

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN HOÀNG LINH

NGHIÊN CỨU CẤU TRÚC VÀ ĐỘNG LỰC HỌC CỦA CÁC
OLIGOMER AMYLOID BETA BẰNG MÔ PHỎNG

Ngành: VẬT LÝ KỸ THUẬT

Mã số ngành: 9520401

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

TP. HỒ CHÍ MINH - NĂM 2022

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn 1: GS. TSKH. Mai Xuân Lý

Người hướng dẫn 2: PGS. TS. Huỳnh Quang Linh

Phản biện độc lập:

Phản biện độc lập:

Phản biện:

Phản biện:

Phản biện:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án họp tại Trường Đại học Bách khoa – Đại học Quốc gia Tp.HCM vào lúc giờ, ngày tháng năm 2022.

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM
- Thư viện Đại học Quốc gia Tp.HCM
- Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp.HCM

1. GIỚI THIỆU

Bệnh Alzheimer (AD) là dạng mất trí phổ biến nhất ở người lớn tuổi. Các dấu hiệu bệnh học của AD đặc trưng bởi mảng bám thần kinh ngoại bào tạo thành từ sợi amyloid, đám rối nội bào hình thành bởi protein tau siêu phosphoryl hóa, mất dần neuron và synapse, và suy giảm dần nhận thức. Mặc dù AD được xác định hơn 100 năm trước, cơ chế gây bệnh còn nhiều điều chưa biết. Có ba giả thuyết chính được đề xuất nhằm giải thích cơ chế của AD bao gồm cholinergic, tau và giả thuyết amyloid cascade. Người ta xác định sự tích tụ quá mức của amyloid beta ($A\beta$) xảy ra trước sự kết tụ protein tau siêu phosphoryl hóa. Dựa trên các khám phá này, người ta đề xuất giả thuyết amyloid cascade, trong đó sự tích tụ ngoại bào $A\beta$ là nguyên nhân của AD.

Các peptide $A\beta$ thuộc lớp protein mất trật tự vì chúng không hình thành cấu trúc ổn định trong môi trường nước. Các dạng kết tụ của $A\beta$ được chia thành oligomer, protofibril và sợi. Các oligomer và protofibril được xem là dạng kết tụ trung gian với khối lượng thấp hơn sợi và không có cấu trúc cụ thể như sợi $A\beta$. Vì các peptide $A\beta$ tích tụ trong sợi để hình thành mảng bám, giả thuyết amyloid cascade cho rằng sợi $A\beta$ đóng vai trò chủ đạo trong AD. Tuy nhiên, các thí nghiệm lâm sàng cho thấy việc loại bỏ mảng bám không thể ngăn chặn AD và các dạng kết tụ hòa tan được của $A\beta$ như oligomer là dạng gây độc chủ yếu chứ không phải các sợi hoàn chỉnh. Các oligomer $A\beta$ hòa tan được cũng có mối tương quan cao hơn với tình trạng AD. Ngoài ra, các thí nghiệm khám phá ra rằng oligomer $A\beta_{1-42}$ chứ không phải $A\beta_{1-40}$ hình thành các lỗ trong màng lipid dẫn tới mất cân bằng ion nội môi. Ngoài ra, thực nghiệm còn khám phá ra rằng tetramer $A\beta_{1-42}$ hoặc oligomer lớn hơn vượt qua màng neuron và ion calci đi vào tế bào. Các oligomer có khối lượng phân tử thấp (8~70 kDa) có hoạt tính sinh học cao hơn các oligomer nặng (> 150 kDa). Vì khối lượng của monomer $A\beta$ khoảng 4 kDa, các oligomer này trong khoảng dimer tới 18-mer. Các kết quả từ thực nghiệm gợi ý rằng tetramer $A\beta$ có thể là dạng oligomer độc nhất. Do đó, hiểu biết về cấu trúc và đặc tính hoá lý của các oligomer $A\beta$ khối lượng phân tử thấp là mục tiêu tiềm năng nhất để làm sáng tỏ cơ chế AD.

Các kỹ thuật thực nghiệm hiện nay chưa thể quan sát, thu được cấu trúc 3 chiều của các oligomer bậc thấp vì các oligomer tồn tại ở nhiều trạng thái có thời gian sống ngắn. Do đó, kỹ thuật mô phỏng động lực học phân tử là công cụ có thể cung cấp cái nhìn sâu sắc vào cấu trúc phân tử của oligomer. Các nghiên cứu

trước đây cho thấy sự thành công của mô phỏng động lực học phân tử kết hợp với phương pháp Replica exchange trong mô phỏng monomer, dimer của A β 42. Tuy nhiên, các mô phỏng cho oligomer lớn hơn khó thực hiện vì số bậc tự do lớn, và sự lựa chọn cấu hình ban đầu cho mô phỏng có thể thiên lệch về dạng cấu trúc xác định.

Vấn đề ảnh hưởng của cấu hình ban đầu lên kết quả mô phỏng oligomer A β chưa được đánh giá đầy đủ. Một số nghiên cứu sử dụng cấu hình sợi hoàn chỉnh làm cấu trúc ban đầu cho oligomer. Tuy nhiên, sợi hoàn chỉnh của A β có dạng “cross-beta” gồm phiến beta nằm vuông góc với trục phát triển của sợi còn oligomer không có dạng cấu trúc xác định. Vì vậy, câu hỏi đặt ra là việc chọn cấu hình ban đầu cho oligomer có ảnh hưởng thế nào lên kết quả mô phỏng.

Như đã trình bày, oligomer của A β có khả năng làm tổn hại màng tế bào, hình thành kênh dẫn ion mạnh hơn sợi hoàn chỉnh. Do đó, câu hỏi tại sao các oligomer có khả năng này đóng vai trò quan trọng trong cơ chế gây AD. Một số nghiên cứu mô phỏng trước đó dùng mô hình màng lipid kéo chỉ gồm 1 thành phần lipid. Tuy nhiên, màng tế bào thần kinh ở bệnh nhân AD bao gồm nhiều loại lipid khác nhau. Vì vậy, nghiên cứu mô phỏng sử dụng màng lipid kép nhiều loại lipid là cần thiết để thu được các kết quả gần với thực tế.

Từ các kết quả về độc tính của oligomer với tế bào thần kinh và sự quan trọng của cấu trúc oligomer trong quá trình tự tập hợp. Trong luận án này đề ra các mục tiêu nghiên cứu sau:

- a. Xác định cấu trúc tetramer A β 42 bằng mô phỏng động lực học phân tử kết hợp phương pháp trao đổi bản sao. Để tăng khả năng lấy mẫu trong không gian cấu hình, luận án sử dụng mô hình hạt thô UNRES. Các cấu hình tetramer thu được có thể góp phần lí giải sự khác biệt cấu trúc giữa oligomer bậc thấp và sợi hoàn chỉnh. Ngoài ra, các cấu trúc này là cơ sở xây dựng oligomer bậc cao và là mục tiêu cho các nghiên cứu thiết kế hợp chất ức chế kết tụ A β 42.
- b. Ảnh hưởng của cấu hình oligomer ban đầu lên mô phỏng cấu trúc oligomer chưa được đánh giá đúng mức. Do đó, tác giả dùng 2 cấu trúc trimer A β 42 ban đầu tạo bởi 2 cách khác nhau và tiến hành mô phỏng động lực học phân tử kết hợp phương pháp trao đổi bản sao. Luận án xác định ảnh hưởng của sự lựa chọn cấu trúc ban đầu lên kết quả cấu

trúc, các đặc tính hoá lý của trimer A β 42.

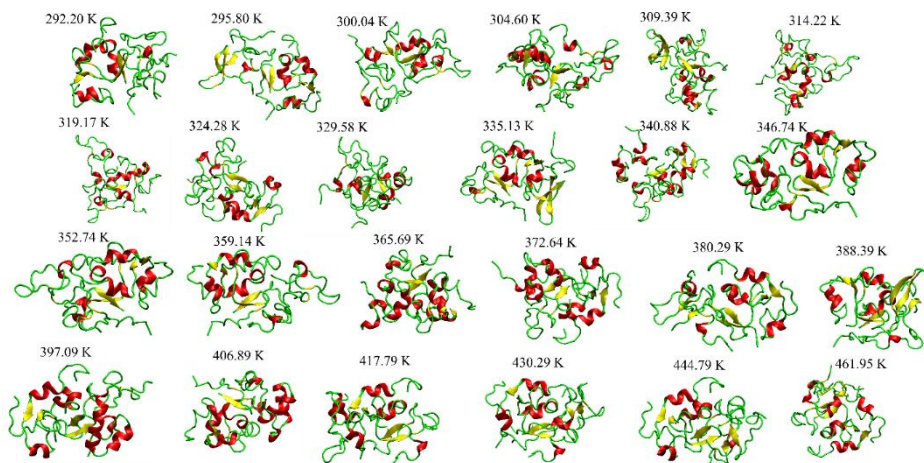
- c. Dodecamer A β 42 là một trong số các oligomer có khả năng gây độc tế bào thần kinh mạnh nhất. Trong luận án này, ảnh hưởng của dodecamer A β 42 lên màng tế bào được đánh giá bằng mô phỏng động lực học phân tử. Ngoài ra, ảnh hưởng của sợi hoàn chỉnh lên màng tế bào thần kinh cũng được xét đến và so sánh với dodecamer. Các kết quả thu được sẽ giúp trả lời câu hỏi tại sao oligomer có độc tính cao hơn sợi hoàn chỉnh.

2. PHƯƠNG PHÁP TÍNH TOÁN VÀ PHÂN TÍCH

2.1 Đối tượng nghiên cứu và cấu hình ban đầu

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu

Các cấu trúc 3 chiều của oligomer bậc thấp như trimer, tetramer A β 42. Nghiên cứu mô phỏng cấu trúc các oligomer bậc thấp này trong dung môi. Ngoài ra, luận án đánh giá tương tác của hệ phức hợp màng tế bào thần kinh-dodecamer A β 42, màng tế bào thần kinh-sợi hoàn chỉnh.



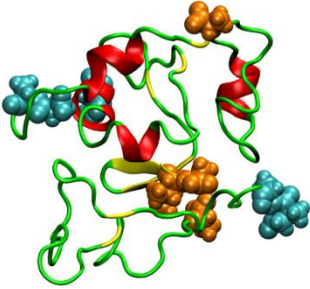
Hình 2.1: Cấu trúc ban đầu của tetramer A β 42 tạo từ docking 2 monomer vào dimer A β 42

2.1.2 Cấu hình ban đầu

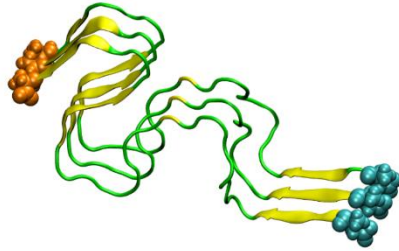
Vật liệu nghiên cứu chính là mục tiêu dạng oligomer. Tetramer A β 42 được tạo từ mô phỏng docking lần lượt 2 monomer vào dimer A β 42 (Hình 2.1). Trimer A β 42 gồm 2 cấu hình ban đầu, thứ nhất là cấu hình tạo từ docking monomer

vào dimer A β 42 (Hình 2.2). Trong mô phỏng tương tác giữa dodecamer, sợi A β 42 và màng tế bào thần kinh.

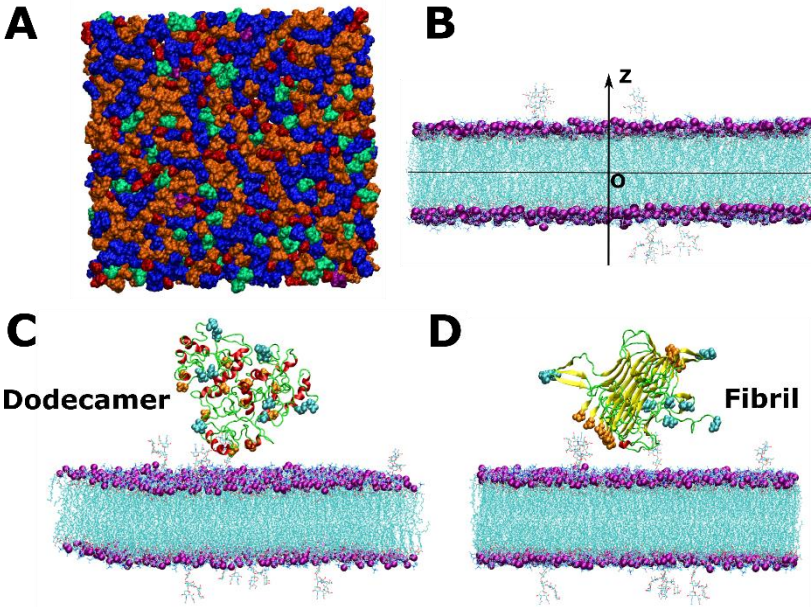
Mô phỏng 1



Mô phỏng 2



Hình 2.2: Cấu trúc ban đầu của trimer A β 42. Trong mô phỏng 1, cấu trúc này tạo bằng docking monomer và dimer A β 42. Trong mô phỏng 2, cấu trúc ban đầu được lấy từ 3 chuỗi của cấu hình sợi với mã PDB 2NAO.



Hình 2.3: (A) Các phân tử lipid trong màng tế bào thần kinh (góc nhìn thẳng vuông góc vào bề mặt màng), DPPC - màu xanh biển POPC - màu cam, CHL1 - màu đỏ, PSM - màu xanh lá, và GM1 - màu tím. (B) Trục z trục giao với bề mặt màng và $z=0$ ở tâm của màng. (C) Minh họa cấu hình ban đầu của phức

hợp màng–dodecamer, các phân tử nước và ion được loại bỏ cho rõ ràng. Các nguyên tử P của lipid là các quả cầu tím, các nguyên tử đầu N và đuôi C của peptide A β tương ứng là các quả cầu cam và lục lam. (D) Giống như (C) nhưng cho hệ màng–sợi. Cấu trúc A β trong hình (C) và (D) thu được từ mô phỏng 500 ns trong nước.

Cấu trúc của dodecamer tạo bằng cách docking 3 tetramer A β 42, cấu trúc sợi được tạo bằng việc tịnh tiến cấu trúc PDB 2NAO vốn gồm 6 chuỗi để tạo nên 12 chuỗi cho dodecamer. Màng tế bào thân kinh gồm 5 loại lipid cholesterol, DPPC, POPC, PSM và GM1 tạo từ web server CHARMM-GUI. Dodecamer và sợi A β 42 được đặt cách màng tế bào một khoảng cách nhỏ nhất 1.5nm (Hình 2.3).

2.1.3 Phương tiện nghiên cứu

Để thực hiện mô phỏng, các phần mềm được sử dụng trong luận án là phần mềm GROMACS 2018, GROMACS 2020, VMD 1.3, Pymol 2.5, UNRES3. Các phần mềm này được biên dịch và cài đặt trên hệ thống máy tính của Viện khoa học công nghệ và tính toán (banana.icst.org.vn), trung tâm tính toán của Viện vật lý, Viện hàn lâm khoa học Ba Lan (dmv.tryton.task.gda.pl).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Mô phỏng docking được sử dụng để tạo các cấu trúc oligomer A β 42 trimer, tetramer từ monomer và dimer A β 42. Các cấu trúc thu được từ docking đóng vai trò là cấu hình ban đầu cho mô phỏng động lực học phân tử (MD). Để nghiên cứu đặc tính cấu trúc của oligomer trimer và tetramer A β 42, mô phỏng động lực học phân tử kết hợp phương pháp trao đổi bản sao được sử dụng. Cơ chế phân tử của tương tác giữa dodecamer, sợi A β 42 và màng tế bào được nghiên cứu bằng mô phỏng MD thông thường ở 1 nhiệt độ xác định. Trường lực UNRES, AMBER99SB-ILDN, OPLS-AA/L, CHARMM36m, CHARMM36 được sử dụng trong luận án để tham số hoá protein, các phân tử lipid.

2.2.1 Mô phỏng docking

Trong phương pháp docking, một hàm số được gọi là hàm chấm điểm, dạng cụ thể của hàm này phụ thuộc vào chương trình docking. Mục tiêu của docking là tìm phức hợp tạo bởi 2 phân tử sinh học sao cho giá trị của hàm chấm điểm là nhỏ nhất.

2.2.2 Mô phỏng động lực học phân tử

Trong luận án này, 2 mô hình phân tử được sử dụng là mô hình UNRES và mô hình tất cả nguyên tử.

Mô hình UNRES sử dụng xấp xỉ trong đó các residue được mô hình hoá bởi 1 hạt đại diện cho nguyên tử $C\alpha$, nối với nhau bằng liên kết ảo và đính kèm các nguyên tử đại diện cho nhánh phụ, nhóm peptide. Hàm thế năng trong mô hình này là tổng của các số hạng tương tác giữa các nhóm nói trên đi kèm với trọng số tương ứng của chúng.

Trong mô hình tất cả nguyên tử, thế năng nói chung được biểu diễn:

$$E = E_{\text{non-bonded}} + E_{\text{others}} \quad (3.1)$$

trong đó $E_{\text{non-bonded}}$ là tương tác phi liên kết gồm tương tác tĩnh điện và van der Waals, E_{others} bao gồm tương tác liên kết và các tương tác bảo toàn góc liên kết.

2.2.2.1 Phương trình chuyển động

Phương trình động lực học có dạng sau:

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = - \frac{dU}{d\mathbf{r}} \quad (3.2)$$

trong đó m là khối lượng của nguyên tử, U là thế năng, U bao gồm các số hạng trong phương trình (3.1) và 1 số số hạng thêm vào để bảo đảm nhiệt độ, áp suất cố định.

2.2.2.2 Phương pháp replica exchange

Ý tưởng căn bản của phương pháp trao đổi bản sao là mô phỏng hệ ở nhiều nhiệt độ khác nhau, sử dụng động năng từ chuyển động nhiệt ở nhiệt độ cao để vượt qua các hồ thế năng lượng tự do của hệ. Các cấu hình từ nhiệt độ cao vượt qua hồ thế được trao đổi với cấu hình ở nhiệt độ thấp. Từ đó, hệ trải qua nhiều trạng thái trong không gian pha hơn so với khi chỉ có động năng ở nhiệt độ thấp vì ở nhiệt độ thấp không đủ động năng vượt hồ thế.

2.2.2.3 Thuật toán giải phương trình chuyển động

Thuật toán mặc định trong mô phỏng động lực học phân tử của gói GROMACS là thuật toán leap frog dùng để giải phương trình động lực học (3.2), đây cũng là thuật toán dùng trong luận án này. Ngoài ra, GROMACS còn sử dụng thuật toán Verlet và Verlet vận tốc.

2.2.3 Các thiết lập mô phỏng động lực học phân tử trong luận án

Để thực hiện mô phỏng động lực học phân tử, nghiên cứu này sử dụng gói

chương trình GROMACS 2020. Thuật toán steepest descent được dùng để cực tiểu hoá năng lượng. Các thuật toán v-rescale, Parrinello-Rahman được sử dụng để giữ nhiệt độ, áp suất cố định.

2.2.4 Các phương pháp phân tích dữ liệu

2.2.4.1 Cấu trúc bậc hai của protein

Thuật toán STRIDE và chương trình STRIDE được dùng để xác định tỉ lệ cấu trúc bậc hai của protein.

2.2.4.2 Chỉ số hydropathy

Các chỉ số hydropathy từ nghiên cứu của Kyte và Doolittle (“A simple method for displaying the hydropathic character of a protein,” *Journal of molecular biology*, vol. 157, no. 1, pp. 105–132, 1982) được dùng trong luận án. Hydropathy toàn phần là tổng giá trị hydropathy của các residue có liên kết với nhau. Nếu một residue có nhiều liên kết, đóng góp hydropathy của nó tỉ lệ với số liên kết.

2.2.4.3 Clustering (phân nhóm)

Công cụ gmx cluster từ gói GROMACS được dùng để cluster hóa các cấu trúc tetramer từ mô phỏng MD thông thường, sử dụng thuật toán gromos với khoảng cách cắt 2.5 Å.

2.2.4.4 Các phân tử nước nằm trong protein

Để tính số phân tử nước trong oligomer, thuật toán quickhull được sử dụng để xây dựng đa diện lồi của oligomer. Sau đó đa diện lõm của oligomer được tạo bằng thuật toán đề xuất bởi Jin-Seo và Se-Jong (“A new concave hull algorithm and concaveness measure for n-dimensional datasets,” *Journal of Information science and engineering*, vol. 28, no. 3, pp. 587–600, 2012) với ngưỡng 5. Cuối cùng, các phân tử nước nằm trong đa diện lõm được tính.

2.2.4.5 Diện tích bề mặt kỵ nước tiếp xúc dung môi (hSASA)

Công cụ gmx sasa từ gói GROMACS được dùng để tính hSASA. Trong luận án, các amino acid được xem là kỵ nước: glycine (Gly), alanine (Ala), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), proline (Pro), phenylalanine (Phe), methionine (Met), và tryptophan (Trp).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Cấu trúc và các tính chất hoá lý của tetramer A β 42

3.1.1 Giới thiệu

Tetramer A β 42 là một trong số oligomer bậc thấp có độc tính cao đối với tế bào thần kinh. Tuy nhiên, các kỹ thuật thực nghiệm hiện chưa thể thu được cấu trúc 3 chiều của oligomer này. Do đó, mô phỏng động lực học phân tử là một công cụ tiềm năng trong việc khảo sát cấu trúc và các đặc tính hoá lý của tetramer A β 42. Trong phần này, tác giả thực hiện mô phỏng MD cấu trúc tetramer A β 42 sử dụng quy trình đa kích thước. Đầu tiên, mô hình hạt thô UNRES và phương pháp trao đổi bản sao được sử dụng kết hợp với MD (REMD) để cải thiện khả năng lấy mẫu trong không gian cấu hình của tetramer A β 42. Sử dụng mô hình hạt thô cho phép giảm yêu cầu tài nguyên tính toán của phương pháp (REMD). Sau khi phân nhóm cấu trúc khi mô phỏng REMD đạt cân bằng, các cấu hình đặc trưng được mô phỏng trong môi trường nước tường minh và mô hình tất cả nguyên tử ở 2 trường lực AMBER99SB-ILDN và OPLS-AA/L. Điều này nhằm kiểm tra tính ổn định của cấu trúc thu được từ mô hình hạt thô.

Kết quả thu được cho thấy tetramer A β 42 chủ yếu có cấu trúc mất trật tự. Về mặt hình học, tetramer A β 42 có dạng phỏng cầu dẹt chứ không phải dạng giả 1 chiều hình sợi. Nồng độ nước trong tetramer cao hơn trong sợi hoàn chỉnh và phân bố điện tích đẳng hướng hơn sợi hoàn chỉnh. Sự khác biệt năng lượng giữa tetramer và sợi gợi ý sự thay đổi triệt để cấu trúc của oligomer để tạo sợi, điều này liên hệ mật thiết với sự thay đổi cấu trúc ba chiều của oligomer nhỏ trở thành sợi giả một chiều. Tương tác chất hoà tan-dung môi chịu trách nhiệm cho sự khác biệt giữa oligomer và cấu trúc sợi.

3.1.2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

3.1.2.1 Đối tượng nghiên cứu

Cấu trúc tetramer của A β 42. Vì cấu trúc này chưa được xác định bằng thực nghiệm, luận án sử dụng phương pháp docking các monomer A β 42 vào dimer để tạo trimer A β 42. Sau đó, dùng cấu hình docking trimer A β 42 để thực hiện docking monomer và trimer A β 42, thu được tetramer A β 42. Cấu hình tetramer A β 42 có được từ docking dùng làm cấu trúc ban đầu cho mô phỏng REMD với mô hình hạt thô UNRES.

3.1.3 Phương pháp nghiên cứu

3.1.3.1 Mô phỏng động lực học phân tử

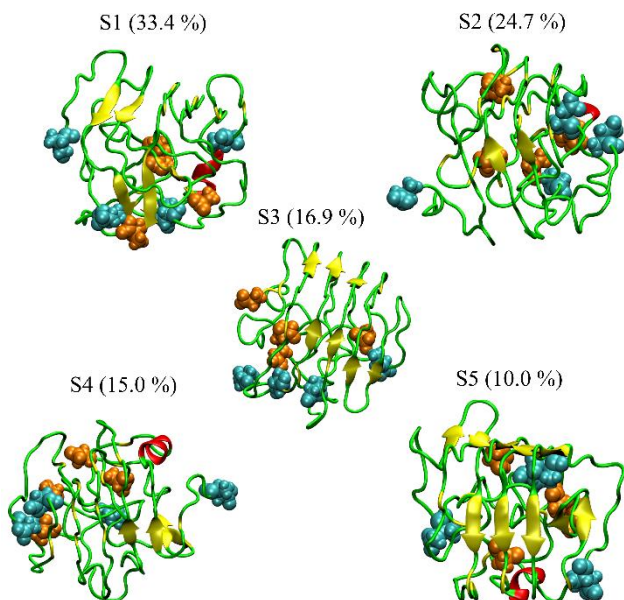
Với mô phỏng REMD trên mô hình UNRES, 24 replica với nhiệt độ từ 292 tới 462K, mỗi replica mô phỏng 409 000 000 bước MD, một bước là 0.1 đơn vị thời gian phân tử tương đương 4.89fs, từ đó thời gian cho một replica khoảng 2000ns. Cứ mỗi 1000 bước MD thực hiện trao đổi giữa các replica. Kích thước của hộp mô phỏng là 20×20×20 nm, đủ lớn để các chuỗi trong tetramer A β 42 phân tách và tái liên kết trong quá trình mô phỏng. Ngoài ra, sự đơn giản hoá mô hình protein trong UNRES làm tốc độ xảy ra các hiện tượng quan sát được nhanh hơn nhiều so với phương pháp mô hình sử dụng tất cả nguyên tử. Trong mô hình UNRES, 1 ns tương đương xấp xỉ 1-10 μ s trong mô hình tất cả nguyên tử.

Với mô phỏng MD tất cả nguyên tử, các cấu trúc hạt thô sau khi hệ cân bằng ở REMD được chuyển thành cấu trúc đầy đủ nguyên tử bằng phần mềm pulchra và tối ưu cấu trúc nhánh phụ bằng chương trình scwrl4. Sau đó các cấu trúc được tham số hoá bằng trường lực AMBER99SB-ILDN và OPLS-AA/L hoà tan trong hộp lập phương chứa các phân tử nước TIP3P và TIP4P tương ứng. Các ion Na⁺ được thêm vào để trung hoà hệ. Các mô phỏng MD tại 300K và 1atm cho tetramer ở 2 trường lực được thực hiện trong thời gian 200 ns.

3.1.4 Kết quả và thảo luận

3.1.4.1 Cấu trúc tetramer A β 42 từ mô phỏng REMD

Sau khi mô phỏng cân bằng ở 295.6K, các cấu trúc được phân nhóm và thu được 5 nhóm cấu trúc. Các cấu trúc trung tâm của 5 cluster được chọn như là cấu hình đại diện của tetramer (Hình 3.1). Tỷ lệ cấu trúc β thấp cho thấy tetramer vẫn ở trạng thái mất trật tự.



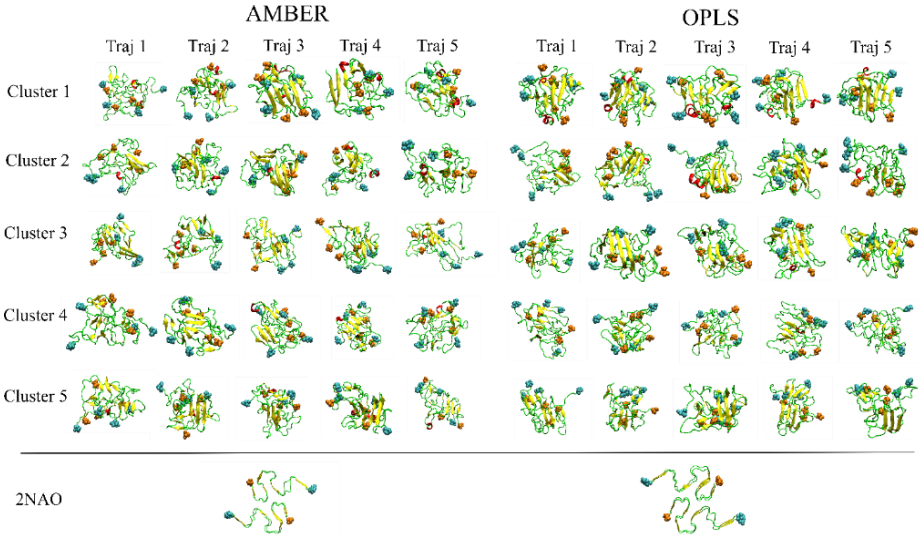
Hình 3.1: Các cấu hình đại diện cho 5 cluster thu được từ mô phỏng REMD UNRES. Các quả cầu màu lục lam (cyan) biểu diễn đầu N, các quả cầu màu cam biểu diễn đuôi C.

3.1.4.2 Phân bố oligomer và liên kết giữa các chuỗi trong mô phỏng REMD UNRES

Ở nhiệt độ khoảng 300K, trung bình số liên kết giữa các chuỗi là 5. Do đó, 5 được dùng như là tiêu chuẩn xác định hai chuỗi có trong cùng một phân tử oligomer hay không. Từ đó, thu được phân bố kích thước oligomer cho thấy ở nhiệt độ cao, tetramer tách thành monomer, dimer và trimer. Ở nhiệt độ thấp, các monomer không thể phân tách. Các kết quả cho thấy tetramer A β 42 được hình thành bởi hai quá trình: thêm monomer vào phân tử mầm ở nhiệt độ cao và sự tái cấu trúc các replica nhiệt độ thấp. Các quá trình này triệt tiêu sự thiên vị đến từ cấu trúc ban đầu tạo bởi docking cũng như tăng tốc hình thành tetramer vì khoảng cách giữa các monomer đủ nhỏ.

3.1.4.3 Các cấu trúc đại diện trong mô phỏng tất cả nguyên tử

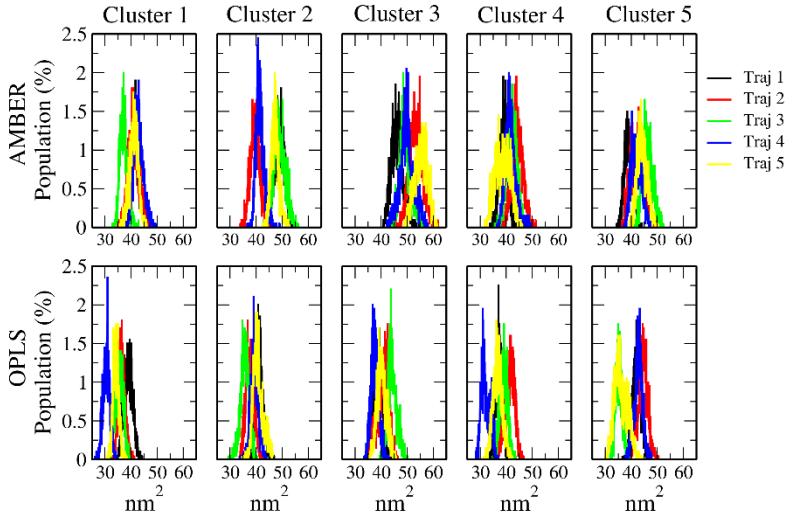
Bằng phương pháp cluster sử dụng cho 2 mô phỏng MD tất cả nguyên tử tương ứng 2 trường lực. Luận án thu được 5 cấu trúc cho mỗi một quỹ đạo MD 1 cấu trúc đại diện từ REMD/trường lực. Vì có 5 quỹ đạo MD cho một cluster REMD ở một trường lực tất cả nguyên tử, 5 cluster REMD thu được 25 cấu trúc đại diện trong mô phỏng MD tất cả nguyên tử. Tổng cộng có 50 cấu trúc đại diện (Hình 3.2). Để so sánh, luận án tiến hành mô phỏng cấu trúc sợi A β 42 (mã PDB 2NAO) và phân nhóm, thu được cấu trúc đại diện cho sợi (Hình 3.2).



Hình 3.2: (Phần trên) Các cấu trúc đại diện từ mô phỏng MD tất cả nguyên tử bắt đầu bằng 5 cấu trúc cluster thu được trong mô phỏng REMD UNRES. (Phần dưới) Cấu trúc ban đầu của mô phỏng MD bắt đầu từ cấu trúc 2NAO với 4 chuỗi. Các quả cầu lục lam biểu diễn đầu N, các quả cầu màu cam biểu diễn đuôi C.

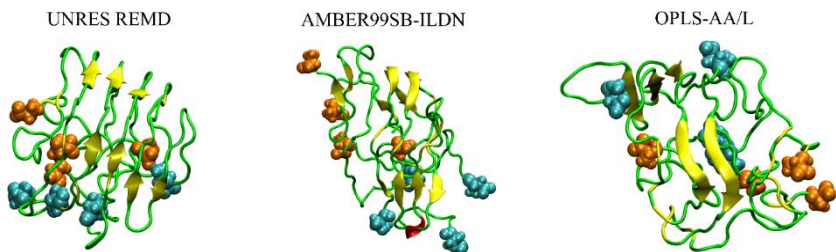
3.1.4.4 Diện tích bề mặt kỵ nước (hSASA)

Diện tích bề mặt của các residue kỵ nước sau khi MD cân bằng (Hình 3.3). Các giá trị trung bình trong trường lực OPLS-AA/L của tetramer A β 42 nhỏ hơn trong trường lực AMBER99SB-ILDN. Các kết quả hSASA phù hợp với dạng cấu trúc compact, trong đó oligomer hình phỏng cầu.



Hình 3.3: Diện tích bề mặt kỵ nước (hSASA) của tetramer A β 42 tính từ tất cả cấu hình trong giai đoạn 100–200 ns của mô phỏng MD tất cả nguyên tử 3.1.4.5 Cấu trúc khả dĩ nhất của tetramer A β 42

Các kết quả tính toán liên kết giữa các monomer trong tetramer cho thấy cluster 3 thu được từ mô phỏng REMD UNRES phù hợp tốt với thực nghiệm hơn 4 cluster còn lại. Ngoài ra, giá trị năng lượng phi liên kết của cluster 3 là thấp nhất trong 5 cluster. Từ đó, cluster 3 (Hình 3.4) có thể là cấu trúc khả dĩ nhất vì tính ổn định và có các tính chất phù hợp với nghiên cứu thực nghiệm.



Hình 3.4: Cấu trúc đại diện của cluster 3 từ mô phỏng REMD UNRES và cluster lớn nhất từ 5 quỹ đạo của các mô phỏng MD tất cả nguyên tử khi cân bằng. Các quả cầu màu lục lam biểu diễn đầu N và các quả cầu màu cam biểu diễn đuôi C. RMSD giữa các nguyên tử C-alpha của cấu trúc từ mô phỏng MD trong trường lực AMBER99SB-ILDN và OPLS-AA/L là 7.6 Å.

3.1.5 Kết luận: Cấu trúc và các tính chất hoá lý của tetramer A β 42

Các cấu trúc tetramer A β 42 thu được bằng việc sử dụng mô phỏng REMD với trường lực hạt thô UNRES, các cấu trúc này sau đó được mô phỏng MD với hai trường lực tất cả nguyên tử phổ biến. Cấu trúc khả dĩ nhất của tetramer ở dạng phỏng cầu dẹt và không có cấu trúc cross-beta. Ngoài ra, vai trò của bốn chuỗi trong tetramer không tương đương với nhau, phần lớn thời gian hai chuỗi trong số này hình thành lõi của tetramer, trong khi hai chuỗi còn lại đóng vai trò vỏ, tương tác yếu với các chuỗi khác, nhưng tương tác mạnh với những phân tử nước. Vì lí do này, tỉ lệ β trong tetramer thấp hơn sợi hoàn chỉnh. Các kết quả này cho thấy sự tái sắp xếp cấu trúc tetramer là cần thiết để hình thành các oligomer bậc cao hơn và dạng sợi. Cấu trúc sau mô phỏng MD tất cả nguyên tử của cluster 3 từ REMD trong nghiên cứu này phù hợp tốt với các dữ liệu thực nghiệm, cũng như những dự đoán lí thuyết và có thể được dùng làm mục tiêu cho thiết kế thuốc AD hoặc làm cấu trúc ban đầu để xây dựng oligomer bậc cao hơn.

3.2 Cấu trúc và tính chất hoá lý của trimer A β 42

3.2.1 Giới thiệu

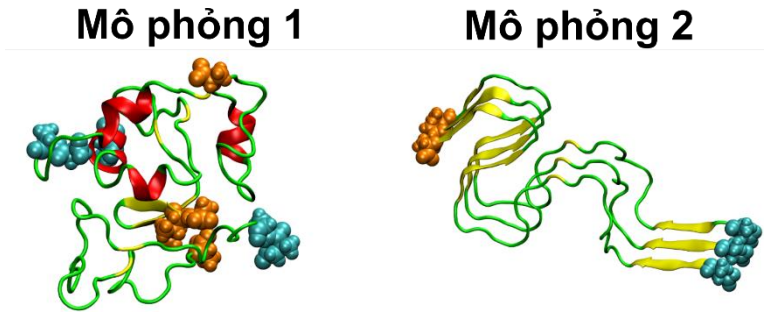
Trong nghiên cứu trước (Nguyen, Hoang Linh, et al. "Structure and physicochemical properties of the A β 42 tetramer: multiscale molecular dynamics simulations." The Journal of Physical Chemistry B 123.34 (2019): 7253-7269), nhóm nghiên cứu đã thu được cấu trúc ba chiều của tetramer

A β 42. Các kết quả cho thấy tetramer A β 42 dạng phỏng cầu dẹt, không có cấu trúc xác định. Trong phần này, nhóm nghiên cứu tiến hành mô phỏng trimer A β 42 sử dụng hai kiểu cấu trúc ban đầu. Thứ nhất, cấu trúc ngẫu nhiên của trimer A β 42 tạo từ mô phỏng docking. Thứ hai, cấu trúc sợi của A β 42 (mã PDB 2NAO) được tách ra 3 chuỗi làm cấu trúc ban đầu. Nhóm nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của kiểu cấu hình ban đầu lên cấu trúc trimer A β 42 thu được.

3.2.2 *Đối tượng và phương pháp nghiên cứu*

3.2.2.1 *Đối tượng nghiên cứu*

Cấu trúc ban đầu cho 2 mô phỏng được tạo tương ứng từ docking (mô phỏng 1) và cấu trúc sợi A β 42 với mã PDB 2NAO (mô phỏng 2) (Hình 3.5)



Hình 3.5: Cấu trúc ban đầu của trimer A β 42 dùng trong hai mô phỏng. Các quả cầu màu lục lam, cam biểu diễn tương ứng các nguyên tử đầu N và đuôi C.

3.2.2.2 *Mô phỏng động lực học phân tử*

Tương tự cho tetramer A β 42, mô phỏng REMD được dùng cho trimer A β 42. Hai mô phỏng REMD độc lập sử dụng tương ứng hai cấu trúc ban đầu khác nhau được tiến hành. Các mô phỏng được thực hiện bằng gói phần mềm GROMACS 2018.2. Trường lực CHARMM36m được sử dụng để tham số hoá protein. Các cấu trúc trimer A β 42 được hoà tan trong hộp nước TIP3P 12 mặt với khoảng cách nhỏ nhất tới mặt hộp là 1.8nm. Luận án sử dụng 72 replica cho mỗi mô phỏng REMD. Nhiệt độ của các replica từ 299.0 tới 410.3K, thời gian mô phỏng cho mỗi replica là 600ns.

3.2.2.3 *Phương pháp xác định lỗ trong protein*

Để xác định và tính kích thước lỗ tạo thành trong trimer, chương trình MOLE

được sử dụng. Các đĩa song song được vẽ ở lõi vào lõi thoát của các khoang. Một đường cong nối tâm các đĩa này. Bán kính lỗ là khoảng cách từ đường cong nối các tâm đĩa và nguyên tử gần nhất.

3.2.3 Kết quả và thảo luận

3.2.3.1 Sự khác biệt trong cấu trúc ban đầu

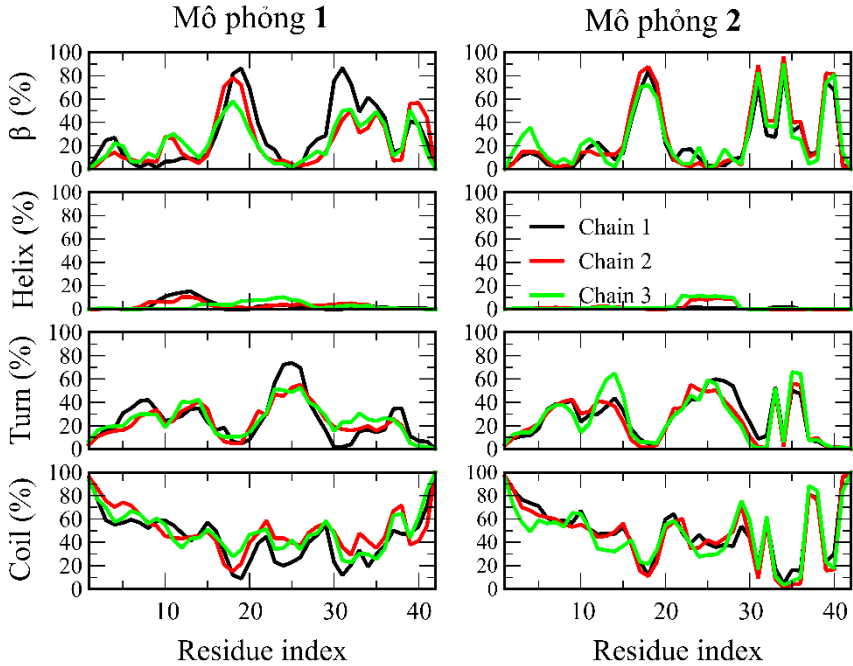
Cấu trúc bậc hai của các cấu hình ban đầu (Bảng 3.1) cho thấy trimer A β 42 từ **1** và **2** khác biệt đáng kể. Cấu trúc β của **1** thấp (8.73 %), trong khi ở **2** thì cao (37.30 %), điều này phù hợp với thực tế là 2NAO không có vùng helix, trong khi ở cấu hình docking, cấu trúc helix chiếm tỉ lệ đáng kể (15.08 %). Ngoài ra, tỉ lệ cấu trúc turn trong **1** cao hơn trong **2**).

Bảng 3.1: Tỉ lệ cấu trúc bậc hai (%) của cấu trúc ban đầu và trung bình (T = 300.38K) của trimer A β 42. Sai số (trong các dấu ngoặc) là độ lệch chuẩn.

Cấu trúc	Mô phỏng 1		Mô phỏng 2	
	Ban đầu	Trung bình	Ban đầu	Trung bình
β	8.73	24.87 (1.97)	37.30	25.14 (2.39)
Helix	15.08	2.72 (0.30)	0.00	1.45 (0.26)
Turn	53.17	23.95 (1.39)	29.37	25.30 (1.73)
Coil	23.02	48.45 (1.70)	33.33	48.11 (2.20)

So sánh tỉ lệ cấu trúc bậc hai thu được từ các mô phỏng (Bảng 3.1) cho thấy trong phạm vi sai số, lượng cấu trúc bậc hai chênh lệch nhỏ giữa các mô phỏng mô phỏng **1** và **2**. Do đó, mặc dù cấu trúc ban đầu khác nhau (Bảng 3.1 và Hình 3.5), trung bình cấu trúc bậc hai của trimer trong dung môi nước không bị ảnh hưởng đáng kể bởi điều kiện ban đầu. Tỉ lệ dải β trong cả hai hệ (Hình 3.6) cao trong các vùng 15–20 và 30–40. Tuy nhiên, trong **1** cấu trúc β của các chuỗi khác với **2** (Hình 3.6): Đuôi C của trimer thu được từ 2NAO có đỉnh nhọn trong phân bố, trong khi ở trường hợp mô phỏng **1** các đỉnh là cong. Cả hai hệ cho thấy tỉ lệ helix thấp. Tổng trung bình của dải β và helix ($\approx 27\%$) thấp hơn tổng các dạng mất trật tự (turn và coil, $\approx 73\%$) trong cả hai mô phỏng REMD (Bảng 3.1) cho thấy trimer A β 42 chủ yếu ở dạng mất trật tự. Kết quả này phù hợp với dữ liệu thực nghiệm cũng như các nghiên cứu mô phỏng. Ngoài ra, cấu trúc bậc hai của hai mô phỏng REMD khác chủ yếu ở vùng đuôi C, gợi ý tính bền cao

của đuôi C trong cấu trúc trimer $A\beta_{42}$, khi một bó các đuôi C được hình thành,



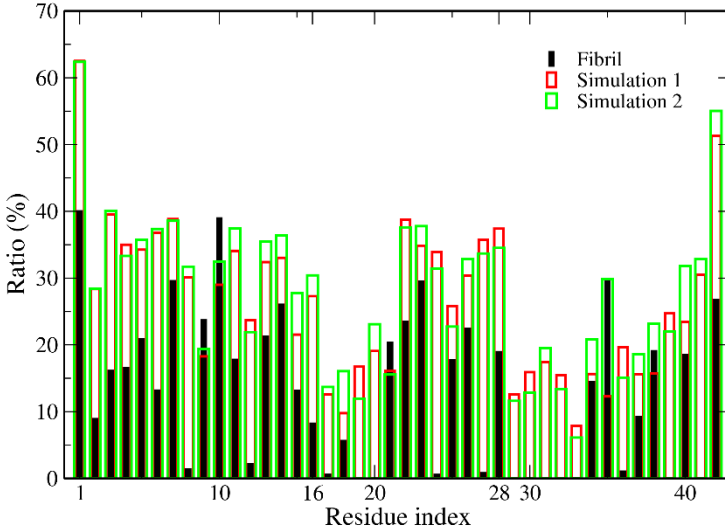
như trong cấu trúc 2NAO hoặc ở cấu trúc sợi hoàn chỉnh khác.

Hình 3.6: Phân bố cấu trúc bậc hai của các chuỗi trong trimer $A\beta_{42}$ ở 300.38 K, lấy trung bình trong 300 ns cuối của mô phỏng.

3.2.3.2 Diện tích bề mặt kỵ nước (hSASA)

Để so sánh sự tiếp xúc với dung môi của các residue trong trimer $A\beta_{42}$ và sợi, tỉ lệ giữa giá trị solvent accessible surface area (SASA, Diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi) của các residue trong trimer, sợi (2NAO), và amino acid tự do được tính. Trong trường hợp sợi, chỉ tính tới các residue ở chuỗi nằm trong lõi, bỏ qua chuỗi đầu và cuối vì trong sợi thực tế số lượng chuỗi ở lõi tăng theo kích cỡ sợi. Các residue trong trimer có diện tích tiếp xúc dung môi lớn hơn sợi (Hình 3.7), với ngoại lệ ở các residue Tyr10, Gly9, và Ala21. Kết quả này phù hợp vì giá trị SASA cho chuỗi ở lõi của sợi. Trong sợi $A\beta_{42}$, các residue Phe19, Phe20, Gly29, Ala30, Ile31, Ile32, Gly33, và Val39 hoàn toàn bị che khỏi dung môi (Hình 3.7), đây là hệ quả của việc kết tụ các chuỗi hình thành lõi

kị nước.



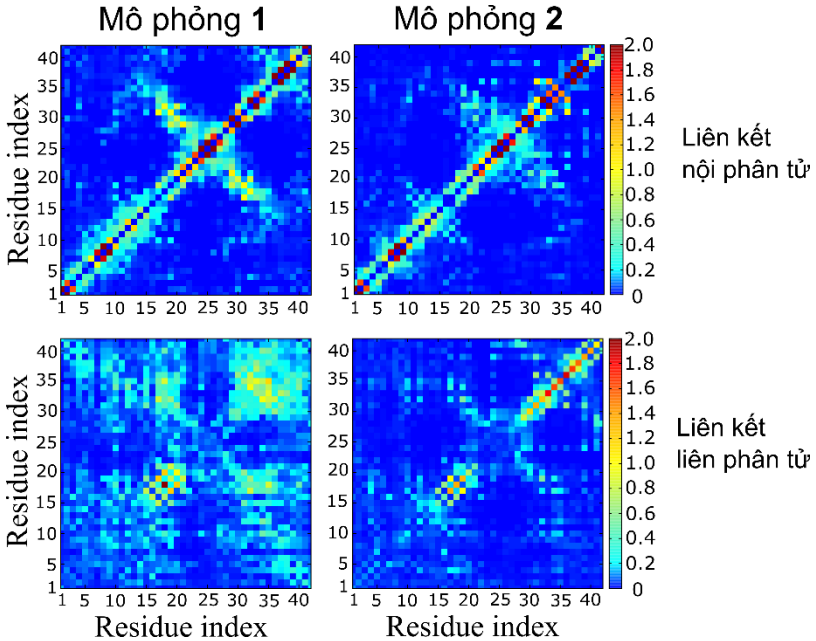
Hình 3.7: Tỷ lệ giữa SASA của các residue và amino acid tự do. Mô phỏng 1 trimer $A\beta_{42}$ (xanh lá cây); mô phỏng 2 trimer $A\beta_{42}$ (đỏ); ba chuỗi của cấu trúc 2NAO (đen)

3.2.3.3 Đuôi C của trimer $A\beta_{42}$ thu được từ mô phỏng sử dụng cấu trúc sợi làm cấu hình ban đầu là ổn định

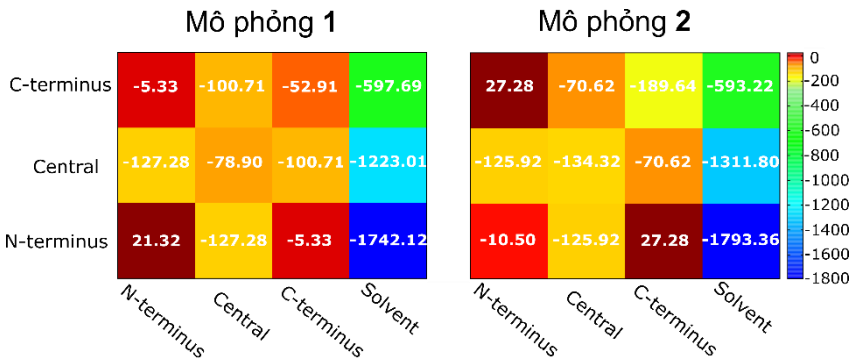
Liên kết nội phân tử xung quanh vùng turn (các residue 25–29, như thể hiện trên hình 3.8) trong mô phỏng 1 nhiều hơn trong mô phỏng 2. Tỷ lệ này đi cùng với sự gia tăng số liên kết giữa các residue trong đầu N (các residue 1–15) so với mô phỏng 2. Mặt khác, một số liên kết tầm xa trong nội bộ chuỗi và chúng ổn định hoá đuôi C như thể hiện ở mô phỏng 2 bị phá huỷ trong mô phỏng 1.

Bản đồ năng lượng tương tác phi liên kết được xây dựng cho các vùng ở những chuỗi khác nhau, bao gồm đầu N, trung tâm, đuôi C, và dung môi (Hình 3.9). Trong cả hai mô phỏng, tương tác giữa đuôi C và dung môi là yếu nhất, trong khi đầu N có tương tác với dung môi mạnh nhất. Kết quả này phù hợp với chỉ số hydrophathy của đuôi C là cao nhất, trong khi đầu N là vùng ưa nước nhất.

Tương tác giữa đầu N và các thành phần khác (Hình 3.9) tương tự ở cả hai mô phỏng REMD, gợi ý rằng cấu trúc ban đầu có ảnh hưởng không đáng kể lên hành xử của vùng đầu N. Tổng năng lượng của tương tác giữa vùng trung tâm ở các chuỗi khác nhau trong mô phỏng 2 thấp hơn ở mô phỏng 1, nhưng tương tác phi liên kết giữa vùng trung tâm và đuôi C trong 2 cao hơn trong 1.



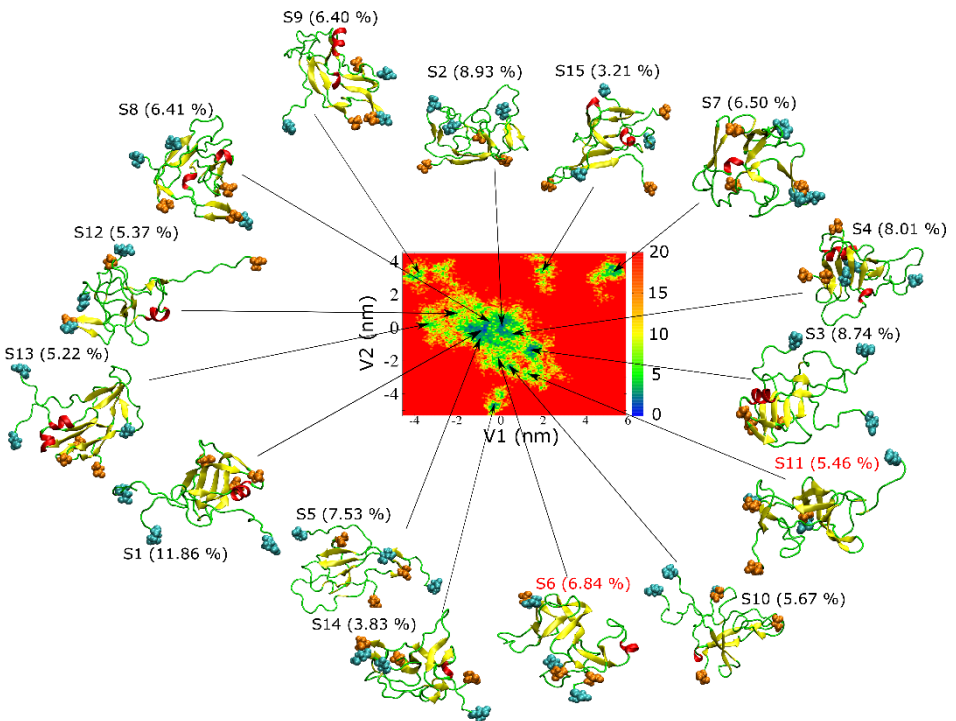
Hình 3.8: Bản đồ liên kết nội phân tử (trên) và liên phân tử (dưới) của trimer A β 42 ở $T = 300.38$ K.



Hình 3.9: Tổng năng lượng tĩnh điện và van der Waals (kcal/mol) cho các vùng của những chuỗi khác nhau và dung môi ở $T = 300.38$ K. Các số trong ngoặc là giá trị trung bình, trong khi màu thể hiện thang độ lớn.

Trong cả hai mô phỏng REMD, tương tác phi liên kết giữa vùng trung tâm và đầu N là tương đương. Tương tác đuôi C-đuôi C của các chuỗi khác nhau trong mô phỏng **2** mạnh hơn nhiều so với mô phỏng **1** (Hình 3.9). Năng lượng tương tác vdW giữa các đuôi C trong **2** là thấp nhất so với các trường hợp khác. Các kết quả này phù hợp với chỉ số hydrophathy cao nhất của đuôi C, hệ quả là tương tác với nước của đuôi C A β 42 là yếu nhất do xu hướng tự tương tác. Tóm lại, trong mô phỏng **2**, các đuôi C của cấu hình tách từ cấu trúc sợi là ổn định do tương tác mạnh giữa chúng và tương tác yếu của vùng này với nước.

3.2.3.4 Bề mặt năng lượng tự do của trimer A β 42: Sự xuất hiện motif beta barrel



Hình 3.10: Bề mặt năng lượng tự do của trimer A β 42 và các cấu trúc đại diện thu được từ mô phỏng **1**. Các residue đầu N và đuôi C được thể hiện bằng

các hình cầu màu xanh lơ và cam. $V1$ và $V2$ là hai vector riêng đầu tiên (xem phương pháp 3.4.2.2). β barrel được thể hiện ở cấu trúc S6 và S11 (màu đỏ).

Cấu trúc S6 và S11 thu được từ mô phỏng **1** (Hình 3.10) có cấu trúc dạng barrel. Số dài β barrel là 6 cho cả cấu trúc S6 và S11, trong khi số shear $S=8$ cho cluster 6 và 11. Do đó, cấu trúc S6 và S11 có chung lớp β barrel. Tuy nhiên, barrel trong cấu trúc S6 mở một phần, trong khi ở S11 là đóng. Đường kính trung bình của β barrel hình thành trong mô phỏng 1 là 12.2 ± 2.2 Å.

3.2.4 Kết luận: sự tồn tại của dạng cấu trúc thùng β trong trimer A β 42

Sử dụng mô hình tất cả nguyên tử và phương pháp REMD với hai cấu trúc ban đầu khác nhau, luận án thu được các tính chất cấu trúc của trimer A β 42. Các cấu hình trimer thu được bằng mô phỏng sử dụng cấu trúc ban đầu khác nhau, tính trung bình, tương đương nhau về hình dạng và cấu trúc bậc hai. Trimer A β 42 chủ yếu là cấu trúc không có trật tự với dạng phỏng cầu dẹt. Đuôi C kỵ nước ổn định hơn đầu N và trung tâm của peptide. Do tương tác mạnh giữa các chuỗi trong cấu trúc bó hình thành từ những đuôi C ở mô phỏng **2**, các đuôi C này không thay đổi đáng kể khi cấu hình ban đầu được lấy từ sợi. Kết quả này cho thấy đuôi C đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định hoá cấu trúc sợi hoàn chỉnh, và trong giai đoạn sau của quá trình kết tụ, khi các dạng kết tụ có hình sợi đã được thiết lập. Ngược lại, một khi bó đuôi C bị phá huỷ, bằng cách chọn cấu hình ban đầu khác như trimer A β 42 ở mô phỏng **1**, chỉ tạo từ monomer và dimer, nhiều đặc tính cấu trúc phát lộ trong quá trình mô phỏng.

3.3 Nghiên cứu về tương tác giữa dodecamer, sợi A β 42 và màng tế bào thần kinh

3.3.1 Giới thiệu

Trong phần này, luận án tập trung so sánh tương tác giữa dodecamer A β 42-một trong số oligomer có độc tính cao, sợi hoàn chỉnh A β 42 và màng. Bằng việc so sánh tương tác giữa các protein này và màng có thể góp phần giải thích tại sao oligomer có độc tính cao hơn sợi hoàn chỉnh.

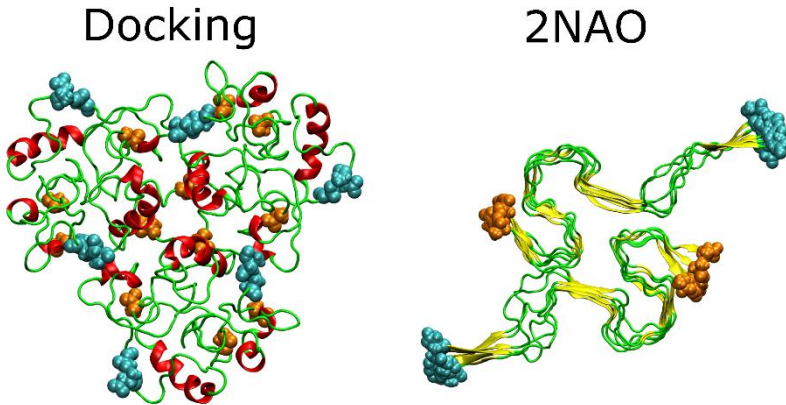
Các mô hình màng thường dùng trong mô phỏng tương tác giữa màng và A β là màng gồm 1 loại lipid. Tuy nhiên, trên thực tế màng tế bào thần kinh gồm nhiều loại lipid như DPPC, POPC, GM1, PSM, cholesterol. Do đó, trong luận án này sử dụng mô hình màng tế bào gồm 5 loại lipid: DPPC, POPC, PSM GM1, cholesterol.

Khi có mặt dodecamer A β 42, màng tế bào bị ảnh hưởng mạnh hơn khi có mặt sợi. Lực đẩy tĩnh điện giữa A β và các phân tử GM1 chỉ phối tương tác giữa A β và màng tế bào. Do thời gian mô phỏng ngắn, các sự kiện liên quan tới việc hình thành lỗ trên màng bởi A β chưa được quan sát thấy, nhưng ảnh hưởng của dodecamer và sợi lên các sự kiện đầu tiên của quá trình này được khảo sát.

3.3.2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

3.3.2.1 Đối tượng nghiên cứu

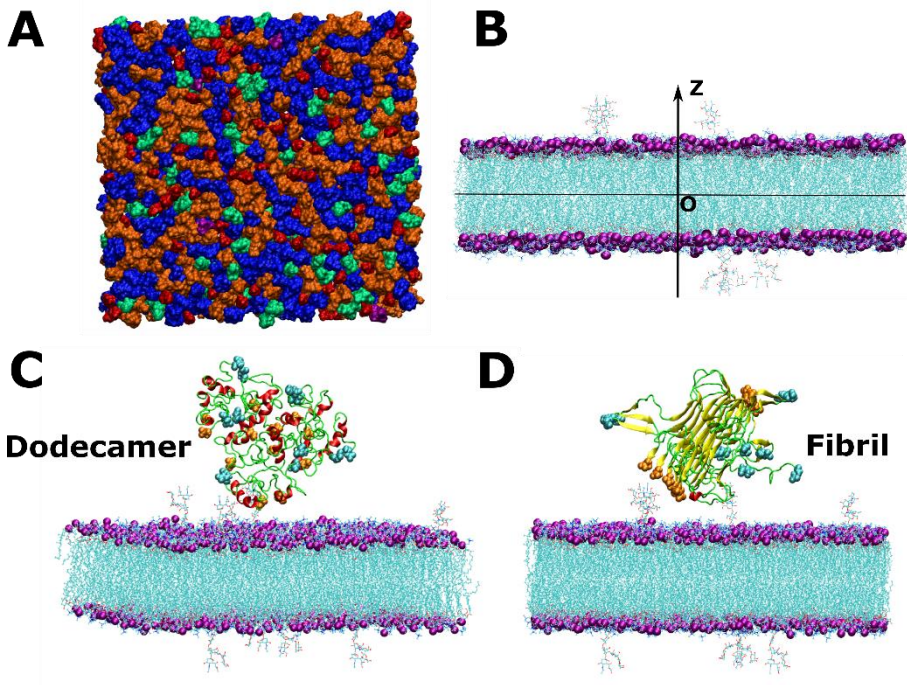
a. *Cấu trúc protein:* Các cấu trúc ban đầu của dodecamer A β 42 được tạo bằng mô phỏng docking 3 tetramer A β 42 sử dụng webserver Galaxy (<https://galaxy.seoklab.org>). Để tạo cấu trúc sợi A β 42 gồm 12 chuỗi, cấu trúc sợi với mã PDB 2NAO được nhân đôi bằng cách tịnh tiến theo trục của sợi. Cấu trúc ban đầu của dodecamer A β 42 và sợi được thể hiện ở Hình 3.11.



Hình 3.11: Cấu trúc ban đầu của dodecamer A β 42 tạo từ mô phỏng docking và sợi A β 42 tạo bằng cách nhân đôi cấu hình 2NAO. Các nguyên tử đầu N và đuôi C được biểu diễn tương ứng bằng các quả cầu màu lục lam (cyan) và màu cam.

b. *Mô hình màng tế bào thần kinh:* Để mô phỏng màng tế bào thần kinh ở bệnh nhân Alzheimer, màng lipid kép gồm năm loại lipid: DPPC-POPC-SM-CHL1-GM1 và tỉ lệ mol của các lipid này tương ứng là 36.5:35.2:9.7:17.8:0.83.13. DPPC và POPC thuộc nhóm lipid Phosphatidylcholine (PC), CHL1 là cholesterol, PSM thuộc nhóm lipid SM, và GM1 ở nhóm glycolipid.

Màng tế bào thần kinh được tạo bằng webserver CHARMM-GUI[315] với 484 phân tử lipid trên một lớp (Hình 3.12).



Hình 3.12: (A) Các phân tử lipid trong màng (góc nhìn thẳng vuông góc vào bề mặt màng), DPPC - màu xanh biển POPC - màu cam, CHL1 - màu đỏ, PSM - màu xanh lá, và GM1 - màu tím. (B) Trục z trục giao với bề mặt màng và $z=0$ ở tâm của màng. (C) Minh họa cấu hình ban đầu của phức hợp màng–dodecamer, các phân tử nước và ion được loại bỏ cho rõ ràng. Các nguyên tử P của lipid là các quả cầu tím, các nguyên tử đầu N và đuôi C của peptide A β tương ứng là các quả cầu cam và lục lam. (D) Giống như (C) nhưng cho hệ màng–sợi. Cấu trúc A β trong hình (C) và (D) thu được từ mô phỏng 500 ns trong nước.

3.3.2.2 Mô phỏng động lực học phân tử

Gói phần mềm GROMACS 2020.2 được sử dụng để tiến hành các mô phỏng MD trong phần này. Protein và màng tế bào thần kinh được tham số hoá tương ứng bởi trường lực CHARMM36m và CHARMM36. Với mô phỏng MD trong nước, cấu trúc ban đầu của dodecamer và sợi được hoà tan trong hộp dodecahedron với nước, khoảng cách nhỏ nhất giữa protein và hộp là 3 nm. Các ion được thêm vào để trung hoà hệ. Kích thước hộp tương ứng là $16.3 \times 16.3 \times 11$ nm và $16.3 \times 16.3 \times 16.3$ nm, và số nguyên tử là 306279 và 316896 tương ứng cho hệ oligomer và sợi. Các hệ phức hợp được hoà tan bởi mô hình nước TIP3P, sau đó các ion được thêm vào để trung hoà điện tích của hệ. 500 ns mô phỏng MD thông thường không có ràng buộc được tiến hành và cấu trúc ban đầu được dùng để mô phỏng tương tác giữa $A\beta$ và màng.

Cấu trúc của dodecamer và sợi thu được từ mô phỏng MD 500 ns trước đó được xoay ngẫu nhiên có được 10 cấu hình ban đầu, đặt trên màng tế bào với khoảng cách nhỏ nhất giữa dạng kết tụ $A\beta$ và màng là 15 Å (Hình 3.12). Các phức hợp $A\beta$ -màng được hoà tan trong nước TIP3P và các ion được thêm vào để trung hoà hệ. Nồng độ ion Na^+ và Cl^- là 0.15 M để tái tạo các điều kiện sinh lý. Hộp chữ nhật kích thước $16.5 \times 16.5 \times 17$ nm và $16.5 \times 16.5 \times 17$ nm, số nguyên tử là 441534 và 440253 tương ứng cho trường hợp dodecamer và sợi. Các hệ phức hợp được cực tiểu hoá năng lượng bởi thuật toán steepest descent. Sau đó, các hệ này được cân bằng lần lượt trong tập hợp thống kê NVT và NPT tại 323K và 1 atm trong tương ứng 1 ns và 5 ns. Nhiệt độ và áp suất được giữ cố định tương ứng bằng các thuật toán v-rescale và Parinello-Rahman. Nhiệt độ 323K được chọn vì nó cao hơn nhiệt độ chuyển pha của PSM ($T_M \approx 314K$), cholesterol (304.8K), GM1 (292.5K), POPC (270K), và DPPC (314K).

3.3.2.3 Modul độ nén điện tích

Modul độ nén điện tích bề mặt màng được tính từ diện tích trên một lipid A bởi phương trình $K_A = \frac{k_B T \langle A \rangle}{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2}$, ở đây $\langle A \rangle$, $\langle A^2 \rangle$, $\langle A \rangle^2$ tương ứng là trung bình của A, A^2 và bình phương trung bình của A.

3.3.2.4 Tham số trật tự chuỗi acyl

Các tham số trật tự đuôi acyl của lipid (SCD) cung cấp thông tin về mức độ trật

tự và chi tiết của các cấu hình mà nguyên tử trong đuôi lipid tạo nên. Để đánh giá ảnh hưởng của dodecamer, sợi A β 42 lên cấu hình của nguyên tử ở đuôi lipid và so sánh với thực nghiệm, các tham số trật tự được tính. Trong luận án này, các tham số SCD được tính như là độ đo cho sự định hướng linh hoạt của liên kết C-H và được định nghĩa.

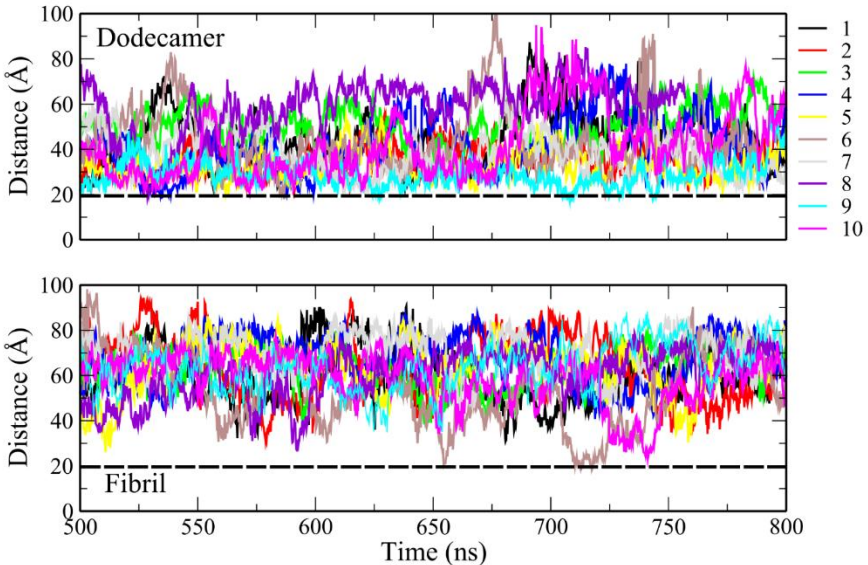
$$S_{CD} = \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle,$$

ở đây θ là góc giữa vector C-H và trục z, phụ thuộc theo thời gian, kí hiệu $\langle \quad \rangle$ biểu thị trung bình theo thời gian.

3.3.3 Kết quả và thảo luận

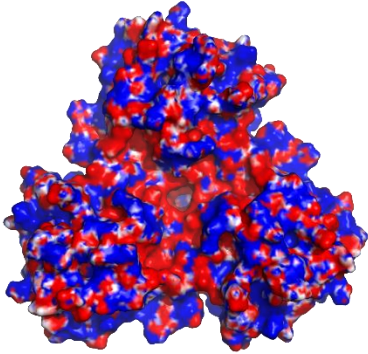
3.3.3.1 Dodecamer có thể tiếp cận màng tốt hơn sợi A β 42

Hình 4.29 thể hiện sự phụ thuộc thời gian của khoảng cách nhỏ nhất giữa A β và tâm của màng theo trục z. Trên các quỹ đạo 4, 5, 6, 7, 9, 10 của hệ dodecamer–màng lipid, nhiều sự kiện xảy ra khi oligomer vượt qua bề mặt màng lipid (khoảng cách nhỏ nhất ngắn hơn 2.06 nm, đây là một nửa độ dày màng trung bình). Ngược lại, sợi chỉ sượt qua bề mặt màng vài lần trong quỹ đạo 6 (Hình 3.13). Do đó, dodecamer A β 42 có thể tiếp cận bề mặt màng gần hơn sợi hoàn chỉnh.

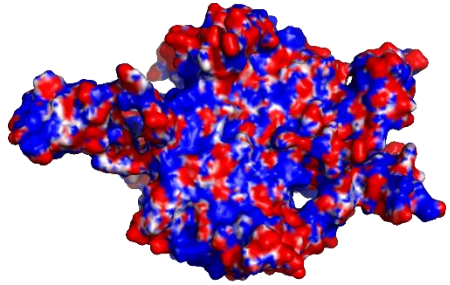


Hình 3.13: Khoảng cách theo trục z nhỏ nhất giữa protein và tâm khối của màng như hàm của thời gian. Đường nét đứt biểu diễn bề mặt màng.

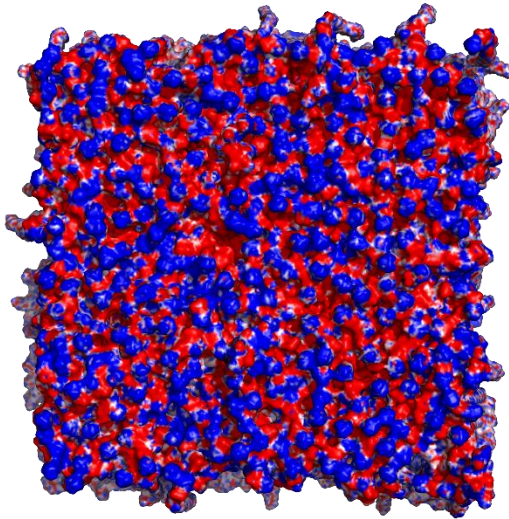
Dodecamer



Fibril



Membrane



Hình 3.14: Phân bố thế năng tĩnh điện trên bề mặt dodecamer và sợi. Thanh màu từ đỏ sang xanh nước biển tương ứng chỉ thị điện tích âm tới dương.

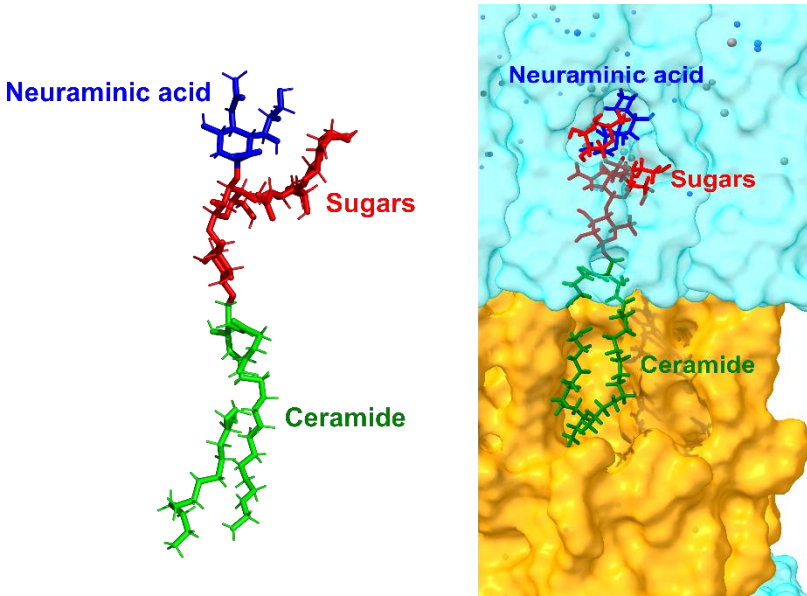
3.3.3.2 Tương tác tĩnh điện giữa $A\beta$ và màng quan trọng hơn tương tác van der Waals

Năng lượng tương tác tĩnh điện (trong khoảng 500–700 kcal/mol) mạnh hơn nhiều vdW (trong khoảng -20.0–0.0 kcal/mol) trong cả dodecamer và sợi. Năng

lượng đẩy tĩnh điện mạnh ngăn cản $A\beta$ không đi vào màng mà không có sự tái sắp xếp cấu trúc đáng kể (Hình 3.14)

3.3.3.3 $GM1$ chi phối tương tác tĩnh điện giữa $A\beta$ và màng

Để hiểu rõ hơn cơ chế phân tử đằng sau sự ổn định của $A\beta$ -màng, đóng góp của các nhóm phân tử trong lipid vào năng lượng tương tác giữa $A\beta$ và màng được đánh giá. Với cả hai trường hợp dodecamer, các phân tử DPPC, POPC và PSM có tương tác hút với $A\beta$, trong khi ở CHL1 và GM1 là tương tác đẩy. Đóng góp của GM1 chiếm ưu thế so với các nhóm khác. Sự quan trọng của GM1 trong tương tác $A\beta$ -màng cũng được chứng minh trong mô hình màng khác.



Hình 3.15: (Trái) Phân tử $GM1$ gồm acid neuraminic, ceramide và đường. (Phải) Phân tử $GM1$ trong hệ màng-dung môi, các phân tử nước được thể hiện bằng màu xanh lơ trong suốt, các lipid khác màu vàng và các quả cầu là ion.

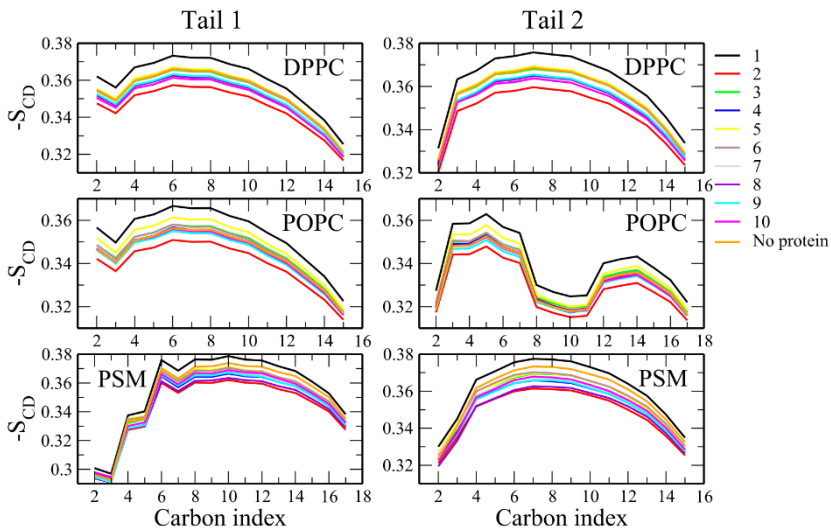
Phân tử GM1 gồm 3 nhóm bao gồm ceramide, acid neuraminic và đường (Hình 3.15). Phân tích chi tiết cho thấy các nhóm acid neuraminic acid và đường đóng góp tương đương vào lực đẩy với $A\beta$, trong khi ceramide đóng góp vào lực hút. Do đó, vì tương tác vdW là yếu, các nhóm acid neuraminic và đường, vốn nằm trong dung môi (Hình 3.15), chi phối tương tác giữa $A\beta$ và màng.

3.3.3.4 *$A\beta$ làm tăng modul nén diện tích của màng, nhưng modul uốn cong gần như không đổi*

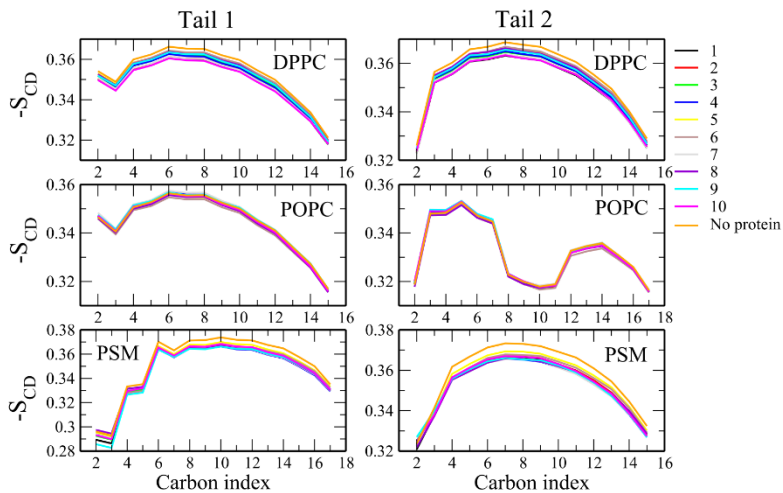
Sự có mặt của dodecamer và sợi thay đổi không đáng kể modul uốn, ở cả ba trường hợp giá trị này khoảng 10.1×10^{-20} J/m. Do đó, ở thang thời gian dùng trong mô phỏng của luận án, dodecamer $A\beta_{42}$ và sợi $A\beta_{42}$ có hiệu ứng bỏ qua được lên modul uốn của màng. Ngược lại, modul nén diện tích (KA) của màng phụ thuộc vào hệ mô phỏng. Khi không có mặt các peptide, KA là 235.99 dyn/cm, nằm trong vùng giá trị thực nghiệm 216-244 dyn/cm được báo cho các màng chứa 14–18% CHL1 và SOPC. Khi có mặt dodecamer $A\beta_{42}$ và sợi $A\beta_{42}$, KA tăng lên tương ứng 275.83 ± 29.47 và 261.57 ± 24.02 dyn/cm. Do đó, dodecamer làm thay đổi KA vốn được tính từ sự thăng giáng diện tích trên một lipid, mạnh hơn sợi $A\beta_{42}$. Kết quả này là hợp lý, vì dodecamer tiến gần tới màng hơn so với sợi (Hình 3.13), làm bề mặt màng thăng giáng yếu hơn.

3.3.3.5 *$A\beta$ có hiệu ứng nhỏ lên hệ số trật tự chuỗi acyl*

Hệ số trật tự của các nguyên tử carbon ở đuôi lipid -SCD có giá trị vào khoảng 0.3 (Hình 3.16, 3.17). Các kết quả này phù hợp với kết quả mô phỏng cho DPPC/Chol và PSM/Chol. Khi có mặt dodecamer $A\beta_{42}$, hệ số trật tự của DPPC và PSM giảm nhẹ ở tất cả các hệ. Trong khi ở trường hợp POPC, sự xuất hiện của dodecamer $A\beta_{42}$ không có ảnh hưởng gì lên hệ số trật tự. Trong trường hợp sợi $A\beta_{42}$, hệ số trật tự của lipid thay đổi ở từng hệ sợi–màng (Hình 3.17). Tuy nhiên, tính trung bình cho mọi hệ, sợi $A\beta_{42}$ không làm thay đổi hệ số trật tự của các carbon ở đuôi phân tử lipid. Mặc dù ảnh hưởng của dodecamer $A\beta_{42}$ lên hệ số trật tự của lipid mạnh hơn sợi, protein chỉ tiếp cận gần với màng làm hiệu ứng của dodecamer lên hệ số trật tự là yếu.



Hình 3.16: Hệ số trật tự của các lipid khi có mặt dodecamer $A\beta_{42}$.



Hình 3.17: Hệ số trật tự của các lipid khi có mặt sợi $A\beta_{42}$.

3.3.4 Kết luận: dodecamer $A\beta_{42}$ làm rối loạn màng tế bào thần kinh mạnh hơn sợi hoàn chỉnh

Do sự khác biệt trong phân bố điện tích trên bề mặt, dodecamer tiếp cận màng

gần hơn sợi làm biến dạng màng mạnh hơn. Mặc dù không phát hiện được cấu trúc kênh ion do thang thời gian mô phỏng ngắn, các vết nứt trên bề mặt màng rõ rệt hơn và nhiều hơn trong trường hợp dodecamer so với trường hợp sợi. Kết quả này có thể ủng hộ phát hiện thực nghiệm trong đó các oligomer có độc tính cao hơn sợi hoàn chỉnh. Nhóm acid neuraminic và các nhóm đường của lipid ganglioside GM1 nằm trong nước là tác nhân chi phối tương tác giữa $A\beta$ và màng.

3.4 Bàn luận chung về kết quả nghiên cứu

Bệnh AD là một trong những căn bệnh gây mất trí phổ biến nhất ở người lớn tuổi. Mặc dù đã được nghiên cứu nhiều năm, nguyên nhân và cơ chế gây AD hiện vẫn chưa được xác định rõ ràng. Trong số các giả thuyết phổ biến nhất về nguyên nhân và cơ chế gây bệnh AD, giả thuyết amyloid cascade được ủng hộ nhiều nhất bởi các bằng chứng thực nghiệm. Trong giả thuyết này, sự tích tụ quá mức các peptide amyloid β , vượt khả năng đào thải của cơ thể là nguyên nhân gây ra AD. Trong số các biến thể của peptide amyloid β , $A\beta_{1-42}$ là biến thể được xác định có khả năng gây độc tế bào thần kinh mạnh nhất, làm mất cân bằng ion thông qua việc làm thủng màng tế bào, là thành phần chính trong các mảng bám amyloid β ngoại bào gồm các sợi $A\beta$. Các peptide amyloid β nói chung và $A\beta_{42}$ nói riêng thuộc lớp các protein không có cấu trúc xác định và có khả năng tự tập hợp tạo thành các dạng tổ chức bậc cao. Trong đó, dạng kết tụ hoà tan được là oligomer có khả năng gây độc tính thần kinh mạnh nhất và là đối tượng chính trong giả thuyết amyloid cascade hiện nay. Các oligomer gồm từ 2–50 peptide $A\beta$ và không có cấu trúc xác định, điều này khác biệt với sợi $A\beta$ hoàn chỉnh vốn sắp xếp dạng phiến β vuông góc với trục của sợi. Vì vai trò quan trọng của oligomer trong AD, việc xác định các đặc tính cấu trúc, tính chất hoá lý, lý do cho khác biệt giữa oligomer và sợi hoàn chỉnh cũng như tương tác của chúng với màng tế bào đóng vai trò tối quan trọng trong cơ chế gây AD theo giả thuyết amyloid cascade.

Từ các lí do trên, luận án tập trung nghiên cứu cấu trúc của các oligomer $A\beta_{42}$ bậc thấp gồm tetramer, trimer $A\beta_{42}$. Các oligomer này nằm trong số các dạng kết tụ có độc tính cao, số lượng nguyên tử không lớn, và là cơ sở để tiếp nhận thêm các monomer để hình thành oligomer bậc cao hơn. Mặc dù có kích thước nhỏ, việc mô phỏng tetramer $A\beta_{42}$ bằng mô hình tất cả nguyên tử mà vẫn đảm

bảo khả năng lấy mẫu hiệu quả trong không gian cấu hình là thách thức lớn. Do đó, nhóm nghiên cứu sử dụng mô hình hạt thô UNRES và phương pháp REMD. Bằng việc phân nhóm, các cấu hình đặc trưng từ mô phỏng hạt thô tiếp tục được mô phỏng trong mô hình tất cả nguyên tử với mẫu nước tường minh nhằm đánh giá tính ổn định. Các tính chất hoá lý, dạng hình học của tetramer $A\beta 42$ thu được phù hợp tốt với thực nghiệm. Từ các kết quả trên, sự khác biệt cấu trúc và phân bố điện tích, momen lưỡng cực giữa tetramer và sợi $A\beta 42$, luận án đề xuất một mô hình đơn giản để giải thích quá trình kết tụ của amyloid beta, trả lời nguyên nhân tại sao các oligomer có dạng cầu, không có cấu trúc xác định trong khi đó, sợi hoàn chỉnh có dạng giả 1 chiều, các phiến beta xếp vuông góc với trục của sợi. Luận án chỉ ra rằng, ở giai đoạn đầu của quá trình kết tụ, các monomer trong oligomer sắp xếp để tối ưu lực hút van der Waals và cực tiểu lực đẩy tĩnh điện giữa các monomer vì chúng có cùng điện tích âm. Khi số monomer trong oligomer tăng lên, lực đẩy tĩnh điện chiếm ưu thế do sự suy giảm bậc một theo khoảng cách, chậm hơn sự suy giảm theo bậc sáu của khoảng cách trong tương tác van der Waals. Từ đó, các monomer trong các thể kết tụ bậc cao này phải sắp xếp theo 1 chiều, điều này làm giảm lực đẩy tĩnh điện nhưng tối ưu lực hút gần của tương tác van der Waals. Như vậy, cấu trúc dạng sợi giả 1 chiều là dạng cấu hình tối ưu, bền vững khi số monomer lớn như trong sợi hoàn chỉnh. Cấu trúc tetramer thu được đã bắt đầu được cộng đồng nghiên cứu sử dụng như trong tính toán tương tác giữa Thioflavin-T và $A\beta$.

Các nghiên cứu trước đây khi khảo sát cấu trúc của oligomer bậc thấp thường lấy cấu hình sợi hoàn chỉnh làm cấu trúc ban đầu. Điều này đặt ra vấn đề rằng liệu việc chọn cấu hình sợi làm cấu trúc ban đầu có ảnh hưởng tới kết quả mô phỏng. Trong luận án này, nhóm nghiên cứu tiến hành hai mô phỏng REMD cho trimer $A\beta 42$ sử dụng cấu trúc ban đầu khác nhau, tạo ngẫu nhiên từ docking và cấu trúc sợi $A\beta 42$ với mô hình tất cả nguyên tử và phân tử nước tường minh. Kết quả cho thấy ở cả hai mô phỏng, trimer $A\beta 42$ chủ yếu ở dạng cấu trúc không xác định, phù hợp với kết quả thực nghiệm cho oligomer. Tuy nhiên, mô phỏng trimer sử dụng cấu trúc sợi làm cấu hình ban đầu cho thấy đuôi C của $A\beta 42$ rất ổn định, khó bị phá vỡ trong suốt quá trình mô phỏng. Điều này cho thấy khi dùng cấu trúc sợi làm cấu hình ban đầu, tính bền vững của đuôi C làm cấu trúc oligomer vẫn giữ các đặc tính của sợi hoàn chỉnh, vốn không phù hợp với tính chất của oligomer. Ngoài ra, khi dùng cấu hình trimer

$A\beta_{42}$ thu được từ docking làm cấu hình ban đầu, cấu trúc thùng β xuất hiện tự phát trong quá trình mô phỏng. Đây là lần đầu tiên quan sát thấy cấu trúc dạng này xuất hiện trong mô phỏng. Trước đó, các nghiên cứu mô phỏng trên thùng β của $A\beta$ sử dụng dạng thùng β tạo sẵn để làm cấu hình ban đầu. Các kết quả này cho thấy sự khác biệt rõ rệt trong việc lựa chọn cấu trúc ban đầu cho mô phỏng oligomer $A\beta$. Từ đó, các nghiên cứu trong tương lai cần chú ý tới ảnh hưởng của cấu trúc ban đầu lên kết quả.

Một trong các cơ chế gây độc tế bào thần kinh là khả năng các peptide $A\beta$ làm thủng màng tế bào thần kinh, dẫn tới các ion Ca^{2+} đi vào tế bào, kết quả kích hoạt quá trình chết theo lập trình của tế bào. Vì oligomer được xác định có độc tính cao hơn sợi hoàn chỉnh, điều này có thể liên quan tới khả năng tạo lỗ mạnh hơn của oligomer so với sợi. Trong luận án này, mô phỏng MD cho tương tác giữa dodecamer, sợi $A\beta_{42}$ và màng tế bào ở bệnh nhân AD được tiến hành. Kết quả cho thấy cả dodecamer và sợi $A\beta_{42}$ đều không thể đi xuyên vào màng và tạo lỗ. Điều này là do thời gian mô phỏng chưa đủ dài, chỉ đủ để theo dõi các sự kiện ban đầu của quá trình tiếp xúc màng tế bào của $A\beta$. Lực đẩy tĩnh điện giữa $A\beta$ và các phân tử GM1 trong màng tế bào làm cho oligomer và sợi $A\beta_{42}$ không thể xuyên vào màng. Mặc dù vậy, sự hiện diện của dodecamer $A\beta_{42}$ có tác động mạnh lên màng tế bào thần kinh hơn sợi hoàn chỉnh. Điều này cho thấy kết quả nghiên cứu đã phần nào làm sáng tỏ tại sao oligomer $A\beta_{42}$ có khả năng gây độc tế bào thần kinh cao hơn so với sợi hoàn chỉnh.

Kết quả nghiên cứu của luận án đã đóng góp cho sự phát triển lĩnh vực khoa học tính toán trong nghiên cứu quá trình cuộn và tương tác với màng tế bào của peptide amyloid β đối với Viện Khoa học công nghệ và tính toán–Sở Khoa học và công nghệ TP. Hồ Chí Minh, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh nói riêng và Việt Nam nói chung, cũng như cộng đồng khoa học vật lý sinh học tính toán thế giới. Kết quả nghiên cứu cũng góp phần cho việc đào tạo nhận lực ở Việt Nam, mở ra hướng nghiên cứu mới cho sinh viên, thạc sỹ, nghiên cứu sinh và các nhà nghiên cứu trong lĩnh vực khoa học tính toán.

4. KẾT LUẬN

🚩 Các kết quả và đóng góp khoa học chính của luận án

Luận án trình bày một số kết quả mới thu được như sau:

- Bằng cách kết hợp mô hình hạt thô UNRES và phương pháp replica

exchange, nhóm nghiên cứu mô phỏng quá trình cuộn của tetramer A β 42. Các cấu trúc tetramer A β 42 thu được sau khi mô phỏng đạt cân bằng được tiếp tục mô phỏng bằng mô hình tất cả nguyên tử ở nhiệt độ phòng. Kết quả cho thấy tetramer A β 42 có dạng phỏng cầu dẹt, chủ yếu ở dạng mất trật tự. Ngoài ra, mật độ các phân tử nước trong tetramer A β 42 lớn hơn trong sợi hoàn chỉnh. Kết quả này cho thấy sự tái sắp xếp cấu trúc oligomer xảy ra trong quá trình hình thành sợi hoàn chỉnh từ oligomer.

- Về mặt phương pháp tính toán, luận án đưa ra quy trình mô phỏng cho oligomer kết hợp mô hình hạt thô và phương pháp replica exchange để cải thiện khả năng lấy mẫu trong không gian cấu hình, sau đó kiểm tra tính ổn định bằng mô hình tất cả nguyên tử. Quy trình này cho phép giảm yêu cầu tài nguyên mô phỏng trong khi vẫn giữ được độ tin cậy của các kết quả. Về mặt phương pháp luận, luận án đề xuất 1 giả thuyết về lí do tại sao oligomer có dạng phỏng cầu còn sợi hoàn chỉnh ở dạng kết tụ giả 1 chiều.

- Luận án xác định được ảnh hưởng của sự lựa chọn cấu trúc ban đầu lên mô phỏng cấu trúc trimer A β 42. Khi dùng cấu trúc sợi làm cấu hình trimer ban đầu, kết quả thu được cho thấy cấu trúc phiến β ở đuôi C bền vững, ít thay đổi trong quá trình mô phỏng. Điều này cho thấy vai trò ổn định hoá cấu trúc của đuôi C trong giai đoạn cuối của quá trình tạo sợi. Khi dùng cấu trúc trimer ngẫu nhiên tạo từ docking làm cấu hình ban đầu cho mô phỏng, dạng β barrel-cấu trúc đặc biệt thường hiện diện trong kênh dẫn xuyên màng xuất hiện tự phát trong trimer A β 42. Ngoài ra, các lỗ với kích thước đủ lớn cho ion đi qua trong trimer A β 42 cho thấy oligomer có thể đóng vai trò như kênh ion.

- Luận án chứng minh được trong các sự kiện ban đầu của quá trình tương tác A β -màng, dodecamer có ảnh hưởng mạnh lên màng tế bào thần kinh hơn sợi hoàn chỉnh. Lực đẩy tĩnh điện giữa các phân tử GM1 trong màng và A β chi phối tương tác giữa màng và A β . Sự linh hoạt cao hơn trong khả năng sắp xếp cấu trúc của dodecamer so với sợi cho phép dodecamer giảm lực đẩy tĩnh điện, tiếp cận màng tế bào gần hơn sợi hoàn chỉnh.

Hướng phát triển của luận án

Giả thuyết amyloid cascade cho rằng oligomer của A β 42 đóng vai trò trung tâm trong cơ chế gây bệnh Alzheimer. Mặc dù có vai trò quan trọng, cấu trúc oligomer chưa thể xác định bằng các phương pháp thực nghiệm. Vì vậy, mô phỏng động lực học phân tử là công cụ hữu hiệu trong việc xác định các đặc

tính cấu trúc của oligomer, từ đó, góp phần làm rõ quá trình kết tụ các peptide A β cũng như tương tác của chúng với những phân tử sinh học khác. Bằng công cụ tính toán mô phỏng động lực học phân tử. Nhóm nghiên cứu đã xác định được cấu trúc của hai oligomer bậc thấp, mang độc tính cao là trimer và tetramer A β 42. Ngoài ra, các sự kiện ban đầu của tương tác giữa dodecamer, sợi A β 42 và màng tế bào thần kinh cũng được mô phỏng. Nói chung, nghiên cứu nhằm xác định cấu trúc oligomer của A β 42 và khả năng ảnh hưởng của oligomer lên màng tế bào thần kinh.

Định hướng phát triển của luận án có thể là, *thứ nhất*, đánh giá ảnh hưởng của cấu trúc β -barrel tạo bởi oligomer A β lên màng tế bào cũng như khả năng tạo kênh dẫn ion xuyên màng tế bào là một chủ đề lý thú cho các nghiên cứu tiếp theo. *Thứ hai*, quy trình mô phỏng đa kích thước từ mô hình hạt thô UNRES cho tới mô hình tất cả nguyên tử áp dụng thành công cho tetramer A β 42 có thể dùng làm nền tảng cho các nghiên cứu về oligomer bậc cao của A β hoặc các protein có tính chất tương tự amyloid beta. Từ các cấu trúc thu được trong luận án, đây có thể là mô hình mục tiêu đại diện oligomer bậc thấp cho nghiên cứu các hợp chất có khả năng ức chế quá trình kết tụ amyloid beta, hoặc đóng vai trò là các tiểu đơn vị tạo nên cấu trúc ban đầu của oligomer A β bậc cao hơn cho những nghiên cứu về các dạng kết tụ A β 42. *Thứ ba*, cấu trúc tetramer A β 42 thu được trong luận án là cấu trúc ở trong nước tại pH 7.5. Quá trình cuộn của A β 42 có thể rất khác biệt trong các dung môi, độ pH khác hoặc trên bề mặt tiếp xúc nước–màng tế bào. Vì vậy, sử dụng quy trình mô phỏng cho tetramer A β 42 trong nước ở pH 7.5 và mở rộng cho các điều kiện môi trường khác là vấn đề đáng quan tâm cho những nghiên cứu trong tương lai. *Thứ tư*, việc xác định giới hạn số monomer mà các thể kết tụ bắt đầu chuyển từ dạng phỏng cầu sang dạng giả 1 chiều như sợi hoàn chỉnh cũng là một vấn đề lý thú cho các nghiên cứu tiếp theo về quá trình kết tụ amyloid. *Thứ năm*, Do điều kiện tính toán hạn chế, luận án mới chỉ thu được các sự kiện đầu tiên trong quá trình tương tác giữa oligomer, sợi và màng. Các mô phỏng trong luận án còn để lại khoảng trống giữa sự kiện tương tác ban đầu và cơ chế phân tử của sự thủng màng tế bào gây bởi A β vốn được phát hiện bởi thực nghiệm. Từ đó, việc kéo dài thang thời gian mô phỏng cũng như khả năng lấy mẫu không gian pha so với các mô phỏng trong luận án là vấn đề đáng quan tâm cho các nghiên cứu trong tương lai nhằm thu được các thông tin về khả năng làm thủng màng tế bào của A β .

DANH MỤC CÔNG TRÌNH PHỤC VỤ CHO LUẬN ÁN

Tạp chí quốc tế

1. **Nguyen Hoang Linh**, Huynh Quang Linh, Pawel Krupa, Giovanni La Penna, and Mai Suan Li, “Amyloid beta dodecamer disrupts the neuronal membrane more strongly than mature fibril: Understanding the role of oligomers in neurotoxicity,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 126, pp. 3659-3672, 2022.
2. **Nguyen Hoang Linh**, Huynh Quang Linh, Paolo Matteini, Giovanni La Penna, and Mai Suan Li, “Emergence of Barrel Motif in Amyloid- β Trimer: A Computational Study,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 124, pp. 10617-10631, 2020.
3. **Nguyen Hoang Linh**, Pawel Krupa, Nguyen Minh Hai, Huynh Quang Linh and Mai Suan Li., "Structure and Physicochemical Properties of the A β 42 Tetramer: Multiscale Molecular Dynamics Simulations", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 123, no. 34, pp. 7253-7269, 2019.