тобто можуть застосовуватися до полімерів більшого розміру  $N > N_t$ .

У полімерних розплавах ефективні потенціали для залишків, розташованих на різних ланцюгах, залежатимуть, загалом, від густини полімеру; тут застосовуються ті самі аргументи, що обговорювалися для взаємодії в рамках одного ланцюга. Однак при високому розведенні контакти між ланцюгами будуть поводитися так само, як і внутрі-ланцюгові контакти частинок з великим розділенням, як показано на Рис. 4.1. Таким чином, потенціал отриманий для  $u_{1,K_{max}}$ , може бути використаний при вивченні кількох полімерних ланцюгів у границі низької густини. Для скінченних густин полімерів ефективні потенціали можуть відхилятися від  $u_{1,K_{max}}$ , і у цьому випадку їх потрібно отримувати окремо в мультиполімерних симуляціях явного розчинника, використовуючи той самий формалізм, що застосовувався до внутрі-ланцюгових потенціалів.

#### 4.1.1.3. Застосування до поліаланінових пептидів

Ми застосовуємо структурноорієнтовану теорію, описану вище, для отримання ефективних потенціалів для поліпептидних ланцюгів, що складаються з аланінової амінокислоти. Пептид моделюється у повному атомному представленні, як показано на Рис. 4.2, для кількості залишків N = 10, A10. Дві нейтралізуючі групи АСЕ і NH2 розміщені при N- і С-кінцях, відповідно. Загальна енергія сольватації  $\Delta G$ поділяється на два внески: електростатичну компоненту  $\Delta G_{el}$  і неполярну



**Рис. 4.2** Атомне представлення аланіндекапептиду (А10), розглянутого в даній дисертації для отримання ефективних потенціалів. Сірі сфери показують ділянки взаємодії для неполярних потенціалів.

сольватацію  $\Delta G_{ap}$ . Разом із прямими кулонівськими взаємодіями, електростатичний внесок моделюється як:  $U_c + \Delta G_{el} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij})r_{ij}}$ , де  $q_i$  - заряд частинки i,  $r_{ij}$  - відстань між частинками i та j,  $\varepsilon(r) = 3r$  – залежна від відстані діелектрична стала. Залежна від відстані  $\varepsilon(r)$  [315] є приблизним способом опису енергії сольватації, яка враховує екранування зарядів при великому розділенні у водному розчині. Ця модель відповідає нашому критерію попарної адитивності, і незважаючи на недоліки, широко використовується в сучасних біомолекулярних симуляціях [164; 316]. Константа пропорційності 3 була отримана на основі максимально спостережуваної кореляції між передбаченою цією моделлю енергією сольватації та енергією, отриманою шляхом розв'язку рівняння Пуассона-Больцмана (PB) для розглянутого пептиду, докладно розглянутого в розділі «Моделі та Методи». Основне призначення вибраної електростатичної моделі

полягає в тому, щоб відокремити далекодіючий внесок від загальної вільної енергії, з тим щоб зробити її короткодіючою.



**Рис. 4.3** Функції розподілу для різних пар залишків, як показано на графіку, отримані в явному та неявному моделюванні розчинника при T = 300К. Різниця між цими двома наборами даних ледве помітна. Узгодження такої ж високої якості спостерігається для функцій розподілу отриманих для метильної групи АСЕ. Для ілюстрації ступеня збіжності в явному розчиннику, панель для пари 1-6 показує дані для першої, пунктирної лінії та останньої, штрихпунктирної лінії, траєкторії, по 60*нс* кожна. Відмінності між двома частинами помітні тільки при збільшенні, як показано на вставці для першого максимуму.

Неполярний внесок в енергію сольватації моделюється як  $\Delta G_{np} = \sum_{\alpha,i < j} u_{\alpha}(r_{ij})$ , де

сумування охоплює всі пари частинок, позначених індексами i та j, а також всі типи контактів, позначених індексом  $\alpha$ . У пептиді з 10 залишками існує 9 типів

контактів, від 1-2 до 1-10. Неполярна сольватація застосовується до всіх гідрофобних фракцій, присутніх у пептиді. У випадку поліаланіну, це бічні ланцюгові групи, розміщені на позиціях С<sub>β</sub> атомів, як показано на Рис. 4.2. Крім того, кінцевий АСЕ містить гідрофобну метилову групу, яка також додається до моделі сольватації. Хоча хімічно ця група ідентична до бокових ланцюгів, геометрично вона відрізняється від них. Отже, повинна розглядатися як окрема точка взаємодії з власним набором потенціалів  $u_{0-i}(r)$ , де *i* пробігає значення від 1 до 10. Загалом, 19 різних потенціалів необхідні для опису неполярної сольватації декапептиду: 9 потенціалів діють у бічних ланцюгах, і 10 – діють між *N*-кінцевими та бічними ланцюгами.

Щоб досягти вищої швидкості обчислення, ефективні потенціали припускаються рівними нулю після відстані обрізання  $R_c$ . Це наближення не повинно привести до суттєвих похибок, оскільки неполярні взаємодії є короткодіючими за своєю природою. У наших симуляціях  $R_c$  вибирається рівним 1.2*нм*, що є достатньо великим, щоб включити мікроскопічні деталі ефективної взаємодії між двома малими гідрофобними молекулами у воді, таких як бічний ланцюг аланіну.

## 4.1.2. Застосування

## 4.1.2.1. Неявна модель для декапептиду з 19 потенціалами

Симуляції методом обміну репліками в явному розчиннику були проведені для отримання базисних парних функцій розподілу  $g_R(r)$  для декапептиду аланіну. Ці функції розподілу використовувались для одержання 19 ефективних міжзалишкових потенціалів, обговорених в підрозділі "Теорія". Ітерації були розпочаті з вихідного стану, утвореного за допомогою потенціалів Леннард-Джонса, які дають g(r) з майже коректним розташуванням максимумів. Після 30 ітерацій розрахована g(r) перестає помітно змінюватися. На Рис. 4.3 показано функції розподілу для дев'яти міжзалишкових контактів від 1-2 до 1-10, отриманих в симуляціях явного та неявного розчинника. Узгодження між двома наборами даних є зовсім добре, з усіма основними особливостями g(r), правильно відтвореними для всіх контактів. Таке саме узгодження спостерігається для десяти розподілів, що включають АСЕ метил-групу (дані не показані), що вказує на те, що використовувана модель із 19 потенціалами є кількісно вірною, в розумінні що парні кореляції між гідрофобними групами є достовірними.



**Рис. 4.4** Приклади ефективних потенціалів, отриманих в двох різних варіантах моделювання, а), і в одній симуляції при різних ітераціях, б). Потенціали визначаються з точністю дозволеною числовим характером застосованої процедури. На коротких відстанях помилка в потенціалі найбільш помітна.

Для перевірки відтворюваності функцій розподілу проведено три незалежних набори відповідних симуляцій, sim1 - sim3. Симуляції стартували з різних вихідних наближень для ефективних потенціалів. Для досягнення збіжності було проведено від 20 до 30 ітерацій, котрі були зупинені тоді коли подальші ітерації вже не приводили до покращення функцій розподілу. Всі три набори симуляцій для визначення g(r) на око не відрізняються, що вказує на те, що розв'язок є стабільний. Однак потенціали, отримані в цих тестах, не ідентичні. Як показано на Рис. 4.4(а) для  $u_{1-10}(r)$ , різні вихідні точки призводять до дещо різних потенці алів. Як зазначалося раніше [258; 317], це є наслідком розрахункової природи застосованої процедури, оскільки теоретично є однозначна відповідність між потенціалами та відповідними функціями розподілу [254]. Видно, що область, яка найбільше чутлива до числових помилок, - це короткі відстані, r < 0.5 н M, де парні функції розподілу піддаються сильному статистичному шуму. Як наслідок, енергія взаємодії частинок в цій області, отри-



**Рис. 4.5** Заселеність природного стану, визначена в послідовних ітераціях трьох незалежних моделей. Збіжність до середнього значення 0.12 видно в усіх трьох випадках. Заселеність, що спостерігається в симуляціях явного розчинника, становить 0.1, у доброму узгодженні з неявним розчинником.

мана з підбору, не є вірогідною. Окрім різних вихідних точок, різні ітерації в межах однієї вихідної точки також приводять до помітних відмінностей у потенціалах, як показано на Рис. 4.4(b), для  $u_{1-7}(r)$ , отриманого в ітераціях 22 та 30 пакету sim3. Хоча невеликі відхилення спостерігаються в усьому діапазоні взаємодії від 0 до 1.2*нм*, найбільш помітна відмінність спостерігається для малих *r*, де глибина першого мінімуму змінюється на близько 1 кДж/моль між ітераціями або біля 20%. Оскільки функції розподілу, що генеруються підібраними симуляціями, не відрізняються, застосовувана структурно базована процедура може лише визначати ефективні взаємодії в межах певної похибки.

#### 4.1.2.2. Властивості згортання в явних та неявних розчинниках

Всі конформації, збережені в симуляціях явного розчинника, були згруповані за допомогою середньо-квадратичного відхилення  $C_{\alpha}$  (RMSD) серед структур як міри подібності. Окрема  $\alpha$ -спіральна конформація появляється в цьому аналі

зі як найбільш заселений або природний стан. Розподіл RMSD, розрахований для всіх структур відносно спірального стану, показав максимум при 0.1*нм* і мінімум - при 0.17нм. Останнє значення було використано як граничне для визначення заселення природного стану, що призвело до оцінки 0.1. Такий же аналіз був проведений для моделювання неявного розчинника. Кластерний аналіз показав, що всі три симуляції мають той самий природний стан, який є ідентичним до природного стану моделювання явного розчинника. Зміну розрахованої заселеності в послідовних ітераціях показано на Рис. 4.5. У всіх трьох циклах у початкових 10 ітераціях спостерігаються широкі коливання між 0.05 і 0.3, після чого мають місце невеликі флуктуації. Величина цих флуктуацій не зменшується з часом, як видно для sim1, впродовж 50 ітерацій, що є прямим наслідком числових похибок, характерних для застосовуваної процедури. Тим не менше, на Рис. 4.5 видно, що заселеність при моделюванні неявного розчинника коливасться від 0.1 до 0.14 із середнім значенням 0.12, що дуже добре узгоджується зі значенням 0.1, отриманим в симуляції явного розчинника. Тому навіть із включеними похибками, модель неявного розчинника передбачає таку ж заселеність для природнього стану, як і для явного розчинника. Це досить обнадійливо, враховуючи, що заселеність включає кореляції між частинками вищого порядку, ніж двочастинкові, на яких ґрунтується модель.

Оскільки природний стан симульованого пептиду є спіральним, то є логічним аналізувати його згортання в термінах переходу клубок-спіраль. Для цієї мети ми використовуємо формалізм Ліфсона і Ройга (LR), що є широко поширеним для моделі спіраль-клубок [318; 319]. Залежно від значень двогранних кутів  $\phi, \psi$  кожен залишок у цій моделі може перебувати в двох станах: спіралі або клубку. Припустимо, що спіральні залишки визначаються як  $-90^\circ < \phi < -30^\circ$  і  $-77^\circ < \psi < -17^\circ$ , а всі інші значення відповідають стану клубка [320]. Статистична вага спіральних залишків залежить від того, чи вони є частиною спіральних сегментів, чи ні. Спіральний залишок є частиною спірального сегмента, якщо

його найближчі сусіди по послідовності, один залишок, що передує йому, і один залишок, що слідує за ним, є також спіральними. Таке означення вимірює скорельоване перетворення щонайменше трьох залишків у спіральний стан і запобігає тому, що кінцеві залишки будуть у спіральних сегментах. Спіральність кожного залишку, або фракція спіральної заселеності, визначається як ймовірність знаходитися у спі-



**Рис. 4.6** Ймовірність того, що кожен залишок буде в спіральному сегменті, обчислена у цій дисертації в явному та неявному моделюванні розчинника. Неявна модель помітно недооцінює "спіральність".

ральному сегменті. **Рис. 4.6** показує цю ймовірність, розраховану моделюванням в явному та неявному розчиннику. Дані неявного розчинника узгоджуються між усіма трьома моделями, при цьому окремі ймовірнісні показники відрізняються не більше, ніж на 2 проценти. Ймовірності явного розчинника добре узгоджуються з ймовірностями неявного розчинника на якісному рівні. Максимум при залишках 4 та 5, малий злам при залишку 2 та поступове зменшення ймовірностей при С-закінченні, всі ці особливості спостерігаються для обох наборів даних. З кількісної точки зору заселеність у неявному розчиннику недооцінюється на 4-6 процентів, залежно від залишку.

На Рис. 4.7 показано функцію розподілу радіуса гірації Rg порахованого для Са атомів, отриману при моделюванні в неявному та явному розчинниках. Три симуляції в неявному розчиннику дуже добре узгоджуються між собою. Порівняно з явним розчинником, вони правильно відтворюють основний максимум близько 0.5*нм* і повільно спадаючий хвіст при великих Rg. Невелика розбіжність

спостерігається в хвостовій області, яка є видимою лише в подвійному логари-

фмічному масштабі. Як показано на Рис. 4.7(б), злам у кривій явного розчинника при Rg = 0.75нм не відтворюється даними неявного розчинника. Замість цього трохи більша заселеність спостерігається при Rg>0.8нм. Цей ефект невеликий, однак він впливає на вже незначно заселену частину структурного простору.

# 4.1.2.3. Переносна модель неявного розчинника

Очікується, що не всі ефективні потенціали, отримані для поліпептиду, є повністю відмінними. На підставі загальних міркувань в підрозділі "Теорія" стверджувалос



**Рис. 4.7** Розподіл ймовірності радіусу гірації для атомів Сα в явному та неявному моделюванні розчинника, показаний у лінійних, а) та log-log, b), масштабах. Невелика розбіжність між даними неявного та явного розчинника видно на панелі б) у хвості функції розподілу.

підрозділі "Теорія" стверджувалося, що існує максимальне число  $K_{\max}$ , для якого  $u_{1-k}(r) = u_{1-K_{\max}}(r), k \ge K_{\max}$ . Щоб дослідити залежність  $u_{1-k}(r)$  від контактного числа

k, було розраховано величину  $dU_{1-i} = \sqrt{\frac{\sum_{r_{min}}^{r_{max}} (u_{1-i+1}(r) - u_{1-i}(r))^2 dr}{r_{max} - r_{min}}}, i = 2,9, яка порівнює наскільки два потенціали <math>u_{1-i+1}(r)$ і  $u_{1-i}(r)$  відрізняються між собою в діапазоні  $[r_{min}, r_{max}]$ , де вони визначені. Згідно з нашими аргументами,  $dU_{1-i}$  прямує до нуля при  $i = K_{max}$ . На **Рис. 4.8** показано  $dU_{1-i}$  а) та  $dU_{0-i}$  b), розраховані для потенціалів, що діють між ACE і бічними ланцюгами, як функції індексу *i*. Для визначення

135

відтворюваності результатів представлено багаторазові симуляції/ ітерації. Існує значний розкид на кривих, особливо для найближчих сусідів із i = 2 і 3, що можна пояснити числовим шумом при отриманні потенціалів. Загальною тенденцією усіх зображених даних є швидке спадання обох  $dU_{1-i}$  i  $dU_{0-i}$  пiсля i = 4. Як і очікувалося, ці величини ніколи не досягають нуля з тої причини, що вони містять числові похибки. Але для досить далеких сусідів, позначених стрілками, спостерігається збіжність до плато. Відповідно до Рис. 4.8, потенціали для бічних ланцюгів з контактним номером 7 і більше слід розглядати як ідентичні. Такий же номер для *dU*<sub>0-i</sub>, складає 6. Модель з такими властивостями має 6 однозначно визначених потенціалів  $u_{1-k}(r), k = 2,7$  і 5 потенціалів  $u_{0-k}(r), k = 1,5$ (потенціал  $u_{0-6}(r) \in$  рівним  $u_{1-7}(r)$  в далекодіючій границі, тому він є однозначно визна-



Рис. 4.8 Збіжність ефективних потенціалів для бічних ланцюгів, а), а також АСЕ та бічних ланцюгів, б) до граничної, незалежної від густини форми в границі дальних контактів. Величини  $dU_{1-i}$  та  $dU_{0-i}$  вимірюють, наскільки відрізняються два потенціали з контактними номерами i + 1 і i. Стрілки вказують, де залежність падає майже до нуля. Показані дані для різних симуляцій та ітерацій. Різниця між двома найкоротшими контактами, 1-2 та 1-3 для бічних ланцюгів і 0-1 та 0-2 для групи АСЕ, є занадто великою, щоб бути показана на заданій шкалі.

ченим); надалі ця модель буде називатися М6/5.

У цій моделі існує 11 різних типів міжчастинкових відстаней. Відповідно, 11 різних потенціалів були повторно отримані з даних для явного розчинника (показано на **Рис. 4.9**). Сильна залежність від контактного номера спостерігається



Рис. 4.9 Ефективні потенціали, отримані для моделі М6 / 5.

для найближчих сусідів та наступних за найближчими сусідами потенціалів  $u_{1-2}(r)-u_{1-4}(r)$  для бічних ланцюгів, та  $u_{0-1}(r)-u_{0-3}(r)$  для бічних ланцюгів та АСЕ групи. Для деяких із цих потенціалів функції розподілу не містять даних для r близьких до  $R_c$ , що вимагає застосування коротшого радіусу обрізання. Починаючи з дальніх тризалишкових сусідів,  $u_{1-k}(r), k \ge 5$  і  $u_{0-k}(r), k \ge 4$  потенціали починають виглядати однаково. Їх основними загальними рисами є наявність першого мінімуму при  $r\sim0.33$ нм і широкого максимуму при  $r\sim0.65$ 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[294], але він також містить усереднений внесок від гідрофобних груп, а також інших частинок, присутніх у пептиді. Десольватаційний бар'єр є надто низьким, <3кДж/ моль, щоб суттєво змінити динаміку пептидів.

#### 4.1.2.4. Тести на переносність

На Рис. 4.8 видно, що довжина пептиду з десяти амінокислотних залишків є достатньою для отримання збіжності ефективних потенціалів до їх граничної далекодіючої форми. Як зазначено в підрозділі "Теорія", збіжні потенціали правильно описують залежність від густини і, отже, повинні бути переносними на пептиди з більшою кількістю залишків. Ми перевірили це твердження безпосередньо, досліджуючи ланцюг поліаланіну з 25 залишками (A25) у явному розчиннику. На додаток до моделі M6/5 ми також розглядаємо моделі M4/3, M5/4 та M7/6, які побудовані аналогічним чином і містять відповідно 7, 9 та 13 однозначно визначених потенціалів. Після досить великої кількості допасовних ітерацій, всі ці моделі продукують парні функції розподілу, які важко розрізнити.

Симуляції в явному розчиннику показують, що пептид А25 залишається переважно невпорядкованим клубком, подібно до розглянутого раніше А10. Спіральні частки окремо для кожного залишку показано на Рис. 4.10(a). Спостерігається такий же рівень структурування, як і для А10, з досягненням ймовірності рівня 0.15, за винятком залишків 17-21, де ймовірність є трохи вищою. На відміну від А10, спостерігається мінімум по середині пептиду, де знаходяться залишки 12-13. Результати моделей неявних розчинників поділяються на дві групи. Перша група містить M4/3 і M5/4 і генерує спіральність у доброму числовому узгодженні з явним розчинником, за винятком мінімуму, який не відтворюється. Друга група включає M6/5 та M7/6 і показує нижчу спіральну імовірність загалом, але з формою розподілу, що краще узгоджується з результатами явного розчинника. Обидві моделі мають плоску ділянку між залишками 5 і 17, а М7/6 має найменший мінімум. Не слід очікувати, що неявний розчинник буде працювати краще для А25, ніж для А10, для якого він був виведений. Враховуючи рівень узгодженості між неявними та явними розчинниками для А10, можна зробити висновок, що моделі в першій групі М4/3 та М5/4 є якісно неправильними.

Цей висновок підтверджується аналізом функції розподілу радіуса гірації P(Rg), показаної на **Рис. 4.10** (б). Видно, що моделі, що мають принаймні 11 потенціалів, генерують P(Rg), що якісно узгоджується з явним розчинником. Вона включає в себе основний максимум при  $R_g \sim 0.7 \mu M$ , який правильно передбачений більшою заселеністю, і невеликий максимум при  $R_g \sim 1.4 M$ , що, як видно, має меншу заселеність. На відміну від цієї форми, M4/3 і M5/4 передбачають P(Rg), що має лише один максимум. Замість заповнення невпорядкованих станів клубка, ці моделі передбачають видовжені стани, в прямому протиріччі з моделюваннями явних розчинників.

Обидві властивості, показані на Рис. 4.10, вказують на те, що моделі з менш ніж 11 ефективними потенціалами невдало описують залежність густини в контексті поліаланінових пептидів і, таким чином, не можуть бути переносними. Ця обставина має значні наслідки для різноманітних характеристик конформаційних станів, включаючи розмір пептиду та його вторинну структуру. З іншого боку, моделі М6/5 та М7/6 дають якісно коректні результати. Хоча узгодження з явним розчинником погіршується порівняно з тим, що спостерігається для А10, найважливіші характеристики сформованих ансамблів відтворю-



Рис. 4.10 Розподіл спіральності для залишків, а), і розподіл радіуса гірації, б), для поліаланінового пептиду з 25 залишками. Панель b) використовує логарифмічну шкалу для кращої видимості. Показано дані для симуляцій в явному розчиннику разом з кількома моделями неявних розчинників. Моделі з менш ніж 11 потенціалами - непереносні.

ються правильно. Обидві моделі є переносними в тому сенсі, що вони забезпечують належний баланс різних сил, що діють у пептидах у масштабах різної довжини. Мінімальна переносна модель, виявлена в наших симуляціях, це М6/5.

## 4.1.2.5. Застосування до декількох ланцюгів

Для перевірки придатності мінімальної моделі для вивчення самоорганізації пептидів було розглянуто дві системи поліаланіну з різною кількістю залишків N=4 та 6. Вісім поліпептидних ланцюгів моделювалися в симуляційній комірці розміром 15*нм*, що давало концентрацію пептиду порядку mM. Аналогічний діапазон концентрацій розглядався в експериментальних агрегаційних дослідженнях подібного аланін-збагаченого пептиду, який містив декілька заряджених залишків, доданих з метою покращення розчинення у воді[308]. Середня відстань між пептидами при вибраній концентрації складає понад 40 Å, що є більше, ніж відстань 21 Å між сусідами 1 і 7 (найкоротший фрагмент, що забезпечується переносними потенціалами) у формі повністю витягнутої пептидної структури. Таким чином, полімерний розчин може розглядатися як розбавлений, що обгрунтовує використання міжпептидних потенціалів, отриманих в результаті одноланцюгового моделювання.

Обидва пептиди, тетрааланін та гексааланін, зазнають переходу в агрегований стан при достатньо низькій температурі. На **Рис. 4.11** показано часову еволюцію радіуса гірації  $R_g$  для атомів С $\alpha$  (розрахованого після кластеризації пептидів) та загальну суму  $\beta$  структури (визначення наведене в підрозділі "Моделі та Методи") для N = 4 та T = 260К, отриманих у траєкторії, що розпочинається з двох "в регістрі" антипаралельних  $\beta$  аркушів, розміщених один напроти одного, як початкової конформації. Початкова  $\beta$  структура зникає швидко і незворотно. Після приблизно 10*нс*  $\beta$ -вміст зменшується від 100% до 20% і залишається на цьому рівні впродовж решти часу моделювання (див. **Рис. 4.11**(а)). Втрата  $\beta$ структури не супроводжується втратою агрегації, однак. Стани з малими  $R_g < 1nm$ 

(на Рис. 4.11 (б)) з'являються незабаром після того, як початкова конформація розпадається. Однак наново сформовані агрегати займають лише невпорядковані клубкові конфігурації. Таким чином, наші симуляції показують перетворення β-листових агрегатів у невпорядковані скупчення, які представляють стан із, вочевидь, нижчою вільною енергією. Цей висновок підтверджується ще двома траєкторіями, розпочатими з випадкового дезагрегованого стану та з β-листової конформації, обидві з яких приводять до невпорядкованих агрегатів як найбільш стабільних структур.

Довший пептид із шістьма залишками демонструє більш інтенсивну агрегацію порівняно з коротшим пептидом із



Рис. 4.11 Часові висліди, отримані при моделюванні 8 тетрааланінових ланцюгів в симуляціях, які були розпочаті зі складеного антипаралельного  $\beta$ -листа (показаного на вставці) як початкової конформації. Панель а) показує сумарну  $\beta$ -структуру як функцію часу (зверніть увагу на логарифмічний масштаб осі *x*). Початковий  $\beta$ -лист зникає в перших 10 наносекундах симуляції і більше не з'являється. Панель b) показує радіус гірації *Rg*, обчислений для атомів Са. Компактні конформації, *Rg* <1*нм*, знаходяться в рівновазі з дезагрегованими станами, *Rg*>1нм. Після перших 10*нс* залишаються лише агрегати що не мають  $\beta$ -структури.

чотирма залишками, розглянутих при однаковій температурі та концентрації. Це видно з **Рис. 4.12**, що показує  $R_g$  двох траєкторій для випадку N = 6 та симуляцій, що розпочаті з: а) антипаралельного β-листа, d) випадкового клубка, де-

загрегованого стану. Обидві траєкторії передбачають переважаючу заселеність агрегованих станів. β-вміст у першій траєкторії, Рис. 4.12 (б), в перші кілька наносекунд спадає зі 100% до 80% і залишається на цьому рівні протягом решти часу моделювання. Конформації з низькою заселеністю В-структури (приблизно 10%) спостерігаються, починаючи з 200нс часу моделювання. Друга траєкторія, Рис. 4.12(е), продукує лише конформації, які не містять в структури. Як видно на Рис. 4.12(с), що показує графік залежності β-вмісту від <sub>Rg</sub> для першої траєкторії, такі конформації як агреговані - при малих Rg, так і дезагреговані - при великих <sub>Rg</sub>. Конформації, багаті на β-структуру, можуть бути як невеликими за розміром, <sub>Rg</sub> <1нм, що відповідає геометрично ідеальним β-листам, так і відносно великими, *Rg* >2*нм*, що відповідає β-листу з однією дисоційованою ниткою. Хоча в обох траєкторіях спостерігаються компактні невпорядковані агрегати, вони становлять меншість в першій траєкторії і чітку більшість у другій траєкторії. Цю невідповідність можна пояснити двома сценаріями. По-перше, невпорядковані агрегати відповідають справжньому мінімуму вільної енергії, і вони не спостерігаються як в першій траєкторії через брак збіжності в моделюванні. По-друге, В -листові конформації є більш стабільними різновидами, а невпорядкований стан виявляється домінуючим у другій траєкторії лише через недостатній час симуляції. Щоб з'ясувати, який сценарій насправді має місце, було проведено третю симуляцію, в якій дві конформації були змушені конкурувати одна з одною. Для цього половина всіх реплік була взята в конформації В-листа, а іншої половина – агрегованих невпорядковано-клубкових конформацій, спостережуваних у другій траєкторії. За однакових початкових умов, конформація з нижчою вільною енергією повинна спостерігатися з вищою ймовірністю. В нашій симуляції спостерігався зсув заселеності в бік  $\beta$  -листа, що вказує на те, що ця конформація є більш стабільною. Отже, відсутність утворення β-листа на **Рис. 4.12**(е), вказує на те, що ця структура є кінетично малодоступною. Повільна нуклеація не є рідкістю у формуванні фібрил багатьох пептидів [321]. В дос-



Рис. 4.12 Часові висліди двох траєкторій, отриманих для системи, складеної з 8 ланцюгів аланінового гексапептиду. Панелі а) -с), Тгај 1, відповідають початковій конформації антипаралельного  $\beta$ -листа. Панелі d) -f), Тгај 2, показують дані для дезагрегованої вихідної конформації випадкового клубка. Радіус гірації, а) та d), а також частка  $\beta$  структури, b) та e), показані як функція часу у двох траєкторіях. 2D зображення цих двох величин показані в панелях c) та f).

лідженій системі додаткова складність полягає в тому, що її первинна структура включає лише одну амінокислоту. Відомо, що ця властивість індукує надлишкову фрустрацію в поверхні вільної енергії[322; 323], що ще більше сповільнює динаміку.

Виявлена поведінка аланінгексапептиду показує, що він не тільки більш схильний до неспецифічної агрегації, ніж тетрапептид, але також утворює більш легко агрегати з високим вмістом β-листа. Ця тенденція дуже добре узгоджується з результатами нещодавніх експериментальних досліджень для аналогічних пептидів (різниця обмежена кількома зарядженими залишками, доданими з метою розчинності) [157; 308], які показують, що відсоток агрегованої β-структури збільшується з довжиною пептиду.

#### 4.1.3. Моделі, методи та технічні деталі

Всі симуляції, про які повідомляється в цій дисертації, були виконані пакетом молекулярного моделювання GROMACS [121; 324]. Пептиди були змодельовані за допомогою силового поля OPLS / AA [307] з нейтралізуючими групами ACE та NH2, долученими до карбокси- та аміно-кінців, відповідно. Всі симуляції виконувалися за допомогою протоколу обміну репліками [325] з температурою, вибраною рівномірно між двома граничними значеннями по оберненій температурі. Хімічні зв'язки що містять атоми водню в білку були обмежені відповідно до алгоритму LINCS[326]. Часовий крок встановлено на рівні  $2\phi c$ . Симуляції явного розчинника виконувались за допомогою моделі води TIP3P [33]. Хімічні зв'язки в молекулах води утримувались за допомогою алгоритму SETTLE [327]. Термостат Нозе-Гувера [328] з постійною часу 0.5nc використовувався для підтримки постійної температури. Для взаємодії ван дер Ваальса було використано одиночний радіус обрізання 0.8hm із переліком сусідів, які оновлюються кожні 10 часових кроків. Для розрахунку електростатичних взаємодій застосовувався метод гладко-частинкової сітки Евальда(РМЕ) [329].

Симуляції неявного розчинника були проведені за допомогою алгоритму динаміки Ланжевена з коефіцієнтом тертя, встановленим при 0.5*nc*<sup>-1</sup>. Для урізання дисперсійних та неполярних взаємодій використовувався радіус 1.2*нм*. Розглянуто кілька траєкторій та моделей, як це було описано в попередніх підрозділах.

Електростатична енергія сольватації була змодельована за допомогою діелектричної проникності  $\varepsilon(r) = \alpha r$ , залежної від віддалі (DD), де коефіцієнт пропор-
ційності α визначався наступним чином. Сто конфігурацій пептиду, включаючи природний стан, були обрані випадково з траєкторії явного розчинника для А10. Електростатична енергія сольватації оцінювалась для цих станів в наближенні діелектричного середовища шляхом розв'язку рівняння Пуассона-Больцмана в СНАRMM [31]. Енергія сольватації, яка відповідає моделі DD, оцінювалася як різниця між загальною електростатичною енергією в цій моделі та електростатичною енергією у вакуумі. Для сумісності з неполярною частиною енергії сольватації, в цих обчисленнях використовувався радіус обрізання 1.2нм. Коефіцієнт кореляції між результатами PB та DD розрахунків оцінювався як функція а. Після сильної варіації при малих α<1, коефіцієнт кореляції досягає плато близько 0.91 при α> 3. Кореляція 1 означає повну функціональну залежність між двома змінними. Нахил лінійної залежності між результатами DD та PB також було визначено як функцію α. Було встановлено, що нахил зменшується від приблизно 0.9 для малих  $\alpha \sim 1$ , до 0.2 при  $\alpha > 5$ . Нахил визначає електростатичний внесок у різницю електростатичної енергії між двома конформаційними станами. Таким чином, він має досягати 1 для точного опису енергетичного ландшафту. Ми виявили, що обидві властивості, коефіцієнт кореляції та нахил не можуть досягати значень, близьких до 1 для тих самих α. В якості компромісу, ми обрали  $\alpha$ = 3, як значення, що зберігає високим коефіцієнт кореляції при максимально можливому нахилі.

Аналіз вторинної структури траєкторій у цій дисертації виконувався за протоколом Кабша та Сандера [330]. Стислий виклад усіх проведених моделювань наведено в Таб. 4.1. Тривалість моделювання визначалася на основі збіжності відповідних парних функцій розподілу.

Симуляція	Час симу-	Темпера-	Число	Розмір комірки
	ляції (нс)	тура (К)	реплік	симуляцій (нм)
Декапептид алані-	126	300-600	44	3.7
ну (А10) в явному				
розчиннику				
А10 в усіх моделях	80	250-600	12	8
неявного розчинника				
Поліпептид алані-	400	300-600	80	5.6
ну з 25 залишками				
(А25) в явному роз-				
чиннику				
А25 використову-	200	280-600	24	11.56
ючи модель М6/5				
8 ланцюгів пепти-	1000	260-500	24	15
ду із 6 залишками				
8 ланцюгів пепти-	1000	250-500	24	15
ду із 4 залишками				

Таб. 4.1 Короткий опис всіх симуляцій, описаних у цій роботі

### 4.2. Дослідження білків у зовнішньому електричному полі

### 4.2.1. Оцінка впливу поля з комп'ютерних симуляцій

4.2.1.1. Електричне поле індукує дипольні моменти способом специфічним для конформаційних станів

Ми розглядаємо декілька поліаланінових пептидів і виконуємо перше, на сьогоднішній день, систематичне дослідження конформаційного переходу під дією поля на мікроскопічному рівні. Використано пептид, який був детально описаний в попередньому розділі [34] і містить шість амінокислотних залишків, N=6. Зауважимо, що досліджуваний пептид залишається в основному випадковим клубком з невеликим вмістом  $\alpha$ -спіральної структури [34] за відсутності поля, що робить його вдалою моделлю для білків розгорнутих в їх природньому стані. Для простоти, ми направляємо поле вздовж осі X і використовуємо наступні поКлючем до механізму прямої взаємодії поля і пептиду є здатність останнього реагувати на електричне поле по різному в залежності від того в якому стані він перебуває.

За відсутності поля, всі орієнтації пептиду є однаково ймовірні. Як наслідок, середній дипольний момент доступний для вимірювання є нулем, незважаючи на те, що деякі конформації можуть мати ненульові диполі. Коли поле увімкнене, симетрія Гамільтоніана системи порушується, і конформації вирівнюють дипольний компонент у напрямку поля. Отримана поляризація специфічна для кожної конформації і залежить від її постійного дипольного моменту. На Рис. 4.13 показано дипольні моменти як функцію напруженості поля Е, обчислену окремо для згорнутого  $\langle d \rangle_{f}$ , і розгорнутого  $\langle d \rangle_{u}$  станів. Кутові дужки вказують на те, що дипольні моменти відповідають термодинамічній рівновазі і обчислюються як середні значення. Дані подані для Т=293К, яка є близькою до температури 300 К, для якої було отримано модель[34]. Конформації з випадковим середнім квадратичним відхиленням (RMSD) від спірального стану(визначений як найбільш заповнений кластер) для C<sub>a</sub> атомів меншим ніж 0.1*нм* приймались за згорнуті, тоді як всі інші вважалися розгорнутими. Використане значення параметра обрізання було визначено з позиції першого мінімуму у функції розподілу RMSD. Обидві криві на Рис. 4.13 демонструють однакову якісну поведінку: залежності є лінійними при малих Е і стають насиченими для сильних полів. Лінійний режим для згорнутого стану спостерігається при *E* <0.1*B/нм*, тоді як для розгорнутого стану він простягається до *E*=0.6*B*/*нм*. Так як спіральні конформації мають великий диполь, спостережуваний значний дипольний момент природного стану є очікуваним. Але велике абсолютне значення  $\langle d \rangle_{u}$  є дещо несподіваним. Бічні ланцюги поліаланінового пептиду, досліджені в цій роботі, є електронейтральними. Крім того, заряджені групи на кінцях нейтралізуються, як обговорюється в розділі "Методи та моделі". Ці обставини залишають пептидний зв'язок як єдине джерело дипольного моменту для даної пептидної конформації. Якщо розгорнутий стан вважається невпорядкованим, пептидні зв'язки в

розгорнутій конформації повинні мати випадкові напрями і, таким чином, продукувати незначне значення повного дипольного моменту. Дані на Рис. 4.13 показують, що таке припущення не є виправданим для досліджуваного пептиду і кількість певна залишкової структури існує у розгорнутому стані. В загальному, очікується, що кількість цієї структури у великій мірі залежить від природи досліджуваної системи.



Рис. 4.13 Дипольні моменти обчислені окремо для згорнутого,  $\langle d \rangle_f$ , та розгорнутого,  $\langle d \rangle_u$ , станів як функція напруженості поля *E*. Видно чіткі лінійні режими, позначені стрілками, після яких спостерігається насичення.

### 4.2.1.2. Згортання у спіральну структуру під дією поля

Вплив електричного поля на конформаційний стан *а* можна оцінити за допомогою термодинамічного інтегрування:

$$\Delta F_a(E) = F_a(E) - F_a(0) = -\int_0^E \langle d \rangle_a(E) dE$$
(4.2)

де  $\Delta F_a(E) = -kT \log(Z_a(E)/Z_a(0))$  - вільна енергія та  $Z_a(E) = \int_{\Omega_a} e^{-\beta(H-dE)} d\Gamma$  це конфігураційний інтеграл в полі *E* для стану *a*. Тут, *k* – стала Больцмана, *T* – температура,  $\beta = 1/kT$ , *H* – Гамільтоніан системи,  $\Omega_a$  визначає межі стану *a*, а інтегрування

відбувається в конфігураційному просторі Г. Символ <···><sub>*a*</sub> вказує на усереднення конформацій стану *a*. Застосовуючи інтегрування окремо для згорнутого та розгорнутого стану, можна отримати наступний вираз для відносної вільної енергії:

$$\Delta\Delta F(E) = \Delta F_f(E) - \Delta F_u(E) = -\int_0^E [\langle d \rangle_f - \langle d \rangle_u](E) dE =$$

$$-kT \log(\frac{Z_f(E)Z_u(0)}{Z_u(E)Z_f(0)}) = -kT \log(\frac{P_f}{1 - P_f}) - \Delta F_0$$
(4.3)

де  $P_f$ - заселеність природного стану в полі силою E,  $\Delta F_0$  - це різниця вільної енергії між згорнутим та розгорнутим станами за відсутності поля. Рис. 4.14 показує  $\Delta\Delta F$ , обчислене в наших моделюваннях як функція від E. Похибки, показані на цьому рисунку, були оцінені за допомогою блочного аналізу[145], розділивши вихідну траєкторію(400*нс*) на 10 частин тривалістю по 40*нс* кожна. Оскільки оцінений час автокореляції становить менше 1*нс*, розділення дає 10 статистично незалежних вимірювань. На шкалі малюнка, похибки є порівняні з розміром символів позначень, що демонструє задовільну збіжність представлених даних. Всі значення напруженості, як видно, посилюють природний спіральний стан. Стабілізація не є значною для малих E < 0.2B/hm, де  $\Delta\Delta F$  не перевищує 2кДж/моль. Для більших E різниця вільної енергії стає помітною, досягаючи 9кДж/моль при E = 1 В/*нм*.

Для визначення термодинамічних причин, через які відбувається стабілізація природного стану,  $\Delta\Delta F$  було розкладено на вклади ентальпії та ентропії за формулою:

$$\Delta\Delta F(E) = \Delta\Delta H(E) - T\Delta\Delta S(E) \tag{4.4}$$

де обидві  $\Delta\Delta H(E)$  та  $\Delta\Delta S(E)$  в загальному є функціями температури. Враховуючи дану вихідну температуру  $T_r$ , можна отримати наближене значення для  $\Delta\Delta F$ 

будь-якій температурі Т розкладанням при Тейлора, В ряд  $\Delta\Delta F(T) = \Delta\Delta F(T_r) + \frac{d\Delta\Delta F(T)}{dT} |_{T=T_r} (T - T_r) + \dots, \qquad \text{який}$ можна перетворити на  $\Delta\Delta F(T) = \Delta\Delta H(T_r) - T\Delta\Delta S(T_r) + \dots$  якщо пригадати, що ентропія пов'язана з першою похідною вільної енергії за T,  $-\Delta\Delta S = \frac{d\Delta\Delta F}{dT}$ . Таким чином, рів. (4.4) можна розглядати як лінійне наближення для  $\Delta\Delta F$ , при якому як ентропія, так і ентальпія відповідають температурі відліку  $T_r$ . Якщо температурна залежність  $\Delta\Delta F$  є доступною для Т ~ Т, то рівняння вільної енергії може бути використане для вилучення  $\Delta\Delta H$  і  $\Delta\Delta S$  шляхом підгонки. Це є основою процедури, яка використовується спільнотою моделювання білків[331] для розрахунку ентропії та ентальпії з профілів вільної енергії, отриманих при різних температурах. У нашому випадку вихідна температура була встановлена 293К. Були розглянуті ще два значення температури, обидві зі списку реплік, одна відразу над  $T_r$ , а інша під  $T_r$ . Пізніше аналіз лінійної регресії виконувався по трьох точках для кожного Е та призвів до чисельних оцінок ΔΔH i ΔΔS. Слід зазначити, що крім статистичної похибки, присутньої у вибірці вільної енергії, ентропія та ентальпія, визначені з підгонки, також містять числові похибки, пов'язані з якістю лінійного наближення. Як видно з Рис. 4.14, на якому відкладені  $\Delta\Delta H$  і  $\Delta\Delta S$ , похибка у складових функціях більша, ніж у вільній енергії, але в цілому все ще мала по відношенню до величини самих функцій. Наявність цієї похибки не повинна впливати на наші висновки щодо поведінки досліджуваних властивостей як функції Е.

На Рис. 4.14 видно, що ентальпія стабілізує природний стан при всіх E.  $\Delta\Delta H$  проходить через мінімум -7кДж/моль при E~0.4 В/нм, після чого підіймається до ~3кДж/моль при найбільшому розглянутому значенні E. При 0.2<E<0.7В/нм, де стабілізація природного стану стає значною, внесок ентальпії є домінуючим. Ентропія чинить опір посиленню природного стану при E<0.6В/нм, але починає

підтримувати його при більших значеннях напруженості поля. При *E*>0.8В/нм, величина вкладів ентропії та ентальпії є приблизно однаковою.

Немонотонна поведінка  $\Delta\Delta H$  і  $\Delta\Delta S$ , зокрема спостереження, що ентропія стабілізує природний стан, є незвичною і вимагає подальшого дослідження. Щоб полегшити аналіз, вклади, спричинені згорнутими та розгорнутими станами до цих величин, оцінювалися окремо. Спочатку, рів. (4.2) було проінтегровано чисельно для отримання компонентів вільної енергії  $\Delta F_f$  і  $\Delta F_u$ , які були розділені на вклади ентальпії  $\Delta H_{u,f}$  та ентропії– $T\Delta S_{u,f}$  через підгонку, використовуючи ту саму процедуру, яку було використано для відносної вільної енергії  $\Delta\Delta F$ .

Ентальпію можна представити суму ЛВОХ виразів: як  $\Delta H_f = \Delta U_f - \langle d \rangle_f E,$ де  $\Delta U_f = U_f(E) - U_f(0)$  це викликана полем зміна внутрішньої енергії згорнутого стану, а другий член відповідає взаємодії постійного диполя <*d*><sub>*f*</sub> із зовнішнім електричним полем. Такий самий розклад на доданки може бути застосований для розгорнутого стану. Внутрішня енергія змінюється, оскільки поле приводить пептид до станів, відмінних від тих, що вони приймають при Е=0В/нм. Однак слід зазначити, що нові



Рис. 4.14 Внесок поля у різні відносні термодинамічні функції згорнутого та розгорнутого станів. Усі значення напруженості поля підсилюють утворення згорнутого стану. Точні причини стабілізації варіюються в залежності від E, що обговорюється в основному тексті. Квадратичне наближення для  $\Delta\Delta F$  позначається як  $\Delta\Delta F_c$ . Похибки оцінювалися за допомогою блочного аналізу, розділивши початкову траєкторію на 10 статистично незалежних фрагментів

стани залишаються в межах відповідних згорнутих та розгорнутих ансамблів. З цими позначеннями відносна ентальпія може бути записана як сума двох виразів:  $\Delta \Delta H = \Delta \Delta U - E \Delta d$ , де  $\Delta \Delta U = \Delta U_f - \Delta U_u$  та  $\Delta d = \langle d \rangle_f - \langle d \rangle_u$ . Рис. 4.15(a), на якому ці вирази побудовані разом із  $\Delta\Delta H$  як функцією електричного поля, показує, що  $\Delta\Delta H$  домінує через доданок поля –  $E\Delta d$ , тоді як  $\Delta\Delta U$  робить лише невеликий внесок із значенням меншим ніж ЗкДж/моль. Оскільки Δd є додатнім, природний стан стає більш численним для значень поля 0.2 <E <0.7В/нм. Цей механізм стабілізації природного стану є повністю сумісним з інтуїтивним очікуванням, що поле скеровує конформації в бік структури з найбільшим дипольним моментом. В свою чергу,  $\Delta\Delta U \in$  основним чинником у появі мінімуму в  $\Delta\Delta H$ , хоча й не робить великого вкладу в цю функцію. Видно, що –  $E\Delta d$  це спадна функція, що досягає плато при Е=0.6В/нм і не має екстремумів. Зміна внутрішньої енергії ΔΔU є спадною функцією при E<0.3B/нм, але починає зростати при більших значеннях E. Якщо об'єднати  $\Delta\Delta U$  та –  $E\Delta d$ , результуюча функція буде мати мінімум при  $E \sim 0.4$  В/нм. Таким чином, мінімум в  $\Delta \Delta H$  можна пояснити мінімумом, що спостерігається в  $\Delta\Delta U$ . Причину появи мінімуму можна зрозуміти порівнюючи зміну внутрішньої енергії згорнутого та розгорнутого станів,  $\Delta U_f$  і  $\Delta U_u$ , показаних на Рис. 4.15(а). Для полів із *E*<0.55В/*нм*  $\Delta U_f$  зменшується швидше ніж  $\Delta U_{\mu}$ , роблячи різницю  $\Delta \Delta U$  від'ємною. При більших значеннях напруженості поля,  $\Delta U_{\scriptscriptstyle u}$  починає зменшуватися швидше ніж  $\Delta U_{\scriptscriptstyle f}$ , що веде до додатного значення  $\Delta\Delta U$ . У деякій проміжній точці *E*~0.3B/нм,  $\Delta\Delta U$ проходить через мінімум, як і будь-яка функція, яка починається з нуля і змінює свій знак з від'ємного на додатній. Таким чином, специфічна форма кривих  $\Delta U_f$ та  $\Delta U_u$  несе відповідальність за появу мінімуму в  $\Delta \Delta U$  і, як було встановлено, в ΔΔΗ. Очевидно, що мінімум можна пояснити прямим впливом електричного поля на конформаційні стани досліджуваної системи. Важко сказати, наскільки універсальним є цей механізм. Величина обох функцій  $\Delta U_f$  та  $\Delta U_u$  нетривіальним чином залежить від геометрії мінімумів потенційної енергії, що відповідає ансамблям згорнутого та розгорнутого станів. Зовнішнє поле викликає перероз

поділ кількостей станів в межах цих ансамблів, що формується завдяки глибині мінімумів, їх ширині та, можливо, деяким іншим параметрам, які можуть виявитися дуже специфічними для системи. Питання чи мінімум відносної ентальпії є характерним для інших білків, і якщо так, то чи це викликано мінімальним значенням в  $\Delta\Delta U$ , залишається відкритим.

Результати аналізу ентропії показані на Рис. 4.15(b). Спочатку ентропія згорнутого стану,  $-T\Delta S_f$ , зазнає швидшого росту по *E*, ніж ентропія розгорнутого стану,  $-T\Delta S_u$ . У результаті перехід у природний стан гальмується ентропією, на що вказує додатне значення  $-T\Delta\Delta S$ . При *E*=0.6B/нм, внески двох станів стають



**Рис. 4.15** Вклади електричного поля в різні термодинамічні функції, що обговорюються в основному тексті. Ентальпія  $\Delta\Delta H$ , показана на панелі(а), проходить через мінімум при *E*~0.4 В/нм, обумовлений специфічною залежністю внутрішньої енергії  $\Delta U$  від електричного поля для згорнутого і розгорнутого станів. Ентропія, зображена на панелі (b), проявляє максимум при тому самому значенні напруженості поля, що пов'язано із більшою швидкістю спаду ентропії розгорнутого стану у порівнянні з ентропією згорнутого стану. Останнє спостереження добре корелює зі зменшенням кількості окремих конформаційних станів (кластерів), що входять до складу розгорнутих станів.

рівними за величиною, тоді як  $-T\Delta S_{\mu}$  перевищує  $-T\Delta S_{f}$  при більших значеннях *Е*, в результаті чого – *Т*ΔΔ*S* стає від'ємним. Таким чином, зміна ролі ентропії обумовлена специфікою поведінки ентропії розгорнутого стану. Ключем до розуміння деталей цієї поведінки є аналіз  $-T\Delta S_u$  та  $-T\Delta S_f$  як функції Е. Дуже зручною для аналізу впливу електричного поля на ентропію є теорія природженої структури (IS), яка була розроблена для опису фазових переходів в рідинах та інших невпорядкованих матеріалах [332]. Згідно з цією теорією, всі конформації однозначно поділяються на басейни природжених структур, які пов'язані з мінімумами функції потенціальної енергії. Переходи між IS інтерпретуються як конформаційні зміни, тоді як рухи в межах басейнів IS розглядаються як коливальні. Зазначимо, що дане визначення коливальних рухів набагато ширше, ніж те, яке використовується в класичній фізичній хімії, де рухи в основному трактуються як гармонічні. У випадку з білками, природний стан можна уявити, як такий, що складається з одного IS, а розгорнутий стан - з багатьох різних IS. На додаток, кожна IS конформація володіє свободою обертання. Отже, вплив електричного поля на природний стан можна розбити на два ефекти: а) обертальне упорядкування за рахунок вирівнювання вздовж напрямку поля; б) вплив на коливальні рухи спірального стану. Ці два вклади важко оцінити безпосередньо, особливо коливальну частину, яка залежить від геометрії мінімумів потенційної енергії, асоційованої із спіраллю[333; 334]. Проте, приблизну оцінку обертальефекту ного обчисливши ентропію Шанона можна отримати,  $TS_o(E) = -kT \sum P(\Theta) \log(P(\Theta))$  пов'язану із параметром порядку  $\Theta$ , який описує орієнтацію спіральної конформації відносно напряму напруженості поля. Тут Θ це кут між спіраллю та віссю поля, а  $P(\Theta)$  це пов'язана з кутом функція розподілу. Розподіли кутів були обчислені для природних конформацій (RMSD<0.1нм від природного стану) як функції напруженості поля Е. У нульовому полі розподіл є плоским, але набуває вузької форми при збільшенні значення Е, що свідчить про зменшення свободи обертання; пов'язана втрата ентропії TS<sub>a</sub>(E) оцінюється в 3.7кДж/моль при T=293K, коли напруженість поля змінюється від 0 до 1В/нм. Це становить менше ніж 20% від загальної зміни ентропії в  $-T\Delta S_f$ , як це видно з Рис. 4.15(b). Впорядкування орієнтації, таким чином, не є головним ефектом в зменшенні ентропії природного стану при високих значеннях напруженості поля. Воно не є незначним, проте й не відіграє такої важливої ролі, як складова коливання. Взаємодія з полем модифікує потенціальну енергію поверхні білка (новий вираз додається до Гамільтоніану), безпосередньо впливаючи на його різні властивості, такі як  $\Delta U$  або ентропія. Модифікація нетривіальна: вона не може бути описана, наприклад, простою моделлю гармонічних осциляторів, яка не призводить до зміни ентропії систем. Таким чином, спостерігається складний негармонійний ефект, який проявляється у коливальній ентропії більше, ніж в інших властивостях.

Механізми зменшення ентропії, описані вище, також застосовні для розгорнутого стану. Крім того, електричне поле може впливати на кількість доступних у цьому стані конформацій. Щоб оцінити ефект орієнтації, було обрано та проаналізовано кілька розгорнутих конформацій, щоб визначити пов'язану величину  $TS_o(E)$  як функцію *E*. Значного розкиду отриманих значень не спостерігалося, всі з яких виявилися близькими до 3.5кДж/моль. Як і очікувалося, втрата ентропії є трохи нижча в розгорнутого стану, оскільки цей стан має менший дипольний момент і, таким чином, має зазнавати менш помітне впорядкування. Вплив поля на  $-T\Delta\Delta S$  для ефекту вирівнювання орієнтації оцінюється в 0.2кДж/моль.

Для оцінки кількості різних конформаційних станів, присутніх у розгорнутому ансамблі, ми провели кластеризацію всіх конформацій, записаних у наших моделюваннях, використовуючи однакові параметри для всіх значень *E*. Зазначимо, що згорнутий стан відповідає одному кластеру в цьому аналізі. Кількість розгорнутих кластерів  $N_c$ , показаних на Рис. 4.15(b), зменшується від 100 до 20, коли напруженість поля змінюється від 0 до 1В/нм. Відповідну втрату ентропії можна оцінити як  $T\Delta S_c = -kT\log(N_c(E)/N_c(0))$ , яка становить 4кДж/моль для даних спостереження при T=293K. Порівнюючи це значення з а) падінням в 6кДж/моль, що спостерігається в загальній ентропії  $T\Delta\Delta S$  в тому самому діапазоні *E*, і b) оцінкою вкладу впорядкування, 0,2кДж/моль, ми робимо висновок, що вклад коливальної складової повинен бути близьким до 2кДж/моль. Отже, легко побачити значення  $T\Delta S_c$  є більшим ніж 60% від  $T\Delta\Delta S$ . Таким чином, наш аналіз вказує на те, що здатність електричного поля усувати розгорнуті конформації є основним механізмом стабілізації ентропією природного стану при *E*> 0.6B/нм.

#### 4.2.1.3. Аналітичне наближення для впливу електричного поля

Хоча  $\Delta\Delta F(E)$  виявляє досить складну та нетривіальну залежність від електричного поля (див. Рис. 4.14), для неї можна отримати деякі корисні аналітичні вирази в межі малого значення *E*. Зауважимо, що лінійна залежність дипольного моменту згорнутих та розгорнутих станів (див. **Рис. 4.13**) дозволяє зробити наступну апроксимацію: :

$$\langle d \rangle_{f} - \langle d \rangle_{u} = \left(\frac{\partial \langle d \rangle_{f}}{\partial E} - \frac{\partial \langle d \rangle_{u}}{\partial E}\right)E = \Delta d_{0}E$$

$$(4.5)$$

Якщо цей вираз підставити в інтеграл (4.3), то це приведе до наступного квадратичного наближення для вільної енергії:

$$\Delta\Delta F_c = -\frac{1}{2}\Delta d_0 E^2 \tag{4.6}$$

Емпіричний параметр  $\Delta d_0$  було оцінено двома шляхами. Спершу, ми визначили його шляхом підгонки. Числові значення  $\langle d \rangle_f$  та  $\langle d \rangle_u$  отримані в симуляціях були наближені лінійними функціями при  $E \rightarrow 0$ . Як наслідок, отримані параметри привели до  $\Delta d_0 = 99[\kappa Дж/моль х нм^2/B^2]$ . Відповідна вільна енергія, зображена на Рис. 4.14, слугує добрим наближенням для фактичної вільної енергії при E < 0.1 V/nm.

Пізніше, було отримано мікроскопічний вираз для  $\Delta d_0$  використовуючи кумулянтні розклади. В рамках цього підходу вплив електричного поля на вільну енергію представити y вигляді ряду E: можна за  $F(E) = F^0 - \beta < d >^0 E - \beta < d^2 >^0 E^2 - \dots$ , де перший член представляє вільну енергію при відсутності поля, а інші вирази відповідають послідовним внескам кумулянтів. Усереднення в ансамблі нульового поля позначається символом <···><sup>0</sup> . Вклад першого кумулянта дорівнює нулю внаслідок симетрії. Другий кумулянт дає наступний вираз, коли застосовується окремо для згорнутих та розгорнутих станів:

$$\Delta d_0 = \beta (\langle d^2 \rangle_f^0 - \langle d^2 \rangle_u^0)$$
(4.7)

Перший доданок у цьому виразі може бути оцінений припускаючи, що природний стан відповідає одиничній конформації з відомим дипольним моментом  $\vec{P}_n$ . Позначаючи кут між  $\vec{P}_n$  та віссю поля як  $\psi$ , середнє за всіма орієнтаціями компонентів паралельними до  $\vec{E}$  можна записати як:  $< d^2 >_f^0 = \frac{\int_0^{\pi} P_n^2 \cos^2(\psi) \sin(\psi) d\psi}{\int_{\pi}^{\pi} \sin(\psi) d\psi} = \frac{1}{3} P_n^2$ , де  $P_n = |\vec{P}_n|$ . Щоб отримати аналогічний вираз

для розгорнутого стану, потрібно знати його структуру. Тут ми припускаємо, що розгорнутий стан повністю невпорядкований і може бути представлений як сума числа N елементарних дипольних моментів, наприклад моментів, пов'язаних з пептидним зв'язком. Сумарний диполь тоді можна записати як  $\vec{P}_u = \sum_{i=1}^{N} \vec{p}_i$ , де всі моменти  $\vec{p}_i$  мають однакову величину  $p = |\vec{p}_i|$ , але різні напрямки. Вираховуючи середнє значення для компонента паралельного полю  $P_u^c$  знаходимо  $< P_u^{c^2} > = < \sum_{i,j} p_i^c p_j^c > \approx N < p^{c^2} >$ , де  $p_i^c$  це компонент *i*-того диполя паралельного полю лю для якого використано умову, що компоненти на нееквівалентних ділянках

нескоррельовані, тобто  $\langle p_i^c p_j^c \rangle = \langle p^{c^2} \rangle \delta_{ij}$ . Якщо припустити, що елементарні диполі в розгорнутій конформації не проявляють переважних орієнтацій, то  $\langle p^{c^2} \rangle = \frac{1}{3} \langle p^2 \rangle = \frac{1}{3} p^2$  і тоді  $\langle P_u^{c^2} \rangle = \frac{N}{3} p^2$ . Нарешті, величину елементарного моменту можна пов'язати з величиною згорнутого стану як  $p = \frac{P_n}{N} \frac{1}{\cos(\phi)}$ , де  $\phi$  це кут між кожним елементарним  $\vec{p}_i$  та загальним диполем спіралі  $\vec{P}_n$ . Це співвідношення приводить до наступного наближеного виразу для середнього квадрату:  $\langle d^2 \rangle_u^0 = \frac{1}{3} \frac{P_n^2}{N} \frac{1}{\cos^2(\phi)}$ . У поєднанні з виразом для згорнутого стану це приводить до наступного кінцевого виразу:

$$\Delta d_0^a = \beta \frac{1}{3} P_n^2 (1 - \frac{1}{\cos^2(\phi)} \frac{1}{N})$$
(4.8)

який потребує лише кількість залишків N і дипольний момент природного стану Р<sub>n</sub> як вхідні дані. Кут  $\phi \in$  характерним для геометрії природного стану. Для αспіралі та параметрів силового поля OPLS/AA [307] ми оцінили його як 150°. Дипольний момент конформації згорнутої оцінили при Р<sub>n</sub>=31[кДж/моль х нм/В] використовуючи середнє значення ансамблю симуляцій при Е=0 та N=6. Якщо використати (4.8), то  $\Delta d_0^a = 103 [кДж/моль х нм^2/B^2],$ що



Рис. 4.16 Заселеність природного стану як функція *E* отримана для а) безпосередньо в симуляціях та b), використовуючи квадратичне наближення для вільної енергії (4.6), та c) з використанням аналітичного виразу для  $\Delta d_0$  в наближенні другого кумулянта (4.8).

чудово узгоджується із значенням 99[кДж/моль х нм<sup>2</sup>/В<sup>2</sup>] отриманим безпосередньо з підгонки чисельних даних.

Наскільки добре працює наближення другого кумулянта та аналітичний вираз для нього можна побачити на **Рис. 4.16**, який показує заселеність природного стану  $P_f$  для змінної *E* визначену як, а) безпосередньо в симуляціях та, b) розрахунком  $\Delta\Delta F(E)$  шляхом інверсії рівняння (4.3).  $P_f$  зростає від значення < 0.2 при *E*=0 до понад 0.9 при *E*=1B/нм, підтверджуючи висновок про те, що електричне поле спричиняє перехід клубок-спіраль. Наближення на основі  $\Delta\Delta F_c$  показує хороше кількісне узгодження з симуляцією для *E*<0.1B/нм і переоцінює  $P_f$  при інших значеннях напруженості поля. Похибка є значною, досягаючи 30% для певних значень *E*. Проте загалом, наближення другого кумулянта забезпечує прийнятну поведінку і, таким чином, є придатним для якісного аналізу. Аналітичний вираз для  $\Delta d_0$  дає значення, що добре узгоджується з чисельними результатами.

На Рис. 4.16 можна чітко розрізнити три режими в залежності  $P_f(E)$ . Перший режим спостерігається для низьких E<0.1В/нм, де майже нема жодної зміни заселеності. Це спостереження добре узгоджується з поведінкою, передбаченою Шварцом та Сілігом[198] на основі моделі Зіма-Брега для переходу клубокспіраль. У цій моделі передбачається, що параметр зростання спіралі *s* (вільна енергія, пов'язана з видовженням спіралі) можна ввести як функцію просторового кута  $\Omega$ , який кожен спіральний сегмент формує з напрямком поля. Параметр росту залежить від зовнішнього поля через рівняння ван Хофа[195]. Цей параметр збільшується із збільшенням напруженості поля *E*, вказуючи на те, що спіралі, вирощені вздовж поля, більш стійкі, ніж ті, що росли проти нього. За умови відсутності орієнтаційної поляризації основного конформаційного ансамблю (усі спіральні орієнтації рівноймовірні) збільшення кількості станів вздовж поля компенсується втратою чисельності проти нього, так що загальна кількість спіралей залишається незмінною. Зрозуміло, що цей простий аналіз містить наближення, такі як нехтування ансамблем розгорнутого стану. Тим не менше, він передбачає вірну поведінку при малих значеннях Е. Ми дійсно бачимо збільшення кількості спіралей з конформаціями, вирівняними вздовж поля та виснаженням кількості у конформаціях, вирівняних проти нього. Таким чином, повний ансамбль проявляє орієнтаційні переваги, вказуючи на упорядкування природного стану як на основний механізм взаємодії з електричним полем. Заселеність при цьому не змінюється. Для високих Е, все відбувається навпаки і головний ефект полягає у впливі поля на коливальні рухи. Як показує Рис. 4.14, ентальпія майже компенсує вклад ентропії в границі малих значень Е, що призводить до дуже малих змін вільної енергії,  $\Delta\Delta F < 1 \kappa Дж/моль$ . Перевага конформацій, що користають зі сприятливої ентальпії завдяки вирівнюванню за полем, втрачається при супровідному зменшенні ентропії. Загальний ефект таким чином близький до нуля. Виходячи з цього аналізу, можна зробити висновок, що основним ефектом поля при малих значеннях Е є вирівнювання природних конформацій, як це вже було показано раніше[194; 195].

У другому режимі, визначеному при 0.1 < E < 0.5 B/нм, заселеність природного стану починає раптово та швидко зростати. Рис. 4.14 показує, що таке збільшення насамперед обумовлене ентальпією. Баланс між ентальпією та ентропією, що спостерігається при малих значеннях *E*, більше не зберігається. Спіральні конформації вирівняні вздовж напрямку поля отримують додаткову ентальпію (вона стає велика і від'ємна), що стає домінуючим внеском у ансамбль згорнутого стану. Проте зменшення ентальпії не може тривати безкінечно. При деяких *E* всі спіральні конформації будуть вирівняні вздовж напрямку поля, після чого подальше збільшення напруженості поля не призведе до зменшення ентальпії. Одночасно, ентропія розгорнутого стану починає зменшуватися швидше, ніж ентропія згорнутого стану, даючи в результаті зміну ентропійного ефекту від дестабілізації до стабілізації. Комбінація цих двох процесів призводить до виникнення насичення в  $P_f(E)$  в третьому режимі при E>0.5В/нм, де заселеність природного стану поступово вирівнюється. Ми очікуємо, що така якісна поведінка буде спостерігатися для всіх невпорядкованих білків, що зазнають впливу електричного поля.

## 4.2.1.4. Електричне поле викликає дезагрегацію β-листів

Для оцінки впливу електричного поля на агрегацію ми використовуємо попередньо зрівноважений ансамбль з 8-ми поліаланін гексапептидів, отриманих в симуляціях методом обміну репліками [34]. Переважаючим компонентом цього ансамблю є конформації укладені в β-листи, які є основним структурним елементом фібрил амилоїдів[249]. Також присутні деякі невпорядковані агреговані та дезагреговані стани. Різні конформації що містяться в цьому ансамблі мають різні постійні дипольні моменти. Наприклад, β-листи мають ненульові моменти через їх високий ступінь упорядкування. Не зрозуміло *а priori*, як ці конформації взаємодіють з електричним полем і які структурні зміщення можуть спричинити ці взаємодії. Наші моделювання проводяться на протязі 100нс, використовуючи такі ж параметри, які були опубліковані раніше [34], але при наявності змінної Е. Очікується, що вибраний час моделювання є достатнім для встановлення принаймні часткової рівноваги. Всі записані конформації були попередньо оброблені з метою видалення неоднозначностей, пов'язаних з періодичними граничними умовами (РВС). Якщо процеси, в яких взаємодіють два або більше суб'єктів для утворення сполуки, досліджуються за РВС, їх аналіз вимагає розгляду більше ніж звичайної симуляційної комірки. Наприклад, може трапитися, що два пептиди, які знаходяться в одній і тій же комірці, не мають фізичного контакту, на відміну від їхніх періодичних копій. Тому всі періодичні копії повинні бути проаналізовані з метою виявлення можливих мульти-пептидних комплексів. Відповідно, симульовані пептиди та їх копії були кластеризовані відповідно до відстаней між їх атомами С<sub>α</sub>. Кластеризація привела до відбору періодичних копій, що утворюють міжпептидні зв'язки. Якщо жодних зв'язків не знайдено, розглядаються конформації з центральної комірки. Кластеризовані конформації були проаналізовані згідно з алгоритмом DSSP[330] з метою виявлення вторинної структури.

Ступінь агрегації в аналізованих конформаціях характеризується часткою  $\beta$ структури,  $P_{\beta}$ , яка включає внески  $\beta$ -листа, та  $\beta$ -містка[330]. Часові висліди  $P_{\beta}$ записані при E=0.7VB/нм та E=0ю0B/нм показані на **Рис. 4.17**, панелях (с) та (а) відповідно. Панелі(b) та (d) зображають кількість  $\alpha$ -структури ( $\alpha$ -спіраль разом із 3<sub>10</sub>-спіраллю[330]) виміряних в симуляціях з однаковими умовами. У випадку з *E*=0, конформації залишаються на 90%  $\beta$ -листами (панель (а)) протягом всього періоду моделювання із дуже малою кількістю  $\alpha$ -спіральної структури (панель (b)). Більшість всіх конформацій є компактними, як це видно з радіуса гірації  $R_g \sim lnm$ , показаного на панелі (e). Ці результати відповідають нашим попереднім висновкам, показуючи, що  $\beta$ -листи залишаються стабільними в часовому масштабі більше 1µс[34].

Вислід на панелі (с) показує, що, якщо електричне поле прикладено,  $\beta$ структура повністю розчиняється протягом перших 10*нс*. Одночасне збільшення кількості  $\alpha$ -структури (панель (d)) вказує на те, що  $\beta$ -листи перетворюються на  $\alpha$ -спіралі. Частка  $\alpha$ -структури коливається в широких межах від 0 до 0.8, відображаючи той факт, що не всі розглянуті 8 пептидів можуть одночасно знаходитися в спіральному стані. Із розвитком структурного перетворення, збільшується радіус гірації до значення ~ 6*nm*, вказуючи на те, що система дезагрегується. Таким чином, дані показані на **Рис. 4.17** при Е=0.7В/нм ілюструють здатність електричного поля руйнувати  $\beta$ -листи шляхом конформаційного перетворення пептидів у  $\alpha$ -спіралі.

Спостережувана структурна перебудова відбувається завдяки різним дипольним моментам фаз β-листів та α-спіралей. Рис. 4.18 показує карту вільної енер





Рис. 4.17 Часові висліди різних змінних що спостерігаються в двох симуляціях попередньо урівноваженого ансамблю з 8 поліаланінових пептидів. Вміст  $\beta$ -структури показаний на панелі (а) та (с), а  $\alpha$ -структури - на (b) та (d). Результати симуляції за відсутності поля зображені на панелях (а) та (b), а при E=0.7B/нм - на (c) та (d). Спостережувана конфігурація  $\beta$ -листа зображена на панелі (b). Радіус гірації при нульовому та ненульовому полі показані на панелях (е) та (f) відповідно. Накладання поля викликає повну втрату  $\beta$ структури та перетворення на  $\alpha$ -структуру, що супроводжується дезагрегацією.

гії, обчислену як функцію радіусу гірації  $R_g$  та загального дипольного моменту d, що спостерігається в симуляціях при E=0.7В/нм. Обчислена як  $-kT\log(P(d,R_g))$ , де T – температура, а  $P(d,R_g)$  - об'єднана функція розподілу ймовірності d та  $R_g$ , карта описує відносну чисельність відповідних конформаційних станів. Зображені два основні мінімуми, що відповідають стану агрегації,  $R_g \sim 1nm$ , який є багатий на β-листи (~90% всієї чисельності) із невеликим вмістом невпорядкованих станів агрегації(~10% всієї чисельності) та дезагрегаії,  $R_g > 5nm$ , що в основному є  $\alpha$ -спіральним. Розмір окремих ланцюгів, спостережуваних в нашому моделюванні, загалом узгоджується з тим, що було опублі-

ковано раніше [335], хоча безпосереднє порівняння є ускладненим через використання в цитованій роботі довшого аланінового поліпептиду. Третій локальний мінімум спостерігається при  $R_g = 3nm$  та d = 250[кДж/моль х нм/В], що відповідає стану агрегації, який складається із суміші  $\alpha$ -спіральних та випадкових клубкових конформацій.

Основні мінімуми вільної енергії добре розділені за дипольним моментом d. Як передбачалося,  $\beta$ -листовий стан має ненульовий диполь d = 130[кДж/моль х нм/В]. Дезагрегований стан має d = 300[кДж/моль х нм/В], що узгоджується з дипольним моментом 8-ми поліпептидів, згорнутими в  $\alpha$ -спіральну конформацію з дипольним моментом близько 37[кДж/моль х нм/В] кожна (див. **Рис. 4.13**). Різниця в 170[кДж/моль х нм/В] забезпечує більше ніж 100кДж/моль ентальпійної стабілізації для стану дезагрегації, яка є дуже значною. Тому зрозуміло, що конформації  $\beta$ -листів, як і в амилоїдних фібрилах, не можуть конкурувати з  $\alpha$ -спіральними станами в умовах сприятливої взаємодії з електричним полем. В результаті очікується, що електричне поле викликає перехід до дезагрегованих  $\alpha$ -спіралей.

### 4.2.1.5. Пептидам потрібно бути згорнутими, щоб уникнути агрегації

Ступінь дестабілізації фібрил електричним полем залежить від напруженості поля *E*. Середню частку  $\beta$ -структур  $\langle P_{\beta} \rangle$  було обчислено в багатоланцюговому моделюванні при змінному *E*. Результати показані на Рис. 4.19 (ламана лінія) як функція заселеності природного стану  $P_f$ , що спостерігається для мономеру пептиду в ідентичних термодинамічних умовах (наявність поля і температура). Як видно, дезагрегація наступає різко при *E*~0.7В/нм, демонструючи поведінку типу «все-або-нічого». У  $\beta$ -структурі при низькому значенні *E* спостерігається дуже малі зміни. Для даної симуляції, природний стан повинен скласти приблизно 90% ймовірності, щоб викликати дезагрегацію. Деталі співвідношення, зображеного на Рис. 4.19, без сумніву залежать від параметрів досліджуваної системи. Зокрема, ми перевірили вплив концентрації та температури пептиду. Відомо, що в амилоїдогенних системах низька температура та висока концентрація пептидів сприяє формуванню фібрил[336]. Тож досліджувана система, що містить 8 пептидів, була розглянута при вищій концентрації. Для цього, на додачу до комірки зі стороною



Рис. 4.18 Карта вільної енергії, визначена як функція радіусу гірації Rg та повного дипольного моменту d, обчислена в моделюванні при E=0.7B/нм. Одиницями енергії є kT, де k - стала Больцмана.

L=15нм[34], було виконано додаткове моделювання для L=7нм (інші параметри аналогічні), що привело приблизно до десятикратного збільшення концентрації пептиду. Це дозволило нам отримати декілька інших температур, при яких фібрили залишаються стабільними (в масштабах часової шкали моделювання), на додачу до найнижчої температури, доступної для більшої комірки. Рис. 4.19 показує залежності  $P_f$  від <  $P_\beta$  > отримані для температур T в діапазоні від 260 до 285К. За відсутності поля, що визначено першою точкою на кожній кривій, видно, що частка фібрил знижується від ~ 90% при Т=260К до ~ 20% при Т=285К. Тому вибраний діапазон охоплює область переходу в фібрильний стан, з температурою 280К<T<285К, яка відповідає температурі, при якій фібрили розчиняються. При найменшій досліджуваній температурі, Т=260К, профіль  $\langle P_{\beta} \rangle$ отриманий для *L*=7нм є дуже подібним до того, що спостерігався для *L*=15нм, що свідчить про те, що концентрація не сильно впливає на схильність до агрегації в умовах, коли фібрили стабільні. Коли електричне поле є увімкненим, частка фібрил зменшується. Для ілюстрації цієї тенденції можна розглянути дані при

T=275К, де <  $P_{\beta}$  > становить ~90% при E=0V/nm, що відповідає стабільній фібрилі, та падає до ~30% при Е=0.5В/нм. З Рис. 4.19 зрозуміло, що інтенсивність поля необхідного для того щоб повністю дестабілізувати фібрили, спадає при зростаючій температурі. Тоді як для T=275 K,  $< P_{\beta} >$  падає нижче 50% при *E*=0.5В/нм, ЛЛЯ T=280К це відбувається вже при Е=0.2В/нм. З точки зору впливу поля на природний стан, дезагрегація супроводжується збільшенням Р<sub>f</sub> (збільшення згортання) для всіх температур. Ця тенденція добре узгоджується з численними експериментальними дослідженнями амилоїдогенних білків, які свідчать про те, що агрегація починається тільки після дестабілізації природного стану [177; 184; 187]. Для досліджуваної системи напруженість поля, необхідна для



**Рис. 4.19** Середня частка  $\beta$ -структури <  $P_{\beta}$ >, що спостерігається в багато ланцюговому моделюванні при змінному Е, зображена як функція заселеності природного стану  $P_f$ , отримана для мономеру пептиду в таких самих термодинамічних умовах. Ключові точки відповідають значенням Е показаних на Рис. 4.16. Ламана лінія відноситься до моделювання з довжиною комірки L=15нм. Суцільні лінії відповідають L=7нм. Дані зображені для 5 різних температур. Вища температура відповідає нижчій стабільності фібрили. Дезагрегація спостерігається, коли мономер згортається із значенням P<sub>f</sub> в діапазоні від 0.3 до 0.9, в залежності від стабільності фібрили. В загальному, менш стабільні фібрили вимагають меншого P<sub>f</sub>, щоб викликати дезагрегацію.

ініціювання дезагрегації, продукує  $P_f$ , що в залежності від температури, коливається в межах від 0.3 до 0.9. Це відповідає режиму різкого росту  $P_f(E)$ , як видно на **Рис. 4.16**. Для інших систем критичне значення  $P_f$  може бути іншим. Ступінь, до якого згортання потрібно підсилити для того щоб воно почало втручатися в агрегацію, можна визначити індивідуально для кожного випадку.

### 4.2.1.6. Довші пептиди згортаються в присутності поля меншої інтенсивності

Результати, представлені в попередніх розділах, показують, що а) електричне поле здатне індукувати перехід в  $\alpha$ -спіральні стани та b) амилоїдні фібрили починають дисоціювати під дією поля, якщо заселеність спірального стану є значною. Однак, значення поля необхідне для переходу в природний стан, 0.2 < E < 0.5 V/nm, є поза біологічно значимими межами. Для порівняння реперні значення полів, що зустрічаються в біологічних системах, наведені в Таб. 4.2. Величина зазначених полів поступово збільшується від 10<sup>-8</sup> В/нм для сканерів МРТ до 10<sup>-2</sup> В/нм, оцінена всередині мембран клітини. Для високих значень поля, мембрана живих клітин має тенденцію до дезінтеграції приблизно при E=0.03B/hm[339], яка й встановлює верхню межу для відповідних напруженостей в біології. З точки зору експериментів *in vitro*, напруженість поля, підтримуваного водними розчинами, обмежується початком електричного пробою, яви-

Система / Застосування	Електричне поле <i>E</i> (В/нм)
Безпечні межі для МРТ сканерів[337]	6·10 <sup>-9</sup>
Вимоги до наземного поля для високовольтних ліній передач[338]	$1 \cdot 10^{-8}$
Поле, залучене в ембріональний розвиток [339]	$0.1 - 1.5 \times 10^{-7}$
Зразки кісток[339]	$2 \cdot 10^{-6}$
Внутрішньо мембранне поле[205; 340]	$1 - 20 \times 10^{-3}$
Межі мембранної наделектропорації [339]	$3 \cdot 10^{-2}$

Таб. 4.2 Електричні поля, пов'язані з біологією

щем, яке відбувається для поля Е<sub>b</sub>, при якому вода тимчасово стає провідником.

Точна напруженість, необхідна для пробою, залежить від багатьох факторів, включаючи наявність інших розчинників та іонів, форми електричного імпульсу тощо. Значення, наведені в літературі для  $E_b$ , змінюються в межах від 0.015В/нм[195] до значення між 0.01 та 0.07В/нм в залежності від експерименту, із середнім значенням 0.03В/нм[341]. Таким чином, діапазон відповідних значень напруженості поля в біології, здається, добре узгоджується зі значеннями напруженості поля що піддаються експериментальним дослідженням у воді, що, можливо, не є випадковістю.

Як видно з Рис. 4.16, біологічні поля не впливають на заселеність природного стану моделі з N=6. Вплив індукованого поля на вільну енергію є настільки малим при E < 0.03B/нм, що  $P_f$ залишається незмінними. Для суттєвої зміни заселеності,  $\Delta\Delta F$  має бути порівнянним за величиною зі стабільністю природного стану *ΔF*. Чисельне значення  $\Delta\Delta F$  в значній мірі визначається внеском дипольної взаємодії з полем в різницю ентальпії ΔΔН. Таким чином, один із способів збільшення  $\Delta\Delta F$  полягає в збільшенні  $\Delta\Delta H$ . Легко бачити, що  $\Delta\Delta H$  визначається дипольним моментом природного стану (припускаючи, що дипольний момент розгор-



Рис. 4.20 Критичне поле  $E_c$  необхідне для дезагрегації аланінових поліпептидів довжиною N, обчислене за допомогою рів. (4.9). Два значення, 0.3 та 0.9, були розглянуті для заселеності природного стану  $P_{f,c}$ . Для фіксованих N, більші  $P_{f,c}$  відповідають більшим  $E_c$ . Пептиди довжиною 30 амінокислот можуть бути схильними до дезагрегації відповідними біологічними полями при умові, що фібрили не дуже стабільні.

нутого стану є незначним) при сталому значенні Е. Отже, збільшення дипольно-

го моменту природного стану можна використати як засіб збільшення  $\Delta\Delta H$ . Оскільки бічні ланцюги в розглянутому тут пептиді не мають заряду, єдиним джерелом дипольного моменту є атоми основного ланцюга. Ланцюги з більшою кількістю атомів основного ланцюга мають більші дипольні моменти. Таким чином довжину пептиду можна використати як параметр для контролю над  $\Delta\Delta H$ . У порівнянні з короткими ланцюгами, очікується, що довгі ланцюги набуватимуть більшого дипольного моменту згортаючись у спіралі(за умови взаємодії з полем), отже, вимагаючи полів меншої інтенсивності для перетворення в спіральний стан.

Аналітичне наближення для  $\Delta\Delta F$ , отримане за допомогою кумулянтного розкладу, може бути використане для отримання чисельної оцінки поля, необхідного для переходу клубок-спіраль у пептиді довільної довжини *N*. Припустімо, що за відсутності поля спіральна конформація характеризується різницею вільної енергії  $\Delta F_0$  щодо розгорнутого стану. Стабільність в ненульовому полі тоді становить:  $\Delta F(E) = \Delta F_0 + \Delta\Delta F(E) = -kT \log(\frac{P_f(E)}{1 - P_f(E)})$ . Далі, припустімо, що заселеність необхідна для дезагрегації становить  $P_f(E_c) = P_{f,c}$ , де  $E_c$  необхідна критична величина напруженості поля. Особливим є випадок, коли  $P_{f,c} = 1/2$ , що призводить до відповідних втрат вільної енершії  $\Delta F(E_c) = \Delta F_c = 0$ . Використовуючи квадратичне наближення для  $\Delta\Delta F$ , (4.6), отримуємо наступне рівняння для критичного поля:  $\frac{1}{2}\Delta d_0 E_c^2 = \Delta F_0 - \Delta F_c$ . Припускаючи, що  $\Delta d_0$  взято з (4.8), розв'язком для поля стає:  $E_c = \sqrt{\frac{2(\Delta F_0 - \Delta F_c)}{\beta \frac{1}{3} P_N^2 (1 - \frac{1}{\cos^2(\phi)} \frac{1}{N})}}$ , де  $P_N$ - дипольний момент спірального ста-

ну. Для пептидів аланіну, момент можна апроксимувати як  $P_N = \alpha N$ , де константу пропорційності  $\alpha$  можна визначити з N=6. З цим припущенням, критичне поле становить:

$$E_{c} = \sqrt{\frac{6}{\beta \alpha^{2} N^{2} (1 - \frac{1}{\cos^{2}(\phi)} \frac{1}{N})}} (\Delta F_{0} - \Delta F_{c})$$
(4.9)

Рис. 4.20 показує  $E_c$  обчислене використовуючи параметри отримані для N=6 при двох значеннях критичної заселеності  $P_{f,c} = 0.3$  та  $P_{f,c} = 0.9$ , які відповідають діапазону стабільності фібрил, що спостерігаються в наших багатопетидних симуляціях, див. Рис. 4.19. Оскільки  $\Delta F_0$  вважається сталою в (4.9), проте ймовірно зростатиме із збільшенням N, дані показані на Рис. 4.20, ймовірно, є переоцінкою дійсного значення критичного поля. В обох побудованих кривих,  $E_c$  різко спадає із ростом довжини ланцюга і стає пропорційним до 1/N в межах великого N. Відповідний біологічний рівень 0.03В/нм спостерігається при  $N\sim30$  для нижчих ступенів стабільності фібрил,  $P_{f,c} = 0.3$ , та  $N\sim70$  для вищих меж стабільності,  $P_{f,c} = 0.9$ . Спадний характер  $E_c(N)$  говорить про те, що при зростаючому розмірі, пептиди на основі аланіну стають більш сприйнятливими до електричного поля. Отже, виходить, що відповідні біологічні з 30 залишків, при умові, що фібрили мають незначну стійкість.

Щоб перевірити тенденцію, що більші N вимагають менших полів для збільшення ступеня згортання, ми провели ще два додаткові моделювання, в яких довжина пептиду N була 14 та 50. Отримана заселеність, зображена на **Рис. 4.21**, проявляє дві особливості. Перше, перехід клубок-спіраль стає стрімкішим. Видно, що поступово, коли N збільшується, зміна E необхідна щоб досягти порівняного збільшення  $P_f$  стає меншою. Друге, ціла крива  $P_f(E)$  зсувається вліво. Як наслідок, довші пептиди вимагають менших полів для досягнення такого ж рівня заселеності, як коротші пептиди, що може бути визначено, наприклад, середньою точкою переходу  $P_f(E_m)=1/2$ . Зокрема, якщо для N=6,  $E_m$  становить ~0.4B/нм, то для N=50,  $E_m$  приблизно 0.1B/нм, тобто 4 рази менше. Зсув не настільки значний, як передбачають наші аналітичні розрахунки, але все ж істотний і має правильний напрямок. На якісному рівні, цей результат підтверджує наші висновки щодо  $E_c$ . Дійсно, для достатньо великих пептидів електричне поле у відповідному біологічному діапазоні може стати важливими як для згортання, так і для агрегації.

# 4.2.2. Методи, моделі та технічні деталі

Ми використовуємо модель RAPID[34] для проведення моделювання всіх систем, описаних у цій дисертації. Пептиди моделюються на рівні атомів за допомогою силового поля OPLS/AA [307], доповненого групою ефективних потенціалів M6/5, виведених для бокових ланцюгів аланіну[34]. Нейтралізуючі захисні ацетил (ACE) та аміно (NH2) гру



**Рис. 4.21** Заселеність природного спірального стану пептидів аланіну з N = 6, 14 і 50 амінокислотних залишків. Видно, що чим більше N тим нижче E необхідне для активації переходу від клубка до спіралі.

пи приєднуються відповідно до аміно- та карбоксильних кінців пептиду. Ми використовуємо протокол обміну репліками[325] та параметри моделювання, як у оригінальній публікації[34]. Крім того, електричний компонент  $\vec{F} = q_i \vec{E}$  був доданий до загальної сили, що діє на кожний заряд  $q_i$ , де  $\vec{E}$  - це вектор зовнішнього поля. Відповідно, загальний Гамільтоніан було доповнено новим доданком  $H_e = -\vec{dE}$ , де  $\vec{d} = \sum_i q_i \vec{r_i}$  - це дипольний момент конформації пептидів. Моделювання було виконано пакетом моделювання GROMACS[121; 324], з відповідними змінами. Часовий крок інтеграції було встановлено на 2фс. Радіус гірації  $R_g$ ,описаний в цій роботі, був обчислений відносно положення С<sub>а</sub> атомів. Щоб уникнути артефактів періодичних граничних умов при моделюванні мономерів, розмір комірки для симуляцій був вибраний достатньо великим для усунення взаємодій між періодичними копіями. У багатоланцюговому моделюванні розмір комірки встановлювався досягненням бажаної концентрації пептиду. Стислий опис всіх моделювань наведено в Таб. 4.3.

Моделювання	Час моде- люван- ня (нс)	Темпера- тура (К)	Число копій	Розмір комір ки для мо- делювання (нм)
Аланін пептид з N=6.	400	260-500	12	4.55
Пептид з N=14	100	260-500	12	7
Пептид з N=50	100	260-500	36	20.9
8-ми ланцюговий ге- ксапептид. Усі поля сильні.	100	260-500	24	15.7

Таб. 4.3 Стислий опис усіх моделювань у цій роботі

# 4.3. Висновки розділу

В даній дисертації ми запровадили стратегію для моделювання великих білків та білкових комплексів з атомістичною точністю, використовуючи парний розклад вільної енергії сольватації. У стратегії виникають ефективні потенціали, що моделюють вплив розчинника з функцій парного розподілу амінокислотних залишків, що отримуються у явній симуляції розчинника. Ми показали, що наш підхід правильно відтворює згортання малого, повністю аланінового пептиду з 10 амінокислотними залишками. Потенціали, що виникають внаслідок підпасування парних функцій розподілу, є статистичними і, отже, залежать від термодинамічних властивостей досліджуваної системи, таких як температура і густина. Зміна з густиною є сильною для найближчих сусідів вздовж ланцюга та наступними найближчими сусідами. У міру збільшення розділення між залишками густинна залежність зникає. Ми показали, що сегмент, що складається з 7 залишків і характеризується 11 різними потенціалами, являє собою мінімальну модель, здатну описати правильну залежність від густини. Симуляції довшого аланінового пептиду з 25 залишками приводять до якісно правильних результатів, порівняно з даними явного розчинника, що доводить, що модель є переносною. Під час тестування систем із кількома ланцюгами модель передбачила, що довші пептиди на основі аланіну самоорганізовуються в  $\beta$ -листові структури, що нагадують амилоїдні фібрили, більш легко, ніж коротші. Цей результат знову якісно співпадає з експериментом. Наші тести демонструють, що отримані потенціали можуть бути використані в комп'ютерних дослідженнях агрегації пептидів для проведення мікросекундних симуляцій в атомістично точних моделях, швидкість яких дуже вигідно порівнюється з подібними недавніми дослідженнями, проведеними в явному розчиннику, для часів з наносекундної шкали [128; 342].

Хоча запропонована модель дає якісно коректні результати для природного стану досліджуваного пептиду, існують деякі відмінності з явним розчинником у більш широкому ландшафті згортання, зокрема у розподілі спіральності вздовж ланцюга та радіусі гірації. Розбіжності пов'язані з наближеннями вихідної моделі, які можна підсумувати наступним чином. 1) Неполярна енергія прикладається до вибраної С<sub>β</sub> групи атомів. Це наближення може мати несприятливий ефект, якщо загальна пептидна конформація має здатність істотно змінюватися для фіксованої конфігурації бічних ланцюгів (і метилової групи ACE). З огляду на жорстку геометрію пептидного зв'язку та той факт, що в боковому ланцюзі є лише один важкий атом, це здається малоймовірним. 2) Нехтування граничним ефектом у міжзалишкових потенціалах, тобто наближення  $u_{i,j} = u_{j-i}$ . Цей ефект є локальним, специфічним для кожного залишку, і тому не може пояснити, чому неявний розчинник недооцінює спіральність глобально, для кожного залишку.

ного залишку ланцюга. 3) Урізання ефективних потенціалів. Відстань відсікання  $1.2\mu m$  є досить довгою для включення всіх важливих особливостей потенціалу середньої сили між двома гідрофобними фрагментами у воді. Очікується, що це не викличе помилок. 4) Вільна енергія сольватації припускається попарно адитивною. На рівні парних кореляцій це припущення є коректним, забезпеченим використанням процедури, що грунтується на g(r). Немає гарантії, однак, що в цьому наближенні добре описуються також багаточастинкові кореляції. Наприклад, можна розглянути спіральність. Щоб бути в спіральному стані певний залишок вимагає, щоб два суміжні залишки також були спіральними. Відповідно, спіральність вимірює скорельовану ймовірність щонайменше з трьох частинок. Такі ж аргументи стосуються і радіуса гірації. Оскільки ці ймовірності недостатью відтворюються неявним розчинником, ми схильні вважати, що реальною причиною розбіжностей є парне наближення. Ця гіпотеза повинна бути перевірена в прямій оцінці внесків багаточастинкових потенціалів в контексті запропонованої моделі.

Використовуючи пептиди на основі аланіну, відомих утворенням амилоїдних фібрил [308] як системи для тестування, ми показали в цій роботі за допомогою комп'ютерного моделювання, що: а) електричне поле здатне індукувати перехід клубок-спіраль у переважно невпорядкованих системах, і b) результуючий зсув заселеності спірального стану супроводжується дисоціацією попередньо сформованих β-листів. Таким чином, поле може використовуватися як інгібітор агрегації. Чисельне співвідношення між згортанням і агрегацією, визначеними для системи тестування, екстраполюється на пептиди довільної довжини *N*. Наші розрахунки дозволяють припустити, що електричні поля, досяжні в умовах експерименту і доречні з біологічної перспективи, здатні змінювати поведінку пептидів, довжиною від 30 аа, у залежності від існуючих термодинамічних умов. У більш широкому контексті наші результати показують, що: По-перше, електричне поле може відігравати роль у запобіганні агрегації у внутрішньоклітинних процесах. Відомо, що пептиди, пов'язані з хворобою Альцгеймера, Аβ, від'єднані від внутрішньо-мембранної частини рго-білка [343]. Вважається, що всередині мембрани пептиди утворюють спіралі. Агрегація не починається, поки пептиди не залишать мембрану, що призводить до позаклітинного амилоїдозу. Гідрофобне середовище мембрани безумовно відіграє роль у стабілізації спіральних конформацій Аβ's. Але, не можна також виключити стабілізуючий ефект мембранного потенціалу. Наші розрахунки показують, що електричні поля, обумовлені цим потенціалом, здатні істотно змінити конформаційний стан невпорядкованого пептиду розміром Аβ, що становить 40-43 амінокислотних залишків залежно від виду.

По-друге, електричне поле можна використовувати як засіб для контролю над агрегацією білків у дослідах *in vitro*. Увімкнення або вимкнення поля може призвести до призупинення чи активації агрегації в експериментах із розділенням в часі. Перевагою цього підходу, в порівнянні з іншими методами нав'язування умов агрегації, таких як додавання розчинників, є його майже миттєвий результат. Вимикаючи поле в розчинах, які спочатку не містять амилоїд, можна було б відстежувати просування реакції агрегації, не зазнаючи незручностей мертвого часу. Ця методика виявиться дуже цінною, якщо підтвердиться експериментально, при дослідженні ранніх стадій агрегації, які характеризуються утворенням олігомерів.

По-третє, наші розрахунки були зроблені для пептидів, які не мають заряджених залишків, так що єдиним джерелом дипольного моменту в них є основний ланцюг. Наявність зарядів у бічних ланцюгах може суттєво змінити наші висновки. Наприклад, було повідомлено, що електричне поле сприяє перетворенню α-спіралі на випадкові клубки та β-листи в пептиді хвороби Альцгеймера Аβ1-40[344], замість того щоб виступати в ролі інгібітора як це передбачається в цій роботі. Автори змогли визначити кілька ключових залишків, що мають електричні заряди, розташовані на спіралі, яка зазнає структурного переходу під дією електричного поля. Зазначено, що взаємодія цих залишків із зовнішнім полем спонукає перехід у більшій мірі, ніж взаємодія атомів основного ланцюга. Таким чином, вплив електричного поля на білки може бути дуже специфічним для первинної структури і повинен бути дослідженим на індивідуальній основі.

Зрештою, ми відзначаємо, що вказані результати покладаються на ряд наближень. По-перше, аналітичні формули були використані для обчислення Е<sub>с</sub>. Точність цих формул ще необхідно перевірити. По-друге, ми використовували модель фіксованого заряду для силового поля пептиду, яка нехтує впливом електричної поляризації викликаної електричним полем [345]. По-третє, було знехтувано впливом електричного поля на воду. Оскільки вода є посередником взаємодії між пептидними атомами, цей вплив може виявитися важливим. Почетверте, у нашій моделі відсутні іони протилежних зарядів, які, як правило, оточують біомолекули в розчині. Відомо, що іони реагують на зовнішнє електричне поле і, таким чином, можуть відігравати певну роль у визначенні шляхів згортання та агрегації білків, особливо тих, що мають заряджені амінокислотні залишки [346]. Легко побачити, що кожне із цих наближень обмежує точність наших передбачень. Наша оцінка Е<sub>с</sub> безсумнівно містить числові похибки. Проте точну величину Е<sub>с</sub> важко оцінити, враховуючи складність задачі. Ми сподіваємось, що експериментальні дослідження зможуть забезпечити остаточну перевірку висновків, викладених в цій роботі. Зокрема, буде дуже цікаво з'ясувати, чи амилоїдні фібрили, утворені внутрішньо невпорядкованими пептидами, подібними до розглянутих тут, зможуть розпастися під дією електричного поля.

### РОЗДІЛ 5.

# СТРУКТУРНІ ПЕРЕХОДИ БІЛКА МІОЗИНУ

З огляду на великий розмір молекули міозину прямі симуляції переходу відновлення в атомному представленні дуже складні. Найдовші симуляції для системи вимірюються кількома наносекундами[222; 224]. Основна мета даної роботи розширити масштаб цих симуляцій. Нами було проведено серію тривалих, некерованих симуляцій в атомному представленні для дослідження динаміки станів М\* та М\*\* при постійній температурі у явному та неявному розчиннику. Масштаби часу, 10-50нс, та кількість згенерованих траекторій, від 5 до 10, значно перевищують ті, що були повідомлені раніше. Вперше, в нашому моделюванні ми простежуємо спонтанне закриття ключа петлі ІІ у траєкторіях, яке почалося з передвідновлювальної конформації М\*. Динаміка області жолоба зв'язування АТФ має багатостановий характер зі стабільними відкритими та закритими конформаціями. Хоча повний перехід від М\* до М\*\* не спостерігався в нашому моделюванні, отримані структурні ознаки його початкових кроків, що відповідають експерименту. Зокрема, відстані між залишками К498 та А639 добре корелюють з відповідними відстанями, виміряними в експериментах EPR та FRET [19]. Загалом, наші результати підтримують багатоетапну модель стрибка відновлення, при якій ключ закриття петлі II не впливає на домен-конвертор одразу, а лише через певний проміжок часу[225; 227; 228].

Враховуючи, що перехід відновлення – це багатокроковий процес, в якому головні події відбуваються в областях що фізично відокремлені одна від одної, є зміст поставити питання про можливість автономного існування цих областей. Зокрема, цікаво було б дізнатися, чи область генерації сили містить певну підчастину, яка є меншою за розмірами від повного білка, проте демонструє функціонально важливі переходи. Знайти таку мінімальну модель, яка демонструє експериментальний перехід М\* - М\*\* є наступною метою даної роботи. Зокрема нас цікавить роль різних структурних компонент, що беруть участь у цій моделі. Наші симуляції показують, що ізольований міозиновий фрагмент, що містить релейну спіраль, має незначну внутрішню перевагу, щоб залишатися у спіральному стані. Додавання до цього фрагмента релейної петлі (relay loop) суттєво збільшує спіральність, що відповідає стану М\*, але не допомагає утворювати злам чи згин, який існує в стані М\*\*. Хоча домен-конвертор повинен прикріплюватися до релейної спіралі під час ходу відновлення для запобігання непродуктивним взаємодіям зі спіраллю SH1, цей процес також не сприяє утворенню зламу. З наших симуляцій 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, як показує багато досліджень [347], наші симуляції відповідають такій новій моделі "відновлювального ходу". Першим кроком є закриття ключа ІІ. Це викликає зміщення в SH1, що згодом викликає перетворення релейної спіралі з переважно М\*-подібної до переважно М\*\*-подібної конформації. Нарешті, релейна спіраль обертає прикріплений до неї конвертор, завершуючи структурний перехід.

Насамкінець, ми скасовуємо обмеження на положення SH1 спіралі і показуємо в точних симуляціях методом обміну реплік, що модель яка утворюється, має лише два стабільні стани. Кути повороту домену-конвертора, що спостерігаються в наших симуляціях, дуже схожі на ті, що отримані в кристалографічних станах М\* та М\*\*, вказуючи на те, що збудована модель являє собою функціональний мотив міозину. Невеликий розмір фрагмента дозволяє нам вперше досліджувати, на атомному рівні, поворот домену-конвертора, відповідального за змах важеля. Наше моделювання виявляє критичну роль SH1. Незначне зміщення цієї спіралі в бік від релейної спіралі, змінює популяцію переважно з М\* до переважно М\*\* 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. Укорочений міозиновий фрагмент, введений у цій роботі, добре підходить для вивчення мутацій в області генерації сили міозину, включаючи мутації, пов'язані з гіпертрофічною кардіоміопатією [38; 39; 348].

# 5.1. Перехід відновлення як двокроковий процес

### 5.1.1. Симуляції в атомному представленні

Якість обчислювальних моделей оцінюється порівнянням з експериментом. На сьогодні, на додачу до кристалографічних структур міозину в двох кінцевих точках стрибка відновлення, М\* (структурний стан стрибка передвідновлення) та М\*\* (структурний стан стрибка поствідновлення), є дані спектроскопічних дослідженнь[18; 230], що відображають структурну кінетику переходу між двома станами. Відстань і розподіл відстані між міченими залишками К498 та А639 в міозині, розглянутому в комплексі з аналогами АТФ, що не піддаються гідролізу, АДФ.Рі, вимірювались за допомогою імпульсних EPR та FRET. Розподіл відстаней між мітками показав два максимуми, які були інтерпретовані як такі, що відповідають структурним станам міозину М\* та М\*\*. Ми використовуємо цей розподіл для того, щоб оцінити якість проведеного моделювання.

### 5.1.1.1. Динаміка міжзалишкових відстаней в некерованих симуляціях

Спершу було з'ясовано чи можливо відтворити двостанову динаміку міозину безпосередньо в некерованих симуляціях, без будь-яких припущень стосовно проміжних станів під час переходу з М\* в М\*\*. Симуляції були проведені для білка в атомному представленні, використовуючи явний розчинник. Розподіл відстаней між N<sub> $\zeta$ </sub> атомом К498 і С<sub> $\beta$ </sub> атомом А639, отриманий для станів М\* і М\*\* в симуляціях з загальною тривалістю 50*нс* показаний на **Рис. 5.1** разом з експериментальними даними імпульсного EPR[18; 230]. Функції розподілу зосереджені навколо середніх значень 3.4*нм* для стану М\*\* та 3.8*нм* для стану М\*, що добре узгоджується з експериментальними даними. Середня відстань відходить дальше від початкового значення в симуляції М\*, ніж в симуляції М\*\*, що свідчить про більшу конформаційну свободу першого стану. В обох станах М\* і М\*\* немає помітних ознак багатостанової динаміки.

Таким чином, на **Рис. 5.1** видно, що в часовому масштабі виконаних симуляцій, 50нс в сукупності, міозин зазнає лише локальних коливань без зміни конформаційних станів, які можуть стосуватись переходу стрибка відновлення.



Рис. 5.1 Функції розподілу ймовірностей для відстані між атомом  $N_{\zeta}$  К498 та атомом  $C_{\beta}$  А639, що спостерігаються в симуляціях з явним розчинником при T = 300К. Вертикальні лінії відповідають початковим значенням відстані в кристалографічних станах М\* та М\*\*. Синя лінія – експериментальна крива для ЕРR розподілу відстаней між мітками[18; 230].

Звідси випливає, що модель, яка використовує явний розчинник, занадто повільна для того, щоб досягти якісної узгодженості з експериментом для розподілу відстані К498-А639.

Для того, щоб зробити модель ефективнішою для обчислень, її потрібно спростити. Перше і найбільш природне спрощення стосується того як враховується розчинник. На відміну від явного розчинника, який представляє будь-яку молекулу води з атомною точністю, неявний розчинник відображає ефект молекул води через ефективні потенціали, що діють на білок. Як наслідок, досягається значне зниження загальної кількості ступенів вільності в симульованій системі. У цій роботі симуляції з моделлю неявного розчинника проходили приблизно в 5 разів швидше ніж еквівалентна модель з явним розчинником, що дозволяє нам подовжити загальний час симуляції на згадану величину. Ще одною пе-
ревагою неявної моделі розчинника є прискорена конформаційна динаміка білка. В явному розчиннику, динаміка розчинених молекул контролюється в'язкістю розчинника або внутрішнім тертям. Величина тертя використовується як параметр при симуляції неявного розчинника і, таким чином, може варіюватися для отримання швидшої або повільнішої динаміки. Ми використовували коефіцієнт тертя 0.5*nc*<sup>-1</sup>. Щоб оцінити отриману величину прискорення, ми обчислили коефіцієнт дифузії для молекули метану в неявних і явних розчинниках для вищезазначеного коефіцієнта тертя при Т = 300К та всіх інших умовах еквівалентних до нашого моделювання міозину. Коефіцієнт дифузії для молекули метану, виміряний у неявному розчиннику, становив 0.3нм<sup>2</sup>/пс, а в явному розчиннику -0.005нм<sup>2</sup>/пс, що привело до прискорення динаміки приблизно в 50 разів. Таким чином, ми оцінюємо, що наша 50*нс* симуляція в неявному розчиннику має бути здатною побачити конформаційні переходи в молекулі міозину, що відбуваються на мікросекундній шкалі часу в явному розчиннику в еквівалентних термодинамічних умовах, такі як закриття петлі. Єдиний недолік моделей з неявним розчинником полягає в тому, що вони побудовані на ряді наближень, які можуть бути неточними. Однак остання генерація неявних розчинників, особливо тих, які базуються на формалізмі узагальненої моделі Борна (GB), має відмінну якість [138]. У цій роботі ми використовуємо модель GB, розроблену Онуфрієвим та ін. [349], що дає енергію електростатичної сольватації у відмінному узгодженні з більш точним рівнянням Пуассона-Больцмана.

Функції розподілу відстаней між мітками, отримані при симуляції з неявним розчинником при T = 300K, зображені на **Рис. 5.2**. Розподіл відстаней, отриманий для симуляцій стану М\* добре узгоджується з відповідним розподілом в явному розчиннику, маючи спільну унімодальну форму і позицію максимальної ймовірності. В симуляціях М\*\*, розподіл відстаней зміщується в бік більшого значення. Важливо, що розподіл відстаней ані для М\*, ані для М\*\* не має багатомодального характеру, що є притаманним для декількох альтернативних кон

формацій, які спостерігаються під час симуляцій. Таким чином, ми приходимо до висновку, що навіть довший час симулювання в неявному розчиннику не є достатньо тривалим для того, щоб виявити перехід стрибка відновлення в міозині. Загальним інструментом для досягнення ще більшої конформаційної динаміки є підвищення температури модельованої системи. Якщо реакція контролюються бар'єром вільної енергії  $\Delta F$ , її швидкість



**Рис. 5.2** Такий як **Рис. 5.1**, але для неявного розчинника. Симуляції при *T*=350К, суцільні лінії, і *T*=300К, штрих-пунктирні лінії.

збільшується відповідно до співвідношення  $\Delta F/kT$ , де k – це константа Больцмана а T - температура. Для перевірки ефективності цього інструменту в даному дослідженні, ми повторили всі симуляції при вищій температурі T = 350 К. Отримані функції розподілу показані на **Рис. 5.2**. Простежуються чіткі якісні зміни порівняно з T = 300 К. По-перше, розподіли відстаней для структурних станів М\* та М\*\* стають значно ширшими. По-друге, і, що найважливіше, безсумнівно з'являється мультимодальний характер функцій розподілу. Два максимуми спостерігаються для симуляцій М\* і три максимуми для симуляцій М\*\*. Ширина розподілу відстаней для М\* і М\*\* є майже однаковою, але їхні форми відрізняються одна від одної, що є очікуваним, оскільки ми не вважаємо, що в наших симуляціях має місце встановлення рівноваги, при якій обидві симуляції дають той самий розподіл. Ми розраховуємо на те, що конформаційні ансамблі, отримані в обох симуляціях, частково перетинаються, але ми не очікуємо повної збіжності. Ми дійшли до висновку, що наші розрахунки при T = 350 К якісно узгоджуються з експериментом стосовно відстані між К498 і Аб39. Водневий зв'язок між атомами нітрогену G457 та атомом  $P_{\gamma}AT\Phi \epsilon$  характерною ознакою поствідновлюваної конформації М\*\*, що спостерігається в кристалографічних дослідженнях. Він виникає внаслідок того, що петля утворена залишками D454-I460 в стані передвідновлення М\*, наближається до місця приєднання AT $\Phi$  і завершує операцію, яка називається замиканням ключа (SW) II. Подія замикання активує гідроліз AT $\Phi$ [226; 350; 351], який слугує тим спусковим гачком, який приводить в рух стрибок відновлення[220]. Наші симуляції ідеально підходять для аналізу ранніх етапів цього процесу. **Рис. 5.3** показує функцію розподілу відстаней між ато-

мами G457: N та АТФ: Р<sub>у</sub>, отриманих в симуляції з явним розчинником в стані М\*\*, де присутній водневий зв'язок. Розподіл зосереджений навколо відстані 0.42нм із незначною підпопуляцією на рівні 0.36нм, що свідчить про те, що зв'язок залишається непорушним протягом всього часу симуляції. Для порівняння, розподіл, отриманий у неявному розчиннику при T = 300K з початковою структурою М\*, тобто без присутності водневого зв'язку, показує 4 максимуми, всі з яких розташовані на відстанях більших ніж 0.5нм. Фактично не має жодних збігів із вихідним розподілом, що вказує на відсутність водневих зв'язків. Точніше, симуляції при низькій температурі не дозволяють простежити зами-



Рис. 5.3 Функція розподілу для відстані між атомом N G457 та Р $_{\gamma}$ молекули АТФ. Чорна лінія: симуляції в явному розчиннику, що розпочалися з структурного стану М\*\* в стані закритого ключа II. Кольорові лінії позначають симуляції в неявному розчиннику, розпочаті із стану М\* із відкритим ключем. Червона лінія: T = 300K, синя лінія: T = 350K. Спонтанне замикання ключа спостерігається лише при температурі T = 350K.

кання SW II.

Вищі температури прискорюють конформаційну динаміку, збільшуючи імовірність переходів. Функція розподілу, отримана при T=350K в неявному розчиннику (Рис. 5.3) показує 3 максимуми, найвищий серед яких розташований при 0.42нм. Це така ж відстань, як і в вихідному розподілі, що свідчить про формування водневого зв'язку в цих симуляціях. Аналіз усіх 10 траєкторій показав 6 випадків закриття SW II. Один із цих випадків був зворотнім, де утворення водневого зв'язку супроводжувалося тимчасовим розривом та подальшим відновленням. Загалом, кількість закриттів SWII є невеликою, що дозволяє вважати, що енергетичний бар'єр, який контролює їх, є високим. Крім того, динаміка міжатомної відстані G457-ATФ має багатостановий характер, як показано на Рис. 5.3, де спостерігається щонайменше два мінімуми між відкритими та закритими станами. Питання про те, чи кратність проміжних станів це наслідок обмеженої вибірки в нашому моделюванні, чи відображення справжньої природи закриття SWII, залишається відкритим. В останньому випадку динаміка петлі SWII буде визначатися більш, ніж одним бар'єром вільної енергії, кожен з яких потенційно може відігравати унікальну роль у переході стрибка відновлення.

#### 5.1.1.3. Події в нуклеотидному жолобі

Вперше, спонтанне закриття петлі SWII спостерігається в некерованій симуляції. Так як закриття SWII приводить до стрибка відновлення, важливо дослідити конформації міозину, які супроводжують його. Для цього конфігурації міозину з відстанню G457: N - ATФ: Р<sub>γ</sub> меншою за 0.46*нм* (перший мінімум розподілу ймовірності положення SWII при T = 350K в неявному розчиннику на **Рис. 5.3**), в яких SWII є в замкненому стані, були згруповані в кластери. Кластеризація проводилася за допомогою взаємного RMSD, порахованого для атомів C<sub>α</sub> фрагментів G175-N188, N233-R238, S456-E459 та атома P<sub>γ</sub>ATΦ, всі з яких розташовані в межах 1*нм* від молекули ATΦ і, таким чином, належать до жолоба зв'язування нуклеотидів. Одне з основних сімейств структур, що виникли внаслідок такої кластеризації, показано на **Рис. 5.4** у порівнянні з експериментальною конформацією М\*\*. Дві структури практично ідеально співпадають, що видно з взаємного  $C_{\alpha}$  RMSD менше ніж на 0.1*нм*. Важливим структурним мотивом, що спостерігається в жолобі зв'язування АТФ, є солевий місток між залишками R238 та E459. Зі структурної перспективи, він об'єднує ключ петлі II і ключ петлі I (**Рис. 5.3**). Для вивчення взаємозв'язку між двома подіями, утворення водневого зв'язку між G457:N-АТФ: Р<sub>γ</sub>, і солевого містка між R238: C<sub>ζ</sub>-E459: C<sub>δ</sub>, ми побудували карту вільної енергії, зображену на **Рис. 5.5**, яка задана як функція двох параметрів порядку *d1* та *d2*, що позначають відстань між парами атомів G457:N-АТФ: Р<sub>γ</sub> і R238: C<sub>ζ</sub>E459: C<sub>δ</sub> відповідно.

Спочатку SWII є відкритим, а солевий місток відсутній у стані М\*, причому *d1* та *d2* близькі до 1*нм* (зелена точка на **Рис. 5.5**(а)). У процесі симуляції обидві

відстані швидко зменшуються. Очевидно, що найстабільніша конфігурація спостерігається для d1,d2<0.4нм, де SWII є закритим, а солевий місток – сформованим. Однак, сильна кореляція між двома параметрами порядку відсутня. Також варто відзначити концентрацію станів в місцях, де наявний солевий місток, але петля SWII є відкритою (d1~0.8nm та d2~0.4nm). Те ж саме спостерігається і щодо замкнутої петлі SWII і відсутності солевого містка, d1~0.4*нм* і d2~0.6*нм*, що дозволяє стверджувати, що два структурні мотиви можуть діяти незалежно один від одного. Аналіз симуляції М\*\* приводить до такого ж висновку ((**Рис. 5.5**(b)). Почи-



Рис. 5.4 Конформація жолоба зв'язування АТФ. Жовтий колір: кристалографічна структура М\*\*, бірюзовий високотемпературні симуляції в неявному розчиннику.

наючи з закритої петлі SWII і стану сформованого солевого містка (зелена точка на **Рис. 5.5**(b)), водневий зв'язок між G457:N-ATΦ: Р<sub>γ</sub> і солевий місток між R238:Cz-E459:C<sub>δ</sub> можуть розриватися в різний час. Форма карти вільної енергії є схожою для обох симуляцій.



**Рис. 5.5** 2D карта вільної енергії, яка спостерігається в симуляції в неявному розчиннику при T = 350K для а) передвідновлювального стану M\* і б) поствідновлювального стану M\*\*. Параметри порядку *d1* і *d2* характеризують стан ключа II та солевого містка R238-E459 і визначаються як відстань між атомами G457: N та ATФ: Р<sub>γ</sub> та R238: C<sub>ζ</sub> та E459: C<sub>8</sub>. Зелені точки представляють початкові конфігурації з відкритим ключем II і відсутнім солевим містком в а), і закритим ключем II і присутнім солевим містком в b). Незважаючи на те, що найбільш стабільна конфігурація має місце при закритому ключі II та сформованому солевому містку, ці дві події не сильно корелюють. Енергія у всіх графіках вільної енергії у цій роботі дається в одиницях *kT*, де *k*-константа Больцмана.

Дослідження з використанням мутованих залишків показують [352; 353], що солевий місток впливає як на гідроліз АТФ так і на зв'язок між різними доменами міозину, але механізм цього впливу досі невідомий. Яманака та інші [224] показали, що місток руйнується після гідролізу АТФ. Наші симуляції узгоджуються з цим висновком, показуючи, що солевий місток не є дуже стійким. Слабкий зв'язок між ключами I і II дозволяє їм діяти послідовно і незалежно один від одного, що, можливо, є важливим із функціональної точки зору. 5.1.1.4. Конформаційні стани релейної спіралі та домену-конвертора

Для моделювання переходу стрибка відновлення між структурними станами М\* і М\*\* необхідна надійна міра подібності, здатна розрізняти ці два стани. Кристалографічні дослідження надаатомну конфігурацію ЮТЬ молекул міозину, що дозволяє використовувати середньоквадратичне зміщення (RMSD) як міру структурних вілмінностей. Але атомні структури не містять інформації про коливання, які відбуваються в білках в їх присередовищі, родному шо приводить до неточностей у



Рис. 5.6 Середньоквадратичні флуктуації (RMSF) виміряні для атомів С<sub> $\alpha$ </sub>. Чорна лінія: значення, отримані для траєкторії М\* в явному розчиннику, щодо середньої структури після підпасування всіх записаних структур до конформації М \*. Червона лінія: та ж величина для траєкторії М\*\*, обчислена відносно конформації М\* після підпасування вздовж залишків 100-400. Домен-конвертор виявляється областю, в якій спостерігається найбільша розбіжність.

встановленні еквівалентності станів.

Ми порівняли повний набір із п'ятизалишкових послідовних сегментів вздовж первинної послідовності двох атомних станів М\* та М\*\*, розглянутих в цій роботі, і знайшли більше ніж 20 несхожих сегментів із C<sub> $\alpha$ </sub> RMSD > 0.5Å. Застосування коротких сегментів дозволило нам виявити ділянки структурної розбіжності з високою роздільною здатністю. Однак, враховуючи коливання, не всі із цих сегментів залишаються істотно відмінними. Ми оцінили ступінь коливань для симуляції з явним розчинником при T = 300K. Ті самі розрахунки RMSD були виконані для всіх конформацій міозину, що спостерігалися в наших симу-

ляціях. Якщо мінімальне RMSD для деяких п'ятизалишкових сегментів є більшим, ніж 0.5 Å, то його структура в станах М\* та М\*\* вважається відмінною. В іншому випадку, вони ідентичні в статистичному сенсі. Ми провели симуляції структурних станів М\* і М\*\* для того, щоб скласти списки розбіжних сегментів. Кристалографічна структура стану М\*порівнювалась до структури стану М\*\* спостережуваної в симуляціях. Подібні розрахунки проводились, коли стани мінялись місцями.

Списки сегментів, отриманих в двох розрахунках, співпали і містили наступні відрізки амінокислотних залишків: 484-489, 497-502, 504-512 і 700-709. Останній сегмент належить до N-кінцевої частини домену-конвертора. Оскільки доменконвертор обрізаний у розглянутій структурі міозину, коливання в сегменті 700-709, цілком ймовірно, піддаються впливу кристалографічних арте-



Рис. 5.7 Рисунок ілюструє торсійний кут  $\Theta$ , який ми використовуємо, що розрізняти стани М\* та М\*\*. Кут утворює лінія, що проходить через атоми С<sub> $\alpha$ </sub>. Е497 та L730, з площиною, утвореною атомами С<sub> $\alpha$ </sub>. Е497, R689 та S465.

фактів. Тому ми не розглядали сегмент домену-конвертора як розбіжний. Перші три сегменти належать до релейної спіралі і релейної петлі, і вони, очевидно, є єдиними частинами розглянутих структур міозину, у яких відбуваються значні зміни після конформаційного переходу. Тому було вирішено використовувати RMSD для залишків 484-512 як один із параметрів порядку, що успішно визначає стани М\* та М\*\*.

Проте локальна структура не завжди відображає повну картину відмінностей між двома білковими конформаціями. Цілком можливо, що великі структурні перебудови доменів приводять до малих значень RMSD для коротких сегментів.

Для виявлення великомасштабних конформаційних змін, ми дослідили структурні коливання в станах М\* та М\*\*, що спостерігаються в наших симуляціях з явним розчинником. Спочатку, коефіцієнт середньоквадратичної флуктуації (RMSF), що відповідає відхиленню від середньої структури був обчислений для кожного C<sub>α</sub> в симуляції стану М\* після підпасування всіх збережених структур до кристалографічної конформації. Було виявлено варіації в гнучкості білка вздовж первинної структури, див. Рис. 5.6, причому найбільш нерухомі атоми виявилися між залишками 100 і 400. Пізніше, всі структури в симуляції М\*\* були підпасовані до конформації М\* вздовж С<sub>а</sub> залишків 100-400, для яких було пораховано RMSF для всіх атомів С<sub>а</sub> (Рис. 5.6) відносно вихідної структури. Найбільше відхилення між М\* та М\*\* спостерігається в домені-конверторі, залишки 700-759. Візуальне обстеження підпсованих структур показує, що їх домени-конвертори обертаються по відношенню один до одного, що є ознакою переходу генерації сили в міозині. Таким чином, поворот домену-конвертора виявляється найбільш значимою структурною різницею, яка глобально характеризує перехід від М\* до М\*\*. Для кількісного опису повороту ми запровадили торсійний кут Θ, сформований лінією, що проходить через Сα L730 в доменіконверторі, і площину, утворену певними С<sub>а</sub> атомами релейної і SH1 спіралі (E497, R689 i S465, Puc. 5.7). Кут  $\Theta$  змінюється приблизно на 30 градусів при переході від М\* до М\*\*.

Два параметри порядку, RMSD для залишків 484-512 та кут  $\Theta$ , можуть бути використані для характеристики структурних переходів у міозині як на локальному, так і на глобальному рівні. **Рис. 5.8** показує вільну енергію як функцію цих двох параметрів, отриманих в симуляції М\* з неявним розчинником. У стані, зв'язаному з АТ $\Phi$ , міозин здатний здійснювати переходи між станами М\* в М\*\* [17]. Розташування М\* і М\*\* на карті вільної енергії, показані контурами, свідчать про те, що такі переходи не спостерігаються в наших симуляціях з неявним розчинником. Досліджені зміни кута  $\Theta$  не супроводжуються одночасною

перебудовою релейної спіралі та петлі, про що свідчить високе значення RMSD у цій області. Отож, ми прийшли до висновку, що наша симуляція не простежує перехід стрибка відновлення в міозині. Подібний висновок отримуємо щодо симуляції, розпочатої зі стану М\*\* (дані не показано).

# 5.1.2.Аналіз результатів

# 5.1.3. Несуттєва взаємодія між областю приєднання нуклеотидів та областю генерації сили

Наші симуляції надають нову інформацію про перехід відновлення в міозині. Вважається, що стрибок відновлення спричинений закриттям SWII [220], яке ініціює конформаційні зміни, що приводять до повороту домену-конвертора. Існують дві інтерпретації механізму впливу між нуклеотидним жолобом та областю генерації сили. Згідно з першою, Фішер та ін. [220] стверджують, виходячи з розрахунків мінімізації енергії, що між М\* та М\*\* існує певний шлях проміжних кроків, по якому відбувається перехід. В ранніх роботах [220] пропонується, що формування солевого містка R238-E459 допомагає закрити SWII, який, у свою чергу, витягує N-кінцеву ділянку релейної спіралі через бічний ланцюг N475. У результаті релейна спіраль повертається навколо опорної точки, утвореної гідрофобним кластером F652-F481-F482. Оскільки релейна спіраль має обмежений діапазон руху в стані М\*, тривале навантаження приводить до розриву водневих зв'язків між залишками 486 і 487, що приводить до утворення зламу у спіралі та повороту домену-конвертора. У пізніших моделях [219; 221] спостерігається, що початкове закриття SWII залишається тим самим, але поворот конвертора обумовлений поршнеподібним зміщенням спіралі SH1, опосередкованим клино-подібною петлею утвореною залишками 572-574. Незважаючи на те, що в цих моделях мікроскопічні деталі відрізняються, їхня спільність полягає в упорядкованості послідовності переходів між чітко визначеними проміжними станами, вздовж яких відбувається реакція. Цей механістичний погляд

був підданий сумніву другою групою дослідників[208; 225; 227; 228], яка виступила проти сильного зв'язку між SWII та областю генерації сили. Докази, отримані завдяки симуляції з покращеною вибіркою [227; 228], показують, що SWII може залишатися закритим, тоді як поворот домену-конвертора ще не завершився. Те саме стосусться і повороту конвертора, тоді як SWII є відкритим. Хоча існує кореляція між станами структурних елементів, двох вона не є достатньо сильною, щоб забезпечити механістичну Замість інтерпретацію. црого



Рис. 5.8 Вільна енергія, як функція двох порядкових параметрів : відхилення RMSD від стану М \*\* над залишками С $\alpha$  484-512 та кут  $\Theta$ , що характеризує стан повороту доменуконвертора, отримана в симуляціях з неявним розчинником М\*. Контури показують розташування станів М\*\* та М\*, що спостерігаються в симуляціях явного розчинника. Глобальний перехід від М\* до М\*\* не спостерігається. Вільна енергія вимірюється в одиницях kT, де k константа Больцмана.

автори висувають статистичне пояснення на основі "ансамблевих зміщень", згідно з яким повернений конвертор є статистично вигідним для закритого стану ключа II, але не пов'язаний з ним детермінованим чином. Ансамблевий підхід визнає значну роль ентропії в переході[228], що підтверджується великою різницею ентропії між експериментально дослідженими станами М\* та М\*\*[19].

Наші симуляції підтримують другу, статистичну інтерпретацію. Починаючи з початкового стану передвідновлення М\* ми бачимо, що закриття SWII відбувається на ранньому етапі в процесі, що повністю узгоджується з роллю спускового гачка для цієї події в структурному переході[220]. Незважаючи на закриття SWII, ми не бачимо супровідного повороту домену-конвертора в наших симуляціях, що означає, що це відбувається пізніше, протягом довшого відрізку часу. Таким чином, наші результати найбільше узгоджуються з ідеєю, що стрибок відновлення є двокроковим процесом, який складається з замикання SWII та ротації конвертора, які розділені певною часовою затримкою[225]. Зв'язок між двома кроками видається слабким, але його точний механізм не може бути оціненим в наших симуляціях.

# 5.1.3.1. Чи є закриття SWII однокроковою реакцією?

Всі події закриття SWII, які спостерігались в наших симуляціях, по суті, приводять до тієї ж конфігурації нуклеотидного жолоба, що була отримана експериментальним шляхом. Відсутність структурної гнучкості свідчить про те, що замикання ключа є простою однокроковою реакцією, в якій немає місця для перехідних станів. Виходячи з цієї простоти, одновимірна репрезентація реакції є виправданою, що також підтверджується попередніми дослідженнями, які базуються на одному параметрі порядку[227]. У зв'язку з цією моделлю постає важливе питання: якою є її координата реакції? Самоочевидним вибором є відстань між атомами водневого зв'язку G457:N і AT $\Phi$ :P<sub>γ</sub>. Проте на даний момент неможливо оцінити якість цього вибору, опираючись лише на декілька спостережень закриття SWII. Використання неявного розчинника повинно дозволити в майбутньому отримати кращу статистику. Результатом таких досліджень стане здатність належно моделювати стрибок відновлення на ранньому етапі. Це включає в себе і здатність оцінити вплив мутацій на тригерну реакцію[354].

### 5.1.3.2. Замикання SWII в контексті експериментальних даних

SWII в закритих та відкритих станах було досліджено за допомогою рентгенівської кристалографії в стані, коли міозин перебуває в комплексі з нуклеотидними аналогами, що не можуть гідролізуватися[355; 356; 357]. Ці дані узгоджуються з експериментами з нуклеотидного переслідування [223; 358; 359; 360], в яких спостерігали замкнуту конформацію SWII при зв'язуванні з АТФ та відкриту – при зв'язуванні з АДФ. Як показують атомні конформації, закритий та відкритий структурний стан SWII характеризуються вигнутими та прямими релейними спіралями відповідно. Спочатку було запропоновано, що існує пряма залежність між замкнутістю SWII та згином в релейній спіралі в межах одного структурного стану міозину (М\*\*). Структурні пертурбації спіралі навіть вважалися причиною зміни флуоресцентної інтенсивності притаманної міозину та вивченої раніше в кінетичних дослідженнях скелетного міозину[361]. Дійсно, площа доступної поверхні одного з міозинових триптофанів (W501) істотно змінюється під час структурного перетворення М\* $\rightarrow$ М\*\*. Але міозин з мутованим W501, показує несподіване падіння внутрішньої флуоресценції на початковій стадії взаємодії міозину з АТФ, що вказує на те, що інші залишки триптофану (загалом є п'ять залишків триптофану в голівці скелетного міозину), також відіграють роль у внутрішній зміні флуоресценції.

Міозин скелетних м'язів містить триптофани, розміщені близько до нуклеотидного жолоба. Шляхом одиничних мутацій у відповідних місцях, W113, W129, та W131, була зроблена спроба описати кінетику зв'язування нуклеотидів та, можливо, кінетику структурної перебудови SWII[362]. На жаль, виявилось, що ці триптофани нечутливі до закриття SWII після взаємодії міозину з АТФ. Дослідження нуклеотидних аналогів зі спіновою міткою показали, що нуклеотид стає нерухомим після взаємодії з міозином, проте не може відрізнити структурні стани SWII[363]. Дослідженням з використанням флуоресцентного (mant) нуклеотиду теж не вдалося відслідкувати момент закриття SWII [360]. В дослідженнях за методом температурних стрибків[17; 218] було виявлено, що внутрішня флуоресценція міозину в комплексі з нуклеотидним аналогом, що не гідролізується, змінюється при стрибках температури, що відображає зміну конформації міозину. Це були перші експериментальні результати, що вказують на те, що стан ключа SWII та структура релейної спіралі не пов'язані механічно в структурних станах міозину, М\* та М\*\*. Нещодавно, дослідження з використанням методу EPR неперервної хвилі, імпульсних EPR, та FRET підтвердили нежорсткий зв'язок між біохімічним станом міозину (визначений зв'язаним нуклеотидом і, як наслідок, закритим або відкритим SWII) і структурним станом області, що генерує силу[18]. Наші симуляції підтверджують результати цього нещодавнього експерименту, показуючи відсутність строгої відповідності між SWII та структурними станами релейної спіралі і пропонуючи, що закриття SWII та структурні зміни в області генерації сили відбуваються в різний час під час стрибка відновлення.

### 5.1.4. Методи і моделі

В цьому дослідженні білки були представлені з атомною точністю, використовуючи силове поле AMBER99[364], модифіковане Хорнаком [32]. Всі симуляції були виконані пакетом GROMACS4[121; 324] з використанням силового поля адаптованого Соріном та Панде[365]. Симуляції з явним розчинником були проведені використовуючи модель води TIP3P[33]. Узагальнена модель Борна (GB), впроваджена Онуфрієвом, Башфордом та Кейсом [349], використовувалася в симуляціях з неявним розчинником. При цьому значення діелектричної константи є було вибрано 80. Хімічні зв'язки в молекулах води були зафіксовані згідно алгоритму SETTLE [327]. Зв'язки з атомами Гідрогену в білку були обмежені відповідно до алгоритму LINCS [326].

В симуляціях з явним розчинником атомні структури були створені, як повідомлено в роботі Агафонов та інших[18]. Молекулу білка було поміщено в кубічну коробку розміром 12-13*нм*, що містить 66,000-67,000 молекул води, і врівноважено за умов, коли всі важкі атоми обмежені їх вихідними положеннями. Продуктивні симуляції проводились при постійній температурі за допомогою термостату Носе-Гувера[328] з константою часу 0.05*nc*. Для взаємодій Ван дер Ваальса було використано довжину обрізання в 1*нм*, тоді як списки сусідів оновлювалися кожні 10 часових кроків. Метод Евальда (РМЕ) [329] використовувався для розрахунку електростатичних взаємодій. У неявному розчиннику для електростатичних і ван-дер-Ваальсових сил використовувався один радіус обрізання, 1.2*нм*. Часовий крок в усіх симуляціях становив 2*фс*.

Ряд симуляцій проводився при різних температурах та з різними початковими структурами. Інформація про всі проведені симуляцій з сумарним часом більшим ніж 2µs, наведено в Таб. 5.1.

	Розчинник	Симуляції	Темпера-
			тура
Початкова	Явний	5 траєкторій по 10ns	300K
конформація М*			
nonpopulation	Неявний	10 траєкторій по 50ns	300K, 350K
Початкова	Явний	5 траєкторій по 10ns	300K
конформація М**			
	Неявний	10 траєкторій по 50ns	300K, 350K

**Таб. 5.1** Інформація про симуляції виконані в цій роботі. Детальні відомості про силові поля та моделі розчинників містяться в основному тексті.

5.2. Фактори, що обумовлюють двостанову поведінку області генерації сили

5.2.1. Умови для існування повороту домену-конвертора в стані М\*\*

5.2.1.1. Мінімальна модель для переходу від конформації М\* до М\*\*

Ми застосовуємо комбінаторний підхід, представлений у розділі "Методи та моделі" для визначення мінімальної моделі, яка демонструє перехід М\*- М\*\*. Щоб знайти компоненти цієї моделі, ми спочатку здійснили підпасування конформацій М\* та М\*\* вздовж N-кінцевої частини спіралі (яка однакова в обох станах), як показано на **Рис. 5.9**(а). Видно, що релейна спіраль утворює злам



**Рис. 5.9** Міозиновий фрагмент, що містить домен-конвертор, релейну спіраль, релейну петлю та спіраль SH1. На а) показано стани М \* і М \*\*, підпасованих вздовж N-кінцевої частини релейної спіралі. На б) - конформація М \*, в якій різні частини позначені різними кольорами. Передбачається, що структурні елементи, зображені в б), утворюють мотив, всередині якого відбувається фолдинг релейної спіралі у дві альтернативні конформації - М \* і М \*\*. Взаємодії, що викликають такий фолдинг, визначаються комбінаторним пошуком, описаним у тексті. Всі зображення, представлені в цій роботі, були створені за допомогою РуМоl [366].

(kink) в структурі М<sup>\*\*</sup> біля залишку F487, що приводить до обертання Скінцевої частини спіралі. Пізніше ми ідентифікували всі взаємодіючі елементи С-термінального мотиву, як показано на **Рис. 5.9** (а). Вони включають в себе: а) релейну петлю (relay loop), що з'єднує релейну спіраль з актин-зв'язуючою областю білка; б) домен-конвертор, який повертається в стані М<sup>\*\*</sup> відносно стану M<sup>\*</sup> і с) спіраль SH1, яка зміщена у конформації М<sup>\*\*</sup> приблизно на 4Å відносно домену-конвертора. Всі інші частини білка або ідентичні в M<sup>\*</sup> та M<sup>\*\*</sup>, або не входять в прямий контакт із С-кінцевою частиною релейної спіралі. На основі цього аналізу побудована обчислювальна модель, яка показана на **Рис. 5.9** (b) разом із позначеннями: 1) релейна спіраль (RH), 2) релейна петля (RL), 3) домен-конвертор (CD) і 4) SH1 спіраль. Роль різних взаємодій, що мають місце в цій моделі у визначенні конформаційних станів релейної спіралі, обговорюється в наступних розділах.

# 5.2.1.2. Фрагмент релейної спіралі має незначну схильність до α-спіральних станів

По-перше, ми перевірили, чи фрагмент, що відповідає релейній спіралі (RH), має тенденцію до згортання в стани М\* і М\*\*. Ці дві структури відрізняються багатьма аспектами, включаючи вторинну структуру, де конформація поствідновлення не має α-спіралі біля позиції 486. Повний аналіз вторинної структури проводився відповідно до протоколу DSSP [330]. Окрім статистичного невпорядковного клубка (random coil), наявні ще два типи вторинних структур: αспіраль та 3<sub>10</sub>-спіраль, які зустрічаються найчастіше. Їх розподіл у білковій послідовності, наведений на Рис. 5.10(а), показує, що витягнута 3<sub>10</sub>-спіраль характерна для залишків 493-495, де її популяція 20% і менше. В розподілі частоти спостереження α-спіралі чітко видно дві ділянки: перша - це залишки 475-486 Nкінцевої частини з високим рівнем заселеності > 50%. Цей сегмент включає в себе як просторово обмежені (475-482) так і вільні залишки (483-486), що вказує на те, що структурування N-кінцевої частини спіралі присутнє вздовж послідовності. Друга область складається з залишків 487-494 і має низький ступінь заселеності - менше 30%, яка поступово зменшується до С-кінцевої ділянки. Зниження досить різке між залишками 486 та 487, де частка зменшується з 55% до 30%. Зазначимо, що саме там спостерігається злам у конформації поствідновлення М\*\*.

Щоб дізнатись більше про присутність структурування вздовж фрагмента, було проведено кластерний аналіз послідовних сегментів з 5 залишками, як описано раніше [367]. Аналіз показав, що всі розглянуті сегменти переважно згортаються в стан α-спіралі. Їх заселеність поступово знижується від 100% в Nкінцевій області до 25% у С-термінальній області. Отримана картина згортання показує, що N-кінцева спіраль поступово зникає до C-кінцевої області, не створюючи альтернативних конформацій. α-спіраль, яка охоплює весь пептид (за лишки 475-494) зустрічається лише у 20% конформацій.

Виходячи з середньоквадратичного зміщення для  $\alpha$ -атомів вуглецю, С $\alpha$ RMSD <1.7 Å, передбачувана частка спіралі М\*\* зі зламом становить менше 1%, тобто є незначною. Щоб визначити, чи спостерігаються деякі залишки такої структури в нашому моделюванні, ми провели аналіз водневих зв'язків атомів остова молекули. Ймовірність утворення зв'язків між атомом оксигену та атомом нітрогену амінокислотних залишків *i* та *i*+4, які є хімічною ознакою  $\alpha$ спіралі, була оцінена на основі взаємної відстані між цими атомами. Відстані <4Å були інтерпретовані як такі, що показують наявність водневих зв'язків.



Рис. 5.10 Структурні характеристики залишків: а) вторинна структура, що спостерігається в наших симуляціях для ізольованої релейної спіралі. Показано дві найбільш розповсюджені невипадкові структури:  $\alpha$ -спіраль та 3<sub>10</sub> спіраль. Стрілка вказує на межу дії гармонічного обмеження. б) Структура водневих зв'язків, яка спостерігається в стані рівноваги та в короткому моделюванні, розпочатому з структури М\*\*. Показана ймовірність утворення водневого зв'язку між атомом оксигену *i*-вого залишку та атомом нітрогену у залишках амінокислот *i* + 4 або *i* + 5. Характерний  $\alpha$ -спіральний шаблон зникає в коротких симуляціях з появою характерних зв'язків *i*, *i* + 5 на місці зламу. Подібні зв'язки відсутні в стані рівноваги.

Крім того, ймовірність водневих зв'язків була оцінена для *i*, *i* + 5 пар. **Рис. 5.10**(б) показує ці ймовірності для випадку коли вони були: 1) обчислені по всій траскторії, що відображає рівноважну вибірку; 2) обчислені протягом перших 1*нс* періоду рівноваги, що відповідає локальній вибірці біля М\*\* стану. Видно, що локальний  $\alpha$ -спіральний шаблон розбитий на пари залишків 485-489, 486-490 та 487-491, кожен з яких втрачає водневі зв'язки різного ступеня. Деякі з цих зв'язків замінюються (485-490) або співіснують (484-489) з  $\alpha$ -спіральними водневими зв'язками *i*, *i* + 5, що характерно для зламу, який утворюється біля залишку 487. Водневий зв'язок, утворений атомом оксигену в положенні М486 повністю втрачається в стані М\*\*. У врівноваженій вибірці імовірність зв'язків *i*, *i* + 5 незначна для всього пептиду, що вказує на те, що заселеність зламу або згину близька до нуля. Тому ми прийшли до висновку, що виокремленому RH-фрагменту притамання схильність лише до стану передвідновлення М\*. Виникнення стану поствідновлення М\*\* в цьому фрагменті мусить бути обумовленим його взаємодією з іншими частинами білка.

# 5.2.1.3. Релейна петля посилює спіральність у релейній спіралі, але не утворює злам

В подальшому ми побудували модель, яка містить релейну петлю на додаток до релейної спіралі, RH/RL. Конформація релейної петлі в кристалографічних конфігураціях М\* та М\*\* відрізняється аж до залишку S510, після чого схожа  $\alpha$ спіраль з'являється в обох станах. Відстань між С $\alpha$  атомами залишку S510 в підпасованих конформаціях М\* і М\*\* є меншою ніж 2 Å, тобто їхні положення майже співпадають. Щоб відобразити цей факт, цей атом був зафіксований в наших симуляціях. На **Рис. 5.11** показана вторинна структура побудованої моделі у порівнянні з моделлю RH з попереднього розділу. Заселеність  $\alpha$ -спіралі збільшується більш ніж у три рази в С-кінцевій частині RH. Кластерний аналіз за залишками 475-497 показує лише одну структуру, яка ідентична експериментально визначеній спіралі стану М\*. Заселеність цієї спіралі в наших симуляціях становить > 70%.

Кластеризація по всій довжині пептиду дозволила виявити 4 стани з повністю сформованою релейною спіраллю, що найчастіше зустрічаються. Вони відрізняються за упаковкою/розташуванням релейної петлі, як показано на **Рис. 5.12**. У стані з найбільшою розповсюдженістю, 30%, релейна петля повертається на 30 градусів навколо осі релейної спіралі (відносно експериментальної структури). Подібне обертання спостерігається в двох інших структурах,



Рис. 5.11 α-спіральний вміст спостерігається для залишків у моделі, яка містить тільки релейну спіраль (червона лінія) і релейну спіраль + релейну петлю, (чорна лінія). Видно, що релейна петля підвищує спіральність у С-кінцевій частині релейної спіралі.

що зустрічаються у 13% та 9% проаналізованих конформацій відповідно, і відсутнє у третій структурі, що зустрічається у 10%. Залишок F487 - це місце, де спостерігається злам. Бічний ланцюг цього залишку лежить на межі зі спіраллю SH1 в стані М\*\* і піддається дії розчинника в стані М\*. У гіпотетичному переході М\*-М\*\* він повинен проходити під релейною петлею з однієї сторони релейної спіралі до іншої. На **Рис. 5.12** видно, що це завдання можна легко виконати, оскільки бічний ланцюг F487 часто зустрічається по обидві сторони петлі. Як і в моделі RH, група спіралей М\*\* зі зламом не була виявлена. Аналіз водневих зв'язків *i*, *i* + 5, характерних для цього стану, показав максимальну заселеність 3% (дані не показані). Проте стани, в яких утворюються ці зв'язки, були неспіральними.

В сукупності, дані, представлені тут, вказують на те, що релейна петля значно підвищує спіральність С-кінцевої частини релейної спіралі. Експериментально визначена конформація в спіральній частині моделі зустрічається з високою ймовірністю. Релейна петля, як видно, згортається в ряд альтернативних конформацій, жодна з яких не ідентична експериментальній структурі. Множинність цих станів вказує на значний рівень фрустрації, притаманний цій частині білка. Як наслідок, невеликі зовнішні пертурбації можуть мати значний вплив на релейну петлю, що робить її дуже чутливою до взаємодії з іншими частинами білка. Ці зовнішні взаємодії відіграють певну роль у обертанні релейної петлі у найбільш розповсюдженому стані (що спостерігається в нашому моделюванні), що



Рис. 5.12 Найбільш розповсюджені конформації, що спостерігаються в наших симуляціях (жовті) у порівнянні з експериментальною структурою М\* (оранжеві). Релейна петля, як видно, складається в ряду альтернативних конформацій з часткою представлення від 9% до 30%. Бічний ланцюг F487, спостерігається з обох боків петлі.

робить її сумісною зі станом М\*. Що більш важливо, ці взаємодії не відповідають за появу функціонально важливого М\*\* стану.

# 5.2.1.4. Домен-конвертор стабілізує стан М\*

В подальшому ми вивчили вплив домену-конвертора. Для зменшення складності обчислення ми розглядали лише два фрагменти: релейну спіраль та релейну петлю (див. Розділ «Методи»). Відстані між атомами Сα у цих фрагментах були зафіксовані відповідним чином, щоб зберегти в цілісності структуру отриманого мотиву. Мотив був цілісним, він міг вільно переміщатися в симуляціях, але не далі, ніж на 9Å від релейної спіралі, що означало б дисоціацію. Отримана модель (RH / RL / CD) містить релейну спіраль, релейну петлю та доменконвертор. Аналіз вторинної структури цієї моделі показує, що домен-конвертор додатково стабілізує релейну спіраль, збільшуючи її заселеність в С-кінцевій частині до більш ніж 95%. Експериментальна спіраль М\* спостерігається у понад 90% конформацій при радіусі відсікання RMSD 1.7 Å для атомів С<sub> $\alpha$ </sub>. Згортання релейної петлі аналогічне тому, що спостерігається в моделі RH / RL. Спостерігається низка альтернативних конформацій, що відрізняються своєю упаковкою

(розташуванням) відносно релейної спіралі. Найбільш поширені з них показано на **Рис. 5.13** разом з аналогічною структурою для моделей RH / RL. За винятком заселеності, 54% у даній моделі та 30% в моделі RH / RL, ці дві структури майже не відрізняються. Релейна петля все ще некоректно повертається на ~ 30 градусів відносно кристалографічного стану М\*. Для домену-конвертора, що прикріплений до релейної петлі, також характерне надмірне повертання, як це видно на **Рис. 5.13**.

У цій моделі для релейної спіралі спостерігалася незначна кількість конформацій М\*\*. Кластеризація показала конфігурацію зі зламом в положенні 487 і шаблоном водневих зв'язків. Ця конфігурація є ідентичною до експериментальної структури, але частота її представлення дуже низька - менше 1%. Це змушує нас зробити висновок про те, що один лише доменконвертор не сприяє М\*\*- подібним станам релейної спіралі.

5.2.1.5. Наявність SH1 спіралі - необхідна, але не достатня умова для стабілізації стану М\*\*



Рис. 5.13 Структури, що найчастіше спостерігаються в наших симуляціях для моделей RH / RL / CD (жовтий колір) та RH / RL (зелений колір) порівняно з експериментальним фрагментом М\* (оранжевий колір). Релейна спіраль ідентична у всіх трьох структурах. Релейна петля і домен-конвертор приймають іншу конформацію, ніж у кристалографічній структуpi.

SH1 спіраль може викликати появу М\*\* конформації. Як показує **Рис. 5.9**, цей фрагмент знаходиться в прямому контакті з релейною спіраллю і релейною петлею. Ми розглядаємо дві моделі, RH / RL / SH1\* та RH / RL / SH1\*\*, в яких мотив SH1 зафіксований у своєму положенні у М\* та М\*\* станах.

Симуляція моделі RH / RL / SH1\* демонструє її подібність до моделі RH / RL, що не містить сегмент SH1. Сегмент RH займає в основному α-спіральні стани, що складає 60% від загальної кількості. Це трохи менше ніж 70%, які спостерігаються в моделі RH / RL. Цей факт вказує на те, що SH1-сегмент дещо дестабілізує релейну спіраль. Найбільш вираженою відмінністю між двома моделями є

упаковка релейної петлі. За умов взаємодії з SH1, релейна петля приймає орієнтації, аналогічні тим, що спостерігаються в експериментальній структурі М\*, як показано на Рис. 5.14. Найбільший вплив SH1-сегмент чинить на релейну петлю, в той час як його вплив на релейну спіраль мінімальний.

Зовсім інший висновок був зроблений при моделюванні RH / RL / SH1\*\*, де фрагмент SH1 зміщений у напрямку релейної спіралі на 4Å і злегка нахилений. Рис. 5.14(б) показує, що структура, яка найчастіше зустрічається у цих симуляціях,



Рис. 5.14 Структури, що спостерігаються найчастіше в симуляціях моделей RH / RL / SH1. a) Модель RH / RL / SH1\* (показана жовтим) у порівнянні з експериментальним фрагментом М\* (показаний оранжевим). Спостерігається гарна узгодженість між експериментом та теорією. б) Модель RH / RL / SH1\*\* у порівнянні з М\*\* станом. Зображена найбільш розповсюджена структура з переважанням взаємодії між зарядженими залишками K690, E490, E493 та K498, що не відповідає кристалографічному стану М\*\*. не є спіральною в С-кінцевій частині релейної спіралі, і є стабілізованою солевими містками між зарядженими амінокислотами К690, Е490, Е493 і К498. Оскільки останні З залишки утримують разом релейну спіраль та доменконвертор в експериментальних конформаціях М\* та М\*\*, їх взаємодія з залишком К690 спіралі SH1 несумісна з експериментом. Порівняння двох моделей на Рис. 5.14 показує, що розташування спіралі SH1 сильно впливає на релейну спіраль. Спіраль SH1, розташована таким же чином, як у конфігурації М\*\*, починає перешкоджати формуванню стійкої поверхні поділу між релейною спіраллю та доменом-конвертором. Як наслідок, ми не спостерігаємо згортання в стан М\*\*. Це змушує нас припускати, що конформація поствідновлення М\*\* не є стабільною без домену-конвертора. Цей висновок узгоджується з останніми дослідженнями [368] і показує, що поверхня поділу між доменом-конвертором та релейною спіраллю залишається незмінною під час ходу відновлення.

Обидві симуляції, RH / RL / SH1\* та RH / RL / SH1\*\*, показують, що спіраль SH1 здатна помітно змінювати конформації релейної спіралі. Цей ефект набагато сильніший у структурі M\*\*, де SH1 упаковується чітко навпроти C-кінцевої частини релейної спіралі. Уможливлюючи значний конформаційний зсув, спіраль SH1 необхідна для появи конформації M\*\* у фрагменті релейної спіралі. Однак, як видно з Рис. 5.14(б), вона не є недостатньою. Щоб запобігти появі альтернативних конформацій, спіраль SH1 повинна діяти узгоджено з іншими фрагментами, щоб стабілізувати конформацію поствідновлення M\*\*.

# 5.2.1.6. Для появи стану поствідновлення М\*\* необхідні домен-конвертор та SH1 спіраль

Щоб перевірити, чи може комбінація домену-конвертора та спіралі SH1 забезпечити необхідний ефект стабілізації, ми побудували модель, в якій включені всі чотири елементи, які ми розглядали до сих пір: RH, RL, CD і SH1. Ця модель, RH / RL / CD / SH1, імітує згортання релейної спіралі та прикріпленого до неї домену-конвертора, в присутності спіралі SH1 в конкретному розташуванні. Як і в попередньому розділі, проведено дві симуляції, що відповідають різним положенням спіралі SH1, RH / RL / CD / SH1\* та RH / RL / CD / SH1\*\*.

У симуляції М\* сегмент релейної спіралі спостерігався у α-спіральній конформації у 78% випадків, що аналогічно всім іншим моделям. У інших 9% випадків сегмент приймає спіральні конформації з невеликими деформаціями поблизу С-термінальної



Рис. 5.15 Три домінуючі конформації релейної спіралі, що спостерігаються в моделюванні RH / RL / CD / SH1\*. Відповідні частки показані над кожною структурою. Два найбільш розповсюджені кластери мають доменконвертор, обернений так само, як у кристалографічному стані М\*. У третьому кластері обертання подібне до стану М\*\*. Експериментальна структура М\* показана оранжевим кольором. Симуляції демонструють прямий перехід М\*-М\*\*.

ділянки. Третій найбільш заселений кластер складається зі спіральної конформації зі зламом у положенні F487, так само, як і в кристалографічному М\*\* стані. Всі три кластери показані на **Рис. 5.15**. Перші два демонструють обертання домену-конвертора, як і у випадку експериментального стану передвідновлення М\*. Обертання в третьому кластері подібне до стану М\*\*, що дає нам підстави інтерпретувати його як модельну (розрахункову) конформацію стану поствідновлення (яка дещо відрізняється від кристалографічної). Рівень заселеності цієї конформації 4% є низьким але статистично значущим, що дає нам прямі докази того, що перехід М\*-М\*\* спостерігається в наших симуляціях.

Зворотний перехід, М\*\*-М\*, був виявлений у нашій симуляції моделі RH / RL / CD / SH1\*\*. Кластеризація за координатами релейної спіралі показує чотири найбільш часто спостережувані сімейства структур, що показані на **Рис. 5.16**. Найбільш розповсюджена структура є безпосереднім аналогом експерименталь

ної конформації М\*\*, з однакоконформаціями різних ВИМИ мотивів та їх упаковкою. Наступні дві найбільш розповсюджені структури відрізняються конформацією їх RH-сегментів, але обидва вони мають злам у F487. Всі три кластери мають домен-конвертор, орієнтований аналогічно кристалографічній структурі М\*\*. Четвертий кластер складає лише 1%, і він має домен-конвертор, повернутий як у стані М\*. Аналогічно, сег-



**Рис. 5.16** Аналогічний **Рис. 5.15**, але для симуляцій RH / RL / CD / SH1\*\*. Показані чотири домінантні конформації разом із їхньою часткою заселення. Три найрозповсюдженіші кластери мають домен-конвертор, обернений так само, як у кристалографічному стані М\*\*. У четвертому кластері обертання аналогічне стану М\*. Симуляції демонструють спонтанний перехід від М\*\* до М\*.

мент релейної спіралі також представлений деформованою, але α-спіральною конформацією, згідно з шаблоном водневих зв'язків остова молекули. Тому ми інтерпретуємо четвертий кластер як модельний еквівалент М\* стану, який демонструє що наші симуляції змогли відслідкувати перехід М\*\*-М\*.

Конформація поствідновлення М<sup>\*\*</sup> спостерігається в різних пропорціях як у моделюванні RH / RL / CD / SH1<sup>\*</sup>, так і в RH / RL / CD / SH1<sup>\*\*</sup>, в той час як у моделях без SH1 спіралі ця конформація відсутня, і представлена переважно у M<sup>\*</sup> стані. Це змушує нас зробити висновок про те, що взаємодії, пов'язані з SH1, є критичними для виконання ходу відновлення M<sup>\*</sup>-M<sup>\*\*</sup>. Якщо позиціонувати M<sup>\*</sup> конформацію як кристалографічну, то SH1 майже не впливає на структуру комплексу RH / RL, залишаючи його переважно в M<sup>\*</sup> стані з рівнем заселеності більше 70%. Зсув вгору, як у в стані M<sup>\*\*</sup>, приводить до росту частки M<sup>\*\*</sup> стану, що становить 70% і більше. Отже, ефект спіралі SH1 є статистичним через модуляцію відносної заселеності двох станів.

# 5.2.1.7. SH1 діє шляхом прямої взаємодії з релейною спіраллю

З огляду на ту обставину, що SH1 необхідна для конформації М\*\*, цікаво з'ясувати механізм, за яким вона діє. Тут можливі два сценарії. По-перше, доменконвертор, зв'язаний ковалентними зв'язками з SH1, перманентно замикається у стані М\*\* шляхом стеричного відштовхування. Ця модель узгоджується з пропозицією того, що поршнеподібний рух SH1 обертає домен-конвертор, що, у свою чергу, створює петлю в релейній спіралі [221], а вплив спіралі SH1 на релейну спіраль відбувається через домен-конвертор. Другий сценарій полягає в тому, що SH1 впливає на конформацію релейної спіралі безпосередньо через

тісні взаємодії з нею. Релейна спіраль реагує на ці взаємодії, змінюючи свою конформацію та повертаючи домен-конвертор. Два сценарії відрізняються послідовністю подій, які ведуть до повороту домену-конвертора. Наші симуляції, про які йшлося раніше, показують, що SH1 може впливати на RH при відсутності доменуконвертора, що, таким чином, сприяє другому сценарію. Щоб підтримати це спостереження більш прямими доказами, ми створили модифіковану модель RH / RL / CD / SH1\*\*, RH / RL / CD / SH1m, в якій вилучено залишок G691, що зв'язує спіраль SH1 та домен-конвертор. Без хімічного зв'язку, що тримає його на місці, доменконвертор може вільно приймати будь-яке обертання, сумісне зі структурою релейної спіралі. Кластеризація конформацій отриманих у симуляціях цієї моделі, показала, що М\*\* все ще є найбільш помітною конформацією, причому



Рис. 5.17 Найбільш розповсюджена структура, що спостерігається в наших симуляціях моделі RH / RL / CD / SH1m (жовта), порівняно з експериментальним фрагментом М\*\* (оранжева). Білі лінії вказують на торсійний кут Θ, який характеризує обертання домену-конвертора. 73% з групи основного кластера ідентичні до конформацій, що спостерігаються у моделі RH / RL / CD / SH1\*\*. Тому хімічний зв'язок не впливає на структуру релейної спіралі. Розрахункові та експериментальні структури, показані на **Рис. 5.17**, дуже добре узгоджуються у всіх аспектах, включаючи обертання домену-конвертора.

# 5.2.1.8. Положення SH1 визначає кут повороту домену-конвертора

Для кількісної оцінки обертальних станів доступних для доменуконвертора, ми вводимо торсійний кут Θ утворений α-атомами карбону залишків К477, Q479, T742 і A748, які значно відрізняються в кристалографічних конформаціях М\*\* та М\*, -34 та 60 градусів відповідно, для того, щоб він служив параметром порядку для цих двох станів. Кут Θ



Рис. 5.18 Карта вільної енергії (показана в одиницях kT, де k - стала Больцмана) як функція торсійного кута  $\Theta$  та C $\alpha$  RMSD від експериментальної структури фрагмента релейної спіралі, отриманої з симуляцій а) моделі RH / RL / CD / SH1\* і б) моделі RH / RL / CD / SH1\*\*. Розташування експериментальних М\* та М\*\* станів виділено. Видно сильну кореляцію між RMSD та  $\Theta$ .

сильно корелює з конформацією релейної спіралі. На **Рис. 5.18** представлені карти вільної енергії, визначені як функція  $\Theta$  та RMSD з експериментального стану М\* для атомів C<sub>α</sub> релейної спіралі, отриманими при моделюванні RH / RL / CD / SH1\* та RH / RL / CD / SH1\*\*. За винятком коливань, конформації з прямою релейною спіраллю, RMSD <0.1*нм*, мають кут повороту  $\Theta$ ~50 градусів.

Аналогічно, деформована релейна спіраль, RMSD>0.15*нм*, має обертання близько -30 гра

дусів. Двостановий характер конформаційного простору чітко видно в обох симуляціях, що дозволяє припустити, що як RMSD, так і торсійний кут можна використовувати для розпізнавання М\* і М\*\* станів.

Торсійний кут є більш інформативним, оскільки він безпосередньо пов'язаний з розміром міозинового кроку уздовж актинової нитки. На **Рис. 5.19** показані розподіли  $\Theta$ , отримані в наших симуляціях для всіх моделей, що



Рис. 5.19 Функція розподілу торсійного кута між залишками К477, Q479, T742 та A748, отримана в цій роботі для різних розрахункових моделей. Прямі чорні лінії вказують на кути в кристалографічних станах М\* і М\*\*. Видалення хімічного зв'язку в моделі RH / RL / CD / SH1m дає додаткову свободу обертання для домену-конвертора. Однак головна конформація залишається М\*\*-подібною.

містять домен-конвертор. Моделі RH / RL / CD / SH1 показують розподіли, з центруванням на значеннях, що спостерігаються у їхніх початкових структурах  $M^*$  та  $M^{**}$ , демонструючи, що положення спіралі SH1 контролює поворот домену-конвертора. Розподіл моделі RH / RL / CD без SH1 центрується на середньому значенні 106 градусів. Це відображає 40-градусний зсув угору від експериментального значення  $M^*$ , показуючи, що кут повороту та відповідний розмір кроку міозину дуже чутливі до SH1 спіралі.

На додаток до основних максимумів, розподіл на Рис. 5.19 показує широкі хвости, які простягаються у напрямку, протилежному значенню у початковій

структурі. У системі RH / RL / CD / SH1\*\* моделювання розпочато з початкового для M\*\*  $\Theta$  =-34, але отриманий розподіл набуває додаткового максимуму при  $\Theta$  = 55, що відповідає M\* стану. Подібна тенденція спостерігається при моделюванні RH / RL / CD / SH1\*, розпочатого зі структури M\*. Розширення розподілів є безпосереднім свідченням зворотніх переходів M\*-M\*\* і M\*\*-M\*, що відбуваються в моделях RH / RL / CD / SH1, які були встановлені в попередньому розділі на основі кластерного аналізу.

Насамкінець, розрив хімічного зв'язку з SH1 збільшує обертальну свободу в домені-конверторі. Це видно з порівняння розподілів для моделей RH / RL / CD / SH1 \*\* та RH / RL / CD / SH1m, де останній демонструє набагато ширший хвіст. Отже, роль хімічного зв'язку полягає в тому, щоб змістити популяцію розподілу в бік стану M\*. Проте цей ефект не значний і набагато менш помітний, ніж вплив спіралі SH1.

## 5.2.2.Аналіз результатів

Провівши вичерпний комбінаторний пошук, ми змогли визначити мінімальну розрхункову модель, здатну відтворити хід відновлення М\*-М\*\*, що спостерігається для моторного білка міозину в експериментальних дослідженнях. Серед чотирьох необхідних компонентів моделі - релейної спіралі, релейної петлі, спіралі Src 1-гомологічного домену та домену-конвертора, спіраль SH1 грає вирішальну роль у переході. Конформація передвідновлення М\* з'являється лише тоді, коли ця спіраль а) відсутня і б) зміщена у напрямку N-кінцевої ділянки релейної спіралі. Переміщення SH1 вгору вздовж релейної спіралі спостерігається разом з переходом у стан М\*\*. Таким чином, позиція SH1 сильно пов'язана з конформацією релейної спіралі та поворотом домену-конвертора.

Спостереження за зв'язком між SH1 та RH дозволяє нам висунути гіпотезу про механізм ходу відновлення. Зазначимо, що кореляція між спіраллю SH1 і доменом-конвертором не обов'язково означає причинно-наслідковий зв'язок між

210

ними. Тут можна передбачити три сценарії, за допомогою яких сигнал з активного сайту, де закриття ключа II дає старт ходу відновлення [144; 220; 225], поширюється на область, що генерує силу. *По-перше*, сигнал прямує до релейної спіралі через його NH<sub>2</sub>-кінець, який взаємодіє з петлею ключа II. Далі релейна спіраль утворює злам, який перетворюється на обертання домену-конвертора. Насамкінець, спіраль SH1 зміщується, щоб зробити можливим обертання. *Подруге*, можливо, що інформація про закриття ключа II передається до доменуконвертора та спіралі SH1 одночасно деякими іншими шляхами, які не включають жоден із цих елементів. У цьому випадку зміщення SH1 і поворот доменуконвертора відбудуться одночасно, але фактично не будуть мати відношення один до одного. І *по-третє*, інформація до домену-конвертора може передаватись через SH1 спіраль. У цьому випадку спочатку відбувається переміщення SH1, а за ним слідує конформаційний перехід релейної спіралі та поворот домену-конвертора.

Шляхи зв'язку між активним сайтом та доменом-конвертором відіграють ключову роль у визначенні фактичного механізму ходу відновлення. Велика кількість досліджень, проведених для виявлення ролі різних частин міозину [134; 369; 370; 371; 372]; кристалографічні дослідження [373], аналіз консервації первинних послідовностей [374] вказують на те, що основний канал зв'язку проходить через SH1, що свідчить на підтримку третього сценарію, описаного вище. У даній роботі висвітлюється механізм, за допомогою якого SH1 діє в цьому гіпотетичному сценарії: ми відзначаємо, що безпосередня взаємодія з С-кінцевою частиною релейної спіралі, яка складається з залишків 487-496, є основною причиною, через яку утворюється злам. Наші симуляції на ізольованому фрагменті релейної спіралі показують, що ця частина спіралі не є сильно структурованою, причому α-спіральна конформація складає менше 20% від загального числа конформацій. Як наслідок, згортання С-термінальної частини дуже залежить від його контексту і легко піддається впливу оточення. Це підтверджено в симуляціях, де релейна спіраль та релейна петля взяті разом. Релейна петля, прикріплена до С-кінця, здатна збільшити частоту спостереження спіралі до понад 80%. Цілком обґрунтовано очікувати, що інші частини білка, які взаємодіють з Скінцевою спіраллю, мають подібний вплив. До них відносяться доменконвертор, який додатково стабілізує спіраль і збільшує її вміст до понад 90%, і спіраль SH1, ефект якої є більш витонченим. Упаковка (складання, розташування) на протилежному боці від SH1 приводить до того, що С-кінцева частина релейної спіралі обертається відносно N-кінцевої частини, утворюючи злам у положенні F487.

Це обертання ретранслюється до конверторного домену, прикріпленого до Скінцевої частини, що приводить до переходу М\*-М\*\*. Важливо підкреслити, що релейна спіраль обертає домен-конвертор за запропонованим механізмом, а не навпаки, як запропонував Фішер та ін. [221] у своїй моделі, спираючись на поршнеподібний рух спіралі SH1.

Насамкінець, наші симуляції показують, що положення спіралі SH1 модулює конформацію релейної спіралі і тим самим впливає на поворот доменуконвертора. З нашого дослідження незрозуміло, як перемикач II, розташований більш ніж на 40 Å від сайту АТФ-ази, зв'язується з SH1. Можливо, спіраль SH1 зміщується механічною силою. Інший сценарій полягає в тому, що стан ключа II впливає на рухливість спіралі SH1, таким чином впливаючи на загальну ентропію білка і зміщуючи баланс між М\* і М\*\*. Що саме відбувається, можна вивчити, використовуючи ту саму комбінаторну стратегію пошуку, яка використовується у цій роботі, але зосереджуючись на моделях, що містять як активний сайт, так і SH1 спіраль.

# 5.2.3. Методи та моделі

### 5.2.3.1. Комбінаторний підхід до побудови моделі

Для розробки мінімальної моделі, яка фіксує конформаційні зміни в релейній спіралі під час ходу відновлення, ми дотримувались процедури, наведеної на **Рис. 5.20**. Припустимо, що нас цікавить один домен у багатодоменному білку, що складається з доменів A, B, C i D, i цей домен A здатний приймати дві альтернативні конформації: стан 1 і стан 2. Згортання у ці конформації визначається взаємодією між усіма залишками, присутніми в білку. Однак, деякі з цих взаємодій можуть бути більш важливими для згортання, ніж інші. Щоб полегшити пошук важливих взаємодій, варто розділити всі взаємодії на а) локальні контакти - ті, що відбуваються в домені A, i б) глобальні контакти - ті, що знаходяться між доменом A та іншими доменами. Зале-

жно від типу відповідного білка можливі два сценарії поведінки домену А.

У першому стан 1 і стан 2 визначаються лише локальними взаємодіями. У цьому випадку фрагмент, що відповідає домену А, ізольований від решти білка і повинен демонструвати самочинне згортання у ці два стани. Всі інші домени функціонально не важливі. У другому випадку, якщо локальні взаємодії не можуть правильно згорнути фрагмент, мають місце критичні взаємодії між доменом А та деякими іншими доменами білка, які можуть бути виявлені шляхом комбінаторного пошуку. Систематично слід розглядати різні комбінації доменів та дос-



Рис. 5.20 Ілюстрація того, як будується мінімальна модель, що фіксує два альтернативних конформаційних стани у фрагменті білка. У багатодоменному білку конформації домену А, який нас цікавить, визначаються а) внутрішньодоменними взаємодіями та б) взаємодіями з іншими доменами. Розглядаючи різні комбінації доменів, можна встановити взаємодію, відповідальну за відповідний перехід. ліджувати їх згортання. Тут ми припускаємо, що А є єдиним доменом, який може змінювати конформації, тоді як всі інші залишаються незмінними. Спершу у цьому процесі варто розглянути пари доменів AB, AC та AD, як показано на **Рис. 5.20**. Якщо жоден з них не демонструє очікуваного ефекту, пошук повинен бути розширений до трьох доменів і тривати до тих пір, поки не будуть спостерігається потрібні властивості. У випадку систематичного застосування, ця процедура встановить критичні взаємодії для домену, що нас цікавить. Також слід визначити мінімальну комбінацію доменів, що демонструють бажаний перехід.

# 5.2.3.2. Технічні деталі

Всі пептиди в цій роботі були змодельовані на атомному рівні з використанням силового поля OPLS/AA [307] і моделі води TIP3P [33]. Як підсумовано в Таб. 5.2, нами було розроблено шість різних моделей. Початкові координати були завантажені з банку даних PDB [269], (структури 1w9k для M\* стану і 1w9l для M\*\* стану), і були обрізані відповідно до розміру кожної моделі. Всі фрагменти, не зв'язані ковалентним зв'язками, були накриті нейтралізуючими групами ACE та NH<sub>2</sub> на N- та C-кінцях, щоб уникнути впливу кінцевих заряджених груп. Координати атомів C $\alpha$  в N-кінцевих залишках N475-F482 були обмежені їх початковими положеннями у всіх 6 моделях. Крім того, бічні ланцюги F481-F482 ідентичні в конформаціях M\* і M\*\*, тому вони також були зафіксовані в симуляціях. Інші обмеження, характерні для кожної моделі, наведені у Taб. 5.2.

Всі симуляції, про які повідомлялося в цій роботі, виконувались за допомогою пакету програмного забезпечення GROMACS [121]. Хімічні зв'язки в молекулах води утримувались зафіксованими за допомогою алгоритму SETTLE [327]. Зв'язки з атомами Гідрогену в білку були зафіксовані відповідно до алгоритму LINCS [326]. Кристалографічні структури для кожної моделі були поміщені в кубічні ящики з розмірами 5.2-6.1*нм*, в залежності від моделі, які містять

Модель	Опис	Послідов-	Обмеження
		нсть	
RH	Релейна спіраль	Ace- NEKLQQFFNH HMFKLEQEEY LKE-NH2	Немає додаткових обмежень
RH/RL	Релейна спіраль та ре- лейна петля	Ace-"RH"- KINWTFIDFGL DS-NH2	Залишок S510 зафік- сований в його почат- ковому положенні
RH/RL/C D	Релейна спіраль, ре- лейна петля та домен- конвертор	Ace- "RH/RL"-NH2, Ace-GFPNRII- NH2, Ace- EQYRFGITKIF FRA-NH2	Так само, як у RH/RL. Додатково, до- мен-конвертор зафіксо- ваний у його початко- вій конфігурації за до- помогою дистанційних обмежень
RH/RL/ SH1* RH/RL/ SH1**	Релейна спіраль та ре- лейна петля, розташована навпроти спі- ралі SH1	Ace- "RH/RL"-NH2, Ace- NGVLEGIRITR KG-NH2	Так само, як у RH/RL. Додатково, Сα - атоми SH1 зафік- совані у їх початкових положеннях. Розгляну- то дві позиції, що від- повідають кристалог- рафічним М* та М**.
RH/RL/C D/SH1* RH/RL/C D/SH1**	Релейна спіраль, ре- лейна петля, спіраль SH1та домен- конвертор	Ace- "RH/RL"-Ace- NGVLEGIRITR KGFPNRII- NH2, Ace- EQYRFGITKIF FRA-NH2	Так само, як у RH/RL. Домен- конвертор зафіксова- ний у його початковій конформації. Спіраль SH1 зафіксована у по- чатковій позиції.

RH/RL/C	Так само як	Ace-	Так само, як	у
D/SH1m	RH/RL/CD/SH	"RH/RL"-Ace-	RH/RL/CD/SH1**	
	1**, але до-	NGVLEGIRITR		
	мен-конвертор	K-NH2, Ace-		
	не приєднаний	FPNRII-NH2,		
	хімічно до	Ace-		
	спіралі SH1	EQYRFGITKIF		
		FRA-NH2		

**Таб. 5.2** Загальні відомості про розрахункові моделі, що використовувалися у даній роботі.

4000-8000 молекул води, і врівноважені, з важкими атомами, зафіксованими у їх вихідному положенні. Всі симуляції проводилися за алгоритмом обміну репліками [325] з використанням термостату Нозе-Гувера [328] з параметром тертя 0.5nc для підтримки постійної температури. Всього було розглянуто 60 реплік, розміщених рівномірно по оберненій температурі між кінцевими точками 300 і 550 К. Всі дані аналізувалися при T = 300К. Для взаємодій ван-дер-Ваальса використовувалося єдине обрізання 1*нм*, а списки сусідів оновлювалися кожні 10 кроків симуляції. Для розрахунку електростатичних взаємодій застосовувався метод гладких частинок Евальда (РМЕ) [329]. Часовий крок встановлено на рівні 2 $\phi c$  у всіх симуляціях. Щоб переконатися, що отримані результати збіжні, всі моделі, де це було доречно, були досліджені за допомогою двох початкових координат М\* та М\*\*. Час збіжності визначався з часових точок, де дві траєкторії починають відображати якісну відповідність. Ця процедура визначила рівноважний час для всіх моделей - 10*нс*. Продуктивні частини симуляцій тривали 20*нс*.

Всі записані конформації були згруповані в кластери відповідно до алгоритму Даура та ін. [375], використовуючи коефіцієнти середньоквадратичного відхилення атомів Сα для вимірювання структурної подібності. Для розрізнення подібних і неподібних структур було використано відсікання 0.2*нм*. Кластериза-
ція виконувалася для області релейної спіралі, залишків 475-497, у всіх моделях і по всій довжині пептиду в моделі RH / RL.

5.3. Мінімальна модель переходу відновлення

#### 5.3.1. Підхід скороченого опису до побудови моделі

#### 5.3.1.1. Область генерації сили згортається в два альтернативні стани

Укорочений фрагмент області генерації сили, розроблений у цій роботі, який ми називаємо мінімальною моделлю стрибка (ходу) відновлення (MRSM), складається з наступних структурних елементів: релейної спіралі (RH), релейної петлі (RL), домену-конвертора (CD) і сульфгідрильної спіралі (SH1). Деякі частини цієї моделі обмежені їх початковим положенням, а інші розглядаються як повністю гнучкі, як це більш докладно описано в розділі "Методи та моделі".

Ключові компоненти, релейна спіраль та релейна петля, не обмежені. Для спіралі SH1 допускається свобода руху, на відміну від нашого попереднього дослідження [376].

Структурні стани MRSM досліджувались в точних симуляціях в явному розчиннику з використанням алгоритму обміну репліками. На **Рис. 5.21** показано спостережуваний розподіл торсійного кута  $\Theta$ , утвореного атомами С<sub> $\alpha$ </sub> залишків К477, Q479, T742 та A748. Кут характеризує



Рис. 5.21 Розподіл ймовірності торсійного кута Θ отриманий для моделі MRSM. Кут, утворений α-атомами карбону залишків К477, Q479, T742 і A748, характеризує орієнтацію домену-конвертора відносно релейної спіралі. Відповідні значення для кристалографічних станів М\* та М\*\* показані як товсті лінії.

217

орієнтацію домену-конвертора відносно N-кінцевої частини релейної спіралі. Його значення становлять -38 градусів у стані М\*\* та 57 градусів в стані М\*. Функція розподілу має два максимуми, що вказує на те, що розроблена модель має два основні стани. Аналіз розташувань максимумів, -20 та 50 градусів, говорить про те, що ці стани відповідають експериментальним структурам М\* та M\*\*.

150 **M\*** 100 50 Ð 0 -50 M\*\* -100 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0 RMSD(nm)

Рис. 5.22 Карта вільної енергії як функція 1) RMSD для релейної спіралі відносно кристалографічної конформації М\* та 2) торсійного кута  $\Theta$ . Тут і на інших малюнках енергія показана в одиницях kT, де k - постійна Больцмана, а T - температура. Добре видно два мінімуми, які пов'язані з конформаціями М\* і М\*\*.

ти пов'язані з М\* та М\*\*, отримуємо з карти вільної енергії, яка визначається як функція середнього квадратного відхилення (RMSD) для атомів С<sub>а</sub> залишків RH, N479-E497, від кристалографічної форми М\* та кута повороту Θ. На карті, показаній на **Рис. 5.22**, видно два мінімуми, розташовані при RMSD ~ 0.05*нм* і RMSD ~ 0.17нм, демонструючи, що RMSD та кут повороту скорельовані. Наприклад, ділянки з  $\Theta$ ~50° на Рис. 5.22 відповідають низькому RMSD, що вказує на випрямлену релейну спіраль. Тому ці стани можуть бути пов'язані зі структурою М\*. Аналогічним чином, конформації другого мінімуму зі зламаною спіраллю можуть бути віднесені до стану М\*\*.

Всі конформації збережені в наших симуляціях, були поділені на дві групи відповідно до торсійного кута: ті, в яких  $\Theta < 10^{\circ}$  відповідають М\*\*, і ті, де Θ>10°, відповідають М\*. Щоб знайти найбільш репрезентативні стани, всі конформації у кожній групі були кластеризовані відповідно до сегмента RH з радіу-

Додаткове підтвердження того, що спостережувані стани можуть бусом обрізання RMSD в 0.1*нм*. Кластеризація виявила єдину домінантну структуру в кожній групі з ~ 60% популяції. Ці структури представлені на **Рис. 5.23** для груп М\* та М\*\* разом з відповідними кристалографічними конформаціями. Розрахункові та експериментальні стани М\* практично ідентичні, за винятком невеликих відхилень, що спостерігаються в С-кінцевій області релейної спіралі та положення SH1. Відхилення в тих же місцях, але з біль-



**Рис. 5.23** Найбільш заселені структури, що спостерігаються в наших симуляціях для М \* та М \*\*, виділені жовтим у порівнянні з відповідними кристалографічними структурами, що виділені оранжевим.

шою амплітудою, спостерігаються в конфігурації М\*\*. Релейна спіраль демонструє N-кінець у такому ж положенні як в розрахункових, так і в рентгенівських структурах М\*\*. Однак, C-кінцева частина спіралі відрізняється в двох структурах. В розрахунковій конформації вона більше нахилена до спіралі SH1 ніж в експериментальній.

# 5.3.1.2. Домен SH1 надає початковий поштовх стрибку відновлення

Подібно до домену-конвертора та релейної спіралі, спіраль SH1 набуває чіткі конфігурації в станах М\* та М\*\*. На Рис. 5.24 показані основні кластери, виявлені в наших симуляціях, разом з відповідними експериментальними структурами. У порівнянні з експериментом SH1 в розрахунковому стані М\* (показаний на Рис. 5.24 (а)) знаходиться ближче до релейної спіралі, особливо в N-кінцевій частині, залишку N679. Це, швидше з'явився за все, є наслідком того, що SH1 хімічно від'єднана від решти білка. У розрахунковому стані М\*\*, SH1 зміщується вниз і повертається так, щоб досягти майже паралельної орієнтації з RH. Рис.

5.24 (б) показує, що термінальний залишок N679 в цій структурі ближче до RH, ніж у експериментальній структурі. Різниця між розрахунковими станами М\* та М\*\* показана на Рис. 5.24 (с). N-кінцевий залишок N679 має однакове положення в обох структурах, але C-кінцевий залишок R689 в стані М\* знаходиться на ~ 2Å ближче до релейної спіралі. Порівняння показує, що невелике зміщення у

напрямку, перпендикулярному до RH, є визначальною характеристикою стану М\*\*.

Для визначення того, як зміщення SH1 пов'язано з поворотом конвертора, ми використовуємо формалізм ландшафтів вільної енергії, що є прийнятою теоретичною базою для розуміння динаміки білків [377]. На **Рис. 5.25** показана карта вільної енергії, яка визначається як функція кута  $\Theta$  та п що з'єднує атоми С<sub> $\alpha$ </sub> N475 та Y494 кореляцію зміщення та кута. Оди і  $\Theta$ ~50, а другий – пов'язаний з ста підтвердження двостанового характ ває нове світло на природу переход



Рис. 5.24 Орієнтації спіралі SH1 в розрахункових кластерах М\* та М\*\*, показані жовтим та блакитним відповідно, у порівнянні з відповідними кристалографічними структурами, показаними оранжевим. У розрахунковому стані М\*\* SH1 зміщується на ~ 2 Å від релейної спіралі.

визначається як функція кута  $\Theta$  та відстані від C<sub>α</sub> R689 до довгої осі RH (лінія, що з'єднує атоми C<sub>α</sub> N475 та Y494), *D*. Карта має два мінімуми, що вказує на кореляцію зміщення та кута. Один мінімум відповідає стану M\* з D~1.1*нм* і  $\Theta$ ~50, а другий – пов'язаний з станом M\*\* з D~1.3*нм* і  $\Theta$ ~-20. На додаток до підтвердження двостанового характеру нашої моделі, карта на **Рис. 5.25** проливає нове світло на природу переходу від M\* до M\*\*, тобто стрибка відновлення. Починаючи з конфігурації M\*, перехід у 2D-просторі змінних  $\Theta$  і *D* може здійснюватися за двома сценаріями. Згідно з першим, після повороту доменуконвертора відбувається зміщення спіралі SH1. Згідно з другим, зміщення спіралі SH1 передує повороту домену-конвертора. Як видно з **Рис. 5.25**, де ці два сценарії показані відповідно білими та зеленими стрілками, перший шлях приводить до вищих і більш широких бар'єрів вільної енергії, що свідчить про меншу ймовірність спостереження. Виходячи з цих даних, ми прийшли до висновку, що спіраль SH1, швидше за все,

докладний механізм

обертання

конвертора, а не навпаки. Більш

можна отримати, використовую-

чи методи, призначені для гене-

рації перехідних траєкторій [378;

379; 380; 381; 382; 383] або для

виведення динаміки з прискоре-

них підходів до вибірки [384;

домену-

переходу



Рис. 5.25 Карта вільної енергії, визначена як функція D, відстані від Cα R689 до RH, та торсійного кута Θ. Зелені стрілки вказують на найбільш вірогідний сценарій переходу від М\* до М\*\*, ініційований зміщенням SH1. Білі стрілки ілюструють малоймовірний сценарій, коли доменконвертор спочатку обертається, а за ним йде зміщення SH1.

### 5.3.1.3. Гідрофобні взаємодії приводять до повороту домену-конвертора

На рівні залишків, перехід між станами М\* і М\*\* зумовлений взаємодією, яка має місце між різними частинами моделі, RH, RL, SH1 та CD. На **Рис. 5.26** представлені карти ймовірності контактів для структур М\* та М\*\*. Ігноруючи контакти між N-кінцем SH1 та RH, які, ймовірно, є артефактами, інші контакти, такі як F487-I687, F487-F506 та F506-I687, можна розділити на двох картах, як виділено на рисунку. Три залишки, що входять до цих контактів, F487, F506 та I687, утворюють гідрофобний кластер, який лежить на границі між RH, SH1 і RL. Інтенсивність інших контактів коливається між станами М\* та М\*\*.

У Таб. 5.3 перелічені контакти (не включаючи контакти, пов'язані з гліцинами), які стають сильнішими або утворюються заново в кожному стані, відповід

ініціює

385;386].

	Нові/Сильніші контакти
M*	D505-K690, F503-K690, I687-F503, I687-Q483, T688-E490,
	F503-F487, Q483-E683
M**	L508-E683, F506-E683, I687-I504, F487-E683, L508-Q479,
	L508-F487, F506-Q491, I504-E490, I504-Q491, F506-W501,
	I504-K690, I504-F487

Таб. 5.3 Список контактів, що стабілізують стани М\* та М\*\*.



**Рис. 5.26** Ймовірність контакту в конформаціях М\* та М\*\*, що спостерігаються у наших симуляціях. Контакт між двома залишками існує, якщо найкоротша відстань між будь-якими двома атомами їхніх бічних ланцюгів становить 6Å або менше.

но. Окрім електростатичної взаємодії D505-K690, яка сильно сприяє станові М\*, більшість усіх інших контактів включають щонайменше один гідрофобний залишок. Залишки, що переважно беруть участь у стабілізації конформації М\*\*, це F506, L508 та I504. Крім того, ця конформація стабілізується гідрофобним контактом між I504 і F487. Подібна взаємодія між F503 і F487 сприяє стану М\*, що вказує на те, що різні контакти стабілізують різні стани. Як наслідок, взаємодія багатьох гідрофобних залишків підтримує баланс між конформаціями М\* і М\*\*. Розташування важливих гідрофобних залишків F487, F506 та I687 в конформаціях M\* та M\*\*, визначених кластеризацією, показано на Рис. 5.27.. У стані М\* найбільш поширеною конфігурацією є та, де бічні ланцюги всіх трьох залишків утворюють трикутник. У стані M\*\*, бічні ланцюги розта-



**Рис. 5.27** Конфігурація важливих гідрофобних залишків I687, F487 та F506 у конформаціях М \* та М \*\*.

шовані в ряд, причому F506 інтеркалює між I687 і F487. Порівняння двох станів показує, що переважно гідрофобний інтерфейс між RH, SH1 і RL може займати ряд альтернативних конфігурацій, контрольованих конкретними контактами між залишками. Таким чином, гідрофобні взаємодії спричиняють перехід від М\* до М\*\*.

### 5.3.2. Аналіз результатів

#### 5.3.2.1. Область генерації сили в контексті повного міозину

Запропонована в цій роботі модель MRSM належним чином відтворює двостанову природу стрибка відновлення міозину. З огляду на невеликий розмір запроектованого фрагмента, який складається тільки з релейної спіралі, релейної петлі та SH1 в силовій ділянці білка, це досить неординарний результат. Ми показали в нашому попередньому дослідженні [376], що ці структурні мотиви є *необхідними* для спостереження згортання у два стани. Тут ми встановлюємо, що вони є також *достатніми*. Таким чином стає зрозуміло, що локальні взаємодії всередині невеликого фрагмента області генерації сили міозину ІІ закодовують функціональну динаміку всього білка.

Щоб функціонувати як двигун, моделі необхідне зовнішнє управління областю генерації сили. Було показано що, згідно з поверхнею вільної енергії моделi, спіраль SH1 запускає поворот домену-конвертора. Переміщення SH1 в бік від релейної спіралі створює режим сильного сприяння для кута повороту М\*\*. Вважається, що в наявних експериментальних структурах SH1 переміщується паралельно



**Рис. 5.28** Функція розподілу повороту торсійного кута, отримана в симуляціях наших моделей, де SH1 а) необмежена в русі, та б) стримується до її положення в кристалографічних станах М\* та М\*\*.

релейній спіралі в конформації М\*\*, а не перпендикулярно до неї. Ми перевірили ефект паралельного зсуву, стримуючи SH1 в її положеннях в кристалографічних станах М\* та М\*\*, як і в нашій попередній роботі [376]. Функції розподілу, отримані в цих тестах, показані на **Рис. 5.28**, демонструють, що SH1 є дуже ефективним модулятором конформаційних станів конвертора: хоча обидва повороти типу "вгору" та "вниз" спостерігаються для різних позицій SH1, позиціонування, як у стані М\* або М\*\* створює дуже сильну прихильність до цього конкретного стану. Виявляється, що паралельне зміщення впливає на заселеність стану М\*\* так само, як перпендикулярне. Крім того, функції розподілу зі стримуваною спіраллю SH1 краще узгоджуються з експериментом.

Розподіл відстаней між залишками білка надає додаткові докази необхідності маніпулювати просторовим положенням SH1 в контексті функціонуючого міозину. Відстані, виміряні між окремими залишками в експериментах EPR та FRET [18; 19], показують два максимуми, які пов'язані з M\* і M\*\*. Як приклад, ми зосереджуємося на відстані K498-A639. Залишок A639 не є частиною нашої моделі, тому нам довелося визначити відстань від нього до К498 шляхом вимірювання вепроведеного 3 K498 ктора, (атом N<sub> $\zeta$ </sub>) до N475 (атом C<sub> $\alpha$ </sub>), та моделювання вектора від N475 (атом  $C_{\alpha}$ ) до A639 (атом  $C_{\beta}$ ) як розподіл Гауса з параметрами (середнє значення і дисперсія для всіх трьох компонент), отриманими з короткого наносекундного моделювання пов-



**Рис. 5.29** Функція розподілу відстані між К498 і А639, отримана в цій роботі в різних моделях. Символи вказують дані EPR [18]

ного білка. Отримані розподіли показані на **Рис. 5.29** разом з результатами MRSM та даними EPR [18]. Максимуми в симуляціях з вільною спіраллю SH1 з'являються в одному місці для обох станів M\* і M\*\* (незважаючи на різні кути повороту). Але в симуляціях зі стримуваним SH1, спостерігаються два добре відокремлені максимуми для станів M\* і M\*\*, демонструючи, що зміщення SH1 під дією зовнішніх сил приводить до кращого узгодження з експериментом (кількісне порівняння теорії з експериментом не виправдано, оскільки ми не моделювали спінові мітки у наших симуляціях). Подібне покращення спостерігається і для інших відстаней, наприклад, K498-D505, але не настільки суттєве, як для пари K498-N475.

#### 5.3.2.2. Роль спіралі SH1

Низка доказів вказує на те, що SH1[373] слугує механізмом комунікації між активною ділянкою та областю генерації сили. По-перше, це близькість SH1 та SH2 (інша спіраль з сульфгідрильною групою, яка передує SH1 вздовж послідовності) як до активної ділянки так і до області генерації сили. По-друге, це мутаційні дослідження, які вказують на те, що: а) хімічне перехресне з'єднання SH1 та SH2 і b) заміщення в SH1/SH2 порушують механічний шлях передачі інформації[369]. По-третє, рентгенівські структури вказують на те, що поворотна точка конвертора знаходиться поблизу SH1 і SH2 [373; 387]. І насамкінець, спостережувана дуже мала схильність доменів SH1 / SH2 до природної мутації в різних організмах[388], так-звана консервація. Наші симуляції повністю підтримують цю гіпотезу. Висновок про те, що SH1 потрібно маніпулювати поза межами зони генерації сили, робить її основним кандидатом на роль передавача сигналів (перемикання I / II закриття, гідроліз AT $\Phi$ ) з активної ділянки.

На основі мутаційних досліджень було запропоновано, що SH1 утворює частину мінімального структурного шаблону - "маленької машини", здатної описати повний рух домену-конвертора під час стрибків відновлення та генерації сили[371]. Наші симуляції узгоджуються з цією пропозицією. Залишки мінімального мотиву, G691-P693 та F746[371], знаходяться в укороченому міозиновому фрагменті, виявленому у цій роботі. Ми не тільки демонструємо, що структурний мотив описує поворот домену-конвертора, але також пояснюємо, як це відбувається.

Мікроскопічна інтерпретація того, як SH1 виконує свою роль зв'язку, була запропонована Фішером та ін[220; 221]. Виходячи зі шляхів мінімальної енергії, що з'єднують стан М\* та М\*\*, автори висловили припущення, що рух домену SH1 уздовж релейної спіралі застосовує механічну силу до конвертора, що змушує його обертатися. Наші симуляції свідчать на підтримку іншого сценарію. У цій роботі ми показали, що невелике переміщення в перпендикулярному напрямку до релейної спіралі здатне викликати обертання. У попередній роботі [376] ми показали, що SH1 діє шляхом прямої взаємодії з релейною спіраллю, а не механічною силою.

## 5.3.2.3. Механізм змаху важеля в ході відновлення

Переміщення SH1 вбік від релейної спіралі, очевидно, створює порожнину в гідрофобному кластері з залишків I687, F487 та F506 на границі RL, RH та SH1. Порожнина заповнюється при переході атомами бічного ланцюга F487, який витягується з поміж I687 та F506 в конформації М\*\* (див. Рис. 5.27), тим самим створюючи злам в релейній спіралі. Порожнина викликає поворот доменуконвертора, який тісно пов'язаний з С-кінцевою частиною релейної спіралі. Замість механічної[220; 221], наша модель скоріше підтримує статистичну [144; 225; 227; 228] інтерпретацію стрибка відновлення, в якій реструктуризація гідрофобного кластеру у відповідь на дислокацію SH1 є тим механізмом, який керує переходом між станами М\* та М\*\*.

Непряма підтримка цього механізму грунтується на мутаційних дослідженнях. Ми показали, що залишки F487, F506 та I687 є важливими для стабільності як стану М\*, так і М\*\*. Мутації будь-якого з них істотно порушують структуру цих станів, можливо, аж до приведення білка в стан дисфункції. Саме це відбувається в заміщенні F487A, яке, як було показано [134], повністю блокує рухову активність в міозині II через порушення зв'язку між активною ділянкою та важелем. Такий же ефект спостерігався для мутації F506A, що свідчить про те, що вона перешкоджає згортанню або стану М\*, або М\*\*, або їх обох[134]. Пізніше дослідження EPR виявило[389], що ці стани залишаються незмінними, але мають змінені популяції. Виходячи з аналізу кристалографічних станів М\* та М\*\*, гідрофобні взаємодії між набором важливих залишків, дуже подібних до тих, що були виявлені в даній роботі, N483, F487, F506, L508 та I687, були запропоновані для контролю переходу стрибка відновлення[134].

Використовуючи тільки запропоновану модель MSRM, не можна відповісти, як саме закриття ключа II контролює SH1. Це питання потрібно досліджувати використовуючи моделі, які включають в себе весь білок, а не його фрагменти. Наша модель, однак, добре підходить для вивчення ефекту мутацій у області генерації сили міозину. Найкращими кандидатами для таких досліджень є згадані вище заміни F487A та F506A, а також деякі мутації, включаючи E490D, E492K, R695L i L508R, пов'язані з гіпертрофічною кардіоміопатією [38; 39; 348].

#### 5.3.3.Методи та моделі

### 5.3.3.1. Дизайн моделі мінімального стрибка відновлення

Рис. 5.27 показує кристалографічні конформації М\* та М\*\*, вирівняні вздовж N-кінцевої частини релейної спіралі. Порожнина спостерігається в конформації M\*\* у С-кінцевому регіоні RH, який взаємодіє з доменом-конвертером, спіраллю SH1 та релейною петлею, що зв'язує релейну спіраль з ділянкою зв'язування актину та міозину.

N-кінцевий сегмент RH ідентичний у станах М\* та М\*\*. Конформація домену-конвертора є теж тою самою, крім її орієнтації відносно релейної спіралі. SH1 в стані М\*\* зсунуто вгору на 4Å вздовж релейної спіралі.

Ми розглядаємо скорочену версію міозину, що складається з фрагментів, зображених на **Рис. 5.30**, і досліджуємо чи вона володіє переходом від М\* до М\*\*, подібно до того, що спостерігається експериментально. Модель, показана на **Рис. 5.31**, підкреслює різницю між конформаціями М\* та М\*\*, обговореними вище. N-кінцева частина релейної спіралі зберігається поблизу початково-



Рис. 5.30 Конформації М\* (зображено оранжевим) і М\*\* (блакитним), підпасовані вздовж N-кінцевої частини релейної спіралі. Порожнина, видима у стані М\*\*, спостерігається в С-кінцевій частині, яка взаємодіє з релейною петлею, доменомконвертором та спіраллю SH1. Остання зміщується на 4Å в М\*\* відносно М\*.

го кристалографічного положення за допомогою гармонічних обмежень, застосованих до атомів  $C_{\alpha}$  від N475 до F482, а додатково - до  $C_{\zeta}$  атомів F481 та F482. Останній залишок релейної петлі, S510, займає практично ідентичне положення в підпасованих станах М\* та М\*\*, при взаємній відстані менше 2 Å. Тому ми стримуємо С $\alpha$  цього залишку, але з силою в 10 разів слабшою, ніж у релейній спіралі. Конформація двох сегментів, спіраль SH1, що охоплює N679-R689, та конвертор, що включає залишки N694-A748, зберігають свою форму за допомогою жорстких обмежень на відстані між залишками, застосованих до атомів С<sub> $\alpha$ </sub>. Всі інші частини моделі повністю гнучкі.

Домен-конвертор, який складається з двох сегментів N694-I697 та E735-A748, утримується в контакті з релейною спіраллю двома гармонічними в'язями, прикладеними до F739 і I499, а також I741 та E497, як показано на **Рис. 5.31**. В'язі впроваджені для того, щоб дозволити часткову дисоціацію конвертора від релейної спіралі. Крім того, Сα P693 утримувався на відстані не менше 15Å від Cα F482, щоб запобігти нефізичному колапсу конвертора на релейну спіраль.

З метою утримання спіралі SH1 в межах відстані взаємодії з RH, в'язі застосовуються до атомів Ca N679 та R689. Точки прив'язки для потенціалів в'язей були обрані в посередині лінії, що з'єднує позиції відповідних залишків в конформаціях M\* та M\*\*, як показано на **Рис. 5.31**. Залишкам дозволялось відхилятися на 4Å від початкового положення перш ніж включались обмежувальні потенціали, що дозволило спостерігати широкий діапазон конформацій, включно з M\* і M\*\*. Для перевірки впливу розташування SH1 як у кристалографічних структурах, були розглянуті два набори точок прив'язування на позиціях M\* та

М\*\*, без дозволених відхилень, аналогічно нашій попередній роботі [376]: всі атоми С<sub>α</sub> спіралі SH1 були обмеженими.

228



**Рис. 5.31** Запропонована у роботі мінімальна модель стрибка відновлення (MSRM). Модель складається з релейної спіралі (RH), релейної петлі (RL), домену-конвертора (CD) і спіралі SH1. Затінені ділянки відповідають частинам, що обмежуються їхніми початковими кристалографічними положеннями. Частини, показані жирним шрифтом, зафіксовані для підтримки їх конформації внутрішніми обмеженнями. Тонкі лінії показують повністю гнучкі ділянки. Спіраль SH1 притримується біля RH двома гармонічними обмежувачами, що діють на N679 і R689, що дозволяють займати як конформацію М\*\*, так і М\*. Конвертор містить два фрагменти, що утримуються в контакті з RH двома обмежувачами.

Врешті, щоб запобігти обертанню SH1 навколо своєї осі та формуванню інтерфейсу з RH, що не спостерігається в кристалографічних структурах, застосовувався кутовий потенціал прикладений до G684, I685, F481 та F482. Кут, утворений атомами  $C_{\alpha}$  цих залишків, зберігався близько 0, що відповідає значенню яке спостерігається в обох станах M\* та M\*\*. Ми називаємо модель з обмеженнями, що імітують знехтувані ділянки міозину, представлену на **Рис. 5.31**, мінімальною моделлю стрибка відновлення (MRSM).

#### 5.3.3.2. Технічні деталі

Усі міозинові фрагменти, розглянуті в цій роботі, були змодельовані на атомному рівні, використовуючи силове поле OPLS / AA [307] у поєднанні з моделлю води TIP3P [33]. Нейтралізуючі групи ACE і  $NH_2$  були поміщені в N- і Cкінці всіх трьох фрагментів, щоб уникнути перешкод, спричинених кінцевими зарядженими групами. Початкові координати були завантажені з банку даних PDB[269] для міозину Dictyostelium (структури 1w9k для стану M \* та 1w9l для стану M \*\*) і усічені відповідно до розміру моделі.

Всі симуляції виконувалися за допомогою набору програмного забезпечення GROMACS [121]. Хімічні зв'язки в молекулах води були зафіксовані за алгоритмом SETTLE [327]. Зв'язки з атомами Гідрогену в білку були обмежені відповідно до алгоритму LINCS [326]. Кристалографічні структури для кожної моделі були поміщені в кубічну коробку зі стороною 6.2 нм, що містить 7490 молекул води, і врівноважені з обмеженими важкими атомами. Алгоритм обміну репліками[325] був використаний для проведення симуляцій з використанням термостату Hose-Гувера [328] з часовою константою0.5*nc* для підтримки постійної температури. Всього було розглянуто 60 реплік, розміщених рівномірно по оберненій температурі між кінцевими точками 300 і 550 К. Всі дані аналізуються при T = 300 К. Для взаємодії ван дер Ваальса використовувався єдиний радіус обрізання 1*нм*, а списки сусідів оновлювалися кожні 10 часових кроків. Для розрахунку електростатичних взаємодій застосовувався метод гладких частинок Евальда (РМЕ) [329]. Часовий крок встановлено на рівні 2*фс* у всіх симуляціях.

#### 5.4. Висновки розділу

Досліджено деталі структурного переходу в білку міозину від передвідновлювального стану М\* до пост-відновлювального стану М\*\*, відомого як стрибок відновлення. В моделюванні повної головки міозину встановлено, що перехід містить як мінімум два послідовні кроки. Перший крок полягає в замиканні ключа ІІ, який знаходиться на великій відстані від області генерації сили. Другий крок – це поворот домена конвертора. Для цього кроку побудовано окрему розрахункову модель, яка складалась із кількох сегментів білка і досліджувалась в моделюванні з явним розчинником. Сегменти обрано за результатами комбінаторного пошуку з умови, що вони відтворюють дві конфігурації релейної спіралі, М\* і М\*\*. В результаті отримано модель скороченого опису, яка є набагато меншою за повний білок, проте так, як і він, має два функціональні стани. Дана модель містить критично важливу частина білка і може використовуватись для досліджень впливу на неї різноманітних зовнішніх чинників, зокрема мутацій.

#### РОЗДІЛ 6.

# АГРЕГАЦІЯ БІЛКІВ В АТОМНИХ ПІДХОДАХ

Агрегація білків це складний багатокроковий процес. Умовно, всі кроки можна розділити на три стадії. На першій стадії мономери проходять через процес згортання. На другій стадії утворюються перші агрегати у формі білкових комплексів, що містять кілька молекул, так звані олігомери. На останній стадії спостерігається утворення зрілих фібрил. Хоча загалом білки через свої розміри недоступні для безпосередніх досліджень в рамках атомних теоретичних моделей, існує широке коло проблем, де такі моделі можуть виявитися досить корисними. Нами виконано ряд робіт, в яких досліджуються всі три стадії агрегації, використовуючи атомні підходи. Зокрема, встановлено природу пришвидшеного утворення олігомерів в пептидах типу *KXXE*, коли фенілаланін використовується в гідрофобному середовищі[391]. Такі модельні дослідження напряму пов'язані з біологічними об'єктами, де гідрофобні групи зустрічаються природно, як наприклад всередині клітинних мембран.

В цьому розділі ми приводимо приклади досліджень структури і механізму утворення фібрил. Розглянуто дві системи.

Перша - це пептид повного розміру Аβ40. Зокрема, нас цікавить механізм впливу мутації E22Q, яка носить назву голландської і пов'язана з вродженою формою AD, на процес утворення фібрил. Експерименти Маджіо et al [248] вказують на те, що швидкість депозиції, або осідання, мутованого мономеру Aβ на вільний кінець фібрили підвищується в порівнянні з послідовністю дикого типу. Реакція агрегації розпочинається зі згортання мономерного пептида. Відповідно, у з'ясуванні впливу мутації ми досліджуємо як заміна E22Q впливає на: 1) конформації мономеру Aβ, та 2) процес осідання мономерів на фібрили.

В першій меті ми зосереджуємо увагу на ефекті мутації Е22Q в двох важливих областях, пов'язаних зі згортанням та агрегацією мономерів Аβ: області E22-K28 та центральному гідрофобному кластері L17-A21 (CHC). Симуляції, виконані нашою групою, спільно з експериментами по іонній мобільності, виконаними нашими співробітниками[243; 392], 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 пептиду приймає структуру згину в контексті протеолітично стійкого фрагмента 21-30 АВ [393; 394; 395] і є, ймовірно, найбільш структурованою областю [393]. В подальшому нами було дуже детально досліджено цей фрагмент в послідовності дикого типу[396], а також вивчено вплив на нього різних середовищ[397] та мутацій, пов'язаних з вродженими формами хвороби[398]. Ці дослідження були розширені для фрагментів Ав12-28[367] та Ав10-35[399], в яких згин було також виявлено. Порівняння результатів наших досліджень для різних сегментів можна знайти в нашій нещодавній статті[23].

З іншого боку, так виглядає, що СНС не має сформованої структури і, радше, служить місцем стикування мономерів з фібрилою. Мутації в цьому сегменті (наприклад, F19T) повністю зупиняють ріст фібрил[400].

З огляду на виявлені особливості згортання Аβ-пептиду, ми розглядаємо дві модельні системи: фрагменти 21-30 та 15-28. Перша модель дозволяє нам вивчити вплив мутації E22Q на структурований згин, тоді як друга - уможливлює дослідження впливу цієї мутації на структуру регіону СНС. Хоча ми не розглядаємо фрагменти, що містять залишки віддалені вздовж послідовності від залишку 22, ми все ж розраховуємо на вірне відтворення ефекту мутації E22Q. Дійсно, експерименти для A $\beta$ 12-28[401] та A $\beta$ 10-35[248] показали, що мутація E22Q викликає лише локальні зміни структурних властивостей пептиду, які не виходять за межі залишків, сусідніх до E22. Наші симуляції використовують явний розчинник і алгоритм обміну репліками для досягнення більш повного охоплення конформаційного простору.

В другій меті ми досліджуємо як мутація E22Q впливає на швидкість осідання пептиду на існуючі амилоїдні фібрили. Для цього визначається ансамбль перехідного стану для реакції росту фібрили та обчислюється вільна енергія активації осідання мономеру на попередньо вирощені фібрили для випадку мутованої послідовності та послідовності дикого типу.

Друга система - це фрагмент АВ11-25. У даній роботі ми намагаємось визначити структуру фібрил цього фрагмента за допомогою теоретичного та комп'ютерного моделювання. Комп'ютерне моделювання широко та успішно застосовують у дослідженнях структури амилоїдів[128; 398; 402; 403; 404; 405]. Нашою метою є визначення взаємодій, які визначають регістр фібрил при кислому та нейтральному рН. Спочатку, шляхом розрахунків вільних енергій ми показуємо, що β-нитки димерів, які є мінімальним будівельним блоком β-листів, переважно заповнюють  $17 + k \leftrightarrow 20 - k$  регістр незалежно від рН. В нейтральному середовищі це вказує на те, що структура фібрили 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 В-листів для кислого та нейтрального рН 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 сольватації та моделі доступної поверхні. Конформації з найменшою вільною енергією відбираються як структури справжніх фібрил при відповідному значенні рН. Видно, що регістр сформованих структур при рН=2 та 7 добре узгоджується з регістром, визначеним експериментально. З допомогою отриманих моделей встановлено, що при 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 К16 і Е22. Ці два залишки заряджені при нейтральному pH і утворюють солевий місток, що робить великий вклад у 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 С- та N-термінальними групами. Ґрунтуючись на цьому спостереженні, висловлено припущення, що модифікація C-кінця Аβ11-25 шляхом приєднання нейтралізуючої групи може впливати на регістр фібрил при pH=7, можливо, повертаючи його до 17+ $k \leftrightarrow 22-k$  конфігурації, яка спостерігається при pH=2. Це припущення було перевірено та підтверджено за допомогою комп'ютерного моделювання пептиду Аβ11-25 з амідованим карбоксильним кінцем.

# 6.1. Дослідження голландської мутації

#### 6.1.1. Вплив мутації на амилоїдні фібрили

#### 6.1.1.1. Мутація Е22Q не змінює структурованого згину в Аβ21-30

Структура сегменту 21-30 була досліджена в наших попередніх роботах, що виконувались методом молекулярної динаміки в поєднанні з алгоритмом обміну репліками[396]. Було знайдено структуру, кластер, з високим ступенем заселеності (порядку 44%), в якій присутній згин, що охоплює залишки 22-28. Згин, або петля, у сегменті 22-28 були описані в теоретичних роботах інших дослідників[394; 395]. Також відомі моделі Аβ-фібрил [22; 406], в яких існує згин в цьому сегменті.

Згин стабілізується мережею водневих зв'язків між атомами D23 Об та амідними атомами гідрогену пептидного остова. З різницею RMSD в 0.37 Å віднос но конформації дикого типу, мутація E22Q дуже слабо впливає на структуру остова. Мережа водневих зв'язків, яка стабілізує згин, залишається незмінною. Проте заселеність переважаючого кластеру трохи зменшується до 33%. На Рис. 6.1 показано перекриття структур 21-30WT та 21-30-E22Q, а на Рис. 6.2 показані карти контактів. Ці карти були обчислені, вважаючи, що контакт між двома залишками утворюється, якщо мінімальна відстань між будь-якими двома атомами цих залишків становить менше 6 Å. Для гліцинів, α-атоми гідрогену брали за бічні групи. Добре видно, що крім кількох малонаселених контактів дві карти практично ідентичні.



Рис. 6.1 Накладання центральних структурованих сегментів, що спостерігаються для Аβ21-30Е22Q (прозорий) та Аβ21-30WT. Залишки D23-N27 зображені паличками, а залишки E22, Q22 і K28 - лініями. Остов пептиду виділений сірим кольором. Водневі зв'язки показані пунктирними синіми лініями.



**Рис. 6.2** Карти контактів для WT Аβ21-30 (внизу праворуч) та мутанта E22Q (зверху ліворуч), отримані в даній роботі. Показані значення відповідають вірогідності спостереження принаймні однієї пари атомів у заданій парі бічних груп в межах 6 Å один від одного.

# 6.1.1.2. В згортанні пептидів Аβ15-28 і Аβ15-28Е22Q переважає мотив згину Е22-К28

Репрезентативна структура (що становить 20% усіх ідентифікованих конформацій) з найбільш заселеного кластеру пептиду дикого типу А $\beta$ 15-28 показана на Рис. 6.3. Можна легко побачити добре сформований згин в сегменті E22-K28, стабілізований взаємодіями бічної групи D23 з амідними атомами гідрогену сусідніх залишків G25-N27. Кластерний аналіз, проведений по всіх послідовних сегментах з п'яти залишків, показує, що область згину є найбільш структурованою частиною пептиду. Використовуючи RMSD відхилення для атомів С $\alpha$  цього регіону, (E<sub>22</sub>DVGSNK<sub>28</sub>), ми виявили, що конформація згину становить приблизно 92%. У випадку мутанта A $\beta$ 15-28E22Q секція 22-28 залишається високо структурованою, хоча її заселеність зменшується до 68%. Порівняльний аналіз показує, що згини 22-28 у мутанті E22Q і WT-послідовності є ідентичними за структурою в A $\beta$ 15-28. Насправді, вони також ідентичні за структурою до сегмента E22-K28, виявленого в A $\beta$ 21-30, і, як обговорювалося вище і показано на Рис. 6.1, в A $\beta$ 21-30E22Q.

Контакти бічних груп для Аβ15-28WT та Аβ15-28E22Q показані на Рис. 6.4. Ці карти контактів чітко показують, що згортання в Аβ15-28WT відбувається навколо сегмента E22-K28. Найбільш інтенсивні контакти (понад 80% ймовірності формування) спостерігаються в цьому сегменті між бічними групами D23 і G25, S26, N27 та K28. Ці ж контакти також є домінуючими на карті Аβ15-28E22Q, хоча їх інтенсивність дещо зменшена. Найбільш помітним ефектом мутації E22Q є ослаблення контакту 22-28, що виникає внаслідок дестабілізації солевого містка E22-K28 внаслідок мутації. У послідовності дикого типу заселеність контакту 22-28 становить > 80%, тоді як в мутанті - приблизно 50%. Зазначимо, що, хоча солевий місток грає стабілізуючу роль у згорнутій структурі, міра цієї стабілізації невелика. Дійсно, дестабілізація солевого містка приводить до часткової депопуляції контакту 22-28, але не до його повного зникнення. 6.1.1.3. Мутація E22Q приводить до ослаблення взаємодій між СНС та згином 22-28

Структурний аналіз конформаційного простору, спостережуваного для  $A\beta15-28WT$  у наших симуляціях, вказує на те, що, на відміну від регіону 22-28, центральний гідрофобний кластер 17-21 не приймає унікальну конформацію. Натомість, з'являються 3-4 ансамблі структур, в яких СНС приймає форму згинів та петель (згідно з класифікацією DSSP [330]), які мають дуже мало спільного зі структурою β-нитки, яка спостерігається в цьому регіоні в моделях фібрил Тико[247]. Кластер СНС є істотно менш структурований, ніж область згину E22-K28, як в Аβ15-28WT, так і в Аβ15-28E22Q. Декілька конформацій з рівнем заселення приблизно 20% спостерігаються в цій області для Аβ15-28WT і приблизно 10% для Аβ15-28E22Q.





Рис. 6.3 Атомне представлення найбільш репрезентативної конформації Аβ15-28, знайденої в проведених симуляціях. Велика гідрофобна латка, яка створена залишками центрального гідрофобного кластера і перебуває в контакті з розчинником, показана у формі поверхні.

ті зі структурою згину. Взаємодія з мотивом згину захищає сегмент СНС з одного боку від впливу води. Проте інша сторона цього сегменту повністю відкрита для розчинника. Подібне спостереження (частково захищений СНС, що взаємодіє з структурою згину) було зроблене роботі Гарсія та колег[407] в симуляціях пептиду повної довжини А $\beta$ 1-40. Конформації сегменту СНС захищають мотив згину від води з одного боку, збільшуючи таким чином його рівень заселеності з 44% у А $\beta$ 21-30 (без присутності СНС) до 92% у А $\beta$ 15-28. Отже, можна стверджувати, що СНС та сегмент згину мають взаємовигідні взаємодії, що підвищують ступінь їх структурування. В Аβ15-28WT E22 має певні взаємодії з залишками CHC, приводячи до інтенсивності контактів E22-V18 та E22-F20 приблизно в 50%. Ці взаємодії знижуються до приблизно 30% в Аβ15-28E22Q, що приводить до загального ослаблення взаємодій між областями CHC та згину E22-K28. Прямим проявом цього є повне зникнення гідрофобного контакту F19-V24 в Аβ15-28E22Q, який заповнено приблизно 50% часу в послідовності дикого типу. Очевидно, що мутація E22Q впливає на залишкову структуру, присутню в сегменті CHC. Найбільш помітним ефектом є значне збільшення вмісту структури β-нитки у залишках V18 та F19, від ~ 10% у послідовності WT до ~20% у мутанті E22Q.



**Рис. 6.4** Карта ймовірності контактів між залишками, розрахована у даній роботі для Аβ15-28WT, нижній правий трикутник, та Аβ15-28E22Q, верхній лівий трикутник.

6.1.1.4. Сегменти 14-20 та 30-36 мають структуру β-нитки в перехідному стані реакції росту фібрил

Як зазначено у розділі "Методи та моделі", можливі конформації перехідного стану мономера, що осідає на поверхню фібрили, були встановлені на основі моделі фібрил Тико[247]. Конформації перехідного стану, що спостерігаються в наших траєкторіях, показані на Рис. 6.5. Хоча, в цілому, конформації перехідного стану являють собою



**Рис. 6.5** Конформації перехідного стану реакції осідання мономеру Аβ на фібрили, отримані в даній роботі. Два структурних мотиви, β-нитки в позиціях H14-F20 і A30-V36, спостерігаються в усіх конформаціях.

сильно неоднорідний структурний ансамбль, вони, тим не менше, зберігають кілька рис оригінальної моделі Тико. Кластеризація всіх сегментів, що містять 5 залишків у межах Аβ9-40, показує дві області з високою схильністю до структурування, а саме залишки від 14 до 20 та від 30 до 36. Ці області відповідають розташуванню структур β-нитки у моделі фібрил, зв'язаних за допомогою петлі A21-G29. Петля, з іншого боку, цілком невпорядкована в конформаціях перехідного стану. Інші невпорядковані області відповідають С- (залишки 9-13) та N- (залишки 37-40) кінцям.

# 6.1.1.5. Мутація E22Q приводить до зменшення бар'єру вільної енергії для осідання мономеру на фібрили

Симуляції дисоціації Аβ-фібрил (показані в розділі "Методи та моделі") вказують на те, що контакти, які включають залишки L17-F20, є останніми, що розриваються в дисоціативних умовах. Ці симуляції підтримують ідею, що залишки СНС, які піддаються впливу розчинника (див. Рис. 6.3) у мономері, слугують місцем стикування молекул Аβ, що осідають на фібрили. Після приєднання молекулі Аβ необхідно пройти додаткову конформаційну трансформацію, щоб стати частиною фібрили. Вільна енергія активації для осідання мономеру на фібрили,  $\Delta G^{\dagger}$ , 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)[234]. Схема, яка ілюструє нашу модель осідання мономеру на фібрили, показана на Рис. 6.6.

Оскільки сегменти A30-V36 та H14-K16 приймають подібні конформації як у Аβ40E22Q, так і в Aβ40WT[248], вільна енергія, необхідна для їх згортання в конформації β-нитки, характерної для фібрил, однакова для обох пептидів. Отже, ефект мутацій E22 на енергію активації процесу осідання в Aβ40 зосереджений, перш за все, на пере-згортанні сегмента L17-F20. Для того, щоб оцінити вільну енергію згортання L17-F20 в потрібний стан, ми обчислили профіль вільної енергії як функцію RMSD в Aβ15-28WT і Aβ15-28E22Q від конформацій

TS, розрахованого для позиції атомів Са. Результати цих розрахунків показані на Рис. 6.7. Панель справа, (б), показує дані для послідовності дикого типу, де видно, що більшість спостережуваних конформацій відхиляються менш ніж на 0.5Å від структури β-нитки перехідного стану. Ми оцінюємо, що втрата вільної енергії при досягненні цієї структури становить  $\Delta G^{\dagger} = 1.3$  ккал/моль. Після вивчення профілю вільної енергії для пептиду АβЕ22Q (дані не показані) ми виявили, що його енергетичний бар'єр є відповідною нижчим, 3  $\Delta G^{\dagger} = 1.1$  ккал/моль. Якщо при-



Рис. 6.6 Схема, що ілюструє, як мономери Аβ40 осідають на амилоїдні фібрили. Часовий масштаб цього процесу регулюється різницею вільної енергії між перехідними станами та мономерними стикованими станами, або вільною енергією активації  $\Delta G^{\dagger}$ . Вільна енергія активації в Аβ40 з мутацією E22Q знижується в порівнянні з послідовністю дикого типу,  $\Delta \Delta G^{\dagger} > 0$ . Визначальними характеристиками конформацій перехідного стану є β-нитки в сегментах H14-F20 і A30-V36. Для досягнення цих конформацій, Аβ40 має перезгорнути центральний сегмент гідрофобного кластеру L17-F20.

пустити, що швидкість осідання задається виразом перехідного стану  $k \sim e^{-\Delta G^{\dagger}/kT}$ , то ми приходимо до висновку, що співвідношення швидкості осідання  $k_m$  у мутантному Аβ до відповідної швидкості в послідовності дикого типу k, є  $k_m/k = e^{\Delta\Delta G^{\dagger}/kT}$ , де  $\Delta\Delta G^{\dagger} = \Delta G^{\dagger} - \Delta G_m^{\dagger}$  - це різниця в енергії активації, а T - температура. При температурі T = 277 К цей вираз передбачає, що Аβ15-28Е22Q повинен осідати на фібрили в 1.4 рази швидше, ніж Аβ15-28. Для порівняння, пришвидшення за рахунок мутації Е22Q поміряне для фрагменту Аβ10-35 становить 2.15 разів[248]. Тому ми бачимо, що вплив Е22 на структурні властивості фрагмента СНС досить добре описує фізи

ку, яка лежить в основі підвищення рівня осідання в пептиді Аβ40. Додаткове підтвердження цього твердження можна отримати з розщеплення різниці вільної енергії активації  $\Delta\Delta G^{\dagger}$  на ентальпійні та ентропійні внески. На Рис. 6.7 (а) наведено температурну залежність  $\Delta G^{\dagger}$ , що спостерігається в наших моделях для Аβ15-28WT і Аβ15-28E22Q. Додатково показано лінійне наближення  $\Delta G^{\dagger} = \Delta H^{\dagger} - T\Delta S^{\dagger}$ , де  $\Delta H^{\dagger}$  - ентальпія, пов'язана з про-



**Рис. 6.7** (а) Температурна залежність вільної енергії активації для осідання мономерів в Аβ15-28 та Аβ15-28Е22Q, отримана в даній роботі. (b) Профіль вільної енергії для Аβ15-28WT як функція RMSD відхилення від конформацій перехідного стану, порахованого для атомів Сα сегмента L17-F20.

цесом активації, і  $\Delta S^{\dagger}$  - її ентропія. Підпасування даних симуляцій до цього наближення дає значення  $\Delta H^{\dagger}$ =1.2±0.4 кКал/моль,  $\Delta S^{\dagger}/k = -3 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-3}$  кКал/моль/К для WT і  $\Delta H^{\dagger}$ =0.7±0.2 кКал/моль,  $\Delta S^{\dagger}/k = -1 \cdot 10^{-3} \pm 7 \cdot 10^{-4}$  кКал/моль/К для мутанта E22Q. Відразу ж видно, що ентальпія є домінуючим доданком у вільній енергії активації. Це узгоджується з недавнім експериментальним спостереженням, що ентальпія робить значний внесок у  $\Delta G^{\dagger}$ [408]. Ентальпія активації як для послідовності WT, так і для мутанта знаходяться в межах статистичної похибки один відносно одного, що дозволяє вважати, що ефект мутації E22Q на швидкість осідання має, переважно, ентропійну природу. Через великий статистичний шум, в порівнянні з даними для WTпептиду з Рис. 6.7(а), оцінка  $\Delta S^{\dagger}$ для мутанта містить значно більшу похибку. Незважаючи на це, відмінні ентропійні внески до вільної енергії активації в пептидах WT та E22Q чітко видно на цьому малюнку з відмінних нахилів кривих  $\Delta G^{\dagger}$ .

#### 6.1.2. Механізм впливу мутації

На додаток до найбільш поширеної спорадичної форми, було встановлено ще кілька видів вроджених форм хвороби Альцгеймера. Вроджені форми AD виникають внаслідок однієї точкової мутації в Аβ-пептидах і характеризуються раннім настанням та тяжкістю протікання. У даній роботі ми зосереджуємося на голландському типі AD, який пов'язаний із заміною E22Q [409]. Численні лабораторні експерименти показали, що Аβ-пептиди з голландською мутацією агрегують легше, ніж їхні аналоги дикого типу, а також демонструють підвищену цитотоксичну активність [231; 233; 410]. Ці спостереження привели до гіпотези про те, що підвищена схильність до агрегації в АβE22Q лежить в основі механізму патології голландської форми AD [233].

Формування амилоїдної фібрили з розчину мономерів - це багатоетапний процес, який включає в себе два обов'язкових кроки: I) нуклеація та II) ріст [343]. На першому кроці (повільніший за інший крок) створюється фібрила мінімальних розмірів ("ядро"); нуклеація фібрили може бути як спонтанною, так і керованою (через, наприклад, взаємодію з іншими внутрішньоклітинними білками). На другому етапі новостворені фібрили збільшуються в розмірі, в першу чергу шляхом додавання мономерів Аβ на кінцях фібрили, хоча відомі і інші механізми росту[411]. Оскільки нуклеація є занадто повільним процесом щоб бути спостережуваною в умовах біологічної концентрації Аβ, стадія росту фібрили визначена основною для пояснення підвищеної амилойдогенності голландської форми AD[248; 412]. Осідання мономера на фібрилу складається з двох послідовних етапів: первинне "стикування", в якому мономери зв'язуються слабо і тимчасово з відкритим кінцем фібрили, і "замикаюча" стадія, що включає структурний перехід мономеру в конформацію, сумісну зі структурою фібрили [413; 414; 415]. Було показано, що крок замикання є набагато повільнішим за крок стикування та визначає швидкість всієї реакції [413; 415]. Часові залежності, отримані Маджіо et al [248], показали, що осідання мономеру на амилоїдні

бляшки, що були отримані з мозку пацієнта з AD, протікає в два-чотири рази швидше для Aβ40 з голландською мутацією ніж у випадку WT-послідовності[413].

Згортання Аβ в мономерному стані у конформацію, виявлену в амилоїдних фібрилах, є ключовим кроком на шляху до росту фібрил. Протягом останніх років багато зусиль було спрямовано на те, щоб з'ясувати, як мутація Е22Q впливає на процес згортання Аβ[241; 416; 417]. Зокрема було висунуто наступні гіпотези про те, що мутація E22Q: а) спричиняє зменшення вмісту α-спіральної структури в N-кінцевому домені Аβ, що містить сегмент 10-24[416]; б) збільшує загальний вміст β-структури Аβ[417], і в) приводить до розгортання СНС кластеру[241]. Гіпотези а та б не є особливо переконливими, оскільки попередні дослідження методом FTIR [418] та нещодавні дослідження методом ЯМР [248] демонструють незначну різницю у загальній вторинній структурі між диким типом і мутованим пептидом і відсутність значних конформаційних змін внаслідок мутації. Третя гіпотеза базується на дуже короткій (1 нс) симуляції [241], що використала як початкову структуру знайдену методом ЯМР для Ав10-35[236]. Ці симуляції показують, що найбільш структурований регіон в запропонованій моделі ЯМР, СНС, частково розгортається в результаті мутації Е22Q. Більш пізні експерименти[393] і моделювання в нашій[367; 396; 399] та інших групах[242; 407] для фрагментів Аβ і для пептиду повної довжини вказують на те, що СНС не є найбільш структурованим елементом. Натомість, найбільш структурованою виявляється частина пептиду що включає сегмент згину, обмежений залишками E22-K28.

Симуляції, представлені в даній роботі, лежать в основі моделі осідання мономерів Аβ на фібрили (показана на Рис. 6.6), яка запроваджує новий механізм підвищення рівня агрегації в мутанті E22Q. Наше моделювання, що використовує алгоритм обміну репліками, показує, що мутація E22Q не змінює структуру згину 22-28, а, радше, приводить до ослаблення взаємодій між СНС і цим згином. У пептиді дикого типу наші симуляції показують, що замість єдиної структури, СНС згортається в ансамбль з 3-4 структур, всі з яких мають заселеність на рівні 20% та знаходяться в контакті з мотивом згину. Мутація дає змогу СНС більш широко охоплювати конформаційний простір і приймати структури, що не суперечать будові фібрил.

Просте зменшення вмісту α-структури в Аβ-пептиді (гіпотеза а) або випадкове розгортання СНС (гіпотеза в) не призведе до підвищення рівня агрегації. Для цього пептиду необхідно прийняти конформацію, яка є близькою до структури перехідного стану для процесу росту фібрил. У наших симуляціях ми бачимо, що мутація Е22Q робить саме це: індукує структурний перехід в СНС від випадкових конформацій до β-структур, які встановлені для TS ансамблю. Цей структурний перехід спричиняє зменшення бар'єру вільної енергії для осідання мономерів і, як наслідок, приводить до збільшення швидкості агрегації. Як і в експериментальних дослідженнях [248], ми виявили, що внесок ентропії домінує в різниці енергії активації між Аβ15-28WT і Аβ15-28E22Q. Походження цього ентропійного ефекту може бути пов'язано з конформаційною ентропією Аβ15-28, що вказує на те, що у мутанті Е22Q існує більше структур перехідного стану, ніж у послідовності WT. З іншого боку, додаткова ентропія може виникати внаслідок відмінностей в сольватації залишків Е22 та Q22 через їхню різну гідрофобність. Точний механізм зміни ентропії та його зв'язок з іншими теоріями підвищеної агрегації, такими, як ті, що запропоновано для поліглутаміну [419], будуть визначені в окремому дослідженні.

Цікаво, що експерименти показують, що осідання довшого та більш цитотоксичного варіанта Аβ42-E22Q не є значно швидшим, ніж у аналога дикого типу Аβ42, що дозволяє припустити, що ці два варіанти можуть відігравати різні ролі у вродженому AD. Важливою особливістю нашої моделі є її здатність пояснити, чому осідання мономерів протікає в Аβ42 набагато швидше ніж у Аβ40[413]. На відміну від Аβ40, мономери Аβ42 містять упорядковані структури β-нитки в сегменті А30-V36 [234]. Тому для Аβ40 існують додаткові витрати на перезгортання цього сегмента (ми припускаємо тут, що Аβ40 та Аβ42 мають той самий ансамбль перехідного стану TS, що, ймовірно, слідує з подібності їх фібрилярних структур [420]). Звідси випливає, що  $\Delta G^{\dagger}$  нижче в Аβ42, ніж у Аβ40, що приводить до більш високої швидкості агрегації.

Окрім голландської мутації E22Q, обговореної в даній роботі, ряд інших мутацій у положенні 22 (включаючи італійський мутант E22K і арктичний E22G) та позиції 23 (мутант D23N Айови), як відомо, приводять до вродженого AD. Кілька *in vitro* експериментів для Aβ40 з цими мутаціями повідомили про посилення рівня агрегації [233; 410]. Чи ці мутації впливають на агрегацію так само, як мутація E22Q, залишається в даний час відкритим питанням. Симуляції впливу цих мутацій на пептиди Aβ21-30 та Aβ15-28, а також на довші фрагменти Aβ в даний час ведуться у нашій групі.

### 6.1.3. Методи та моделі

#### 6.1.3.1. Динаміка дисоціації мономерів Аβ з моделей фібрилярних структур

Часовий масштаб осідання мономеру на вільний кінець амилоїдної фібрили контролюється енергією активації, або бар'єром вільної енергії, при переході від дисоційованого стану до асоційованого. Щоб оцінити висоту бар'єру, необхідно визначити молекулярні структури, що лежать у його верхній частині (структури перехідного стану (TS)). Пряме спостереження за процесом осідання в комп'ютерних симуляціях є неможливим з огляду на складність цієї проблеми. Для обчислення структур TS ми діємо аналогічно до того, як обчислюються структури TS у проблемі згортання білків [421], а саме, використовуємо той факт, що перехідні стани прямих та зворотних одномірних (1D) реакцій ідентичні. В білках згортання може бути ефективно представлено як 1D-реакція, що дозволяє знайти перехідні стани згортання з перехідних станів розгортання [422]. Для отримання перехідного стану осідання мономеру на фібрилу ми чинимо аналогічно, тобто знаходимо перехідний стан дисоціації мономерів. Зазначимо, що ця про цедура спирається на припущення, що осідання мономеру є 1D-реакцією.

Схематично, термодинамічна рівновага між асоційованими з фібрилою та дисоційованими станами мономерів Аβ показана на Рис. 6.8 як функція одного параметра порядку *q*. При низькій температурі (еквівалент природних умов для

білків) асоційований стан є більш стабільним і, таким чином, володіє меншою вільною енергією ніж дисоційований стан. При більш високих температурах (умови денатурації, відповідна вільна енергія показана червоним кольором), дисоційований стан є більш сприятливим. Два стабільних стани розділені бар'єром, розташованим при певному значенні параметра порядку  $q^{\dagger}$ , який визначає приналежність до структур перехідного стану.

Для представлення структури амилоїдної фібрили ми використовуємо модель Тико та співробітників [247]. Ця модель передбачає, що фібрили утворюються шарами молекул Аβ40, які утворюють β-листи з двома β-нитками, що охоплюють залишки Y10-E22 та A30-V40, зв'язані петлею на позиціях D23-G29. У наших симуляціях ми вико-



Рис. 6.8 Термодинамічна рівновага між мономерами Аβ та фібрилами контролюється температурою. При високій температурі мономери стабільніші, що приводить до поступового розпаду фібрил. Після відриву від фібрили, мономер повинен подолати дуже великий бар'єр вільної енергії для повторної адсорбції. Ми використовуємо цю властивість для визначення конформацій перехідного стану. ристовуємо лише два шари фібрили: верхній шар і шар безпосередньо під ним. Взаємодії з глибшими шарами незначні і враховувати їх недоцільно. Було запропоновано дві можливі конфігурації міжшарових контактів: стикування +2 та стикування -2 [247], які визначають контакти між еквівалентними залишками на сусідніх шарах. Ми дослідили обидва види стикування та встановили, що вони ведуть до якісно подібних результатів. У подальшому ми зосереджуємось на стикуванні +2, в якому бічна група К28 шару *i* утворює солевий місток з бічною групою D23 шару i + 2.

Атомне представлення системи, яку ми розглядаємо, показано на Рис. 6.9. Хоча модель була запропонована для пептиду повного розміру Аβ40, розглядаються лише залишки від 9 до 40 (Аβ9-40), оскільки перші 9 залишків у фібрилах невпорядковані. Ми досліджуємо динаміку молекули у верхньому шарі, яка вільно рухається, тоді як друга молекула в нижньому шарі обмежена початковими позиціями, щоб відтворити ситуацію, яка спостерігається для відкритого кінця зростаючої фібрили. Перший тест, який ми виконали для цієї системи, – це тест на стабільність початкової конформації. Для цього були проведені симуляції при постійній температурі T = 300К в явному розчиннику, які згенерували 10 незалежних траєкторій по 5нс кожна. В якості міри структурних коливань, на Рис. 6.10 ми показуємо випадкові середні зміщення (RMSF) атомів  $C_{\alpha}$  від їх початкових положень протягом усього часу симуляції. Відхилення, як правило, невеликі, нижче 1Å, за винятком кількох залишків у області петлі D23-G25 та обох кінців. Додатковий аналіз зміщення RMS для атомів С<sub>а</sub> показав, що лише одна траєкторія з 10 відхилилася від початкової конформації більш ніж на 3 Å. Виходячи з цих спостережень, ми робимо висновок, що розглянута модель є достатньо стабільною і представляє, якщо не справжню структуру краю фібрили, то близький до неї низький мінімум вільної енергії.

Для того, щоб викликати дисоціацію, ми збільшили температуру в наших симуляціях до 500К. Знову було розглянуто 10 незалежних траєкторій, кожна з них мала 5*нс*. Ми очікуємо, що в цих умовах вільна енергія дисоційованих станів буде нижчою за



**Рис. 6.9** Два шари β-листа використовуються для моделювання краю амилоїдної фібрили. Нижній шар закріплений у просторі, тоді як верхній шар може вільно дисоціювати з фібрили під дією теплових коливань.

вільну енергію асоційованих станів, як це схематично показано на Рис. 6.8. Для визначення структур перехідного стану в цих симуляціях ми аналізуємо структури конформаційних переходів та використовуємо розбіжність часових масштабів, на яких відбувається перетин бар'єра дисоціації та локальні переходи. Коротко, наш метод визначення перехідних структур є наступним. Як видно з Рис. 6.8, перетин бар'єра є найповільнішим етапом реакції. Порівняно з іншими переходами, він не може спостерігатися двічі в одній і тій же траєкторії. Як тільки бар'єр перетинається у напрямку вперед, від асоційованих фібрилярних станів до дисоційованих, його не можна перетнути в зворотному напрямку, оскільки цей процес стримується значно вищим бар'єром вільної енергії. Отже, очікується, що всі переходи між молекулярними конформаціями, які спостерігаються в симуляціях, поділяються на дві категорії: (і) швидкі переходи до/після бар'єру та (ii) одна подія переходу бар'єру. Щоб точно визначити момент переходу бар'єру, ми аналізуємо карти зв'язності всіх спостережуваних станів, котрі будуються наступним чином. Конформації представляються як точки в 2D площині та переходи між ними як напрямлені лінії. Очікується, що всі стани спостережувані в симуляції будуть скупчуватися в дві області, що відповідають асоційованим та

дисоційованим станам. Ці дві області повинні бути пов'язані між собою лише однією лінією, яка буде вказувати лише в одному напрямку. Точки, які відповідають цій лінії, це часові моменти, в які відвідуються перехідні стани.

Ми застосували цю стратегію для визначення перехідних станів в усіх 10 траєкторіях. Для цього, поперше, всі записані конформації були розбиті в кластери, щоб зменшити кількість структур, які необхідно проаналізувати, від тисяч до десятків. Далі, обрані конформації були спроектовані в 2D точки, разом зі спостережуваними переходами між



Рис. 6.10 Випадкове середнє квадратичне відхилення від атомів С $\alpha$ , що спостерігається за різних умов в даній роботі. При низькій температурі, T = 300 К, амилоїдна фібрила залишається незмінною. При підвищенні температури, верхній шар поступово відривається від фібрили. Середній перехідний стан ансамблю цього процесу також показаний.

ними. Якщо був помічений перехід від стану i до стану j, ми малювали стрілку на нашому графіку, що вказує від i до j. Усі спостережувані переходи були відображені таким чином. Приклад отриманої карти показаний на Рис. 6.8. Початкова конформація нашої симуляції позначається на цій карті номером 18. Загальна кількість проаналізованих станів - 20. З Рис. 6.8 добре видно, що в цій конкретній траєкторії перетинання бар'єру відбувається в момент між часами відвідування кластерів 4 та 7. Лінія між цими кластерами є єдиним зв'язком між групою взаємопов'язаних передперехідних кластерів 18, 8, 4 і 19, а також групою постперехідних кластерів (усі інші). Крім того, лінія вказує лише в одному напрямку, від 4 до 7, що дозволяє припустити, що зворотний перехід від 7 до 4 неможливий в спостережуваному масштабі часу. За умови, що перехід між асоційованими та дисоційованими станами відділяється високим бар'єром вільної енергії, наша процедура дозволяє однозначно визначити перехідний стан.

Відхилення RMSF конформацій TS (для атомів Ca) від їх початкових значень показано на Рис. 6.10. Порівняння з передперехідними кластерами (спостережуваними при T = 300 K) та структурами отриманими після переходу (показано для T = 500 K) підтверджує наше вихідне припущення, що конформації, що представляють ансамбль TS, мають підвищену мобільність в центральному регіоні петлі, зберігаючи при цьому жорсткими дві  $\beta$ -нитки фібрили.

#### 6.1.3.2. Технічні деталі

Для моделювання сольватованої амилоїдної  $\beta$ -пептидної системи було використано атомне силове поле OPLS/AA[307] у поєднанні з явною моделлю води TIP3P[33]. Всі симуляції виконувалися за допомогою програмного пакету GROMACS [423; 424]. Ковалентні зв'язки молекул води фіксувалися згідно з алгоритмом SETTLE[327]. Зв'язки, що включають атоми Гідрогену пептиду, були обмежені відповідно до протоколу LINCS[326]. Крок інтеграції був 2 *фс*. Далекосяжні взаємодії Леннард-Джонса спрямовувались до нуля в інтервалі від 8 до 10 Å. Списки сусідів оновлювалися кожні 10 кроків симуляції. Електростатичні взаємодії були враховані за допомогою методу Евальда з частинковими сітками [329].

Було проведено три групи симуляцій. В першій було досліджено структуру пептиду Аβ15-28 (послідовність: QKLVFFAEDVGSNK) та його E22Q мутанта. Щоб покращити збіжність в конфірмаційному просторі, було застосовано алгоритм обміну репліками[425]. Для контролю тиску використовувався метод Парінело-Рамана[426]. Було розглянуто 60 реплік, що були розміщені при температурах, які присвоювались експоненціально між 277К та 600К. Тиск 1атм підтримувався для температур нижчих за 384К, після чого тиск експоненціально підвищувався до 2500атм, щоб уникнути неконтрольованого росту комірки симу-
ляції. Ці високі температури не впливають на представлені результати. Обмін репліками відбувався кожні 250 кроків. Це призвело до ймовірності обміну не нижче 19% для всіх пар реплік. Симуляції розпочиналися з випадкової початкової конфігурації, однакової для всіх реплік, і продовжувались на протязі 5*нс* в фазі еквілібрації. Після цієї фази слідували 28*нс* рівноважних симуляцій, протягом яких записувались траєкторії. Щоб встановити збіжність даних, для мутанта E22Q була проведена незалежна повторна симуляція. Її результати не відрізнялись від вихідних.

Як до Аβ15-28WT так і до мутанта E22Q було додано блокуючі групи на N- та C-кінцях, після чого система була поміщена в кубічну комірку довжиною 4.5*нм*, що містила 3000 молекул води. Щоб нейтралізувати повний заряд пептиду Aβ15-28E22Q, до системи було додано один хлорид-іон.

Аналогічні процедури були використані у другій групі симуляцій, проведених для пептиду Aβ21-30E22Q. 40 реплік, всі при тиску 1атм, були використані для температур в діапазоні від 277 до 600 К. Симуляційна комірка мала довжину 4*нм*. Були отримані дві траєкторії, по 25*нс* кожна.

У третій групі було проведено симуляції дисоціації моделі фібрили[247] А $\beta$ 9-40 при постійній температурі. Амінокислотна послідовність цього пептиду є наступною: GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV. Для нейтралізації зарядів С- та N-кінців використовувались відповідно ацетильні та амідні групи. Повний заряд пептиду становить -1 при pH =7. Розглянуто два ланцюги, сольватовані в прямокутній коробці з розмірами 7.5x5.0x5.0*нм*, що містять 5866 молекул води. Заряд цієї системи, -2, нейтралізувався шляхом додавання 2 іонів натрію. Десять незалежних траєкторій по 5*нс* були отримані, використовуючи алгоритм Нозе-Гувера для підтримки постійної температури. Щоб змоделювати різні умови дисоціації, симуляції проводилися при 300К і 500К.

## 6.2. Структура фібрил Аβ11-25

# 6.2.1. Антипаралельні $\beta$ -нитки обирають регістр 17+k $\leftrightarrow$ 20-k при низькому та нейтральному pH

Коли pH змінюється від нейтрального до кислого, індукований заряд на здатних до іонізації ділянках в Аβ11-25, викликає зміну регістру β-листів. В первинній структурі пептиду існують залишки, які змінюють заряд в кислому середовищі. Негативно заряджені E11, E22 та D23 стають нейтральними, тоді як нейт-



**Рис. 6.11** Схематичне зображення амилоїдних фібрил, утворених Аβ11-25. На (с) пептиди, що агрегуються, збираються у β-листи, які додатково зливаються у протофіламенти. Кілька протофіламентів, точна мікроскопічна структура яких невідома, утворюють фібрилу[238]. В межах β-листів, пептиди розташовуються в антипаралельному положенні та демонструють два різних регістри R2 і R1, які відповідають (а) кислому та (b) близькому до нейтрального pH відповідно. Бічні ланцюжки гідрофобних залишків показані сірим, ті, що несуть негативний заряд, - білим, а ті, що мають позитивний заряд, - чорним кольором.

ральні залишки H13 і H14 – позитивно зарядженими. Крім того, карбоксильна група С-кінця стає протонованою та позитивно зарядженою. На якому рівні структурного формування фібрил зміна заряду впливає на регістр? Взаємодія між зарядженими групами відбуваються як локально, так і між найближчими β-нитками, а також глобально між β-листами або протофіламентами як зображено на Рис. 6.11(с). Які з цих взаємодій визначають регістр? Щоб дати відповідь на

це питання, спочатку розглянемо найпростішу можливу модель β-листа, яка складається з двох пептидів, що утворюють β-нитковий димер. Ілюстрація цієї моделі наведена на Рис. 6.11(а)-(b).

Вона є елементарним будівельним блоком для побудови більших  $\beta$ листів, що дозволяє нам протестувати роль локальних взаємодій. Для оцінки відносної частоти виникнення регістрів 17+ $k \leftrightarrow 20-k$  (R1) та 17+ $k \leftrightarrow 22-k$ (R2) ми розрахували їхню різницю вільної енергії. Це було зроблено в два



Рис. 6.12 Потенціал середньої сили, що обчислюється між двома антипаралельними β-нитками пептиду Аβ11-25, як функція відстані між їх центрами мас. Показані результати для двох регістрів при pH=7. Регістр R1 вважається стійкішим на ~ 5кКал/моль

кроки. Спочатку ми використали метод парасолькового відбору вибірки[427] у поєднанні з методом множинного аналізу гістограм[306; 428] для обчислення профілю вільної енергії, або потенціалу середньої сили (PMF), як функції відстані, що відокремлює геометричні центри  $\alpha$ -атомів карбону, розташованих на двох пептидах, що утворюють димер (див. "Методи та моделі" для отримання додаткової інформації про обчислення). Криві PMF отримані при pH=7, G(r), показані на Рис. 6.12, мають мінімум приблизно при  $r_{\min}$ =5Å, що відповідає двом  $\beta$ -ниткам, які перебувають у контакті, і плато на великих відстанях. Плато з'являється при  $r = r_p$ =8Å, що вказує на відстань, при якій більше не потрібні додаткові витрати енергії для подальшого розділення пептидів, або відстань, на якій вони перестають взаємодіяти. Тому ми можемо інтерпретувати різницю мінімального G(r) та його значення для плато як виграш вільної енергії внаслідок об'єднання двох пептидів і утворення димеру, або енергію асоціації. Рис. 6.12

показує, що ця енергія становить приблизно 30 кКал/моль для R2 і 35 ккал/моль для R1.

Далі, оскільки вільна енергія стану, в якому пептиди повністю дисоційовані (  $r > r_p$ ), не залежить від регістру, ми можемо використати його як загальний еталон для обчислення відносної вільної енергії між двома регістрами як різниці їх енергій асоціації. Наші розрахунки показують, що вільна енергія R1 менша приблизно на 5 кКал /моль ніж у R2, що узгоджується з експериментальними спостереженнями. З цих розрахунків ми робимо висновок про те, що регістр βлистів в амилоїдній фібрилі Аβ11-25 задається на найнижчому рівні їх формування в нейтральному середовищі. Водневі зв'язки в антипаралельних β-нитках разом з локальними взаємодіями між бічними ланцюгами амінокислот колективно віддають перевагу R1 як більш стабільній конфігурації.

Ми повторили наші розрахунки при кислому pH=2 і обчислили профілі вільної енергії для R1 і R2. Вони дуже схожі на ті, що показані на Рис. 6.12 і тому не представлені тут. Дивно, але ми виявили, що як і при pH=7, так і в кислому середовищі перевага віддається R1 над R2. Різниця вільної енергії збільшується і становить приблизно 10кКал /моль. Цей результат показує, що локальні взаємодії між амінокислотними залишками не контролюють регістр фібрил Аβ11-25.

# 6.2.2. Регістр фібрил Аβ11-25 з моделі β-листів

# 6.2.2.1. Структурні та геометричні параметри В-листів

Оскільки димер β-нитки не може пояснити, чому регістр змінюється при pH=2, він мусить визначатися на іншому, більш високому рівні структури фібрил. Як видно з Рис. 6.11(с), наступний структурний елемент у ієрархії фібрил це β-листи, розташовані один навпроти одного. Невідомо, скільки β-листів міститься в протофіламенті Аβ11-25. Ми зосереджуємося на мінімальній кількості,

яка становить 2, заради отримання зручної і простої в обчисленнях моделі. Серед фібрил, утворених іншими білками, два Bлисти в протофіламенті є поширеним досить явищем[429]. Подібно до димера для одного β-листа, пару β-листів можна побуелементарного дувати 3 будівельного блоку, який у цьому випадку складається з 4 пептидів. Схематичне зображення цієї одиниці показано на Рис. 6.13. Оскільки експериментальної інформації про взаємну орієнтацію β-листів у фібрилах Аβ11-25 бракує, ми розглянемо всі можливі моделі. На Рис. 6.13 пока-



Рис. 6.13 Протофіламенти моделюються як два  $\beta$ листи, складені один проти одного. Більш довгі  $\beta$ листи можуть бути побудовані з будівельного блоку, що містить 4  $\beta$ -нитки. Є чотири способи складання двох  $\beta$ -листів, які утворюють різні міжлистові зв'язки. С1 випливає з простої трансляції одного  $\beta$ -листа на міжлистову відстань у напрямку, перпендикулярному як площині листа, так і осі фібрилу. Інші конфігурації, С2-С4, можуть бути створені з С1 через 3 основних повороти перекладеного листа.

зано 4 різні способи стекінгу двох антипаралельних β-листів. Спершу, почнемо з двох β-листів, які можна ідеально сумістити один з одним. Один β-лист, наприклад лівий, може бути переміщений на міжлистову відстань в напрямку *Y*, яка перпендикулярна до площини листів та осі фібрили. Ми називатимемо таку конфігурацію C1. Три інші конфігурації, C2, C3 і C4, можуть бути побудовані з C1 виконуючи три нееквівалентні повороти його правого β-листа на 180°. Один із цих поворотів відбувається навколо осі фібрили, а два інші - навколо напрямків, перпендикулярних їй. У позначеннях на Рис. 6.13 - це обертання навколо осей *X*, *Y* та *Z*. Конфігурації C1 та C3 розташовують лицьову, або фронтальну, сторону одного β-листа до зворотної, або тильної, сторони іншого β-листа і таким чином називаються **фронт-тил**. Інші конфігурації, C2 і C4, утворюють зв'язки між β-листами, в яких лицьові частини листів знаходяться один навпроти одного, в так званій **фронт-фронт** конфігурації.

Що стосується взаємної орієнтації β-ниток в одному і тому ж шарі β-листа, то конфігурації С1 та С2 можуть бути класифіковані як **"паралельні"**, а С3 і С4 як **"антипаралельні"**. Таким чином, альтернативна та більш інтуїтивно зрозуміла класифікація стекінгу конфігурацій полягає в наступному: паралельна модель фронт-тил для С1, паралельна модель фронт-фронт для С2, антипаралельна модель фронт-тил для С3 та антипаралельна модель фронт-фронт для С4. Наші конфігурації стекінгу С1-С4 відповідають класам симетрії 7 і 8 класифікації βперехресних листів, представлених Айзенбергом та ін.[430].

Крім регістру, R1 або R2, і стекінгу, C1-C4, потрібна ще одна змінна, щоб однозначно визначити структуру двох  $\beta$ -листових протофіламентів. Ця змінна описує взаємний зсув двох  $\beta$ -листів вздовж латерального напрямку фібрили. Відповідно до позначеннь на Рис. 6.13, цей напрямок лежить уздовж осі X. Взаємний зсув  $\beta$ -листів визначає, які контакти утворюються на інтерфейсі, тобто вирівнює один лист з іншим, і тому є важливою характеристикою моделі фібрил. Щоб означити міжлистове зміщення, ми будемо використовувати позначення  $D_k$ , де k є цілим числом між -7 та 7, яке вказує на те, що у верхньому листі нашої чотирипептидної моделі  $\beta$ -листа (див. Рис. 6.13), залишок F19 лівої  $\beta$ -нитки знаходиться в контакті з залишком 17+k правої  $\beta$ -нитки. Це дозволяє запровадити позначення  $R_i$ - $C_j$ - $D_k$ , де i=1,2, j=1-4, k=-7,7, які однозначно визначають всі мож



**Рис. 6.14** Регістр R1 конфігурації  $\beta$ -листа у конфігурації стекінгу C3. Показані дві різні міжосьові зміщення  $D_1$  та  $D_{-1}$ . В  $D_1$  висвітлено залишок F19 у лівій  $\beta$ -нитці верхнього листа та залишок V18 у правій  $\beta$ -нитці, які утворюють зв'язок. У  $D_{-1}$  еквівалентний зв'язок знаходиться між F19 і K16. Позитивно заряджені залишки при pH=7 показані синім, негативно заряджені залишки червоними. Пунктирна червона лінія показує, що залишки у двох сусідніх  $\beta$ нитках того самого листа вирівняні.

ливі конфігурації двох стикованих  $\beta$ -листів певного регістру. Як приклад, на Рис. 6.14 показані конфігурації C3 регістру R1 з міжлистовими зсувами  $D_1$  та  $D_1$ ,  $R_1 - C_3 - D_1$  і  $R_1 - C_3 - D_{-1}$ . Обидві структури знаходяться в антипаралельній орієнтації фронт-тил. Перша структура містить міжлистовий контакт між F19 та V18, тоді коли друга - між F19 і K16.

Як β-листи розташовуються та зміщуються по відношенню один до одного у фібрилах Аβ11-25, невідомо. Тому ми визначаємо конфігурацію C та зсув D теоретично. Надалі ми розглянемо всі можливі комбінації C-D та виберемо найбільш імовірні кандидати для моделі фібрили на основі результатів комп'ютерного моделювання. Однією з важливих умов, яку ми використовуємо в цій процедурі, є те, що моделі фібрили не містять некомпенсованих заряджених залишків, розміщених у їхній внутрішній структурі. У великих білках та протеїнових комплексах заряджені бічні ланцюги присутні або на поверхні в контакті з розчинником, або утворюють солеві містки у внутрішній структурі комплексу[431]. Ми визначаємо найбільш стійку модель окремо для нейтрального та кислого pH.

#### 6.2.2.2. Модель фібрили, отримана при рН=7

*Моделі з регістром*  $17 + k \leftrightarrow 20 - k$  (*R1*) приймають лише антипаралельне укладання типу фронт-фронт. Ми розпочинаємо наш аналіз з конфігурації C3 у регістрі R1 при рH=7. Як видно з Рис. 6.14, вона має схильність заглиблювати некомпенсовані заряджені групи всередину фібрили. Наприклад, у  $R_1 - C_3 - D_1$  бічні ланцюги заряджених лізинів, глутаміну та аспарагінової кислоти розташовані глибоко всередині фібрили, що порушує гідрофобне ядро. Легко бачити, що будь-яке зміщення β-листа не може зняти це обмеження. Переміщаючи правий β-лист вгору або вниз на два залишки, можна створити сприятливий зв'язок між D23 і K16 в одному листі, як у конфігурації  $R_1 - C_3 - D_{-1}$ . Однак ця пара залишків залишається некомпенсованою в іншому листі, як це видно на Рис. 6.14. Крім того, негативно заряджені сторони бічних ланцюгів Е22 все ще залишаються всередині фібрили. З цього аналізу ми робимо висновок, що конфігурації С3 не підходять для моделі фібрили. Конформації в конфігураціях стекінгу С1 та С2 показані на Рис. 6.15(а)-(b). Вони приводять до (i) розміщення некомпенсованих зарядів всередині фібрили, як в  $R_1 - C_1 - D_3$ , або до (ii) створення зв'язків між однаково зарядженими залишками, як в R<sub>1</sub> - C<sub>2</sub> - D<sub>2</sub>. Як і в конфігураціях СЗ, ці стикування не можуть забезпечити фізично розумних зміщень β-листів, і тому конфігурації С1 та С2 не будуть розглядатися надалі.

Ми виявили, що єдиною конфігурацією, яка може задовольнити обмеження на заряджені залишки, є С4. Дві конформації цієї конфігурації показані на Рис. 6.15(c)-(d). У конформації  $R_1 - C_4 - D_0$  залишки К16 утворюють зв'язок з залишками Е22 у нижньому листі. Інші заряджені залишки в цьому листі, D23 та Е11, знаходяться на поверхні моделі. У верхньому листі залишки D23 та Е11 знаходяться всередині фібрили, але досить близько до країв, які можуть піддаватися дії розчинника. Залишки К16 та Е22 знаходяться на поверхні моделі. Стабільність моделі  $R_1 - C_4 - D_0$  була протестована у коротких наносекундних симуляці



**Рис. 6.15** Чотири різні конфігурації, розглянуті в даній роботі як моделі фібрил Аβ11-25 при pH=7. Як обговорюється в тексті, тільки конфігурації C4 дозволяють зарядженим залишкам бути або на поверхні фібрили, або у парах з компенсованим повним зарядом.

ях у явному розчиннику. Початкові конформації були побудовані вручну, що більш детально обговорено в розділі "Методи та моделі". Для побудови нашої моделі ми використовували 8 пептидів А $\beta$ 11-25 з розрахунку на один  $\beta$ -лист або 16 пептидів на один протофіламент. Відомо, що агрегація фібрил проходить за класичним сценарієм[432]: нуклеація, за якою слідує фаза росту. Щоб відтворювати властивості довершеної фібрили, теоретичні моделі повинні розглядати кількість пептидів, більшу за розмір критичного ядра. У дослідженнях формування амилоїду нерідко спостерігають порівняно невеликі ядра, деякі з яких містять 6 мономерів або менше[433]. Крім того, критичне ядро визначається концентрацією пептиду, температурою та іншими параметрами, які, таким чином, можуть використовуватися для регулювання його розміру. Хоча ми й не знаємо,





Рис. 6.16 Найбільш стабільна модель (  $R_1 - C_4 - D_0$ ), отримана в даній роботі для фібрили Аβ11-25 при рН=7. β-листи розташовані в антипаралельному положенні із зв'язками F19-L17, присутніми на поверхні моделі. Знімки із симуляції молекулярної динаміки в явному розчиннику з усіма атомами: (а) початкова конфігурація фібрили; (b) стійка структура фібрили пі-



сля 8нс симуляції; (с) вид зверху для початкової конфігурації; (d) стійка структура фібрили з викривленими та відкритими краями, що дозволяє молекулам води сольватувати гідрофільні залишки на кінцях; (e) таке ж, як (d), але показує розподіл води; (f) таке ж, як (e), але виділено компактне гідрофобне ядро всередині фібрили; (g) деталі солевих містків К16-Е22 між β-листами. Ці та інші рисунки були створені за допомогою PyMOL[434].

якими є ядра фібрил Аβ11-25 за описаних умов[250], ми припускаємо, що можна зменшити їхній розмір до менш ніж 16 мономерів, підібравши відповідні термодинамічні умови.

Наша модель протофіламенту була сольватована в явному розчиннику, після чого всі молекули води у внутрішній структурі були видалені. Після мінімізації, система була приведена в стан рівноваги протягом 20nc за умови, що всі важкі атоми пептиду зафіксовані. За фазою врівноважування слідував 8nc результативний цикл, де пептиди та вода були повністю вільними. Початкова конфігурація, що використовується в наших симуляціях, показана на Рис. 6.16(а),(с). Вона має структуру β-листа, відповідно до класифікації DSSP[330], що поширюється на максимальну кількість залишків, допустимих в регістрі 1, і охоплює залишки H13-V24. Вміст β-структури в сегменті H13 -V24 несуттєво зменшується протягом симуляції та залишається на рівні 90% в кінці траєкторії. Важливою особливістю цієї структури є схема чергування водневих зв'язків, що виникають між С- та N-кінцями сусідніх β-ниток, які поширюються по всій довжині фібрили.

Наприкінці 8-мої наносекунди в симуляції початкова конфігурація фібрили зазнає помітних змін. Дві проекції кінцевих конформацій наведені на Рис. 6.16(b) і (d). Серед інших структурних особливостей моделі є її кручення навколо довгої осі, що є загальною характеристикою амилоїдних фібрил[435]. Воно оптимізує водневі зв'язки, взаємодії між бічними ланцюгами та електростатичні взаємодії. Інша очевидна структурна зміна полягає в тому, що фібрила починає відкриватися на краях, як це видно на Рис. 6.16(d). Це приводить до менш компактної структури на її межі з водою, де порожнина, яка створюється шляхом розходження β-листів, наповнюється розчинником. Як показує Рис. 6.16(е), що відображає мікроскопічні деталі краю фібрили, вода проникає глибоко всередину фібрили, повністю сольватуючи бічні ланцюжки залишків Е11-Н14 та D23-G25. Це прямий наслідок того, що багато з цих залишків є або гідрофільними, або зарядженими, і тому сприятливо взаємодіють з водою. Кластер між залишками К16 та E22 у центральній частині послідовності виявляється повністю захищеним від води. Як видно з Рис. 6.16(f), цей кластер зосереджений навколо групи контактів між залишками F19 та L17 і між V18 та F20, які утворюють великий і нерозчинний гідрофобний комплекс усередині конформації фібрили. Наявність таких гідрофобних кластерів або ядер є особливою ознакою амилоїдної структури[249].

Гідрофобне ядро обмежене з обох боків солевими містками між К16 та E22, які захищають його від води. Знімок репрезентативної конфігурації води показаний на Рис. 6.16(е). Добре видно, що солеві містки утворюють "стінку", що складається з позитивних та негативних зарядів і тому сприяє присутності води. Гідрофобні залишки позаду стінки ніколи не стикаються з водою і, таким чином, уникають небажаних взаємодій. Крім того, бічний ланцюжок Q15, який лежить з A21 в одному шарі β-листа (див. Рис. 6.15(с)), утворює водневий зв'язок з бічним ланцюгом K16, розташованим в іншому листі. Ці взаємодії, виявляється, роблять "стіну" ще більш непроникною для розчинника.

Додаткове підтвердження запропонованих моделей фібрил. Щоб перевірити, наскільки достовірними є результати нашого моделювання  $R_1 - C_4 - D_0$ , ми провели контрольну симуляцію, в якій дослідили фібрилу, яка завідомо була нестабільною. Ми розглянули модель  $R_1 - C_4 - D_2$ , представлену на Рис. 6.15(d), яку можна побудувати з  $R_1 - C_4 - D_0$ , перемістивши один з β-листів вгору або вниз на два залишки в бічному напрямку, і який містить внутрішній конфлікт у місці заряджених залишків. Видно, що ізоляція заряджених залишків задовольняється, але К16 і Е22 не вирівнюються. Залишки Е11 та D23 розташовані поблизу краю фібрили і, таким чином, можуть бути піддані дії розчинника. Крім того, модель демонструє неперервне гідрофобне ядро, можливо стабілізоване сприятливими ароматичними взаємодіями бічних ланцюгів фенілаланіну. Щоб перевірити, чи конформація  $R_1 - C_4 - D_2$  стабільна на *наносекундній* шкалі часу, симуляції виконувалися з використанням того ж протоколу, що і для  $R_1 - C_4 - D_0$ . Ми виявили, що початкова структура β-листа руйнується швидко, лише після 2*нс* часу симуляції. Колапс, спровокований некомпенсованими зарядами бічних ланцюгів К16, взаємодіючих з остовними атомами оксигену суміжних β-ниток, приводить до утворення дефекту у вигляді дири у стінці β-листа. Дефект доступний для молекул води, які вільно протікають всередину фібрили. Наше контрольне моделювання, таким чином, вказує на те, що конформація  $R_1 - C_4 - D_2$  нестабільна, що обґрунтовує використання у цій роботі короткочасового молекулярно-динамічного моделювання як методу дослідження.

Модель фібрили з регістром  $17 + k \leftrightarrow 20 - k$  (R1) найбільш стійка при pH=7. Для побудови моделей фібрил з регістром 2 при pH=7 ми виконали ті самі процедури, що описані вище для регістру R1. Для двох β-листів були розглянуті чотири різні конфігурації стекінгу. На Рис. 6.17 показані лише дві конфігурації



**Рис. 6.17** Конформації, запропоновані в якості протофіламентних моделей для А $\beta$ 11-25 в регістрі 2 при рH=7. Обидві структури демонструють солевий місток, що включає К16, поміщений всередині фібрили, одночасно зберігаючи інші заряджені залишки доступними для дії розчинника. Оцінка вільної енергії показує, що  $R_2 - C_4 - D_4$  є найбільш стабільною.

 $R_2 - C_4 - D_4$  та  $R_2 - C_3 - D_3$ , які або піддають заряджені групи впливу розчинника, або підтримують їх у парах за допомогою солевих містків. Конформація  $R_2 - C_4 - D_4$  має спільний з конформацією  $R_1 - C_4 - D_0$  характерний солевий місток К16-Е22. На противагу цьому, конформація  $R_2 - C_3 - D_3$  має К16-D23 солеві містки. Обидві конформації були протестовані в симуляціях методом молекулярної динаміки на протязі 8*нс*, які виявили стабільні траєкторії, що добре підтримували початкову структуру β-листа.

Щоб розрізнити конформації, які здаються однаково стабільними в симуляціях, ми оцінюємо їх відносну вільну енергію. Для таких складних сполук, як фібрили, неможливо точно розрахувати різницю вільної енергії, як це було зроблено для димеру β-нитки. Тому тут ми вдаємося до наближення. Для оцінки вільної енергії моделей фібрил використовується поєднання узагальненої моделі Борна(GB) для електростатичної частини вільної енергії сольватації з моделлю площі поверхні, яка доступна розчиннику (SA) для неполярної частини. Більш докладний опис схеми GB/SA наведено в розділі "Методи та моделі".

Оскільки ми не можемо повністю врівноважити модельовані системи у глобальному масштабі, нам необхідно досягти локальної рівноваги для оцінки вільної енергії. За умови, що початкові конфігурації досить близькі до рівноважних станів, локальні оцінки, отримані з симуляцій, забезпечують добре уявлення про глобальну вільну енергію. Щоб проконтролювати, як швидко настає рівновага, ми розглядаємо загальну вільну енергію як функцію часу. Два приклади таких часових залежностей показані на Рис. 6.18(а) для конформацій  $R_1 - C_4 - D_0$  і  $R_2 - C_4 - D_4$ . Видно, що ці дві криві мають спільну поведінку: спочатку спостерігаються відносно високі значення (відображення того, що початковий стан не врівноважений), які швидко досягають плато, де вони залишаються протягом решти часу симуляції. Довжина цієї фази швидкої стабілізації залежить від моделі фібрили і становить ~ 1*нс* для конформації  $R_1 - C_4 - D_0$  та ~ 2*нс* для моделі  $R_2 - C_4 - D_4$ . Щоб визначити вільну енергію локально урівноважених станів, *G* усереднюється по ділянці плато. Як показує Рис. 6.18(а), час усереднення залежить від конкретної моделі фібрили. Загалом, для оцінки вільних енергій та їх похибок було обрано 100 конфігурацій, розташованих рівномірно всередині інтервалу усереднення. Отримана в результаті цього вільна енергія, розділена на компоненти, наведена на Рис. 6.18(b) для моделі  $R_1 - C_4 - D_0$ . Видно, що електростатична частина є майже на два порядки більшою за дві інші частини і тому повністю переважає в загальній вільній енергії.

Оцінка вільної енергії для групи структур R2,  $R_2 - C_4 - D_4$  та  $R_2 - C_3 - D_3$  (див. Рис. 6.17), показує, що остання - вища у вільній енергії приблизно на  $\Delta G = 30kCal/mol$ . Тому ми зосередимось на структурі  $R_2 - C_4 - D_4$  як найбільш стійкій моделі амилоїду в регістрі R2. На Рис. 6.18(а) порівнюється вільна енергія цієї структури з вільною енергією моделі  $R_1 - C_4 - D_0$ , яка є найбільш вірогідною для фібрил у регістрі R1. Зрозуміло, що регістр R1 більш стійкий при рН=7 і що різниця вільної енергії між двома конкуруючими структурами є ста-



**Рис. 6.18** Оцінки вільної енергії, отримані для структур  $\beta$ -листів у регістрі 1 та регістрі 2 при pH=7. У а) показана часова залежність *G* для  $R_1 - C_4 - D_0$  і  $R_2 - C_4 - D_4$ . Вільна енергія оцінюється як середнє по виділених районах плато. Величина різних компонентів у вільній енергії  $R_2 - C_4 - D_4$  ілюструється на b).

тистично значимою. При розкладі на частини отримуємо:  $\Delta G = G_2 - G_1 = 143 \pm 16 \text{ kCal/mol}, \Delta \Delta G_{el} = 187 \pm 8 \text{ kCal / mol}, \Delta U_{vdw} = 28 \pm 6 \text{ kCal / mol}$  Ta  $\Delta\Delta G_{np} = -72 \pm 52 k Cal/mol$ . Статистичні похибки в цих виразах оцінювалися, припускаючи, що конформації, з яких виводили середню величину, є статистично незалежними. Очевидно, що в нашому наносекундному масштабі симуляцій це не так. Щоб краще оцінити похибки, ми провели ще дві симуляції для структур  $R_1 - C_4 - D_0$  і  $R_2 - C_4 - D_4$ , використовуючи дещо інші початкові структури. Ці симуляції (дані не показані) вказують на те, що загальна різниця вільної енергії  $\Delta G \in$  відтворюваною, з оціненою похибкою, яка збільшується від 16 ккал/моль до 20 ккал/моль в проведених додаткових тестах. Ми також виявили, що індивідуальні компоненти вільної енергії піддаються більшим коливанням, ніж їхня сума, що є зрозумілим. Ми вважаємо, що похибка в електростатичній частині ∆∆G<sub>е</sub> збільшується приблизно до 30 ккал/моль. Але навіть з таким збільшенням, різниця енергії між R1 і R2,  $\Delta\Delta G_{el} = 187 k Cal / mol$ , залишається статистично значущою. На підставі Рис. 6.18(а) ми дійшли до висновку, що конформація з найнижчою вільною енергією для фібрили Ав11-25 при pH=7 містить в-листи в регістрі 1.

#### 6.2.2.3. Модель фібрили для рН=2

На відміну від нейтрального pH, при pH=2 карбоксильні групи глутамінової кислоти (залишки E11 та E22), аспарагінової кислоти (залишок D23) та C-кінці стають нейтральними. Одночасно, залишки гістидину H13 і H14 стають протонованими і, разом з K16 і N-кінцем, стають єдиними зарядженими групами в пептиді. Важливим є те, що ці групи мають один і той же заряд +1, і тому вони не можуть утворювати солеві містки всередині фібрили, як описано в попередніх розділах для pH=7. Отже, одне з обмежень, які ми використовуємо для побудови моделей фібрил, усувається. Однак, друге обмеження, яке вимагає, щоб заряджені залишки знаходилися в контакті з розчинником, залишається незмінним.

Відсутність солевих містків приводить до дегенерації при pH=2. Ми дослідили всі чотири групи стекінгу C1-C4 з регістром 1 і знайшли лише 4 конформації, які потенційно можуть задовільнити це обмеження. Це - конформації  $R_1 - C_4 - D_0$ ,  $R_1 - C_4 - D_{-2}$ ,  $R_1 - C_1 - D_5$  та  $R_1 - C_1 - D_7$ , схематично зображені на **Рис. 6.19.** Усі чотири моделі були просимульовані на протязі 8*нс* використовуючи протокол, описаний у попередніх розділах. Аналіз вільної енергії вказує на те, що найбільш стабільними є  $R_1 - C_4 - D_{-2}$  та  $R_1 - C_1 - D_5$ , чиї вільні енергії статистично не відрізняються. Вільна енергія двох інших станів вища на 44кКал/моль для  $R_1 - C_4 - D_0$  та на 56кКал/моль для  $R_1 - C_1 - D_7$ . Існування двох станів з однаковою вільною енергією здається спочатку дивним, з урахуванням великих очеви-



Рис. 6.19 Схеми конфігурацій з регістром 1, що розглядалися як моделі фібрил при pH=2. Немає негативно заряджених залишків, а отже і солевих містків. МД симуляції та обчислення вільної енергії показують, що структура  $R_1 - C_4 - D_{-2}$  є найбільш стійкою та відрізняється від структури  $R_1 - C_4 - D_0$ , яка вважається найбільш стійкою при pH=7.

дних відмінностей між цими станами, як видно з Рис. 6.19(b) та (c). Однак, більш глибокий розгляд показує, що  $R_1 - C_4 - D_{-2}$  та  $R_1 - C_1 - D_5 \epsilon$  схожими. Ці конформації можуть переходити одна в одну шляхом зсуву одного з двох β-листів (див. Рис. 6.13) вздовж осі фібрили (напрямок зсуву не має значення). Як показує **Рис. 6.19**, все, що спричиняє зсув, - це тонка перебудова інтерфейсних контактів, які в основному є гідрофобними за своїм характером. Звернемо увагу, що такий зсув був би неможливим в  $R_1 - C_4 - D_0$  при pH=7, оскільки це спричинило б порушення роботи солевих містків K16-E22. З наших розрахунків слідує, що або конформації  $R_1 - C_4 - D_{-2}$  і  $R_1 - C_1 - D_5$  дійсно мають однакову вільну енергію, або так лише видається через наближене врахування гідрофобних взаємодій в нашому моделюванні. В межах точності нашої моделі ці конформації ідентичні. Надалі ми обмежимо наш аналіз лише однією з них,  $R_1 - C_4 - D_{-2}$ .

Вимоги до моделі фібрил з регістром  $17+k \leftrightarrow 22-k$  (**R2**). Ми виявили, що в загальному 7 моделей з регістром R2 можуть задовольнити обмеження на заряджені залишки. Дві з цих моделей,  $R_2 - C_4 - D_0$  та  $R_2 - C_4 - D_2$ , показані на **Рис. 6.20**. У порівнянні з  $R_2 - C_4 - D_0$ , конформація  $R_2 - C_4 - D_2$  формує кращі гідро-



**Рис. 6.20** Схеми конфігурацій з регістром 2, які пропонуються як найбільш стійкі при pH=2. Вільні енергії для цих станів ідентичні в межах статистичних похибок.

фобні контакти, можливо, використовує  $\pi - \pi$  взаємодії між бічними ланцюгами F19 і F20, але може бути більш обмеженою з точки зору доступу бокових ланцюгів K16 до води. Всі сім моделей демонстрували стійкі 8*нс* траєкторії, в яких вони зберігали початкову структуру  $\beta$ -листа та відображали інші характеристики амилоїдних фібрил.

Аналіз досліджених структур показує, що пари конформацій  $R_2 - C_4 - D_0$  - $R_2 - C_1 - D_5$ ,  $R_2 - C_4 - D_2 - R_2 - C_1 - D_3$  і  $R_2 - C_4 - D_4 - R_2 - C_1 - D_1$  мають однакові вільні енергії в межах статистичних похибок. Ці конформації пов'язані одним і тим же структурним перетворенням, що було обговорено для моделей з регістром 1. Тому ми обмежимось лише групою С4. Ми виявили, що серед конформацій  $R_2 - C_4 - D_0$ ,  $R_2 - C_4 - D_2$  та  $R_2 - C_4 - D_4$  остання має приблизно на 100 кКал/моль вище значення вільної енергії, ніж дві попередні, і тому в подальшому аналізуватися не буде. Вільні енергії  $R_2 - C_4 - D_0$  та  $R_2 - C_4 - D_2$  не відрізняються в межах статистичної похибки. Загалом, це не дивно, зважаючи на те, що дві структури тісно пов'язані між собою, та те, що основними силами їхньої стабілізації є неспецифічні гідрофобні взаємодії, що містять два β-листи в цих моделях. Проте, більш детальний аналіз кінцевих конформацій, спостережуваних для цих структур, показав, що один з їх β-листів обернений відносно іншого βлиста приблизно на 20°. Така конформація не відповідає структурі фібрили. Щоб перевірити, чи може поворот вплинути на структуру моделей у значній мірі або змінити рівень вільної енергії, було досліджено модель, яка містить 16 пептидних ланцюгів в β-листі (загалом 32 ланцюга). Початкові конформації моделей  $R_2 - C_4 - D_0$  та  $R_2 - C_4 - D_2$  були побудовані та просимульовані так само, як описано в попередніх розділах. Симуляції тривали 6нс і повторювались двічі, щоб перевірити збіжність. Ми виявили, що обертання β-листа, що спостерігається в моделі з 16-ма ланцюгами, більше не спостерігається в моделі з 32-ма ланцюгами. Але стани

 $R_2 - C_4 - D_0$  і  $R_2 - C_4 - D_2$  як і раніше демонструють однакову вільну енергію. Отже, або фібрили Аβ11-25 характеризуються справжнім структурним поліморфізмом при pH=2, або наша модель вільної енергії недостатньо точна, щоб виявити різницю між двома альтернативними станами. Ми схиляємось до першого випадку і зосереджуємо подальший аналіз на одній з еквівалентних структур,  $R_2 - C_4 - D_0$ .



Рис. 6.21 Порівняння вільної енергії станів  $R_2 - C_4 - D_0$  і  $R_1 - C_4 - D_{-2}$ ,які були ідентифіковані як найбільш стійкі структури в регістрі 2 і 1 відповідно при рH=2. Вставка показує, що вільна енергія моделі регістру 2 є меншою на 118кКал/моль.

Структура з найнижчою вільною енергією при pH=2 має регістр (R2). Крім моделі  $R_2 - C_4 - D_0$  було проведено оцінку вільної енергії для найбільш стійкої структури R1 32-ланцюгової моделі  $R_1 - C_4 - D_{-2}$ . Це дозволяє провести безпосереднє порівняння вільної енергії між двома конкуруючими структурами, як показано на Рис. 6.21. Видно, що часові залежності дуже схожі на ті, що розглядалися на Рис. 6.18: швидке спадання, за яким слідує плато. Середнє значення встановлювалося з поміж останніх 40 структур, обраних для аналізу, як показано на вставці з Рис. 6.21. Очевидно, що регістр 2 є більш стабільним в двох структурах. Відповідна різниця вільної енергії  $\Delta G = G_2 - G_1 = -118 \pm 27 \, kCal \, mol$ компоненти  $\Delta\Delta G_{el} = -146 \pm 15 \, kCal \, / \, mol$ , може бути розкладена на  $\Delta U_{vdw} = 157 \pm 10 \, kCal \, / \, mol$  та  $\Delta \Delta G_{np} = -129 \pm 3 kCal \, / \, mol$ . Аналіз різниці вільної енергії, отриманої за допомогою 16-ланцюгової моделі, дає схожі результати.

Зображення останньої конформації моделі  $R_2 - C_4 - D_0$  показані на Рис. 6.22. Модель має багато структурних властивостей, таких як кручення та гідрофобне ядро, спільних з моделлю  $R_1 - C_4 - D_0$ , яка була отримана при pH=7. Перший βлист структури з двох β-листів завершує симуляції практично без змін. В останню наносекунду, залишки Q15-V24 були виявлені в стані β-листа більше ніж в 90% часу. Кількість залишків у конфігурації β-листа на 2 одиниці менша, ніж при pH=7. Це повністю відповідає регістру моделі  $R_1 - C_4 - D_0$ . Карта ймовірностей водневого зв'язку, отримана в симуляціях, узгоджується з аналізом вторин-



Рис. 6.22 Структура найбільш стійкої моделі ( $R_2 - C_4 - D_0$ ), яку встановлено у цій роботі для фібрили Аβ11-25 при pH=2. Остання конформація з 6*нс*симуляції показана в (а), (b) та (c). Вид збоку (b) ілюструє упаковку бічного ланцюга на міжлистовому інтерфейсі. Гідрофобне ядро висвітлено в (c). Деталі бічних ланцюгів К16 показана на (d). β-листи розташовані в антипаралельному положенні з контактами F19-L17, що знаходяться на інтерфейсі.

ної структури, та свідчить про сильні зв'язки між залишками Q15 та V24. Важливо, що між C- та N-кінцями немає водневого зв'язку, як це було для структури  $R_1 - C_4 - D_0$  при pH=7.

Як і модель  $R_1 - C_4 - D_0$  при pH=7, модель  $R_2 - C_4 - D_0$  при pH=2 має повністю сольватовані краї. Міру проникнення води показано на **Рис. 6.22**(b). Єдина частина у фібрилі, захищена від розчинника, містить щільно упаковані бічні ланцюги L17-E22. Ці залишки утворюють гідрофобне ядро, яке виділено на **Рис. 6.22**(c). Цікаво, що ядро повністю обезводнене навколо контактів F19-L17 та F20-E22, тоді як контакти Q15-A21 та V18-V24 частково сольватовані. Бокові ланцюги K16 повністю розчиняються у воді після завершення формування структури. Деталь сольватованої конфігурації показана на **Рис. 6.22**(d). Видно, що вода вільно протікає навколо заряджених аміногруп K16. У просторі, утвореному між K16 i V18 та між D23 i A21, спостерігається низка впорядкованих молекул води, що утворюють 1-D водяну струну. Значення цього спостереження на сьогодні не є зрозумілим.

#### 6.2.3. Фактори що контролюють регістр фібрил

Основна структурна відмінність фібрил А $\beta$ 11-25, утворених при різних pH, полягає в регістрі їх  $\beta$ -листів. Зокрема, при pH=7 залишки 17+k однієї  $\beta$ -нитки вирівнюються з залишками 20-k сусідньої  $\beta$ -нитки, утворюючи регістр  $17+k \leftrightarrow 20-k$  (R1). При pH=2 регістр змінюється на  $17+k \leftrightarrow 22-k$  (R2), як показано на Рис. 6.11(а)-(b). Коли pH знижується, деякі іонізовані групи змінюють значення заряду, таким чином, впливаючи на взаємодію між  $\beta$ -нитками. Зміна балансу в електростатичних взаємодіях приводить до зсуву регістру. Може статися, що локальні взаємодії, що діють між двома сусідніми  $\beta$ -ланцюгами в  $\beta$ -листі, викликають цей структурний перехід. Щоб перевірити, чи це так насправді, ми оцінили відносну вільну енергію формування  $\beta$ -нитки димера в регістрі R1 і R2 і виявили, що регістр R1 більш стійкий як в нейтральному, так і кислому

середовищі. Як видно з Рис. 6.11, R1 дозволяє утворити на два міжниткових водневих зв'язків більше, ніж регістр R2, і, таким чином, отримує перевагу від взаємодії водневих зв'язків. Ці результати дозволяють стверджувати, що регістр  $\beta$ листів у фібрилах A $\beta$ 11–25 визначається дальними або глобальними, а не локальними взаємодіями між пептидами. Важливим наслідком цього твердження є те, що при кислотному pH невеликі олігомерні сполуки, що передують утворенню фібрил, будуть затримуватися в неправильному регістрі. Це може мати кінетичні наслідки для росту фібрил, тому що олігомерні проміжні сполуки будуть змушені попередньо дисоціювати, або відокремитися від фібрил, тим самим сповільнюючи загальний процес. Наше моделювання вказує на те, що, крім структури фібрил, різний рівень pH також впливає на механізм фібрилізації.

Щоб пояснити, які глобальні взаємодії пептидів впливають на визначення регістру, ми побудували амилоїдні моделі, що складаються з двох стекованих  $\beta$ листів, що відповідає наступному рівню структурної організації фібрил після димерів  $\beta$ -нитки. Симуляції цих моделей показують, що найбільш стійка структура при рH= 7 має антипаралельну конфігурацію зі стекінгом типу фронт-фронт з залишками F19 на одному  $\beta$ -листі, що

kCal/mol	pH=7	pH=2
$\Delta G = G_1 - G_2$	143±16	-118±27
$\Delta\Delta G_{el}$	187±8	-146±15
$\Delta U_{_{vdw}}$	28±6	157±10
$\Delta\Delta G_{np}$	-72±2	-129±3

**Таб. 6.1** Компоненти вільної енергії для найбільш стійкої конформації з регістром 1 та 2 при кислотному і нейтральному рН.

утворюють контакти з залишками L17 на іншому  $\beta$ -листі. Регістр цієї структури — 17 +  $k \leftrightarrow 20 - k$  (R1), який добре узгоджується з експериментом. При pH= 2,

структури в одній і тій же конфігурації стекінгу і з контактами за участі F19, L17 або F20 виявляються найбільш стійкими. Знову ж таки, прогнозований регістр  $17 + k \leftrightarrow 22 - k$  (R2) добре узгоджується з експериментом, виправдовуючи застосування використаного обчислювального методу. За наявності мікроскопічних конформацій фібрил Аβ11-25 (в межах точності використаної моделі), можна зрозуміти, які взаємодії контролюють їх збірку.

Ми виявили, що при низькому та нормальному рівні рН, отримані структури виявляють великі кластери щільно упакованих неполярних залишків або гідрофобні ядра, що є особливою характеристикою амилоїдних фібрил[238]. У наших симуляціях вода витісняється з ядер фібрил через гідрофобний ефект тоді як їхні краї сольватовані. Отримана поверхня поділу між β-листами є незмоченою в центральній частині фібрили. Ця особливість є характерною і для моделі стеричного зшиття амилоїдів, запропонованої на основі кристалографічних досліджень коротких амилойдогенних послідовностей [430]. Проте, на відміну від цієї моделі, ми не бачимо взаємного проникнення залишків на поверхні поділу. Видно, що гідрофобні залишки з різних  $\beta$ -листів утворюють дегідратовані контакти, але ми не спостерігали закономірності проникнення бічних ланцюгів на одному  $\beta$ -листі в проміжок між бічними ланцюгами протилежного  $\beta$ -листа, що відповідає стеричному зшиванню. З наших результатів незрозуміло, чи фрагмент А $\beta$ 11-25 не утворює стеричного зшивання, чи наші симуляції не були достатньо довгими для їх спостереження.

При нейтральному pH, заряджені залишки E22 і K16 відіграють значну роль у визначенні структури фібрили. Конфігурація з регістром R1, яка містить солеві містки E22-K16, виявляється єдиною стабільною структурою, яка не розпадється впродовж наносекундної симуляції. Для регістру R2 існують дві конфігурації з солевими містками, однак та, що містиь контакт E22-K16 є більш стабільною. Коли pH змінити на кисле, заряджений залишок E22 стає нейтральним, таким чином, нівелюючи вигідний ефект солевого містку. Як наслідок, вплив електростатичних сил зменшується, тоді як вплив інших видів взаємодій, таких як гідрофобні та дисперсійні сили, збільшується. Для кількісної оцінки впливу різних взаємодій ми досліджуємо різницю вільної енергії  $\Delta G = G_2 - G_1$  між структурами

R2 і R1. Три різні компоненти  $\Delta G$  представлені в **Таб. 6.1** при pH= 2 та 7. Видно, що при pH= 7 більш стійка структура R1 стабілізується електростатичними силами, а також ван-дер-Ваальсовою взаємодією. Стабілізуючий ефект електростатичних взаємодій узгоджується з недавнім моделюванням Тірумалая та ін. для іншого фрагмента Aβ[436]. Також видно, що конформація регістру 2 забезпечує кращу гідрофобну взаємодію. При pH= 2 вклади різних компонентів вільної енергії, в більшій частині, відповідають тим, що спостерігаються при pH= 7. ван-дер-Ваальсові сили сприяють структурі R1, гідрофобні сили - конформації R2, з чого ми робимо висновок, що ці короткосяжні взаємодії в основному задаються геометрією конкретного регістру. З іншого боку, електростатичні сили змінюються істотно в залежності від pH середовища. Це не дивно, оскільки зміна pH впливає на розподіл зарядів іонізованих груп.

Хоча електростатичні сили сприяють найбільш стабільному стану при нейтральному і низькому pH, їх відносний внесок відрізняється у цих двох середовищах. При pH= 7  $\Delta\Delta G_{el}$  повністю переважає загальну вільну енергію  $\Delta G$ . Також  $\Delta\Delta G_{el}$  у 6 разів перевищує вклад ван-дер-Ваальсових взаємодій і у 2 рази - неполярні взаємодії. Значною мірою  $\Delta\Delta G_{el}$  визначає регістр при pH= 7.

Всі три компоненти вільної енергії,  $\Delta\Delta G_{el}$ ,  $\Delta U_{vdw}$  та  $\Delta\Delta G_{np}$ , мають порівняно однакові значення при pH= 2. Отже, регістр визначається делікатним балансом між різними дальними взаємодіями. Той факт, що  $\Delta\Delta G_{el}$  є настільки великим при pH=7, робить його зручною мішенню для керованих маніпуляцій, що мають на меті зміну загальної різниці вільної енергії і тим самим зміщенню балансу між фібрилами різних регістрів. Яскравим результатом з **Таб. 6.1** є зміна знаку, коли pH знижується від нейтрального до кислого. Відомо, що зміна pH змінює розподіл заряду шести іонізуючих груп у первинній послідовності Аβ11-25, C-кінці, E11, E22, H13, H14 та D23. Ми також знаємо, що кінцевим результатом цієї зміни є те, що  $\Delta\Delta G_{el}$  сприяє регістру 2 замість регістру 1. Чи може таке бути, що де-

які групи зарядів у шести задіяних залишках впливають на  $\Delta\Delta G_{el}$  більше, ніж інші? Це запитанням є дуже актуальним в контексті з'ясування будови фібрилу. Зміна розподілу заряду головних залишків через мутації дозволить спроектувати послідовність, яка може формувати фібрили регістру 2 при pH=7 замість фібрил регістру 1. Відповідь на це запитання, також допоможе пояснити роль різних залишків у визначенні регістру в фібрилах Аβ11-25.

Наявність траєкторій моделей фібрил для pH=7 і pH=2 робить можливою перевірка вкладу різних заряджених груп у  $\Delta\Delta G_{el}$ . Ми провели тести шляхом присвоювання залишкам нетипових зарядів, відповідно, нейтральним для глутамінової кислоти, і +1 для гістидинів при pH=2, для конформацій отриманих у наших симуляціях при pH=7 і 2. Назвемо залишки із зміненим значенням заряду умовно "мутованими", хоча жодна фактична мутація не відбувається. Для мутованої E22, використовувались конформації, отримані при pH=2, тоді як для всіх інших - конформації, отримані при pH=7 з неушкодженим солевим містком E22-K16.

Group	WT	C-term	E11	E22	D23	H13	H14
$\Delta\Delta G_{el}$ , kCal/mol	187	-148	268	12	428	90	207

**Таб. 6.2** Результати сканування заряду іонізованих груп. Оцінки  $\Delta\Delta G_{el}$  для відповідних залишків конформацій в регістрі 1 і 2 при рН=7.

Зазначимо, що наша процедура наближена, і в найкращому випадку може описати лише якісний ефект конкретної мутації. Отримані передбачення потрібно перевірити в реальних симуляціях. **Таб. 6.2** показує нашу оцінку впливу зміни заряду кожної конкретної групи на  $\Delta\Delta G_{el}$ . Помітно, що мутація E22 приводить до дуже сильної зміни  $\Delta\Delta G_{el}$  в порівнянні з WT послідовністю. Це доволі оічуваний наслідок ролі залишка E22 в стуктурі фібрили, що була описана в попере дніх розділах. Дуже несподіваний результат це те, що лише одна група з шести, заряд на С-кінці, приводить до зміни знаку  $\Delta\Delta G_{el}$  таким чином роблячи структуру R2 більш стабільною при pH=7. Щоб знайти механічне пояснення цього ефекту, ми дослідили взаємодії С-кінцевого заряду в структурі R1 при pH=7. Контакти з бічними ланцюгами інших залишків показали особливо сильну взаємодію між С- та Nкінцевими групами, що належать до двох сусідніх β-ниток. Існує лише одна така взаємодія на кожну пару



Рис. 6.23 Даний рисунок пояснює, як зв'язки кінців С- та N- сприяють стійкості структур R1 при pH=7. Завдяки геометричним обмеженням такі зв'язки не можуть утворитися в структурах R2. Коли група С-кінців нейтралізується, перевага конфігурації R1 зникає.

 $\beta$ -ниток, і вона почергово виникає уздовж  $\beta$ -листа. Дуже ймовірно, що ця взаємодія відіграє важливу роль у визначенні регістру фібрилу. Оскільки  $\beta$ -нитки в регістрі 2 переміщаються на два залишки один вздовж одного відносно регістру 1, це не дозволяє утворювати зв'язок між C- та N-кінцевими групами. На Рис. 6.23 пояснюється геометрична різниця між R1 і R2  $\beta$ -листами. Видно, що в двох конкуруючих структурах R1 і R2 присутність зв'язку C-N зміщає баланс в сторону першої. Відсутність C-N взаємодії робить конформацію R2 менше стабільною. Так свідчать дані з **Таб. 6.2**, отримані на підставі гіпотетичних експериментів зі сканування заряду. Чи підтвердяться ці висновки в реальних симуляціях?

Щоб відповісти на це питання були проведені дві додаткові симуляції, в яких перевірявся ефект нейтралізації С-термінального заряду на  $\Delta G$ . Було побудовано конформації  $R_1 - C_4 - D_0$  та  $R_2 - C_4 - D_4$ , в яких нейтралізуюча аміногрупа NH2 була додана до С-кінця. Симуляції були виконані на протязі 8*нс*. Отримана різ-

ниця вільної енергії представлена в **Таб. 6.3**, разом з даними, отриманими для дикого типу послідовності. Порівняння двох наборів даних показує, що основним ефектом нейтралізації С-кінця є електростатичний компонент вільної енергії. Хоча  $\Delta\Delta G_{el}$  не змінює свій знак, як передбачено в скануючому тесті, його величина зменшується більш ніж у 3 рази. З більш сприятливими гідрофобними взаємодіями в мутованій послідовності в порівнянні з вихідним пептидом, -106 ккал/моль проти -72 ккал/ моль, загальна різниця вільної енергії  $\Delta G$  стає негативною, сигналізуючи, що структура R2 є більш стабільною. Наша гіпотеза про критичну роль заряду С-кінця, схоже, є правильною: наявність цього заряду схиляє структурний баланс в бік регістру R1 при pH=7. На підставі цих результатів ми передбачаємо, що Аβ11-25 пептид з нейтралізованим С-кінцем збиратиметься у фібрили з регістром 2 при pH=7. Цей прогноз піддається експериментальній перевірці.

#### 6.2.4. Методи та моделі

#### 6.2.4.1. Ісрархічна архітектура амилоїдних фібрил.

Хоча всі амилоїдні фібрили істотно відрізняються за своїми розмірами та мікроскопічним виглядом, вони мають кілька спільних структурних елементів[238]. По-перше, Рентгенівська дифракція показує, що всі фібрили багаті на перехресну  $\beta$ - структуру; вони складені з  $\beta$ -листів, в яких  $\beta$ -нитки перпендикулярні осі фібрилу, тоді як водневі зв'язки, що зв'язують  $\beta$ -нитки, пролягають паралельно до неї. Відстань між двома сусідніми  $\beta$ -нитками становить 4.7-4.8Å. По-друге, два або більше  $\beta$ -листа об'єднуються, щоб утворити стержнево-подібні структури з розміром 25-30Å впоперек, відомі як протофіламенти. Відстань між  $\beta$ листами у протофіламенті змінюється залежно від розміру бічних ланцюгів амінокислот, що лежать на границі між двома листами. По-третє, фібрили, як правило, складаються з декількох протофіламентів, що утворюються навколо загальної осі. На Рис. 6.11(с) показано схематичне зображення ієрархічної організації амилоїдних фібрил до рівня протофіламентів.

Фрагмент Аβ11-25 β-амилоїдного пептиду з послідовністю амінокислот EVHHQKLVFFAEDVG утворює фібрили, які відповідають ієрархічній моделі амилоїду. Електронна мікроскопія та Рентгенівська дифракція[250; 437]показали що, цей пептид виростає у прямі, нерозгалужені, стрічкові волокна з періодичною модуляцією, що вказує на поворот вздовж довгої осі. Вимірювання методом твердотільного ЯМР дозволяють спостерігати водневі зв'язки між β-нитками. З допомогою цих вимірю-

kCal/mol	CONH <sub>2</sub>	COO	
	terminal	terminal	
$\Delta G = G_2 - G_1$	-24±18	143±16	
$\Delta\Delta G_{el}$	40±9	187±8	
$\Delta U_{vdw}$	41±6	28±6	
$\Delta\Delta G_{np}$	-106±3	-72±2	

**Таб. 6.3** Різниця вільної енергії між станами в регістрі R2 і R1 в Аβ11-25 з нейтралізованими Скінцями.

вань, було визначено, що фібрили складаються в основному з β-листів у антипаралельному розташуванні. Більше того, було виявлено, що при pH=7 залишки 17+k однієї β-нитки вирівнюються з залишками 20-k наступної β-нитки, утворюючи регістр  $17+k \leftrightarrow 20-k$  або R1, згідно з позначеннями даної роботи. При pH=2 β-листи залишаються антипаралельними, але їх регістр змінюється на  $17+k \leftrightarrow 22-k$  або R2. Мікроскопічні деталі двох регістрів пояснені на Рис. 6.11(a)-(b). R1 і R2 відображають різні схеми міжниткових водневих зв'язків, зокрема максимальну кількість дозволених зв'язків. Взаємодії бічних ланцюгів відрізняються як на рівні β-листа, так і в контексті фібрили. Є й інші характеристики, за якими відрізняються різні регістри, такі як захищеність бічних ланцюгів амінокислот від розчиннику. Точна мікроскопічна структура фібрил Аβ11-25 залишається невідомою.

#### 6.2.4.2. Побудова обчислювальних моделей фібрил

Ми використовуємо атомне представлення для моделювання пептидів та води в усіх наших симуляціях. Для моделі взаємодії між атомами пептиду застосовано силове поле OPLS/AA з фіксованим зарядом[307], а для моделювання води використовувався потенціал TIP3P[33]. Всі симуляції виконувалися за допомогою програмного комплексу GROMACS[423; 424]. Ковалентні зв'язки молекул води утримувались незмінними згідно алгоритму SETTLE [327]. Зв'язки, що включають водень пептиду, були обмежені відповідно до протоколу LINCS [326]. Крок інтеграції був  $2\phi c$ . Далекосяжні взаємодії Ленард-Джонса були спрямовані до нуля на відрізку від 7 до 8 Å. Списки сусідів для далекосяжних взаємодій оновлювалися кожні 10 симуляційних кроків.

#### 6.2.4.3. Обчислення вільної енергії для двох антипаралельних *β*-ниток

Для обчислення відносної вільної енергії формування  $\beta$ -ниткового димеру в регістрах R1 і R2 ми використовуємо метод парасолькової вибірки[427] у поєднанні з мульти-гістограмним аналізом [306; 428]. Початкові конформації пептидів були побудовані в ідеальній антипаралельної конформації  $\beta$ -листа зі значеннями -119 та 113 для  $\phi$  та  $\psi$  кутів відповідно[438]. Вісім іонів C1 були додані до системи при pH=2 і чотири іони Na при pH=7, щоб зробити загальний заряд нульовим. Для обчислення електростатичних взаємодій використовувався метод Евальда[329]. Термостат Нозе-Гувера[328] застосовувався для підтримання температури в наших симуляціях близько 300К.

Спочатку пептиди були поміщені в конфігурацію  $\beta$ -листа; їх С $\alpha$  лежали в площині *X-Y*, а міжлистові водневі зв'язки проходили паралельно осі *Z*. Координати С $\alpha$  одного з двох пептидів, нижньої  $\beta$ -нитки, були обмежені близько їх початкових значень, використовуючи гармонічні потенціали з константою сили  $10^4$  кДж/моль/нм<sup>2</sup>. Гармонічні обмеження уздовж *X*- і *Y*-напрямків також застосовуються до С $\alpha$  другого пептиду, верхньої  $\beta$ -нитки, що обмежує дозволений

рух лише вздовж осі Z Крім того, до верхньої β-нитки застосовувалось кутове обмеження, призначене для збереження вектора, сформованого С $\alpha$  з E11 і G25, приблизно перпендикулярним вертикальній осі. Отримані конформації остова верхньої β-нитки були паралельні нижній β-нитці. Ідентичні набори обмежень були застосовані в нейтральному та кислотному середовищі, щоб виключити вплив різних умов симуляцій на отримані результати. Парасолькові потенціали накладались на відстані між центрами маси атомів С $\alpha$  у двох β-нитках. Сили, що виникають внаслідок цих потенціалів, були рівномірно розподілені між усіма атомами С $\alpha$ . Розглянуто 19 різних вікон уздовж осі Z, починаючи з 4Å, що розміщені на відстані 0.5Å один від одного. Однакова константа сили 2х10<sup>4</sup> кДж/моль/нм<sup>2</sup> використовується для всіх вікон. Симуляції під дією парасолькових потенціалів були проведені на протязі 5*нс*. Отримані гістограми перевірялись на достатнє перекриття перед обчисленням потенціалів середньої сили.

# 6.2.4.4. Симуляція β-листових моделей фібрил.

Ми використовували той самий протокол, що і в наших розрахунках вільної енергії, для проведення короткого моделювання запропонованих моделей фібрил. Початкові конформації будувались наступним чином. Спочатку пептиди були розміщені в ідеальній антипаралельній конфігурації  $\beta$ -листа. Далі вони були переміщені на 4.8Å, щоб утворити  $\beta$ -лист із восьми (або 16) пептидів. Другий  $\beta$ -лист був скопійований з першого  $\beta$ -листа, а потім переміщений на 8Å і обернений при потребі. Моделі були сольватовані у прямокутних комірках з водою, вимагаючи, щоб молекули води не знаходилися в їхньому внутрішньому просторі. Симуляційні комірки були вибрані таким чином, щоб забезпечити буферний шар води між пептидами та межами комірки товщиною щонайменше 10Å. Розміри комірок змінювалися для кожної моделі. Типовий розмір складав 9х6х6*нм* для комірок що містили моделі з 16 ланцюгами. Моделі з 32 пептидами були приблизно вдвічі довшими. Початкові конфігурації були врівноважені на протязі щонайменше 20*nc* з фіксованими С $\alpha$  атомами. Після врівноважування,

слідували декілька результативних симуляцій без обмежень тривалістю 4*нс*. Подібно до температура, тиск в цих симуляціях також зберігався сталим, P = 1атм. Електростатичні взаємодії розраховувалися методом реакційного поля[439; 440]. Для досягнення кращих характеристик гідратації заряджених груп, обрізання потенціалів відбувалось на основі атомних відстаней для молекул води та групових відстаней - для пептидів[441]. В усіх симуляціях радіус обрізання потенціалу складав 12 Å.

# 6.2.4.5. Оцінка вільної енергії В-листів

Для того, щоб диференціювати багато моделей фібрил, отриманих у цьому дослідженні, ми оцінюємо їх відносну вільну енергію. Почнемо з загального виразу для вільної енергії білка в станіг:

$$G(\Gamma) = U(\Gamma) + \Delta G(\Gamma) - TS(\Gamma)$$
(6.1)

де  $U(\Gamma)$  - це внутрішня енергія білка у вакуумі, T – температура,  $S(\Gamma)$  - ентропія пов'язана зі станом  $\Gamma$  та  $\Delta G(\Gamma)$  - вільна енергія сольватації. Стан  $\Gamma$  в цих позначеннях відповідає розподілу білкових конформацій, а не одиничним конформаціям. Два компоненти з рівняння (6.1) можна додатково розкласти на більш елементарні доданки:  $U(\Gamma) = U_{vdw}(\Gamma) + U_{el}(\Gamma)$ , де  $U_{vdw}(\Gamma)$  та  $U_{el}(\Gamma)$  - ван-дер-Ваальсові та електростатичні взаємодії між атомами білка відповідно;  $\Delta G(\Gamma) = \Delta G_{pol}(\Gamma) + \Delta G_{np}(\Gamma)$ , де  $\Delta G_{pol}(\Gamma)$  - вільна енергія електростатичної або полярної сольватації і  $\Delta G_{np}(\Gamma)$  - неполярної або гідрофобної сольватації. У цій роботі ми ігноруємо ентропійну змінну у виразі (6.1). Хоча величина  $S(\Gamma)$ , безумовно, важлива, ми очікуємо, що вона буде однаковою для аналогічних моделей фібрил, які відрізняються лише їх регістром, і, отже, вона скорочується у виразі (6.1), якщо розглядати різницю вільної енергії. Ми також групуємо дві електростатичні величини  $\Delta G_{el}(\Gamma) = \Delta G_{pol}(\Gamma) + U_{el}(\Gamma)$ , щоб отримати остаточний вираз для вільної енергії:

$$G(\Gamma) = \Delta G_{el}(\Gamma) + \Delta G_{nn}(\Gamma) + U_{vdw}(\Gamma)$$
(6.2)

У цій роботі вільна енергія полярної сольватації оцінюється використовуючи формулювання молекулярного об'єму узагальненої моделі Борна(GBMV)[442]. Модель GB є однією з найсучасніших схем сольватації, які наразі доступні. Результати розрахунків в рамках цієї моделі дуже добре співпадають з розв'язком більш точного рівняння Пуассона для великої кількості білкових структур.

Теперішнє розуміння неполярної сольватації набагато менш розвинене, ніж полярної. Гідрофобні взаємодії демонструють чітку залежність від розміру частинок[443], що необхідно враховувати в теоретичних розрахунках. Для досить великих розмірів, починаючи приблизно від 10 Å, витрати на сольватацію шматка гідрофобної поверхні на молекулі розчиненої речовини пропорційна її площі поверхні (SA). β-листи, включені в наші моделі фібрили, досягають розмірів, де застосовується модель SA. Тому ми оцінюємо гідрофобні витрати, пов'язані з формуванням моделі фібрил, як пропорційні площі поверхні $\Delta S$ , яка стає захищеною від розчинника, коли β-листи складаються разом,  $\Delta G_{np}(\Gamma) = p\Delta S$ . Константа пропорційності становить величину, яка відповідає рівним поверхням,  $\gamma=72$  Cal/mol/Å<sup>2</sup>[143]. Всі розрахунки виконуються за допомогою набору програм СНАRMM [31].

#### 6.3. Висновки розділу

Амилоїдні фібрили досліджено в атомному моделюванні в явному розчиннику. Спочатку розглянуто проблему осідання мономерного Aβ на край існуючої фібрили. Отримано структури перехідного стану для цього процесу з моделювання десорбції мономера. Конформаційні стани, спостережувані в моделюванні фрагментів Aβ, що містять структурно важливі області, використано для обрахунку висоти бар'єру вільної енергії для процесу адсорбції. Подібні розрахунки проведено для фрагмента з мутацією E22Q, яка відповідає голландській формі вродженої хвороби Альцгеймера. Бар'єр вільної енергії для мутованого пептиду виявився нижчим, ніж у пептиду дикої послідовності, що свідчить про більш стрімкий процес агрегації. Передбачене теоретично прискорення добре узгоджується з експериментальними спостереженнями. Більше того, як в теорії так і в експерименті, прискорення має ентропійну природу.

Структуру фібрили побудовано також для фрагмента Аβ11-25. Відомо, що регістр β-листів цих фібрил змінюється зі зміною pH середовища. Щоб пояснити мікроскопічне походження pH залежності регістру побудовано декілька структурних моделей для фібрил при низьких та нейтральних значеннях pH та досліджено в короткій молекулярній динаміці в явній воді. Моделі, що показали найнижчу вільну енергію, оцінену за допомогою неявної моделі розчинника, обрано як зразки структури справжньої фібрили. Показано, що регістр цих моделей збігається з експериментальними спостереженнями. В нейтральному середовищі основним внеском у різницю вільної енергії між двома регістрами є електростатична взаємодія. Група зарядів карбоксильного кінця робить великий внесок у ці взаємодії і, отже, грає ключову роль у визначенні регістру.

#### 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 амилоїдних фібрил на атомному рівні для фрагментів Аβ 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 GroeEL/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 про-

міжним 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 сольватації, 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 підвищену схильність до утворення амилоїдних фібрил з ростом довжини ланцюга. Цей висновок добре узгоджується з експериментальними спостереженнями.

9. Електричне поле здатне індукувати перехід у спіральний стан у переважно невпорядкованих білках. Перехід 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. Перехід відновлення в м'язовому білку міозину містить, як мінімум, два послідовні кроки. Перший крок полягає в замиканні ключа ІІ, 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 гомології 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 Аβ 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 Аβ, 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 Аβ11-25 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 регістру β–листів фібрили.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 1. *Ishimoto C., Tanaka T.* Critical behavior of a binary mixture of protein and salt water // *Phys. Rev. Lett.* 1977. Vol. 39, no. 8. P. 474.
- Zhang F., Roth R., Wolf M., Roosen-Runge F., Skoda M.W., Jacobs R.M., Stzucki M., Schreiber F. Charge-controlled metastable liquid–liquid phase separation in protein solutions as a universal pathway towards crystallization // Soft Matter. 2012. Vol. 8, no. 5. P. 1313-1316.
- 3. Benedek G. The molecular basis of cataract formation // Human Cataract Formation. 1984. P. 237-247.
- 4. *Hyman A.A., Weber C.A., Jülicher F.* Liquid-liquid phase separation in biology // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2014. Vol. 30, P. 39-58.
- Abramo M.C., Caccamo C., Costa D., Pellicane G., Ruberto R., Wanderlingh U. Effective interactions in lysozyme aqueous solutions: a small-angle neutron scattering and computer simulation study // J. Chem. Phys. 2012. Vol. 136, no. 3. P. 035103.
- Stradner A., Sedgwick H., Cardinaux F., Poon W.C.K., Egelhaaf S.U., Schurtenberger P. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids // Nature. 2004. Vol. 432, no. 7016. P. 492-495.
- Atmuri A.K., Bhatia S.R. Polymer-Mediated Clustering of Charged Anisotropic Colloids // Langmuir. 2013. Vol. 29, no. 10. P. 3179-3187.
- Tam J.M., Murthy A.K., Ingram D.R., Nguyen R., Sokolov K.V., Johnston K.P. Kinetic Assembly of Near-IR-Active Gold Nanoclusters Using Weakly Adsorbing Polymers to Control the Size // Langmuir. 2010. Vol. 26, no. 11. P. 8988-8999.
- Janai E., Schofield A.B., Sloutskin E. Non-crystalline colloidal clusters in two dimensions: size distributions and shapes // Soft Matter. 2012. Vol. 8, no. 10. P. 2924-2929.

- Dinsmore A.D., Dubin P.L., Grason G.M. Clustering in Complex Fluids // J. Phys. Chem. B. 2011. Vol. 115, no. 22. P. 7173-7174.
- Yearley E.J., Godfrin P.D., Perevozchikova T., Zhang H.L., Falus P., Porcar L., Nagao M., Curtis J.E., Gawande P., Taing R., Zarraga I.E., Wagner N.J., Liu Y. Observation of Small Cluster Formation in Concentrated Monoclonal Antibody Solutions and Its Implications to Solution Viscosity // Biophys. J. 2014. Vol. 106, no. 8. P. 1763-1770.
- Xu S., Sun C., Guo J., Xu K., Wang C. Biopolymer-directed synthesis of highsurface-area magnetite colloidal nanocrystal clusters for dual drug delivery in prostate cancer // J. Mater. Chem. 2012. Vol. 22, no. 36. P. 19067-19075.
- Englander S.W., Mayne L. The nature of protein folding pathways // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2014. Vol. 111, no. 45. P. 15873-15880.
- 14. *Hartl F.U., Hayer-Hartl M.* Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // *Science*. 2002. Vol. 295, P. 1852-1858.
- 15. *Saibil H.R., Horwich A.L., Fenton W.A.* Allostery and protein substrate conformational change during GroEL/GroES-mediated protein folding. T. 59 : Academic Press, 2002.
- Todd M.J., Viitanen P.V., Lorimer G.H. Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: impliciations for facilitated protein folding // Science. 1994. Vol. 265, P. 659-666.
- Malnasi-Csizmadia A., Pearson D.S., Kovacs M., Woolley R.J., Geeves M.A., Bagshaw C.R. Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a Dictyostelium myosin II mutant containing a single tryptophan residue // Biochemistry. 2001. Vol. 40, no. 42. P. 12727-12737.
- 18. Agafonov R.V., Negrashov I.V., Tkachev Y.V., Blakely S.E., Titus M.A., Thomas D.D., Nesmelov Y.E. Structural dynamics of the myosin relay helix by time-

resolved EPR and FRET // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106, no. 51. P. 21625-21630.

- Agafonov R.V., Nesmelov Y.E., Titus M.A., Thomas D.D. Muscle and nonmuscle myosins probed by a spin label at equivalent sites in the forcegenerating domain // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, no. 36. P. 13397-13402.
- 20. Luheshi L.M., Crowther D.C., Dobson C.M. Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism // Curr. Opin. Chem. Biol. 2008. Vol. 12, no. 1. P. 25-31.
- 21. Makin O.S., Sikorski P., Serpell L.C. Diffraction to study protein and peptide assemblies // Curr. Opin. Chem. Biol. 2006. Vol. 10, no. 5. P. 417-422.
- Ma B.Y., Nussinov R. Stabilities and conformations of Alzheimer's beta-amyloid peptide oligomers (A beta(16-22 ') A beta(16-35 ') and A beta(10-35)): Sequence effects // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. Vol. 99, no. 22. P. 14126-14131.
- Teplow D.B., Lazo N.D., Bitan G., Bernstein S., Wyttenbach T., Bowers M.T., Baumketner A., Shea J.E., Urbanc B., Cruz L., Borreguero J., Stanley H.E. Elucidating amyloid beta-protein folding and assembly: A multidisciplinary approach // Acc. Chem. Res. 2006. Vol. 39, no. 9. P. 635-645.
- 24. Bitan G., Kirkitadze M.D., Lomakin A., Vollers S.S., Benedek G.B., Teplow D.B. Amyloid β-protein (Aβ) assembly: Aβ40 and Aβ42 oligomerize through distinct pathways // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100, no. 1. P. 330-335.
- Irback A., Mitternacht S. Spontaneous beta-barrel formation: An all-atom Monte Carlo study of A beta(16-22) oligomerization // Proteins-Structure Function and Bioinformatics. 2008. Vol. 71, no. 1. P. 207-214.
- Day R., Paschek D., Garcia A.E. Microsecond simulations of the folding/unfolding thermodynamics of the Trp-cage miniprotein // Proteins: Struct., Funct., Bioinf. 2010. Vol. 78, no. 8. P. 1889-1899.

292

- Pitera J.W., Swope W. Understanding folding and design: Replica-exchange simulations of `Trp-cage"miniproteins // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. Vol. 100, no. 13. P. 7587-7592.
- Baumketner A., Melnyk R., Holovko M.F., Cai W., Costa D., Caccamo C. Softness and non-spherical shape define the phase behavior and the structural properties of lysozyme in aqueous solutions // J. Chem. Phys. 2016. Vol. 144, no. 1. P. 015103.
- Kmiecik S., Wabik J., Kolinski M., Kouza M., Kolinski A. Coarse-grained modeling of protein dynamics // Computational methods to study the structure and dynamics of biomolecules and biomolecular processes : Springer, 2014. P. 55-79.
- Baumketner A., Jewett A., Shea J.-E. Effects of confinement in chaperonin assisted protein folding: rate enhancement by decreasing the roughness of the folding energy landscape // J. Mol. Biol. 2003. Vol. 332, no. 3. P. 701-713.
- Brooks B.R., Bruccoleri R., Olafson B., States D., Swaninathan S., Karplus M. CHARMM: a program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations // J. Comp. Chem. 1983. Vol. 4, P. 187-200.
- Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters // Proteins-Structure Function and Bioinformatics. 2006. Vol. 65, no. 3. P. 712-725.
- Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. Comparison of single potential functions for simulating liquid water // J. Chem. Phys. 1983. Vol. 79, no. 2. P. 926-935.
- 34. *Ni B., Baumketner A.* Reduced atomic pair-interaction design (RAPID) model for simulations of proteins // *J. Chem. Phys.* 2012. Vol. 138, no. 6. P. 064102.

- 35. Singharoy A., Chandler D., Durrant J., Sener M., Amaro R., Schulten K. The Do's and Do Not's of a 100 Million Atom Molecular Dynamics Simulation // Biophys. J. Vol. 108, no. 2. P. 158a.
- 36. *Reches M., Gazit E.* Formation of closed-cage nanostructures by self-assembly of aromatic dipeptides // *Nano Lett.* 2004. Vol. 4, no. 4. P. 581-585.
- Rajagopal K., Schneider J.P. Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications // Curr. Opin. Str. Biol. 2004. Vol. 14, P. 480-486.
- Richardson P., McKenna W., Bristow M., Maisch B., Mautner B., OConnell J., Olsen E., Thiene G., Goodwin J., Gyarfas I., Martin I., Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies // Circulation. 1996. Vol. 93, no. 5. P. 841-842.
- 39. *Maron B.J.* Hypertrophic Cardiomyopathy // JAMA: The Journal of the American Medical Association. 2002. Vol. 287, no. 10. P. 1308-1320.
- 40. Johnston K.P., Maynard J.A., Truskett T.M., Borwankar A.U., Miller M.A., Wilson B.K., Dinin A.K., Khan T.A., Kaczorowski K.J. Concentrated dispersions of equilibrium protein nanoclusters that reversibly dissociate into active monomers // ACS Nano. 2012. Vol. 6, no. 2. P. 1357-1369.
- 41. Benedek G.B., Pande J., Thurston G.M., Clark J.I. Theoretical and experimental basis for the inhibition of cataract // Prog. Retin. Eye Res. 1999. Vol. 18, no. 3. P. 391-402.
- 42. Dumetz A.C., Chockla A.M., Kaler E.W., Lenhoff A.M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid-liquid phase separation, gels, and aggregates // Biophys. J. 2008. Vol. 94, no. 2. P. 570-583.
- 43. Israelachvili J.N. Intermolecular and surface forces. : Academic press, 2011.

- Eberstein W., Georgalis Y., Saenger W. Molecular interactions in crystallizing lysozyme solutions studied by photon correlation spectroscopy // J. Cryst. Growth. 1994. Vol. 143, no. 1-2. P. 71-78.
- Broide M.L., Tominc T.M., Saxowsky M.D. Using phase transitions to investigate the effect of salts on protein interactions // Phys Rev E. 1996. Vol. 53, no. 6. P. 6325.
- 46. Malfois M., Bonneté F., Belloni L., Tardieu A. A model of attractive interactions to account for fluid–fluid phase separation of protein solutions // The Journal of chemical physics. 1996. Vol. 105, no. 8. P. 3290-3300.
- Ducruix A., Guilloteau J.P., Riès-Kautt M., Tardieu A. Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis // J. Cryst. Growth. 1996. Vol. 168, no. 1-4. P. 28-39.
- Niebuhr M., Koch M.H.J. Effects of Urea and Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) on the Interactions of Lysozyme in Solution // Biophys. J. 2005. Vol. 89, no. 3. P. 1978-1983.
- Shukla A., Mylonas E., Di Cola E., Finet S., Timmins P., Narayanan T., Svergun D.I. Absence of equilibrium cluster phase in concentrated lysozyme solutions // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, no. 13. P. 5075-5080.
- Schroer M.A., Markgraf J., Wieland D.F., Sahle C.J., Möller J., Paulus M., Tolan M., Winter R. Nonlinear pressure dependence of the interaction potential of dense protein solutions // Phys. Rev. Lett. 2011. Vol. 106, no. 17. P. 178102.
- Möller J., Schroer M.A., Erlkamp M., Grobelny S., Paulus M., Tiemeyer S., Wirkert F.J., Tolan M., Winter R. The effect of ionic strength, temperature, and pressure on the interaction potential of dense protein solutions: from nonlinear pressure response to protein crystallization // Biophys. J. 2012. Vol. 102, no. 11. P. 2641-2648.

- Chinchalikar A., Aswal V., Kohlbrecher J., Wagh A. Small-angle neutron scattering study of structure and interaction during salt-induced liquid-liquid phase transition in protein solutions // Phys Rev E. 2013. Vol. 87, no. 6. P. 062708.
- Pellicane G., Costa D., Caccamo C. Phase coexistence in a DLVO model of globular protein solutions // J. Phys.: Condens. Matter. 2003. Vol. 15, no. 3. P. 375.
- 54. Pellicane G., Costa D., Caccamo C. Microscopic determination of the phase diagrams of lysozyme and γ-crystallin solutions // The Journal of Physical Chemistry B. 2004. Vol. 108, no. 23. P. 7538-7541.
- *Pellicane G.* Colloidal model of lysozyme aqueous solutions: a computer simulation and theoretical study // J. Phys. Chem. B. 2012. Vol. 116, no. 7. P. 2114-20.
- 56. Abramo M.C., Caccamo C., Cavero M., Costa D., Pellicane G., Ruberto R., Wanderlingh U. Effective protein-protein interaction from structure factor data of a lysozyme solution // J. Chem. Phys. 2013. Vol. 139, no. 5. P. 054904.
- 57. Sumi T., Imamura H., Morita T., Isogai Y., Nishikawa K. Model-potential-free analysis of small angle scattering of proteins in solution: insights into solvent effects on protein–protein interaction // Phys. Chem. Chem. Phys. 2014. Vol. 16, no. 46. P. 25492-25497.
- Rosch T.W., Errington J.R. Investigation of the phase behavior of an embedded charge protein model through molecular simulation // The Journal of Physical Chemistry B. 2007. Vol. 111, no. 43. P. 12591-12598.
- Carlsson F., Malmsten M., Linse P. Monte Carlo simulations of lysozyme selfassociation in aqueous solution // The Journal of Physical Chemistry B. 2001. Vol. 105, no. 48. P. 12189-12195.
- Vekilov P.G. Nucleation of protein condensed phases // Rev. Chem. Eng. 2011.
   Vol. 27, no. 1-2. P. 1-13.

- Osterman N., Babic D., Poberaj I., Dobnikar J., Ziherl P. Observation of condensed phases of quasiplanar core-softened colloids // Phys. Rev. Lett. 2007. Vol. 99, no. 24. P. 248301.
- Lebowitz J.L., Penrose O. Rigorous Treatment of Van Der Waals-Maxwell Theory of Liquid-Vapor Transition // J Math Phys. 1966. Vol. 7, no. 1. P. 98-&.
- 63. *Kendrick G.F., Sluckin T.J., Grimson M.J.* Macrocrystal Phases in Charged Colloidal Suspensions // *Europhys. Lett.* 1988. Vol. 6, no. 6. P. 567-572.
- Sear R.P., Chung S.W., Markovich G., Gelbart W.M., Heath J.R. Spontaneous patterning of quantum dots at the air-water interface // Phys Rev E. 1999. Vol. 59, no. 6. P. R6255-R6258.
- Sear R.P., Gelbart W.M. Microphase separation versus the vapor-liquid transition in systems of spherical particles // J. Chem. Phys. 1999. Vol. 110, no. 9. P. 4582-4588.
- Wu D., Chandler D., Smit B. Electrostatic Analogy for Surfactant Assemblies // J. Phys. Chem. 1992. Vol. 96, no. 10. P. 4077-4083.
- Seul M., Andelman D. Domain Shapes and Patterns the Phenomenology of Modulated Phases // Science. 1995. Vol. 267, no. 5197. P. 476-483.
- Groenewold J., Kegel W.K. Anomalously large equilibrium clusters of colloids // J. Phys. Chem. B. 2001. Vol. 105, no. 47. P. 11702-11709.
- 69. Zhang T.H., Kuipers B.W.M., Tian W.D., Groenewold J., Kegel W.K. Polydispersity and gelation in concentrated colloids with competing interactions // Soft Matter. 2015. Vol. 11, no. 2. P. 297-302.
- Sweatman M.B., Fartaria R., Lue L. Cluster formation in fluids with competing short-range and long-range interactions // J. Chem. Phys. 2014. Vol. 140, no. 12. P. 124508.

- 71. *Pini D., Ge J.L., Parola A., Reatto L.* Enhanced density fluctuations in fluid systems with competing interactions // *Chem. Phys. Lett.* 2000. Vol. 327, no. 3-4. P. 209-215.
- 72. *Pini D., Parola A., Reatto L.* Freezing and correlations in fluids with competing interactions // *J Phys-Condens Mat.* 2006. Vol. 18, no. 36. P. S2305-S2320.
- Archer A.J., Pini D., Evans R., Reatto L. Model colloidal fluid with competing interactions: Bulk and interfacial properties // J. Chem. Phys. 2007. Vol. 126, no. 1. P. 014104.
- 74. *Archer A.J., Wilding N.B.* Phase behavior of a fluid with competing attractive and repulsive interactions // *Phys Rev E.* 2007. Vol. 76, no. 3. P. 031501.
- 75. *Charbonneau P., Reichman D.R.* Systematic characterization of thermodynamic and dynamical phase behavior in systems with short-ranged attraction // *Phys Rev E.* 2007. Vol. 75, no. 1. P. 011507.
- 76. *Tarzia M., Coniglio A.* Lamellar order, microphase structures, and glassy phase in a field theoretic model for charged colloids // *Phys Rev E.* 2007. Vol. 75, no. 1. P. 011410.
- 77. Costa D., Caccamo C., Bomont J.M., Bretonnet J.L. Theoretical description of cluster formation in two-Yukawa competing fluids // Mol. Phys. 2011. Vol. 109, no. 23-24. P. 2845-2853.
- 78. *Groenewold J., Kegel W.K.* Colloidal cluster phases, gelation and nuclear matter // *J Phys-Condens Mat.* 2004. Vol. 16, no. 42. P. S4877-S4886.
- *Imperio A., Reatto L.* A bidimensional fluid system with competing interactions: spontaneous and induced pattern formation // *J Phys-Condens Mat.* 2004. Vol. 16, no. 38. P. S3769-S3789.
- Hutchens S.B., Wang Z.G. Metastable cluster intermediates in the condensation of charged macromolecule solutions // J. Chem. Phys. 2007. Vol. 127, no. 8. P. 084912.

298

- Liu Y., Chen W.R., Chen S.H. Cluster formation in two-Yukawa fluids // J. Chem. Phys. 2005. Vol. 122, no. 4. P. 044507.
- Schwanzer D.F., Kahl G. Two-dimensional systems with competing interactions: microphase formation versus liquid-vapour phase separation // J Phys-Condens Mat. 2010. Vol. 22, no. 41. P. 415103.
- Hemmer P.C., Stell G. Fluids with Several Phase Transitions // Phys. Rev. Lett.
   1970. Vol. 24, no. 23. P. 1284-&.
- Stell G., Hemmer P.C. Phase-Transitions Due to Softness of Potential Core // J. Chem. Phys. 1972. Vol. 56, no. 9. P. 4274-&.
- 85. *Young D.A., Alder B.J.* Melting-Curve Extrema from a Repulsive Step Potential // *Phys. Rev. Lett.* 1977. Vol. 38, no. 21. P. 1213-1216.
- Jagla E.A. Core-softened potentials and the anomalous properties of water // J. Chem. Phys. 1999. Vol. 111, no. 19. P. 8980-8986.
- 87. Rzysko W., Pizio O., Patrykiejew A., Sokolowski S. Phase diagram of a square-shoulder, square-well fluid revisited // J. Chem. Phys. 2008. Vol. 129, no. 12. P. 124502.
- Buldyrev S.V., Malescio G., Angell C.A., Giovambattista N., Prestipino S., Saija F., Stanley H.E., Xu L. Unusual phase behavior of one-component systems with two-scale isotropic interactions // J Phys-Condens Mat. 2009. Vol. 21, no. 50. P. 504106.
- Klein W., Gould H., Ramos R.A., Clejan I., Melcuk A.I. Repulsive Potentials, Clumps and the Metastable Glass Phase // Physica A. 1994. Vol. 205, no. 4. P. 738-746.
- 90. Norizoe Y., Kawakatsu T. Monte Carlo simulation of string-like colloidal assembly // Europhys. Lett. 2005. Vol. 72, no. 4. P. 583-589.
- Norizoe Y., Kawakatsu T. Particle Monte Carlo simulation of string-like colloidal assembly in two and three dimensions // J. Chem. Phys. 2012. Vol. 137, no. 2. P. 024904.

- 92. Camp P.J. Structure and phase behavior of a two-dimensional system with core-softened and long-range repulsive interactions // Phys Rev E. 2003. Vol. 68, no. 6. P. 061506.
- Malescio G., Pellicane G. Stripe patterns in two-dimensional systems with core-corona molecular architecture // Phys Rev E. 2004. Vol. 70, no. 2. P. 021202.
- 94. Glaser M.A., Grason G.M., Kamien R.D., Kosmrlj A., Santangelo C.D., Ziherl
  P. Soft spheres make more mesophases // EPL. 2007. Vol. 78, no. 4. P. 46004.
- 95. Mladek B.M., Gottwald D., Kahl G., Neumann M., Likos C.N. Clustering in the absence of attractions: Density functional theory and computer Simulations // J. Phys. Chem. B. 2007. Vol. 111, no. 44. P. 12799-12808.
- 96. Fornleitner J., Kahl G. Lane formation vs. cluster formation in twodimensional square-shoulder systems - A genetic algorithm approach // EPL. 2008. Vol. 82, no. 1. P. 18001.
- 97. Shin H.M., Grason G.M., Santangelo C.D. Mesophases of soft-sphere aggregates // Soft Matter. 2009. Vol. 5, no. 19. P. 3629-3638.
- Dotera T., Oshiro T., Ziherl P. Mosaic two-lengthscale quasicrystals // Nature.
   2014. Vol. 506, no. 7487. P. 208-211.
- 99. Likos C.N., Lang A., Watzlawek M., Lowen H. Criterion for determining clustering versus reentrant melting behavior for bounded interaction potentials // Phys Rev E. 2001. Vol. 63, no. 3. P. 031206.
- 100. Mladek B.M., Gottwald D., Kahl G., Neumann M., Likos C.N. Formation of polymorphic cluster phases for a class of models of purely repulsive soft spheres // Phys. Rev. Lett. 2006. Vol. 96, no. 4. P. 045701.
- 101. Klix C.L., Royall C.P., Tanaka H. Structural and Dynamical Features of Multiple Metastable Glassy States in a Colloidal System with Competing Interactions // Phys. Rev. Lett. 2010. Vol. 104, no. 16. P. 165702.

- 102. Xu Z., Horwich A.L., Sigler P.B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)\$\_7\$ chaperonin complex // Nature. 1997. Vol. 388, P. 741-750.
- 103. Todd M.J., Lorimer G.H., Thirumalai D. Chaperonin-facilitated protein folding: Optimization of rate and yield by an iterative annealing mechanism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93, P. 4030-4035.
- 104. *Lorimer G.* Folding with a two-stroke motor *// Nature*. 1997. Vol. 388, P. 720-723.
- Shtilerman M., Lorimer G.H., Englander S.W. Chaperonin function: folding by forced unfolding // Science. 1999. Vol. 284, P. 822-825.
- 106. *Ellis R.J.* Opening and closing the Anfinsen cage // *Curr. Biol.* 1994. Vol. 4, no.
  7. P. 633-635.
- Ellis R.J. Molecular chaperones: Inside and outside the Anfinsen cage // Curr. Biol. 2001. Vol. 11, P. R1038-R1040.
- 108. Brinker A., Pfeifer G., Kerner M.J., Naylor D.J., Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Dual function of protein confinement in chaperonin-assisted protein folding // Cell. 2001. Vol. 107, P. 223-233.
- Weissman J.S., Kashi Y., Fenton W.A., Horwich A.L. GroEL-Metiated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms // Cell. 1994. Vol. 78, P. 693-702.
- Gulukota K., Wolynes P.G. Statistical Mechanics of Kinetic Proofreading in Protein Folding in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91, P. 9292-9296.
- Chan H.S., Dill K.A. A simple model of chaperonin-mediated protein folding // Proteins: Str. Fun. Gen. 1996. Vol. 24, P. 345-351.
- 112. Sfatos C.D., Gutin A.M., Abkevich V.I., Shakhnovich E.I. Simulations of chaperone-assisted folding // Biochemistry. 1996. Vol. 35, P. 334-339.

- Betancourt M.R., Thirumalai D. Exploring the kinetic requirements for enhancement of protein folding rates in the GroEL cavity // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 287, no. 3. P. 627-644.
- 114. *Gorse D*. Global minimization of an off-lattice potential energy function using a chaperone-based refolding method // *Biopolymers*. 2001. Vol. 59, P. 411-426.
- Gorse D. Application of a chaperone-based refolding method to two- and threedimensional off-lattice protein models // *Biopolymers*. 2002. Vol. 64, P. 146-160.
- Minton A.P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, no. 14. P. 10577-10580.
- 117. Goloubinoff P., Christeller J.T., Gatenby A.A., Lorimer G.H. Reconstitution of active dimeric ribulose bisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP // Nature. 1989. Vol. 342, P. 884-888.
- 118. Nawrocki J., Chu R.-A., Pannell L.K., Bai Y. Intermolecular aggregations are responsible for the slow kinetics observed in the folding of Cytochrome c at neutral pH // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 293, P. 991-995.
- Silow M., Oliveberg M. Transient aggregates in protein folding are easily mistaken for folding intermediates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94, P. 6084-6086.
- 120. Stan G., Thirumalai D., Lorimer G.H., Brooks B.R. Annealing function of GroEL: structural and bioinformatic analysis // Biophys. Chem. 2003. Vol. 100, P. 453-467.
- 121. Van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. GROMACS: Fast, flexible, and free // J. Comput. Chem. 2005. Vol. 26, no. 16. P. 1701-1718.

- 122. *van Gunsteren W.F., Dolenc J.* Biomolecular simulation: historical picture and future perspectives // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. Vol. 36, P. 11-15.
- 123. *Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M.* Molecular chaperones in protein folding and proteostasis // *Nature*. 2011. Vol. 475, no. 7356. P. 324-332.
- 124. *Elcock A.H., Sept D., McCammon J.A.* Computer simulation of protein-protein interactions // *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105, no. 8. P. 1504-1518.
- 125. Eisenberg D., Nelson R., Sawaya M.R., Balbirnie M., Sambashivan S., Ivanova M.I., Madsen A.O., Riekel C. The structural biology of protein aggregation diseases: Fundamental questions and some answers // Acc. Chem. Res. 2006. Vol. 39, no. 9. P. 568-575.
- Tarus B., Straub J.E., Thirumalai D. Probing the initial stage of aggregation of the A beta(10-35)-protein: Assessing the propensity for peptide dimerization // J. Mol. Biol. 2005. Vol. 345, P. 1141-1156.
- 127. *Gnanakaran S., Nussinov R., Garcia A.E.* Atomic-level description of amyloid β-dimer formation // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128, no. 7. P. 2158-2159.
- 128. *Rohrig U.F., Laio A., Tantalo N., Parrinello M., Petronzio R.* Stability and structure of oligomers of the Alzheimer peptide A beta(16-22): From the dimer to the 32-mer // *Biophys. J.* 2006. Vol. 91, no. 9. P. 3217-3229.
- Nguyen H.D., Hall C.K. Molecular dynamics simulations of spontaneous fibril formation by random-coil peptides // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, no. 46. P. 16180-16185.
- Santini S., Mousseau N., Derreumaux P. In silico assembly of Alzheimer?s A beta(16-22) peptide into beta-sheets // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, P. 11509-11516.
- Morriss-Andrews A., Bellesia G., Shea J.E. Effects of surface interactions on peptide aggregate morphology // J. Chem. Phys. 2011. Vol. 135, no. 8. P. 085102.

- Honeycutt J.D., Thirumalai D. The nature of folded states of globular proteins // Biopolymers. 1992. Vol. 32, P. 695-709.
- 133. Urbanc B., Cruz L., Ding F., Sammond D., Khare S., Buldyrev S.V., Stanley H.E., Dokholyan N.V. Molecular Dynamics Simulation of Amyloid beta Dimer Formation // Biophys. J. 2004. Vol. 87, no. 4. P. 2310-2321.
- 134. Tsiavaliaris G., Fujita-Becker S., Batra R., Levitsky D.I., Kull F.J., Geeves M.A., Manstein D.J. Mutations in the relay loop region result in dominantnegative inhibition of myosin II function in Dictyostelium // EMBO Rep. 2002. Vol. 3, P. 1099-1105.
- Bitan G., Vollers S.S., Teplow D.B. Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, P. 34882-34889.
- Roux B., Simonson T. Implicit solvent models // Biophys. Chem. 1999. Vol. 78, no. 1-2. P. 1-20.
- Okur A., Simmerling C. Hybrid Explicit/Implicit Solvation Methods // Ann Rep Comp Chem. 2006. Vol. 2, P. 97-109.
- 138. Bashford D., Case D.A. Generalized born models of macromolecular solvation effects // Annu. Rev. Phys. Chem. 2000. Vol. 51, P. 129-152.
- Israelachvili J., Pashley R. The Hydrophobic Interaction Is Long-Range, Decaying Exponentially with Distance // Nature. 1982. Vol. 300, no. 5890. P. 341-342.
- Ben-Naim A. Solvent-Induced Interactions Hydrophobic and Hydrophilic Phenomena // J. Chem. Phys. 1989. Vol. 90, no. 12. P. 7412-7425.
- 141. Ooi T., Oobatake M., Nemethy G., Scheraga H.A. Accessible Surface-Areas as a Measure of the Thermodynamic Parameters of Hydration of Peptides // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1987. Vol. 84, no. 10. P. 3086-3090.

- 142. Varilly P., Patel A.J., Chandler D. An improved coarse-grained model of solvation and the hydrophobic effect // J. Chem. Phys. 2011. Vol. 134, no. 7. P. 074109.
- 143. Sharp K.A., Nicholls A., Fine R.F., Honig B. Reconciling the Magnitude of the Microscopic and Macroscopic Hydrophobic Effects // Science. 1991. Vol. 252, no. 5002. P. 106-109.
- 144. Baumketner A., Nesmelov Y. Early stages of the recovery stroke in myosin II studied by molecular dynamics simulations // Protein Sci. 2011. Vol. 20, no. 12. P. 2013-2022.
- Allen M.P., Tildesley D.J. Computer simulations of liquids. Oxford : Oxford University Press, 1987.
- 146. Frenkel D., Smit B. Understanding molecular simulation. San Diego : Academic Press, 2002.
- 147. *Lyubartsev A.P., Laaksonen A.* Osmotic and activity coefficients from effective potentials for hydrated ions // *Phys Rev E.* 1997. Vol. 55, no. 5. P. 5689-5696.
- 148. Lyubartsev A.P., Nordenskiold L. Monte Carlo simulation study of DNA polyelectrolyte properties in the presence of multivalent polyamine ions // J. Phys. Chem. B. 1997. Vol. 101, no. 21. P. 4335-4342.
- 149. Villa A., Peter C., van der Vegt N.F.A. Self-assembling dipeptides: conformational sampling in solvent-free coarse-grained simulation // Phys. Chem. Chem. Phys. 2009. Vol. 11, no. 12. P. 2077-2086.
- 150. Villa A., van der Vegt N.F.A., Peter C. Self-assembling dipeptides: including solvent degrees of freedom in a coarse-grained model // Phys. Chem. Chem. Phys. 2009. Vol. 11, no. 12. P. 2068-2076.
- 151. Lyubartsev A.P. Multiscale modeling of lipids and lipid bilayers // European Biophysics Journal with Biophysics Letters. 2005. Vol. 35, no. 1. P. 53-61.
- 152. Akkermans R.L.C., Briels W.J. A structure-based coarse-grained model for polymer melts // J. Chem. Phys. 2001. Vol. 114, no. 2. P. 1020-1031.

- Fukunaga H., Takimoto J., Doi M. A coarse-graining procedure for flexible polymer chains with bonded and nonbonded interactions // J. Chem. Phys. 2002. Vol. 116, no. 18. P. 8183-8190.
- 154. Ashbaugh H.S., Patel H.A., Kumar S.K., Garde S. Mesoscale model of polymer melt structure: Self-consistent mapping of molecular correlations to coarsegrained potentials // J. Chem. Phys. 2005. Vol. 122, no. 10. P. 104908-104918.
- Reith D., Putz M., Muller-Plathe F. Deriving effective mesoscale potentials from atomistic simulations // J. Comput. Chem. 2003. Vol. 24, no. 13. P. 1624-1636.
- 156. Faux N.G., Bottomley S.P., Lesk A.M., Irving J.A., Morrison J.R., de la Banda M.C., Whisstock J.C. Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins // Genome Res. 2005. Vol. 15, no. 4. P. 537-551.
- 157. Bernacki J.P., Murphy R.M. Length-Dependent Aggregation of Uninterrupted Polyalanine Peptides // Biochemistry. 2011. Vol. 50, no. 43. P. 9200-9211.
- Nguyen H.D., Hall C.K. Spontaneous fibril formation by polyalanines; Discontinuous molecular dynamics simulations // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128, no. 6. P. 1890-1901.
- Cheon M., Chang I., Hall C.K. Spontaneous Formation of Twisted A beta(16-22) Fibrils in Large-Scale Molecular-Dynamics Simulations // Biophys. J. 2011. Vol. 101, no. 10. P. 2493-2501.
- 160. *Pellarin R., Guarnera E., Caflisch A.* Pathways and intermediates of amyloid fibril formation // *J. Mol. Biol.* 2007. Vol. 374, no. 4. P. 917-924.
- 161. Wei G.H., Mousseau N., Derreumaux P. Sampling the self-assembly pathways of KFFE hexamers // Biophys. J. 2004. Vol. 87, no. 6. P. 3648-3656.
- Bellesia G., Shea J.E. Effect of beta-sheet propensity on peptide aggregation // J. Chem. Phys. 2009. Vol. 130, no. 14. P. 145103.

- 163. Paci E., Gsponer J., Salvatella X., Vendruscolo M. Molecular dynamics studies of the process of amyloid aggregation of peptide fragments of transthyretin // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 340, no. 3. P. 555-569.
- 164. Cecchini M., Curcio R., Pappalardo M., Melki R., Caflisch A. A molecular dynamics approach to the structural characterization of amyloid aggregation // J. Mol. Biol. 2006. Vol. 357, no. 4. P. 1306-1321.
- 165. Cecchini M., Rao F., Seeber M., Caflisch A. Replica exchange molecular dynamics simulations of amyloid peptide aggregation // J. Chem. Phys. 2004. Vol. 121, no. 21. P. 10748-10756.
- 166. Gsponer J., Haberthur U., Caflisch A. The role of side-chain interactions in the early steps of aggregation: Molecular dynamics simulations of an amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003. Vol. 100, no. 9. P. 5154-5159.
- 167. Li D.W., Mohanty S., Irback A., Huo S.H. Formation and Growth of Oligomers: A Monte Carlo Study of an Amyloid Tau Fragment // PLoS Comput. Biol. 2008. Vol. 4, no. 12. P. e1000238.
- Cheon M., Chang I., Mohanty S., Luheshi L.M., Dobson C.M., Vendruscolo M., Favrin G. Structural reorganisation and potential toxicity of oligomeric species formed during the assembly of amyloid fibrils // PLoS Comput. Biol. 2007. Vol. 3, no. 9. P. 1727-1738.
- 169. Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Condron M.M., Teplow D.B. Amyloid
  β-Protein Fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate // J. Biol.
  Chem. 1997. Vol. 272, no. 35. P. 22364-22372.
- 170. Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J., Teplow D.B. Amyloid β-Protein Fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, no. 36. P. 25945-25952.

- 171. Selkoe D.J. Folding proteins in fatal ways // Nature. 2003. Vol. 426, P. 900-904.
- 172. *Fowler D.M., Koulov A.V., Balch W.E., Kelly J.W.* Functional amyloid from bacteria to humans // *Trends Biochem. Sci.* 2007. Vol. 32, no. 5. P. 217-224.
- 173. *Otzen D., Nielsen P.H.* We find them here, we find them there: Functional bacterial amyloid // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. Vol. 65, no. 6. P. 910-927.
- 174. Cheng P.-N., Liu C., Zhao M., Eisenberg D., Nowick J.S. Amyloid β-sheet mimics that antagonize protein aggregation and reduce amyloid toxicity // Nat. Chem. 2012. Vol. 4, no. 11. P. 927-933.
- 175. *Hard T., Lendel C.* Inhibition of Amyloid Formation // *J. Mol. Biol.* 2012. Vol. 421, no. 4-5. P. 441-465.
- 176. Barnham K.J., Kenche V.B., Ciccotosto G.D., Smith D.P., Tew D.J., Liu X., Perez K., Cranston G.A., Johanssen T.J., Volitakis I., Bush A.I., Masters C.L., White A.R., Smith J.P., Cherny R.A., Cappai R. Platinum-based inhibitors of amyloid-beta as therapeutic agents for Alzheimer's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, no. 19. P. 6813-6818.
- 177. Dobson C.M. Protein folding and misfolding // Nature. 2003. Vol. 426, P. 884-890.
- 178. Ramirez-Alvarado M., Merkel J.S., Regan L. A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. Vol. 97, no. 16. P. 8979-8984.
- 179. Munishkina L.A., Henriques J., Uversky V.N., Fink A.L. Role of protein-water interactions and electrostatics in alpha-synuclein fibril formation // Biochemistry. 2004. Vol. 43, no. 11. P. 3289-3300.
- 180. Brockwell D.J., Radford S.E. Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? // Curr. Opin. Struct. Biol. 2007. Vol. 17, no. 1. P. 30-37.

- Jahn T.R., Radford S.E. Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways // Arch. Biochem. Biophys. 2008. Vol. 469, no. 1. P. 100-117.
- 182. Hurle M.R., Helms L.R., Li L., Chan W.N., Wetzel R. A Role for Destabilizing Amino-Acid Replacements in Light-Chain Amyloidosis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994. Vol. 91, no. 12. P. 5446-5450.
- 183. Lai Z.H., Colon W., Kelly J.W. The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid // Biochemistry. 1996. Vol. 35, no. 20. P. 6470-6482.
- 184. Booth D.R., Sunde M., Bellotti V., Robinson C.V., Hutchinson W.L., Fraser P.E., Hawkins P.N., Dobson C.M., Radford S.E., Blake C.C.F., Pepys M.B. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis // Nature. 1997. Vol. 385, no. 6619. P. 787-793.
- 185. Kelly J.W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways // Curr. Opin. Struct. Biol. 1998. Vol. 8, no. 1. P. 101-106.
- 186. Chiti F., Taddei N., Bucciantini M., White P., Ramponi G., Dobson C.M. Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein // EMBO J. 2000. Vol. 19, no. 7. P. 1441-1449.
- 187. Uversky V.N., Fink A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1698, no. 2. P. 131-153.
- Chiti F., Taddei N., Baroni F., Capanni C., Stefani M., Ramponi G., Dobson C.M. Kinetic partitioning of protein folding and aggregation // Nat. Struct. Biol. 2002. Vol. 9, no. 2. P. 137-143.
- 189. *Chiti F., Taddei N., Stefani M., Dobson C.M., Ramponi G.* Reduction of the amyloidogenicity of a protein by specific binding of ligands to the native conformation // *Protein Sci.* 2001. Vol. 10, no. 4. P. 879-886.

- 190. Nerelius C., Sandegren A., Sargsyan H., Raunak R., Leijonmarck H., Chatterjee U., Fisahn A., Imarisio S., Lomas D.A., Crowther D.C., Stromberg R., Johansson J. alpha-Helix targeting reduces amyloid-beta peptide toxicity // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106, no. 23. P. 9191-9196.
- 191. Villegas V., Zurdo J., Filimonov V.V., Aviles F.X., Dobson C.M., Serrano L. Protein engineering as a strategy to avoid formation of amyloid fibrils // Protein Sci. 2000. Vol. 9, no. 9. P. 1700-1708.
- 192. *Abedini A., Raleigh D.P.* A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides // *Protein Eng. Des. Sel.* 2009. Vol. 22, no. 8. P. 453-459.
- Porschke D. Effects of Electric-Fields on Bio-Polymers // Annu. Rev. Phys. Chem. 1985. Vol. 36, P. 159-178.
- 194. Porschke D. Macrodipoles Unusual electric properties of biological macromolecules // Biophys. Chem. 1997. Vol. 66, no. 2-3. P. 241-257.
- 195. *Neumann E.* Chemical Electric-Field Effects in Biological Macromolecules // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1986. Vol. 47, no. 3. P. 197-231.
- 196. Diekmann S., Hillen W., Jung M., Wells R.D., Porschke D. Electric Properties and Structure of DNA Restriction Fragments from Measurements of the Electric Dichroism // Biophys. Chem. 1982. Vol. 15, no. 2. P. 157-167.
- 197. Porschke D. Electric, Optical and Hydrodynamic Parameters of Lac Repressor from Measurements of the Electric Dichroism - High Permanent Dipole-Moment Associated with the Protein // Biophys. Chem. 1987. Vol. 28, no. 2. P. 137-147.
- 198. Schwarz G., Seelig J. Kinetic properties and the electric field effect of life helix-coil transition of poly(gamma-benzyl L-glutamate) determined from dielectric relaxation measurements // Biopolymers. 1968. Vol. 6, no. 9. P. 1263-1277.

- Schwarz G. On Kinetics of Helix-Coil Transition of Polypeptides in Solution // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 11, no. 1. P. 64-&.
- 200. *Wada A.* Dielectric evidence of chemical relaxation in the helix-coil transition of polypeptides // *Chem. Phys. Lett.* 1971. Vol. 8, no. 2. P. 211-213.
- 201. Marchal E. Comment on Wadas Letter on Dielectric Evidence of Chemical Relaxation in Helix-Coil Transition of Polypeptides // Chem. Phys. Lett. 1971. Vol. 12, no. 1. P. 9-&.
- 202. Sano T., Yasunaga T. Kinetics of Helix-Coil Transition of Polypeptides in Solution by the Relaxation Methods // Biophys. Chem. 1980. Vol. 11, no. 3-4. P. 377-386.
- 203. Porschke D. Electrostatics and electrodynamics of bacteriorhodopsin // Biophys. J. 1996. Vol. 71, no. 6. P. 3381-3391.
- 204. Rochu D., Pernet T., Renault F., Bon C., Masson P. Dual effect of high electric field in capillary electrophoresis study of the conformational stability of Bungarus fasciatus acetylcholinesterase // J. Chromatogr. A. 2001. Vol. 910, no. 2. P. 347-357.
- Astumian D., Berg H. Direct Electric-Field Effects and Sequential Processes in Biosystems // Bioelectrochem. Bioenerg. 1991. Vol. 25, no. 3. P. 455-462.
- 206. Shoemaker K.R., Kim P.S., York E.J., Stewart J.M., Baldwin R.L. Tests of the Helix Dipole Model for Stabilization of Alpha-Helices // Nature. 1987. Vol. 326, no. 6113. P. 563-567.
- 207. Lymn R.W., Taylor E.W. Mechanism of Adenosine Triphosphate Hydrolysis by Actomyosin // Biochemistry. 1971. Vol. 10, no. 25. P. 4617-4624.
- 208. *Woo H.J.* Exploration of the conformational space of myosin recovery stroke via molecular dynamics // *Biophys. Chem.* 2007. Vol. 125, no. 1. P. 127-137.
- 209. *Tekpinar M., Zheng W.J.* Predicting order of conformational changes during protein conformational transitions using an interpolated elastic network model //

Proteins-Structure Function and Bioinformatics. 2010. Vol. 78, no. 11. P. 2469-2481.

- Taylor W.R., Katsimitsoulia Z. A coarse-grained molecular model for actinmyosin simulation // J. Mol. Graphics Modell. 2010. Vol. 29, no. 2. P. 266-279.
- 211. *Takagi F., Kikuchi M.* Structural change and nucleotide dissociation of myosin motor domain: Dual G(o)over-bar model simulation // *Biophys. J.* 2007. Vol. 93, no. 11. P. 3820-3827.
- 212. *Cecchini M., Alexeev Y., Karplus M.* Pi Release from Myosin: A Simulation Analysis of Possible Pathways // *Structure*. 2010. Vol. 18, no. 4. P. 458-470.
- Cecchini M., Houdusse A., Karplus M. Allosteric Communication in Myosin V: From Small Conformational Changes to Large Directed Movements // PLoS Comput. Biol. 2008. Vol. 4, no. 8. P. e1000129.
- 214. Ovchinnikov V., Trout B.L., Karplus M. Mechanical Coupling in Myosin V: A Simulation Study // J. Mol. Biol. 2010. Vol. 395, no. 4. P. 815-833.
- 215. Zheng W. Multiscale modeling of structural dynamics underlying force generation and product release in actomyosin complex // Proteins: Struct., Funct., Bioinf. 2010. Vol. 78, no. 3. P. 638-660.
- 216. Tehver R., Thirumalai D. Rigor to Post-Rigor Transition in Myosin V: Link between the Dynamics and the Supporting Architecture // Structure. 2010. Vol. 18, no. 4. P. 471-481.
- 217. Sweeney H.L., Houdusse A. Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism // Annual Review of Biophysics, Vol 39. 2010. Vol. 39, P. 539-557.
- 218. *Wray J., Urbanke C.* A fluorescence temperature-jump study of conformational transitions in myosin subfragment 1 // *Biochem. J.* 2001. Vol. 358, P. 165-173.

- 219. Mesentean S., Koppole S., Smith J.C., Fischer S. The principal motions involved in the coupling mechanism of the recovery stroke of the myosin motor // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 367, no. 2. P. 591-602.
- 220. Fischer S., Windshugel B., Horak D., Holmes K.C., Smith J.C. Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. Vol. 102, no. 19. P. 6873-6878.
- 221. Koppole S., Smith J.C., Fischer S. The structural coupling between ATPase activation and recovery stroke in the myosin II motor // Structure. 2007. Vol. 15, no. 7. P. 825-837.
- 222. Koppole S., Smith J.C., Fischer S. Simulations of the myosin II motor reveal a nucleotide-state sensing element that controls the recovery stroke // J. Mol. Biol. 2006. Vol. 361, no. 3. P. 604-616.
- 223. Gyimesi M., Kintses B., Bodor A., Perczel A., Fischer S., Bagshaw C.R., Malnasi-Csizmadia A. The mechanism of the reverse recovery step, phosphate release, and actin activation of Dictyostelium myosin II // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, no. 13. P. 8153-8163.
- 224. Yamanaka K., Okimoto N., Neya S., Hata M., Hoshino T. Behavior of water molecules in ATPase pocket of myosin // Journal of Molecular Structure-Theochem. 2006. Vol. 758, no. 2-3. P. 97-105.
- 225. *Elber R.*, *West A.* Atomically detailed simulation of the recovery stroke in myosin by Milestoning // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107, no. 11. P. 5001-5005.
- 226. Yang Y., Yu H.B., Cui Q. Extensive conformational transitions are required to turn on ATP hydrolysis in myosin // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 381, no. 5. P. 1407-1420.
- 227. Yu H.B., Ma L., Yang Y., Cui Q. Mechanochemical coupling in the myosin motor domain. I. Insights from equilibrium active-site simulations // PLoS Comput. Biol. 2007. Vol. 3, no. 2. P. 199-213.

- 228. *Harris M.J., Woo H.J.* Energetics of subdomain movements and fluorescence probe solvation environment change in ATP-bound myosin // *European Biophysics Journal with Biophysics Letters.* 2008. Vol. 38, no. 1. P. 1-12.
- 229. Nesmelov Y.E., Agafonov R.V., Burr A.R., Weber R.T., Thomas D.D. Structure and dynamics of the force-generating domain of myosin probed by multifrequency electron paramagnetic resonance // Biophys. J. 2008. Vol. 95, no. 1. P. 247-256.
- 230. Nesmelov Y.E., Agafonov R.V., Negrashov I.V., Blakely S.E., Titus M.A., Thomas D.D. Structural kinetics of myosin by transient time-resolved FRET // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108, no. 5. P. 1891-6.
- 231. Melchor J.P., McVoy L., van Nostrand W.E. Charge alterations of E22 enhance the pathogenic properties of the amyloid beta-protein // J. Neurochem. 2000. Vol. 74, P. 2209-2212.
- 232. van Nostrand W.E., Melchor J.P., Cho H.S., Greenberg S.M., Rebeck G.W. Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid beta-protein // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, P. 32860-32866.
- 233. Murakami K., Irie H., Morimoto A., Ohigashi H., Shindo M., Nagao M., Shimizu T., Shirasawa T. Neurotoxicity and physicochemical properties of Aβ mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, no. 46. P. 46179-46187.
- 234. Hou L., Shao H., Zhang Y., Li H., Menon N.K., Neuhaus E.B., Brewer J.M., Byeona I.-J.L., Ray D.G., Vitek M.P., Iwashita T., Makula R.A., Przybyla A.B., Zagorski M.G. Solution NMR Studies of the Aβ(1-40) and Aβ(1-42) Peptides Establish that the Met35 Oxidation State Affects the Mechanism of Amyloid Formation // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, P. 1992-2005.
- 235. Lee J.P., Stimson E.R., Ghilardi J.R., Mantyh P.W., Lu Y.-A., Felix A.M., Llanos W., Behbin A., Cummings M., Van Criekinge M., Timms W., Maggio J.E. <sup>1</sup>H NMR of Aβ amyloid peptide congeners in water solution.

Conformational changes correlate with plaque competence // *Biochemistry*. 1995. Vol. 34, P. 5191-5200.

- 236. Zhang S., Iwata K., Lachenmann M.J., Peng J.W., Li S., Stimson E.R., Lu Y.-A., Felix A.M., Maggio J.E., Lee J.P. The Alzheimer's peptide Aβ adopts a collapsed coil structure in water // J. Struct. Biol. 2000. Vol. 130, P. 130-141.
- 237. Riek R., Guntert P., Dobeli H., Wipf B., Wuthrich K. NMR studies in aqueous solution fail to identify significant conformational differences between the monomeric forms of two Alzheimer peptides with widely different plaque-competence, A beta(1-40)(ox) and A beta(1-42)(ox) // Eur. J. Biochem. 2001. Vol. 268, no. 22. P. 5930-5936.
- Serpell L.C. Alzheimer?s amyloid fibrils: structure and assembly // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1502, P. 16-30.
- 239. Massi F., Peng J.W., Lee J.P., Straub J.E. Simulation study of the structure and dynamics of the Alzheimer?s amyloid peptide congener in solution // Biophys. J. 2001. Vol. 80, P. 31-44.
- 240. *Massi F., Straub J.E.* Structural and dynamical analysis of the hydration of the Alzheimer's β-amyloid peptide // *J. Comput. Chem.* 2003. Vol. 24, P. 143-153.
- 241. Massi F., Klimov D., Thirumalai D., Straub J.E. Charge states rather than propensity for β-structure determine enhanced fibrillogenesis in wild-type Alzheimer's β-amyloid peptide compared to E22Q Dutch mutant // Protein Sci. 2002. Vol. 11, P. 1639-1647.
- 242. Han W., Wu Y.-D. A Strand-Loop-Strand Structure Is a Possible Intermediate in Fibril Elongation: Long Time Simulations of Amyloid-β Peptide (10-35) // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127, no. 44. P. 15408-15416.
- 243. Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.-E. Amyloid β-protein monomer structure: a computational and experimental study // Protein Sci. 2006. Vol. 15, no. 3. P. 420-430.

- 244. *Roux B*. Implicit Solvent Models // Computational Biochemistry and Biophysics в 0 томах. : CRC Press, 2001.
- 245. Yu Z.Y., Jacobson M.P., Josovitz J., Rapp C.S., Friesner R.A. First-shell solvation of ion pairs: Correction of systematic errors in implicit solvent models // J. Phys. Chem. B. 2004. Vol. 108, no. 21. P. 6643-6654.
- 246. Jang H., Zheng J., Nussinov R. Models of beta-amyloid ion channels in the membrane suggest that channel formation in the bilayer is a dynamic process // Biophys. J. 2007. Vol. 93, P. 1938-1949.
- 247. *Petkova A.T., Yau W.-M., Tycko R.* Experimental Constraints on Quaternary Structure in Alzheimer's β-Amyloid Fibrils // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45, no. 2. P. 498-512.
- 248. Esler W.P., Felix A.M., Stimson E.R., Lachenmann M.J., Ghilardi J.R., Lu Y.-A., Vinters H.V., Mantyh P.W., Lee J.P., Maggio J.E. Activation Barriers to Structural Transition Determine Deposition Rates of Alzheimer's Disease Aβ Amyloid // J. Str. Biol. 2000. Vol. 130, P. 174-183.
- 249. Serpell L.C., Fraser P.E., Sunde M. X-Ray fiber diffraction of amyloid fibrils // Methods Enzymol. Vol. Volume 309, Ronald W. : Academic Press, 1999. P. 526-536.
- 250. Petkova A.T., Buntkowsky G., Dyda F., Leapman R.D., Yau W.M., Tycko R. Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel beta-sheet registry in fibrils formed by a beta-amyloid peptide // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 335, no. 1. P. 247-260.
- 251. Kirschner D.A., Abraham C., Selkoe D.J. X-Ray-Diffraction from Intraneuronal Paired Helical Filaments and Extraneuronal Amyloid Fibers in Alzheimer-Disease Indicates Cross-Beta Conformation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1986. Vol. 83, no. 2. P. 503-507.

- 252. Batten R.D., Huse D.A., Stillinger F.H., Torquato S. Novel ground-state crystals with controlled vacancy concentrations: From kagome to honeycomb to stripes // Soft Matter. 2011. Vol. 7, no. 13. P. 6194-6204.
- Liu Y.H., Chew L.Y., Yu M.Y. Self-assembly of complex structures in a twodimensional system with competing interaction forces // Phys Rev E. 2008. Vol. 78, no. 6. P. 066405.
- 254. *Henderson R.L.* A uniqueness theorem for fluid pair correlation functions // *Phys. Lett. A.* 1974. Vol. 49, no. 3. P. 197-198.
- 255. Schommers W. Pair Potential for Liquid Rubidium from Pair Correlation-Function // Phys. Lett. A. 1973. Vol. 43, no. 2. P. 157-158.
- 256. *Schommers W.* Pair Potentials in Disordered Many-Particle Systems a Study for Liquid Gallium // *Phys. Rev. A.* 1983. Vol. 28, no. 6. P. 3599-3605.
- 257. Levesque D., Weis J.J., Reatto L. Pair Interaction from Structural Data for Dense Classical Liquids // Phys. Rev. Lett. 1985. Vol. 54, no. 5. P. 451-454.
- 258. Soper A.K. Empirical potential Monte Carlo simulation of fluid structure // *Chem. Phys.* 1996. Vol. 202, no. 2-3. P. 295-306.
- 259. Praprotnik M., Delle Site L., Kremer K. Multiscale simulation of soft matter: From scale bridging to adaptive resolution // Annu. Rev. Phys. Chem. 2008. Vol. 59, P. 545-571.
- 260. Cardinaux F., Zaccarelli E., Stradner A., Bucciarelli S., Farago B., Egelhaaf S.U., Sciortino F., Schurtenberger P. Cluster-driven dynamical arrest in concentrated lysozyme solutions // The Journal of Physical Chemistry B. 2011. Vol. 115, no. 22. P. 7227-7237.
- 261. Louis A., Bolhuis P., Hansen J., Meijer E. Can polymer coils be modeled as "soft colloids"? // Phys. Rev. Lett. 2000. Vol. 85, no. 12. P. 2522.
- 262. *Panagiotopoulos A.Z.* Gibbs ensemble techniques // Observation, prediction and simulation of phase transitions in complex fluids : Springer, 1995. P. 463-501.

- 263. Kern N., Frenkel D. Fluid–fluid coexistence in colloidal systems with shortranged strongly directional attraction // The Journal of chemical physics. 2003. Vol. 118, no. 21. P. 9882-9889.
- 264. Taratuta V.G., Holschbach A., Thurston G.M., Blankschtein D., Benedek G.B. Liquid-liquid phase separation of aqueous lysozyme solutions: effects of pH and salt identity // J. Phys. Chem. 1990. Vol. 94, no. 5. P. 2140-2144.
- 265. *Haas C., Drenth J., Wilson W.W.* Relation between the solubility of proteins in aqueous solutions and the second virial coefficient of the solution // *The Journal of Physical Chemistry B.* 1999. Vol. 103, no. 14. P. 2808-2811.
- Curtis R., Blanch H., Prausnitz J. Calculation of phase diagrams for aqueous protein solutions // The Journal of Physical Chemistry B. 2001. Vol. 105, no. 12. P. 2445-2452.
- 267. Gögelein C., Nägele G., Tuinier R., Gibaud T., Stradner A., Schurtenberger P.
  A simple patchy colloid model for the phase behavior of lysozyme dispersions
  // The Journal of chemical physics. 2008. Vol. 129, no. 8. P. 08B615.
- 268. Lomakin A., Asherie N., Benedek G.B. Aeolotopic interactions of globular proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96, P. 9465-9468.
- Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer E.F., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. Protein Data Bank Computer-Based Archival File for Macromolecular Structures // J. Mol. Biol. 1977. Vol. 112, no. 3. P. 535-542.
- 270. Mossa S., Sciortino F., Tartaglia P., Zaccarelli E. Ground-state clusters for short-range attractive and long-range repulsive potentials // Langmuir. 2004. Vol. 20, no. 24. P. 10756-10763.
- 271. Sciortino F., Tartaglia P., Zaccarelli E. One-dimensional cluster growth and branching gels in colloidal systems with short-range depletion attraction and screened electrostatic repulsion // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109, no. 46. P. 21942-21953.

- 272. *De Gennes P.G.* Scaling Concepts in Polymer Physics. New York : Cornell University Press, 1979.
- 273. Baumketner A. Electric Field as a Disaggregating Agent for Amyloid Fibrils // J. Phys. Chem. B. 2014. Vol. 118, no. 50. P. 14578-14589.
- 274. Dobnikar J., Fornleitner J., Kahl G. Ground states of model core-softened colloids // J Phys-Condens Mat. 2008. Vol. 20, no. 49. P. 494220.
- Malescio G., Pellicane G. Stripe phases from isotropic repulsive interactions // Nat. Mater. 2003. Vol. 2, no. 2. P. 97-100.
- 276. Zaccarelli E. Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes // J Phys-Condens Mat. 2007. Vol. 19, no. 32. P. 323101.
- 277. Guo Z., Brooks III C.L. Thermodynamics of Protein Folding: A Statistical Mechanical Study of a Small All-β Protein // Biopolymers. 1997. Vol. 42, P. 745-757.
- 278. Zhou H.-X., Dill K.A. Stabilization of proteins in confined spaces // Biochemistry. 2001. Vol. 40, no. 38. P. 11289-11293.
- Socci N.D., Onuchic J.N. Folding kinetics of proteinlike heteropolymers // J. Chem. Phys. 1994. Vol. 101, no. 2. P. 1519-1528.
- Lee C.-L., Stell G., Wang J. First-passage time distribution and non-Markovian diffusion dynamics of protein folding // J. Chem. Phys. 2003. Vol. 118, P. 959-968.
- 281. Cieplak M., Hoang T.X., Li M.S. Scaling of Folding Properties in Simple Models of Proteins // Phys. Rev. Lett. 1999. Vol. 83, no. 8. P. 1684-1687.
- Thirumalai D., Lorimer G.H. Chaperonin-mediated protein folding // Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2001. Vol. 30, P. 245-269.
- 283. Baumketner A., Shea J.-E. Effects of frustration on the kinetics of helix formation in alanine polypeptides // Condensed Matter Physics. 2004. Vol. 7, no. 2. P. 421–434.

- 284. Baumketner A., Shea J.E. Kinetics of the coil-to-helix transition on a rough energy landscape // Phys. Rev. E. 2003. Vol. 68, no. 5. P. 051901.
- Bryngelson J.D., Wolynes P.G. Intermediates and Barrier Crossing in a Random Energy Model (with Applications to Protein Folding) // J. Phys. Chem. 1989. Vol. 93, P. 6902-6915.
- Onuchic J.N., Luthey-Schulten Z., Wolynes P.G. Theory of Protein Folding: The Energy Landscape Perspective // Annu. Rev. Phys. Chem. 1997. Vol. 48, P. 545-600.
- 287. *Klimov D.K., Thirumalai D.* Criterion that Determines the Foldability of Proteins // *Phys Rev Letters*. 1996. Vol. 76, no. 21. P. 4070-4073.
- 288. Veitshans T., Klimov D., Thirumalai D. Protein folding kinetics: timescales, pathways and energy landscapes in terms of sequence-dependent properties // *Fold. Des.* 1996. Vol. 2, no. 1. P. 1-22.
- 289. Klimov D.K., Thirumalai D. Linking rates of folding in lattice models of proteins with underlying thermodynamic characteristics // J. Chem. Phys. 1998. Vol. 109, no. 10. P. 4119-4125.
- 290. *Camacho C.J., Thirumalai D.* Kinetics and Thermodynamics of Folding in Model Protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90, P. 6369-6372.
- 291. Shea J.-E., Nochomovitz Y.D., Guo Z., Brooks III C.L. Exploring the space of protein folding Hamiltonians: The balance of forces in a minimalist β-barrel model // J. Chem. Phys. 1998. Vol. 109, no. 7. P. 2895-2903.
- Nymeyer H., García A.E., Onuchic J.N. Folding funnels and frustration in offlattice minimalist protein landscapes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95, P. 5921-5928.
- 293. Shea J.-E., Onuchic J.N., Brooks III C.L. Energetic frustration and the nature of the transition state in protein folding // J. Chem. Phys. 2000. Vol. 113, no. 17. P. 7663-7671.

- 294. Cheung M.S., Garcia A.E., Onuchic J.N. Protein folding mediated by solvation: Water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. Vol. 99, no. 2. P. 685-690.
- 295. Shea J.-E., Onuchic J.N., Brooks III C.L. Exploring the origins of topological frustration: Design of a minimally frustrated model of fragment B of protein A // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96, P. 12512-12517.
- 296. Klimov D.K., Thirumalai D. Stiffness of the distal loop restricts the structural heterogeneity of the transition state ensemble in SH3 domains // J. Mol. Biol. 2002. Vol. 315, P. 721-737.
- 297. Chan H.S., Dill K.A. Energy landscapes and the collapse dynamics of homopolymers // J. Chem. Phys. 1993. Vol. 99, no. 3. P. 2116-2127.
- 298. Chan H.S. Modelling protein folding by Monte Carlo dynamics: chevron plots, chevron rollover and non-Arrhenius kinetics. — Singapore : World Scientific, 1997.
- Thirumalai D., Klimov D.K. Deciphering the timescales and mechanisms of protein folding using minimal off-lattice models // Curr. Opin. Struct. Biol. 1999. Vol. 9, P. 197-207.
- 300. Creighton T.E. Protein Folding. New York : W.H. Freeman and Co., 1992.
- 301. Klimov D.K., Newfield D., Thirumalai D. Simulations of β-hairpin folding confined to spherical pores using distributed computing // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, no. 12. P. 8019-8024.
- 302. Friedel M., Sheeler D.J., Shea J.-E. Effects of confinement and crowding on the thermodynamics and kinetics of folding of an off-lattice beta barrel model // J. Chem. Phys. 2003. Vol. 118, P. 8106-8113.
- 303. *Jewett A., Baumketner A., Shea J.E.* Accelerated folding in the weak hydrophobic environment of a chaperonin cavity: Creation of an alternate fast

folding pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, no. 36. P. 13192-13197.

- Klimov D., Thirumalai D. Viscosity Dependence of the Folding Rates of Proteins // Phys Rev Letters. 1997. Vol. 79, no. 2. P. 317-320.
- 305. Baumketner A., Hiwatari Y. Diffusive dynamics of protein folding studied by molecular dynamics simulations of an off-lattice model // Phys Rev E. 2002. Vol. 66, no. 1. P. 011905.
- 306. Ferrenberg A.M., Swendsen R.H. Optimized Monte-Carlo Data-Analysis // Phys. Rev. Lett. 1989. Vol. 63, no. 12. P. 1195-1198.
- 307. Kaminski G.A., Friesner R.A., Tirado-Rives J., Jorgensen W.L. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides // J. Phys. Chem. B. 2001. Vol. 105, P. 6474-6487.
- 308. Blondelle S.E., Forood B., Houghten R.A., PerezPaya E. Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes // Biochemistry. 1997. Vol. 36, no. 27. P. 8393-8400.
- 309. Lyubartsev A.P., Laaksonen A. Calculation of Effective Interaction Potentials from Radial-Distribution Functions - a Reverse Monte-Carlo Approach // Phys Rev E. 1995. Vol. 52, no. 4. P. 3730-3737.
- 310. Ercolessi F., Adams J.B. Interatomic Potentials from 1st-Principles Calculations
  the Force-Matching Method // Europhys. Lett. 1994. Vol. 26, no. 8. P. 583-588.
- Izvekov S., Voth G.A. A multiscale coarse-graining method for biomolecular systems // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109, no. 7. P. 2469-2473.
- 312. Zhou J., Thorpe I.F., Izvekov S., Voth G.A. Coarse-grained peptide modeling using a systematic multiscale approach // Biophys. J. 2007. Vol. 92, no. 12. P. 4289-4303.

- 313. Liu P., Izvekov S., Voth G.A. Multiscale coarse-graining of monosaccharides // J. Phys. Chem. B. 2007. Vol. 111, no. 39. P. 11566-11575.
- 314. *Izvekov S., Voth G.A.* Solvent-Free Lipid Bilayer Model Using Multiscale Coarse-Graining // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, no. 13. P. 4443-4455.
- 315. Guenot J., Kollman P.A. Molecular dynamics studies of a DNA-binding protein: 2. An evaluation of implicit and explicit solvent models for the molecular dynamics simulation of Escherichia coli trp repressor // Protein Sci. 1992. Vol. 1, P. 1185-1205.
- 316. *Kim S., Takeda T., Klimov D.K.* Mapping Conformational Ensembles of A beta Oligomers in Molecular Dynamics Simulations // *Biophys. J.* 2010. Vol. 99, no. 6. P. 1949-1958.
- 317. Almarza N.G., Lomba E. Determination of the interaction potential from the pair distribution function: An inverse Monte Carlo technique // Phys Rev E. 2003. Vol. 68, no. 1. P. 011202.
- 318. *Poland D., Scheraga H.A.* Theory of helix-coil transitions in biopolymers; statistical mechanical theory of order-disorder transitions in biological macromolecules. : Academic Press New York, 1970.
- 319. Best R.B., Hummer G. Optimized Molecular Dynamics Force Fields Applied to the Helix-Coil Transition of Polypeptides // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, no. 26. P. 9004-9015.
- 320. Gnanakaran S., Garcia A.E. Validation of an all-atom protein force field: From dipeptides to larger peptides // J. Phys. Chem. B. 2003. Vol. 107, P. 12555-12557.
- 321. Chiti F., Calamai M., Taddei N., Stefani M., Ramponi G., Dobson C.M. Studies of the aggregation of mutant proteins in vitro provide insights into the genetics of amyloid diseases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, P. 16419-16426.

- 322. Shakhnovich E.I., Gutin A.M. Formation of Unique Structure in Polypeptide-Chains Theoretical Investigation with the Aid of a Replica Approach // Biophys. Chem. 1989. Vol. 34, no. 3. P. 187-199.
- 323. Pande V.S., Grosberg A.Y., Tanaka T. Heteropolymer freezing and design: Towards physical models of protein folding // Reviews of Modern Physics. 2000. Vol. 72, no. 1. P. 259-314.
- 324. Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // J. Chem. Theory Comput. 2008. Vol. 4, no. 3. P. 435-447.
- 325. Sugita Y., Okamoto Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding // Chem. Phys. Lett. 1999. Vol. 314, P. 141-151.
- 326. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations // J. Comput. Chem. 1997. Vol. 18, no. 12. P. 1463-1472.
- 327. Miyamoto S., Kollman P.A. SETTLE: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithms for Rigid Water Models // J. Comp. Chem. 1992. Vol. 13, P. 952-962.
- 328. Nose S. Constant Temperature Molecular-Dynamics Methods // Progress of Theoretical Physics Supplement. 1991. no. 103. P. 1-46.
- 329. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G. A smooth particle mesh Ewald method // J. Chem. Phys. 1995. Vol. 103, no. 19. P. 8577-8593.
- 330. Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features // Biopolymers. 1983. Vol. 22, no. 12. P. 2577-637.
- 331. Garcia A.E., Onuchic J.N. Folding a protein in a computer: an atomic description of the folding/unfolding of protein A // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003. Vol. 100, no. 24. P. 13898-903.
- 332. Stillinger F.H., Weber T.A. Hidden Structure in Liquids // Phys. Rev. A. 1982.Vol. 25, no. 2. P. 978-989.
- Baumketner A., Shea J.E., Hiwatari Y. Glass transition in an off-lattice protein model studied by molecular dynamics simulations // Phys. Rev. E. 2003. Vol. 67, no. 1. P. 011912.
- 334. Friedel M., Baumketner A., Shea J.E. Stability of a protein tethered to a surface // J. Chem. Phys. 2007. Vol. 126, no. 9. P. 095101.
- 335. *Nguyen H.D., Hall C.K.* Phase diagrams describing fibrillization by polyalanine peptides // *Biophys. J.* 2004. Vol. 87, no. 6. P. 4122-4134.
- 336. Harper J.D., Lansbury J., P. T. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins // Annu. Rev. Biochem. 1997. Vol. 66, P. 385-407.
- 337. Schlueter R.D., Budinger T.F. Magic angle rotating. field NMR/MRI magnet for in vivo monitoring of tissue // IEEE Trans. Appl. Supercond. 2008. Vol. 18, no. 2. P. 864-867.
- 338. Wiggins C.M., Wright S.E. Switching Transient Fields in Substations // IEEE Trans. Power Delivery. 1991. Vol. 6, no. 2. P. 591-600.
- 339. Sheppard A.R., Swicord M.L., Balzano Q. Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes // Health Phys. 2008. Vol. 95, no. 4. P. 365-396.
- 340. *Astumian R.D., Robertson B.* Nonlinear Effect of an Oscillating Electric-Field on Membrane-Proteins // J. Chem. Phys. 1989. Vol. 91, no. 8. P. 4891-4901.
- 341. Stygar W.A., Wagoner T.C., Ives H.C., Wallace Z.R., Anaya V., Corley J.P., Cuneo M.E., Harjes H.C., Lott J.A., Mowrer G.R., Puetz E.A., Thompson T.A., Tripp S.E., VanDevender J.P., Woodworth J.R. Water-dielectric-breakdown relation for the design of large-area multimegavolt pulsed-power systems // Phys. Rev. ST Accel. Beams. 2006. Vol. 9, no. 7. P. 070401.

- 342. Singh G., Brovchenko I., Oleinikova A., Winter R. Demixing Transition of the Aqueous Solution of Amyloidogenic Peptides: A REMD Simulation Study // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, no. 29. P. 9863-9870.
- 343. *Rochet J.-C., Lansbury P.T.* Amyloid fibrillogenesis: themes and variations // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. Vol. 10, no. 1. P. 60-68.
- 344. *Toschi F., Lugli F., Biscarini F., Zerbetto F.* Effects of Electric Field Stress on a beta-Amyloid Peptide // *J. Phys. Chem. B.* 2009. Vol. 113, no. 1. P. 369-376.
- 345. Calvo F., Dugourd P. Folding of gas-phase polyalanines in a static electric field: Alignment, deformations, and polarization effects // Biophys. J. 2008. Vol. 95, no. 1. P. 18-32.
- 346. Yoshioka K., Fujimori M., Kikuchi K. Electro-Optical Studies on the Electric Field-Induced Helix-to-Coil Transition of Poly(L-Ornithine Hydrobromide) in Methanol-Water Mixtures // Int. J. Biol. Macromol. 1980. Vol. 2, no. 4. P. 213-216.
- 347. *Ruppel K.M., Spudich J.A.* Structure-function analysis of the motor domain of myosin // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996. Vol. 12, P. 543-573.
- 348. Van Driest S.L., Ommen S.R., Vasile V.C., Will M.L., Tajik A.J., Gersh B.J., Ackerman M.J. Comprehensive mutational analysis of myosin binding protein C in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy // J. Am. Coll. Cardiol. 2004. Vol. 43, no. 5. P. 165a-165a.
- 349. Onufriev A., Bashford D., Case D.A. Exploring protein native states and largescale conformational changes with a modified generalized born model // Proteins-Structure Function and Bioinformatics. 2004. Vol. 55, no. 2. P. 383-394.
- Geeves M.A., Holmes K.C. Structural mechanism of muscle contraction // Annu. Rev. Biochem. 1999. Vol. 68, P. 687-728.

- Sasaki N., Shimada T., Sutoh K. Mutational analysis of the switch II loop of Dictyostelium myosin II // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273, no. 32. P. 20334-20340.
- 352. Onishi H., Kojima S., Katoh K., Fujiwara K., Martinez H.M., Morales M.F. Functional transitions in myosin: Formation of a critical salt-bridge and transmission of effect to the sensitive tryptophan // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998. Vol. 95, no. 12. P. 6653-6658.
- 353. Furch M., Fujita-Becker S., Geeves M.A., Holmes K.C., Manstein D.J. Role of the salt-bridge between switch-1 and switch-2 of Dictyostelium myosin // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 290, no. 3. P. 797-809.
- 354. *Murphy C.T., Rock R.S., Spudich J.A.* A myosin II mutation uncouples ATPase activity from motility and shortens step size // *Nat. Cell Biol.* 2001. Vol. 3, no. 3. P. 311-315.
- 355. *Gulick A.M., Bauer C.B., Thoden J.B., Rayment I.* X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36, no. 39. P. 11619-28.
- 356. Fisher A.J., Smith C.A., Thoden J.B., Smith R., Sutoh K., Holden H.M., Rayment I. X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AlF4 // Biochemistry. 1995. Vol. 34, no. 28. P. 8960-72.
- 357. *Smith P.E., Pettitt B.M.* Ewald artifacts in liquid state molecular dynamics simulations // *J. Chem. Phys.* 1996. Vol. 105, no. 10. P. 4289-4293.
- 358. Phan B.C., Cheung P., Stafford W.F., Reisler E. Complexes of myosin subfragment-1 with adenosine diphosphate and phosphate analogs: probes of active site and protein conformation // Biophys. Chem. 1996. Vol. 59, no. 3. P. 341-9.

- 359. Woodward S.K.A., Eccleston J.F., Geeves M.A. Kinetics of the Interaction of 2'(3')-O-(N-Methylanthraniloyl)-Atp with Myosin Subfragment-1 and Actomyosin Subfragment-1 - Characterization of 2 Acto.S1.Adp Complexes // Biochemistry. 1991. Vol. 30, no. 2. P. 422-430.
- 360. Jahn W. The association of actin and myosin in the presence of gamma-amido-ATP proceeds mainly via a complex with myosin in the closed conformation // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46, no. 33. P. 9654-9664.
- 361. Johnson K.A., Taylor E.W. Intermediate States of Subfragment-1 and Actosubfragment-1 Atpase - Re-Evaluation of Mechanism // Biochemistry. 1978. Vol. 17, no. 17. P. 3432-3442.
- 362. Kovacs M., Malnasi-Csizmadia A., Woolley R.J., Bagshaw C.R. Analysis of nucleotide binding to Dictyostelium myosin II motor domains containing a single tryptophan near the active site // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, no. 32. P. 28459-67.
- 363. Naber N., Purcell T.J., Pate E., Cooke R. Dynamics of the nucleotide pocket of myosin measured by spin-labeled nucleotides // Biophys. J. 2007. Vol. 92, no. 1. P. 172-84.
- 364. Wang J.M., Cieplak P., Kollman P.A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? // J. Comput. Chem. 2000. Vol. 21, no. 12. P. 1049-1074.
- 365. Sorin E.J., Pande V.S. Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations // Biophys. J. 2005. Vol. 88, no. 4. P. 2472-2493.
- Schrodinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
   2010.
- 367. *Baumketner A., Shea J.-E.* Folding landscapes of the Alzheimer amyloid-β(12-28) peptide // *J. Mol. Biol.* 2006. Vol. 362, no. 3. P. 567-579.

328

- 368. Shih W.M., Spudich J.A. The myosin relay helix to converter interface remains intact throughout the actomyosin ATPase cycle // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, no. 22. P. 19491-19494.
- 369. Ruppel K.M., Spudich J.A. Structure-function studies of the myosin motor domain: Importance of the 50-kDa cleft // Mol. Biol. Cell. 1996. Vol. 7, no. 7. P. 1123-1136.
- 370. Patterson B., Spudich J.A. Cold-sensitive mutations of Dictyostelium myosin heavy chain highlight functional domains of the myosin motor // Genetics. 1996. Vol. 143, no. 2. P. 801-810.
- 371. Ohki T., Mikhailenko S.V., Morales M.F., Onishi H., Mochizuki N. Transmission of force and displacement within the myosin molecule // Biochemistry. 2004. Vol. 43, no. 43. P. 13707-13714.
- 372. *Seidman J.G.* Genomics of Cardiovascular Development, Adaptation, and Remodeling. NHLBI Program for Genomic Applications, Harvard Medical School. URL: http://www.cardiogenomics.org.
- 373. Rayment I., Rypniewski W.R., Schmidtbase K., Smith R., Tomchick D.R., Benning M.M., Winkelmann D.A., Wesenberg G., Holden H.M. 3-Dimensional Structure of Myosin Subfragment-1 - a Molecular Motor // Science. 1993. Vol. 261, no. 5117. P. 50-58.
- 374. Weiss A., Schiaffino S., Leinwand L.A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: Implications for functional diversity // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 290, no. 1. P. 61-75.
- 375. Daura X., Gademann K., Jaun B., Seebach D., van Gunsteren W.F., Mark A.E. Peptide folding: When simulation meets experiment // Angew Chem Int Edit. 1999. Vol. 38, no. 1-2. P. 236-240.
- 376. *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 // Proteins-Structure Function and Bioinformatics. 2012. Vol. 80, no.6. P. 1569-1581.

- 377. Zhuravlev P.I., Papoian G.A. Protein functional landscapes, dynamics, allostery: a tortuous path towards a universal theoretical framework // Q. Rev. Biophys. 2010. Vol. 43, no. 3. P. 295-332.
- 378. Elber R., Karplus M. A method for determining reaction paths in large molecules: Application to myoglobin // Chem. Phys. Lett. 1987. Vol. 139, no. 5. P. 375-380.
- 379. Faradjian A.K., Elber R. Computing time scales from reaction coordinates by milestoning // The Journal of chemical physics. 2004. Vol. 120, no. 23. P. 10880-10889.
- 380. Bolhuis P.G., Chandler D., Dellago C., Geissler P.L. Transition path sampling: Throwing ropes over rough mountain passes, in the dark // Annu. Rev. Phys. Chem. 2002. Vol. 53, no. 1. P. 291-318.
- 381. van Erp T.S., Moroni D., Bolhuis P.G. A novel path sampling method for the calculation of rate constants // The Journal of chemical physics. 2003. Vol. 118, no. 17. P. 7762-7774.
- 382. *Henkelman G., Jónsson H.* Improved tangent estimate in the nudged elastic band method for finding minimum energy paths and saddle points // *The Journal of chemical physics*. 2000. Vol. 113, no. 22. P. 9978-9985.
- 383. Maragliano L., Fischer A., Vanden-Eijnden E., Ciccotti G. String method in collective variables: Minimum free energy paths and isocommittor surfaces // The Journal of chemical physics. 2006. Vol. 125, no. 2. P. 024106.
- 384. Chodera J.D., Swope W.C., Noé F., Prinz J.-H., Shirts M.R., Pande V.S. Dynamical reweighting: Improved estimates of dynamical properties from simulations at multiple temperatures // The Journal of chemical physics. 2011. Vol. 134, no. 24. P. 06B612.

- 385. *Muff S., Caflisch A.* ETNA: equilibrium transitions network and Arrhenius equation for extracting folding kinetics from REMD simulations // *The Journal of Physical Chemistry B.* 2009. Vol. 113, no. 10. P. 3218-3226.
- 386. Laio A., Gervasio F.L. Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science // Reports on Progress in Physics. 2008. Vol. 71, no. 12. P. 126601.
- 387. Houdusse A., Kalabokis V.N., Himmel D., Szent-Gyorgyi A.G., Cohen C. Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head // Cell. 1999. Vol. 97, no. 4. P. 459-70.
- 388. Dahan M., Deniz A.A., Ha T., Chemla D.S., Schultz P.G., Weiss S. Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules // Chem. Phys. 1999. Vol. 247, P. 85.
- 389. Agafonov R.V., Negrashov I.V., Blakely S.E., Titus Margaret A., Nesmelov Y.E., Thomas D.D. Structural Basis for Uncoupling of Force Generation in the F506A Dictyostelium Myosin Revealed by Time-Resolved EPR and FRET // Biophys. J. 2010. Vol. 98, no. 3, Supplement 1. P. 143a-143a.
- 390. *Baumketner A., Shea J.E.* Free energy landscapes for amyloidogenic tetrapeptides dimerization // *Biophys. J.* 2005. Vol. 89, no. 3. P. 1493-1503.
- 391. Soto P., Baumketner A., Shea J.E. Aggregation of polyalanine in a hydrophobic environment // J. Chem. Phys. 2006. Vol. 124, no. 13. P. 134904.
- 392. Bernstein S.L., Wyttenbach T., Baumketner A., Shea J.E., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T. Amyloid beta-protein: Monomer structure and early aggregation states of A beta 42 and its Pro(19) alloform // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127, no. 7. P. 2075-2084.
- 393. Lazo N.D., Grant M.A., Condron M.C., Rigby A.C., Teplow D.B. On the nucleation of amyloid β-protein monomer folding // Protein Sci. 2005. Vol. 14, no. 1581-1596. P. 1581.

- 394. Chen W., Mousseau N., Derreumaux P. The conformations of the amyloid-beta (21-30) fragment can be described by three families in solution // J. Chem. Phys. 2006. Vol. 125, no. 8. P. 084911.
- 395. Borreguero J.M., Urbanc B., Lazo N.D., Buldyrev S.V., Teplow D.B., Stanley H.E. Folding events in the 21-30 region of amyloid β-protein (Aβ) studied in silico // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. Vol. 102, no. 17. P. 6015-6020.
- 396. Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Lazo N.D., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. Structure of the 21-30 fragment of amyloid beta-protein // Protein Sci. 2006. Vol. 15, no. 6. P. 1239-1247.
- 397. Murray M.M., Krone M.G., Bernstein S.L., Baumketner A., Condron M.M., Lazo N.D., Teplow D.B., Wyttenbach T., Shea J.E., Bowers M.T. Amyloid beta-Protein: Experiment and Theory on the 21-30 Fragment // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, no. 17. P. 6041-6046.
- 398. Krone M.G., Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Lazo N.D., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. Effects of familial Alzheimer's disease mutations on the folding nucleation of the amyloid beta-protein // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 381, no. 1. P. 221-228.
- 399. Baumketner A., Shea J.-E. The structure of the Alzheimer amyloid-β(10-35) peptide probed through replica-exchange molecular dynamics simulations in explicit solvent // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 366, no. 1. P. 275-285.
- 400. Esler W.P., Stimson E.R., Ghilardi J.R., Lu Y.-A., Felix A.M., Vinters H.V., Mantyh P.W., Lee J.P., Maggio J.E. Point substitutions in the central hydrophobic cluster of a human β-amyloid congener disrupts peptide folding and abolishes plaque competence // Biochemistry. 1996. Vol. 35, P. 13914-13921.
- 401. *Zhang S.S., Casey N., Lee J.P.* Residual structure in the Alzheimer's disease peptide: probing the origin of a central hydrophobic cluster // *Fold. Des.* 1998. Vol. 3, no. 5. P. 413-422.

- 402. *Klimov D.K., Thirumalai D.* Dissecting the assembly of A beta(16-22) amyloid peptides into antiparallel beta sheets // *Structure*. 2003. Vol. 11, no. 3. P. 295-307.
- 403. Zheng J., Jang H., Ma B., Nussinov R. Annular structures as intermediates in fibril formation of Alzheimer A beta(17-42) // J. Phys. Chem. B. 2008. Vol. 112, no. 22. P. 6856-6865.
- 404. Buchete N.V., Hummer G. Structure and dynamics of parallel beta-sheets, hydrophobic core, and loops in Alzheimer's A beta fibrils // Biophys. J. 2007. Vol. 92, no. 9. P. 3032-3039.
- 405. *Han W., Wu Y.D.* Molecular dynamics studies of hexamers of amyloid-beta peptide (16-35) and its mutants: Influence of charge states on amyloid formation // *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*. 2007. Vol. 66, no. 3. P. 575-587.
- 406. Petkova A.T., Ishii Y., Balbach J.J., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Delaglio F., Tycko R. A structural model of Alzheimer's β-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. Vol. 99, no. 26. P. 16742-16747.
- 407. Sgourakis N.G., Yan Y., McCallum S.A., Wang C., Garcia A.E. The Alzheimer's peptides Aβ40 and 42 adopt distinct conformation in water: A combined MD/NMR study // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 368, no. 5. P. 1448-1457.
- 408. Kusumoto Y., Lomakin A., Teplow D.B., Benedek G.B. Temperature dependence of amyloid beta-protein fibrillization // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998. Vol. 95, P. 12277-12282.
- 409. Vanbroeckhoven C., Haan J., Bakker E., Hardy J.A., Vanhul W., Wehnert A., Vegtervandervlis M., Roos R.A.C. Amyloid-beta protein-precursor gene and hereditary cerebral-hemorrhage with amyloidosis (dutch) // Science. 1990. Vol. 248, P. 1120-1122.

- 410. Paivio A., Jarvet J., Graslund A., Lannfelt L., Westlind-danielsson A. Unique physicochemical profile of alpha-amyloid peptide variant A beta 1-40E22G protofibrils: Conceivable neuropathogen in arctic mutant carriers // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 339, P. 145-159.
- 411. Kodali R., Wetzel R. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly // Curr. Opin. Str. Biol. 2007. Vol. 17, P. 48-57.
- 412. Esler W.P., Stimson E.R., Ghilardi J.R., Vinters H.V., Lee J.P., Mantyh P.W., Maggio J.E. In vitro growth of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques displays first-order kinetics // Biochemistry. 1996. Vol. 35, P. 749-757.
- 413. Esler W.P., Stimson E.R., Jennings J.M., Vinters H.V., Ghilardi J.R., Lee J.P., Mantyh P.W., Maggio J.E. Alzheimer?s Disease Amyloid Propagation by a Template-Dependent Dock-Lock Mechanism // Biochemistry. 2000. Vol. 39, no. 21. P. 6288-6295.
- 414. Cannon M.J., Williams A.D., Wetzel R., Myszka D.G. Kinetic analysis of betaamyloid fibril elongation // Anal. Biochem. 2004. Vol. 328, P. 67-75.
- 415. Ban T., Hoshino M., Takahashi S., Hamada D., Hasegawa K., Naiki H., Goto Y.
  Direct observation of A beta amyloid fibril growth and inhibition // J. Mol. Biol.
  2004. Vol. 344, P. 757-767.
- 416. Soto C., Castano E.M., Frangione B., Inestrosa N.C. The alpha-helical to betastrand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270, P. 3063-3067.
- 417. Miravalle L., Tokuda T., Chiarle R., Giaccone G., Bugiani O., Tagliavini F., Frangione B., Ghiso J. Substitutions at codon 22 of Alzheimer's A beta peptide induce diverse conformational changes and apoptotic effects in human cerebral endothelial cells // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, P. 27110-27116.
- 418. Fraser P.E., Nguyen J.T., Inouye H., Surewicz W.K., Selkoe D.J., Podlisny M.B., Kirschner D.A. Fibril formation by primate, rodent, and dutch-

hemorrhagic analogs of alzheimer amyloid beta-protein // *Biochemistry*. 1992. Vol. 31, P. 10716-10723.

- 419. Vitalis A., Wang X.L., Pappu R.V. Quantitative characterization of intrinsic disorder in polyglutamine: Insights from analysis based on polymer theories // Biophys. J. 2007. Vol. 93, P. 1923-1937.
- 420. Sato T., Kienlen-campard P., Ahmed M., Liu W., Li H.L., Elliott J.I., Aimoto S., Constantinescu S.N., Octave J.N., Smith S.O. Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of A beta 40 and A beta 42 // Biochemistry. 2006. Vol. 45, P. 5503-5516.
- 421. Shea J.-E., Friedel M., Baumketner A. Simulations of protein folding // Rev. Comp. Chem. 2006. Vol. 22, P. 169-219.
- 422. Daggett V., Fersht A. The present view of the mechanism of protein folding // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. Vol. 4, no. 6. P. 497-502.
- 423. *Lindahl E., Hess B., van der Spoel D.* GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis // *J. Mol. Mod.* 2001. Vol. 7, P. 306-317.
- 424. Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. GROMACS: A messagepassing parallel molecular dynamics implementation // Comp. Phys. Comm. 1995. Vol. 91, P. 43-56.
- 425. Okabe T., Kawata M., Okamoto Y., Mikami M. Replica-exchange Monte Carlo method for the isobaric-isothermal ensemble // Chem. Phys. Lett. 2001. Vol. 335, P. 435-439.
- 426. van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., van Buuren A.R., Apol E., Meulenhoff P.J., Tieleman D.P., Sijbers A.L.T.M., Feenstra K.A., van Drunen R., Berendsen H.J.C. Gromacs User Manual version 3.2, www.gromacs.org. 2004.
- 427. *Torrie G.M., Valleau J.P.* Non-Physical Sampling Distributions in Monte-Carlo Free-Energy Estimation Umbrella Sampling // *J. Comput. Phys.* 1977. Vol. 23, no. 2. P. 187-199.

- 428. Ferrenberg A.M., Swendsen R.H. New Monte-Carlo Technique for Studying Phase-Transitions // Phys. Rev. Lett. 1988. Vol. 61, no. 23. P. 2635-2638.
- 429. Lee S.W., Mou Y., Lin S.Y., Chou F.C., Tseng W.H., Chen C., Lu C.Y.D., Yu S.S.F., Chan J.C.C. Steric zipper of the amyloid fibrils formed by residues 109-122 of the Syrian hamster prion protein // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 378, no. 5. P. 1142-1154.
- 430. Sawaya M.R., Sambashivan S., Nelson R., Ivanova M.I., Sievers S.A., Apostol M.I., Thompson M.J., Balbirnie M., Wiltzius J.J.W., McFarlane H.T., Madsen A.O., Riekel C., Eisenberg D. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers // Nature. 2007. Vol. 447, no. 7143. P. 453-457.
- 431. *Gitlin I., Carbeck J.D., Whitesides G.M.* Why are proteins charged?: Networks of charge-charge interactions in proteins measured by charge ladders and capillary electrophoresis // *Angew Chem Int Edit.* 2006. Vol. 45, P. 3022-3060.
- 432. Caughey B., Lansbury P.T. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders // Annu. Rev. Neurosci. 2003. Vol. 26, P. 267-298.
- 433. Xue W.F., Homans S.W., Radford S.E. Systematic analysis of nucleationdependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, no. 26. P. 8926-8931.
- 434. DeLano W.L. The PyMOL Molecular Graphics System // DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA. 2008.
- 435. *Zheng J., Jang H., Ma B., Tsai C.-J., Nussinov R.* Modeling of the Alzheimer Aβ<sub>17-42</sub> fibril architecture: Tight intermolecular sheet-sheet association and intramolecular hydrated cavities // *Biophys. J.* 2007. Vol. 93, P. 3046-3057.
- 436. *Klimov D.K., Straub J.E., Thirumalai D.* Aqueous urea solution destabilizes A beta(16-22) oligomers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. Vol. 101, no. 41. P. 14760-14765.

- 437. Sikorski P., Atkins E.D.T., Serpell L.C. Structure and texture of fibrous crystals formed by Alzheimer's A beta(11-25) peptide fragment // Structure. 2003. Vol. 11, no. 8. P. 915-926.
- 438. Vass E., Hollosi M., Besson F., Buchet R. Vibrational spectroscopic detection of beta- and gamma-turns in synthetic and natural peptides and proteins // Chem. Rev. 2003. Vol. 103, no. 5. P. 1917-1954.
- 439. Barker J.A., Watts R.O. Monte-Carlo Studies of Dielectric Properties of Water-Like Models // Mol. Phys. 1973. Vol. 26, no. 3. P. 789-792.
- 440. Barker J.A. REACTION FIELD, SCREENING, AND LONG-RANGE INTERACTIONS IN SIMULATIONS OF IONIC AND DIPOLAR SYSTEMS // Mol. Phys. 1994. Vol. 83, no. 6. P. 1057-1064.
- 441. *Baumketner A.* Removing systematic errors in interionic potentials of mean force computed in molecular simulations using reaction-field-based electrostatics // J. Chem. Phys. 2009. Vol. 130, no. 10. P. 10.
- 442. Lee M.S., Salsbury F.R., Brooks C.L. Novel generalized Born methods // J. Chem. Phys. 2002. Vol. 116, no. 24. P. 10606-10614.
- 443. *Chandler D.* Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly // *Nature*. 2005. Vol. 437, P. 640-647.

## ДОДАТОК

## А. Список публікацій здобувача за темою дисертації

- Baumketner A., Melnyk R., Holovko M.F., Cai W., Costa D., Caccamo C. Softness and non-spherical shape define the phase behavior and the structural properties of lysozyme in aqueous solutions // J. Chem. Phys. 2016. Vol. 144, no. 1. P. 015103 (4 pages).
- Baumketner A., Cai W. Equilibrium clusters in suspensions of colloids interacting via potentials with a local minimum // Condens. Matter Phys. 2016. Vol. 19, no. 1. P. 13605 (12 pages).
- 3. *Baumketner A., Jewett A., Shea J.-E.* Effects of confinement in chaperonin assisted protein folding: rate enhancement by decreasing the roughness of the folding energy landscape // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 332, no. 3. P. 701-713.
- Jewett A., Baumketner A., Shea J.E. Accelerated folding in the weak hydrophobic environment of a chaperonin cavity: Creation of an alternate fast folding pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, no. 36. P. 13192-13197.
- Baumketner A., Shea J.-E. Effects of frustration on the kinetics of helix formation in alanine polypeptides // Condens. Matter Phys.. 2004. Vol. 7, no. 2. P. 421–434.
- 6. *Baumketner A., Shea J.E.* Kinetics of the coil-to-helix transition on a rough energy landscape // *Phys. Rev. E.* 2003. Vol. 68, no. 5. P. 051901. (10 pages).
- Ni B., Baumketner A. Reduced atomic pair-interaction design (RAPID) model for simulations of proteins // J. Chem. Phys. 2012. Vol. 138, no. 6. P. 064102 (12 pages).
- Baumketner A. Electric Field as a Disaggregating Agent for Amyloid Fibrils // J. Phys. Chem. B. 2014. Vol. 118, no. 50. P. 14578-14589.

- Baumketner A., Nesmelov Y. Early stages of the recovery stroke in myosin II studied by molecular dynamics simulations // Protein Sci. 2011. Vol. 20, no. 12. P. 2013-2022.
- 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 // Proteins Struct. Funct. Bioinf. 2012. Vol. 80, no. 6. P. 1569-1581.
- Baumketner A. The mechanism of the converter domain rotation in the recovery stroke of myosin motor protein // Proteins Struct. Funct. Bioinf. 2012. Vol. 80, no. 12. P. 2701-2710.
- 12. *Baumketner A., Shea J.E.* Free energy landscapes for amyloidogenic tetrapeptides dimerization // *Biophys. J.* 2005. Vol. 89, no. 3. P. 1493-1503.
- 13. *Soto P., Baumketner A., Shea J.E.* Aggregation of polyalanine in a hydrophobic environment // *J. Chem. Phys.* 2006. Vol. 124, no. 13. P. 134904 (7 pages).
- 14. *Baumketner A., Shea J.-E.* Folding landscapes of the Alzheimer amyloid-β(12-28) peptide // *J. Mol. Biol.* 2006. Vol. 362, no. 3. P. 567-579.
- Bernstein S.L., Wyttenbach T., Baumketner A., Shea J.E., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T. Amyloid beta-protein: Monomer structure and early aggregation states of A beta 42 and its Pro(19) alloform // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127, no. 7. P. 2075-2084.
- Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Lazo N.D., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. Structure of the 21-30 fragment of amyloid beta-protein // Protein Sci. 2006. Vol. 15, no. 6. P. 1239-1247.
- Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.-E. Amyloid β-protein monomer structure: a computational and experimental study // Protein Sci. 2006. Vol. 15, no. 3. P. 420-430.
- 18. Teplow D.B., Lazo N.D., Bitan G., Bernstein S., Wyttenbach T., Bowers M.T., Baumketner A., Shea J.E., Urbanc B., Cruz L., Borreguero J., Stanley H.E.

Elucidating amyloid beta-protein folding and assembly: A multidisciplinary approach // Acc. Chem. Res. 2006. Vol. 39, no. 9. P. 635-645.

- Baumketner A., Shea J.-E. The structure of the Alzheimer amyloid-β(10-35) peptide probed through replica-exchange molecular dynamics simulations in explicit solvent // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 366, no. 1. P. 275-285.
- Baumketner A., Krone M.G., Shea J.E. Role of the familial Dutch mutation E22Q in the folding and aggregation of the 15-28 fragment of the Alzheimer amyloid-beta protein // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, no. 16. P. 6027-6032.
- Krone M.G., Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Lazo N.D., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. Effects of familial Alzheimer's disease mutations on the folding nucleation of the amyloid beta-protein // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 381, no. 1. P. 221-228.
- Murray M.M., Krone M.G., Bernstein S.L., Baumketner A., Condron M.M., Lazo N.D., Teplow D.B., Wyttenbach T., Shea J.E., Bowers M.T. Amyloid beta-Protein: Experiment and Theory on the 21-30 Fragment // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, no. 17. P. 6041-6046.
- Negureanu L., Baumketner A. Microscopic Factors that Control beta-Sheet Registry in Amyloid Fibrils Formed by Fragment 11-25 of Amyloid beta Peptide: Insights from Computer Simulations // J. Mol. Biol. 2009. Vol. 389, no. 5. P. 921-937.
- Баумкетнер А. Дослідження білків методом компютерних симуляцій // Різдвяні дискусії. Book of Abstracts. Львів, Україна, 11-12 Січня 2017. Журн. фіз. дослідж. 2017. Vol.21. no.1/2. Р. 1998-8.
- 25. *Stelmakh A., Baumketner A.* Effective attraction between like-charged macroions in aqueous medium // Ulam Computer Simulations Workshop. Book of Abstracts. Lviv, Ukraine, 21-24 June 2017. 2017. P. P26.

- 26. *Baumketner A.* Monte Carlo study of cluster crystals stabilized by hydrophobic and electrostatic interactions // Ulam Computer Simulations Workshop. Book of Abstracts. Lviv, Ukraine, 21-24 June 2017. 2017. P. T1.
- Baumketner A. Biomolecular simulations in generalized non-Boltzmann ensembles // Summer Short Course on Monte Carlo Methods and Applications. Book of Abstracts. Beijin, China, 26-28 June 2016. P. 45-58.
- Баумкетнер А. Кластери білка лізоциму у водному середовищі // Х Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини. Програма. Львів, Україна. 6 Листопад 2015. Р. 1.
- 29. Баумкетнер А. Комп'ютерне моделювання проблеми агрегації білків // XV Всеукраїнська школа-семінар і Конкурс молодих вчених зі статистичної фізики та теорії конденсованої речовини. Програма. Львів, Україна. 4-5 Червня 2015. Р. 1.
- Баумкетнер А. Комп'ютерне моделювання біофізичних процесів // ФЕС-ТИВАЛЬ НАУКИ в Інституті фізики конденсованих систем НАН України Програма. Львів, Україна. 19-21 Травня 2015. Р. 1.
- 31. Баумкетнер А. Згортання та агрегація амилоїдного бета пептиду хвороби Альцгеймера // VIII Робоча нарада з актуальних проблем фізики м'якої речовини. Програма. Львів, Україна. 1 Листопад 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 // 238-th ACS National ACS meeting. Book of Abstracts. Washington, DC, USA, 16-20 August 2009. Vol.238. 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 // Statistical Physics: Modern Trends and Applications. Book of Abstracts. Львів, Україна, 23-25 Червня 2009. Р. 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 // Protein Folding Dynamics, Gordon Research Conference Book of Abstracts. Venture, CA, USA, 6-8 January 2008. P. 1.

## В. 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 on "Monte Carlo Methods and Applications" (Beijin, 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], ІХ 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, Веіјіпд Computational Science Research Center, Beijing, China, 6 July 2015, Український католицький університет, семінар "Обрії науки", 10 червня 2015.

## С. Список публікацій здобувача

1. Chushak Y., Bryk T., Baumketner A. Dynamical Properties of Liquid Alloys // Mettalofizika. 1996. Vol. 18, P. 3-10.

2. Chushak Y., Bryk T., Baumketner A., Kahl G., Hafner J. Dynamical Properties of Liquid Binary Alloys: A Memory Function Study // Physics and Chemistry of Liquids. 1996. Vol. 32, no. 2. P. 87-102.

3. *Baumketner A., Bryk T., Chushak Y.* Theoretical Study of the Dynamic Features of Binary Mixtures // *Ukrayinsky Fizychny Zhurnal.* 1997. Vol. 42, P. 241-245.

4. *Baumketner A., Chushak Y.* Correction for finite-size effects in molecular dynamics simulation of liquid alloys // *Journal of non-crystalline solids*. 1999. Vol. 250, P. 354-359.

5. *Baumketner A., Chushak Y.* A molecular dynamics study of the diffusion processes in liquid Na-K alloys // *Journal of Physics: Condensed Matter.* 1999. Vol. 11, no. 6. P. 1397-1407.

6. Baumketner A., Chushak Y. Bridge function for liquid Na // Condensed Matter Physics. 1999. Vol. 2, no. 1. P. 81-88.

7. *Chushak Y., Baumketner A.* Theoretical and computer simulation study of density fluctuations in liquid binary alloys // *The European Physical Journal B-Condensed Matter and Complex Systems.* 1999. Vol. 7, no. 1. P. 129-136.

8. *Baumketner A., Chushak Y., Hiwatari Y.* A comparative study of the diffusion processes in liquid binary alloys with a tendency to aggregation and segregation // *Defect Diffus Forum.* 2001. Vol. 188-1, P. 143-151.

9. *Baumketner A., Hiwatari Y.* Finite-size dependence of the bridge function extracted from molecular dynamics simulations // *Phys Rev E.* 2001. Vol. 63, no. 6. P. art. no.-061201.

10. Baumketner A., Shimizu H., Isobe M., Hiwatari Y. Helix transition in diblock polyampholyte // J Phys-Condens Mat. 2001. Vol. 13, no. 46. P. 10279-10291.

11. *Baumketner A., Hiwatari Y.* Running multicanonical simulations on deformed energy surface: Application to a model protein // *J Phys Soc Jpn.* 2002. Vol. 71, no. 3. P. 1001-1002.

12. *Baumketner A., Hiwatari Y.* Influence of the hydrodynamic interaction on kinetics and thermodynamics of minimal protein models // *J Phys Soc Jpn.* 2002. Vol. 71, no. 12. P. 3069-3079.

13. *Baumketner A., Hiwatari Y.* Diffusive dynamics of protein folding studied by molecular dynamics simulations of an off-lattice model // *Phys Rev E.* 2002. Vol. 66, no. 1. P. 011905.

14. *Baumketner A., Shimizu H., Hiwatari Y.* Structural organization of a chain molecule with specific charge distribution: A molecular dynamics study // *Mol Simulat.* 2002. Vol. 28, no. 4. P. 359-375.

15. *Baumketner A., Shimizu H., Isobe M., Hiwatari Y.* Stochastic tunneling minimization by molecular dynamics: an application to heteropolymer models // *Physica A.* 2002. Vol. 310, no. 1-2. P. 139-150.

 Baumketner A., Hiwatari Y. Molecular dynamics study of protein folding: potentials and mechanisms // AIP Conference Proceedings. Book of Abstracts.
 2003. Vol.661. no.1. P. 195-204 17. *Baumketner A., Jewett A., Shea J.-E.* Effects of confinement in chaperonin assisted protein folding: rate enhancement by decreasing the roughness of the folding energy landscape // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 332, P. 701-713.

18. Baumketner A., Shea J.E. Kinetics of the coil-to-helix transition on a rough energy landscape // Phys Rev E. 2003. Vol. 68, no. 5. P. 051901.

19. *Baumketner A., Shea J.E., Hiwatari Y.* Glass transition in an off-lattice protein model studied by molecular dynamics simulations // *Phys Rev E.* 2003. Vol. 67, no. 1. P. 011912.

20. Anento N., Gonzalez L.E., González D.J., Chushak Y., Baumketner A. Viscoelastic model for the dynamic structure factors of binary systems // Phys Rev E. 2004. Vol. 70, no. 4. P. 041201.

21. *Baumketner A., Shea J.-E.* Effects of frustration on the kinetics of helix formation in alanine polypeptides // *Condensed Matter Physics*. 2004. Vol. 7, no. 2. P. 421–434.

22. Baumketner A., Shea J.-E., Hiwatari Y. Improved theoretical description of protein folding kinetics from rotations in the phase space of relevant order parameters // J. Chem. Phys. 2004. Vol. 121, no. 2. P. 1114-1120.

23. Jewett A., Baumketner A., Shea J.E. Accelerated folding in the weak hydrophobic environment of a chaperonin cavity: Creation of an alternate fast folding pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, P. 13192-13197.

24. *Baumketner A., Shea J.E.* Free energy landscapes for amyloidogenic tetrapeptides dimerization // *Biophys J.* 2005. Vol. 89, no. 3. P. 1493-1503.

25. *Baumketner A., Shea J.E.* The influence of different treatments of electrostatic interactions on the thermodynamics of folding of peptides // *J Phys Chem B.* 2005. Vol. 109, no. 45. P. 21322-21328.

26. Bernstein S.L., Wyttenbach T., Baumketner A., Shea J.E., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T. Amyloid beta-protein: Monomer structure and early aggregation states of A beta 42 and its Pro(19) alloform // J Am Chem Soc. 2005. Vol. 127, no. 7. P. 2075-2084.

27. Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.-E. The structure of the wild type Amyloid  $\beta$  monomer: a computational and experimental study // Protein Science. 2006. Vol. 15, P. 420-430.

28. Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Lazo N.D., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. Structure of the 21-30 fragment of amyloid beta-protein // Protein Science. 2006. Vol. 15, no. 6. P. 1239-1247.

29. *Baumketner A., Shea J.-E.* Folding landscapes of the Alzheimer amyloid- $\beta(12-28)$  peptide *// Journal of Molecular Biology*. 2006. Vol. 362, no. 3. P. 567-579.

30. *Baumketner A., Shea J.E.* The thermodynamics of folding of a beta hairpin peptide probed through replica exchange molecular dynamics simulations // *Theor Chem Acc.* 2006. Vol. 116, no. 1-3. P. 262-273.

31. Friedel M., Baumketner A., Shea J.-E. Effects of surface tethering on protein folding mechanisms // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006. Vol. 103, no. 22. P. 8396-8401.

32. Shea J.-E., Friedel M., Baumketner A. Simulations of protein folding // Rev. Comp. Chem. 2006. Vol. 22, P. 169-219.

33. Soto P., Baumketner A., Shea J.E. Aggregation of polyalanine in a hydrophobic environment // Journal of Chemical Physics. 2006. Vol. 124, no. 13. P. 134904.

34. Teplow D.B., Lazo N.D., Bitan G., Bernstein S., Wyttenbach T., Bowers M.T., Baumketner A., Shea J.E., Urbanc B., Cruz L., Borreguero J., Stanley H.E. Elucidating amyloid beta-protein folding and assembly: A

multidisciplinary approach // Accounts Chem Res. 2006. Vol. 39, no. 9. P. 635-645.

35. *Baumketner A., Shea J.-E.* The structure of the Alzheimer amyloid-β(10-35) peptide probed through replica-exchange molecular dynamics simulations in explicit solvent *// Journal of Molecular Biology*. 2007. Vol. 366, no. 1. P. 275-285.

36. *Friedel M., Baumketner A., Shea J.E.* Stability of a protein tethered to a surface // *Journal of Chemical Physics*. 2007. Vol. 126, no. 9. P. 095101.

37. Baumketner A., Krone M.G., Shea J.E. Role of the familial Dutch mutation E22Q in the folding and aggregation of the 15-28 fragment of the Alzheimer amyloid-beta protein // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008. Vol. 105, no. 16. P. 6027-6032.

38. *Cai W., Xu Z.L., Baumketner A.* A new FFF-based algorithm to compute Born radii in the generalized Born theory of biomolecule solvation // *Journal of Computational Physics.* 2008. Vol. 227, no. 24. P. 10162-10177.

39. Krone M.G., Baumketner A., Bernstein S.L., Wyttenbach T., Lazo N.D., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. Effects of familial Alzheimer's disease mutations on the folding nucleation of the amyloid beta-protein // Journal of Molecular Biology. 2008. Vol. 381, no. 1. P. 221-228.

40. *Baumketner A*. Removing systematic errors in interionic potentials of mean force computed in molecular simulations using reaction-field-based electrostatics // *Journal of Chemical Physics*. 2009. Vol. 130, no. 10. P. 10.

41. Lin Y., Baumketner A., Jacobs D., Xu Z.L., Cai W. An image-based reaction field method for electrostatic interactions in molecular dynamics simulations // Journal of Chemical Physics. 2009. Vol. 131, P. 154103.

42. Murray M.M., Krone M.G., Bernstein S.L., Baumketner A., Condron M.M., Lazo N.D., Teplow D.B., Wyttenbach T., Shea J.E., Bowers M.T.

Amyloid beta-Protein: Experiment and Theory on the 21-30 Fragment // *J Phys Chem B*. 2009. Vol. 113, no. 17. P. 6041-6046.

43. *Negureanu L., Baumketner A.* Microscopic Factors that Control beta-Sheet Registry in Amyloid Fibrils Formed by Fragment 11-25 of Amyloid beta Peptide: Insights from Computer Simulations // *Journal of Molecular Biology*. 2009. Vol. 389, no. 5. P. 921-937.

44. *Baumketner A., Nesmelov Y.* Early stages of the recovery stroke in myosin II studied by molecular dynamics simulations // *Protein Science*. 2011. Vol. 20, no. 12. P. 2013-2022.

45. Lin Y., Baumketner A., Song W., Deng S., Jacobs D., Cai W. Ionic solvation studied by image-charge reaction field method // Journal of Chemical *Physics*. 2011. Vol. 134, P. 044105.

46. *Ni B., Baumketner A.* Effect of atom- and group-based truncations on biomolecules simulated with reaction-field electrostatics *// Journal of Molecular Modeling*. 2011. P. 1-11.

47. *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 // *Proteins*. 2012. Vol. 80, no. 6. P. 1569-1581.

48. *Baumketner A*. The mechanism of the converter domain rotation in the recovery stroke of myosin motor protein // *Proteins*. 2012. Vol. 80, no. 12. P. 2701-2710.

49. Baker K., Baumketner A., Lin Y.C., Deng S.Z., Jacobs D., Cai W. ICSM: An order N method for calculating electrostatic interactions added to TINKER // Comput Phys Commun. 2013. Vol. 184, no. 1. P. 19-26.

50. *Deng S., Xue C., Baumketner A., Jacobs D., Cai W.* Generalized image charge solvation model for electrostatic interactions in molecular dynamics simulations of aqueous solutions *// Journal of computational physics.* 2013. Vol. 245, P. 84-106.

51. *Ni B., Baumketner A.* Reduced atomic pair-interaction design (RAPID) model for simulations of proteins *// Journal of Chemical Physics.* 2013. Vol. 138, no. 6. P. 064102.

52. Song W., Lin Y.C., Baumketner A., Deng S.Z., Cai W., Jacobs D.J. Effect of the Reaction Field on Molecular Forces and Torques Revealed by an Image-Charge Solvation Model // Commun Comput Phys. 2013. Vol. 13, no. 1. P. 129-149.

53. *Baumketner A*. Electric Field as a Disaggregating Agent for Amyloid Fibrils // *J Phys Chem B*. 2014. Vol. 118, no. 50. P. 14578-14589.

54. *Baumketner A., Cai W.* Equilibrium clusters in suspensions of colloids interacting via potentials with a local minimum // *Condensed Matter Physics*. 2016. Vol. 19, no. 1. P. 13605

55. Baumketner A., Melnyk R., Holovko M.F., Cai W., Costa D., Caccamo C. Softness and non-spherical shape define the phase behavior and the structural properties of lysozyme in aqueous solutions // Journal of Chemical Physics. 2016. Vol. 144, no. 1. P. 015103.

56. Baumketner A., Stelmakh A., Cai W. Cluster crystals stabilized by hydrophobic and electrostatic interactions// J Phys Chem B. 2018. Vol. 122, no.
9. P. 2669-2682.