

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 Физика

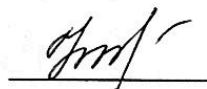
Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ
ПЕПТИДА PАР248-286

Студент 2 курса группы 06-019

«15» июня 2022 г.



(Никитина А.О.)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

«15» июня 2022 г.

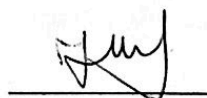


(Блохин Д.С.)

Научный консультант (*при наличии*)

к.ф.-м.н., доцент

«15» июня 2022 г.

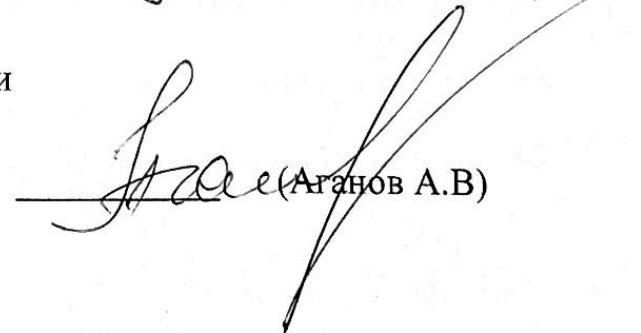


(Юльметов А.Р.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.ф.-м.н., профессор

«15» июня 2022 г.



(Аганов А.В.)

Казань-2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 ГЛАВА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Амилоидные фибриллы.....	6
1.1.1. Амилоидные фибриллы SEVI.....	7
1.1.2. Фибриллообразование амилоидных фибрилл	10
1.2. Метод молекулярной динамики с использованием метадинамики	13
1.2.1. Молекулярная динамика.....	14
1.2.2. Метадинамика	18
Выбор коллективных переменных	20
Вычисление погрешности свободной энергии.....	23
1.3. Сканирующая электронная микроскопия	24
1.4. Атомно-силовая микроскопия	25
1.5. Флуоресцентный анализ с использованием тиофлавина Т	27
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	29
2.1. Образование амилоидных фибрилл in vitro	29
2.2. Алгоритм молекулярного моделирования амилоидных фибрилл SEVI методом молекулярной динамики с использованием метадинамики	30
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	35
Экспериментальное исследование амилоидных фибрилл PAP248-286 ..	35
Молекулярное моделирование олигомеризации пептида PAP248-286 ...	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	45

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что избыточное образование амилоидных пептидов и их агрегация связаны с более чем 30 заболеваниями и расстройствами, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона, диабет второго типа, а также инфекцию ВИЧ [1-7]. Поэтому в последние два десятилетия большое внимание уделяется исследованию и моделированию амилоидных пептидов и их агрегатов (амилоидных фибрилл).

Примером таких амилоидных фибрилл являются SEVI (Semen-derived Enhancer of Viral Infection) – усилитель вирусной инфекции, полученный из спермы. Амилоидные фибриллы SEVI многократно усиливают вероятность заражения ВИЧ. SEVI захватывают вирусные частицы и способствуют их прикреплению к клеткам-мишеням и последующей интенсификации слияния вирионов ВИЧ и клеток. SEVI образуются из пептидных фрагментов кислой фосфатазы предстательной железы (PAP): PAP248-286 и PAP85-120.

Изучение начальной стадии фибрилляции, т.е. гомоолигомеризации полипептидов, необходимо для понимания взаимодействия между SEVI, вирионом и клетками. Основной проблемой экспериментальных исследований структурных перестроек амилоидогенных полипептидов является наличие внутренне неупорядоченных фрагментов, характеризующихся высокой гибкостью и способностью связываться с большим количеством белков-партнеров [8-9], а также олигомеры полипептидов имеют короткие времена жизни, что их делает недоступными для большинства экспериментальных методов.

Несмотря на то, что достигнут значительный прогресс в понимании механизмов агрегации белков при некоторых заболеваниях (например, болезнь Альцгеймера через распространение Ab⁵), подавляющее большинство белков агрегирует с механизмами, которые еще предстоит идентифицировать. Выяснение физико-химических параметров молекулярного механизма,

лежащего в основе образования амилоидных фибрилл, имеет решающее значение для нашего понимания и последующего лечения амилоидных заболеваний.

Учитывая очень высокую степень усиления ВИЧ-инфекции из-за образования и повсеместного распространения SEVI в семенной жидкости, изучение олигомеров амилоидогенных полипептидов, вероятно, окажет большое влияние на исследования, касающиеся передачи и профилактики ВИЧ.

Молекулярное моделирование – идеальный инструмент для наблюдения за такими сложными объектами, как олигомеры, для интерпретации экспериментальных данных и прогнозирования свойств объектов. Молекулярное моделирование достаточно затратный процесс, поэтому для ускорения вычислений применяют различные методы ускоренной выборки: метадинамика [10-11], термодинамическое интегрирование [12] и зонтичная выборка [13-15]. Данные методы позволяют снижать потенциальные барьеры с помощью введения дополнительных потенциалов, чем облегчают прохождение всего конформационного пространства. В данной работе в качестве ускоренной выборки используется метадинамика. Целью данной работы является изучение формирования амилоидных фибрилл пептида PAP248-286.

Для достижения данной цели необходимо решить следующие задачи:

- контроль формирования амилоидных фибрилл с помощью флюоресцентного анализа;
- наблюдение фибрилл с помощью микроскопии;
- моделирование олигомеров (димера, тримера, тетрамера, гексамера и гептамера) пептида PAP248-286 методом метадинамики в пакете GROMACS с помощью библиотеки PLUMED;
- анализ полученных структур и сопоставление с существующими механизмами образования амилоидных фибрилл.

Структуры олигомеров PAP248-286 могут быть использованы для разработки подхода к проектированию точечных мутаций, влияющих на процесс фибриллообразования PAP248-286.

1 ГЛАВА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Амилоидные фибриллы

Амилоидные белки характеризуются отложением в различных тканях или клетках в виде агрегированных видов (амилоидов или нерастворимых отложений), которые имеют отличительную β -листовую фибриллярную ультраструктуру.

Амилоидные фибриллы состоят из мономеров и представляют собой протяженные β -листы, в которых β -нити лежат перпендикулярно продольной оси фибриллы и могут располагаться параллельно и антипараллельно друг другу [16-19]. Организация амилоидных фибрилл может быть сложной, фибриллы обычно состоят из 2-9 протофиламентов (нитевидных белковых структур, являющихся строительными элементами микротрубочек) [20]. Все амилоидные фибриллы имеют ряд общих структурных особенностей, несмотря на значительное разнообразие в первичной последовательности составляющих белков. Амилоидные фибриллы обычно длинные, неразветвленные и имеют ширину от 5 до 20 нм [21]. Расстояние между главными цепями внутри β -листа составляет 0,47 нм, между соседними β -листами – 0,8-1,2 нм [22-23]. В стабилизации структуры амилоидных фибрилл играют важную роль водородные связи, образующиеся между пептидными остовами соседних β -нитей. В стабилизацию структуры амилоидов также вносят вклад взаимодействия между боковыми группами аминокислотных остатков соседних полипептидов (гидрофобные взаимодействия, солевые мостики, стэкинг-взаимодействия). Для амилоидов характерна высокая устойчивость к изменениям таких параметров окружающей среды, как гидрофобность, концентрация соли, pH, температура, давление, влияние денатурирующих агентов и протеиназ, что обусловлено большим числом взаимодействий, вовлеченных в стабилизацию их структуры [24-29]. Состояние белка в фибриллярной форме стабильно и конкурирует наравне с нативным состоянием.

Амилоидогенные белки и полипептиды можно разделить на два различных структурных класса: гибкие, внутренне неупорядоченные и те, которые образуют компактную шаровидную структуру с четко выраженной третичной складкой в их нормально растворимом состоянии. Глобулярные белки обычно полностью или частично разворачиваются, чтобы образовать амилоид [21,30]. Изначально развернутые последовательности обычно имеют меньшую внутреннюю склонность к образованию амилоида, чем последовательности, полученные из глобулярных белков [30].

Специфической первичной последовательности не требуется, поскольку образование амилоида скорее общее свойство полипептидных цепей, поскольку широкий спектр белков и пептидов образует амилоид *in vitro*, не образуя его *in vivo* [31].

Многие амилоидные пептиды разрушают мембраны, и считается, что повреждение целостности клеточной мембраны является одной из основных причин патологий, связанных с амилоидом [32]. Однако амилоидные фибриллы также способны образовывать белки, не связанные с заболеваниями [33], а также могут продуцироваться бактериями и грибами [32,34].

1.1.1. Амилоидные фибриллы SEVI

Амилоидные фибриллы SEVI (усилитель вирусной инфекции, полученный из спермы) образуются из пептидных фрагментов кислой фосфатазы предстательной железы (PAP): PAP248-286 и PAP85-120.

Фибриллы SEVI играют важную роль в передаче ВИЧ-инфекции половым путем, повышая вирусную инфекционность (на 3-5 порядков по разным данным) [19,37]. PAP248-286 является наиболее активной формой SEVI, встречающийся в природе.

Первичная последовательность PAP248-286 состоит из 30,77 % (12 остатков) α -спирали, 56,11 % (22 остатка) случайного клубка и 12,82 % (5

остатков) удлиненной нити на С-конце [18]. РАР248-286 неструктурирован в физиологических условиях, но в присутствии анионных липидов он складывается в частичную α -спиральную структуру [19]. С-концевая (РАР273-286) и средняя (РАР260-272) области РАР248-286 обладают высокой гидрофобностью и, по прогнозам, будут иметь решающее значение для агрегации и образования амилоида. Ожидается, что эти участки образуют основные водородные связи и в основном отвечают за образование амилоида [35-36].

Частично спиральная конформация РАР248-286 также может объяснить фузиогенную активность пептида, другими словами, способность усиливать слияние между клеткой и вирионом, а также с белком gp41 (гликопротеин 41), который является субъединицей комплекса белков оболочки ВИЧ. Gp41 представляет собой трансмембранный белок, который содержит в своем эктодомене несколько участков, необходимых для инфицирования клеток-хозяев.

Поскольку структура амилоидной формы РАР248-286 неизвестна, трудно делать прогнозы относительно возможных мембранных взаимодействий амилоидной формы РАР248-286, поскольку они, вероятно, будут сильно зависеть от супрамолекулярной организации пептида. Примечательно, что другие амилоидные белки, которые имеют ту же общую структуру поперечного β -листа, что и амилоидная форма РАР248-286, менее эффективны в усилении инфекционности ВИЧ [37]. Определение структуры амилоидной формы РАР248-286 с высоким разрешением, вероятно, будет очень информативным для освещения природы этих различий.

С помощью анализа спектров кругового дихроизма выявлено, что свежерастворенный РАР248-286 существует в основном в случайной конфигурации спирали [19]. Ассоциация, опосредованная спиралью, приведет к высокой локальной концентрации последовательности, склонной к агрегации, что, в свою очередь, будет способствовать межмолекулярному формированию β -

листа [21]. Спиральная α -конформация представляет собой промежуточное состояние перед образованием β -листов. Принято считать, что α -конформация катализирует переход от случайной спиральной конформации к амилоидному состоянию [38]. Важно понимать, что спиральные промежуточные соединения не всегда должны приводить к увеличению скорости образования амилоида. Если бы спиральное промежуточное звено было слишком стабильным, оно могло бы фактически снизить скорость образования амилоида, поскольку представляло бы собой кинетическую ловушку [21]. Стабилизация спиральных состояний PAP248-286 может катализировать образование амилоида из-за увеличения эффективной концентрации развернутых и склонных к агрегации последовательностей в PAP248-286 за счет самоассоциации спиральных участков в PAP248-286.

Свежеприготовленные мономерные растворы SEVI неэффективны для повышения вирусной инфекционности, увеличение инфекционности происходит со временем по мере инкубации SEVI в растворе. Проведенные исследования показывают, что амилоидные волокна пептида более эффективны, чем мономерный пептид, в стимулировании связывания клеток ВИЧ и слияния мембран [37]. Анализы, зависящие от времени, показали, что стимулирующая инфекцию активность PAP248-286 начинает возрастать задолго до образования амилоида [37], при этом форма, ответственная за начальную форму образования SEVI, не идентифицирована, поэтому стоит уделить пристальное внимание начальному этапу образования фибрилл.

Механизм образования амилоида *in vivo* может сильно отличаться от того, что наблюдается в разбавленном водном растворе и условия *in vitro* таковы, что большинству вирусных частиц никогда не предоставляется правильная возможность прикрепиться и слиться с клеткой-мишенью до того, как вирусная частица деградирует.

Поэтому для исследования структуры на начальной стадии фибриллообразования удобнее использовать моделирование молекулярной динамикой.

1.1.2. Фибриллообразование амилоидных фибрилл

Сворачивание белка жизненно важно для нормального функционирования клетки. Большинство белков имеют одну или несколько нативных конформаций, некоторые белки неправильно сворачиваются в нативную конформацию, вызывая накопление и образование аморфных агрегатов или, в случае амилоидогенных белков, зрелых амилоидных фибрилл [3,39]. Амилоидные волокна, состоящие из одного и того же белка, могут иметь разные конформации с различными фенотипами [40].

Образование амилоидных фибрилл характерно для всех живых организмов, от микроорганизмов до человека. Фибриллообразование прошло испытание на прочность эволюцией и сохранило консервативность структуры, что доказывает биологическую необходимость этих формирований [41].

Агрегация белковых молекул в нити является распространенной формой биологической гомомолекулярной самосборки. В природе полученные структуры участвуют как в функциональных, так и в аномальных явлениях [42]. Фибриллы обычно обеспечивают стабильную конформацию, благодаря стабилизации перекрестных связей β -листов по пептидному остову [43]. Хотя образование димеров, тримеров и других более крупных олигомерных комплексов является частью нормального, здорового функционирования клеток, аберрантные белковые агрегаты могут быть токсичными и иметь патологические последствия [44].

На осуществление конформационного перехода из нативного белка в патологический агрегат оказывает влияние огромное количество факторов, в том числе высокая концентрация белка, мутации, взаимодействие с лигандами и другие факторы, которые еще необходимо определить. Несмотря на то, что

кинетика образования амилоида хорошо изучена для многих пептидов, до сих пор предлагаются альтернативные механизмы протекания данного процесса, поскольку мы все еще далеки от полного его понимания.

Фибриллообразование – это сложный многоступенчатый процесс, обычно начинающийся с мономеров или других малых молекул, которые сталкиваются и связываются с образованием более крупных молекул, включая олигомеры и протофибриллы, до тех пор, пока размеры образующихся фибрилл не достигнут равновесия [45].

Принято считать, что процесс фибриллообразования содержит следующие стадии: фаза нуклеации (лаг-период), в течение которой формируются зародыши (ядра) амилоидных фибрилл и увеличивается количество агрегатов; фаза роста, которая приводит к увеличению размеров существующих агрегатов; фаза насыщения, которая характеризует момент времени полного перехода мономеров в фибриллярную форму. Важным условием для любого белка, способного образовывать амилоидные фибриллы из раствора, в котором он изначально находился в мономерной форме, является его способность подвергаться нуклеации, иначе молекулы полипептида остаются в растворе неопределенно долго.

Лag-период является важным этапом фибриллообразования, поскольку он предоставляет важную информацию о факторах, регулирующих процесс фибрилляции. Начало фибрилляции связано с концентрацией несвязанных белковых соединений в присутствии ингибитора. В ходе лаг-фазы образуются различные олигомеры, в том числе способные оказаться затравкой для роста зрелых фибрилл. Затравкой принято называть аликвоты различных растворов белков, содержащих предварительно сформированные амилоидные фибриллы, которые обладают способностью вызывать образование таких фибрилл в свежеприготовленных растворах пептида.

Кроме того, данный процесс может сопровождаться фрагментацией полимера, которая в свою очередь может привести к вторичному образованию зародышей, поскольку фрагментированные полимеры могут служить зародышами для удлинения фибрилл [46].

Особенностью самосборки является то, что редко можно найти области во времени или пространстве параметров, где активен только один процесс, и чаще всего многие формы взаимопревращения между различными видами протекают одновременно. Важным следствием этого вывода является то, что фаза нуклеации в целом не может быть определена как время, необходимое для первичного зарождения [42].

За лаг- фазой следует фаза быстрого роста, приводящая к амилоидной структуре, богатой β -листами [21,47-50]. В период роста происходит увеличение размеров новых образований. Агрегаты, однажды образованные в результате процессов зарождения, могут расти за счет дальнейшего поглощения растворимых белковых молекул. Кинетические исследования, исследующие удлинение амилоидных фибрилл, выявляют зависимость концентрации первого порядка как от мономера, так и от вида фибрилл [51-53], что предполагает бимолекулярный механизм роста путем добавления мономера к концам существующих фибрилл.

При высоких концентрациях структурная реорганизация молекулы полипептида после ее прикрепления к концу фибриллы становится ограничителем скорости для общего процесса удлинения, и в этом режиме наблюдается переход к зависимости нулевого порядка от концентрации мономера [51-54].

Заключительные период процесса фибриллообразования связан с диссоциацией. Диссоциация молекул из агрегатов имеет решающее значение для восстановления химического равновесия в конце реакции агрегации. Эта обратимая и динамическая диссоциация приводит к явлению молекулярной

рециркуляции [55]. Для того, чтобы произошел рост агрегата, процессы диссоциации должны быть значительно медленнее, чем процессы роста, и, следовательно, явления диссоциации обычно не имеют большого значения при определении кинетики агрегации *in vitro* до очень поздней стадии реакции, когда набор мономеров исчерпан [56].

Образование амилоидных фибрилл *in vitro* обычно контролируется оптическими методами, включая флуорометрические анализы. Эти измерения могут сообщать о доле белка, которая была разделена на агрегаты в зависимости от времени. Временной ход фибрилляции белка измеряется по поглощению света на одной или нескольких длинах волн с использованием красителей и внешних флуоресцентных зондов. Лаг-фаза обычно изучается с помощью эмпирической логистической (сигмоидальной) функции, которая используется для оценки феноменологических параметров по данным о ходе фибрилляции.

Исследования с одной молекулой используются для мониторинга временного хода отдельных видов фибрилл и, следовательно, времени задержки для каждой фибриллы разного размера потенциально может быть оценена. Появляются новые одномолекулярные методы. Например, Хоррокс и соавт. [57] разработали метод, называемый визуализацией отдельных агрегатов путем улучшения, который позволяет проводить сверхчувствительное флуоресцентное обнаружение отдельных амилоидных фибрилл. Тосатто и др. [58] обнаружили, что одномолекулярный резонансный перенос энергии Форстера помогает визуализировать процесс самосборки с использованием одноканальных микрофлюидных устройств [59].

1.2. Метод молекулярной динамики с использованием метадинамики

Молекулярное моделирование позволяет исследовать свойства молекулярных соединений с точки зрения их структуры и микроскопических взаимодействий между ними и служит отличным дополнением информации к

обычным экспериментам, которую нельзя получить другими экспериментальными методами.

К основным методам моделирования относят молекулярную динамику и Монте-Карло, а также существует целый ряд смешанных методов, которые сочетают в себе функции обоих методов. Молекулярное моделирование является инструментом для изучения динамических процессов – трансляционное и вращательное движения молекул, времена нахождения одних молекул около других, динамику конформационных переходов и др.

1.2.1. Молекулярная динамика

Метод молекулярной динамики представляет собой моделирование движения атомов и молекулярных систем, а также анализ эволюции этих систем. С помощью полученных временных зависимостей координат и скоростей молекул и атомов вычисляются характеристики системы, зависящие от взаимного расположения атомов (структура, расположение молекул, подвижность и др.).

При моделировании динамики в каждом состоянии системы вычисляются силы, действующие на атомы, и новое состояние системы (координаты и скорости частиц) получается путём интегрирования уравнений движения Ньютона для систем, состоящих из N атомов:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i = -\vec{\nabla}_i U(\vec{r}_1 \dots \vec{r}_N), \quad i = 1 \dots N, \quad (1)$$

где \vec{r}_i – радиус-вектор i -ой частицы, m_i – масса частицы.

Решениями уравнений (1) является получение выражений, определяющих положение частиц $\vec{r}_i(t + \Delta t)$ в момент времени $(t + \Delta t)$, исходя из координат известных в момент времени t . Для интегрирования уравнений в молекулярной динамике применяется метод Верле, суть которого заключается в том, что

координаты атомов хранятся на целом t -половинном шаге ($t - \frac{1}{2}\Delta t, t + \frac{1}{2}\Delta t, t + \frac{3}{2}\Delta t \dots$). Основная формула метода Верле описывается следующим образом:

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \Delta t) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \Delta t^2. \quad (2)$$

Для сохранения полной энергии системы без существенных изменений, которые могут быть вызваны погрешностью численного интегрирования, подбирается шаг интегрирования Δt , величина которого зависит от частоты наиболее быстрых колебаний атомов. Для моделирования биологических систем шаг составляет 0,5-2 фс.

Для моделирования молекулярных систем применяют атом-атомные потенциальные функции, описывающие внутри- и межмолекулярные взаимодействия.

К потенциалам межмолекулярных взаимодействий относится кулоновский потенциал, описывающий электростатическое взаимодействие:

$$U_{el} = \sum_{\text{ат.пары}} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}^2}. \quad (3)$$

А также потенциал Леннард-Джонса 6-12, описывающий силы Ван-дер-Ваальса:

$$U_{LJ} = \sum_{\text{ат.пары}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (4)$$

где r_{ij} – расстояние между парами атомов, ϵ_{ij} – глубина потенциальной ямы, σ_{ij} – минимальное расстояние между атомами, при котором энергия взаимодействия равняется нулю.

В простейших моделях внутримолекулярные взаимодействия описываются суммой трех потенциалов:

$$U_{\text{связ.}} = \frac{1}{2} \sum_{\text{связи}} k_{ij}^l (l_{ij} - l_{eq})^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{углы}} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{двугр.углы}} \sum_{\text{углы}} k_{ijkl}^{\varphi,m} [1 + \cos(n\varphi_{ijkl} - \gamma_m)], \quad (5)$$

где первое слагаемое описывает энергию деформации длин связи, второе – энергию валентных углов от их равновесного состояния, третье – энергию вращения вокруг химической связи.

Длины валентных связей $l_{ij} = |\vec{r}_i - \vec{r}_j|$ представляют собой расстояния между парами соседних атомов. Валентный угол θ_{ijk} – угол между векторами последовательных связей $\vec{r}_i - \vec{r}_j$ и $\vec{r}_j - \vec{r}_k$. Двугранный угол φ_{ijkl} (угол вращения) определяется как угол между поверхностями, заданными тремя последовательными валентными связями (рисунок 1).

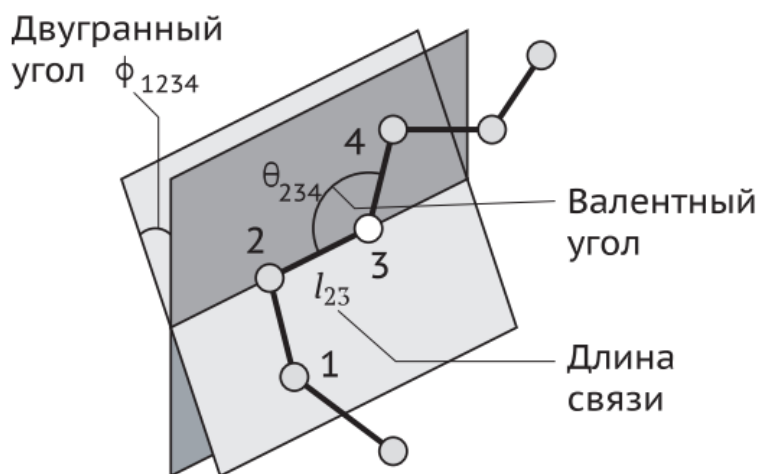


Рисунок 1 – Геометрические параметры, участвующие в вычислении межмолекулярных взаимодействий

Для моделирования молекулы, находящейся в растворе, все атомы помещают в единую ячейку. Во избежание возникновения артефактов из-за граничных условий, так как на границе ячейки может находиться большое число молекул, вводятся периодические граничные условия. Границы ячейки

становятся проницаемыми, и атом, выходя за границу ячейки, возвращается обратно через противоположную границу (рисунок 2) [60].

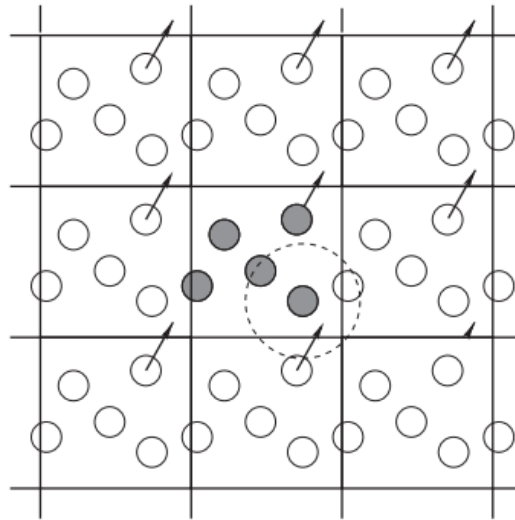


Рисунок 2 – Периодические граничные условия для системы молекул, помещенной в ячейку

Важной характеристикой описания биофизических процессов является разность между свободной энергией Гиббса ΔG (описывает NPT-ансамбли) и свободной энергией Гельмгольца ΔF (описывает NVT-ансамбли) между разными состояниями системы. В некоторых случаях между двумя состояниями системы может существовать энергетический барьер, который влияет на константы скорости переходов между данными состояниями. Поэтому для описания переходов между состояниями целесообразней ввести координату реакции s , непрерывно описывающую эволюцию системы в течение всего моделирования. Свободная энергия Гиббса для NPT-ансамбля описывается следующей формулой:

$$G(s) = -k_B T \ln P(s), \quad (6)$$

$$P(s) = \frac{1}{P_0} \int \delta(s(\vec{r}) - s) \exp\left(-\frac{U(\vec{r})}{k_B T}\right) d\vec{r}, \quad (7)$$

где $P(s)$ – плотность вероятности, δ – дельта-функция, U – потенциальная энергия системы, k_B – постоянная Больцмана, T – температура, P_0 – нормировочная константа. Интегрирование ведется по пространству изменения всех декартовых координат системы.

Зная распределение вероятностей, из молекулярной динамики можно получить профиль свободной энергии. Из-за ограничения времени симуляции (выбирается при моделировании) некоторые области конформационного пространства могут остаться не достигнутыми, находясь вдали от минимума потенциальной энергии или из-за энергетического барьера. Для устранения этого аспекта используют методы ускоренной выборки: метадинамика (Metadynamics) [10-11] термодинамическое интегрирование (Thermodynamics Integration/ Blue Moon) [12] и зонтичная выборка (Umbrella Sampling) [13-15]. Суть данных методов заключается в добавлении дополнительных потенциалов, снижающих энергетические потенциальные барьеры для прохождения всего конформационного пространства, при этом эффект потенциалов вычитается из профиля свободной энергии, не искажая результатов.

1.2.2. Метадинамика

Метадинамика – это метод атомистического моделирования, который позволяет ускорять редкие события и оценивать свободную энергию сложных молекулярных систем. Он основан на итеративном «заполнении» потенциальной энергии системы суммой гауссианов U_{bias} , центрированных вдоль траектории, за которой следует соответствующим образом выбранный набор координат реакции (коллективных переменных), тем самым вынуждая систему переходить от одного минимума к следующему, избегая уже пройденные состояния.

$$H = T + U + U_{bias} \quad (8)$$

В качестве функции координат реакции s выступает потенциал смещения U_{bias} , который описывается следующим уравнением:

$$U_{bias}(\vec{s}, t) = \sum_{k\tau < t} W(k\tau) \exp\left(-\sum_{i=1}^d \frac{(s_i - s_i(k\tau))^2}{2\sigma_i^2}\right), \quad (9)$$

где τ — шаг изменения, σ_i - ширина гауссиана для i -й коллективной переменной, $W(k\tau)$ — высота гауссиана.

При длительной эволюции системы потенциал сходится к значению свободной энергии с противоположным знаком, как функция коллективных переменных:

$$U_{bias}(\vec{s}, t \rightarrow \infty) = -F(\vec{s}) + C, \quad (10)$$

где C — аддитивная константа, а свободная энергия системы $F(\vec{s})$ определяется следующим уравнением:

$$F(\vec{s}) = -\frac{1}{\beta} \int \delta(s - s(\vec{r})) e^{-\beta U(\vec{r})} d\vec{r}, \quad (11)$$

где $\beta = (k_B T)^{-1}$, k_B — постоянная Больцмана, T — температура системы, $U(\vec{r})$ — функция потенциальной энергии, интегрирование производится по всем значениям \vec{r} .

В результате, потенциал способствует выходу системы из локального минимума в другие области фазового пространства.

Добавление гауссианов одинаковой высоты в метадинамике на протяжении всей симуляции приводит к движению системы в сторону высоких областей потенциальной энергии и к сильным флуктуациям свободной энергии, определенной исходя из потенциала.

Поскольку амплитуда колебаний потенциала смещения пропорциональна высоте добавленного гауссиана W , то для ускорения сходимости вычислений можно уменьшить эти колебания во время моделирования, выбрав гауссианы, высота которых экспоненциально уменьшается с убыванием потенциала смещения [61]:

$$W(k\tau) = W_0 \exp\left(-\frac{U(\vec{r}, k\tau)}{k_B \Delta T}\right), \quad (12)$$

где W_0 – начальная высота гауссиана, ΔT – параметр в размерности температуры, k_B – постоянная Больцмана.

Однако в таких условиях потенциал не уравнивает полностью поверхность свободной энергии:

$$U(\vec{s}, t \rightarrow \infty) = -\frac{\Delta T}{T + \Delta T} F(\vec{s}) + C, \quad (13)$$

где C – аддитивная константа, T – температура системы.

Таким образом, предел $\Delta T \rightarrow 0$ соответствует стандартной молекулярной динамике, а $\Delta T \rightarrow \infty$ – стандартной метадинамике. Степень исследования пространства свободной энергии определяется значением ΔT .

Выбор коллективных переменных

Эффективность метадинамики и многочисленных альтернативных методов сильно зависит от выбора коллективных переменных. Если пренебречь важной переменной, полученная оценка свободной энергии будет ненадежной, и предсказанные механизмы перехода могут быть качественно неверными.

Коллективные переменные являются произвольными функциями атомарных координат. Для мультстабильной системы минимальным критерием является то, что разные метастабильные состояния должны соответствовать разным значениям координат реакции. Если это условие не выполняется, любой потенциал смещения, добавленный к одному состоянию, будет одинаково неблагоприятен для всех остальных состояний, соответствующих одному и тому же значению коллективной переменной. Даже если ландшафт потенциальной энергии имеет два минимума, свободная энергия как функция x имеет один минимум.

Второе требование заключается в том, что коллективные переменные должны уметь различать переходные состояния. Метадинамика эффективно работает только в том случае, если коллективные переменные принимают разные значения в метастабильных состояниях и в переходном состоянии между ними. Другими словами, из значения координат реакции должна быть возможность с уверенностью определить, находится ли система в одном метастабильном состоянии или в переходном состоянии.

Еще одним требованием является то, чтобы число занятых коллективных переменных не должно быть слишком большим (как правило используют две или три переменные). Потому что общая идея метадинамики состоит в том, чтобы не принимать уже посещенные конформации, если количество координат реакции слишком велико, система никогда не вернется к точно такому же значению всех коллективных переменных.

В качестве коллективных переменных можно взять целый ряд параметров в зависимости от исследуемой системы (расстояния между атомами, углы, число контактов, дипольный момент и др.). В данной работе в качестве коллективных переменных были выбраны расстояния между центрами масс олигомеров и количество специфических контактов между мономерами, которые могут быть вычислены по следующим формулам:

$$s(\vec{R}) = \sum_i \sum_j \varepsilon_{ij}, \quad (14)$$

где суммирование производится по всем парам атомов из групп G_1 и G_2 , а ε_{ij} вычисляется следующим образом:

$$\varepsilon_{ij} = \begin{cases} 1, & \text{при } r_{ij} < 0 \\ \frac{1 - (r_{ij}/r_0)^n}{1 - (r_{ij}/r_0)^m}, & \text{при } r_{ij} > 0 \end{cases}, \quad (15)$$

где $r_{ij} = |\vec{r}_i - \vec{r}_j| - d_0$. Параметры n , m , d_0 выбираются исходя из решаемой задачи.

Метастабильность характерна для многих систем в материаловедении и биофизике. Метастабильность возникает, когда распределение вероятности в зависимости от атомарных координат имеет по крайней мере два пика (метастабильные состояния), разделенные областью, в которой вероятность на много порядков ниже. С практической точки зрения метастабильность означает, что моделирование молекулярной динамики скорее всего, задержится только в одном максимуме вероятности (обычно соответствующем минимуму энергии) в течение всего цикла. С создания молекулярного моделирования исследователи пытались разработать подходы для борьбы с этой проблемой с целью наблюдения всех соответствующих метастабильных состояний за ограниченное время, которое может быть предоставлено при моделировании.

Возможный путь к этой цели включает «заполнение» минимумов свободной энергии метастабильных состояний контролируемым образом, что позволяет системе исследовать все состояния.

Процедура взвешивания имеет важное значение при проведении метадинамики, так как при добавке потенциала смещения U_{bias} происходит искажение статистического веса всех кадров траектории. Данная процедура позволяет определить свойства несмещенной системы, устраняя эффект искажения.

Коллективные переменные $s(\mathbf{r})$ рассчитываются из координат атомов. Будем считать, что значения координат реакции, рассчитанные для каждого кадра симуляции молекулярной динамики при постоянной температуре, подчиняются вероятностному распределению канонического ансамбля (NVT), в таком случае вероятность можно найти по следующей формуле:

$$P(s) = \frac{\int \delta(s(\vec{\mathbf{r}}) - s) \exp\left(+\frac{U_{bias}(s(\vec{\mathbf{r}}))}{k_{\beta}T}\right) d\vec{\mathbf{r}}}{\int \exp\left(+\frac{U_{bias}(s(\vec{\mathbf{r}}))}{k_{\beta}T}\right) d\vec{\mathbf{r}}}, \quad (16)$$

где δ – дельта-функция, k_B – постоянная Больцмана, T – температура.

Только для простой системы возможно определить интегралы, включенные в функцию (16). В случае более сложных физических систем оценка распределения коллективной переменной $P(s')$ вычисляется через гистограмму, которая является выборкой полиномиального распределения.

Свободную энергию (с точностью до постоянной) можно найти из полученного частного распределения $P(s)$:

$$F(s) = -k_B T \ln P(s), \quad (17)$$

В результате, рассчитав функцию распределения коллективных переменных, мы можем построить поверхность свободной энергии и найти стабильные и метастабильные состояния, а также оценить энергию активации для переходов между ними.

Вычисление погрешности свободной энергии

Погрешность нахождения вероятностей, вычисленных в течение всего моделирования, может быть оценена с помощью разбивки всей траектории симуляции на блоки, определенной длительности. Затем производится вычисление гистограммы распределения заданной коллективной переменной в каждом блоке, значение которой необходимо для расчета среднего значения и оценки погрешности.

В статистической механике величина среднего по ансамблю вычисляется как математическое ожидание переменной. Оно оценивается как среднее арифметическое по выборкам $\{X\}$ из распределения:

$$\langle X \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N X_i. \quad (18)$$

Для вычисления средней свободной энергии и оценки ошибок можно использовать усреднение по блокам. Сначала необходимо построить для

каждого блока гистограммы и усреднить их, затем вычислить поверхность энергии из отношения между гистограммой $P(s)$ и поверхностью свободной энергии $F(s)$. Для вычисления величины свободной энергии для i столбца гистограммы используют следующую формулу:

$$F_i = -k_{\beta}T \ln \left(\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N H_i^{(j)} \right) = -k_{\beta}T \ln \langle H_i \rangle. \quad (19)$$

Суммирование в уравнении (19) производится по N гистограммам и $H_i^{(j)}$ – величина i столбца для j оценки гистограммы.

Погрешность нахождения свободной энергии вычисляется следующим образом:

$$\delta F_i = \frac{k_{\beta}T}{\langle H_i \rangle} \sqrt{\frac{\langle H_i^2 \rangle - \langle H_i \rangle^2}{N}}. \quad (20)$$

1.3. Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) – эффективный метод анализа органических и неорганических материалов в масштабе от нанометра до микрометра. СЭМ работает при большом увеличении, достигающем 300 000 и более кратное увеличение, создавая очень точные изображения из широкого спектра материалов [62]. Формирование изображения исследуемого образца происходит в процессе сканирования поверхности объекта точно сфокусированным лучом электронов (электронным зондом).

Основными недостатками использования электронной микроскопии является то, что метод обеспечивает ограниченную возможность исследования физических и механических свойств образца, поскольку исследует только проводящие материалы. При облучении диэлектрического материала, его

поверхность предварительно заряжают отрицательно за счет напыления тонкой пленки электропроводящего вещества (золото, платина, углерод).

СЭМ проводится путем применения пучка электронов, обладающих высокой энергией в диапазоне между 100-30 000 эВ. Обычно для эмиссии электронов используется тепловой источник. Сфокусированный пучок электронов взаимодействует с образцом и проникают на глубину 1 мкм, генерируя сигналы, используемые для получения изображения. Изображение образца формируется точка за точкой в зависимости от перемещения сканирующих катушек, которые заставляют электронный луч перемещаться в отдельные места. Весь процесс зависит от требуемого увеличения. При многократном увеличении, сканирующие катушки заставляют луч отклоняться на меньшую площадь.

В формирование изображения свой вклад вносят ответные сигналы из-за взаимодействия электронов зонда с веществом. К таким сигналам относятся как возникающие вторичные электроны, так и электроны с обратным рассеянием. Пространственное разрешение и глубина, на которой возможно провести СЭМ-анализ определяется объемом площади взаимодействия исследуемого объекта и пучка электронов. Он зависит от плотности материала образца и ускоряющего напряжения. СЭМ используется в визуализации биологических объектов в основном как инструмент визуализации поверхности.

1.4. Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) представляет собой метод высокого разрешения, предоставляющий исходную информацию о клеточной и биологической структуре и позволяющий получать зависящую от времени динамическую информацию о биологических системах в их естественной среде. Большим преимуществом АСМ по сравнению с сканирующей электронной микроскопией является способность получать топографические данные с поверхности образца в водной, неводной или сухой среде. Благодаря чему удобно

использовать АСМ для получения изображений биологических образцов в их естественном состоянии.

Функциональные свойства биологических систем определяются сложным набором механических и электромеханических взаимодействий на масштабах длины в несколько порядков: от макро до нано.

В основе атомно-силовой микроскопии лежит измерение сил взаимодействия (дальнодействующая сила Ван-дер-Ваальса, упругая сила, электростатическая и др.) между поверхностью исследуемого образца и зондом микроскопа. Сила, с которой действует образец на зонд, деформирует консоль, приводя к ее изгибу. Контролируя уровень этого изгиба, можно следить и управлять силой их взаимодействия. Существует несколько режимов работы АСМ исходя от вида действующей силы: контактный, бесконтактный и полуконтактный [63].

АСМ обладает оптимальным разрешением для изучения структуры белка, в том числе и амилоидных фибрилл, поскольку латеральное разрешение составляет 0,5-1 нм, вертикальное – 0,1-0,02 нм. Для обеспечения наименьших повреждений и деформаций используют полуконтактный режим с латеральным разрешением в диапазоне 1,1-1,5 нм и вертикальным около 0,1 нм [64].

В полуконтактном режиме пьезовибратор возбуждает колебания кантилевера на частоте, близкой к резонансной, с амплитудой модуляции порядка десятков милливольт [65]. Расстояние между зондом и образцом соответствует касанию в нижнем полупериоде колебаний кантилевера. Суммарное взаимодействие определяется силой упругости в момент соприкосновения и силами Ван-дер-Ваальса. Локальная жесткость поверхности образца существенно влияет на изменение фазы и амплитуды кантилевера. Во время сканирования система обратной связи регистрирует изменения амплитуды и фазы колебаний кантилевера, которые формируют АСМ-изображение и распределение фазового контраста соответственно [66].

АСМ помимо построения изображений позволяет путем манипуляций с геометрическими размерами полипептидной цепочки определить расстояние между концами полипептидной цепочки и представить полученные данные как функцию удерживающей их силы. Зависимость результирующей силы от расстояния можно интерпретировать как потерю энтропии развернутых полипептидных цепочек по мере их распространения [66].

Благодаря этим функциям в настоящее время активно сочетают АСМ с методами молекулярной динамики для решения биофизических задач, например, исследование проблемы фолдинга белка.

1.5. Флуоресцентный анализ с использованием тиофлавина Т

Контроль образования амилоидных фибрилл обычно осуществляют путем мониторинга увеличения интенсивности флуоресценции при связывании амилоидного волокна с амилоидным специфическим красителем тиофлавином Т (ThT) или конго красным. Физический эффект флуоресценции заключается в том, что молекула исследуемого вещества поглощает квант света возбуждения и при этом переходит в новое, энергетически более богатое состояние, через некоторый промежуток времени она излучает избыточную энергию в виде кванта света флуоресценции (эмиссии).

Тиофлавин Т представляет собой бензотиазольный краситель, который проявляет повышенную флуоресценцию при связывании с амилоидными фибриллами и обычно используется для диагностики амилоидных фибрилл как *in ex vivo*, так и *in vitro*. В водных растворах тиофлавин Т существует в виде мицелл в концентрациях, обычно используемых для мониторинга фибрилл с помощью флуоресцентного анализа (10-20 мкМ) [67].

Структура тиофлавина Т имеет гидрофобный конец с диметиламиногруппой, присоединенной к фенильной группе, связанной с более полярной бензотиазольной группой, содержащей полярные N и S.

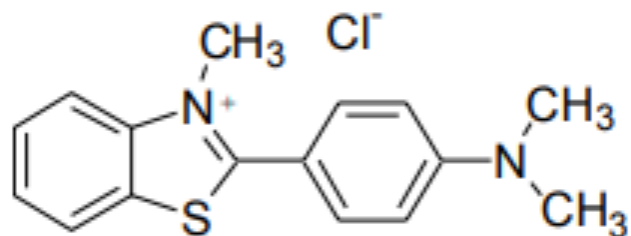


Рисунок 3 – Структура тиофлавина Т

Эта комбинация полярных и гидрофобных областей создает возможность для молекул тиофлавина Т образовывать мицеллы в водном растворе с гидрофобными внутренними и внешними поверхностями. Положительно заряженный N, направленный в сторону растворителя. Есть предположения, что тиазольный азот красителя и гидроксильные группы тканевых структур образуют водородные связи, приводящие к специфическому связыванию этих молекулы красителя для амилоида и других тканевых структур [68].

Несмотря на его широкое применение в диагностике амилоидных фибрилл *in ex vivo*, *in vitro* и в исследованиях на животных моделях, о механизме действия тиофлавина известно не так много.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Образование амилоидных фибрилл *in vitro*

Процедура приготовления фибрилл SEVI из пептида PAP248-286 выполнялась по протоколу, описанному в работе [69]. Фибриллы PAP248-286 получали растворением сухого пептида PAP248-286 в 1,5 мл фосфатного буфера NaPB pH 7,4. Буфер NaPB pH 7,4 был приготовлен с использованием воды Milli-Q и профильтрован через нитроцеллюлозную мембрану с порами 0,45 мкм перед использованием. Концентрацию полученного образца определяли спектрофотометрическим методом с использованием коэффициента поглощения A при длине волны 215 нм. Коэффициент экстинкции PAP248-286 составил $\varepsilon=2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Концентрация образца составила $c = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Для ускорения процесса образования фибрилл было включено перемешивание образца при 37 °C в течение 70 ч.

Для подтверждения и контроля фибриллообразования PAP248-286 использовали флуоресцентный анализ. Аликвоты PAP248-286 были извлечены из образцов PAP248-286 в объеме 16,9 мкл и тиофлавина Т в объеме 3,1 мкл, перемешивались, а затем наносились на планшет и проводили измерение флуоресценции образца. Тиофлавин Т необходим в качестве красителя, по своим свойствам образец не является флуоресцентным веществом.

Измерения флуоресценции проводились на мультимодальном ридере Thermo Scientific Varioskan LUX. Спектры излучения были получены в диапазоне от 450 до 550 нм.

Следующий этап – подготовка образца для исследования с помощью микроскопии. Как для исследования на СЭМ, так и АСМ образец высушивался при комнатной температуре в течение суток.

Измерения АСМ проводили на атомно-силовом микроскопе Bruker Dimension FastScan Bio. Параметры визуализации были скорректированы и оптимизированы для получения четких изображений с минимальными искажениями или повреждением образца.

В процессе подготовки образца для исследования на СЭМ микроскопии после высушивания наносилось напыление палладия с золотом, так как образец является диэлектрическим.

Буфер в процессе высушивания образца образовал соляную пленку, для исследования фибрилл необходимо провести процедуру отмывки. Для этого приготовили NA-NA фосфатный буфер и путем последовательных центрифугирований со сливом надосадочной жидкости отмыли фибриллы от NaCl, повторив процедуру пять раз.

СЭМ-визуализация проводилась на универсальном аналитическом комплексе сканирующей автоэмиссионной электронной микроскопии Zeiss Merlin.

2.2. Алгоритм молекулярного моделирования амилоидных фибрилл SEVI методом молекулярной динамики с использованием метадинамики

Для моделирования образования олигомеров на начальной стадии фибриллообразования PAP248-286 мы использовали комплексный подход, заключающийся в применении программных пакетов молекулярной динамики (Gromacs) [70] и метадинамики (Plumed) [71].

Молекулярное моделирование в настоящее время регулярно проводится для изучения взаимосвязи структуры, динамики и функций белка на атомарном уровне детализации. Надежность методов моделирования в значительной степени основана на точности базового эмпирического силового поля, которое может быть установлено на основе его способности воспроизводить и прогнозировать экспериментальные наблюдения. Качество силового поля

постоянно улучшается, в настоящей работе использовали полноатомную модель с обновленным силовым полем Charmm36, включающее усовершенствованные основные потенциалы карты коррекции энергии и новые двугранные параметры боковой цепи [72].

Во всех случаях моделировались водные растворы изучаемых молекул с использованием модели воды tip3p (рисунок 4). Данная модель воды является жесткой и относится к трёхточечному типу (три участка для электростатических взаимодействий). Частичные положительные заряды на атомах водорода уравниваются соответствующим отрицательным зарядом, расположенным на атоме кислорода. Межмолекулярного взаимодействия между двумя молекулами воды вычисляется с использованием типа потенциала Леннарда-Джонса только с одной точкой взаимодействия на молекулу – с центром на атоме кислорода [73]. Версия модели Charmm помещает параметры Леннарда-Джонса на атомы водорода в дополнение к кислороду. Заряды не изменяются. Трёхточечная модель tip3p обладает лучшей производительностью при расчете удельных теплот [74].

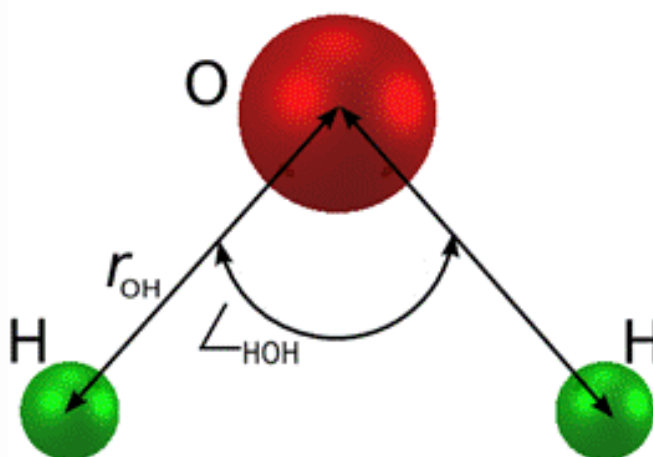


Рисунок 4 – Трёхточечная модель воды tip3p

Начальные структуры исследуемых PAP248-286 были сконструированы из мономера, полученного из PDB- банка (Банка белковых данных, идентификатор

PDB 2L3H) и для которого также была проведена минимизация энергии и уравнивание.

Затем был создан файл `pdb` с двумя молекулами PAP248-286, который используется для моделирования молекулярной динамики с помощью метадинамики. Потенциал смещения `Ubias` был включен в расчет с помощью метадинамики. `Ubias` является функцией коллективных переменных (CV), определяющих как расстояние между центрами масс R, так и количество специфических контактов мономер-мономер NCV. NCV определяется как расстояние между молекулами менее 0,3 нм, рассчитанное с помощью плагина `Plumed`.

Для каждой комбинации образования димера, тримера, тетрамера, гексамера и гептомера был выполнен единый алгоритм. Систему молекул помещали в кубическую ячейку с периодическими граничными условиями и заполняли ее водой. Для создания условий, приближенных к физиологическим, в систему помещали ионы Cl^- и Na^+ (до достижения 150 мМ концентраций). Суммарный заряд системы сводили к нулю при добавлении дополнительных ионов. Сторона куба для димера, тримера и тетрамера PAP248-286 составляла 8 нм, для гексамера и гептамера составляла 10 нм. Система молекул после добавления молекул воды и ионов Cl^- и Na^+ не находится в состоянии равновесия, что может привести к ошибкам в расчете сил, геометрии и артефактам. Для достижения равновесного состояния системой проводится минимизация энергии и уравнивание системы.

Для минимизации энергии использовали метод градиентного спуска с условием окончания минимизации в виде максимальной силы не более 1000,0 кДж/ (моль • нм). Оптимизированные молекулярные системы уравнивались в две фазы. В первой фазе производится сравнительно короткое моделирование динамики системы в NVT ансамбле (постоянное количество частиц, объем и температура) при температуре $T=300\text{K}$ в течение 100 пс, во второй фазе – моделирование в NPT ансамбле (постоянное количество частиц, давление и

температура) при температуре $T=300\text{K}$ в течение 1000 пс. Для моделирования в NVT-ансамбле использовался термостат Брендсона, подавляющий флуктуации кинетической энергии, корректируя скорости частиц, значения которых домнажались на фактор λ на каждом шаге:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right)}. \quad (19)$$

Для моделирования в NPT-ансамбле для поддержания постоянного давления применялся баростат Парринелло-Рамана. После этапа уравнивания система готова к запуску моделирования молекулярной динамики.

Для построения профилей свободной энергии для всех олигомеров мы провели моделирование методом метадинамики в пакете Gromacs с использованием библиотеки Plumed. Высота функции Гауссиана составила $w = 0,25$ кДж/моль и добавлялась каждые 2 пс, а изменения добавочного потенциала U_{bias} предпринимались каждые 20 пс. После расчета стороннего потенциала $U_{bias}(s)$, коллективных переменных и дополнительных сил управление возвращается в Gromacs, где на основе суммарных значений энергии и сил происходит обновление координат атомов для следующего шага – моделирования молекулярной динамикой. Продолжительность каждого моделирования молекулярной динамики составляла 100 нс, кадры динамики сохраняли каждые 10 пс. Для визуализации структур использовалась программа UCSF Chimera [75]. Все параметры моделирования указаны в таблице –1.

Образование тримера происходило путем добавления мономера в кубическую ячейку к димеру и выполнением всего алгоритма. Тетрамер получали из двух димеров, изначально расположенных в разных концах одной ячейки. Гексамер составляли из тетрамера путем добавления в ячейку димера, гептамер – путем добавления мономера к гексамеру. Визуализация олигомеров выполнялась в программе UCSF Chimera.

Стабилизированные комплексы с наименьшей энергией, полученные после молекулярной динамики, были использованы для изучения карт контактов.

	Уравновешивание		Моделирование метадинамики	Моделирование динамики
	NVT	NPT		
Шаг интегрирования	1 фс	1 фс	1 фс	1 фс
Число шагов	100000	1000000	100000000	100000000
Длительность	0,1 нс	1 нс	100 нс	100 нс
Шаг сохранения координат	5 пс	5пс	10 пс	10 пс
Температура	300 К	300 К	300 К	300 К
Давление	–	1,0 бар	1,0 бар	1,0 бар

Таблица 1. Параметры моделирования методом молекулярной динамики

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное исследование амилоидных фибрилл РАР248-286

Поскольку у Тиофлавина Т при связывании с амилоидными фибриллами увеличивается выход флюоресценции, то с увеличением количества амилоидных агрегатов будет наблюдаться рост интенсивности флюоресценции (рисунок 5). Из графика зависимости интенсивности флюоресценции от времени перемешивания РАР248-286 (Рисунок 6) виден активный рост фибрилл в образце, начиная с 24 часов после начала перемешивания.

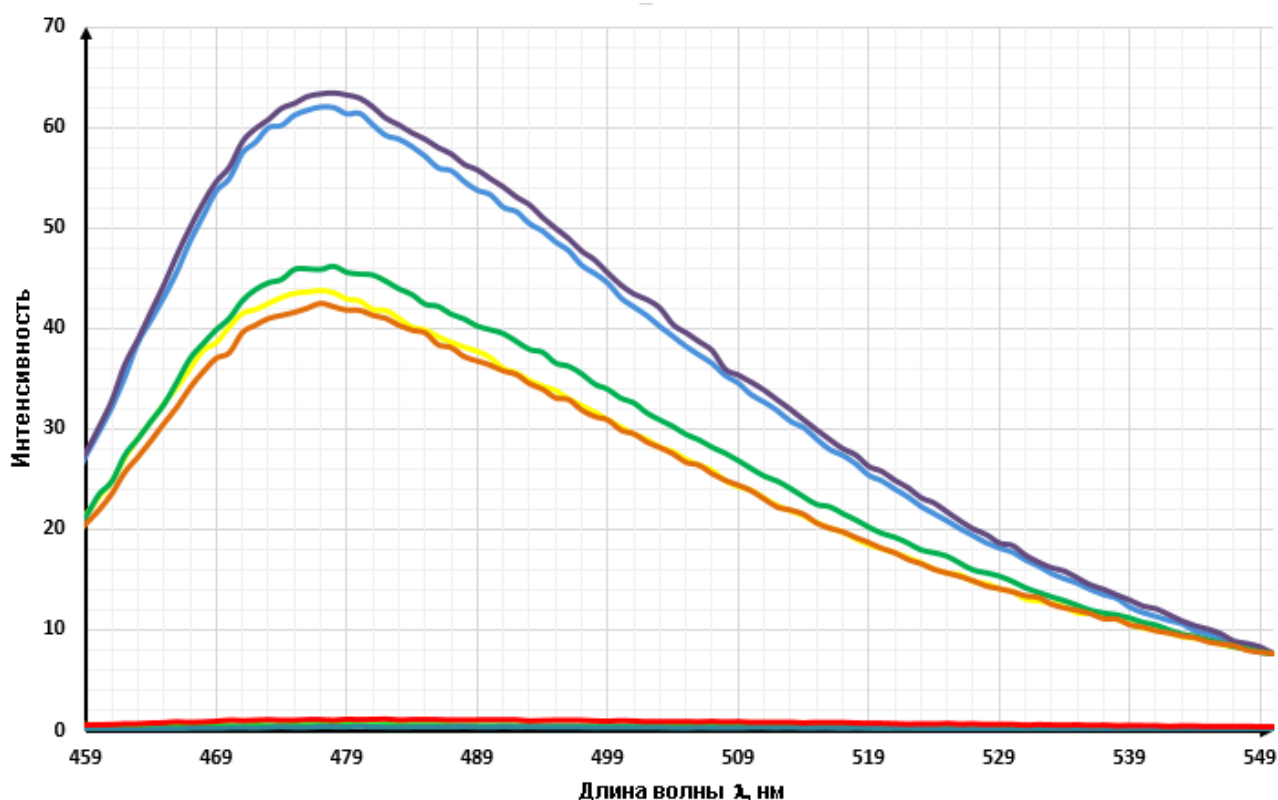


Рисунок 5 – Флуоресцентный анализ процесса фибриллообразования РАР 248-286. Салатовый – ThT, Бирюзовый – РАР+ThT 0ч, Красный – РАР+ThT 7ч., Красный – РАР+ThT 0ч., Оранжевый – РАР+ThT 24ч., Желтый – РАР+ThT 46ч., Зеленый – РАР+ThT 50ч., Синий – РАР+ThT 55ч., Фиолетовый – РАР+ThT 70ч.

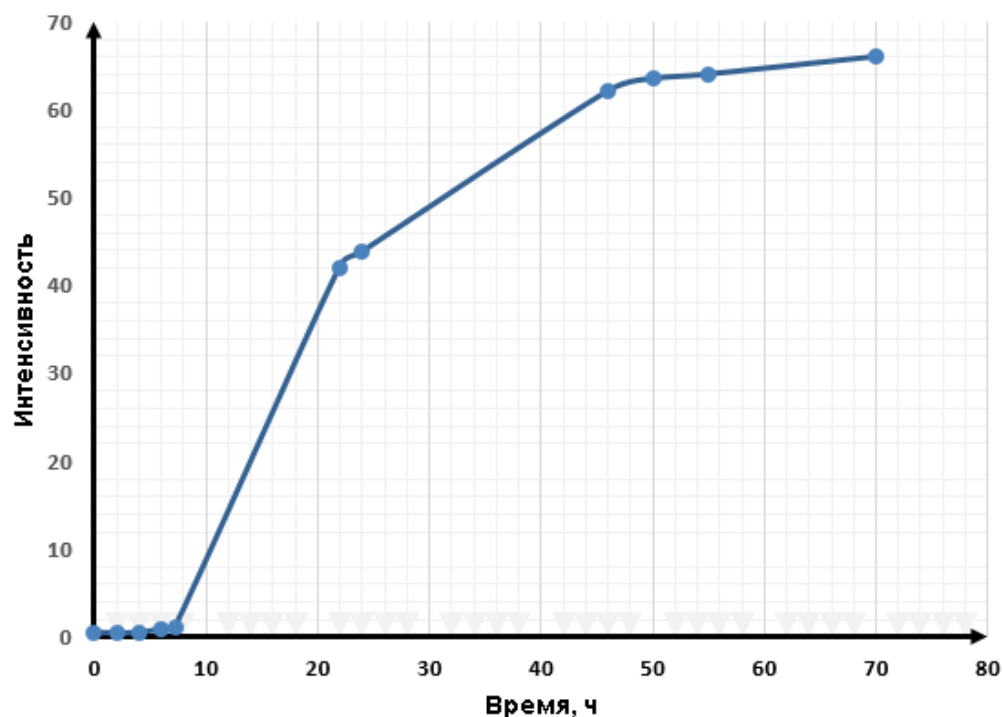


Рисунок 6 – График зависимости интенсивности флуоресценции от времени перемешивания PАР248-286 в процессе фибриллообразования

В ходе исследования выяснилось, что буфер в процессе высушивания образца образовал соляную пленку, которая не позволяет провести корректное измерение (рисунок 7). Для избавления от соляной пленки был применен метод отмывки путем последовательных центрифугирований с Na-Na буфером с последующим сливом надосадочной жидкости. Данная процедура позволила исследовать полученную пленку без повреждения самого образца (рисунок 8).

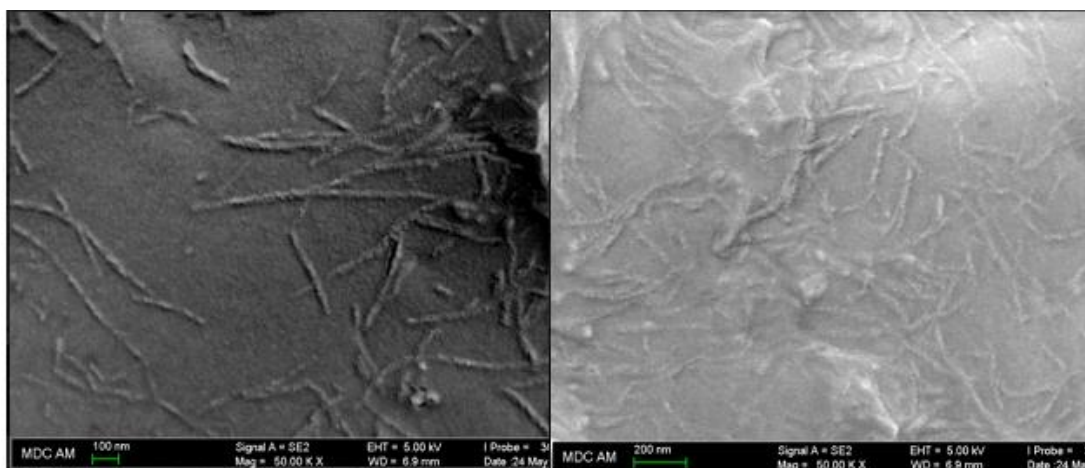


Рисунок 7 – Снимки фибрилл РАР (248-286) в СЭМ после 2х суток перемешивания без процедуры отмывки

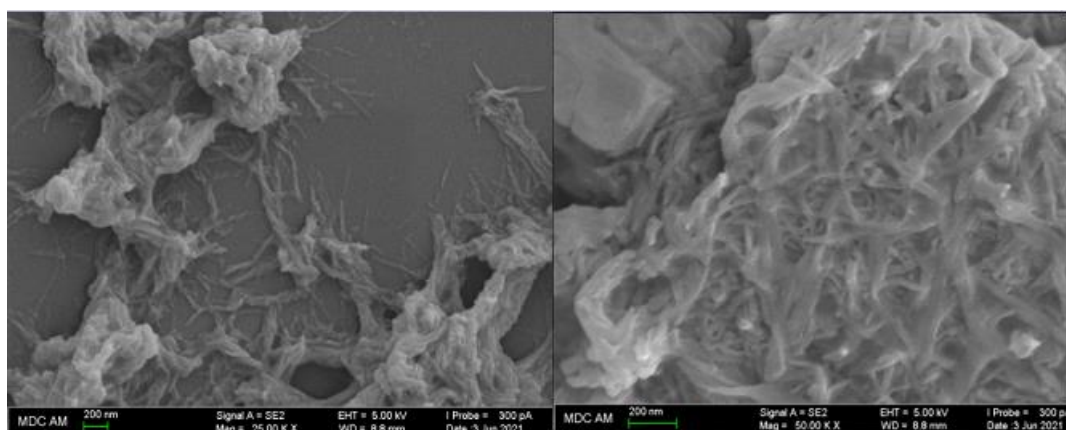


Рисунок 8 – Снимки фибрилл РАР248-286 в СЭМ после 2х суток перемешивания после процедуры отмывки

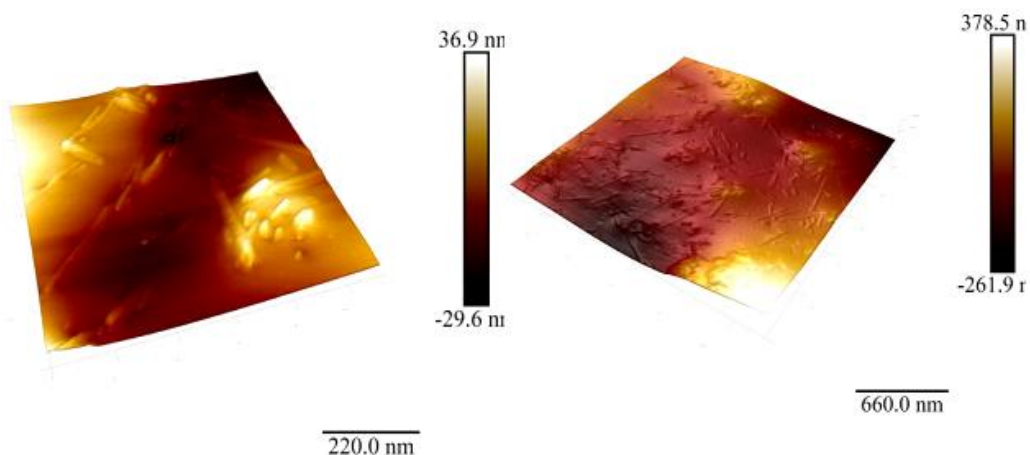


Рисунок 9 – Снимки фибрилл PAPP248-286 в АСМ после 3х суток перемешивания.

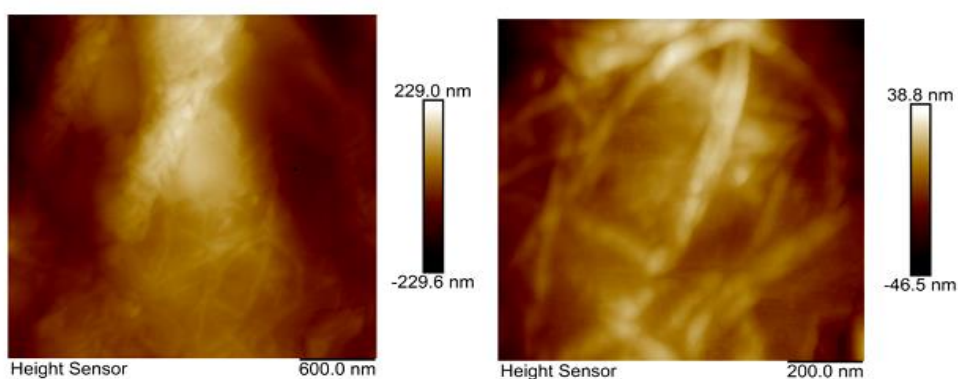


Рисунок 10 – Снимки фибрилл PAPP248-286 в АСМ после 4х суток перемешивания

Исследования с помощью АСМ (рисунок 9,10) и СЭМ (рисунок 8) микроскопии показало, что фибриллы образуются уже на вторые сутки, причем образуются преимущественно в скоплениях, размеры фибрилл составляют 29-36нм.

АСМ и СЭМ представляет собой вспомогательный инструмент в характеристике формирования амилоидных фибрилл. Поскольку амилоидные фибриллы *in vitro* имеют большой размер и не представляется возможным остановить их рост, то данный объект удобнее исследовать с помощью компьютерного моделирования.

Молекулярное моделирование олигомеризации пептида PAP248-286

С помощью молекулярного моделирования была получена карта свободной энергии ΔF для димера в зависимости от CV R и NCV (рисунок 11) и график зависимости свободной энергии ΔF от расстояния между центрами масс R в процессе димеризации PAP248-286 (рисунок 12).

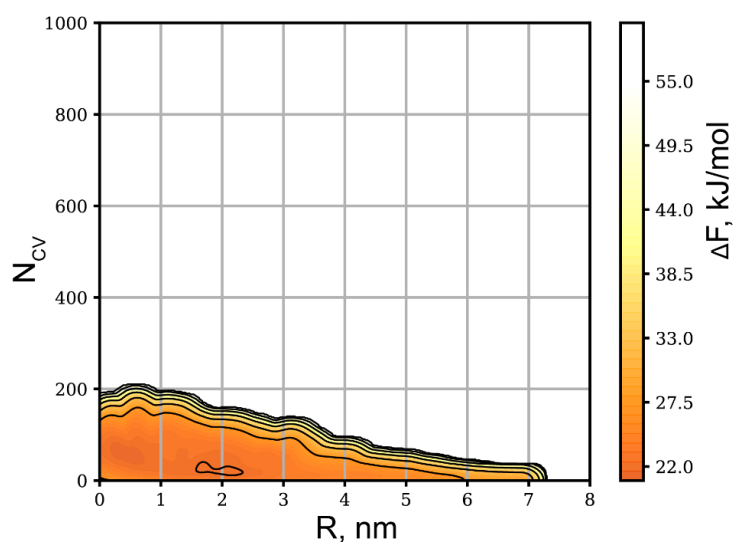


Рисунок 11 – Карта свободной энергии димеризации PAP248-286 в зависимости от расстояния между центрами масс R и количеством специфических контактов мономер-мономер NCV

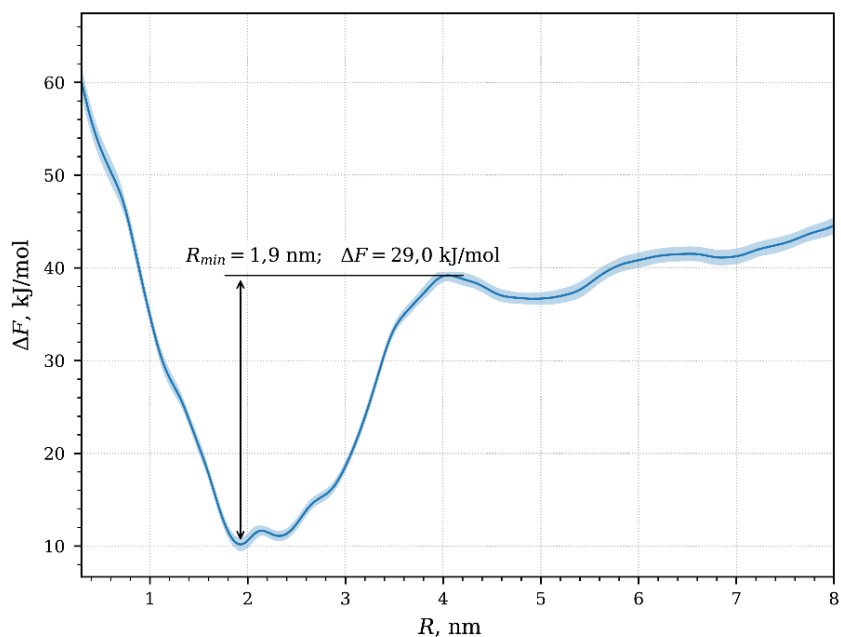


Рисунок 12 – График зависимости свободной энергии ΔF от расстояния между центрами масс R в процессе димеризации PAP248-286

На графике видно, что глобальный минимум в области $R = 1,9$ нм. Для проверки стабильности структуры димера было проведено моделирование минимальной свободной энергии без использования метадинамики. Необходимые параметры для моделирования молекулярной динамики: среднеквадратичное отклонение (СКО) координат атомов основной цепи (рисунок 13а) и радиус вращения (рисунок 13б) димера были получены путем анализа координатной траектории. Изменения значений СКО основной цепи и радиуса вращения указывают на стабильность димера PАР248-286 во время моделирования. На рисунке 14 показана конечная структура димера с минимальной свободной энергией.

Для олигомеров более высокого порядка (тример, тетрамер, гексамер, гептамер) были также построены карты свободной энергии (рисунок 15) и получены структуры (рисунок 16).

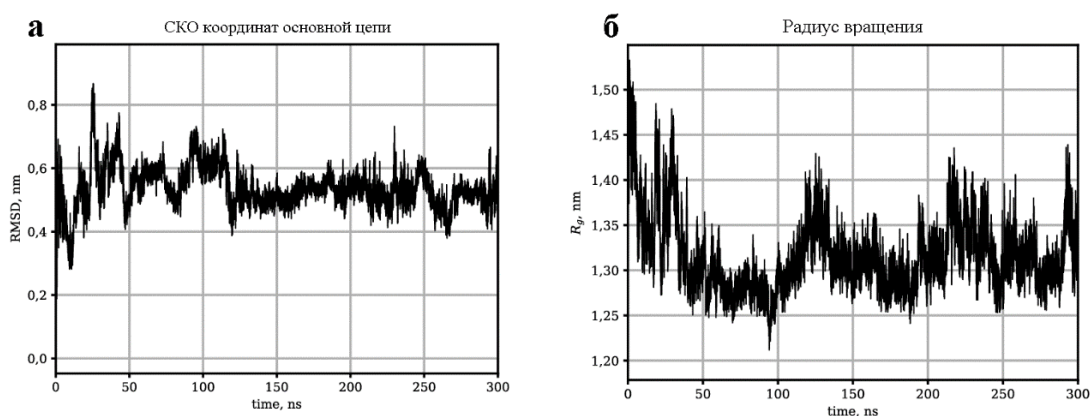


Рисунок 13 – (а) среднеквадратичное отклонение основной цепи и (б) радиус вращения димера PАР248-286

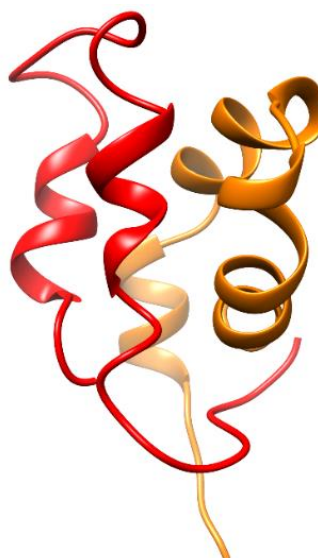


Рисунок 14 – Структура димера P4P248-286, соответствующая глобальному минимуму свободной энергии

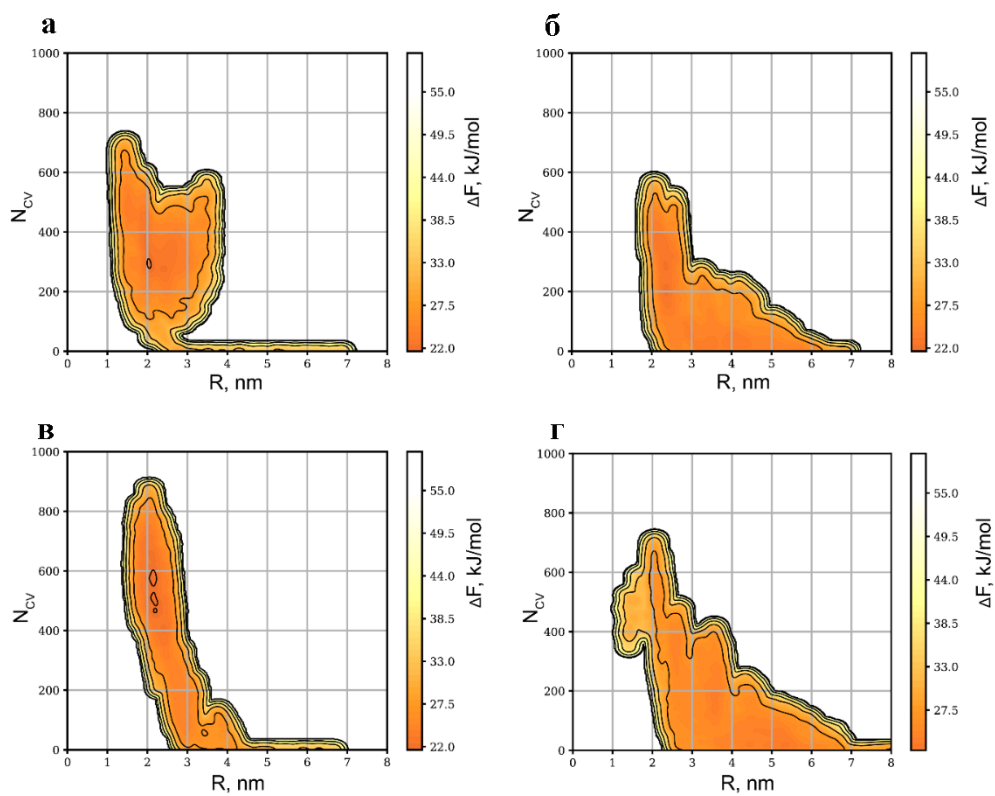


Рисунок 15 – Поверхность свободной энергии P4P248-286: (а) тример; (б) тетрамер; (в) гексамер; (г) гептамер

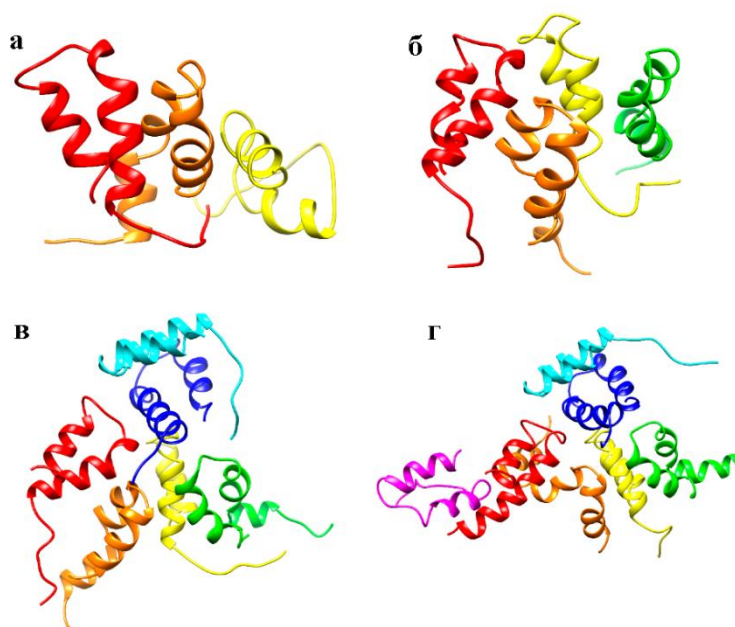


Рисунок 16 – Структура олигомеров RAR248-286: (а) тример; (б) тетрамер; (в) гексамер; (г) гептамер. Структуры соответствуют глобальному минимуму карты свободной энергии. 1–я молекула - красная, 2-я – оранжевая, 3-я - желтая, 4-я - зеленая, 5-я - голубая 6-я – синяя, 7-я – фиолетовая

Используя молекулярное моделирование, мы показали, что молекулы RAR248-286 имеют форму подковы с изгибами в областях аминокислотных остатков A274 и N269 в димерном состоянии. Молекулы димера RAR248-286 содержат α -спирали V262-N270 и I277-L283. Подковообразная форма основной цепи RAR248-286 участвует в формировании амилоидных фибрилл в соответствии с моделью стерической молнии [76]. Можно отметить, что положения спиральных областей (PDB ID 2L3H) в полипептидном мономере и димере совпадают, но длина и близость областей выше для состояния димера по сравнению с состоянием мономера. Аналогичные структурные изменения наблюдаются для олигомеров более высокого порядка RAR248-286 (рисунок 16).

Таким образом, увеличение длины спиральных областей и их параллельное расположение согласуются с механизмом образования амилоида, предложенным G. Liu и др. (2010) [77]. Мы можем предположить, что подковообразная форма основной цепи может вызвать дальнейшую трансформацию α -спиралей в β -листы и формирование модели стерической молнии, типичной для амилоидов

[76]. Авторы G. Liu и др. (2010) [77] предположили, что в лаг-фазе образования фибрилл существует несколько стадий: 1. стадия мономеров, содержащих нестабильные спиральные области; 2. формирование параллельных α -спиральных сборок; 3. перегруппировка спиральных секций в β -листы.

На рисунке 16 показано, что для всех олигомеров PAP248-286 наблюдается параллельное расположение спиральных областей для двух молекул, как это наблюдалось для димерной формы. Для всех олигомерных форм PAP248-286 наблюдалось попарно параллельное расположение спиральных областей, соответствующее предположению о второй стадии в фазе нуклеации образования фибрилл [77]. Существует отклонение от параллельного расположения неспаренной молекулы для нечетного порядка олигомера PAP248-286. Третья молекула не имеет спиральной области, параллельной спиральной области димерной пары в полипептидном тримере (рисунок 16b). Спиральная область седьмой молекулы в гептамере выравнивается параллельно спиральным областям первой молекулы, нарушая параллелизм внутри пары 1 и 2 молекул (рисунок 16d). На основании полученных данных можно сделать вывод, что начало процесса образования фибрилл PAP248-286 характеризуется попарно-параллельным расположением спиральных областей молекул полипептида, представленных во всех олигомерах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлены результаты исследования формирования амилоидных фибрилл пептида PAP248-286 с помощью флуоресцентного анализа, СЭМ/АСМ микроскопии и молекулярного моделирования.

- АСМ и СЭМ микроскопии показали, что фибриллы в условиях *in vitro* образуются на вторые сутки, преимущественно в скоплениях, размеры фибрилл составляют 29-36нм.
- Получены структуры олигомеров (димер, тример, тетрамер, гексамер, гептамер) амилоидогенного пептида PAP248-286.
- Установлено, что основная цепь олигомера PAP248-286 содержит изгибы в областях аминокислотных остатков A274 и N269. Эти основные цепи имеют форму подковы, что согласуется с моделью стерической амилоидной молнии, следовательно, можем предположить, что следующие стадии фибрилляции протекают согласно данной модели.
- Наблюдалось увеличение длины спиральных областей и их параллельного расположения, вызванное процессом олигомеризации, что согласуется с механизмом образования амилоида, предложенным G. Liu и соавт. [77].

Полученные данные могут быть использованы для разработки подхода к проектированию точечных мутаций, влияющих на процесс фибрилляции PAP248-286. Точечные мутации в аминокислотных остатках A274 и N269 (например, вставки из пролина) могут препятствовать изгибу основной цепи и предотвращать образование стерической молнии. Это может создать трудности для процесса фибрилляции PAP248-286.

Мы ожидаем, что настоящая работа может внести вклад в дальнейшие исследования амилоидных фибрилл SEVI и поиске их ингибитора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. From Alzheimer to Huntington: why is a structural understanding so difficult? / P.A. Termussi, L. Masino, A Pastore // *The EMBO journal*. – 2003. – Vol. 22, № 3. – P. 355–361.
2. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides / P. Westermark // *Federation of European Biochemical Societies journal*. – 2005. – Vol. 272, № 23. – P. 5942–5949.
3. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease/ F. Chiti, C.M. Dobson// *Annu Rev Biochem*. – 2006. – Vol.75, №1. – P. 333–366.
4. Protein aggregation and neurodegenerative disease / C.A. Ross, M.A. Poirier // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10, № 7. – P. S10–S17.
5. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade / F. Chiti, C.M. Dobson // *Annu Rev Biochem*. – 2017. – Vol. 86, № 1. – P. 27-68.
6. Amyloidosis / J.D. Sipe // *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. – 1994. – Vol. 31, № 4. – P. 325–354.
7. Folding proteins in fatal ways / D. Selkoe // *Nature*. – 2003. – Vol. 426. – P. 900–904.
8. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept / V.N. Uversky, C.J. Oldfield, A.K. Dunker // *Annual review of biophysics*. – 2008. – Vol. 37. – P. 215-246.
9. Intrinsically disordered proteins from A to Z / V. N. Uversky // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2011. – Vol. 43, № 8. – P. 1090-1103.
10. Escaping free-energy minima / A. Laio, M. Parrinello // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99. – P. 12562–12566.
11. New advances in metadynamics / L. Sutto, S. Marsili, F.L. Gervasio // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. – 2012.– Vol. 2. – P. 771–779.

12. Efficient schemes to compute diffusive barrier crossing rates / M.J. Ruiz-Montero, D. Frenkel, J. J. Brey // *Molecular Physics*. – 1997. – Vol.7, № 90. – P. 925–942.
13. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling / G.M. Torrie, J.P. Valleau // *Journal of Computational Physics*. – 1977. – Vol. 23. – P. 187–199.
14. Optimized Potential of Mean Force Calculations for Standard Binding Free Energies / I. Buch, S.K. Sadiq, G.D. Fabritiis // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2011. – Vol. 7. – P. 1765–1772.
15. Umbrella sampling / J. Kästner // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. – 2011. – Vol. 1, № 6. – P. 932–942.
16. Peptide Conformation and Supramolecular Organization in Amylin Fibrils: Constraints from Solid-State NMR / S. Luca, W-M. Yau, R. Leapman, R. Tycko // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46, № 47. – P. 13505–13522.
17. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR / A.T. Petkova, Y.Ishii, J.J. Balbach [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2002. – Vol. 99, № 26– P. 16742–16747.
18. The mechanism of phosphatidylcholine-induced interference of PAP (248-286) aggregation / V. Kumar, S. Gour, N. Verma [et al.] // *Journal of Peptide Science*. – 2019. – Vol. 25, № 4. – P. e3152.
19. Helical conformation of the SEVI precursor peptide PAP248-286, a dramatic enhancer of HIV infectivity, promotes lipid aggregation and fusion / J.R. Brender, K. Hartman, L.M. Gottler [et al.] // *Biophys J*. – 2009. – Vol. 97, № 9. – P. 2474-2483.
20. Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin / C. Goldsbury, K. Goldie, J. Pellaud [et al.] // *Journal of structural biology*. – 2000. – Vol. 130. – P. 352–362.

21. A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides? / A. Abedini, D.P. Raleigh // *Physical Biology*. – 2009. – Vol. 6, № 1. – P. 015005.
22. Амилоиды: от патогенеза к функции / А. А. Нижников, К. С. Антонец, С. Г. Инге-Вечтомов // *Биохимия*. – 2015. – № 80 (9). – С. 1356–75.
23. Peptide fibrillization / I.W. Hamley // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2007. – Vol 46, № 43. – P.8128–47.
24. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*/ J. Wessels, O. De Vries, S.A. Asgeirsdottir, F.H.J. Schuren// *Plant Cell*. – 1991. – Vol. 3, № 8. – P. 793–799.
25. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin / S.K. Collinson, P.C. Doig, J.L. Doran [et al.]// *Journal of Bacteriology*. – 1993. – Vol. 175, № 1. – P. 12–18.
26. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation / M.R. Chapman, L.S. Robinson, J.S. Pinkner [et al.] // *Science*. – 2002. – Vol.295, № 5556. – P. 851–855.
27. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms / K. Schwartz, A.K. Syed, R.E. Stephenson [et al.]// *PLoS Pathogens*. – 2012. – Vol. 8, № 6. – P. e1002744.
28. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection / C.J. Alteri, J. Xicohtencatl-Cortes, S. Hess [et al.]// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2007. – Vol. 104, № 12. – P. 5145–5150.
29. Амилоидные белки поверхности микроорганизмов: структура, свойства и значение для медицины / В. В. Рекстина, А. А. Горкoesкий, Е. Е. Беэсонов и др. // *Вестник РГМУ*. – 2016. – №1. – С. 4–13.
30. A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides / A. Abedini, D.P. Raleigh// *Protein engineering, design & selection*. – 2009. – Vol.22, № 8. – P. 453–459.
31. Protein folding and misfolding: A paradigm of selfassembly and regulation in complex biological systems / M. Vendruscolo, C.E. MacPhee, C.M.

Dobson // Philosophical transactions of the Royal Society. Series A. – 2003. – Vol. 361, № 1807. – P. 1205–1222

32. HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection / S.P. Layne, M.J. Merges, M. Dembo [et al.]// Nature. – 1990. – Vol. 346, № 6281. – P. 277–279.

33. Functional amyloid formation within mammalian tissue / D.M. Fowler, A.V. Koulov, C. Alory-Jost [et al.]// PLoS Biology. – 2006. – Vol. 4, №1. – P. 100–107.

34. Amyloid as a natural product / J.W. Kelly, W.E. Balch // The Journal of cell biology. – 2003. – Vol. 161, № 3. – P. 461–462.

35. NMR structure in a membrane environment reveals putative amyloidogenic regions of the SEVI precursor peptide PAP248–286 / R.P. Nanga, J.R. Brender, S. Vivekanandan[et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Vol. 131, № 49. – P. 17972–17979.

36. Core sequence of PAPf39 amyloid fibrils and mechanism of pH-dependent fibril formation: the role of monomer conformation / K.C. French, G.I. Makhatadze // Biochemistry. – 2012. – Vol. 51, № 51. – P. 10127–10136

37. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection / J. Münch, E. Rücker, L. Ständker [et al.]// Cell. – 2007. – Vol.131, №6. – P. 1059–1071.

38. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid b-protein fibrillogenesis / M. D. Kirkitadze, M. M. Condrón, D. B. Teplow // Biophysical Journal. – 2001. – Vol. 312. – P. 1103–1119.

39. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases / T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, C. M. Dobson // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2014. – Vol. 15. – P. 384–396.

40. Emerging principles of conformation-based prion inheritance / P. Chien, J.S. Weissman, A.H. DePace // Annu Rev Biochem. – 2004. – Vol. 73. – P. 617–656.

41. Механизмы образования амилоидных фибрилл / Н.В. Довидченко, Е.И. Леонова, О.В. Галзитская // Успехи биологической химии. – 2014. – т.54. – С. 203–230.

42. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation / S.I.A. Cohen, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, T.P.J. Knowles // *Journal of molecular biology*. – 2012. – Vol. 421, №2-3. – P. 160–171.
43. Amyloid fibril formation by an SH3 domain / J. I. Gujjarro, M. Sunde, J. A. Jones, C. M. Dobson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1998. – Vol. 95, № 8. – P. 4224–4228.
44. Conformational disease / R. W. Carrell, D. A. Lomas // *Lancet*. – 1997. – Vol. 350. – P. 134–138.
45. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature / A. M. Morris, M. A. Watzky, R. G. Finke // *Biochem Biophys Acta*. – 2009. – Vol. 1794, № 3. – P. 375–397.
46. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly / T. P. J. Knowles, C. A. Waudby, G. L. Devlin [et al.] // *Science*. – 2009. – Vol. 326, № 5959. – P. 1533–1537.
47. Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis / S.B. Padrick, A.D. Miranker // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41, № 14. – P. 4694–4703.
48. Kinetic analysis of beta-amyloid fibril elongation / M.J. Cannon, A.D. Williams, R. Wetzel [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2004. – Vol. 328. – P. 67–75.
49. Nucleation: the connections between equilibrium and kinetic behavior / F. Ferrone // *Methods Enzymology*. – 2006. – Vol. 412. – P. 285–299.
50. Kinetics and thermodynamics of amyloid fibril assembly / R. Wetzel // *Accounts of chemical research*. – 2006. – Vol. 39, № 9. – P. 671–679.
51. Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition / S. R. Collins, A. Douglass, R. D Vale, J. S. Weissman // *PLoS Biology*. – 2004. – Vol. 2, № 10. – P. 1582–1590.
52. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils / T. P. Knowles, A. W. Fitzpatrick, S. Meehan [et al.] // *Science*. – 2007. – Vol. 318, № 1900. – P. 1900–1903.

53. Frequency factors in a landscape model of filamentous protein aggregation / A. K. Buell, J. R. Blundell, C. M. Dobson [et al.]// Physical review letters. – 2010. – Vol. 104. – P. 228101.
54. The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion / T. Scheibel, J. Bloom, S. L. Lindquist// Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2004. – Vol. 101, № 8. – P. 2287–2292.
55. Molecular recycling within amyloid fibrils / N. Carulla, G. L. Caddy, D. R. Hall [et al.]// Nature. – 2005. – Vol. 436. – P. 554–558.
56. Nucleated polymerization with secondary pathways. III. Equilibrium behavior and oligomer populations / S. I. A. Cohen, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, T.P. J. Knowles // The journal of chemical physics. – 2011. – Vol. 135. – P. 065107.
57. Single-Molecule Imaging of Individual Amyloid Protein Aggregates in Human Biofluids / M. H. Horrocks, S. F. Lee, S. Gandhi [et al.] // ACS chemical neuroscience. – 2016. – Vol. 7, № 3. – P. 399–406.
58. Single-molecule FRET studies on alpha-synuclein oligomerization of Parkinson's disease genetically related mutants / L. Tosatto, M. H. Horrocks, A. J. Dear [et al.]// Scientific reports. – 2015. – Vol. 19, № 5. – P. 16696.
59. Fast flow microfluidics and single-molecule fluorescence for the rapid characterization of α -synuclein oligomers / M. H. Horrocks, L. Tosatto, A. J. Dear [et al.]// Analytical chemistry. – 2015. – Vol. 87, №17. – P. 8818–8826.
60. GROMACS: fast, flexible, and free / D.V.D. Spoel, E. Lindahl, B. Hess [et al.]// Journal of Computational Chemistry. – 2005. – Vol.26. – P. 1701–1718.
61. Well-tempered metadynamics: A smoothly converging and tunable free-energy method / A. Barducci, G. Bussi, M. Parrinello// Physical Review Letters. – 2008. – Vol. 100. – P. 020603.
62. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review / A. Mohammed, A. Abdullah // Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics – HERVEX. – 2018. – P. 1–9.
63. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений / Российская академия

наук, Институт физики микроструктур; автор-составитель В. Л. Миронов. – Нижний Новгород – 2004. – С. 114.

64. Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM / D. J. Muller, H. Janovjak, T. Lehto [et al.] // *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 79. – P. 1–43.

65. Tapping-mode atomic force microscopy and phase-imaging in higher eigenmodes / R. W. Stark, T. Drobek, W. M. Heckl // *Applied Physics Letters*. – 1999. – Vol. 74, № 22. – P. 3296–3298.

66. Атомно-силовая микроскопия и ее применения в науке, технике и реставрации / В. А. Парфенов, И. А. Юдин // *Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ»*. – 2015. – № 9. – С. 61-70.

67. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils / R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, Sue A. Carter, V. Krishna [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2005. – Vol. 151. – P. 229–238.

68. On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes / G. Kele'nyi // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 1967. – Vol. 15, № 3. – P. 172–180.

69. Mechanism of fibril formation by a 39-residue peptide (PAPf39) from human prostatic acidic phosphatase / Z. Ye, K.C. French, L.A. Popova, [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48, № 48. – P. 11582–11591.

70. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit / S. Pronk, S. Pall, R. Schulz [et al.] // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29. – P. 845–854.

71. PLUMED 2: New feathers for an old bud / G. A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi [et al.] // *Computer Physics Communications*. – 2014. – Vol. 185, №.2. – P. 604–613.

72. CHARMM36 All-Atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data / J. Huang, A.D. MacKerell. // *Journal of Computational Chemistry*. – 2013. – Vol. 34. – P. 2135–2145.

73. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration / H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren [et al.] Nature. – 1981. – Vol.11, № 1. – P. 331–342.

74. Thermal conductivity, shear viscosity and specific heat of rigid water models / Y. Mao, Y. Zhang // Chemical Physics Letters. – 2012. – Vol.542. – P. 37–41.

75. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang [et al.]// Journal of Computational Chemistry. – 2004. – Vol. 25, № 13. – P. 1605-1612.

76. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils / L. Goldschmidt, P.K. Teng , R. Riek, D. Eisenberg // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2013. – Vol. 107, № 8. – P. 3487–3492.

77. Mechanistic Studies of Peptide Self-Assembly: Transient α -Helices to Stable β -Sheets / G. Liu, A.Prabhakar, D.Aucoin [et al.]// Journal of the American Chemical Society. – 2010. – Vol. 132, № 51. – P. 18223–18232.