

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

ННІ «Фізико-технічний факультет»

Кафедра Медичної фізики та біомедичних нанотехнологій

## Пояснювальна записка

До дипломної роботи бакалавра

на тему (укр. мова)

Вплив поліфенольних сполук на взаємодію амілоїдних  
фібрил з білками: молекулярний докінг та молекулярно-  
динамічне моделювання

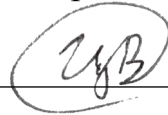
на тему (англ. мова)

The effect of polyphenolic compounds on the interaction of  
amyloid fibrils with proteins: molecular docking and  
molecular dynamics modeling

---

Виконав: студент 4 курсу, групи ТБ-41

Напрямок підготовки 105 «Прикладна фізика та  
наноматеріали»



Валерій ЦЯЦЬКО

(підпис, прізвище та ініціали)

Науковий керівник:



Галина ГОРБЕНКО

(підпис, прізвище та ініціали)

Рецензент:



Валерій ЛІСОВСЬКИЙ

(підпис, прізвище та ініціали)

## АНОТАЦІЯ

Цяцько В.В. – Вплив поліфенольних сполук на взаємодію амілоїдних фібрил з білками: молекулярний докінг та молекулярно-динамічне моделювання. – Рукопис.

Дипломна робота бакалавра за спеціальністю 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» – Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, Харків, 2025.

74 с., 25 рис., 6 табл., 35 джерел.

За допомогою молекулярного докінгу в HDOCK та молекулярно-динамічного моделювання у GROMACS досліджено вплив 7 поліфенолів (галової кислоти, саліцилової кислоти, куркуміну (кетос- та енольної форм), кверцетину, ресвератолу і сезаміну) на зв'язування нативних функціональних білків альбуміну та інсуліну з амілоїдними фібрилами Абета-пептиду, одотриптофанового мутанту M3 фрагменту 1-83 аполіпропротеїну AI (1–83/G26R/W@8) та інсуліну. Показано, що практично всі поліфеноли (крім сезаміну), а найчастіше – галова та саліцилова кислоти, можуть дестабілізувати принаймні один білок-фібрильний комплекс. Даний ефект поліфенолів було найчастіше зумовлено зниженням кількості нековалентних зв'язків, сформованих між білком та фібрилами, завдяки витісненню нативного білка на інший сайт зв'язування на амілоїдній фібрилі або завдяки формуванню зв'язків поліфенолів з амінокислотними залишками функціонального білка, які також беруть участь у формуванні контактів з фібрилярними агрегатами. Продемонстровано, що галова кислота призводить до більшої дестабілізації комплексу нативного інсуліну з фібрилами інсуліну, ніж саліцилова, через вищі значення середньоквадратичного відхилення остову, радіусу інерції, найнижчу кількість  $\beta$ -тяжів амілоїдних фібрил, що залишилися після 10 нс моделювання, а також — завдяки значній стабілізації спіральної структури амінокислотних залишків CYS7A та ASN18A інсуліну.

Ключові слова: амілоїдні фібрили, білок-фібрильні комплекси, інсулін, альбумін, галова кислота, саліцилова кислота, молекулярний докінг, молекулярно-динамічне моделювання

## SUMMARY

Tsiatsko V.V. – The effect of polyphenolic compounds on the interaction of amyloid fibrils with proteins: molecular docking and molecular dynamics modeling. – Manuscript.

Bachelor's thesis in speciality 105 "Applied Physics and Nanomaterials" –

V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2025.

74 pages, 25 figures, 6 tables, 35 sources.

The effect of 7 polyphenols (gallic acid, salicylic acid, curcumin (keto- and enol forms), quercetin, resveratrol, and sesamin) on the binding of native functional proteins albumin and insulin to amyloid fibrils of A $\beta$ -peptide, single Trp variant M3 of apolipoprotein A-I 1-83 fragment (1–83/G26R/W@8), and insulin was investigated using molecular docking in HDOCK and molecular dynamics simulation in GROMACS. It appeared that almost all polyphenols (except sesamin), and most often gallic and salicylic acids, can destabilize at least one protein-fibril complex. This effect of polyphenols was predominantly result from a decrease in the number of noncovalent protein-fibril bonds due to the displacement of the native protein to another binding site on the amyloid fibril or due to the formation by the polyphenol noncovalent bonds with amino acid residues of the functional protein, which were also involved in the protein-fibril binding. Gallic acid was shown to induce a greater destabilization of the complex of native insulin with insulin fibrils than salicylic acid, due to higher values of the root mean square deviation of the backbone, the radius of inertia, the lowest number of  $\beta$ -strands of amyloid fibrils remaining after 10 ns of simulation, and finally, due to the significant stabilization of the helical structure of the amino acid residues CYS7A and ASN18A of insulin.

Keywords: amyloid fibrils, protein-fibril complexes, insulin, albumin, gallic acid, salicylic acid, molecular docking, molecular dynamics modeling

## ЗМІСТ

Помилка: джерело посилання не знайдено

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10
РОЗДІЛ 1.1. ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІФЕНОЛІВ У БІОМЕДИЦИНІ.....	10
РОЗДІЛ 1.2. АМІЛОЇДНІ ФІБРИЛИ ТА НАТИВНІ ФУНКЦІОНАЛЬНІ БІЛКИ.....	13
РОЗДІЛ 1.3. МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ.....	18
РОЗДІЛ 1.4. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ.....	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	25
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПОЛІФЕНОЛІВ НА СТАБІЛЬНІСТЬ КОМПЛЕКСІВ НАТИВНИХ БІЛКІВ З АМІЛОЇДНИМИ ФІБРИЛАМИ.....	33
РОЗДІЛ 3.1. РЕЗУЛЬТАТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ.....	33
РОЗДІЛ 3.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ КОМПЛЕКСІВ ІНСУЛІНУ З ФІБРИЛАМИ ІНСУЛІНУ У ПРИСУТНОСТІ ПОЛІФЕНОЛІВ.....	60
ВИСНОВКИ.....	69
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	72

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ**

InsF — амілоїдні фібрили інсуліну людини

InsN — нативний інсулін людини

M3 — фібрили мутанту M3 аполіпопротеїну AI

Abeta — амілоїдні фібрили Аbeta-пептиду (1-42)

HSA — людський альбумін

GA — галова кислота

PA — саліцилова (фенольна) кислота

CUR1 — куркумін (енольна форма)

CUR2 — куркумін (кетон-форма)

QUR — кверцетин

RV — ресвератол

SSM — сезамін

RMSD — середньоквадратичне відхилення остову

$R_g$  — радіус інерції

Helicity — спіральність структури

EGCG — епігалокатехін

KG — kaempferol-7-O-glycoside

## ВСТУП

Неправильна агрегація білків, що призводить до формування високовпорядкованих агрегатів, амілоїдних фібрил, асоційована з розвитком патологічних захворювань, зокрема, системного амілоїдозу, хвороб Альцгеймера та Паркінсона [1]. Амілоїдні фібрили мають у складі велику кількість бета-тяжів, агрегованих у бета-листи, які у свою чергу здатні до латеральної агрегації та формування зрілої фібрили. Попередниками амілоїдних фібрил є олігомери, які також характеризуються високим вмістом бета-структури і високою цитотоксичністю, зокрема, формуванням іонних каналів у клітинних мембранах, збільшенням провідності ліпідного бішару, підвищення формування активних форм кисню [1]. Організм людини намагається боротися цитотоксичною дією амілоїдних фібрил, зокрема, завдяки шаперонові активності людського альбуміну, який зв'язується зі стресовими білками, наприклад, частково денатурованими та здатними формувати амілоїдні фібрили, і виводить їх з реакції [2]. Але альбумін, зв'язуючись з попередниками амілоїдних фібрил, може таким чином втрачати свою нативну функцію, оскільки втрачає здатність зв'язуватися з природними лігандами та лікарськими речовинами.

Інсулін — важливий функціональний білок, основною функцією якого є регуляція транспорту глюкози на поверхню клітини та її запасання в організмі завдяки серії сигналів, які передаються транспортерам глюкози. Крім того, інсулін регулює апетит, має розвивальну дію на нейрони та пам'ять людини, але також у випадку мутації може бути здатним до аномального фосфорилування та у білка, опосередковано стимулюючи розвиток хвороби Альцгеймера [3, 4]. Також інсулін може формувати амілоїдні фібрили у сайтах внутрішньовенних ін'єкцій інсуліну пацієнтів-діабетиків, а також під час довготривалого зберігання фармакологічних препаратів інсуліну [5, 6]. Останнє явище може бути зумовлено тим фактом, що існує певна критична

концентрація інсуліну та певна дестабілізація молекули білка, які призводять до формування амілоїдних фібрил.

Беручи до уваги вище зазначені факти, можна стверджувати, що стратегія лікування амілоїдних хвороб, яка передбачає між іншим пригнічення взаємодія амілоїдних фібрил з нативними функціональними білками, зокрема, альбуміном та інсуліном, може бути корисною для збереження нативних функцій цих білків.

Поліфеноли — це молекули, що містять у складі одне або декілька фенольних кілець та використовується для захисту від оксидативного стресу в організмі людини [7]. Крім того, поліфеноли, зокрема, куркумін, EGCG, кверцетин, мірицетин, ресвератол можуть інгібувати формування амілоїдних фібрил на стадіях нуклеації та/або елонгації завдяки пі-стекінговій взаємодії з ароматичними амінокислотними залишками білків, які зазвичай сприяють формуванню амілоїдних фібрил [7,8]. Куркумін та кверцетин, рутин також здатний пом'якшувати окислювальний стрес, викликаний токсичним ефектом амілоїдних фібрил на організм людини, завдяки своїй здатності поглинати вільні радикали, стимуляції антиоксидантних механізмів організму та хелатувати іон двовалентного заліза, відповідно [7].

В цілому завдяки наявності спільного фенольного кільця поліфеноли можуть утворювати тривимірні конформації, які здатні забезпечувати нековалентну взаємодію з бета-листами амілоїдних фібрил, що призводить до інгібування росту фібрил, через що поліфеноли є потенційними анти-амілоїдними ліками [7].

У цьому контексті можна припустити, що поліфеноли будуть інгібувати взаємодію і, як наслідок, дестабілізуючий вплив амілоїдних фібрил на нативні функціональні білки, завдяки в своїй добрі здатності до взаємодії з ароматичними залишками амінокислот амілоїдних фібрил білків.

Молекулярний докінг — простий та швидкий метод визначення сайту зв'язування ліганду на макромолекулі-мішені, оцінити енергію такого зв'язування та вибрати структуру найбільш енергетично вигідного комплексу,

який має найнижчу енергію зв'язування, за допомогою функції оцінки [9].

Молекулярний докінг є основним інструментом комп'ютерного дизайну ліків на основі структури мішені та вибору сполук-лідерів. Недоліками молекулярного докінгу є неможливість врахувати під час моделювання тиск, температуру, неможливість якісного моделювання розчинника, гнучкості молекули-мішені та ентропії, тому для якісної інтерпретації результатів, результати молекулярного потребують підтвердження експериментальними дослідженнями або молекулярно-динамічним моделюванням [9, 10].

Завдяки методу молекулярно-динамічного моделювання можна визначити структуру біологічних комплексів та їх динаміку у атомних масштабах, хоча цей метод займає дуже багато комп'ютерного часу [11]. Припущення квантової хімії про нерухомість атомних ядер і неможливість явного представлення розчинника при квантових хімічних розрахунках, робить метод молекулярної динаміки більш доцільним у випадку досліджень великих біомолекулярних ансамблів. Для таких ансамблів молекулярна динаміка будує моделі, використовуючи емпіричну параметризацію на основі експериментів, зокрема, класичні кулонівські взаємодії між атомними зарядами. Тому результати моделювання молекулярної динаміки є більш надійними, ніж квантово-хімічні, особливо у мілісекундному часовому діапазоні [11]. В основу молекулярної динаміки лежить розв'язок рівнянь руху Ньютона [11]. Метод молекулярно-динамічного моделювання зараз широко використовується для опису механізму взаємодій біомолекул на атомному.

Метою даної роботи було дослідити вплив поліфенолів на взаємодію амілоїдних фібрил інсуліну, Абета-пептиду та одотриптофанового мутанту фрагменту аполіпопротеїну AI з нативними функціональними білками - людським альбуміном та інсуліном. Для виконання мети було поставлено та вирішено такі завдання: 1) провести молекулярний докінг поліфенольних сполук (саліцилової та галовою кислот, кето- та енольної форм куркуміну, сезаміну, ресвератолу та кверцетину) з нативними функціональними білками

в HDOCK; 2) провести молекулярний докінг амілоїдних фібрил з нативними функціональними білками, а також — з білок-поліфенольними комплексами в HDOCK; 3) порівняти значення енергій зв'язування найбільш оптимальних білок-фібрильних комплексів з енергіями зв'язування найбільш оптимальних комплексів амілоїдних фібрил з білок-поліфенольними комплексами; 4) проаналізувати сайти зв'язування нативних білків на амілоїдних фібрилах, а також амінокислотні залишки нативних функціональних білків, зв'язаних з амілоїдними фібрилами, у присутності та за відсутності поліфенолів; 5) за допомогою молекулярно-динамічного моделювання у GROMACS проаналізувати вплив галової та саліцилової кислот на стабільність найбільш енергетично вигідних комплексів амілоїдних фібрил інсуліну з нативним інсуліном, отриманих у результаті молекулярного допінгу; 6) на основі отриманих результатів виявити, які поліфеноли здатні дестабілізувати білок-фібрильні комплекси і запропонувати механізм їх дії.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### РОЗДІЛ 1.1. ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІФЕНОЛІВ У БІОМЕДИЦИНІ

Поліфеноли — природні молекули, до складу яких входить одне або декілька фенольних кілець, та які використовуються для захисту від оксидативного стресу і цитотоксичних факторів [7]. На основі кількості та положення фенольних кілець, поліфеноли діляться на чотири класи: фенольні кислоти, лігнани, флавоноїди та стилібени. Кверцетин та куркумін, подібно до інших флавоноїдів, мають основну структуру, що складається з двох вуглецевих кілець, які між собою поєднані тривуглецевим гетероциклом, у якому є атом кисню. Галова та саліцилова кислоти, наприклад, є прикладом фенольних кислот, похідними бензойної кислоти. Ресвератол є прикладом стилібенів, які мають дві фенольні кільця, поєднані двовуглецевим містком. Сезамін є прикладом лігнанів, кожен з яких має у складі 2,3-добензилбутан [7].

Поліфеноли також використовуються у якості потенційних інгібіторів процесу формування амілоїдних фібрил, зокрема, лізоциму, фібрилізація якого пов'язана з розвитком системного амілоїдозу людини. Наприклад, куркумін ефективно пригнічував фібрилізацію 200 мілімолей розчину білка, а також сприяв руйнуванню зрілих фібрилярних агрегатів. Інший поліфенол, EGCG, також сприяв зниженню цитотоксичності фібрилярних агрегатів лізоциму, зміщуючи процес агрегації до формування великих агрегатів, що не були схильні до взаємодіяти з клітинами [8].

Неправильне згортання Абета-пептиду та утворення ними амілоїдних бляшок асоціюється з розвитком хвороби Альцгеймера, а поліфеноли пригнічують мутації Абета-пептиду і тау-білка, що знижує ризик розвитку хвороби Альцгеймера. Нативна функція цих двох білків регулюється фосфорилуванням, зокрема, гіперфосфорилування спричиняє порушення

роботи філаментів та формування амілоїдних фібрил. Так само і у випадку пріонних білків, які можуть бути схильні формувати цитотоксичні амілоїдні фібрили через мутації [7].

Завдяки пі-стекинговим взаємодіям з ароматичними амінокислотними залишками білка, що часто входять до складу ядра амілоїдних фібрил та сприяють агрегації білка. Водночас поліфеноли знижують швидкість формування амілоїдних фібрил, взаємодіючи з ароматичними амінокислотними залишками. Також було показано, що мірицетин пригнічує нуклеацію, а кверцетин та куркумін і галова кислота — інгібують елонгацію амілоїдних фібрил.

Амілоїдні бляшки також утворюють активні форми кисню, що зумовлюють цитотоксичність амілоїдних фібрил, а поліфеноли, особливо куркумін, пом'якшують цей окислювальний стрес, оскільки здатні поглинати вільні радикали та стимуляції антиоксидантних механізмів організму завдяки взаємодії з ферментами, таких як каталаза. Кверцетин та рутин здатні хелатувати іон двовалентного заліза, чим пояснюється їх сильні антиоксидантні властивості. Серед проблем використання поліфенолів є їх швидке розкладання на неактивні метаболіти [7].

Куркумін, подібний за структурою до Конго червоного, пригнічує формування олігомерів Абета-пептиду, а навіть призводить до руйнування зрілих амілоїдних бляшок. Також куркумін має здатність хелатувати іони двовалентного купруму, що також пригнічує формування амілоїдних фібрил, для яких іон купрум є каталізатором. Незважаючи на низьку біодоступність через здатність розкладатися у фосфатному буфері при рН 9, 80 С протягом 20 хвилин, продукти його розпаду також є ефективними у інгібування формування амілоїдних фібрил Абета-пептиду.

Ресвератол зв'язується з N-кінцем мономерного Абета-пептиду A $\beta$ 1-42, запобігаючи формуванню олігомерів амілоїдних фібрил. Також він має протизапальну дію та може боротися з запаленням мікроглії, яке утворюється

через фібрили Абета-пептиду у клітинах PC12. Ресвератол активує фермент неприлізин, який стимулює виведення Абета-пептиду з організму [7].

Катехіни зеленого чаю (які складають 30% від сухої маси чайного листа), до яких входить поліфенол епігалокатехін (EGCG) та галова кислота, здатні підтримувати когнітивні здібності людей похилого віку на належному рівні, що також може бути корисним для лікування негативних ефектів хвороба з Альцгеймера на когнітивні здібності людей.

Водночас нещодавнє дослідження свідчить про те, що розчинність поліфенолів значно впливає на їх ефект на розвиток амілоїдних фібрил. Наприклад, поліфенол EGCG має вищу розчинність, ніж поліфенол kaempferol-7-O-glycoside (KG), що призвело до того, що перший поліфенол пригнічував формування амілоїдних фібрил альфа-синуклеїну (формування та відкладання яких організмів асоціюється з розвитком хвороби Паркінсона), сприяючи формуванню комплексів білка, розчинних у воді. Натомість, KG сприяв утворенню амілоїдних фібрил, оскільки формував комплекси білка з нижчою розчинністю у воді [12].

В цілому завдяки наявності спільного фенольного кільця поліфеноли можуть утворювати тривимірні конформації, які здатні забезпечувати не ковалентну взаємодію з бета-листами амілоїдних фібрил, що призводить до інгібування росту фібрил, через що поліфеноли є потенційними антиамілоїдними-ліками [7].

У цьому контексті можна припустити, що поліфеноли будуть інгібувати взаємодію і, як наслідок, дестабілізуючий вплив амілоїдних фібрил на нативні функціональні білки, завдяки в своїй добрі здатності до взаємодії з ароматичними залишками амінокислот амілоїдних фібрил білків.

## РОЗДІЛ 1.2. АМІЛОЇДНІ ФІБРИЛИ ТА НАТИВНІ ФУНКЦІОНАЛЬНІ БІЛКИ

Специфічна агрегація білків, під час якої утворюються так звані амілоїдні фібрили, часто пов'язана з розвитком амілоїдних захворювань, зокрема системного амілоїдозу, хвороби Паркінсона та Альцгеймера [1]. Фібрилярні агрегати утворюються шляхом конформаційних змін у негативних функціональних білках, за якими слідує формування олігомерів, протофібрил та зрілих фібрил, що містять ядро, яке складається з латерально-агрегованих бета-листів, що складаються з впорядкованих бета-тяжів (рис. 1.1). Олігомери вважаються одними із найбільш токсичних білкових агрегатів. В експериментальних дослідженнях амілоїдні фібрили утворюють за допомогою підвищеної температури, зміни напруження, а також у кислому середовищі. У живих організмах амілоїдні фібрили формуються через оксидативний стрес або мутації, що призводять до неправильного згортання білка [1]. Олігомери призводять до руйнування клітинних мембран та в цілому нейронів під час хвороби Альцгеймера, що має дуже негативні наслідки для пацієнта. Також деякі дослідження показують, що накопичення зрілих амілоїдних фібрил має захисний характер, оскільки водночас маємо багато менше олігомерів. Олігомери також порушують гомеостаз кальцію, формуючи іонні канали та збільшуючи провідність ліпідного бішару [1].

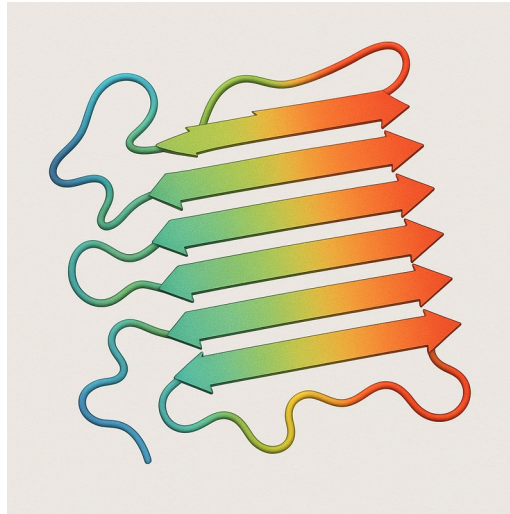


Рис. 1.1. Структура бета-листа модельної амілоїдної фібрили, яка складається з 6 бета-тяжів (показано стрілочками), що лежать в одній площині, та пов'язані водневими зв'язками. Фібрила може мати декілька бета-листів, латерально агрегованих між собою за допомогою гідрофобних взаємодій. Неупорядковану структуру поліпептидного ланцюга зоразено гнучкими кривими. Рисунок отримано з використанням штучного інтелекту (<https://chatgpt.com>).

Клітина токсичність амілоїдних олігомерів заключається у порушенні цілісності мітохондріальних та плазматичних мембран, підвищення рівня базального кальцію, підвищення рівня формування активних форм кисню, тобто основна токсична дія олігомерів амілоїдних опосередкована саме взаємодією з клітинними мембранами [13].

Однак, у роботі Фінна та співавторів показано, що людський альбумін, який складає 50% усіх білків плазми крові, має активність як шаперон [2]. Це означає, що альбумін зв'язується з більшою афінією зі стресовими білками, зокрема, з частково денатурованими білками, з яких можуть сформуватися амілоїдні олігомери та фібрили. І в такий спосіб альбумін може перешкоджати формуванню амілоїдних олігомерів і їх токсичні дії на клітин. З іншого боку, при тяжких патологічних станах, альбумін втрачає шаперонову активність, оскільки йому доводиться зв'язуватися з дуже великою кількістю неправильно згорнутих або частково розгорнутих білків-попередників амілоїдних фібрил [2]. Також альбумін втрачає здатність зв'язуватися з

лікарськими речовинами та іншими метаболітами в крові людини під час зв'язування з білками-попередниками амілоїдних фібрил. Тобто амілоїдні олігомери мають негативну дію на функцію людського альбуміну.

Таким чином, інші функціональні білки плазми крові, зокрема інсулін, також можуть втратити свої нативні функції через взаємодію з амілоїдними олігомерами та фібрилами білків. У багатьох наукових роботах показано, що амілоїдні фібрили формуються завдяки приєднанню до бета-листа, що росте, частково денатурованих білків, які мають підвищений вміст бета-структури, і що саме наявність амілоїдних олігомерів та фібрил ("seeds") може стимулювати часткову денатурацію нативних білків та і їх приєднання до амілоїдної фібрили, що росте [14].

Людський альбумін є розчинним у воді білком з високою стабільністю та здатністю зберігати свою нативну структуру під час нагріву до 60° протягом 10 годин. Цей білок має 83 позитивно заряджених амінокислотних залишків (аргінін та лізин), 98 негативно заряджених амінокислотних залишків (аспарагінова та глутамінова кислота). Альбумін не є глікозилізованим у плазмі крові. Ген альбуміну має 16961 нуклеотид [15]. Альбумін може зв'язуватися з різними лігандами з водою, жирними кислотами, трансферином, ібупрофеном, катіонами металів, гормонами тощо. Зв'язування лігандів проходить в основному у субдоменах ІА і ІІА. При взаємодії альбуміну з іншими речовинами можуть спостерігатися ефекти алостеричної модуляції та кооперативності. Завдяки наявності 17 досульфідних низків і однієї теольної групи Cys34 альбумін може брати участь в окисно-відновних реакціях [15].

Альбумін також може брати активну участь у фармакокінетичних процесах, зокрема він має естеразну активність відносно жирних кислот циклофосфаміду октаноїлгріліну тощо. Також він здатний брати участь в ацетилюванні субстратів завдяки утворенню ковалентних зв'язків між декількома амінокислотними залишками альбуміну та субстратом [15].

Функціональні властивості людського альбуміну впливає стан кровотоку, зокрема наявність основних жирних кислот і молекулярної скупченості. Для покращення фармакотерапії часто використовують цілеспрямований вплив на людський альбумін для модуляції його зв'язуючих, антиоксидантних та ферментативних властивостей [15].

Інсулін — це дуже важливий функціональний білок, який складається з двох поліпептидних ланцюгів (що містять 21 та 30 залишків амінокислот), зв'язаних двома дисульфідними містками, та регулює апетит, знижуючи експресію нейропептиду Y. має розвивальну дію на нейрони, моделює пам'ять та настрій. Але у випадку аномального фосфорилування тау-білка, що є центральним дефектом дії інсуліну, може розвиватися хвороба Альцгеймера. Інсулін пригнічує глюконеогенез в печінці і здійснює контррегулюючу реакцію на гіпоглікемію [3].

У м'язах та жировій тканині інсулін збільшує поглинання їжі, зокрема глюкози, оскільки транспорт глюкози є самою повільною стадією у процесі її запасання в організмі. Регуляція транспорту глюкози інсуліном на поверхню клітини досягається серією сигналів, які взаємодіють з транспортерами глюкози. Цей процес називається транслокація GLUT4, яка відбувається протягом декількох хвилин після зв'язування інсуліну рецепторами на поверхні адипоцитів і міоцитів [3].

Інсулін людський може формувати амілоїдні фібрили у місці внутрішньовенних ін'єкцій інсуліну у пацієнтів-діабетиків, а також формувати амілоїдні фібрили під час довготривалого зберігання фармакологічних препаратів інсуліну [5, 6]. У цьому контексті запобігання взаємодії нативного інсуліну з амілоїдними фібрилами, що може спричинити агрегацію інсуліну у фібрили, є доброю стратегією попередження системного амілоїдозу у пацієнтів діабетиків Та підвищити строк зберігання фар препаратів інсуліну.

Також може взаємодіяти з амілоїдами фібрилами, стимулюючи їх подальший ріст [4]. Хвороба Альцгеймера супроводжується відкладанням

амілоїдних фібрил в головному мозку, сформованих з Абета-пептиду та нейрофібрилярних клубків в гіперфосфорильованого тау-білка, 99% хвороб Альцгеймера розвинулися спорадично, тобто не мали генетичного походження. Показано кореляцію між дисфункцією інсуліну і гіперфосфорильованням тау-білка, тобто цукровий діабет може впливати на формування амілоїдних фібрил тау-білком [4]. Дійсно, відомо, що діабет першого та другого типу впливають негативно на когнітивні здібності пацієнтів [4].

### РОЗДІЛ 1.3. МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ

Молекулярний докінг дозволяє визначити афінність зв'язування лігандів до макромолекул, а також положення макромолекули при зв'язуванні. Основною перевагою молекулярного докінгу є швидкість та простота [9].

За допомогою молекулярного докінгу проводять розробку лікарських засобів за допомогою комп'ютера на основі структури макромолекули-мішені (CADD — Computer Aided Drug Design). У випадку, коли мішені немає, тобто вона невідома, такий підхід розробки ліків з використанням молекулярного докінгу використати не вдається.

За допомогою молекулярного докінгу можна оцінити афінність зв'язування ліганда з мішенню (зокрема, білком), з її активним центром або з алостеричним центром. Що нижча енергія зв'язування ліганду з білком, то вища спорідненість зв'язування, оскільки енергія зв'язування стабільного комплексу білку з лігандом має знак мінус. Як правило, енергію зв'язування вимірюють у кілокалоріях на моль (ккал/моль). Інколи програми для молекулярного докінгу використовують замість енергії зв'язування так звану “оцінку докінгу”, зокрема, значення скорингової функції, яка немає одиниць вимірювання, але пропорційна до енергії зв'язування білка з лігандом. Якщо мова йде про потенційний лікарський засіб, який зв'язується з активним центром білка-мішені, то для його успішного використання енергія зв'язування повинна бути нижчою, ніж у нативного ліганду цього білка, який зв'язується, як правило, з активним центром цього білка. Про нативний ліганд часто відомі експериментальні значення енергії зв'язування з білком-мішенню. Ефективність тестових лігандів оцінюється за допомогою природного ліганду [9].

Основний результат молекулярного докінгу — це визначення пози зв'язування біоактивної сполуки на білку. Одна сполука може мати різні пози зв'язування, тобто просторове розташування в активному сайті зв'язування білка мішені і всі ці пози дають різну спорідненість зв'язування. Поза

зв'язування, яка має найнижчу енергію, є найбільш енергетично вигідною позою та визначає амінокислоти білка, з якими взаємодіє ліганд.

Інші наукові дослідження стверджують, що потенційний лікарський засіб повинен утворювати більше водневих зв'язків з декількома амінокислотами в активному центрі білка-мішені, що знижує ймовірність розвитку лікарської стійкості.

До основних переваг молекулярного докінгу належить швидкість його проведення, оскільки для цього достатньо простого ноутбуку, або робочої станції. За допомогою молекулярного докінгу легко досліджувати вплив зміни функціональних груп лікарських препаратів на спорідненість зв'язування потенційного лікарського засобу з білком-мішенню і таким чином виявляти найбільш важливі функціональні групи, які впливають на афінні зв'язування з білком, щоб потім використовувати ці групи для модифікації структури ліків і потенційного зростання їх біологічної дії. В цілому цей метод дозволяє швидко виявити сполуки-лідери серед лікарських засобів, розроблених *in silico* [9].

До основних недоліків молекулярного докінгу належить той факт, що отримані результати не є повністю достовірними та не дають змоги прийняти обґрунтовані висновки, а тому всі висновки з молекулярно-докінгових досліджень містять слово "потенційний". Докінг не може відповісти на питання про залежність афінності ліганду до білку-мішені від часу взаємодії, а також не може надати інформацію про зміну стабільності ліганду, що взаємодіє з білком мішенню протягом тривалого часу. Молекулярний докінг не дозволяє враховувати під час моделювання температуру і тиск. Найчастіше для підтвердження результатів молекулярного докінгу необхідно виконати дослідження *in vitro* або провести молекулярно-динамічне моделювання [9].

Під час молекулярного докінгу проводиться стикування легенда у тривимірний сайт зв'язування на білку. Для цього проводиться пошук конформаційного простору, який може бути зайнятий лігандом, а потім використовується функція оцінювання спорідненості зв'язування ліганда з

білком у певному положенні. Алгоритми докінгу відрізняються між собою завдяки тому, що у них надаються різні переваги до певних нековалентних взаємодіючи ентропійних параметрів, що призводить до різних результатів за однакових вхідних даних [10].

Молекулярний докінг використовує випадковий алгоритм пошуку, причому існує компроміс між точністю і часом, відведеним на докінг. Якщо атоми білка-мішені зафіксовано у певному положенні (“жорсткий” докінг), то швидкість молекулярного докінгу є дуже високою. З іншого боку, додавання гнучкості у білкові ланцюги (“гнучкий” докінг) підвищує точність дослідження, але потребує також більше часу [10].

Обмеженнями докінгу також є неможливість точного моделювання гнучкості макромолекули-мішені, розчинника та ентропії. Оцінити ефективність докінгу можна, використовуючи експериментальні результати про зв'язування відомих речовин з макромолекулою-мішенню [10].

Після пошуку можливих поз докінгу, оцінюють енергію зв'язування ліганду з білком мішенню, використовуючи рівняння Гібса-Гельмгольца [16]:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1)$$

де  $\Delta G$  – вільна енергія формування комплексу,  $T$  – температура (у кельвінах),  $\Delta S$  – ентропія,  $\Delta H$  – ентальпія. Константу зв'язування ліганду з білком-мішенню ( $K_i$ ) розраховують за такою формулою [16]:

$$\Delta G = -RT \ln K_i, \quad (3)$$

## РОЗДІЛ 1.4. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ

Молекулярна динаміка дозволяє нам моделювати структуру біологічних комплексів та їх динаміку у атомних масштабах, тому останнім часом цей метод став винятково популярним у біомедичних дослідженнях. Завдяки появі сучасних графічних процесорів високим прискоренням можна здійснювати симуляції у мікросекундному масштабі лише за один день, якщо мова йде про невеликі білки [11].

Молекулярна динаміка не є єдиним теоретичним методом, який можна використовувати, оскільки, наприклад, прогнозування структури і функції білків можна здійснювати шляхом аналізу подібності амінокислотних послідовностей у споріднених білках, а для розробки ліків продуктивно використовувати менш точний, але більш продуктивний аналіз кількісного співвідношення структура-активність замість витратити комп'ютерний час на моделювання зв'язування мільйона сполук з білками [11].

Молекулярно-динамічне моделювання є корисним для валідації теоретичних моделей шляхом експерименту. Наприклад, при моделюванні іонних каналів виявлено механізм, за певні іони блокуються, а інші проходять крізь іонні канали, хоча всі ці дані вже відомі експериментально. Якщо брати фізичну точку зору, рівняння Шредінгера, залежне від часу, у разі його вирішення може пояснити та передбачити всі властивості молекули з будь-якою точністю. Але у випадку дослідження великої кількості частинок, необхідно вводити наближення, яким у квантовій хімії є припущення про те, що атомні ядра є нерухомими, а також неявне представлення розчинника. Ці припущення квантової хімії не є реалістичними для макромолекул, тому для них будуємо моделі, використовуючи емпіричну параметризацію, зокрема, класичні кулонівські взаємодії між атомними зарядами. Молекулярна динаміка може вирішувати завдання для великої кількості вибірок (мільярд станів), які можуть бути характерними для макромолекули, тобто непогано враховувати ентропійну частину вільної енергії, а квантова хімія описує електронну структуру та ентальпію молекули належним чином. Моделі

молекулярної динаміки параметризовані на основі експериментів, тому результати моделювання будуть більш надійними, ніж квантово-хімічні, особливо у мілісекундному часовому діапазоні [11].

Макроскопічні властивості молекул є усередненням по мільярдах структур, які входять до молекулярних ансамблів статистичної механіки. Тому в експериментальній роботі необхідно працювати з репрезентативним ансамблем структур, наприклад, за певних значень тиску і температури, на відміну від квантової хімії. Усі термодинамічні властивості систем, наприклад константу зв'язування, розчинність, не можна розрахувати з окремих симуляцій, оскільки вони залежать від ентропії. Для рівноважних властивостей систем метою є дослідження не окремих атомних траєкторій, а ансамблю структур.

Для створення статистично достовірних рівноважних ансамблів використовують метод Монте-Карло і метод молекулярної динаміки, причому молекулярної динаміка може також точно відтворити нерівноважні властивості систем, зокрема час згортання білка чи дифузію. Однак якщо два атоми майже перекриваються у молекулі, щоб цей треба проводити мінімізацію енергії перед початком. Мінімізація енергії також проводиться, якщо експериментальні дані з низькою роздільною здатністю. Емпіричні набори параметрів для розрахунку залежності потенційної енергії та взаємодій системи від атомних координат називаються силовими полями та складається з набору рівнянь, що використовуються для знаходження потенційної енергії і сил як функції від координат [11].

Для більшості систем ці наближення добре діють, але вони не можуть відтворити, наприклад, утворення чи розрив зв'язків. Силові поля існують для зв'язаних та незв'язаних взаємодій. Зв'язані взаємодії - це кутове вигинання, потенціали при обертанні зв'язків, розтягування зв'язків тощо, і ці взаємодії зазвичай фіксовані під час молекулярно-динамічного моделювання. Незв'язані взаємодії - це електростатичні взаємодії, дисперсійні взаємодії Ленарда Джонса тощо. Враховуючи значення сили на усіх атомах,

оновлюється координати для наступного кроку у системі. Молекулярна динаміка виконується за допомогою інтегрування рівнянь руху Ньютона (рівняння 1 і 2), а квантова хімія використовує алгоритм найкрутішого спуску, переміщуючи кожен атом на невеличку відстань у напрямку зменшення енергії. Рівняння Ньютона, які вирішуються під час молекулярно-динамічного моделювання:

$$F_i = \frac{-\partial V(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i},$$

(1)

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i,$$

(2)

де  $F_i$ ,  $N$ ,  $V$ ,  $r_i$ ,  $m_i$ ,  $t_i$  — сила, що діє на атом, число атомів у системі, потенційна енергія атома, координата атома, маса атома і момент часу, відповідно.

Біомолекулярні молекулярно-динамічні симуляції використовують періодичні граничні умови для запобігання поверхневих артефактів, зокрема якщо молекула води, яка виходить праворуч, знову з'являється ліворуч у системі. Якщо величина комірки велика, молекули не будуть взаємодіяти зі своїми періодичними копіями [11].

Обчислення не зв'язаних взаємодій потребує розширення часового кроку для покращення продуктивності молекулярно-динамічного моделювання, а також можна використовувати алгоритми обмежень зв'язків SHAKE та LINCS, які дозволяють усунути ці коливання і розширити часові кроки до двох фемтосекунд.

Тривимірні структури для молекулярно-динамічного моделювання, зокрема у GROMACS, білків (у форматі PDB), ДНК, малих лігандів та інших молекул можна отримати з білкової бази даних або нарисувати.

Для моделювання необхідно також мати файл топології, у якому описано взаємодію всіх атомів у системі, а також самих атомів.

Для моделювання у воді біомолекулярної системи треба обрати комірку, розмістивши розчинену речовину в центрі куба, наприклад, на відстані 7,5 ангстрем від його сторін. Треба додати у обрано комірку молекули розчинника, як правило, води.

Оскільки до тривимірної структури біомолекули, перед моделюванням додаються атоми водню, для уникнення спотворення структури перед молекулярно-динамічним моделюванням необхідно Провести коротку мінімізацію енергії, зокрема, використовуючи метод найкрутішого спуску протягом приблизно 500 кроків, що дає стабільну але не максимально низьку енергію [11].

Для уникнення спотворення структури макромолекули після запуску молекулярно-динамічної симуляції, проводять еквілібрацію, при під час якої виставляють всі важкі атоми утримуються в своїх початкових положеннях, У той час як Вода релаксує навколо структури макромолекули. Для малої молекули білка, наприклад, достатньо стопікосекунд для досягнення рівноваги води навколо нього, а для великої мембрани може навіть декілька наносекунд бути необхідно для релаксації.

Останнім кроком є запуск молекулярно-динамічного моделювання (production), у якому вимикаються обмеження на положення атомів, яке було під час еквілібрації. Під час моделювання можна записувати вихідні координати системи, наприклад, кожні 5000 кроків.

Після завершення молекулярно-динамічного моделювання за допомогою спеціальних команд у GROMACS та VMD можна проаналізувати результати [11].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Одним з двох методів, які використовували даній роботі, є метод молекулярного докінгу, який проводили за допомогою веб-серверу HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) [17].

HDOCK – онлайн-сервер, який дозволяє проводити молекулярно-докінгове моделювання, маючи вхідними файлами тривимірні структури рецепторів (білків) та лігандів (білків, ДНК, РНК, малих молекул), на основі гібридного алгоритму, з використанням або без використання шаблонів [18]. Гібридний алгоритм містить експериментально отримані дані про сайти зв'язування білків на білках, які можуть бути використані під час молекулярного докінгу та для ранжування отриманих структур (після докінгу). Сервер HDOCK може працювати в режимі гібридного докінгу (саме цим режимом ми користувалися), а також у режимі докінгу без використання шаблонів. Для роботи необхідно взяти тривимірні структури рецептора или ліганду у форматі pdb. Молекулярний докінг проводиться шляхом пошуку у pdb файлах відомих гомологічних шаблонів (амінокислотних послідовностей) інших білків, і у разі його знаходження комплекс рецептори з лігандом буде побудовано з урахуванням цього шаблону. Якщо шаблону не буде знайдено, то структуру комплексу буде побудовано на основі мономерного шаблону. Тобто сервер HDOCK дозволяє: 1) будувати гомологічні моделі на основі складних шаблонів (фрагментів декількох білків), 2) використовувати структури pdb, які було введено під час запуску завдання, 3) будувати гомологічні моделі на основі мономерного шаблону (амінокислотної послідовності одного білка). У гібридному докінгу пріоритет побудови тривимірної моделі рецептор легенд такий: 1, 2, 3, а у режимі без шаблонному – такий: 2,3 [18].

На наступному кроці HDOCK проведе глобальний докінг, використовуючи структури рецептора та ліганда, вибере оптимальні моделі зв'язування за допомогою спеціального пошукового методу FFT та оцінить їх з використанням розробленої функції оцінювання білок білкових взаємодій. Цікаво також, що експериментальні дані, наприклад, про сайт зв'язування білка на білку, можна також включити при налаштуванні параметрів докінгу і пост-докінгу. Отримані 100 найкращих модельних комплексів рецептора з лігандом можна використовувати для подальшого аналізу, а перші 10 найбільш енергетично вигідних комплекси можна також візуалізувати у переглядачі NGL36 просто у браузері [18].

Одним з популярних способів застосування HDOCK є дослідження взаємодії двох білкових структур. Важливо також, що структури білків можна задавати навіть у вигляді амінокислотних послідовностей, а також сервер вміє використовувати експериментальну інформацію про існуючу взаємодію між двома білками. Таким чином, HDOCK можна застосовувати для дослідження молекулярних механізмів білок-білкової взаємодії, використовуючи отримані під час молекулярного докінгу білок білкові комплекси, особливо коли є певна експериментальна інформація про взаємодію цих білків [18].

Тривимірні структури всіх молекул поліфенолів, які було використано у даній роботі, намалювали у MarvinSketch [19], а потім проводили оптимізацію отриманих структур за допомогою Avogadro [20]. На схемі 1 представлено структури та назви 7 поліфенолів, які використовували у даному дослідженні.

Структури нативних функціональних білків: людського інсуліну (PDB ID: 5ENA) та людського альбуміну (PDB ID: 1AO6), які брали для моделювання, отримували з бази даних білків Protein Data Bank. Людський альбумін також було мінімізовано (релаксовано) у програмі GROMACS протягом п'яти наносекунд, за фізіологічних значень іонної сили, рН і

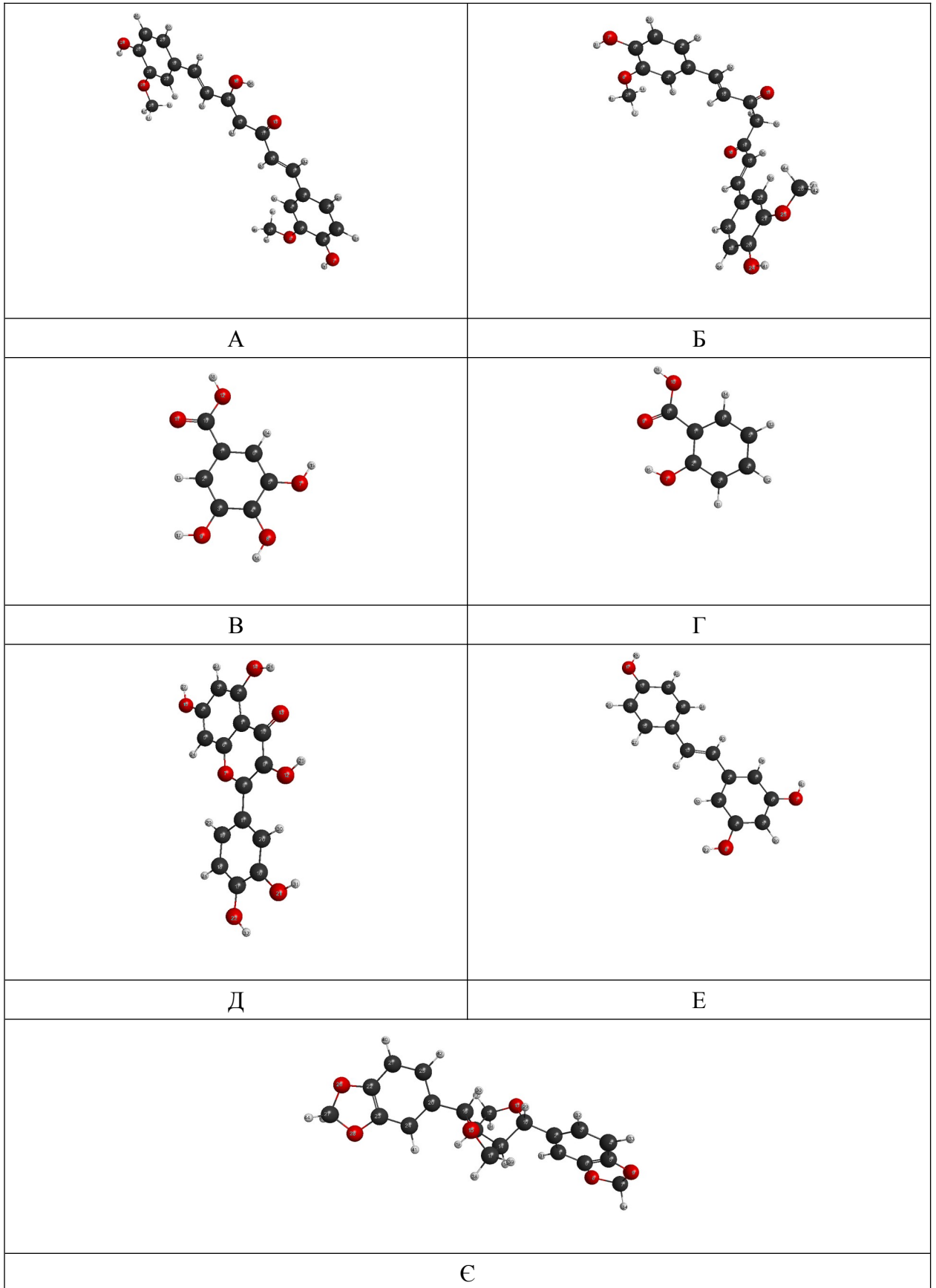


Схема 1. Структурні формули поліфенолів, які були використані для дослідження. А – куркумін (енольна форма), Б – куркумін (кето-форма), В – галова кислота, Г – саліцилова кислота, Д – кверцетин, Е – ресвератол, Є – сезамін.

температури, для того, щоб ліквідувати можливі сферичні конфлікти атомів [21].

Структури модельних амілоїдних фібрил були такі:

1) **M3**, Амілоїдні фібрили одотриптофанового мутанту фрагменту 11-37 аполіпопротеїну АІ людини (24-50/G26R/W@8, де G26R означає заміну гліцину у позиції 26 на аргінін, а W@8 - заміну триптофану у позиції 8 на фенілаланін [22]), які позначено тут як M3 [23]. Амілоїдні фібрили фрагменту аполіпопротеїну А-I було побудовано у наших попередніх дослідженнях, з використанням інструменту CreateFibril, який шляхом обертальних і трансляційних афінних перетворень дозволяє сформувати декілька копій окремого фрагмента ядра амілоїдної фібрили, а потім укласти їх у видовжений фібрилярний агрегат [24]. Зокрема, для аполіпопротеїну АІ було взято фрагмент 11-37. За допомогою PatchDock згенеровано вхідні для CreateFibril тривимірні структури фрагменту аполіпопротеїну АІ. При створенні структур фібрил кут закручення дорівнював  $10^\circ$ , оскільки це значення близьке до 15, яке дозволяє отримати найбільш стабільні конформації амілоїдних фібрил аполіпопротеїну АІ, лізоциму, Абета-пептиду, за нашими попередніми даними [24]. Отриманий файл мав назву ApoAI\_M3\_11\_37\_a10.pdb.

2) **Abeta**, Амілоїдні фібрили фрагменту 1-40 Абета-пептиду людини (файл 8OT4\_Abeta\_1\_40\_seeded.pdb). Цей файл було завантажено з Protein Data Bank (PDB ID: 8OT4), його отримано шляхом кристалізації структури фібрили та її аналізу за допомогою криоелектронної мікроскопії [25].

3) **InsF**, 50-мономерний фрагменті модельної амілоїдної фібрили інсуліну людини отримано з бази даних M. Sawaya <http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/jmol/fibrilmodels/> (файл Insulin\_F12.pdb), як і в попередніх наших дослідженнях [26, 27].

Молекулярний докінг нативних функціональних білків з амілоїдними фібрилами у присутності та за відсутності поліфенолів (контроль) проводили за таким алгоритмом:

- 1) Проводили докінг нативного функціонального білка з кожною із семи молекул поліфенолів. Отримали найбільш енергетично вигідний комплекс (той, який має найнижчу енергію за абсолютним значенням) для кожної пари білок-поліфенол.
- 2) Отриманий на першому етапі комплекс докували з модельними амілоїдними фібрилами кожного з трьох білків (інсуліну, Абета-пептиду та мутанту M3 (1–83/G26R/W@8) аполіпропротеїну AI), обираючи фібрили у якості рецептора, а комплекс нативного білка з поліфенолом - у якості ліганда. Отримані найбільш енергетично вигідні білок-фібрильні комплекси у присутності поліфенолів обирали для подальшого аналізу їх стабільності та сайтів зв'язування нативних білків на амілоїдних фібрилах.
- 3) Контрольні білок-фібрильні комплекси (за відсутності поліфенолів) отримували шляхом молекулярного докінгу амілоїдних фібрил з нативними функціональними білками, обираючи амілоїдні фібрили у якості рецептора, а нативний білок у якості ліганда. Оцінювали енергію та структуру отриманих комплексів, порівнюючи її з енергією та структурою відповідних білок-фібрильних комплексів у присутності поліфенолів.

Також цікаво, що на відміну від багатьох інших програм для молекулярного докінгу, саме HDOCK здатний робити докінг амілоїдних фібрил не тільки з нативним білком, але і з комплексом нативний білок поліфенол, тому у нашій роботі було використано саме цей онлайн-сервер.

Після аналізу стабільності найбільш оптимальних за енергією білок фібрильних комплексів, а також амінокислотних залишків нативних білків, що беруть участь у зв'язуванні з амілоїдними фібрилами, у присутності поліфенолів та контролі, три білок-фібрильні комплекси (InsF+InsN+GA, InsF+InsN+PA, InsF+InsN) було обрано для подальшого молекулярно-динамічного моделювання. За допомогою молекулярно-динамічного моделювання потрібно було встановити механізм дестабілізації комплексу нативного інсуліну з фібрилами інсуліну галової та саліцилової кислотами.

Для цієї мети було використано молекулярна динамічне моделювання у програмі GROMACS [28], протягом 10 нс.

Важливим досягненням сучасного молекулярно-динамічного моделювання є той факт, що біологічні системи можна досліджувати з кращою часовою та просторовою роздільною здатністю, ніж дозволяють експериментальні прилади. Точність результатів залежить не тільки від правильного обраного силового поля, але і для енергії певної конфігурації атомів. Найбільш уживані силові поля мають в основі ньютонівську механіку, за допомогою якої проводиться обчислення енергій певної конфігурації атомів, і за допомогою отриманих значень розраховуються сили для прогнозування часової еволюції даної конфігурації. Важливо знати переваги і недоліки використання різних силових полів, типові протоколи моделювання, щоб отримувати надійні результати. Багато програмних пакетів існує для молекулярно-динамічного моделювання і аналізу результатів, зокрема, GROMACS, AMBER, NAMD, CHARMM тощо [29]. Кожна з них має різні функції, різну сумісність з силовим полем та здатність моделювати системи від тисяч до мільйонів атомів.

GROMACS – один з найбільш відомих безкоштовних для науковців програм з відкритим кодом, який використовується для молекулярно-динамічного моделювання (<http://www.gromacs.org>) [30]. Цей програмний пакет має 2000000 рядків коду. GROMACS працює, використовуючи багаторівневий паралелізм, який дозволяє проводити обчислювальну роботу, розподіляючи її між ансамблями симуляцій, кількома ядрами, та використовувати паралелізм. Усі системи описуються у GROMACS за допомогою елементарних комірок триклінної сингонії, що може покращити продуктивність на 40% завдяки використанню не прямокутних комірок. Електростатичні взаємодії розраховуються методом Евальда (PME). Також використовується новий алгоритм Верлета для оцінки нековалентних взаємодій.

Програму GROMACS було розроблено у Нідерландах на мові ANSI C у 90-ті роки [31]. Розрахунки за цією програмою можна також проводити шляхом паралелізації на процесорних кластерах. Програма GROMACS дозволяє відносно швидко проводити молекулярно-динамічне моделювання, оскільки має добру оптимізацію сусіднього пошуку та продуктивність внутрішнього циклу. Також програма є сумісною з силовими полями AMBER, GROMOS, OPLS, може використовувати гнучкі обмеження та моделі поляризованих оболонок. Також програма GROMACS підтримує інтерфейси квантових хімічних програм (GAUSSIAN, GAMESS) для забезпечення змішаного молекулярно-динамічного та квантово-хімічного моделювання. Програмний пакет GROMACS містить близько 100 програм [31].

Для створення вхідних файлів до GROMACS, було використано CHARMM-GUI Input Generator. Файли з розширенням .itp для поліфенолів було створено з файлів .mol2 за допомогою CHARMM General Force Field. Часткові заряди на атомах поліфенолів не було скориговано, тобто Вони залишилися такими, і якими їх згенерував CHARMM General Force Field. Найбільш енергетично вигідні білок-фібрильні комплекси були поміщені у прямокутну комірку, що містила 0.15 M NaCl. Також для моделювання було використано модель води TIP3P. Усі розрахунки проводилися при температурі 310 K, використовуючи термостат Nose-Hoover. Молекулярно-динамічне моделювання проводилося у програмі GROMACS протягом 10 наносекунд (час симуляції), використовуючи силове поле CHARMM36m у ансамблі NPT, з шагом симуляції 2 фемтосекунди. Мінімізація та екваїбрація систем проводилися протягом 50000 та 125 тисяч кроків, відповідно. Отримані молекулярно-динамічні траєкторії було скориговано за допомогою команди `gmx trjconv` у GROMACS. Візуалізацію структурних комплексів у певний момент часу симуляції було проведено у VMD (Visual Molecular Dynamics) [32]. Команди `gmx rms`, `gmx gyrate`, `helix`, які включено до GROMACS, було використано для розрахунку середньо-квадратичних відхилень остова

(RMSD), радіусу інерції (Rg) та спіральності амінокислотних залишків білок-фібрильних комплексів (helicity, % of time) [33].

## РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПОЛІФЕНОЛІВ НА СТАБІЛЬНІСТЬ КОМПЛЕКСІВ НАТИВНИХ БІЛКІВ З АМІЛОЇДНИМИ ФІБРИЛАМИ

### РОЗДІЛ 3.1. РЕЗУЛЬТАТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ

На рисунках 1-6 та 7-19 представлено структури найбільш оптимальних за енергією (тих, що мають мінімальне значення енергії) комплексів білок-фібрила та білок-фібрила-поліфенол, відповідно.

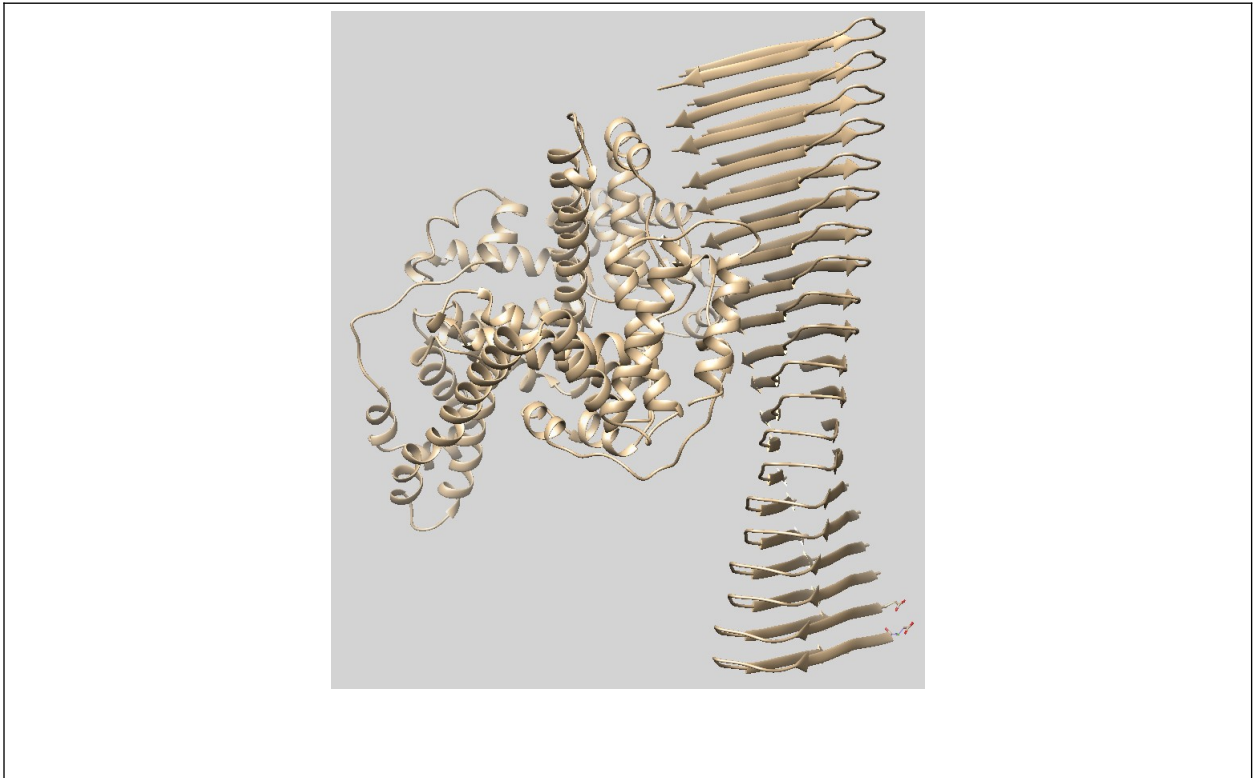


Рис. 1. Структура комплексу **фібрил** мутанту **М3** аполіпопротеїну АІ (М3) з нативним альбуміном (**HSA**) (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -160.55 в. о.).

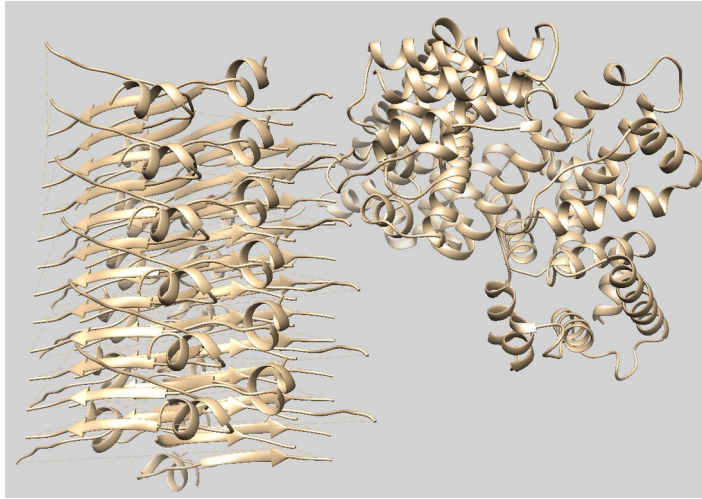


Рис. 2. Структура комплексу **фібрил інсуліну (InsF)** з нативним альбуміном (**HSA**) (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -207.42 в. о.).

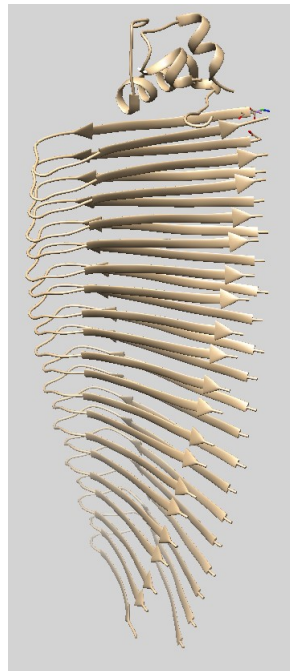


Рис. 3. Структура комплексу **фібрил мутанту M3** аполіпопротеїну AI (M3) з нативним інсуліном (**InsN**) (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -189.37 в. о.).

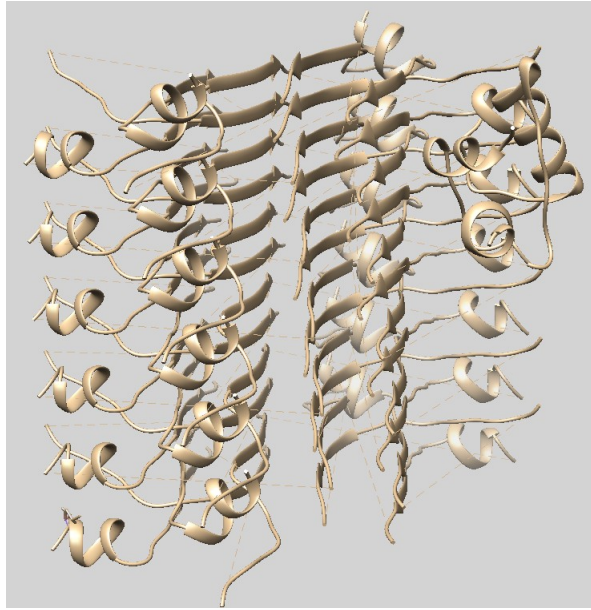


Рис. 4. Структура комплексу **фібрил інсуліну (InsF)** з нативним інсуліном (**InsN**) (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -243.04 в. о.).

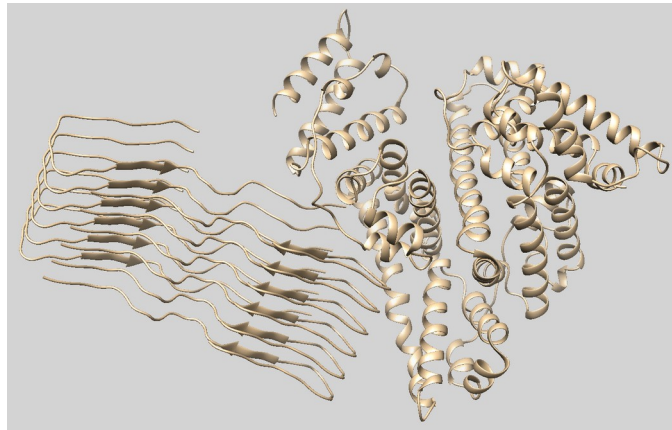


Рис. 5. Структура комплексу **фібрил Абета-пептиду (Abeta)** з нативним альбуміном (**HSA**) (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -236.19 в. о.).

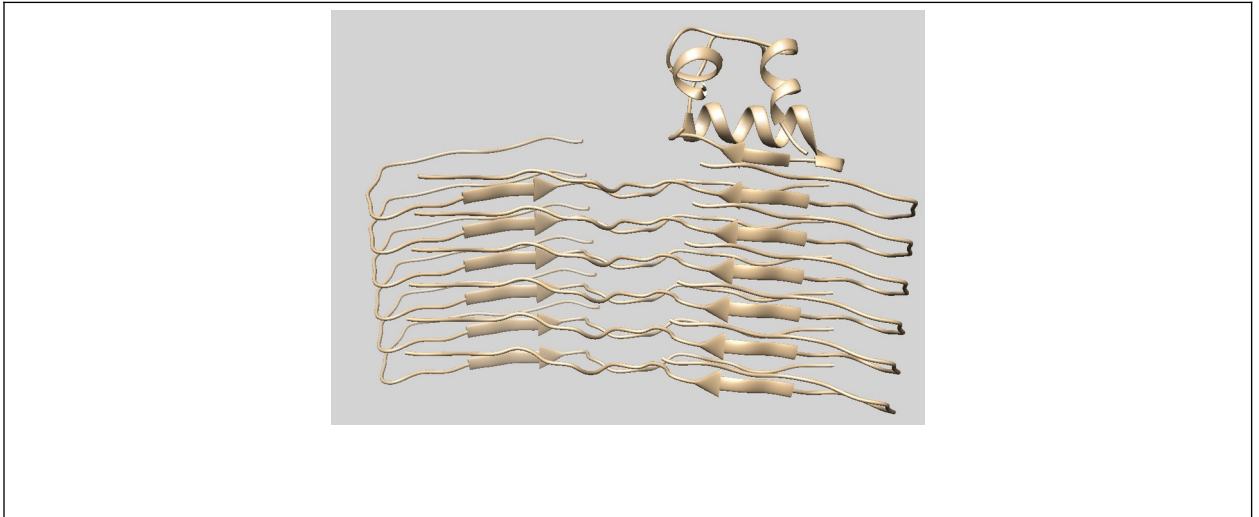


Рис. 6. Структура комплексу **фібрил Абета-пептиду (Abeta)** з нативним інсуліном (**InsN**) (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -252.46 в. о.).

З рисунків 1 – 6 (зв'язування амілоїдних фібрил з нативними білками) видно, що:

- 1) InsN вбудовується у структуру амілоїдних фібрил M3 та Abeta перпендикулярно лінії їх росту (перпендикулярно головної осі), тому, імовірно, теж буде створювати сітку водневих зв'язків з остовами амінокислотних ланцюгів бета-тяжа амілоїдних фібрил. Але для амілоїдних фібрил InsF чомусь зв'язування відбувається з латеральною областю фібрил (за допомогою нековалентних зв'язків).
- 2) HSA через те, що має дуже велику молекулярну масу, вбудовується у структуру амілоїдних фібрил за рахунок зв'язування з латеральною областю бета-листів фібрил, а також частково – з перпендикулярно лінії їх росту (тільки для фібрил Abeta).

З рис. 7 видно, що галова кислота знаходиться близько до сайту зв'язування альбуміну з латеральним краєм амілоїдної фібрили. Тому, імовірно, вона і заважає зв'язуванню і токсичній дії фібрили на білок, що підтверджується зниженням (за модулем) значення скорингової функції (docking score) у порівнянні з комплексами “фібрила – білок” (без

поліфенолу), комплекс фібрила-білок стає менш стабільним у присутності галової кислоти.



Рис. 7. Структура комплексу **фібрил** мутанту **M3** аполіпопротеїну **A1** (**M3**) з нативним альбуміном (**HSA**) та **галовою кислотою** (**GA**), отримана за допомогою веб-серверу **HDOCK** (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -160.55 в. о.).

У статті Трусової В.М. та співавторів за допомогою молекулярного докінгу в **HDOCK** також виявлено, що додавання **галової кислоти** до комплексу **цитохрому с (відновленого)** з **фібрилами інсуліну** та **кверцетином**, знижувало афінність зв'язування білка цитохрому с з амілоїдними фібрилами інсуліну (тобто збільшувалося значення скорингової функції з -230 в.о. до -208 в.о.) [34]. Таким чином, наші результати узгоджуються з даними інших дослідників.

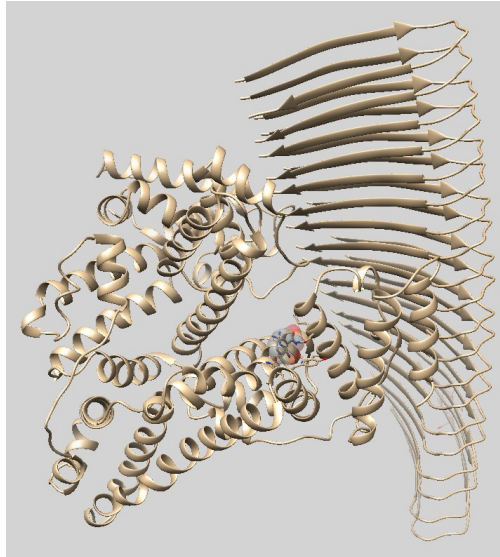


Рис. 8. Структура комплексу **фібрил** мутанту **М3** аполіпопротеїну АІ (М3) з нативним альбуміном (**HSA**) та **саліциловою кислотою** (РА), отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -160.55 в. о.).

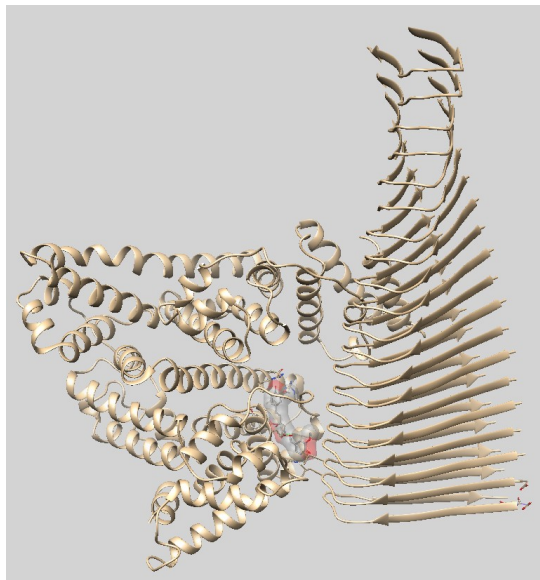


Рис. 9. Структура комплексу **фібрил** мутанту **М3** аполіпопротеїну АІ (М3) з нативним альбуміном (**HSA**) та **куркуміном (енольна форма)** (CUR1), отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -159.29 в. о.).

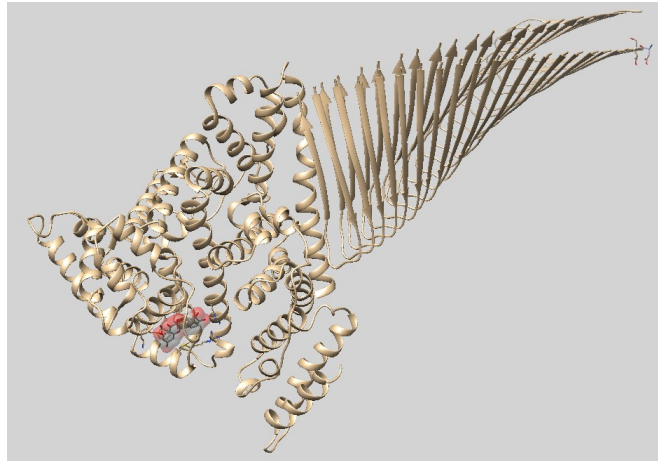


Рис. 10. Структура комплексу **фібрил** мутанту **М3** аполіпропротеїну АІ (М3) з нативним альбуміном (**HSA**) та **кверцетином** (QUR), отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -158.97 в. о.).



Рис. 11. Структура комплексу **фібрил** мутанту **М3** аполіпропротеїну АІ (М3) з нативним альбуміном (**HSA**) та **ресвератолом** (RV), отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -158.97 в. о.).

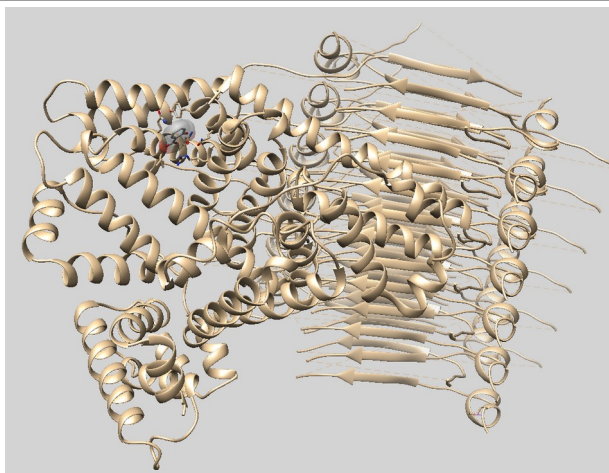


Рис. 12. Структура комплексу **фібрил інсуліну (InsF)** з нативним альбуміном (**HSA**) та **саліциловою кислотою (РА)**, отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -205.52 в. о.).



Рис. 13. Структура комплексу **фібрил мутанту М3** аполіпопротеїну АІ (М3) з нативним інсуліном (**InsN**) та **галоювою кислотою (GA)**, отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -188.34 в. о.).

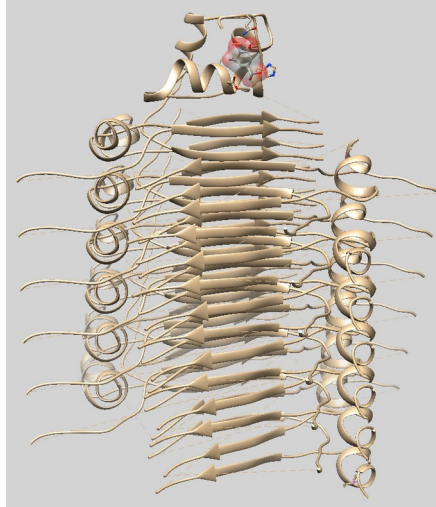


Рис. 14. Структура комплексу **фібрил інсуліну (InsF)** з нативним інсуліном (**InsN**) та **галловою кислотою (GA)**, отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = - 237.79 в. о.).

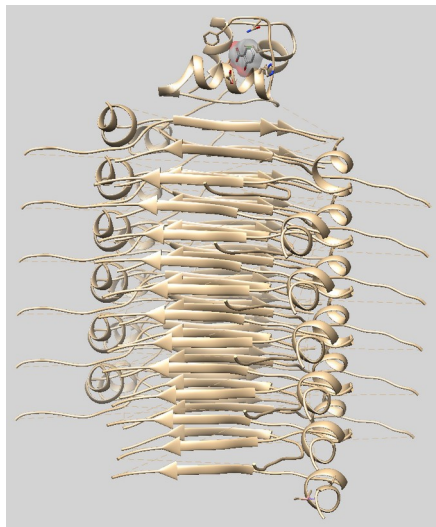


Рис. 15. Структура комплексу **фібрил інсуліну (InsF)** з нативним інсуліном (**InsN**) та **саліциловою кислотою (РА)**, отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = - 237.79 в. о.).

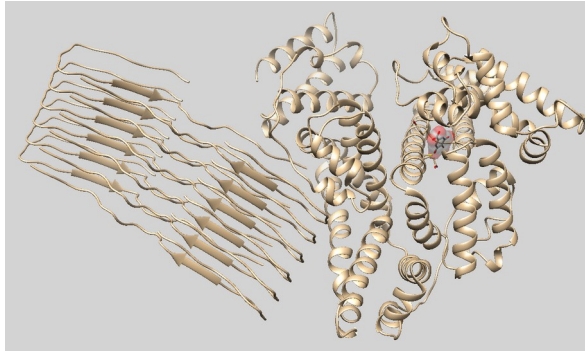


Рис. 16. Структура комплексу **фібрил Абета-пептиду (Abeta)** з нативним альбуміном (**HSA**) та **галовою кислотою (GA)**, отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -236.19 в.о.).

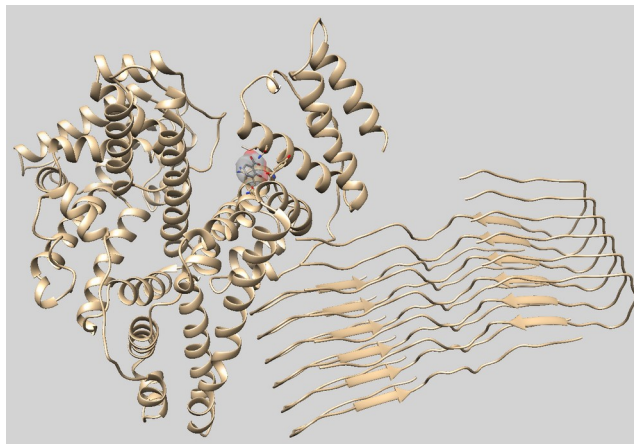


Рис. 17. Структура комплексу **фібрил Абета-пептиду (Abeta)** з нативним альбуміном (**HSA**) та **саліциловою кислотою (SA)**, отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -236.19 в.о.).

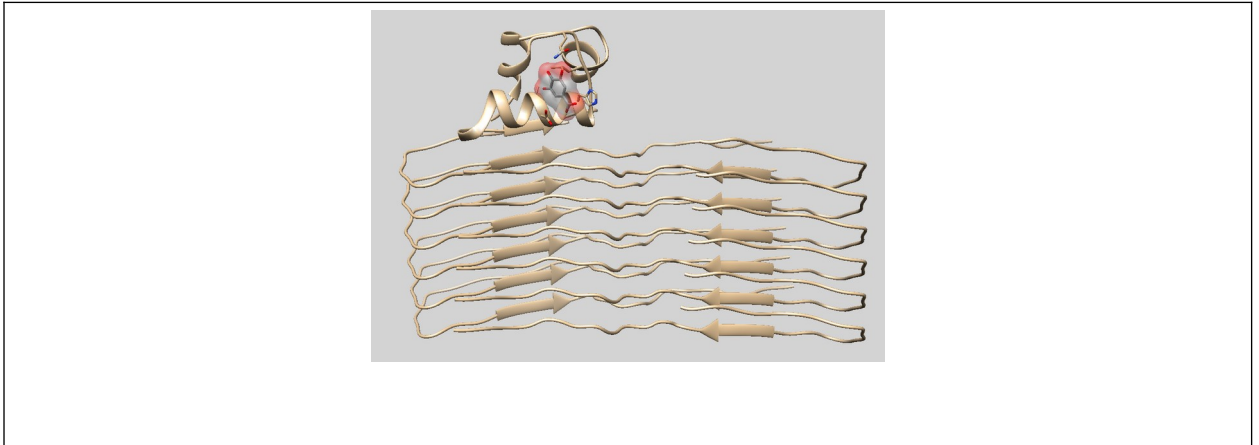


Рис. 18. Структура комплексу **фібрил Абета-пептиду (Abeta)** з нативним інсуліном (**InsN**) та **галовою кислотою (GA)**, отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -251.91 в.о.).

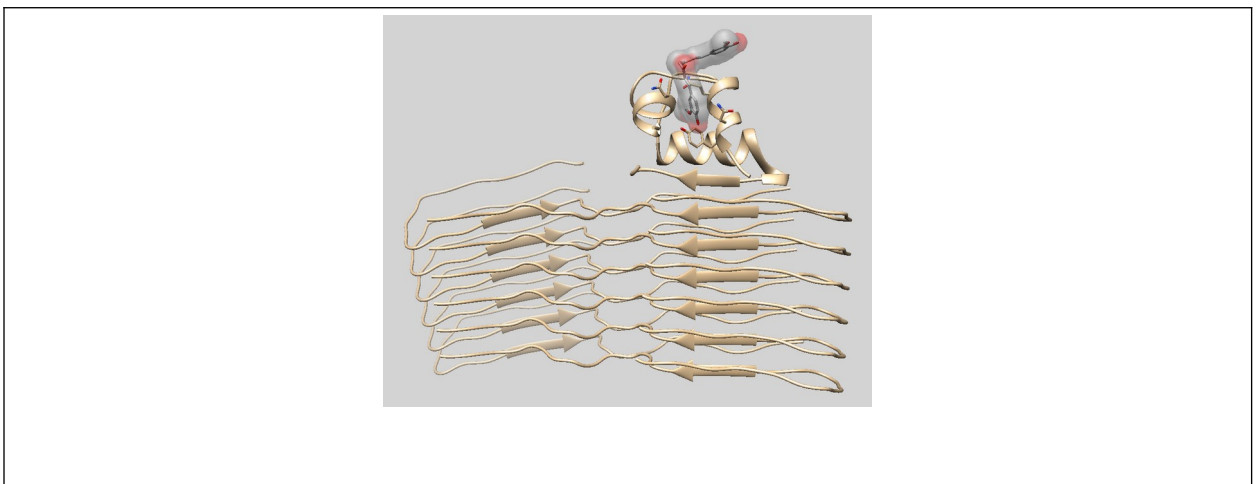


Рис. 19. Структура комплексу **фібрил Абета-пептиду (Abeta)** з нативним інсуліном (**InsN**) та **куркуміном (кето-форма) (CUR2)**, отримана за допомогою веб-серверу HDOCK (model 1, docking score (пропорційний до енергії зв'язування) = -252.32 в.о.).

При додаванні поліфенолів картина зв'язування нативного білка з амілоїдними фібрилами не сильно змінюється (Рис. 7 – 19).

З таблиць 1-3 видно, що найчастіше інгібіторами фібрил-білкової взаємодії є **галова та саліцилова кислоти**. Куркумін (енольна форма), кверцетин і ресвератол пригнічують взаємодію фібрил M3 з альбуміном, а куркумін (кето форма) – знижує афінність Абета-фібрил до нативного інсуліну.

Цікаво також, що у присутності GA та PA нативний інсулін зв'язується на іншому сайті: перпендикулярно росту амілоїдних фібрил інсуліну, причому стабільність комплексу білок-фібрила знижується (Таблиця 2). З іншого боку, треба перевірити (наприклад, за допомогою молекулярно-динамічного моделювання той факт, що інсулін, який вбудувався у фібрилу перпендикулярно напрямку її росту, не буде перетворюватися на бета-лист фібрилярної структури, і не буде сприяти росту фібрили). Дійсно з літератури відомо, що галова та саліцілова кислоти діють подібно інгібіторам повздовжнього росту амілоїдних фібрил, тобто інгібують елонгацію фібрил [7].

Таблиця 1. Значення скорингової функції у найбільш енергетично вигідних комплексах амілоїдні фібрили – нативний альбумін – поліфенол (за результатом докінгу в HDOCK)

Polyphenol type	Fibril type	Native protein type	HDOCK Scoring function value, a.u.
CUR1	M3	HSA	-159.29
CUR2	M3	HSA	-161.78
GA	M3	HSA	-160.55
PA	M3	HSA	-160.55
QUR	M3	HSA	-158.97
RV	M3	HSA	-158.97
SSM	M3	HSA	-178.53
CUR1	<i>InsF</i>	HSA	-217.88
CUR2	<i>InsF</i>	HSA	-213.47
GA	<i>InsF</i>	HSA	-213.47
PA	<i>InsF</i>	HSA	-205.52
QUR	<i>InsF</i>	HSA	-213.47
RV	<i>InsF</i>	HSA	-213.47
SSM	<i>InsF</i>	HSA	-213.47
NO polyphenol	M3	HSA	-160.55
NO polyphenol	<i>InsF</i>	HSA	-207.42

Таблиця 2. Значення скорингової функції у найбільш енергетично вигідних комплексах амілоїдні фібрили – нативний інсулін – поліфенол (за результатом докінгу в HDOCK)

Polyphenol type	Fibril type	Native protein type	HDOCK Scoring function value, a.u.
CUR1	M3	InsN	-196.73
CUR2	M3	InsN	-192.45
GA	M3	InsN	-188.34
PA	M3	InsN	-189.48
QUR	M3	InsN	-191.11
RV	M3	InsN	-190.42
SSM	M3	InsN	-190.85
CUR1	<i>InsF</i>	InsN	-243.84
CUR2	<i>InsF</i>	InsN	-243.39
GA	<i>InsF</i>	InsN	-237.79
PA	<i>InsF</i>	InsN	-237.79
QUR	<i>InsF</i>	InsN	-253.07
RV	<i>InsF</i>	InsN	-245.60
SSM	<i>InsF</i>	InsN	-258.45
NO polyphenol	M3	InsN	-189.37
NO polyphenol	<i>InsF</i>	InsN	-243.04

Видно з Таблиць 1–3, що дуже мало поліфенолів може інгібувати взаємодію нативного інсуліну з амілоїдними фібрилами різних типів (галова кислота з фібрилами M3, саліцилова кислота, галова кислота – з фібрилами *InsF*, куркумін (кето-форма) – з фібрилами *Abeta*. З іншого боку, можна стверджувати, що ці три поліфеноли мають специфічність до інгібування зв'язування нативного інсуліну саме з конкретним типом амілоїдних фібрил, що може бути корисним у подальших молекулярно-динамічних та *in vivo* дослідженнях. Натомість, для нативного альбуміну, набагато більше поліфенолів здатні інгібувати білок-фібрильну взаємодію (для фібрил M3 –

куркумін (енольна форма), галова кислота, саліцилова кислота, кверцетин, ресвератол; для фібрил InsF – саліцилова кислота; для фібрил Abeta – галова кислота, саліцилова кислота).

Таблиця 3. Значення скорингової функції у найбільш енергетично вигідних комплексах амілоїдні фібрили Абета-пептиду – нативний білок – поліфенол (за результатом докінгу в HDOCK)

Polyphenol type	Fibril type	Native protein type	HDOCK Scoring function value, a.u.
CUR1	Abeta	HSA	-245.50
CUR2	Abeta	HSA	-245.50
GA	Abeta	HSA	-236.19
PA	Abeta	HSA	-236.19
QUR	Abeta	HSA	-245.50
RV	Abeta	HSA	-245.50
SSM	Abeta	HSA	-244.96
CUR1	Abeta	InsN	-265.59
CUR2	Abeta	InsN	-252.32
GA	Abeta	InsN	-251.91
PA	Abeta	InsN	-252.65
QUR	Abeta	InsN	-255.63
RV	Abeta	InsN	-253.11
SSM	Abeta	InsN	-255.29
NO polyphenol	Abeta	HSA	-236.19
NO polyphenol	Abeta	InsN	-252.46

Тобто для громіздкої молекули альбуміну можна підібрати кілька поліфенолів, як можуть потенційно інгібувати його взаємодію з різними амілоїдними фібрилами. **Зокрема, саліцилова кислота є універсальною, яка здатна пригнічувати білок-фібрильну взаємодію альбуміну з усіма трьома типами досліджених фібрил** (у подальшому дослідженні це треба перевірити за допомогою МД).

Також варто відзначити, що зниження значень скорингової функції у присутності поліфенолів було дуже низьким: 0.1 – 2%, але абсолютні значення енергії зв'язування важко оцінити за допомогою молекулярного докінгу, тому дивимося тут на якісний результат. Звісно, це все треба перевіряти за допомогою молекулярної динаміки.

Таблиця 4. Залишки інтерфейсу рецептор-ліганд у комплексах HSA або InsN з амілоїдними фібрилами за відсутності та у присутності **галової кислоти**

Амінокислотні залишки нативного білка, зв'язані з фібрилами (на відстані менше 5 ангстрем)	
HSA	
M3	
Without any polyphenol	With GA
GLN 33A	GLN 33A
CYS 34A	CYS 34A
PRO 35A	PRO 35A
PHE 36A	PHE 36A
GLU 37A	GLU 37A
ASP 38A	ASP 38A
ARG 81A	ARG 81A
GLU 82A	GLU 82A
THR 83A	THR 83A
TYR 84A	TYR 84A
GLY 85A	GLY 85A
GLU 86A	GLU 86A
ASN 111A	ASN 111A
LEU 112A	LEU 112A
PRO 113A	PRO 113A
VAL 122A	VAL 122A
THR 125A	THR 125A
ASP 129A	ASP 129A
LYS 137A	LYS 137A
TYR 140A	TYR 140A
GLU 141A	GLU 141A
ARG 144A	ARG 144A
ARG 145A	ARG 145A
GLU 501A	GLU 501A
PHE 502A	PHE 502A
ASN 503A	ASN 503A
ALA 504A	ALA 504A
GLU 505A	GLU 505A
THR 508A	THR 508A
GLU 565A	GLU 565A
ALA 569A	ALA 569A
LYS 573A	LYS 573A
GLN 580A	GLN 580A

Without any polyphenol+14	With CUR1+10 (менше на 3 залишки)
GLN 33A CYS 34A PRO 35A PHE 36A GLU 37A ASP 38A ARG 81A GLU 82A THR 83A TYR 84A GLY 85A GLU 86A ASN 111A LEU 112A PRO 113A VAL 122A THR 125A ASP 129A LYS 137A TYR 140A GLU 141A ARG 144A ARG 145A GLU 501A PHE 502A ASN 503A ALA 504A GLU 505A THR 508A GLU 565A ALA 569A LYS 573A GLN 580A	GLN 33A PRO 35A PHE 36A GLU 37A ASN 111A LEU 112A PRO 113A LYS 137A TYR 140A ARG 144A LYS 500A GLU 501A PHE 502A ASN 503A ALA 504A GLU 505A THR 508A HSD 510A LYS 564A GLU 565A THR 566A ALA 569A GLU 570A GLY 572A LYS 573A LYS 574A VAL 576A ALA 577A GLN 580A ALA 581A
Without any polyphenol	With PA
GLN 33A CYS 34A PRO 35A PHE 36A GLU 37A ASP 38A ARG 81A GLU 82A THR 83A TYR 84A GLY 85A GLU 86A ASN 111A LEU 112A PRO 113A VAL 122A THR 125A ASP 129A LYS 137A TYR 140A GLU 141A ARG 144A ARG 145A GLU 501A PHE 502A	GLN 33A CYS 34A PRO 35A PHE 36A GLU 37A ASP 38A ARG 81A GLU 82A THR 83A TYR 84A GLY 85A GLU 86A ASN 111A LEU 112A PRO 113A VAL 122A THR 125A ASP 129A LYS 137A TYR 140A GLU 141A ARG 144A ARG 145A GLU 501A PHE 502A

ASN 503A ALA 504A GLU 505A THR 508A GLU 565A ALA 569A LYS 573A GLN 580A	ASN 503A ALA 504A GLU 505A THR 508A GLU 565A ALA 569A LYS 573A GLN 580A
<b>Without any polyphenol+33</b>	<b>With QUR+31</b> (зовсім різні сайти)
GLN 33A CYS 34A PRO 35A PHE 36A GLU 37A ASP 38A ARG 81A GLU 82A THR 83A TYR 84A GLY 85A GLU 86A ASN 111A LEU 112A PRO 113A VAL 122A THR 125A ASP 129A LYS 137A TYR 140A GLU 141A ARG 144A ARG 145A GLU 501A PHE 502A ASN 503A ALA 504A GLU 505A THR 508A GLU 565A ALA 569A LYS 573A GLN 580A	THR 352A THR 356A LYS 359A CYS 360A ALA 362A ALA 363A ALA 364A GLU 368A CYS 369A LYS 372A VAL 373A ASP 375A GLU 376A PHE 377A LYS 378A PRO 379A LEU 380A GLU 382A GLU 383A ASN 386A LEU 387A GLN 390A GLU 393A LEU 394A GLN 397A ALA 406A LEU 407A ARG 410A ARG 485A SER 489A GLU 492A
<b>Without any polyphenol+33</b>	<b>With RV+31</b> (зовсім різні сайти, але однакові з with QUR, як і енкрія)
GLN 33A CYS 34A PRO 35A PHE 36A GLU 37A ASP 38A ARG 81A GLU 82A THR 83A TYR 84A GLY 85A GLU 86A ASN 111A LEU 112A PRO 113A VAL 122A	THR 352A THR 356A LYS 359A CYS 360A ALA 362A ALA 363A ALA 364A GLU 368A CYS 369A LYS 372A VAL 373A ASP 375A GLU 376A PHE 377A LYS 378A PRO 379A

THR 125A ASP 129A LYS 137A TYR 140A GLU 141A ARG 144A ARG 145A GLU 501A PHE 502A ASN 503A ALA 504A GLU 505A THR 508A GLU 565A ALA 569A LYS 573A GLN 580A	LEU 380A GLU 382A GLU 383A ASN 386A LEU 387A GLN 390A GLU 393A LEU 394A GLN 397A ALA 406A LEU 407A ARG 410A ARG 485A SER 489A GLU 492A
<b>InsF</b>	
<b>Without any polyphenol+2</b>	<b>With PA+2</b>
LYS 359A ALA 362A ALA 363A GLU 368A CYS 369A LYS 372A ASP 471A ARG 472A LYS 475A GLU 479A SER 489A ALA 490A LEU 491A GLU 492A ASP 494A GLU 495A THR 496A TYR 497A VAL 498A PRO 499A LYS 500A GLU 501A PHE 502A LYS 534A HSD 535A LYS 536A PRO 537A LYS 538A ALA 539A THR 540A LYS 541A GLN 543A ALA 582A	LYS 359A ALA 362A ALA 363A GLU 368A LYS 372A GLN 417A ASP 471A ARG 472A LYS 475A GLU 479A SER 489A ALA 490A LEU 491A GLU 492A VAL 493A ASP 494A GLU 495A THR 496A TYR 497A VAL 498A PRO 499A LYS 500A GLU 501A PHE 502A LYS 534A HSD 535A LYS 536A PRO 537A LYS 538A ALA 539A LYS 541A GLN 543A ALA 582A
<b>Abeta</b>	
<b>Without any polyphenol</b>	<b>With GA</b>
ARG 348A LYS 351A THR 352A THR 355A	ARG 348A LYS 351A THR 352A THR 355A

LYS 359A	LYS 359A
GLU 376A	GLU 376A
PRO 379A	PRO 379A
LEU 380A	LEU 380A
GLU 382A	GLU 382A
GLU 383A	GLU 383A
LEU 387A	LEU 387A
GLN 390A	GLN 390A
LEU 394A	LEU 394A
ALA 406A	ALA 406A
LEU 407A	LEU 407A
VAL 409A	VAL 409A
ARG 410A	ARG 410A
LYS 413A	LYS 413A
LYS 414A	LYS 414A
ARG 472A	ARG 472A
LYS 475A	LYS 475A
ASN 483A	ASN 483A
ARG 485A	ARG 485A
PRO 486A	PRO 486A
CYS 487A	CYS 487A
SER 489A	SER 489A
ALA 490A	ALA 490A
LEU 491A	LEU 491A
GLU 492A	GLU 492A
VAL 493A	VAL 493A
GLU 495A	GLU 495A
PRO 537A	PRO 537A
LYS 538A	LYS 538A
ALA 539A	ALA 539A
THR 540A	THR 540A
LYS 541A	LYS 541A
<b>Without any polyphenol</b>	<b>With PA</b>
ARG 348A	ARG 348A
LYS 351A	LYS 351A
THR 352A	THR 352A
THR 355A	THR 355A
LYS 359A	LYS 359A
GLU 376A	GLU 376A
PRO 379A	PRO 379A
LEU 380A	LEU 380A
GLU 382A	GLU 382A
GLU 383A	GLU 383A
LEU 387A	LEU 387A
GLN 390A	GLN 390A
LEU 394A	LEU 394A
ALA 406A	ALA 406A
LEU 407A	LEU 407A
VAL 409A	VAL 409A
ARG 410A	ARG 410A
LYS 413A	LYS 413A
LYS 414A	LYS 414A
ARG 472A	ARG 472A
LYS 475A	LYS 475A
ASN 483A	ASN 483A
ARG 485A	ARG 485A
PRO 486A	PRO 486A
CYS 487A	CYS 487A
SER 489A	SER 489A
ALA 490A	ALA 490A
LEU 491A	LEU 491A

GLU 492A VAL 493A GLU 495A PRO 537A LYS 538A ALA 539A THR 540A LYS 541A	GLU 492A VAL 493A GLU 495A PRO 537A LYS 538A ALA 539A THR 540A LYS 541A
InsN	
M3	
Without any polyphenol	With GA+1
ASN 21A SER 9B VAL 12B TYR 16B GLY 20B GLU 21B ARG 22B GLY 23B PHE 24B PHE 25B TYR 26B THR 27B PRO 28B LYS 29B	ASN 21A GLY 8B SER 9B VAL 12B TYR 16B GLY 20B GLU 21B ARG 22B GLY 23B PHE 24B PHE 25B TYR 26B THR 27B PRO 28B LYS 29B
InsF	
Without any polyphenol+18	With GA+14
GLN 5A CYS 7A SER 9A ILE 10A CYS 11A SER 12A LEU 13A TYR 14A GLN 15A PHE 1B VAL 2B ASN 3B GLN 4B HIS 5B LEU 6B CYS 7B HIS 10B GLU 13B ALA 14B LEU 17B	CYS 20A ASN 21A SER 9B VAL 12B TYR 16B GLY 20B GLU 21B ARG 22B GLY 23B PHE 24B PHE 25B TYR 26B THR 27B PRO 28B LYS 29B THR 30B
Without any polyphenol+18	With PA+14
GLN 5A CYS 7A SER 9A ILE 10A CYS 11A SER 12A LEU 13A	CYS 20A ASN 21A SER 9B VAL 12B TYR 16B GLY 20B GLU 21B

TYR 14A GLN 15A PHE 1B VAL 2B ASN 3B GLN 4B HIS 5B LEU 6B CYS 7B HIS 10B GLU 13B ALA 14B LEU 17B	ARG 22B GLY 23B PHE 24B PHE 25B TYR 26B THR 27B PRO 28B LYS 29B THR 30B
Abeta	
Without any polyphenol	With GA
ASN 21A SER 9B VAL 12B TYR 16B GLY 20B GLU 21B ARG 22B GLY 23B PHE 24B PHE 25B TYR 26B THR 27B PRO 28B LYS 29B THR 30B	ASN 21A SER 9B VAL 12B TYR 16B GLY 20B GLU 21B ARG 22B GLY 23B PHE 24B PHE 25B TYR 26B THR 27B PRO 28B LYS 29B THR 30B
Without any polyphenol	With CUR2
ASN 21A SER 9B VAL 12B TYR 16B GLY 20B GLU 21B ARG 22B GLY 23B PHE 24B PHE 25B TYR 26B THR 27B PRO 28B LYS 29B THR 30B	ASN 21A SER 9B VAL 12B TYR 16B GLY 20B GLU 21B ARG 22B GLY 23B PHE 24B PHE 25B TYR 26B THR 27B PRO 28B LYS 29B THR 30B

З аналізу Таблиці 4 видно, що у комплексах M3+GA+HSA, M3+PA+HSA, M3+HSA – однакова енергія комплексів та повністю однакові амінокислотні залишки нативного альбуміну, зв'язані з амілоїдними фібрилами M3. Це говорить про відсутність впливу галової та саліцилової кислот на стабільність комплексів альбуміну з фібрилами M3, хоча у даній

роботі ми вважали відсутність впливу за умовно дестабілізуючий вплив (тобто поліфенол не сприяє стабілізації білок-фібрильного комплексу). Те ж саме можна сказати і про комплекси: Abeta+GA+HSA, Abeta+PA+HSA, Abeta+HSA, тобто галова та саліцилова кислоти не сприяють і не пригнічують зв'язування нативного альбуміну з фібілами Абета-пептиду, можливо тому, що через низьку молекулярну масу мають здатність створити мало контактів з громіздким альбуміном.

А ось у присутності кверцетину та ресвератолу комплекси **M3-HSA-QUR**, **M3-HSA-RV** мають повністю інший сайт зв'язування нативного білка з фібрилою M3, ніж у комплексі M3-HSA: замість латерального зв'язування з поверхнею бета-листа нативний білок зсувається ближче до краю фібрили та частково зв'язується з її кінцем, перпендикулярно росту фібрили. Також замість 33 амінокислотних залишків з фібрилою зв'язуються лише 31, що може також бути причиною дестабілізації комплексів у порівнянні з контролем (M3-HSA). Слід також зауважити, що скориногові функції та сайти зв'язування були повністю однакові для M3-HSA-QUR і M3-HSA-RV, що може свідчити про однакові механізми пригнічення білок-фібрильної взаємодії M3-HSA кверцетином і ресвератолом.

У комплексі **HSA-InsF-PA** була така ж кількість амінокислотних залишків білка, зв'язаних з фібрилою, як і у комплексі, HSA-InsF, але дестабілізуючий ефект саліцилової кислоти проявився у заміні двох амінокислотних залишків: замість CYS369, THR540 (полярні незаряджені, можуть формувати водневі та дисульфідні зв'язки), у комплексі HSA-InsF-PA фібрила зв'язалася з такими амінокислотними залишками нативного альбуміну: GLN417, VAL493 (валін – неполярна амінокислота, глутамін – полярна незаряджена, тобто вони можуть формувати гідрофобні зв'язки та, може, водневі). Саліцилова кислота має одну карбоксильну та одну гідроксильну групу, які можуть зв'язуватися з гідроксильною групою треоніну 540 нативного альбуміну та заважати формувати водневий зв'язок

між фібрилою та нативним білком. Але краще це перевірити за допомогою МД.

Цікаво, що сайт зв'язування нативного білка з фібрилами M3 не змінюються у комплексі **M3-InsN-GA** у порівнянні з комплексом M3-InsN, однак додається зв'язування з одним додатковим амінокислотним залишком: GLY8, хоча при цьому знижується стабільність комплексу (гліцин – дестабілізує поліпептидний ланцюг (зокрема, утворення бета-листів, а при переміщенні гліцину замість аланіну у центра бета-тяжа отримуємо програш в енергії на 1.2 ккал/моль) [35]).

Для комплексів **InsF-InsN-GA**, **InsF-InsN-PA** та InsF-InsN у присутності галової та саліцилової кислот амілоїдна фібрила зв'язується з на 4 меншими амінокислотними залишками нативного інсуліну, хоча сайт зв'язування білка на фібрилі також повністю змінюється (але у присутності галової та саліцилової кислот амінокислотні залишки зв'язування та енергії зв'язування білка з фібрилою однакові). Пам'ятаємо, що, як уже писали вище, у присутності GA та PA нативний інсулін зв'язується на іншому сайті: перпендикулярно росту амілоїдних фібрил інсуліну, причому стабільність комплексу білок-фібрила знижується (Таблиця 2).

У комплексах Abeta-InsN-GA, Abeta-InsN-Curcumin-Keto та Abeta-InsN сайти зв'язування фібрили Абета-пептиду на нативному інсуліні однакові, незалежно від присутності поліфенолів (перпендикулярно головній осі фібрили та на краю фібрили). Але все одно стабільність комплексу знижується (Таблиця 2).

Таким чином, інгібування зв'язування поліфенолами білок-фібрильних взаємодій проходить, найімовірніше, з двома механізмами: 1) конкурентне інгібування (зв'язування поліфенолу з однаковими амінокислотними залишками, що і фібрила, звісно, не з усіма, а тільки з деякими, бо фібрила зв'язується з набагато більшим числом амінокислот нативного білка, ніж поліфеноли); 2) неконкурентне інгібування (поліфенол зв'язується в

алостеричному центрі, що змінює спорідненість амінокислотних залишків нативного білка до фібрил та призводить до зміни кількісного і якісного складу зв'язаних залишків та до зниження стабільності комплексу – підвищення за абсолютним значенням енергії зв'язування – бо енергія зв'язування має від'ємний знак: що вона вище, то зв'язування слабкіше). Зокрема, куркумін (енольна форма), саліцилова і галова кислоти інгібують за конкурентним механізмом зв'язування альбуміну з фібрилами, а кверцетин і ресвератол – за неконкурентним механізмом. Натомість, саліцилова і галова кислоти, а також куркумін (кетто-форма) інгібують за неконкурентним механізмом зв'язування нативного інсуліну з фібрилами Абета-пептиду та інсуліну, а галова кислота – за конкурентним механізмом пригнічує комплексоутворення нативного інсуліну з фібрилами МЗ. Також, варто відзначити, що у комплексах МЗ-HSA-QUR, МЗ-HSA-RV, InsF-InsN-GA, InsF-InsN-PA, у яких поліфеноли діють як неконкурентні інгібітори, нативний білок зв'язується на краю фібрили (перпендикулярно росту фібрили), тоді як за відсутності поліфенолу – білок зв'язується з латеральною областю фібрили (Рис. 1 – 19).

До таблиці 5 занесено типи зв'язків, які формує нативний білок з фібрилами у присутності поліфенолів у найбільш енергетично вигідних комплексах фібрила-білок-поліфенол.

Таблиця 5. Типи зв'язків, які формує нативний білок з фібрилами у присутності поліфенолів у найбільш енергетично вигідних комплексах фібрила-білок-поліфенол

<b>HSA</b>	
<b>МЗ</b>	
<b>Without any polyphenol</b>	<b>With GA</b>
Домінують у зв'язуванні з фібрилою заряджені амінокислотні залишки нативного білка (42.4%, електростатичні взаємодії), в основному, глутамінова кислота; полярні незаряджені – 27.3%, ароматичні – 12.1%, неполярні незаряджені – 18.2%.	
<b>With CUR1+10 (менше на 3 залишки)</b>	<b>With PA</b>
Домінують у зв'язуванні з фібрилою заряджені амінокислотні залишки нативного білка (40%), в основному, глутамінова кислота; полярні	Домінують у зв'язуванні з фібрилою заряджені амінокислотні залишки нативного білка (42.4%), в основному, глутамінова кислота; полярні незаряджені –

незаряджені – 23.3%, ароматичні – 10%, неполярні незаряджені – 26.7% (аланін, лейцин). Більше стало неполярних зв'язків з фібрилами (гідрофобних), менше – полярних (ван-дер-Ваальсових, водневих).		27.3%, ароматичні – 12.1%, неполярні незаряджені – 18.2%.	
<b>With QUR+31(зовсім різні сайти)</b>		<b>With RV+31(зовсім різні сайти, але однакові з with QUR, як і енкргія)</b>	
Домінують у зв'язуванні з фібрилою заряджені амінокислотні залишки нативного білка (38.7%), в основному, глутамінова кислота; полярні незаряджені – 25.8%, ароматичні – 3.2%, неполярні незаряджені – 32.3% (аланін, лейцин). Більше стало неполярних зв'язків з фібрилами (гідрофобних), менше – ароматичних.			
<b>InsF</b>			
<b>Without any polyphenol+2</b>		<b>With PA+2</b>	
Домінують у зв'язуванні з фібрилою заряджені амінокислотні залишки нативного білка (51.5%), в основному, глутамінова кислота та лізин; полярні незаряджені – 15.2%, ароматичні – 6.1%, неполярні незаряджені – 27.3%.		Домінують у зв'язуванні з фібрилою заряджені амінокислотні залишки нативного білка (51.5%), в основному, глутамінова кислота та лізин; полярні незаряджені – 12.1%, ароматичні – 6.1%, неполярні незаряджені – 30.3%.	
<b>Abeta</b>			
<b>Without any polyphenol</b>		<b>With GA</b>	<b>With PA</b>
Домінують у зв'язуванні з фібрилою заряджені амінокислотні залишки нативного білка (44.4%), в основному, глутамінова кислота, лізин, аргінін; полярні незаряджені – 19.4%, ароматичні – 0%, неполярні незаряджені – 36.1%.			
<b>InsN</b>			
<b>M3</b>			
<b>Without any polyphenol</b>		<b>With GA+1</b>	
Домінують у зв'язуванні з фібрилою полярні незаряджені амінокислотні залишки нативного білка (35.7%, водневі, ван-дер-Ваальсові взаємодії); заряджені – 21.4 %, ароматичні – 28.6%, неполярні незаряджені – 14.3%. Взаємодіючих залишків у 2 рази менше, ніж у альбуміну нативного.		Домінують у зв'язуванні з фібрилою полярні незаряджені амінокислотні залишки нативного білка (40%, в основному, гліцин; водневі, ван-дер-Ваальсові взаємодії); заряджені – 20 %, ароматичні – 26.7%, неполярні незаряджені – 13.3%. Більше стало полярних взаємодій (водневих, ван-дер-Ваальсових).	
<b>InsF</b>			
<b>Without any polyphenol+18</b>		<b>With GA+14</b>	<b>With PA+14</b>
Домінують у зв'язуванні з фібрилою полярні незаряджені амінокислотні залишки нативного білка (45%, в основному, цистеїн, глутамін; водневі, ван-дер-Ваальсові взаємодії); заряджені – 15 %, ароматичні – 10%, неполярні незаряджені – 30%. Взаємодіючих залишків у 2 рази менше, ніж у альбуміну нативного.		Домінують у зв'язуванні з фібрилою полярні незаряджені амінокислотні залишки нативного білка (43.8%, в основному, гліцин, треонін; водневі, ван-дер-Ваальсові взаємодії); заряджені – 18.8 %, ароматичні – 25%, неполярні незаряджені – 12.5%. Взаємодіючих залишків у 2 рази менше, ніж у альбуміну нативного. Більше стало ароматичних взаємодій, менше – неполярних (гідрофобних).	
<b>Abeta</b>			

Without any polyphenol	With GA	With CUR2
Домінують у зв'язуванні з фібрилою полярні незаряджені амінокислотні залишки нативного білка (40%, в основному, гліцин, треонін; водневі, ван-дер-Ваальсові взаємодії); заряджені – 20 %, ароматичні – 26.7%, неполярні незаряджені – 13.3%. Взаємодіючих залишків у 2 рази менше, ніж у альбуміну нативного.		

З таблиці 5 видно, що у білку HSA переважають електростатичні взаємодії з фібрилами (39 – 51.5% заряджених амінокислотних залишки на 100% зв'язаних з фібрилою), причому з фібрилою M3 взаємодіє багато залишків глютамінової кислоти, з фібрилами інсуліну – додатково залишки лізину, з фібрилами Абета-пептиду – додатково залишки лізину та аргініну. У присутності поліфенолів зростає кількість неполярних (гідрофобних) контактів нативного альбуміну з амілоїдними фібрилами (на 8% більше, ніж за відсутності поліфенолу), але знижується число полярних (водневих, ван-дер-Ваальсових, на 4% для куркуміну (енольна форма)) або ароматичних (на 9% менше, ніж у контролі, для систем M3-HSA-QUR, M3-HSA-RV). Зокрема, кверцетин і ресвератол викликають зміну сайту зв'язування **альбуміну** на фібрилі з латерального на перпендикулярно росту фібрили на її краю, що призводить до зростання кількості гідрофобних і зниження кількості ароматичних білок-фібрильних взаємодій.

Натомість, у зв'язуванні нативного інсуліну з фібрилами домінують полярні незаряджені амінокислотні залишки (35.7 – 45%, в основному, за рахунок: гліцину, цистеїну, треоніну, глютаміну). При цьому у присутності поліфенолів-інгібіторів білок-фібрильної взаємодії нативний інсулін завжди зв'язується перпендикулярно головній осі фібрили на краю фібрили. Цікаво, що домінуючі залишки цистеїн та глютамін змінюються на **гліцин** і треонін у присутності галової та саліцилової кислот (діють як неконкурентні інгібітори) у комплексі InsF-InsN, а інсулін перебирається з латеральної області фібрили на її кінець (перпендикулярно осі). У присутності поліфенолів зросла кількість полярних контактів (на 4% у порівнянні з контролем, для системи M3-InsN-GA) або ароматичних зв'язків (на 15% для систем InsF-InsN-GA, InsF-InsN-PA) ти знизилася число неполярних

контактів (на 17.5% для систем InsF-InsN-GA, InsF-InsN-PA). Тобто у порівнянні з альбуміном, зв'язування перпендикулярно осі фібрили призводить до обернених змін у кількості ароматичних та неполярних незаряджених амінокислот білка, що взаємодіють з фібрилами.

## РОЗДІЛ 3.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ КОМПЛЕКСІВ ІНСУЛІНУ З ФІБРИЛАМИ ІНСУЛІНУ У ПРИСУТНОСТІ ПОЛІФЕНОЛІВ

На останньому етапі роботи досліджували часову еволюцію структур найбільш енергетично вигідних (за результатами молекулярного докінгу в HDOCK, отриманих на попередньому етапі роботи) комплексів нативного інсуліну з амілоїдними фібрилами інсуліну у присутності та за відсутності галової або фенольної (саліцилової) кислот.

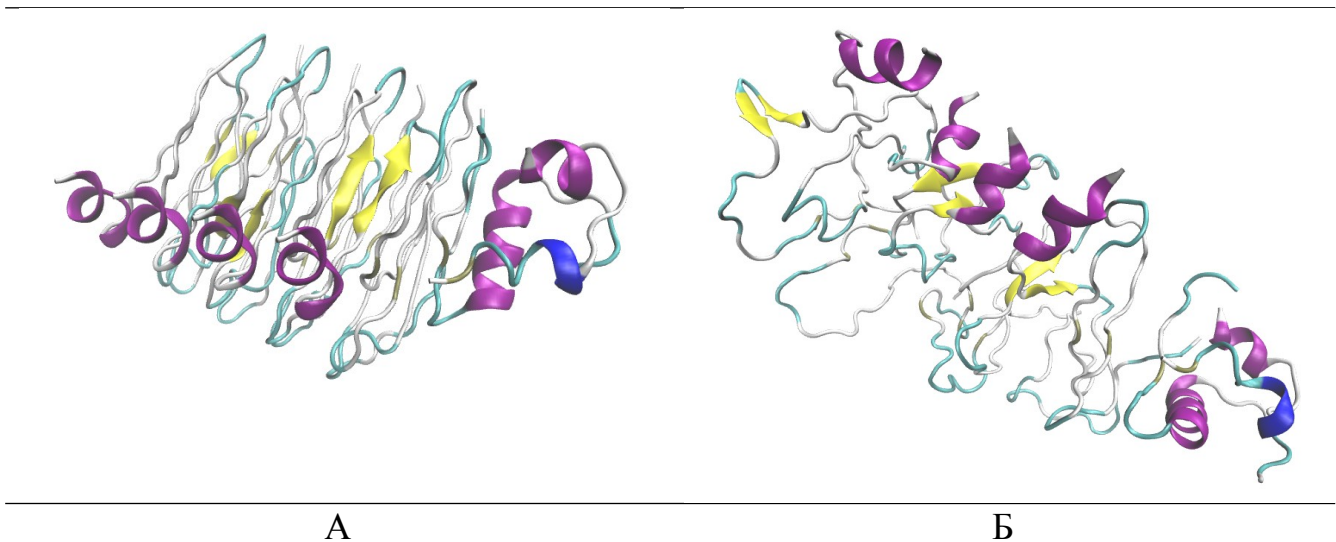


Рисунок 20. Структура комплексу **InsN-InsF** (отриманого за допомогою молекулярного докінгу в HDOCK на попередньому етапі роботи) у різні моменти часу молекулярно-динамічної симуляції: А – 0 нс, Б – 10 нс. Поліпептидні ланцюги розфарбовано за типом вторинної структури: жовтий –  $\beta$ -тяжі, фіолетовий –  $\alpha$ -спіралі, блакитний —  $\beta$ -повороти, білий — невідпорядкована структура.

На рисунках 20, 21 та 22 зображено структури комплексів InsN-InsF, InsN-InsF-GA та InsN-InsF-PA, відповідно, отриманих під час молекулярно-динамічного моделювання у моменти часу  $time=0$  і  $time=10$  наносекунд. Аналізуючи ці рисунки, можна сказати, що протягом 10 нс амілоїдні фібрили інсуліну втрачають свою третинну і навіть частину вторинної структури, а структура нативного інсуліну змінюється незначно.

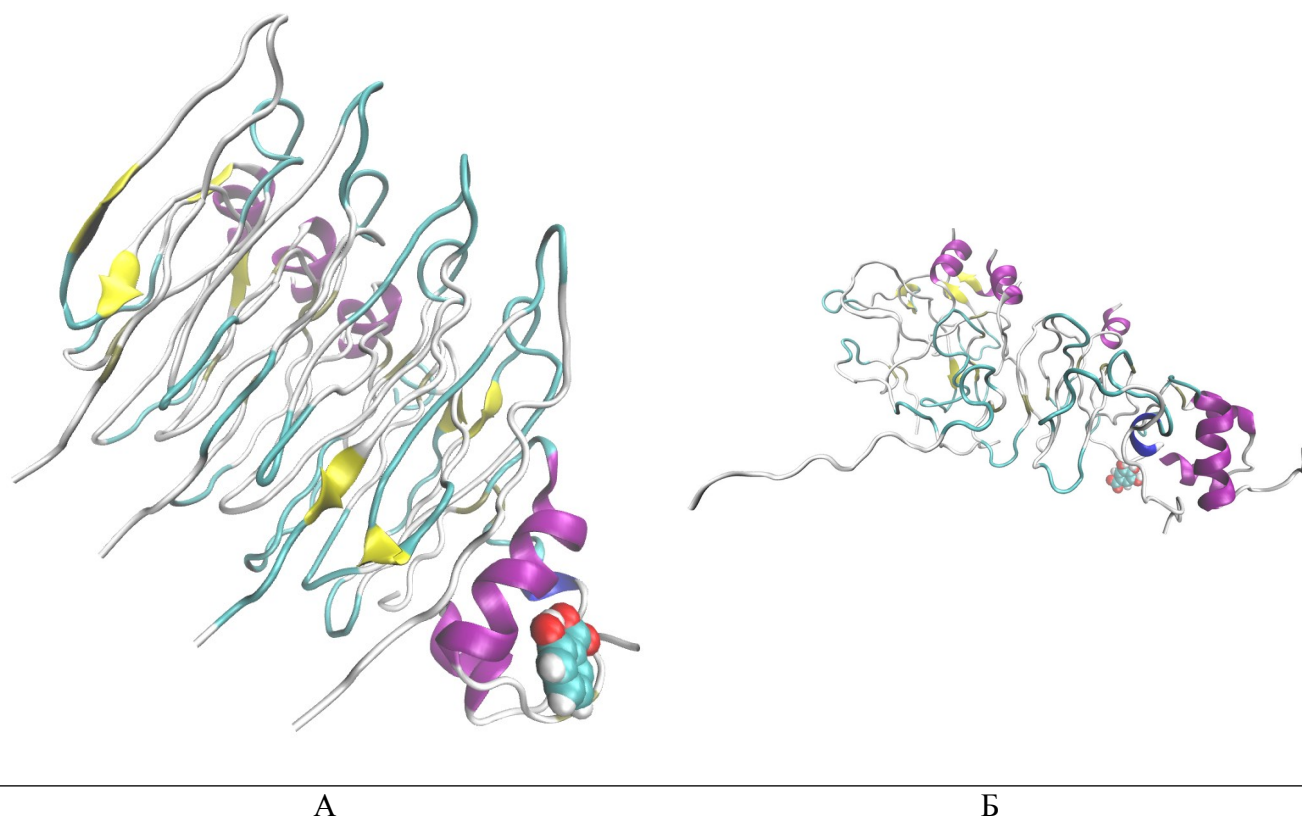
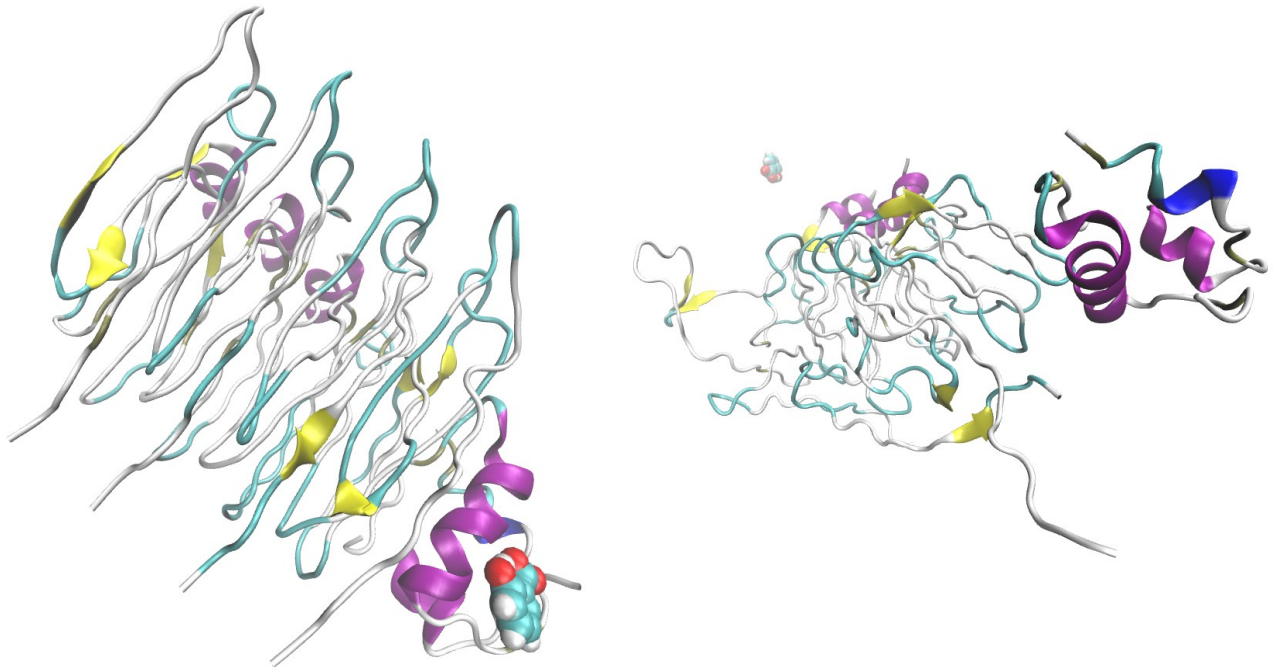


Рисунок 21. Структура комплексу **InsN-InsF-GA** (отриманого за допомогою молекулярного докінгу в HDOCK на попередньому етапі роботи) у різні моменти часу молекулярно-динамічної симуляції: А – 0 нс, Б – 10 нс. GA – галова кислота. Поліпептидні ланцюги розфарбовано за типом вторинної структури: жовтий –  $\beta$ -тяжі, фіолетовий –  $\alpha$ -спіралі, блакитний —  $\beta$ -повороти, білий — невпорядкована структура. Молекулу галової кислоти представлено у вигляді радіусів Ван дер Ваальса.

На жаль, з цих рисунків не видно, чи впливає додавання галової або саліцилової кислот на стабільність нативного інсуліну. Хоча видно, що амілоїдні фібрили після 10 нс симуляції мають найменш впорядковану структуру у присутності галової кислоти, і найбільш впорядковану — за відсутності поліфенолів. Таке припущення зроблено тому, що у комплексі InsN-InsF-GA та InsN-InsF збереглося найменше та найбільше  $\beta$ -тяжів (для комплексів InsN+InsF, InsN+InsF+GA та InsN+InsF+PA число бета-тяжів становило 6, 5 та 4, відповідно, після 10 нс молекулярно-динамічної симуляції, рис. 20Б, 21Б, 22Б, хоча у момент часу нуль наносекунд їх число дорівнювало 8 — рис. 20А, 21А, 22А), відповідно. Але отримані дані узгоджуються з відомими властивостями поліфенолів інгібувати

формування, а також руйнувати амілоїдні фібрили *in vitro*, через що поліфеноли розглядаються як потенційні ліки проти амілоїдних захворювань [7].



А

Б

Рисунок 22. Структура комплексу **InsN-InsF-PA** (отриманого за допомогою молекулярного докінгу в HDOCK на попередньому етапі роботи) у різні моменти часу молекулярно-динамічної симуляції: А – 0 нс, Б – 10 нс. PA – фенольна (саліцилова) кислота. Поліпептидні ланцюги розфарбовано за типом вторинної структури: жовтий —  $\beta$ -тяжі, фіолетовий —  $\alpha$ -спіралі, блакитний —  $\beta$ -повороти, білий — неупорядкована структура. Молекулу саліцилової кислоти представлено у вигляді радіусів Ван дер Ваальса.

На рисунку 23 зображено середньоквадратичне відхилення остовів та радіус інерції системи протягом 10 нс молекулярно-динамічного моделювання. Аналіз цих графіків показав, що білкові структури значно денатурують протягом 10 нс симуляції [33]. Але при цьому у присутності глової кислоти ступінь денатурації був найбільшим (рим. 23 А), оскільки значення RMSD після 10 наносекунд симуляції було найвищим (1.2 нм проти 1.1 нм у білок-фібрильному комплексі у присутності саліцилової кислоти, та проти 1 нм — у контрольному білок-фібрильному комплексі). Також, у

комплексі InsN+InsF+GA компактність комплексу була найнижча після симуляції (рис. 23Б), оскільки радіус інерції цього комплексу складав 2.65 нм проти 2.55 і 2.5 нм — для комплексів InsN+InsF+PA та InsN+InsF, відповідно. В цілому зображені на рисунку 23 результати узгоджуються з даними візуального аналізу структур комплексів після молекулярно-динамічного моделювання протягом 10 нс, зображених на рисунках 20 — 22. Однак, за даними параметрів RMSD та Radius of gyration, на жаль, теж не можна нічого сказати про зміну стабільності структури інсуліну протягом симуляції. Але аналіз тривимірних структур комплексів показав, що структура інсуліну майже не змінилася на відміну від структури фібрил інсуліну, яка суттєво денатурує протягом 10 нс, особливо в присутності поліфенолів.

Але все ж таки можна припустити, що у присутності галової і у меншому ступені саліцилової кислот, стабільність білок-фібрильних комплексів повинна знизитися через денатурацію структур фібрил.

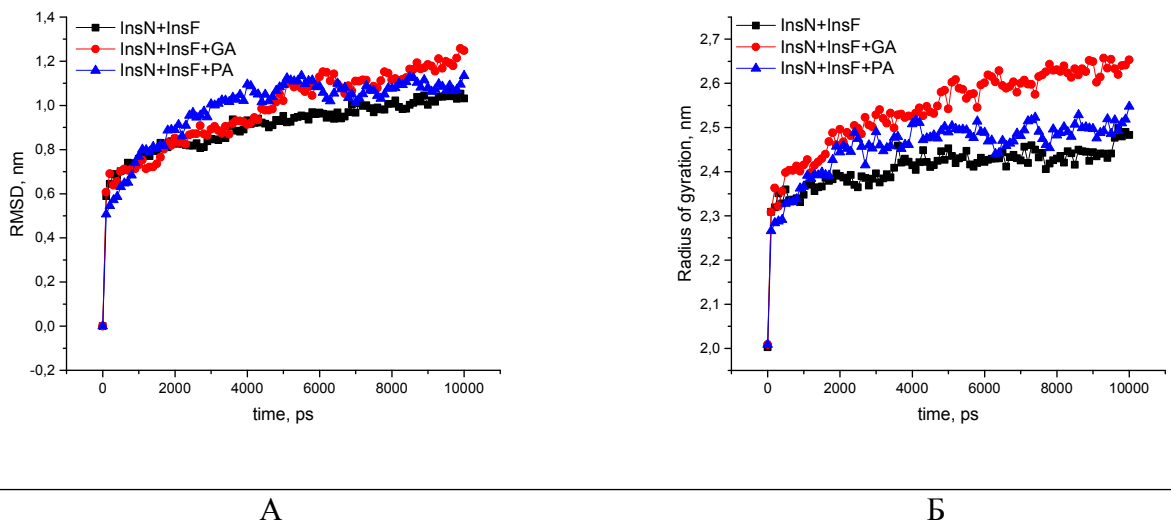


Рисунок 23. Еволюція у часі структурних параметрів комплексів інсуліну з фібрилами інсуліну у присутності поліфенолів (протягом МД симуляції): А) Середньоквадратичне відхилення остовів (RMSD) та радіус інерції (Radius of gyration)/

Нарешті, для того, щоб визначити, як саме впливає додавання галової та саліцилової кислот на стабільність комплексу фібрил інсуліну з нативним інсуліном, проаналізували зміну ступеня спіральності (helicity) ланцюгів А і

В молекули інсуліну у комплексі з фібрилами протягом 10 нс молекулярно-динамічного моделювання у присутності та за відсутності поліфенолів (рис. 24).

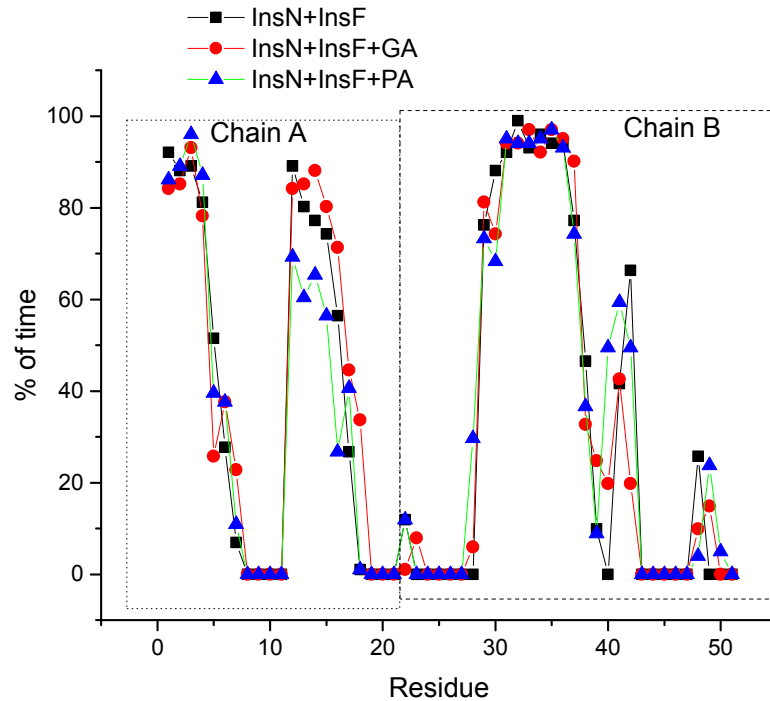


Рисунок 24. Спіральність (helicity) амінокислотних залишків інсуліну під час МД симуляції (протягом 10 нс) комплексів інсуліну з амілоїдними фібрилами інсуліну у присутності поліфенолів, виражена у відсотках від часу симуляції.

У ланцюгу А інсуліну поліфеноли впливали на спіральність амінокислотних залишків номер GLN5A, CYS6A, **CYS7A**, SER12A, LEU13A, TYR14A, GLN15A, LEU16A, GLU17A, ASN18A (рис. 24). Цікаво, що **CYS7A** формує цистеїновий місток з залишком ланцюга В.

У ланцюгу В поліфеноли впливали на спіральність амінокислотних залишків номер 22, 23, 38, 39, 40, 41, 42, 48, 49, 50 (рис. 24). Але оскільки нумерація амінокислотних залишків спіралі В інсуліну повинна починатися з 1, А на рисунку нумерація зсунута на 21 залишок вперед, то від актуальних номерів треба відняти 21, щоб отримати реальні номери амінокислотних залишків ланцюга В інсуліну. Тобто отримуємо такі амінокислотні залишки ланцюга В інсуліну: PHE1B, VAL2B, LEU17B, VAL18B, **CYS19B**, GLY20B,

GLU21B, TYR27B, PRO28B, LYS29B. Цікаво, що **CYS19B** формує цистеїновий місток з залишком ланцюга А.

Для більш конкретного аналізу також побудували таблицю 6, у яку внесено тільки ті амінокислотні залишки, на час знаходження у спіральній структурі яких впливають поліфеноли.

Для того, щоб прояснити, чи отриманий вплив поліфенолів (рис. 24, таблиця 6) стабілізує структуру інсуліну, треба знати, яку конформацію приймають залишки в нативному інсуліні, а також знати, чи взаємодіють означення поліфеноли з даними амінокислотними залишками за результатами молекулярного докінгу. Для цього було побудовано рисунок 25 з вторинною структурою інсуліну у VMD та виділено у ньому елементи вторинної структури (Extentions — Analysis — Sequence viewer). Отримані дані також занесли до таблиці 6.

Цікаво, що поліфеноли змінюють час знаходження  $\alpha$ -спіральних залишків GLN5A, CYS7A, LEU17B, за допомогою яких зв'язується інсулін з фібрилами інсуліну, у спіральній структурі, стабілізуючи **CYS7A** (збільшуючи його час знаходження у спіральній структурі у 1.6 (GA) і 3.3 (PA) рази) і дестабілізуючи  $\alpha$ -спіральні залишки GLN5A, LEU17B (знижуючи їх час знаходження у спіральній структурі в 1.3 — 2 рази).

У комплексах InsN+InsF+GA, InsN+InsF+PA сайти зв'язування нативного білка на фібрилах були різними, тому головна роль поліфенолів — саме у змінні сайту зв'язування нативного інсуліну на фібрилах, що знижує стабільність комплексів InsN+InsF+GA, InsN+InsF+PA у порівнянні з комплексом InsN+InsF. Але у комплексі InsN+InsF+GA галова кислота знижувала час, проведений в 3-10-спіральній конформації залишку GLU21B у 3 рази (цей залишок бере участь у зв'язуванні з фібрилами інсуліну у цьому комплексі). Натомість, у комплексі InsN+InsF+PA саліцилова кислота збільшує час, проведений в 3-10-спіральній конформації залишка **GLY20B** на 40%, і знижує час, проведений в 3-10-спіральній конформації залишка

Таблиця 6. Спіральність (helicity) вибраних амінокислотних залишків інсуліну під час МД симуляції (протягом 10 нс) комплексів інсуліну з амілоїдними фібрилами інсуліну у присутності поліфенолів, виражена у відсотках від часу симуляції

Амінокислотний залишок інсуліну	Тип вторинної структури у нативному стані	Helicity (спіральність) для комплексу <b>InsN+InsF</b> , % of time	Helicity (спіральність) для комплексу <b>InsN+InsF+GA</b> , % of time	Helicity (спіральність) для комплексу <b>InsN+InsF+PA</b> , % of time
GLN5A	$\alpha$ -helix ( $\alpha$ -спіраль)	51	26	40
CYS6A	$\alpha$ -helix	28	38	38
<b>CYS7A</b>	$\alpha$ -helix	7	23	11
<b>SER12A</b>	$\beta$ -turn ( $\beta$ -поворот)	89	84	69
<b>LEU13A</b>	$\beta$ -turn	80	85	60
<b>TYR14A</b>	$\beta$ -turn	77	88	65
<b>GLN15A</b>	$\beta$ -turn	74	80	56
LEU16A	$\beta$ -turn	56	71	27
GLU17A	3-10 helix (3-10 спіраль)	27	45	41
ASN18A	3-10 helix	1	34	1
<b>PHE1B</b>	$\beta$ -turn	12	1	12
<b>VAL2B</b>	$\beta$ -turn	0	8	0
<b>LEU17B</b>	$\alpha$ -helix	47	33	37
VAL18B	$\alpha$ -helix	10	25	9
<b>CYS19B</b>	$\alpha$ -helix	0	20	50
GLY20B	3-10 helix	42	43	59
GLU21B	3-10 helix	66	20	50
TYR27B	coil (невпорядкована структура)	26	10	4
PRO28B	coil	0	15	24
LYS29B	coil	0	0	5

GLU21B на 32% (ці залишки беруть участь у зв'язуванні з фібрилами інсуліну у цьому комплексі).

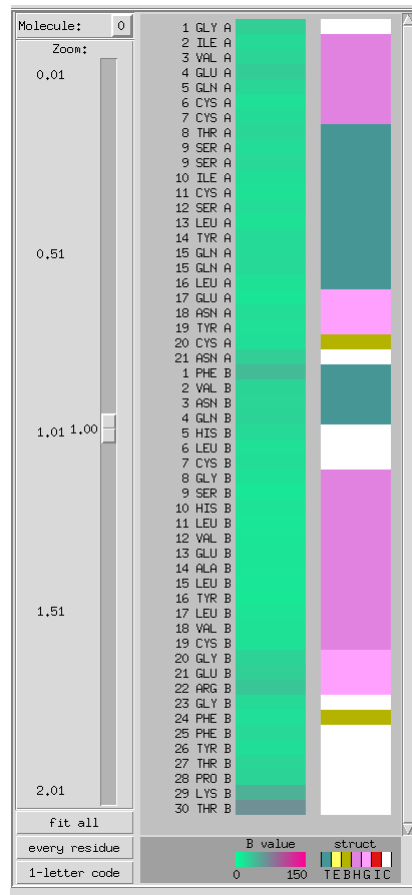


Рис. 25. Вторинна структура нативного інсуліну (код PDB: 5ENA), завантаженого з бази Protein Data Bank та візуалізованого у VMD. Аббревіатури внизу означають наступне: **H** –  $\alpha$ -helix, **T** –  $\beta$ -turn, **B** – isolated  $\beta$ -bridge, **G** – 3-10 helix, **I** –  $\pi$ -helix, **E** – extended strand ( $\beta$ -sheet), **C** – coil.

Також варто відмітити стабілізацію залишків 3-10 спіралі інсуліну: **GLU17A** (гальною та фенольними кислотами) та **ASN18A** (гальною кислотою), і  $\alpha$ -спіральных залишків **CYS6A**, **CYS19B** інсуліну (гальною та фенольними кислотами), оскільки в той час як фібрили інсуліну значно знижують час знаходження цих залишків у спіральній конформації (хоч ці залишки безпосередньо не контактують з фібрилярними структурами за даними докінгу), поліфеноли пригнічують ефект амілоїдних фібрил (час знаходження цих залишків у спіральній конформації зростає в 1.4 рази, для **ASN18A** — у 34 рази, а для **CYS19B** — від 0 (InsN+InsF) до 20 (+GA) та 50 (+PA) %!).

Таким чином, хоча галова та саліцилова кислоти за результатами докінгу знижують стабільність комплексу інсуліну з фібрилами інсуліну в однаковій мірі, за даними молекулярної динаміки, галова кислота призводить до більшої дестабілізації даного комплексу (InsN+INF+GA). Це тому, що отримуємо вищі значення параметрів RMSD, радіусу інерції та нижчу кількість  $\beta$ -тяжів амілоїдних фібрил після 10 нс молекулярно-динамічного моделювання у порівнянні з комплексами InsN+InsF, InsN+InsF+PA. Натомість, галова кислота, на відміну від саліцилової, суттєво стабілізує  $\alpha$ -спіральну структуру залишку CYS7A, який бере участь у створенні першого дисульфідного містка між ланцюгами інсуліну А та В та зв'язується з фібрилами інсуліну у комплексі InsN+INF, а також — суттєво стабілізує 3-10-спіральну структуру залишку ASN18A, збільшуючи час знаходження цих двох залишків у спіральній конформації в 3.3 та 34 рази, відповідно. У свою чергу, саліцилова кислота збільшує час знаходження  $\alpha$ -спірального залишку CYS19B, який бере участь у створенні другого дисульфідного містка між ланцюгами інсуліну А та В, від 0 (для комплексу InsN+InsF) до 50% від часу симуляції, тоді як галова кислота — від 0 (для комплексу InsN+InsF) до 20% від часу симуляції.

## ВИСНОВКИ

1. За допомогою аналізу результатів молекулярного докінгу в HDOCK нативних білків (інсуліну та альбуміну) з амілоїдними фібрилами (інсуліну, M3, Abeta) встановлено, що енергія білок-фібрильних комплексів зростає (за абсолютним значенням) на 0.1 — 2% найчастіше у присутності галової та саліцилової кислот у порівнянні з енергією контрольних білок-фібрильних комплексів (без поліфенолів). Тобто галова та саліцилова кислоти дестабілізують білок-фібрильні комплекси і, таким чином, є потенційними інгібіторами несприятливих ефектів амілоїдних фібрил на нативні функціональні білки. Отримані результати узгоджуються з нашими попередніми дослідженнями, які показали, що додавання галової кислоти до комплексу цитохрому с (відновленого) з фібрилами інсуліну та кверцетином, знижувало афінність зв'язування білка цитохрому с з амілоїдними фібрилами інсуліну. Також виявлено, що у порівнянні з інсуліном, більше поліфенолів, зв'язаних з альбуміном, можуть бути потенційними протекторами негативної дії амілоїдних фібрил (GA, PA, CUR2 — для InsN, CUR1, GA, SA, QUR, RV — для HSA).

2. Показано, що в залежності від типу амілоїдних фібрил та нативного білка, поліфеноли можуть інгібувати формування білок-фібрильного комплексу за конкурентним (комплекси M3+InsN+GA, M3+HSA+GA, M3+HSA+PA, InsF+HSA+PA, Abeta+HSA+GA, Abeta+HSA+PA) або неконкурентним (комплекси InsF+InsN+GA, InsF+InsN+PA, Abeta+InsN+GA, Abeta+InsN+CUR2, M3+HSA+QUR, M3+HSA+RV) механізмами. У першому випадку поліфеноли зв'язуються з деякими амінокислотними залишками нативного білка, які також беруть участь у зв'язуванні з фібрилами, таким чином, дестабілізуючи білок-фібрильний комплекс. У другому випадку поліфеноли змушують нативний білок зв'язатися на іншому сайті зв'язування фібрил, зокрема, перпендикулярно напрямку їх росту (імовірно, за допомогою водневих зв'язків), що може призводити до уповільнення поздовжнього росту фібрил (комплекси InsF+InsN+GA, InsF+InsN+PA, M3-HSA-QUR, M3-HSA-

RV). Також, найчастіше, дестабілізація білок-фібрильного комплексу поліфенолами супроводжується формуванням меншої кількості нековалентних зв'язків між білком і фібрилами у порівнянні з контролем.

3. Аналіз амінокислотних залишків нативних білків, що беруть участь у зв'язуванні з фібрилами показав, що у присутності поліфенолів-інгібіторів, на 8% зростає кількість гідрофобних контактів, але на 9% знижується число ароматичних зв'язків нативного альбуміну з амілоїдними фібрилами (комплекси M3-HSA-QUR, M3-HSA-RV). Навпаки, для нативного інсуліну, у присутності поліфенолів на 15% зростає кількість ароматичних контактів, але на 17.5% знижується число гідрофобних контактів нативного білка з амілоїдними фібрилами (комплекси InsF-InsN-GA, InsF-InsN-PA), причому домінуючі залишки цистеїн та глутамін, які формують інсулін-фібрильні контакти у контролі, змінюються на гліцин і треонін у присутності поліфенолів.

4. На основі результатів молекулярно-динамічного моделювання (у GROMACS) найбільш енергетично вигідних білок-фібрильних комплексів, отриманих у результаті молекулярного докінгу, показано, що галова кислота призводить до більшої дестабілізації комплексу InsF+InsN, ніж саліцилова, через найвищі значення середньоквадратичного відхилення остову, радіусу інерції та найнижчу кількість  $\beta$ -тяжів амілоїдних фібрил, що залишилися після 10 нс моделювання у комплексі InsF+InsN+GA, у порівнянні з комплексами InsF+InsN+PA та InsF+InsN. Виявлено, що механізм дестабілізації комплексу InsF+InsN+GA, імовірно, полягає не тільки у руйнуванні структури амілоїдних фібрил інсуліну, але і в стабілізації спіральної структури амінокислотних залишків CYS7A та ASN18A, оскільки час знаходження цих двох залишків у спіральній конформації зростає в 3.3 та 34 рази, відповідно, у комплексі InsF+InsN+GA у порівнянні з контролем.

5. Отримані результати можуть бути корисними у фармакології та медицині при розробці нових лікарських засобів проти амілоїдних захворювань, а також — при удосконаленні фармацевтичних композицій для

довготривалого зберігання інсуліну, оскільки вони свідчать про здатність поліфенолів, особливо, галової та саліцилової кислот, до протекторної дії на нативні функціональні білки.

## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Verma M., Vats A., Taneja V. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils //Annals of Indian Academy of Neurology. – 2015. – Т. 18. – №. 2. – С. 138-145.
2. Finn T. E. et al. Serum albumin prevents protein aggregation and amyloid formation and retains chaperone-like activity in the presence of physiological ligands //Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Т. 287. – №. 25. – С. 21530-21540.
3. Tokarz V. L., MacDonald P. E., Klip A. The cell biology of systemic insulin function //Journal of Cell Biology. – 2018. – Т. 217. – №. 7. – С. 2273-2289.
4. El Khoury N. B. et al. Insulin dysfunction and Tau pathology //Frontiers in cellular neuroscience. – 2014. – Т. 8. – С. 22.
5. Gupta Y., Singla G., Singla R. Insulin-derived amyloidosis //Indian journal of endocrinology and metabolism. – 2015. – Т. 19. – №. 1. – С. 174-177.
6. Nilsson M. R. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes //Amyloid. – 2016. – Т. 23. – №. 3. – С. 139-147.
7. Beldona V. et al. Natural product polyphenol inhibition of amyloid- $\beta$  aggregation //Journal of High School Science. – 2022. – Т. 6. – №. 1.
8. Zaidi F. K., Bhat R. Two polyphenols with diverse mechanisms towards amyloidosis: differential modulation of the fibrillation pathway of human lysozyme by curcumin and EGCG //Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2022. – Т. 40. – №. 10. – С. 4593-4611.
9. Zothantluanga J. H., Chetia D. A beginner's guide to molecular docking //Sciences of Phytochemistry. – 2022. – Т. 1. – №. 2. – С. 37-40.
10. E Lohning A. et al. A practical guide to molecular docking and homology modelling for medicinal chemists //Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2017. – Т. 17. – №. 18. – С. 2023-2040.
11. Lindahl E. Molecular dynamics simulations //Molecular modeling of proteins. – New York, NY : Springer New York, 2014. – С. 3-26.

12. So M. et al. Polyphenol-solubility alters amyloid fibril formation of  $\alpha$ -synuclein //Protein Science. – 2021. – T. 30. – №. 8. – C. 1701-1713.
13. Gonzalez-Garcia M., Fusco G., De Simone A. Membrane interactions and toxicity by misfolded protein oligomers //Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – T. 9. – C. 642623.
14. Sowade R. F., Jahn T. R. Seed-induced acceleration of amyloid- $\beta$  mediated neurotoxicity in vivo //Nature communications. – 2017. – T. 8. – №. 1. – C. 512.
15. Belinskaia D. A. et al. Serum albumin //Encyclopedia. – 2020. – T. 1. – №. 1. – C. 65-75.
16. Rossi, A.; Marti-Renom, M.A. and Sali, A. (2006) Protein Sci., 15(10), 2366-2380; Dias R., de Azevedo J., Walter F. Molecular docking algorithms //Current drug targets. – 2008. – T. 9. – №. 12. – C. 1040-1047.
- 17 Yan Y. et al. HDOCK: a web server for protein–protein and protein–DNA/RNA docking based on a hybrid strategy //Nucleic acids research. – 2017. – T. 45. – №. W1. – C. W365-W373.
18. Yan Y. et al. The HDOCK server for integrated protein–protein docking //Nature protocols. – 2020. – T. 15. – №. 5. – C. 1829-1852.
19. Csizmadia P. MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the World Wide Web. – 1999.
20. Hanwell M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform //Journal of cheminformatics. – 2012. – T. 4. – C. 1-17.
21. Van Der Spoel D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free //Journal of computational chemistry. – 2005. – T. 26. – №. 16. – C. 1701-1718.
22. Vus K. et al. Association of novel benzanthrone dyes with amyloid fibrils: A resonance energy transfer study //Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2014. – №. 68. – C. 189-196.
23. Gorbenko G. et al. Two-step FRET as a tool for probing the amyloid state of proteins //Journal of Molecular Liquids. – 2019. – T. 294. – C. 111675.

24. Trusova V. et al. Interactions of Fibrillar Proteins with Lipids: A Molecular Docking Insight //East European Journal of Physics. – 2023. – №. 1. – C. 236-240.
25. Pfeiffer P. B. et al. Cryo-EM analysis of the effect of seeding with brain-derived A $\beta$  amyloid fibrils //Journal of Molecular Biology. – 2024. – T. 436. – №. 4. – C. 168422.
26. Trusova V., Tarabara U., Gorbenko G. INTERACTIONS OF AMYLOID FIBRILS WITH FUNCTIONAL PROTEINS: MODULATING EFFECT OF POLYPHENOLS1 //European Journal OF Physics. – 2024. – T. 2. – C. 463-469.
27. Tarabara U. et al. Multiple Docking of Fluorescent Dyes to Fibrillar Insulin //East European Journal of Physics. – 2022. – №. 3. – C. 115-120.
28. González M. A. Force fields and molecular dynamics simulations //École thématique de la Société Française de la Neutronique. – 2011. – T. 12. – C. 169-200.
29. Sinha S., Tam B., Wang S. M. Applications of molecular dynamics simulation in protein study //Membranes. – 2022. – T. 12. – №. 9. – C. 844.
30. Abraham M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers //SoftwareX. – 2015. – T. 1. – C. 19-25.
31. Van Der Spoel D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free //Journal of computational chemistry. – 2005. – T. 26. – №. 16. – C. 1701-1718.
32. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics //Journal of molecular graphics. – 1996. – T. 14. – №. 1. – C. 33-38.
33. Vus K. Binding of benzanthrone dye abm to insulin amyloid fibrils: Molecular docking and molecular dynamics simulation studies //East European Journal of Physics. – 2020. – №. 3. – C. 141-153.
34. Trusova V., Tarabara U., Gorbenko G. INTERACTIONS OF AMYLOID FIBRILS WITH FUNCTIONAL PROTEINS: MODULATING EFFECT OF POLYPHENOLS1 //European Journal OF Physics. – 2024. – T. 2. – C. 463-469.
35. Merkel J. S., Regan L. Aromatic rescue of glycine in  $\beta$  sheets //Folding and Design. – 1998. – T. 3. – №. 6. – C. 449-456.