

**Міністерство освіти і науки України**  
**Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна**

На правах рукопису

**ТРУСОВА ВАЛЕРІЯ МИХАЙЛІВНА**

УДК 577.352.335.152

**БІЛОК-ЛІПІДНІ ВЗАЄМОДІЇ ЯК МОДУЛЯТОР АГРЕГАЦІЙНОЇ  
ПОВЕДІНКИ БІЛКІВ**

03.00.02 – біофізика

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
доктора фізико-математичних наук

Науковий консультант:  
**Горбенко Галина Петрівна,**  
доктор фізико-математичних наук,  
професор

**Харків – 2016**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	7
ВСТУП.....	11
РОЗДІЛ 1. АГРЕГАЦІЯ БІЛКІВ У ЛІПІДНОМУ ОТОЧЕННІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) .....	21
1.1. Молекулярні основи процесу агрегації білків .....	24
1.2. Структура та механізми утворення амілоїдних фібрил .....	26
1.3. Моделі утворення фібрилярних агрегатів .....	31
1.4. Фізичні властивості амілоїдних фібрил.....	41
1.5. Рідинно-кристалічна поведінка амілоїдів: ізотропно-нематичний фазовий перехід .....	45
1.6. Молекулярні детермінанти мембрано-опосередкованої фібрилізації білків... 48	
1.6.1. Роль електростатики у мембрано-опосередкованій агрегації білків .....	51
1.6.2. Гідрофобний ефект як рушійна сила агрегації білків .....	52
1.6.3. Водневі зв'язки як детермінант агрегаційної здатності білка .....	54
1.7. Біомедичні та біотехнологічні застосування амілоїдів .....	56
1.7.1. Амілоїдні фібрили як біоактивні матриці для інжинірингу клітин .....	57
1.7.2. Нові системи доставки ліків на основі амілоїдів .....	59
1.7.3. Розробка металевих нанопроводів та біосенсорів.....	60
1.8. Короткі висновки до Розділу 1 .....	61
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	62
2.1. Матеріали .....	62
2.2. Формування моношарів Ленгмюра .....	63
2.3. Формування бішарів на підложці .....	63
2.4. Формування ліпосом.....	63
2.5. Ковалентне мічення лізоциму флуоресцентними мітками.....	64
2.6. Приготування амілоїдних фібрил лізоциму та аполіпопротеїну А-I.....	65
2.7. Флуоресцентні вимірювання та первинна обробка даних.....	66
2.7.1. Дослідження зв'язування АБМ, Тіофлавіну Т та SQ-1 з фібрилярним лізоцимом .....	66

2.7.2. Перенос енергії у донорно-акцепторних парах триптофан-пірен, пірен-флуоресцеїн та флуоресцеїн-родамін .....	67
2.7.3. Часороздільний ІРПЕ.....	68
2.7.4. ІРПЕ з пульсовим затриманим збудженням.....	68
2.7.5. Флуоресцентна мікроскопія повного внутрішнього відбиття.....	69
2.7.6. Дослідження спектральних відгуків пірену, ДФГТ та Лаурдану .....	69
2.7.7. Аналіз зв'язування Продану, ДМХ та МБА з ліпосомами.....	70
2.7.8. Гасіння власної флуоресценції мутантів аполінопротеїну A-I.....	72
2.7.9. Асоціація цитохрому c з ліпідними везикулами .....	72
2.8. Трансмисійна електронна та атомно-силова мікроскопія.....	74
2.9. Молекулярно-динамічне моделювання .....	74
2.10. Методи чисельного моделювання та обробки даних .....	75
2.11. Короткі висновки до Розділу 2 .....	76
<b>РОЗДІЛ 3. РОЗВИТОК НОВИХ ПІДХОДІВ ДО АНАЛІЗУ АГРЕГАЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БІЛКІВ У ВОДНОМУ ТА ЛІПІДНОМУ ОТОЧЕННІ .....</b>	<b>77</b>
3.1. Флуоресцентне визначення структурних параметрів амілоїдних фібрил .....	78
3.2. Аналіз агрегаційної поведінки лізоциму в ліпідному оточенні за даними внутрішньо- та міжмолекулярного переносу енергії .....	90
3.2.1. Внутрішньомолекулярний перенос енергії з залишків триптофану на пірен.....	90
3.2.2. Перенос енергії між білковими мітками пірен – флуоресцеїн та флуоресцеїн – родамін .....	92
3.2.3. Дослідження процесу олігомеризації лізоциму за допомогою часороздільного ІРПЕ.....	93
3.3. Дослідження лізоцим-ліпідних систем методом флуоресцентної мікроскопії повного внутрішнього відбиття.....	110
3.4. Короткі висновки до Розділу 3 .....	121
<b>РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ФІБРИЛЯРНИХ ІНТЕРМЕДІАТІВ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІПІДНОГО БІШАРУ .....</b>	<b>123</b>
4.1. Мембранні ефекти префібрилярних інтермедіатів лізоциму .....	124

4.1.1. Дослідження модифікації ліпідного бішару за допомогою пірену та ДФГТ.....	124
4.1.2. Дослідження впливу олігомерного лізоциму на полярну область ліпідного бішару за допомогою Продану та ДМХ .....	131
4.2. Вплив префібрилярних інтермедіатів N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I на структурно-динамічні властивості ліпідного бішару .....	143
4.2.1. Визначення параметрів зв'язування та локалізації мутантів apoA-I 83 у ліпідному бішарі .....	145
4.2.2. Вплив apoA-I 83 на фізико-хімічні властивості ліпідного бішару.....	161
4.3. Модифікація структури ліпідних мембран під дією цитохрому c .....	163
4.3.1. Гіпотетична модель структурних змін ліпідного бішару, викликаних цитохромом c .....	187
4.4. Короткі висновки до Розділу 4. ....	192
<b>РОЗДІЛ 5. АМІЛОЇДНІ ФІБРИЛИ ЯК ОСОБЛИВИЙ КЛАС</b>	
<b>МЕМБРАНОТРОПНИХ АГЕНТІВ .....</b>	<b>193</b>
5.1. Загальна характеристика амілоїдних агрегатів лізоциму та apoA-I 83. ....	193
5.2. Мембранні ефекти фібрилярних агрегатів лізоциму .....	197
5.2.1. Дослідження сорбції амілоїдних фібрил лізоциму на моношарах Ленгмюра.....	197
5.2.2. Моделювання адсорбції білків на поверхні ліпідного моношару .....	203
5.2.3. Вплив фібрилярних білкових агрегатів на неполярну зону ліпідного бішару.....	210
5.2.4. Зміни фізико-хімічних властивостей полярної зони мембрани під дією амілоїдних фібрил лізоциму .....	216
5.2.5. Амілоїдні фібрили як конкурентний ліганд для мембранних білків .....	222
5.3. Модифікація фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару під дією амілоїдних фібрил фрагментів apoA-I .....	232
5.3.1. Спектральні властивості пірену в системі ліпосоми+амілоїдні фібрили apoA-I 83.....	232
5.3.2. Вплив варіантів apoA-I на полярну область мембрани .....	234

5.4. Короткі висновки до Розділу 5 .....	238
РОЗДІЛ 6. СТРУКТУРНА МОДИФІКАЦІЯ ФІБРИЛЯРНИХ АГРЕГАТІВ БІЛКІВ НА ЛІПІДНІЙ МАТРИЦІ .....	240
6.1. Поліморфізм амілоїдних структур фрагменту апоА-I 83. ....	241
6.2. Механічні властивості фібрилярних агрегатів фрагменту апоА-I .....	247
6.3. Реструктуризація амілоїдних фібрил на ліпідному бішарі .....	252
6.4. Короткі висновки до Розділу 6 .....	265
РОЗДІЛ 7. МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСУ АГРЕГАЦІЇ МЕМБРАНО-ЗВ'ЯЗАНИХ БІЛКІВ .....	266
7.1. Електростатично-контрольована адсорбція білків на поверхні ліпідного бішару: моделювання агрегаційної поведінки адсорбату .....	266
7.1.1. Загальна форма ізотерм адсорбції при утворенні агрегатів білка .....	267
7.1.2. Вплив заряду білка та мембрани на поведінку кривих адсорбції .....	271
7.1.3. Поведінка ізотерм зв'язування в залежності від рН та іонної сили розчину .....	276
7.1.4. Порівняння з експериментальними результатами .....	279
7.2. Комп'ютерні підходи до ідентифікації агрегаційних ділянок поліпептидного ланцюга .....	284
7.2.1. Загальна характеристика методів прогнозування амілоїдогенних ділянок поліпептидного ланцюга .....	285
7.2.2. Прогнозування амілоїдогенного потенціалу білків .....	287
7.3. Моделювання процесу зв'язування амілоїдних фібрил з мембраною .....	294
7.3.1. Моделювання амілоїдних фібрил пептидів .....	295
7.3.2. Моделювання взаємодії амілоїдних фібрил з мембранами .....	299
7.4. Дослідження конформаційних змін білкових молекул на ліпідній матриці методом молекулярної динаміки .....	306
7.4.1. Молекулярна динаміка лізоцим-ліпідних систем .....	307
7.4.2. Дослідження амілоїдогенного потенціалу цитохрому с у мембранному оточенні .....	317

7.4.3. Амілоїдогенні властивості N-термінального фрагменту аполіпопротеїну A-I: вплив мутації та ліпідного оточення.....	321
7.5. Короткі висновки до Розділу 6 .....	327
ВИСНОВКИ.....	330
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	334
ДОДАТОК А. Моделі адсорбції білків на поверхні ліпідного бішару.....	386

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

$A$	поглинання
$\alpha_i$	амплітуда, яка визначає внесок компоненти з часом життя $\tau_i$ у криву затухання
$\alpha_D, \alpha_A$	кути, утворені $D_x$ і $A_x$ та $N$ , відповідно
$a_L, a_P$	молярна флуоресценція зонду, зв'язаного із ліпосомами чи білком, відповідно, $M^{-1}$
$B, B_c$	концентрації зв'язаного білка, розраховані з експериментальних даних та шляхом чисельного розв'язання системи рівнянь, що описують певну модель адсорбції, відповідно, мкМ
$C_a^s$	поверхнева концентрація акцепторів, $nm^{-2}$
$c$	молярна концентрація моновалентних іонів, мМ
$d_a$	відстань між площиною донорів та акцепторів, нм
$d_c$	відстань між площиною донорів та центром бішару, нм
$d_f$	фрактальна розмірність
$d_t$	відстань між площинами акцепторів, нм
$d_D, d_A$	аксіальні деполяризаційні фактори донору та акцептору
$D_x, A_x$	осі конусів, у межах яких симетрично розподілені моменти переходу випромінювання донора та поглинання акцептора
$\varepsilon$	молярний коефіцієнт екстинкції, $M^{-1} cm^{-1}$
$E$	ефективність переносу енергії
$\varepsilon_A(\lambda)$	спектр поглинання акцептора, $M^{-1} cm^{-1}$
$\varepsilon_r$	діелектрична стала
$f_A$	молярна частка аніонних ліпідів
$\phi_i$	час обертальної кореляції флуорофору $i$ , нс
$F_D(\lambda)$	спектр випромінювання донора
$\Phi$	частка площі поверхні бішару, зайнятої білком

$F$	концентрація вільного білка, мкМ
$F_{el}^S, F_{el}^P$	електростатична вільна енергія мембрани та білка, відповідно, кДж/моль
$\phi_{DA}$	двогранний кут між площинами $(D, R_{DA})$ та $(A, R_{DA})$
$\Phi_{DA}$	кут між площинами, які містять осі конусів $D_x$ чи $A_x$ та вектор $R_{DA}$
$\sigma$	поверхнева густина заряду мембрани, Кл $\times$ м $^{-2}$
$\gamma$	коефіцієнт активності
$I$	інтенсивність флуоресценції, відн. од.
$J$	інтеграл перекривання спектра випромінювання донора зі спектром поглинання акцептора, М $^{-1}$ см $^3$
$k_{corr}$	коефіцієнт корекції на ефекти реабсорбції та внутрішнього фільтру
$K_{SV}$	константа Штерна-Фольмера, М $^{-1}$
$\kappa^2$	орієнтаційний фактор
$K_a$	константа асоціації лізоциму з ліпідним бішаром, М $^{-1}$
$K_{el}$	електростатична складова $K_a$
$K_0$	неелектростатична складова $K_a$ , М $^{-1}$
$k_B$	константа Больцмана, Дж $\times$ К $^{-1}$
$\kappa_d$	обернена довжина Дебая, нм $^{-1}$
$K_{PL}, K_{PP}$	коефіцієнти розподілу зонду в ліпідну та білкову фази, відповідно
$L$	загальна концентрація ліпіду, мкМ чи мМ
$L_a$	концентрація ліпіду, доступного для зв'язування білка, мкМ
$l_p$	персистентна довжина фібрили
L:P	молярне співвідношення ліпід:білок
$\lambda$	довжина хвилі, нм
$\lambda_D = t/\tau_D$	безрозмірний час життя донору



$N$	вектор нормалі до ліпідного бішару
$N_e$	число експериментальних точок
$P$	загальна концентрація білка, мкМ
$[Q]$	концентрація гаснику, М
$Q_i$	квантовий вихід флуорофору $i$ , відн.од.
$r$	анізотропія
$r_\infty$	залишкова анізотропія
$R_0$	радіус Фьорстера, нм
$R_{DA}$	відстань між донором та акцептором, нм
$S_L$	середня площа на ліпідну молекулу, нм <sup>2</sup>
$\tau_i$	час життя збудженого стану флуорофору $i$ , нс
$< \tau >$	усереднений час життя триптофанових залишків молекули лізоциму, нс
$T$	температура, К
$\theta_D, \theta_A$	кути між моментами переходу випромінювання донора ( $D$ ) або поглинання акцептора ( $A$ ) та вектором $R_{DA}$ , що з'єднує молекули донора і акцептора
$\Theta_D, \Theta_A$	кути між осями $D_x$ й $A_x$ та вектором $R_{DA}$
$V_L, V_P$	об'єми ліпідної та білкової фаз, відповідно, нм <sup>3</sup>
$Z_f, Z_L, Z_P$	концентрації вільного або зв'язаного з ліпідами чи білком зонду, відповідно, мкМ
$Z_{tot}$	загальна концентрація флуорофору, мкМ
$z$	ефективний заряд білка
$z_a$	ступінь олігомеризації білка
$\psi_s$	поверхневий електростатичний потенціал ліпідного бішару, мВ
AB-ФХ	антрілвініл-фосфатидилхолін
AB-КЛ	антрілвініл-кардіоліпін

апоА-I 83	N- термінальний фрагмент аполіпопротеїну А-I (залишки 1-83)
АСМ	атомно-силова мікроскопія
ДФГТ	діфенілгексатрієн
ДМХ	діметіламінохалкон
ЗС	закручена стрічка
ІРПЕ	індуктивно-резонансний перенос енергії
ІРПЕ-ІЗЗ	мономолекулярний ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням
КЛ	кардіоліпін
МБА	3-метоксібензантрон
СС	спіральна стрічка
ТМЧ	теорія масштабованих частинок
ТЕМ	трансмісійна електронна мікроскопія
ФГ	фосфатидилгліцерин
ФС	фосфатидилсерін
ФХ	фосфатидилхолін
Хол	холестерин
чрІРПЕ	часороздільний ІРПЕ

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Дослідження молекулярних механізмів агрегації біологічних макромолекул, зокрема, білків, є одним із фундаментальних напрямків сучасної біофізики [1,2]. Міжмолекулярні нековалентні взаємодії між білковими молекулами призводять до формування широкого спектру надмолекулярних ансамблів, структура яких коливається від неупорядкованих аморфних агрегатів до кристалів із чітко визначеною трансляційною симетрією у трьох напрямках. В останні десятиріччя невпинно зростаюча увага вчених прикута до дослідження процесу одномірної кристалізації білків та пептидів з утворенням високоупорядкованих фібрилярних структур, які зветься амілоїдами [3-5]. Ці агрегати являють собою лінійні  $\beta$ -складчасті ансамблі мономерних субодиниць із трансляційною симетрією у повздовжньому напрямку, структура яких стабілізується, головним чином, мережею водневих зв'язків [1,6,7]. В останні десятиріччя цьому класу білкових агрегатів приділяється зростаюча увага, що обумовлюється, щонайменше, двома факторами. По-перше, акумуляція фібрилярних агрегатів в тканинах організму є ключовим фактором в етіології цілої низки так званих конформаційних хвороб, включаючи хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона, діабет другого типу, ревматоїдний артрит, губчасті енцефалопатії (пріонні хвороби), тощо [8]. По-друге, амілоїдні фібрили є перспективними природними наноматеріалами, завдяки своїм унікальним фізико-хімічним та механічним властивостям, до числа яких відносяться висока гнучкість, еластичність, жорсткість, термо- та хімічна стабільність, біосумісність, тощо [9].

Аналіз накопиченого на теперішній час фактичного матеріалу свідчить про те, що білкові олігомери, сформовані на ліпідній матриці, з одного боку, слугують нуклеусом для росту амілоїдних фібрил, а з іншого боку, представляють собою токсичні структури, що викликають дестабілізацію мембран та загибель клітини [10]. З огляду на ключову роль, яку клітинні мембрани здатні відігравати в ініціації утворення амілоїдів та послідовному пошкодженні клітин, проблема

мембрано-опосередкованої агрегації є надзвичайно актуальною. Незважаючи на значні успіхи, досягнуті у з'ясуванні ролі білок-ліпідних взаємодій в модуляції агрегаційного стану білків, цілісна система уявлень щодо детермінантів такої модуляції на цей час відсутня. До числа невирішених питань відноситься, перш за все, встановлення кореляції між конформаційною поведінкою білків і пептидів та фізико-хімічними властивостями ліпідного бішару (хімічний склад, поверхневий заряд, фазовий стан, тощо). Численні дослідження, у яких робились спроби вирішити це питання, демонструють різноманітність та складність чинників, що контролюють процес агрегації білків у мембранних системах [13-15]. Висловлюється припущення, що аніонні фосфоліпіди є головним мембранним компонентом, відповідальним за посилення фібрилізації, що було продемонстровано, зокрема, для  $\alpha$ -синуклеїну [16], A $\beta$  пептиду [13], амуліну [17], тау білка [18], лізоциму, транстиретину, цитохрому *c*, інсуліну, міоглобіну [19]. Однак, спостереження, що утворення фібрил *in vitro* може бути індуковане не тільки мембранами, що містять аніонні фосфоліпіди, але і бішарами із сумішей цвіттерійонних фосфоліпідів з гангліозидами, сфінгомієліном та холестерином [20-22], не дозволяють приписати здатність до індукції фібрилізації білків певному класу ліпідів.

Більш детального вивчення потребує питання щодо механізмів токсичної дії префібрилярних та фібрилярних агрегатів на структуру мембран. Основними шляхами дестабілізації мембран патогенними агрегатами білків наразі вважаються утворення іонних каналів та екстракція ліпідів із бішару та їх вбудовування у білок-ліпідні агрегати фібрилярного типу [19,23,24]. Ці ефекти пояснюються електростатично-контрольованим підвищенням локальної концентрації білка поблизу мембрани та переважним зв'язуванням білків з ліпідними доменами певного складу. При цьому, припускається, що деструктивний потенціал притаманний не лише раннім олігомерним інтермедіатам, а і зрілим фібрилам. У цьому відношенні важливим є проведення порівняльного аналізу впливу префібрилярних та фібрилярних білкових агрегатів на цілісність ліпідного бішару.

Формуванню білкових ансамблів у мембранному оточенні може сприяти певне розташування молекул, що агрегують, відносно поверхні розділу ліпід-вода. Припускається, що нерівномірний розподіл заряду та дипольний момент поліпептидного ланцюга відповідають за специфічну орієнтацію білків та пептидів, зв'язаних із зарядженими мембранами [10]. Роль мембран у фібрилогенезі може включати також варіювання частки експонованих та занурених у ліпідний бішар ділянок білкової молекули, що впливає на здатність білка слугувати ядром при утворенні фібрили. Важливість такого чинника, як глибина занурення у бішар, була продемонстрована, наприклад, при вивченні ліпід-індукованого фібрилогенезу  $\alpha$ -синуклеїну, A $\beta$  пептиду, пріонного білка та аполіпопротеїну С-III [24,25]. Більш того, шляхи та кінетичні особливості мембрано-індукованого фібрилогенезу можуть суттєво відрізнятись від механізмів утворення фібрил у розчині внаслідок обмежень, які накладаються розмірністю системи, фізико-хімічними та динамічними характеристиками мембранних компонентів, колективними властивостями ліпідного бішару, тощо [21,26]. Переважна більшість експериментальних підходів, що використовуються для отримання інформації щодо структури білок-ліпідних ансамблів (зокрема, рентгеноструктурний аналіз), є непридатними для мембранних систем, які характеризуються високою структурною лабільністю та анізотропією. Зважаючи на це, спектроскопічні методи, зокрема, різні модифікації методу флуоресцентної спектроскопії набувають все більшого значення при дослідженні структури білок-ліпідних систем. У цьому аспекті уявляється актуальним розвиток нових методичних підходів до отримання структурної інформації стосовно білкових агрегатів, що формуються на ліпідній матриці.

Не до кінця вирішеною залишається проблема коректного детектування фібрилярних агрегатів білків. Традиційні методи ідентифікації амілоїдів (зокрема, за допомогою барвників Тіофлавіну Т та Конго Червоного) виявляються недостатньо специфічними при вивченні мембранних систем, де частка амілоїдних агрегатів зазвичай досить низька і здатність барвників формувати комплекси з ліпідами може призвести до помилкового позитивного результату. У

зв'язку з цим, існує нагальна потреба у розвитку нових методологій детектування амілоїдів та пошуку флуорофорів, яким притаманна висока селективність до фібрилярних агрегатів мембранозв'язаних білків.

Відкритим є також питання стосовно структурної реорганізації амілоїдних фібрил на ліпідній матриці. До теперішнього часу основні зусилля вчених були спрямовані на характеризацію мембранотропної активності амілоїдогенних білків та пептидів [11-16], однак механізми впливу ліпідів на конформацію фібрил залишаються невизначеними. До того ж, наявність різних поліморфних форм фібрилярних агрегатів дозволяє поставити питання щодо існування кореляції між їх морфологією та мембрано-деструктивним потенціалом.

Вирішення усіх вищезначених питань неможливе без детального дослідження модельних білок-ліпідних систем, що містять штучні мембрани (моношари, бішари на підложці та ліпідні везикули), та білкові молекули, які відрізняються за фізико-хімічними, структурними та агрегаційними властивостями. Використання такого роду систем дозволяє імітувати процеси, що відбуваються у клітинах організму на різних стадіях амілоїдогенезу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалась на кафедрі ядерної і медичної фізики фізико-технічного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна у відповідності з планом науково-дослідних робіт кафедри за темами:

- «Дослідження механізмів формування відгуку біологічних систем та фізичних засад нових методів медичної мікро- та макродіагностики» (№ держреєстрації 0109U001322);
- «Роль іонів важких металів в мембранних ефектах амілоїдних білків» (№ держреєстрації 0113U005246) Державного фонду фундаментальних досліджень;
- «Дослідження мембрано-опосередкованих механізмів токсичності пре-амілоїдних агрегатів білків» (№ держреєстрації 0112U004611) Державного фонду фундаментальних досліджень;

- «Білок-ліпідні взаємодії як детермінант амілоїдогенних властивостей білків» (№ держреєстрації 0111U008000) Державного фонду фундаментальних досліджень
- «Нові підходи до детектування та модуляції процесу утворення амілоїдних фібрил» (проект № 4534) Українського науково-технологічного центру.

**Мета і задачі дослідження.** Метою даної роботи було встановлення ролі білок-ліпідних взаємодій в модуляції агрегаційної поведінки білків. Для досягнення даної мети були поставлені та вирішені наступні *задачі*:

- розробити нову методологію структурної характеристики фібрилярних білкових агрегатів на основі аналізу ефективності індуктивно-резонансного переносу енергії між амілоїд-специфічними флуоресцентними зондами;
- розвинути новий підхід до отримання якісної та кількісної інформації щодо процесу олігомеризації білків у мембранному оточенні на основі комбінованого застосування методів стаціонарного і часороздільного міжмолекулярного переносу енергії та визначити параметри олігомеризації лізоциму;
- встановити кореляцію між інтегральними фізичними характеристиками ліпідного бішару та ступенем олігомеризації мембранозв'язаних білків;
- за допомогою низки методів, включаючи метод флуоресцентних зондів, ІРПЕ, гасіння власної флуоресценції білків та метод моношарів Ленгмюра, з'ясувати молекулярні механізми модифікації структурно-динамічних та фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару під дією фібрилярних інтермедіатів та зрілих фібрил лізоциму, цитохрому *c* та N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну A-I;
- ідентифікувати різні поліморфні форми амілоїдних фібрил N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну A-I, охарактеризувати їх

еластичні властивості та встановити зв'язок між морфологією фібрил та характером їх взаємодій з модельними мембранами;

- розвинути методичний підхід до аналізу структурної трансформації амілоїдних фібрил на ліпідній матриці;
- використовуючи сукупність методів комп'ютерного аналізу, зокрема, метод молекулярної динаміки та алгоритми аналізу амінокислотної послідовності білків, ідентифікувати агрегаційні ділянки ряду білків та пептидів та дослідити роль мембранного оточення в утворенні їх агрегаційно-компетентної конформації.

**Об'єкт дослідження** – комплекси модельних ліпідних мембран з білковими ансамблями різного ступеня олігомеризації та впорядкованості.

**Предмет дослідження** – процес взаємодії префібрилярних та фібрилярних агрегатів білків та пептидів з модельними фосфоліпідними мембранами.

**Методи дослідження** – різні модифікації методу стаціонарної та часороздільної флуоресцентної спектроскопії (метод флуоресцентних зондів, індуктивно-резонансний перенос енергії (ІРПЕ), гасіння власної флуоресценції білків, часороздільний ІРПЕ та ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням), спектрофотометрія, флуоресцентна, електронна та атомно-силова мікроскопія, метод моношарів Ленгмюра, динамічне світлорозсіювання, методи комп'ютерного моделювання та молекулярної динаміки. Для обробки даних використовували нелінійну оптимізацію, чисельні розрахунки та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів.

1. Вперше на основі аналізу ІРПЕ між амілоїд-специфічними флуоресцентними зондами визначені структурні характеристики амілоїдних фібрил лізоциму – молекулярний об'єм мономерних субодиниць та фрактальну розмірність фібрилярних агрегатів.
2. За допомогою часороздільного ІРПЕ вперше отримана кількісна інформація щодо олігомеризації лізоциму на ліпідних бішарах з різним поверхневим електростатичним потенціалом. Вперше проведене вимірювання мономолекулярного ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням у білок-



ліпідних системах. Запропоновано структурну модель олігомерів мембранозв'язаного лізоциму.

3. На основі глобального аналізу даних ІРПЕ отримана нова інформація стосовно взаємодії конформаційно-модифікованих мономерів цитохрому *c* з модельними ліпідними мембранами. Визначені термодинамічні та структурні параметри асоціації білка з двома типами центрів зв'язування на ліпідному бішарі. Вперше проведено аналіз даних ІРПЕ у цитохром *c* – ліпідних системах в рамках алгоритму Монте-Карло.
4. Вперше методом флуоресцентних зондів досліджена модифікуюча дія амілоїдних фібрил лізоциму та N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I на молекулярну організацію модельних ліпідних мембран. Отримані докази на користь дефрагментації ліпідного бішару під впливом фібрилярних варіантів аполіпопротеїну А-I.
5. Вперше методом атомно-силової мікроскопії ідентифіковані дві поліморфні форми амілоїдних фібрил N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I. Розраховані механічні параметри (модуль Юнга, персистентна довжина, жорсткість при вигині) фібрилярного білка у конформаціях закрученої стрічки та спіральної стрічки. Вперше проведено дослідження впливу морфології фібрил на характер їх взаємодії з ліпідними мембранами. Вперше методом ІРПЕ отримані докази реструктуризації амілоїдних агрегатів N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I на ліпідній матриці.
6. З використанням алгоритму комп'ютерного моделювання CreateFibril вперше побудовані структурні моделі амілоїдних фібрил пептидів лізоциму, аполіпопротеїну А-I та А $\beta$ -пептиду, що відрізнялись кутом закручування. Проведена оцінка стабільності модельних фібрил та ідентифіковані найбільш енергетично вигідні поліморфи.
7. Вперше методом молекулярної динаміки проведено дослідження комплексів лізоциму, N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I та цитохрому *c* з ліпідними бішарами різного складу. Отримана принципово

нова інформація щодо ролі мембран в утворенні ранніх інтермедіатів фібрилярних ансамблів білків. Запропоновано нову модель нуклеації амілоїдних фібрил лізоциму на ліпідній матриці.

**Практичне значення отриманих результатів.** Експериментальні та теоретичні результати, отримані у даній роботі, важливі для поглиблення уявлень щодо молекулярних механізмів утворення фібрилярних агрегатів білків та їх структурних інтермедіатів на границі розділу ліпід-вода, а також стосовно мембрано-модифікуючої дії агрегованих білків.

Охарактеризовані у роботі нові амілоїд-специфічні флуоресцентні зонди можуть бути застосовані при створенні біосенсорних систем для ранньої діагностики конформаційних хвороб, а також для вивчення структурних особливостей амілоїдних фібрил.

Отримані дані щодо модифікуючого впливу фібрилярних агрегатів на структурно-динамічний стан ліпідних мембран важливі для попередження цитотоксичної дії амілоїдних фібрил, яка реалізується на рівні мембран та розвитку нових стратегій пошуку анти-амілоїдних лікарських препаратів.

Розроблені у роботі методичні підходи до диференціації різних стадій фібрилогенезу та структурної характеристики білкових агрегатів, а також комплекс комп'ютерних програм можуть бути застосовані для моніторингу процесу утворення амілоїдів у водній фазі та на ліпідній матриці.

Кількісна інформація стосовно механічних властивостей амілоїдних фібрил може бути використана при створенні нових біосумісних наноматеріалів на основі білкових агрегатів для різноманітних біомедичних застосувань.

**Особистий внесок здобувача.** Вибір напрямку дослідження, формулювання мети та наукових задач, розробка та верифікація запропонованих у роботі експериментальних та теоретичних підходів, оформлення та узагальнення результатів зроблено автором особисто чи при його безпосередній участі. В опублікованих зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає: у роботах [36-38,52] – постановка задачі, отримання експериментальних даних, розвиток моделей ІРПЕ, написання статей; у роботі [40] – проведення

експерименту, обробка та обговорення результатів вимірювань, написання статті; у роботах [28,31,44,51,53,54,59,60,63-67,77,80-82,85] – проведення експериментів, аналіз експериментальних даних, написання статей та тез; в роботах [29,32,35,39,41-43,45,48,49,55,57,69,78] – участь у проведенні експерименту, обговорення та обробка результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи були представлені та доповідались на Школі-семинарі «Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения» (Харьков, 2008); III Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2008); IV Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Naukowy potencjał świata – 2008» (Przemyśl, 2008); International Conference «Nanobiophysics: fundamental and applied aspects NBP-2009» (Харків, 2009); I Міжнародній конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2009); IX Всеукраїнській конференції студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих учених в Україні» (Київ, 2009); 11<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence (Budapest, 2009); Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2010); II Международной научной конференции «Наноструктурные материалы – 2010: Беларусь – Россия – Украина» (Киев, 2010); VII International Science-Technical Conference «Modern trends in biological physics and chemistry BPPC – 2011» (Севастополь, 2010); V з'їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк, 2011); 12<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence (Strasbourg, 2011); X Міжнародній конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна – 2012: біологічні науки» (Київ, 2012); Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (Пущино, 2012); IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); International Conference «Development and application of new fluorescent materials and methods» (Daugavpils, 2012); International Research and Practice Conference «Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2013)» (Буковель,

2013); Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика-13» (Пушино, 2013); 13<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence (Genoa, 2013); 4<sup>th</sup> International Scientific and Technical Conference for Young Scientists «Luminescent processes in condensed state of matter» (Харків, 2015); International Young Scientists Forum on Applied Physics (Дніпропетровськ, 2015); 14<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence (Wurzburg, 2015).

**Публікації.** Основні матеріали дисертації опубліковані у 59 наукових працях, у тому числі в 32 статтях у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах, (з них 21 стаття у журналах, індексованих у базі даних Scopus, їхній сумарний імпакт-фактор складає 48.5), 25 тезах доповідей на міжнародних і національних конференціях та 2 патентах України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, семи основних розділів, висновків, списку використаних джерел та одного додатку. Загальний обсяг дисертації складає 391 сторінку (об'єм основної частини – 385 сторінок). Додаток займає 6 сторінок. Дисертація містить 124 рисунки (з них 16 займають повну сторінку), 36 таблиць (з них 7 займають повну сторінку). Список використаних джерел (519 найменувань) займає 52 сторінки.

## РОЗДІЛ 1

### АГРЕГАЦІЯ БІЛКІВ У ЛІПІДНОМУ ОТОЧЕННІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Білок-ліпідні взаємодії відіграють ключову роль у багатьох клітинних процесах, включаючи передачу сигналу, внутрішньоклітинний транспорт, ферментативний каталіз, перетворення енергії, антимікробний захист, тощо [86-88]. Критичними для усіх цих функцій є унікальні структурні особливості білкових молекул, яким властива надзвичайно висока конформаційна лабільність та чутливість до змін параметрів навколишнього середовища. Сучасні концепції розглядають ліпідний бішар, основний структурний елемент біологічних мембран, як двовимірну рідину, яка може модифікувати структуру та динаміку білків внаслідок специфічних та неспецифічних взаємодій. Ці взаємодії контролюються не тільки загальними фізико-хімічними характеристиками мембрани, як, наприклад, її фазовий стан, кривизна та еластичність, поверхневий заряд та ступінь гідратації, але й хімічною природою мембранних ліпідів, конформацією та динамікою ліпідних голівок та ацильних ланцюгів, ступенем структурної комплементарності білкових та ліпідних молекул, тощо [89]. Важливо, що усі ці чинники можуть впливати не тільки на конформацію білка, але і на його агрегаційний стан. Так, зокрема, з'являється все більше доказів на користь посилення агрегаційного потенціалу білків та пептидів у мембранному оточенні [90,91]. Протягом останнього десятиріччя надзвичайну увагу привертає особливий тип білкових агрегатів, амілоїдні фібрили, утворення яких в організмі пов'язується із розвитком так званих конформаційних хвороб. Ці агрегати характеризуються філаментною структурою з крос- $\beta$ -листовим остовом, в якому  $\beta$ -тяжі окремих поліпептидних ланцюгів орієнтуються перпендикулярно головній осі фібрили,  $\beta$ -листи простягаються паралельно цій осі [6,92]. Зрілі фібрили мають діаметр 4-13 нм та містять, зазвичай, 2-6 латерально асоційованих закручених протофіламентів, кожен діаметром 2-5 нм [93].

Все більшого експериментального обґрунтування набуває гіпотеза про те, що структурна трансформація поліпептидного ланцюга в частково згорнуту конформацію є критичною передумовою для утворення фібрил. *In vitro*, умови,

сприятливі для фібрилізації, створюються шляхом зниження рН, підвищення температури, додавання органічних розчинників чи денатурантів, тощо, тоді як *in vivo* патологічне часткове розгортання чи згортання білка може бути наслідком мутацій, окиснювального чи теплового шоку або ж дестабілізації структури білка при його адсорбції на поверхні розділу. Саме у наявності значної кількості поверхонь розділу, утворюваних клітинними мембранами, полягає принципова різниця між ростом амілоїдів *in vitro* та *in vivo*. Ліпідний бішар може слугувати ефективним каталізатором фібрилогенезу, забезпечуючи оточення, у якому білкові молекули приймають конформацію та орієнтацію, які сприяють самозбиранню білка у протофібрилярні та фібрилярні структури. Більш того, мембрани являють собою пряму мішень для токсичних пре-фібрилярних агрегатів чи неправильно згорнутих білків, які викликають пошкодження мембрани шляхом утворення неспецифічних іонних каналів та/чи вбудовування ліпідів у білкові фібрили [94,95].

З метою з'ясування молекулярних механізмів мембрано-опосередкованої фібрилізації було досліджено велику кількість модельних систем, що містили амілоїдогенні білки чи пептиди та модельні мембрани різного складу [13,14,23,96]. Важливий висновок, який був зроблений на основі цих робіт, полягає у тому, що фібрилогенні властивості мембранозв'язаних білків у значній мірі визначаються хімічною природою мембранних ліпідів. Існують неспростовні докази на користь ключової ролі аніонних ліпідів у посиленні олігомеризації білків, як було продемонстровано, зокрема, для  $\alpha$ -синуклеїну [97,98],  $A\beta$ -пептиду [11,13,99], амуліну [17,23], тау-білка [18], лізоциму, транстеритину, цитохрому *c*, інсуліну, міоглобіну та ендостатину [19]. Так, наприклад, було показано, що ступінь фібрилізації  $A\beta_{1-40}$  зростає при асоціації пептиду із ФС, ФІ, ФІФ, ФІФ<sub>2</sub> та КЛ, у порівнянні із нейтральними та цвіттеріонними ліпідами [17]. Більш того, посилення фібрилізації корелює із ступенем фосфорилування ФІ у порядку ФІФ<sub>2</sub>>ФІФ>ФІ, висвітлюючи суттєву роль фосфатних груп в утворенні амілоїдних фібрил. Поряд з цим, інші роботи свідчать, що  $A\beta_{1-40}$  має вищу

спорідненість до гангліозидів, тому прискорення фібрилізації спостерігалось саме у присутності гангліозид-вміщуючих везикул [99].

Як проілюстровано у табл. 1.1, здатність ініціювати фібрилізацію *in vitro* не обмежується мембранами, які містять аніонні ліпіди, але притаманна також і ліпідним бішарам, що складаються з суміші фосфоліпідів з гангліозидами, сфінгомієліном чи холестерином. З огляду на це, неможливо приписати здатність посилювати фібрилізацію якомусь конкретному класу ліпідів.

Таблиця 1.1

Утворення амілоїдних агрегатів білків та пептидів у присутності мембран

Хвороба	Білок чи пептид	Мембранна система	Посилання
Хвороба Паркінсона, Хвороба Альцгеймера, Системна атрофія	$\alpha$ -синуклеїн	ФГ/ФХ, ФС/ФХ, ФГ/ФЕ	97
		везикули,	
		планарні ФХ/ФС бішари,	98
		ФХ,ФС, ФІ везикули,	100
		фракції мембран клітин мозку, синаптосомальні мембрани	101 16
Хвороба Альцгеймера	А $\beta$ -пептид	мембрани клітин мозку	102
		ФХ/ФГ везикули	103
		ФХ/гангліозидні везикули	99
		ФС, ФІ, КЛ, ФХ, ФЕ, СМ, Хол, ФГ, гангліозиди	104
Діабет II типу	амулін	ФГ/ФХ везикули, ліпосоми з ліпідів підшлункової залози,	17
		ФХ, ФС/ФХ везикули	23
Хвороба Альцгеймера	тау-білок	ФС везикули	18
Губчасті енцефалопатії	пріонний білок	ФГ, ФХ, ФХ/Хол/СМ везикули	21
Спадкові полінейропатії, Системний амілоїдоз	транстиретин	ФХ/ФС, ФХ/ФГ везикули	22
Системний амілоїдоз	лізоцим	ФХ/ФС, ФХ/ФГ везикули	19
Карцинома щитовидної залози	кальцитонін	ФХ, ФХ/Хол, ФХ/ФС, ФХ/гангліозидні везикули	20

Тим не менш, хімічна природа ліпідних компонентів мембрани відіграє ключову роль у забезпеченні певного типу та ступеня зв'язування поліпептиду, а також його переходу до агрегаційно-компетентної конформації. У даному розділі розглянуті основні мембранні детермінанти амілоїдогенності білків. Однак, для більш глибокого розуміння молекулярних механізмів, що обумовлюють ліпід-опосередковану трансформацію поліпептидного ланцюга у фібрилярний стан, спочатку будуть висвітлені структурні та фізичні властивості амілоїдних агрегатів, а також проаналізовані базові моделі фібрилогенезу.

### 1.1. Молекулярні основи процесу агрегації білків

Протягом багатьох років загальновизнаною була гіпотеза, яка постулювала, що формувати амілоїдні фібрили можуть лише окремі білки та пептиди, пов'язані із розвитком нейродегенеративних хвороб. Однак, останнім часом все більшого обґрунтування набуває ідея про те, що здатність білка утворювати фібрилярні агрегати є фундаментальною властивістю поліпептидного ланцюга. Молекулярна причина цього полягає у неправильному згортанні білка (місфолдінгу). За фізіологічних умов поліпептидний ланцюг досягає свого нативного функціонального стану через різні шляхи згортання, які визначаються енергетичним ландшафтом [105]. Цей ландшафт описує залежність вільної енергії молекули від координат білка, які визначають його конформацію. Число конформаційних станів, доступних для поліпептидного ланцюга зменшується при наближенні до нативного стану. З огляду на це, енергетична поверхня називається «енергетичною воронкою» [106] та описується функцією енергії  $F(x) = F(x_1, x_2, \dots, x_n)$ , де  $n$  – ступінь свободи білка,  $x_1, x_2, \dots, x_n$  описує мікроскопічні стани молекули (наприклад, торсійні кути поліпептидного ланцюга),  $F(x)$  – вільна енергія білка у даній конформації [107]. Найбільш термодинамічно стабільна конформація білка відповідає набору значень  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , що забезпечує мінімум  $F(x)$ . Широкий край енергетичної воронки представляє денатурований, чи незгорнутий стан білка, тоді як вузький край відповідає глобальному мінімуму  $F(x)$  (рис. 1.1). Однак, внаслідок великої



кількості ступенів конформаційної свободи та значних флуктуацій, модель енергетичної воронки припускає, що нативний повністю згорнутий стан не завжди відповідає абсолютному мінімуму вільної енергії, а відображає, скоріше, стан, який відповідає мінімуму вільної енергії, що досягається найшвидше. Тому енергетичний профіль кожного білка характеризується кількома локальними мінімумами. Це означає, що на кожному кроці процесу фолдингу, молекула білка знаходиться у рівновазі із частково згорнутими інтермедіатами, що знижує імовірність досягнення нативного стану поліпептидного ланцюга. Відносний внесок молекул, що знаходяться у нативному та проміжному станах, визначається різницею їх вільних енергій, а швидкість досягнення рівноваги – висотою енергетичного бар'єру, який розділяє ці стани.

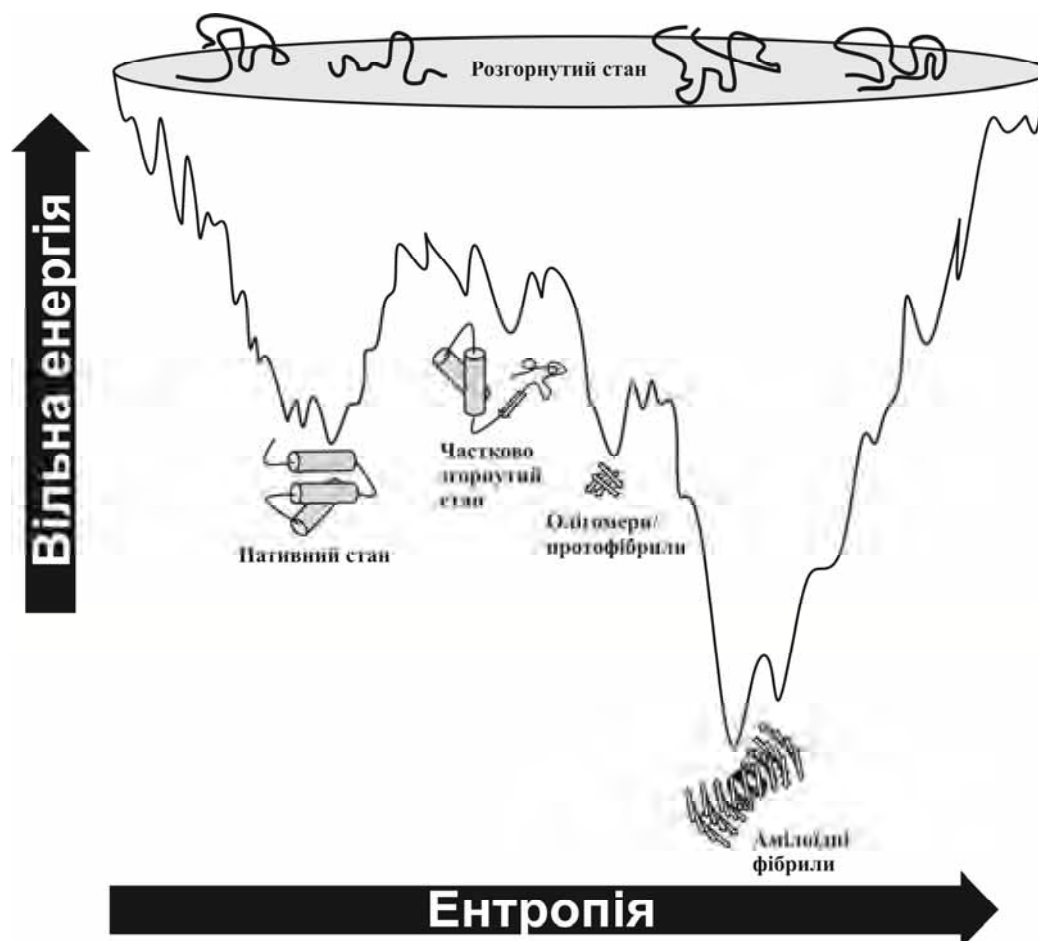


Рис. 1.1. Енергетичний ландшафт білкових молекул.

Разом із подібними до нативного стану структурами, інтермедіати можуть містити елементи вторинної структури, які не властиві нативному білку. Як

правило, такі проміжні стани характеризуються наявністю протяжних експонованих гідрофобних областей. Гідрофобні взаємодії між частково згорнутими інтремедіатами призводять до того, що поліпептидний ланцюг залишає свій шлях нативного фолдінгу та переходить до «офф-фолдінгового» маршруту. На противагу швидкому та спонтанному процесу згортання, «офф-фолдінговий» шлях характеризується відносно повільною кінетикою. Одним з можливих маршрутів «офф-фолдінгу» є перехід частково розгорнутих інтермедіатів у високовпорядковані фібрилярні структури [108]. Чинники, які зміщують баланс між внутрішньомолекулярними взаємодіями, відповідальними за правильне згортання білка, та індукують «офф-фолдінгову» трансформацію у амілоїдні фібрили, включають генетичні мутації, окислювальний стрес, фізико-хімічні властивості розчинника (рН, температура, іонна сила, тиск), тощо [58,90,103].

## **1.2. Структура та механізми утворення амілоїдних фібрил**

Для розшифрування ультраструктурної організації фібрилярних агрегатів була використана ціла низка експериментальних методів, включаючи дифракцію рентгенівських променів [109], ЯМР [5], ЕПР [110], флуоресцентну спектроскопію [39], електронну [111], кріоелектронну [112] та атомно-силову [3] мікроскопію, тощо. Ці аналітичні інструменти показали, що амілоїдні агрегати мають чітку структурну ієрархію. Зокрема, вторинна структура фібрил визначається  $\beta$ -тяжами та невпорядкованими ділянками. На рівні третинної структури  $\beta$ -тяжі упаковуються у протяжні паралельні чи антипаралельні  $\beta$ -листи, які стабілізуються водневими зв'язками [7]. При такій організації сусідні  $\beta$ -тяжі розділені відстанню  $\sim 4.7$  Å та розташовуються ортогонально до осі фібрили. Кластеризація  $\beta$ -листів паралельно напрямку росту агрегатів визначає четвертинну структуру амілоїдів. Відстань між  $\beta$ -листами складає 9-11 Å. Означена конфігурація називається крос- $\beta$ -структура та представляє собою «молекулярний відбиток» кожного протофіламенту (рис. 1.2).

Описання структури амілоїдів може бути доповнене моделлю «стеричної блискавки». Згідно з цією моделлю, два  $\beta$ -листа комплементарно взаємодіють

один з одним, при цьому, взаємна орієнтація  $\beta$ -тяжів протилежних листів така, що бокові залишки одного  $\beta$ -листа локалізуються між боковими залишками другого  $\beta$ -листа [113]. Поверхня між двома  $\beta$ -листами повністю недоступна для води, тому вона називається «сухою поверхнею» [114]. Така самокомплементарна «стерична блискавка» повторюється по всій довжині фібрили та стабілізується, здебільшого, ван-дер-Ваальсовими та гідрофобними взаємодіями.

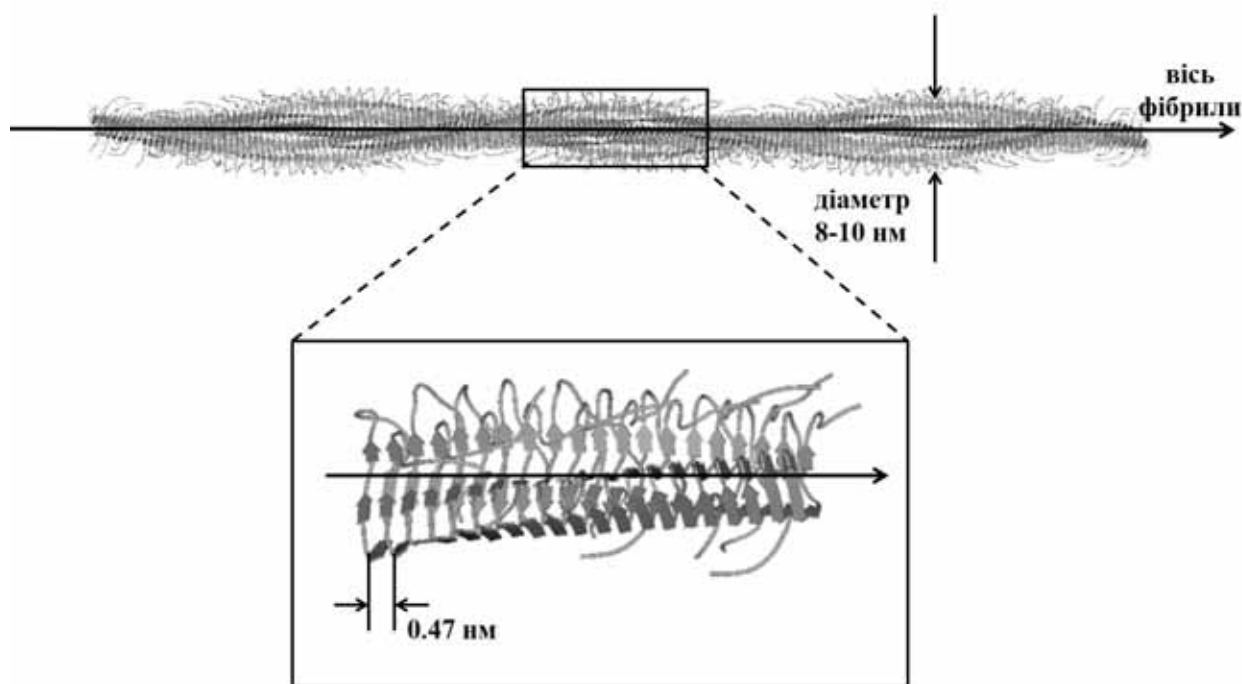


Рис. 1.2. Схематична ілюстрація структури амілоїдної фібрили.

Згідно з сучасними концепціями, фібрилізація білка описується як стохастичний, але у той же час чітко визначений нуклеаційний процес. Стохастичність цього процесу визначається наявністю численних просторово-часових шкал протікання реакцій, які призводять до гетерогенної популяції та різних поліморфних форм.

У рамках нуклеаційно-залежного механізму, агрегація починається із кластеризації мономерних молекул у нуклеус (олігомерне ядро), елонгація якого у протофібрили далі відбувається за рахунок приєднання мономерів (рис. 1.3). Це віддзеркалюється у характеристичній сигмоїдній формі кінетичного профілю росту фібрилярних агрегатів (рис. 1.4).

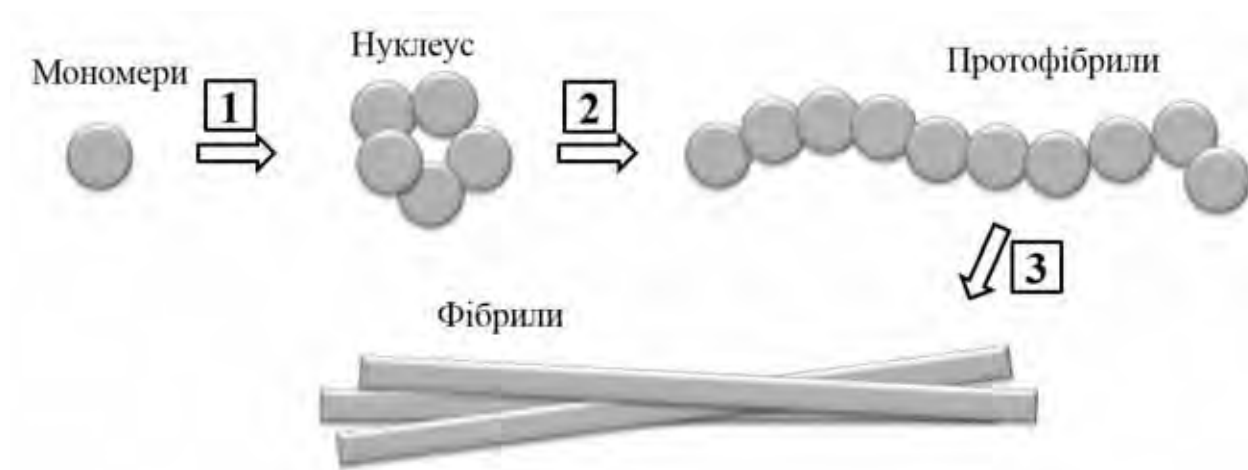


Рис. 1.3. Утворення амілоїдних фібрил по нуклеаційно-залежному механізму.

Концентраційні флуктуації призводять до підвищення локальної густини окремих протофіламентів внаслідок їх тісного зближення [3]. Це індукує взаємодії між протофіламентами, результатом чого є їх незворотна агрегація та закручення вздовж контурної довжини. Сила взаємодії між протофіламентами описується другим віріальним коефіцієнтом, пропорційним  $l^2d$ , де  $l$  та  $d$  означають довжину та діаметр протофіламенту.

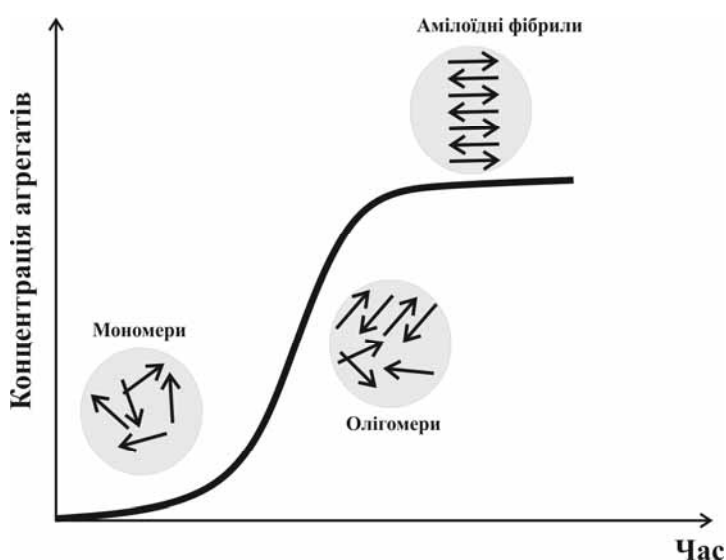


Рис. 1.4. Профіль кінетики росту амілоїдних фібрил.

Зріла фібрила складається з 2-6 протофіламентів, закручених один навколо одного. Довжина фібрил досягає 10 мкм, а діаметр – близько 8-10 нм [93,115]. Пакування протофіламентів у фібрилі визначається як фізико-хімічними

властивостями поліпептидного ланцюга, амінокислотою послідовністю, розподілом зарядів, ступенем гідрофобності, тощо, так і експериментальними умовами [10]. На початку фази росту амілоїдів закручення протофіламентів вздовж контурної довжини трапляється випадково. Однак, кількість точок закручення зростає із часом інкубації. Більш того, ці точки поступово локалізуються на однакових відстанях одна від одної, які визначають напівперіод фібрили. Молекулярні детермінанти здатності фібрил до закручування до цього часу залишаються до кінця не з'ясованими [116,117]. У глобальному сенсі, хіральність L-амінокислотних залишків, є основною рушійною силою закручування фібрилярних агрегатів. Відомо, що поліпептидний ланцюг, який складається з L-ізомерів амінокислот, утворює або правозакручені  $\alpha$ -спіралі, або лівозакручені  $\beta$ -структури [118]. Внаслідок цього, більшість фібрилярних агрегатів є лівозакрученими. Ключова роль власної хіральності білка у формуванні структури амілоїдних фібрил, була продемонстрована Агелі та співавторами [119]. Використовуючи статистико-механічний підхід, автори показали, що процес фібрилізації білка включає наступну послідовність структурних трансформацій: мономерний  $\beta$ -лист  $\rightarrow$  спіральна смуга  $\rightarrow$  закручена стрічка (подвійна смуга)  $\rightarrow$  фібрила (закручені стопки стрічок). Описання цих трансформацій у рамках крупнозернистих моделей базується на представленні  $\beta$ -тяжової конформації білка як хіральної стрижнеподібної структури, що має комплементарні групи на протилежних сторонах. Припускається, що верхня та нижня поверхні такої структури відрізняються одна від одної доступністю для розчинника, тобто гідрофобністю. Впізнавання між комплементарними групами на обох поверхнях індукує асоціацію стрижнеподібних мономерів у закручені смуги. Окрім цього, смуга характеризується хімічною анізотропією. Різна спорідненість поверхонь смуги до розчинника призводить до спіральної конфігурації з циліндричною кривизною, періодом  $h$  та радіусом  $r$ :

$$h = b \left( \frac{2\pi}{\gamma_0} \right) \left( 1 + \left( \frac{\gamma_v}{\gamma_0} \right)^2 \right)^{-1} \quad (1.1)$$

$$r = b \left( \frac{\gamma_v}{\gamma_0^2} \right) \left( 1 + \left( \frac{\gamma_v}{\gamma_0} \right)^2 \right)^{-1} \quad (1.2)$$

де  $\gamma_v$  та  $\gamma_0$  означають кути вигину та закручення смуги,  $b$  – відстань між двома сусідніми стрижнеподібними мономерами у смузі. Притягання між смугами викликає їх самозбирання у подвійну смугу, або закручену стрічку з ідентичними поверхнями, яка характеризується гауссовою кривизною. Результатом послідуочого стекінгу стрічок є формування фібрил. Кінцеві значення товщини та періоду фібрили визначаються тонким балансом між виграшом енергії внаслідок притягання між смугами при стекінгу та затратами еластичної енергії внаслідок тенденції стрічки деформуватись таким чином, щоб змінити свій кут закручення у відповідь на стеричні обмеження, що накладаються сусідніми стрічками при утворенні фібрили.

Закручування протофіламентів як компроміс між двома протилежними силами також було продемонстровано Адамчиком та ін. [120]. Зокрема, авторами було показано, що закручення контролюється балансом між еластичними та електростатичними властивостями білка. У рамках запропонованого формалізму, закручення навколо центральної осі є єдиним шляхом зниження електростатичної енергії. У такій конфігурації відстань між зарядами одного знаку зростає, та електростатичне відштовхування зменшується. З іншого боку, збільшення відстані між сегментами поліпептидного ланцюга призводить до затрат еластичної енергії, що ініціює більш плоску конформацію фібрили. Результуючий кут закручення фібрили диктується співвідношенням між цими двома процесами.

Слід відмітити, що сукупність результатів робіт останнього десятиріччя припускає існування інших причин закручення амілоїдних фібрил, які включають ентропійні фактори [121] та гідрофобні взаємодії [122]. Окрім цього, дані атомно-силової мікроскопії свідчать, що періодичність амілоїдів є параметром, початкове значення якого може змінюватись при варіюванні іонної сили [123]. Підвищення концентрації моновалентних іонів викликає зростання періоду фібрили згідно з рівнянням:

$$L_2 = L_1 \left[ \left( \frac{\kappa_1}{\kappa_2} \right)^{1/2} + \frac{\alpha_2}{4\pi} (\kappa_1 - \kappa_2) L_1^{3/2} \right]^{-2/3} \quad (1.3)$$

де  $L, \kappa$  – період фібрили та довжина Дебая, нижній індекс означає режим іонної сили – 1 чи 2 (тобто іонна сила  $I_1$  чи  $I_2$ , відповідно),  $\alpha_2$  – параметр при іонній силі 2, який залежить від внутрішніх характеристик фібрилярного агрегату (густини заряду, геометрії, механічної жорсткості).

Взаємозв'язок між періодичністю фібрили та її фізичними властивостями у більш загальному вигляді був запропонований Ассенгою та ін. [124]. Зокрема, моделювання протофіламенту як ланцюга кульок діаметром  $b$  та міжцентровою відстанню  $b(1 + \varepsilon)$ ,  $\varepsilon > 0$ , з'єднаних пружинами, дозволило визначити напівперіод фібрили:

$$Z = b(1 + \varepsilon) \frac{\pi}{A} (3n^2 - 7)^{1/2} \quad (1.4)$$

де  $n$  – число протофіламентів,  $A$  – константа, яка залежить від іонної сили розчину, еластичних властивостей фібрил та геометричних параметрів  $b$  та  $\varepsilon$ .

### 1.3. Моделі утворення фібрилярних агрегатів

Сукупність експериментальних та теоретичних результатів, накопичених на теперішній час, свідчить на користь того, що фібрилізація білків – це надзвичайно складний процес, який включає багато стадій. Окрім цього, наявність численних поліморфів амілоїдних фібрил, поряд із розмаїттям структурних інтермедіатів говорить про те, що утворення високовпорядкованих білкових агрегатів може відбуватись за різними механізмами. Для опису процесу утворення амілоїдів було запропоновано велику кількість моделей [125-129].

Перші спроби описання полімеризації білків належать Оосава та ін., які у 1959 році вивчали агрегацію G-актину у F-актин [130]. Основні рівняння моделі мають наступний вигляд:

$$\frac{dn_h}{dt} = [k_+ \lambda(t) - k_-] \int [k'_+ \lambda_3(t) - k'_- \lambda_{3h}(t)] dt + 3[k'_+ \lambda_3(t) - k'_- \lambda_{3h}(t)] + k'_- \lambda_{3h}(t) \quad (1.5)$$

$$\ln \left[ \frac{1 + (1 - \lambda^p / \lambda_0^p)^{1/2}}{1 - (1 - \lambda^p / \lambda_0^p)^{1/2}} \right] = p(2/pk_+c)^{1/2} \lambda_0^{p/2} t \quad (1.6)$$

де  $n_h$  – загальна концентрація білкових мономерів,  $k_+$ ,  $k_-$  – пряма/зворотна константи швидкості приєднання/дисоціації мономеру, відповідно,  $k_+ \lambda_3$  представляє собою константу прямої трансформації тримера у ядро,  $k_- \lambda_{3h}$  означає зворотну константу дисоціації ядра у тример,  $p$  – число мономерів в агрегаті,  $\lambda_0$  та  $\lambda$  – початкова концентрація мономерів та концентрація мономерів в агрегаті,  $c$  – константа.

У 1967 році Гріффіт запропонував механістичну модель матрично-опосередкованої самозбірки (МОС) поліпептидів для опису агрегації пріонних білків [131]. Ця модель постулює наявність двох станів білка – стабільної мономерної конформації (S) та агрегаційно-компетентної конфігурації (A). Згідно з запропонованою моделлю, елонгація амілоїдної фібрили відбувається за рахунок приєднання мономеру у стані S до ядра у стані A.

Наступний вагомий внесок у розуміння механізмів фібрилізації білків був зроблений Ферроне та ін., які у 1980 році сформулювали модель полімеризації гемоглобіну при серповидноклітинній анемії [132]. Ця модель розглядає гомогенну та гетерогенну нуклеацію, де гетерогенність означає, що нові полімери акумулюються на поверхні вже існуючих:

$$\frac{dc_p}{dt} = K_N k_+ (\gamma c)^n + K_M \phi k_+ (c_0 - c) (\gamma c)^m \quad (1.7)$$

$$-\frac{dc}{dt} = n K_N k_+ (\gamma c)^n + m K_M \phi k_+ (c_0 - c) (\gamma c)^m + (k_+ \gamma c - k_-) c_p \quad (1.8)$$

де  $K_N$  та  $K_M$  – рівноважні константи гомогенної та гетерогенної нуклеації, відповідно,  $k_+$  та  $k_-$  описують швидкість додавання та дисоціації мономеру, відповідно,  $c_0$  та  $c$  означають концентрацію мономерів у момент часу 0 та  $t$ ,  $\phi$  – фактор, який враховує число ефективних сайтів нуклеації,  $n$  – критичний розмір ядра.



Модель мономер-спрямованої конверсії (МСК) була запропонована Прусінером та співавторами у 1982 для опису агрегації пріонних білків та розвинута у 1991 [133,134]. Ця модель припускає існування S мономерів у А-стані, які асоціюють з розчинними мономерами у S-стані, що індукує трансформацію останніх у реактивний А-стан. Спираючись на роботи Прусінера, Лансбурі та ін. у 1993 розробили модель нуклеаційно-залежної полімеризації (НЗП) [126]. Спочатку ця модель була запропонована для пояснення механізмів трансмісії пріонів, але наразі вона представляє одну з основних кінетичних моделей фібрилізації білка. У рамках цієї моделі, перехід білка в амілоїдогенний стан описується двофазним кінетичним профілем із лаг-фазою та фазою росту. Лаг-фаза (чи фаза нуклеації) включає самоасоціацію мономерів у критичне ядро, яке має найвищу енергію та характеризується, відповідно, як найбільш нестабільний стан. За цим процесом слідує елонгація ядра за рахунок приєднання додаткових мономерів, що врешті рещт приводить до термодинамічно вигідного експоненційного росту фібрили. Зазначимо, утворення ядра представляє собою процес, який визначає швидкість усього процесу фібрилізації. Кінетика лаг-фази контролюється умовами навколишнього середовища (рН, іонна сила, температура), мутаціями та/чи наявністю преагрегованих мономерів (матриці) (відомий як ефект затравки). У припущенні, що ядро представлено 10-мером, та агрегати більші, ніж 10-мер, розглядаються як фібрили, кінетичні рівняння моделі НЗП можуть бути записані у загальному виді наступним чином [126]:

$$\frac{d[M_1]}{dt} = -k_1[M_1] \left( 2[M_1] + \sum_{j=2}^9 [M_j] \right) + k_2 \left( 2[M_2] + \sum_{j=3}^{10} [M_j] \right) - k_p[M_1][M_{10}] - k_p[M_1][P] \quad (1.9)$$

$$\frac{d[M_j]}{dt} k_1[M_1]([M_{j-1}] - [M_j]) - k_2([M_j] - [M_{j+1}]) \quad (j = 2 - 9) \quad (1.10)$$

$$\frac{d[M_{10}]}{dt} = k_1[M_1][M_9] - k_2[M_{10}] - k_p[M_1][M_{10}] \quad (1.11)$$

$$\frac{d[M_j]}{dt} = k_p[M_1]([M_{j-1}] - [M_j]) \quad (\text{від } j = 11 \text{ до } N - 1) \quad (1.12)$$

$$\frac{d[M_N]}{dt} k_p [M_1] [M_{N-1}] \quad (1.13)$$

де  $k_1$  та  $k_2$  означають константи швидкості додавання мономеру (росту ядра) та дисоціації,  $k_p$  – константа швидкості елонгації ядра,  $[M_j]$  – концентрація  $n$ -меру,

$[P] = \sum_{j=1}^{N-1} [M_j]$  – концентрація фібрил. Загальна концентрація фібрил-утворюючих

мономерів становить:

$$[F] = \sum_{j=1}^N j [M_j] \quad (1.14)$$

Швидкості приросту концентрацій мономерів та фібрил з часом може бути виражена наступним чином:

$$\begin{aligned} \frac{d[F]}{dt} &= k_p [M_1] [P] + 11 k_p [M_1] [M_{10}] \\ \frac{d[P]}{dt} &= k_p [M_1] [M_{10}] \end{aligned} \quad (1.15)$$

Чисельне розв'язання вищеописаних рівнянь дає значення констант швидкості та ступеня олігомеризації ( $N$ ). Аналіз фібрилізації білків у рамках моделі НЗП відтворює характерну сигмоїдну форму кінетичного профілю агрегації (рис. 1.4).

У 1996 році Ломакін та ін. розвинули модель Ферроне та запропонували модель нуклеаційної полімеризації (НП) для фібрилізації Аβ пептиду [127,135]. Ця модель постулює, що вище певної критичної міцелярної концентрації (КМК)  $c^*$  існує термодинамічна рівновага між білковими мономерами та міцелями. Невпорядковані міцелярні олігомери утворюють ядро, а елонгація фібрили відбувається шляхом незворотнього зв'язування мономерів з кінцями фібрили. Основні рівняння моделі мають вигляд:

$$\dot{N}_p = c k_e N_{p-1} - c k_e N_p + k_n M \delta_{pn_0} \quad (1.16)$$

$$n L_f = \sqrt{\frac{m_0 k_e c^*}{k_n}} \quad (1.17)$$

$$N_f = c_0 \sqrt{\frac{k_n}{m_0 k_e c^*}} \quad (1.18)$$

де  $M, N_p$  та  $c$  представляють концентрацію міцел,  $p$ -мерних фібрил та вільних мономерів, відповідно,  $\dot{N}_p$  – похідна за часом,  $k_n$  та  $k_e$  означають константи нуклеації та елонгації,  $\delta_{pn_0}$  – фактор корекції, який залежить від швидкості утворення ядра,  $m_0$  та  $n$  – структурні параметри, які означають число мономерів у міцелі та у фібрилі, відповідно,  $L_f$  та  $N_f$  – довжина та кількість фібрил, відповідно,  $c_0$  – початкова концентрація білка.

У 2000 році Серіо поєднав базові положення МОС та НП моделей та сформулював модель нуклеаційно-конформаційної конверсії (НKK) [136]. У рамках цієї моделі перехід із стабільного мономерного стану S в агрегаційно-компетентний стан A здійснюється через структурний інтермедіатний стан розпавленої глобули. Після утворення олігомерного ядра елонгація відбувається за рахунок приєднання мономерів до кінців фібрили. Припускається, що роль структурних інтермедіатів полягає у модифікації маршруту фолдингу білка за рахунок: а) повільної реорганізації у структуроване ядро; б) конформаційних змін мономеру при зв'язуванні з нуклеусом; в) переходу у конформацію з високим ступенем рухливості, яка здатна до швидкої олігомеризації у присутності матриці (нуклеусу).

У 2001 Палліто та Мерфі описали модель позашляхового фолдингу, згідно з якою процес утворення фібрил включає декілька етапів [137]. Зокрема, припускається, що ріст амілоїду починається із денатурованого стану та проходить наступні етапи: 1) рефолдинг денатурованих мономерів у димерний інтермедіатний стан; 2) кооперативна асоціація інтермедіатів у ядро; 3) елонгація нуклеусу у філаменти за рахунок додавання димерного інтермедіату; 4) латеральна асоціація філаментів у фібрили; та 5) їх подальша елонгація. Кінетичні рівняння моделі мають наступний вигляд:

$$\frac{d[I]}{dt} = -nk_n[I]^n - nk_{-n}[N] - k_p[I]\{[N] + \lambda_{f_0}\} + k_{-p}\lambda_{f_0} \quad (1.19)$$

$$\frac{d\lambda_{f_0}}{dt} = k_p[N][I] - k_{-p}[f_{n+1}] - pk_{1a}\lambda_{f_0}^q - \frac{1}{2}\bar{k}_{ij}\lambda_{f_0}^2 \quad (1.20)$$

$$\frac{d\lambda_{f_1}}{dt} = k_p[\Pi]\{(n+1)[N] + \lambda_{f_0}\} - k_{-p}\{n[f_{n+1}] + \lambda_{f_0}\} - pk_{1a}\lambda_{f_1}\lambda_{f_0}^{q-1} \quad (1.21)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\lambda_{f_2}}{dt} = & k_p[\Pi]\{(n+1)^2[N] + 2\lambda_{f_1} + \lambda_{f_0}\} - \\ & - k_{-p}\{n^2[f_{n+1}] + (\lambda_{f_0} - \lambda_{f_1})\} - pk_{1a}\lambda_{f_2}\lambda_{f_0}^{q-1} + \bar{k}_{ij}'\lambda_{f_1}^2 \end{aligned} \quad (1.22)$$

$$\frac{d\lambda_{F_0}}{dt} = k_{1a}\lambda_{f_0}^q - \frac{1}{2}\bar{k}_{ij}'\lambda_{F_0}^2 \quad (1.23)$$

$$\frac{d\lambda_{F_1}}{dt} = pk_{1a}\lambda_{f_1}\lambda_{f_0}^{q-1} \quad (1.24)$$

$$\frac{d\lambda_{F_2}}{dt} = p^2k_{1a}\lambda_{f_2}\lambda_{f_0}^{q-1} + \bar{k}_{ij}'\lambda_{F_1}^2 \quad (1.25)$$

Параметри, використані у рівняннях:  $[f_i]$  – молярна концентрація протофіламентів,  $[F_i]$  – молярна концентрація фібрил,  $[\Pi]$  – молярна концентрація амیلідогенних інтермедіатів,  $k_{ij}$  – константа швидкості елонгації філаментів,  $k_{1a}$  – константа латеральної агрегації філаментів у фібрили,  $k_n$  – пряма константа кооперативної асоціації інтермедіатів у нуклеус,  $k_{-n}$  – зворотна константа дисоціації нуклеусу до інтермедіатів,  $k_p, k_{-p}$  – пряма та зворотна константи додавання/дисоціації інтермедіату до/з ядра,  $[N]$  – молярна концентрація ядра,  $n$  – число інтермедіатів у ядрі,  $p$  – число протофіламентів у фібрилі,  $q$  – порядок реакції самозбірки філаментів у фібрили,  $\lambda_f$  – момент розподілу розміру протофіламентів,  $\lambda_F$  – момент розподілу розміру фібрил.

У 2003 році Чіті зі співавторами розробили феноменологічний підхід для опису процесу агрегації білка на основі фізико-хімічних властивостей поліпептидного ланцюга [138]. У рамках запропонованої моделі фізико-хімічні характеристики білка варіювались шляхом введення мутацій, а також зміною властивостей розчинника. Константи агрегації поліпептиду були виражені наступним чином:

$$\ln(v_{mut}/v_{wt}) = A\Delta Hydr + B(\Delta\Delta G_{coil-\alpha} + \Delta\Delta G_{\beta-coil}) + C\Delta Ch \quad (1.26)$$

$$\log(k) = \alpha_0 + \{\alpha_1 I^{hydr} + \alpha_2 I^{patt} + \alpha_3 I^{ch}\} + \{\alpha_4 E^{pH} + \alpha_5 E^{ionic} + \alpha_6 E^{conc}\} \quad (1.27)$$

де  $v_{mut}, v_{wt}$  – константи агрегації мутантного та нативного білка, відповідно,  $(\Delta\Delta G_{coil-\alpha} + \Delta\Delta G_{\beta-coil})$  означає здатність поліпептидного ланцюга переходити із  $\alpha$ -спіралі у  $\beta$ -лист,  $\Delta Ch$  – зміна заряду білка внаслідок мутації,  $A, B, C$  представляють собою експериментально визначені коефіцієнти,  $I$  та  $E$  означають внутрішні та зовнішні фактори,  $hydr$ , гідрофобність – нормована сума гідрофобних внесків кожного залишку,  $patt$ , паттерність – змінна поведінка гідрофобних та гідрофільних залишків,  $ch$ , заряд – абсолютне значення заряду білка,  $pH$  – рН розчину,  $ionic$  – іонна сила розчину,  $conc$  – концентрація білка.

Наступним вагомим внеском була методологія ван Гестела та Лееву, яка описує фібрилізацію білків у розведених розчинах [128]. Зокрема, авторами була сформульована статистико-механічна модель, яка дозволяє розрахувати наступні параметри фібрили: 1) середній ступінь полімеризації; 2) довжину; 3) вагові фракції агрегатів у розчині. Для розв'язання рівнянь моделі, було розглянуто три випадки граничних умов: а) *випадок А* – кінці фібрили мають неупорядковану структуру, тобто знаходяться не в  $\beta$ -конформації, б) *випадок В* – на кінцях фібрили розташовані мономерні тільки у  $\beta$ -конформації, в) *випадок С* – кінці фібрили можуть приймати як неупорядковану, так й  $\beta$ -конформацію. Відповідні рівняння мають вигляд:

$$\langle N \rangle = \frac{\phi}{\rho}, \quad \rho = z + z^2 k + \frac{xz^3 k^2 \lambda_1}{1 - zk \lambda_1} + \frac{yz^3 k^2 \lambda_2}{1 - zk \lambda_2} + \sum_{p=2}^{p_0} \rho_{fibr}(p) \quad (1.28)$$

$$\phi = z + 2z^2 k + \frac{xz^3 k^2 \lambda_1 (3 - 2zk \lambda_1)}{(1 - zk \lambda_1)^2} + \frac{yz^3 k^2 \lambda_2 (3 - 2zk \lambda_2)}{(1 - zk \lambda_2)^2} + \sum_{p=2}^{p_0} \phi_{fibr}(p) \quad (1.29)$$

де  $\phi$  означає об'ємну фракцію білка (тобто загальну кількість молекул білка в одиниці об'єму),  $\rho$  – розподіл розміру,  $z$  – фугітивність,  $k$  представляє собою коефіцієнт Больцмана, який враховує утворення неупорядкованої структури,

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} + \frac{s}{2} \pm \frac{(1 - 2s + s^2 + 4s\sigma)^{1/2}}{2} \quad - \text{характеристичні числа матриці переносу}$$

мономерів,  $s$  та  $\sigma$  – коефіцієнти, які характеризують взаємодії між неупорядкованими структурами та між  $\beta$ -листами, відповідно,  $x, y$  – це фактори, які залежать від граничних умов,  $p$  – число протофіламентів у фібрилі,  $\rho_{fibr}(p), \phi_{fibr}(p)$  представляють собою коефіцієнти, які визначаються граничними умовами. Середня довжина фібрили для трьох випадків граничних умов визначається як:

$$\begin{aligned}\langle L \rangle_A &= \frac{\langle N \rangle_A(p)}{p} = \frac{2}{1-kz} + \frac{2-(ksfz)^p/f}{1-(ksfz)^p/f} \\ \langle L \rangle_B &= \frac{\langle N \rangle_B(p)}{p} = \frac{2-(ksfz)^p/f}{1-(ksfz)^p/f} \\ \langle L \rangle_C &= \frac{\langle N \rangle_C(p)}{p} = \frac{2-(ksfz)^p/f}{1-(ksfz)^p/f} + \frac{2\sigma^{1/2}kz}{(1+\sigma^{1/2}kz)}\end{aligned}\quad (1.30)$$

де  $f$  – фактор Больцмана вільної енергії латеральних взаємодій.

Решіткова модель утворення фібрили була розроблена у 2008 році Лі та ін. на основі комбінування головних положень моделей МОС, НП та НКК [129]. Згідно цієї моделі, фібрилізація білка протікає у три етапи. На першому етапі утворюються мобільні олігомери різного розміру. На другому етапі ці олігомери асоціюють з утворенням агрегаційно-компетентної компактної, але все ще неупорядкованої структури з численними внутрішньомолекулярними контактами. Нарешті, остання фаза включає формування амілоїдних фібрил шляхом об'єднання маленьких олігомерних кластерів у великий, який відіграє роль матриці. Основні висновки, які були зроблені авторами при аналізі процесу агрегації білка у рамках решіткової моделі, можуть бути сформульовані наступним чином: а) серед кінетичних фаз утворення амілоїду найповільнішою є перша фаза, а найшвидшою – остання; б) кінетика росту фібрили залежить від температури у відповідності до закону Ареніусу; в) ріст фібрил відбувається згідно із теорією Сльозова-Лівшиця, яка припускає, що більші кластери зростають за рахунок маленьких. Іншими словами, додавання у розчин пре-сформованих фібрил прискорює матурацію зростаючого агрегату.

У 2001 році модель НКК була удосконалена Шмітом та співавторами, які запропонували термодинамічну теорію на основі енергетичних ландшафтів різних білкових станів, які приймають участь в утворенні фібрил [139]. Ця теорія розглядає наступні рівноважні стани білка: а) мономери; б) олігомери, що складаються з декількох поліпептидних ланцюгів; в) нуклеус у  $\beta$ -конформації; г) пост-критичний нуклеус із більшим вмістом  $\beta$ -структур; д) протофіламенти, які описуються як протяжні ансамблі  $\beta$ -структур; е) фібрили, що складаються з декількох протофіламентів.

#### **1.4. Фізичні властивості амілоїдних фібрил**

Протягом останніх років, окрім критичної ролі у патогенезі різних захворювань, амілоїдні фібрили були у фокусі багатьох досліджень з точки зору їх унікальних фізичних властивостей, таких, зокрема, як висока еластичність та жорсткість [140]. В основі підвищеної механічної стабільності лежить значна кореляція між механічними характеристиками амілоїдних фібрил та їх структурними параметрами, зокрема, періодичністю, довжиною та товщиною. Міжмолекулярні взаємодії між  $\beta$ -листами сприяють росту фібрилярних агрегатів до мікронних розмірів, що обумовлює їх високу міцність [141,142]. Ця ідея підтверджується експериментальними даними Кетену та ін., які показують, що стекінг  $\beta$ -листів підвищує механічну стабільність кристалів білка [143]. Припускається, що водневі зв'язки відіграють роль хімічного клею між шарами  $\beta$ -листів.

З фізичної точки зору, амілоїдні фібрили розглядаються як супрамолекулярні напівеластичні полімери, які зазнають броунівських рухів у розчині. Взаємодії із молекулами розчинника призводять до постійних флуктуацій полімеру, які залежать від його глобальних фізичних властивостей, зокрема, коефіцієнту жорсткості [2]. Одним із базових підходів до опису напівеластичних полімерів є модель персистентного ланцюга. У рамках цієї моделі полімер розглядається як ланцюг, еластичні властивості якого обумовлені його коефіцієнтом жорсткості [2,144]. Основною характеристикою еластичності полімеру є персистентна

довжина,  $l_p$ . У свою чергу, цей параметр залежить від модуля Юнга,  $E$ , та другого моменту інерції фібрили,  $I$ :

$$l_p = EI/k_B T \quad (1.31)$$

У той час, як  $E$  – це фізичний параметр, який визначається, головним чином, фізико-хімічними характеристиками поліпептидного ланцюга,  $I$  є геометричною характеристикою, що залежить від форми та розмірів поперечного перетину фібрили [3]. З огляду на це, чітке визначення площі поперечного перетину фібрилярних агрегатів є вельми важливим. При відомій структури фібрили, поперечна площа може бути розрахована, наприклад, на основі мікроскопічних зображень, однак у більшості випадків це визначення є проблематичним. Для точних розрахунків геометричних параметрів фібрилярних агрегатів були запропоновані різні типи пакування протофіламентів у зрілій фібрилі (рис. 1.5). Відповідно, для пакування *типу 1* поперечний перетин апроксимується колом з радіусом  $r$ . У цьому випадку персистентна довжина описується наступним рівнянням:

$$l_p \sim n^2 r^4 E/k_B T \quad (1.32)$$

де  $n$  – число протофіламентів у фібрилі. У свою чергу, для пакування *типу 2* поперечний перетин фібрили апроксимується прямокутником, та персистентна довжина дорівнює:

$$l_p \sim n r^4 E/k_B T \quad (1.33)$$

Іншими словами, із цих рівнянь слідує, що більша площа поперечного перетину призводить до вищих значень персистентної довжини та другого моменту інерції. Важлива інформація може бути отримана із порівняння персистентної довжини із контурною довжиною фібрили  $L$ , тобто відстанню між кінцями повністю витягнутого поліпептидного ланцюга. Якщо  $l_p \gg L$ , полімер вважається жорстким, тоді як при  $l_p \ll L$  полімер розглядається як еластичний. Полімери, у яких персистентна та контурна довжини сумірні, є напівеластичними.



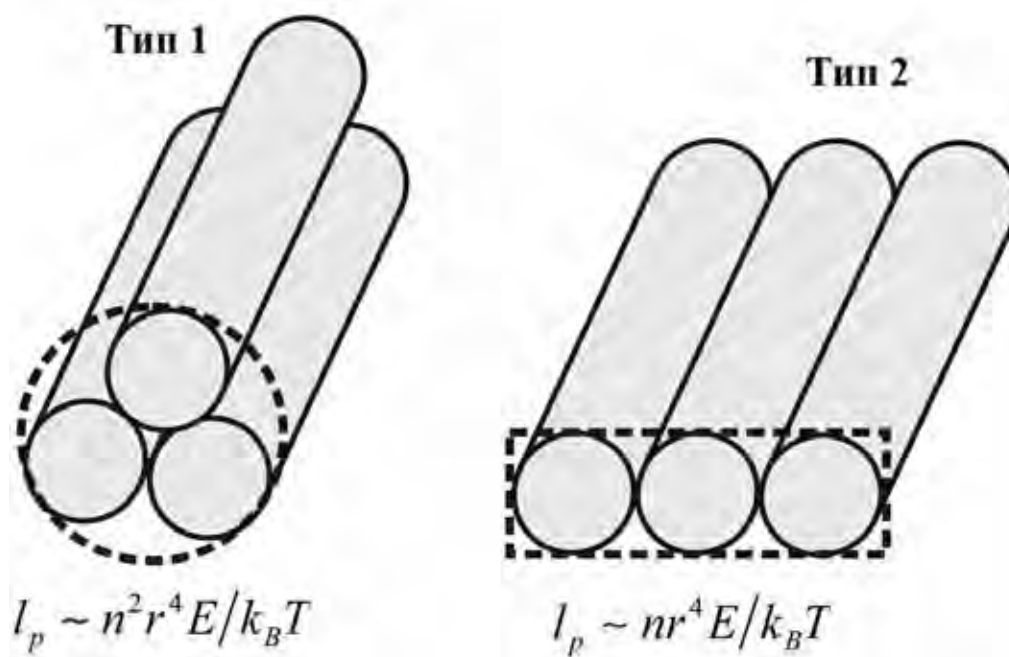


Рис. 1.5. Два типи пакування протофіламентів у фібрилі.

Експериментальні стратегії, що наразі використовуються для вивчення механічних властивостей амілоїдних фібрил, базуються, головним чином, на методі атомно-силової мікроскопії. Різні модифікації АСМ, такі як наноідентифікація, кількісне наномеханічне картування, силова спектроскопія, статистичний аналіз флуктуацій форми, тощо, роблять можливим точне визначення механічних параметрів амілоїдних фібрил [2,146,147]. В ілюстративних цілях, у табл. 1.2 представлені еластичні характеристики трьох амілоїдогенних білків – амуліну, інсуліну та Аβ (1-42) пептиду [147,148]. У таблиці наведені також аналогічні параметри для деяких матеріалів. Як видно з таблиці, модуль Юнга амілоїдних фібрил вище, ніж модуль Юнга шовку, а гранична міцність сумірна із міцністю сталі. Це говорить про те, що фібрилярні агрегати білків представляють собою надзвичайно міцні біоматеріали. Унікальні еластичні властивості амілоїдних структур віддзеркалюють силу внутрішньомолекулярних взаємодій, найміцнішими серед яких є водневі зв'язки. Зокрема, модуль Юнга, який з фізичної точки зору означає енергію, що приходить на одиницю об'єму, є мірою густини енергії взаємодій у фібрилі [2].

Таблиця 1.2

Механічні властивості амілоїдних фібрил та деяких матеріалів

	Модуль Юнга, ГПа	Жорсткість, Н м <sup>-1</sup>	Жорсткість при вигині, $\times 10^{-26}$ Н м <sup>2</sup>	Модуль зсуву, ГПа	Гранична міцність, ГПа	Персистентна довжина, мкМ
<b>Амунін</b>	7-20	0.44-2.2	7.7-38	5.97-6.71	4-8	-
<b>A<math>\beta</math>(1-40)</b>	10-30	0.2-4	10-25	5.6-10.2	-	0.5-100
<b>Інсулін</b>	3.3	0.25	9.1	0.28	0.6	22-43
<b>Шовк</b>	1-10	0.2-4	-	-	1-1.5	-
<b>Гума</b>	0.001- 0.01	-	-	-	0.02- 0.04	-
<b>Сталь</b>	200	-	-	-	0.6-1.8	-

З огляду на те, що значення  $E$  амілоїдних агрегатів досягає величин 10-30 ГПа, максимально можливих для біологічних макромолекул, можна зробити висновок, що фібрилярні агрегати характеризуються найвищою густиною водневих зв'язків, можливою у білкових молекулах. Ця ідея підтверджується моделлю гауссової мережі амілоїдних фібрил, яка розглядає фібрилярні агрегати як ланцюг жорстких мономерів, зв'язаних між собою гауссовою мережею водневих зв'язків [149].

Великий внесок у розуміння механічних властивостей амілоїдних фібрил було зроблено Юном та ін. [141,148]. Незважаючи на те, що автори акцентували свою увагу на дослідженні амуліну, висновки, зроблені у даних роботах, можуть бути екстрапольовані на інші амілоїдогенні білки. Зокрема, основні результати робіт Юна та ін. можуть бути сформульовані наступним чином:

- *жорсткість фібрили є параметром, залежним від довжини, тобто існує критична довжина, вище якої поліпептидний ланцюг стає стабільним та набуває механічного опору. Наприклад, для амуліну критична довжина дорівнює 70 нм, тоді як для A $\beta$  (1-43) ця величина досягає 200 нм. Залежність*

жорсткості від довжини фібрили може бути інтерпретована у рамках теорії опору матеріалів Тимошенко [145]. Аналіз базується на розрахунку загального відхилення, яке визначається як сума відхилень внаслідок деформацій вигину та зсуву. Складні математичні розрахунки зрештою

призводять до виразу для ефективного модулю Юнга  $E_B = E_B^0 \left( 1 + \frac{a}{b} \frac{c E_B^0 I}{G_s A L^2} \right)^{-1}$ ,

де  $E_B^0$  – складова модуля Юнга, незалежна від довжини фібрили,  $G_s$  – внутрішній модуль зсуву,  $I, A, L$  означають другий момент інерції, площу поперечного перетину та довжину фібрили,  $a$  та  $b$  – константи, які залежать від граничних умов,  $c$  – коефіцієнт зсуву, який визначається формою поперечного перетину;

- *закручена конфігурація фібрилярних агрегатів критична для їх механічних властивостей.* Зокрема, коли фібрила знаходиться у плоскій конформації, вона характеризується низькою механічною стабільністю. Тому закручування протофіламентів у зрілій фібрилі є ключовим детермінантом не тільки найбільш термодинамічно вигідної конформації агрегатів, але й особливих механічних властивостей амілоїдів;
- *молекулярна архітектура фібрили у значній мірі впливає на її механічні характеристики,* тобто жорсткість агрегатів варіює в залежності від відносної орієнтації  $\beta$ -листів. Найбільші значення жорсткості відповідають антипаралельному стекінгу  $\beta$ -листів, тоді як паралельна орієнтація призводить до зниження міцності фібрили. Молекулярною основою цього ефекту є так званий порядок контактів, або ступінь нативних водневих контактів. Значення цього параметру для антипаралельної орієнтації  $\beta$ -листів вище, ніж для паралельного пакування, що призводить до вищої жорсткості.

Значна роль морфології у визначенні механічних властивостей фібрили була також виявлена і у інших роботах [150-152]. Наприклад, було продемонстровано, що  $A\beta$  мономери різної довжини утворюють фібрили з різними силами руйнування [150,151]. Окрім цього, у іншій роботі було показано, що модифікація

експериментальних умов у ході росту фібрили призводить до утворення фібрилярних агрегатів  $\alpha$ -синуклеїну з різною морфологією та персистентною довжиною ( $l_p \sim 140$  мкм для прямих фібрил та  $l_p \sim 0.2$  мкм для хвилеподібних) [152]. Еластична поведінка різних амілоїдних поліморфів була також проаналізована у нещодавній роботі Усова та ін. [145]. Спираючись на теорію еластичності Тимошенко, автори отримали рівняння для усередненого другого моменту інерції для трьох найбільш відомих поліморфів амілоїдних фібрил – закручена стрічка (ЗС), спіральна стрічка (СС) та нанотрубка (див. розд. 6). У рамках класичної теорії міцності матеріалів (теорії еластичності) амілоїдні фібрили у конформації закрученої стрічки розглядаються як балка із прямокутним поперечним перетином. Радіус кривизни  $\rho$  такої балки та момент вигину  $M$ , який деформує фібрилу у площині  $xz$ , дорівнює:

$$\frac{1}{\rho} = \frac{M}{EI_y} \quad (1.34)$$

де  $I_y$  – другий момент інерції по відношенню до осі  $y$ .

Енергія балки може бути виражена як:

$$U = \frac{M^2 L}{2D} \quad (1.35)$$

де  $L$  – довжина об'єкту,  $D = EI_x$  – жорсткість при вигині. Розділяючи стрічку на декілька сегментів  $dx$ , отримуємо енергію одного сегменту:

$$dU = \frac{M^2 dx}{2D'(x)} \quad (1.36)$$

де  $D'(x) = EI'(x)$ ,  $I'(x)$  – локальний другий момент інерції поблизу сегменту. Цей момент інерції залежить від кута закручування:

$$I'(\theta) = I_y \cos^2 \theta + I_z \sin^2 \theta - I_{yz} \sin 2\theta \quad (1.37)$$

Опускаючи математичні розрахунки, зрештою отримуємо:

$$U = \frac{M^2 L}{2E \sqrt{I_y I_z - I_{yz}^2}} \quad (1.38)$$

де  $I_{yz}$  – результуючий момент інерції.

Для конфігурації закрученої стрічки  $I_{yz} = 0$ , тому маємо:

$$U = \frac{M^2 L}{2E \sqrt{I_y I_z}} \quad (1.39)$$

де  $\sqrt{I_y I_z} = \langle I \rangle$  – усереднений момент інерції. Для прямокутного поперечного перетину момент інерції по відношенню до осей  $y$  та  $z$  залежить від числа протофіламентів  $n$  у фібрилі та їх розміру  $d$ :

$$\begin{aligned} I_y &= n^3 d^4 / 12 \\ I_z &= n d^4 / 12 \end{aligned} \quad (1.40)$$

Тому усереднений момент інерції для закрученої стрічки дорівнює  $\langle I \rangle_{3C} = n^2 d^4 / 12$ .

Аналогічні математичні перетворення можуть бути зроблені і для конформації спіральної стрічки та нанотрубки:

$$\langle I \rangle_{CC} = \frac{r_2^4 - r_1^4}{8} \sqrt{\varphi^2 - \sin^2 \varphi} \quad (1.41)$$

$$\langle I \rangle_{\text{нанотрубка}} = \left[ a \left( \frac{r^2}{2} + a^2 \right) \sqrt{r^2 - a^2} + r^2 \left( \frac{r^2}{2} - 2a^2 \right) \arccos \left( \frac{a}{r} \right) \right]_{\max(a, r_1)}^{r_2} \quad (1.42)$$

де  $r_1, r_2$  – внутрішній та зовнішній радіуси фібрили,  $\varphi$  – кут сегменту,  $a$  – зсув нейтральної осі від центральної осі (цей параметр відображає асиметричність внесків у загальну енергію, яка виникає внаслідок стиснення та адгезії). Хоча вищенаведені рівняння базуються на деяких наближеннях та припущеннях, тим не менш, вони висвітлюють важливу роль структурних характеристик у наномеханіці амілоїду.

### 1.5. Рідинно-кристалічна поведінка амілоїдів: ізотропно-нематичний фазовий перехід

Колоїдна природа амілоїдних фібрил передбачає складну рідинно-кристалічну поведінку цих систем. Дійсно, було продемонстровано, що білкові фібрилярні агрегати зазнають ізотропно-нематичного (I – N) переходу у воді за

умов низьких об'ємних фракцій [153]. При низькій густині фібрилярні агрегати розподілені випадковим чином у розчині внаслідок домінуючого внеску орієнтаційної ентропії у вільну енергію системи. Однак, коли концентрація набагато вища критичного значення (критична фібрилярна концентрація), основний внесок належить ентропії пакування внаслідок підвищеної частоти зіткнень фібрил (ефект виключеного об'єму). Це призводить до переходу рідких кристалів у нематичну фазу, у якій трансляційна ентропія сприяє паралельній орієнтації фібрилярних структур, тому що така орієнтація мінімізує ефект виключеного об'єму. І – N перехід зазвичай описується у рамках теорії Онзагера, розробленої для прогнозування фазової поведінки анізотропних частинок [154]. Зокрема, для суспензій незаряджених монодисперсних ригідних стержнів довжиною  $L$  та діаметром  $D$ , які взаємодіють між собою, І – N перехід відбувається при об'ємній фракції:

$$\phi_{IN} = 4 \frac{D}{L} \quad (1.43)$$

Це рівняння описує так звану «точку біфуркації», тобто точку співіснування двох фаз. Подальше зростання концентрації частинок приводить до повністю нематичної фази.

У випадку заряджених частинок, параметр  $D$  заміщується ефективним діаметром  $D_{eff}$  для врахування електростатичного відштовхування:

$$D_{eff} = D + \kappa^{-1} \left( \ln A + C + \ln 2 - \frac{1}{2} \right) \quad (1.44)$$

де  $\kappa^{-1}$  – довжина Дебая,  $C = 0.577$  – константа Ейлера,  $A$  може бути виражене як:

$$A = 2\pi\nu_{eff}^2 \kappa^{-1} Q \exp(-\kappa D) \quad (1.45)$$

де  $\nu_{eff}$  – лінійна густина заряду стержня (число зарядів на одиницю довжини),  $Q$  – довжина Б'єрума ( $Q = 0.712$  нм для води при кімнатній температурі). У рамках теорії Онзагера, ізотропно-нематичний перехід описується безрозмірною константою  $c$ , яка визначається силою взаємодій між фібрилами:

$$c = B_2^{iso} \rho \quad (1.46)$$

де  $B_2^{iso} = (\pi/4)D_{eff}L^2$  – другий віріальний коефіцієнт,  $\rho = N/V$  – густина  $N$  фібрил, розподілених в об'ємі  $V$ . Нехтуючи математичними перетвореннями, зрештою маємо:

$$\phi_{IN} = c^* \frac{D^2}{D_{eff}L} \quad (1.47)$$

Використовуючи описаний підхід, Болісенга та ін. отримали фазову діаграму для амілоїдних фібрил  $\beta$ -лактоглобуліну як функцію концентрації білка, рН та іонної сили [155]. Автори дійшли висновку, що збільшення рН та іонної сили уповільнює I – N перехід внаслідок менших значень довжини Дебая та  $D_{eff}$ . Аналогічний висновок був зроблений Лі, який запропонував термодинамічну модель для аналізу ізотропно-нематичного переходу [156]. Шляхом комбінування базових положень моделі нематичного впорядкування лінійних структур та заряджених стержнів з моделлю еластичності амілоїдів, Лі отримав вирази для густини вільної енергії ізотропної та нематичної фаз:

$$f_I = (\chi S_I^2 + 2S_I) e^{-\xi} + \frac{\pi D_{eff} \zeta^2 c_I^2}{4} \quad (1.48)$$

$$f_N = -\frac{4\lambda^*}{P} \left[ \left( \chi - \frac{\zeta}{4\lambda^*} \right) S_N^2 + 2S_N \right] e^{-\xi} + D_{eff} \zeta^2 \sqrt{\frac{\pi\lambda^*}{P}} c_N^2 \quad (1.49)$$

де  $S_{I,N}$  та  $c_{I,N}$  – середні значення параметру агрегації та об'ємної фракції білка в ізотропній та нематичній фазах, відповідно,  $\xi$  та  $\zeta$  – енергія зв'язування та довжина мономеру,  $P$  – персистентна довжина фібрили,  $\lambda^*$  – довжина деплеції фібрили. При співіснуванні двох фаз, для густини вільної енергії маємо вираз:

$$f_{tot}(c_I, c_N) = \nu_I f_I(c_I) + \nu_N f_N(c_N) \quad (1.50)$$

де  $\nu_{I,N}$  означає фракцію ізотропного чи нематичного компоненту системи, відповідно. З огляду на те, що  $\nu_I = (c_N - c_{tot})/(c_N - c_I)$  та  $\nu_N = (c_{tot} - c_I)/(c_N - c_I)$ , пропорція ізотропних та нематичних компонентів може бути отримана шляхом мінімізації густини загальної енергії по відношенню до  $c_I$  та  $c_N$ . Використання цього формалізму для аналізу нематичного впорядкування фібрил лізоциму з

яєчного білка дозволило визначити нижню та верхню граничні концентрації для фазового переходу, які складали 0.65 та 1.05 мМ, відповідно.

## **1.6. Молекулярні детермінанти мембрано-опосередкованої фібрилізації білків**

Як зазначалось вище, все більшого обґрунтування набуває гіпотеза, згідно з якою агрегація білків у більшості випадків ініціюється переходом поліпептидного ланцюга у нестабільну агрегаційно-компетентну конформацію. Цей перехід є можливим, тому що втрата конфігураційної ентропії у процесі фолдингу поліпептиду може суттєво вплинути на компактність нативного стану [157]. Внаслідок незначної різниці між стабілізуючими та дестабілізуючими силами, нативна структура білка вважається лише умовно стабільною, тому будь-які зміни фізико-хімічних властивостей оточення поліпептидного ланцюга можуть виявитись критичними для переходу білка з мономерного до агрегованого стану. Стає все більш очевидним, що у клітині агрегаційний потенціал білка може бути посилений присутністю біологічних мембран [95,158]. Зокрема, превалюючою є ідея про те, що білкові олігомери, утворені на мембранній матриці, з одного боку, відіграють роль нуклеусу для росту амілоїдних фібрил, тоді як з іншого боку, вони представляють собою найбільш токсичні структури, які викликають дестабілізацію мембрани та зрештою спричиняють загибель клітини [10,15,17,20]. Основні детермінанти мембрано-опосередкованої агрегації білків можуть бути визначені наступним чином: а) структурна трансформація поліпептидного ланцюга у агрегаційно-компетентну конформацію, яка характеризується наявністю експонованих ділянок, взаємно комплементарних у термінах гідрофобності, розподілу заряду та здатності утворювати водневі зв'язки; б) підвищення локальної концентрації білка у ліпідній фазі; в) специфічна орієнтація білкової молекули у мембранному оточенні; г) агрегаційно-компетентна орієнтація експонованих та вбудованих у бішар фрагментів білка; д) електростатичне притягання між диполями антипаралельних  $\alpha$ -спіралей, є) ступінь відповідності між гідрофобними ділянками ліпідного бішару та вбудованого фрагменту білка.

### *1.6.1. Роль електростатики у мембрано-опосередкованій агрегації білків*



### *А. Акумуляція білків на поверхні розділу ліпід/вода*

Важливою передумовою самоасоціації мембранозв'язаних поліпептидів є підвищення локальної концентрації поверхнево сорбованих молекул. Для водорозчинних білків цей процес має, здебільшого, електростатичну природу, обумовлену як специфічними, так і неспецифічними взаємодіями. Ступінь неспецифічної акумуляції моно- та полівалентних іонів біля протилежно зарядженої поверхні може бути приблизно оцінена за допомогою теорії подвійного шару Гуї-Чепмена [159]. Наприклад, за фізіологічних умов концентрація моновалентних іонів поблизу мембрани із поверхневим потенціалом -100 мВ у 50 разів вища, ніж у розчині. Неспецифічна акумуляція білків на поверхні мембрани внаслідок довгодіючого кулонівського притягання супроводжується утворенням специфічних іонних контактів між позитивно зарядженими амінокислотними залишками та аніонними головками ліпідів. Утворення чотирьох чи п'яти таких контактів забезпечує сильне білок-ліпідне комплексоутворення із внеском кожного контакту у загальну енергію зв'язування 4-6 ккал/моль [160]. Часткова іммобілізація білка на поверхні мембрани призводить до зближення мономерних молекул, відстань між якими зворотно пропорційна квадратному кореню із числа молекул, які знаходяться у двовимірному просторі (замість кубічного кореня для тривимірного простору) [161]. Акумуляційний ефект мембран може суттєво посилювати агрегаційний потенціал білка внаслідок того, що: а) більш компактний олігомерний стан сорбованих молекул відповідає мінімуму вільної енергії системи; б) знижена активність води сприяє зменшенню розчинності білка; в) підвищена в'язкість середовища призводить до зниження швидкості дифузійних рухів молекул білка [162]. Варто також відзначити, що клітинні мембрани можуть містити ділянки переважної акумуляції окремих білків. У термінах електростатики, домени аніонних ліпідів можуть бути сайтами для акумуляції позитивно заряджених білків, особливо тих, що містять кластери позитивних амінокислотних залишків [163]. Роль поверхневого заряду ліпідного бішару у посиленні агрегаційного потенціалу мембранозв'язаних білків була проілюстрована, наприклад, у роботі

[164]. На основі аналізу змін інтенсивності флуоресценції флуоресцеїн-міченого лізоциму було досліджено сорбцію білка на поверхні модельних мембран, які складались із фосфатидилхоліну та його сумішей у різних пропорціях із фосфатидилгліцерином, фосфатидилсерином чи кардіоліпіном. Трансформація форми ізотерм адсорбції з ленгмюрівської на сигмоїдну була пояснена переходом білка з мономерного в агрегований стан при зростанні поверхневої густини заряду мембрани з  $-0.025 \text{ K/m}^2$  (10 мол% ФГ) до  $-0.05 \text{ K/m}^2$  20 (мол% ФГ). Варто відзначити, що утворення олігомерів білка відбувається у фізіологічному діапазоні молярної фракції ФГ, вказуючи на те, що навіть незначні варіації у вмісті аніонних ліпідів *in vivo* можуть призвести до суттєвих змін в агрегаційному стані мембранозв'язаних білків.

#### *Б. Структурна трансформація поліпептидного ланцюга*

Поряд із роллю матриці для акумуляції мономерних молекул білків, клітинні мембрани забезпечують середовище, яке сприяє переходу поліпептидного ланцюга в агрегаційно-компетентну конформацію [4]. Значна роль у конформаційних перебудовах білка приписується електростатичним ефектам. Поверхнево сорбовані білки знаходяться у середовищі, яке є високо анізотропним у термінах хімічних, структурних та електростатичних властивостей. Мережа внутрішньомолекулярних зв'язків молекули білка може зазнавати суттєвої реорганізації у відповідь на: а) електричне поле, створене зарядженими ліпідними групами, диполями фосфохоліну, карбонілу та поверхневого шару води; б) зміни діелектричної проникності, типу іонів, іонної сили та рН, у порівнянні з розчином; в) утворення іонних контактів зі специфічними ліпідними групами. Необхідно відзначити, що характер змін може бути різним в залежності від структурних та фізико-хімічних особливостей взаємодіючих молекул. Внаслідок значних відмінностей у структурі білків та пептидів, які можуть бути згорнутими чи незгорнутими, збагаченими  $\alpha$ -спіралями чи  $\beta$ -листами, тощо, не існує єдиного механізму ініціювання ліпідами трансформації поліпептидного ланцюга з нативного у агрегаційний стан. Для нативно згорнутих білків основний тип конформаційного переходу на поверхні розділу ліпід/вода полягає у частковому

розгортанні до стану розплавленої глобули, який наразі вважається основним структурним інтермедіатом на шляху олігомеризації та фібрилізації [4]. Ключова роль електростатичних взаємодій в утворенні такої конформації переконливо продемонстрована для катіонного білка цитохрому *c*, ступінь розгортання якого збільшувалась із ростом молярної фракції аніонних ліпідів у складі мембрани [165]. Інші приклади представлені ацетилхолінестеразою [166], бактеріальними токсинами [167], інсуліном [14], фосфоліпазою  $A_2$  [168] та рекомбінантним пріонним білком [169]. Серед факторів, які можуть спричиняти розгортання білка на поверхні негативно зарядженої мембрани, варто виділити нейтралізацію поверхневого заряду білка аніонними ліпідними голівками та посилене електростатичне відштовхування між боковими амінокислотними залишками, яке супроводжується експонуванням схильних до агрегації неполярних ділянок. Окрім цього, сильне електростатичне поле, що створюється у ліпідних доменах, також може сприяти розгортанню поліпептидного ланцюга.

На противагу цьому, нативно розгорнуті білки та пептиди характеризуються тенденцією до переходу у більш структуровану конформацію, яка передуює самоасоціації у мембранному оточенні. Подібні ефекти були продемонстровані для  $\alpha$ -синуклеїну [4], амуліну [170], протоміозину  $\alpha$  [171] та  $A\beta$ -пептиду [172]. Зокрема, було показано, що аніонні ліпіди викликають перехід  $\alpha$ -синуклеїну із невідпорядкованої конформації у конформацію амфipатичної  $\alpha$ -спіралі [97], гідрофобна поверхня якої є агрегаційно-компетентною. Було також зроблено припущення, що  $\alpha$ -спіральні олігомери є префібрилярними інтермедіатами [173]. Примітно, молекулярний механізм впливу ліпідів на конформацію білка залежить також від молярного співвідношення ліпід:білок. Так, наприклад, при низькому ступені покриття поверхні мембрани  $A\beta$ -пептид приймає конформацію  $\alpha$ -спіралі, тоді як при високій поверхневій концентрації пептиду домінантною стає  $\beta$ -структура [174].

#### *В. Специфічна орієнтація сорбованого білка*

Інший електростатично-контрольований детермінант посилення олігомеризації білків у мембранному оточенні полягає у специфічному

розташуванні мономерних молекул відносно поверхні розділу ліпід/вода. Завдяки нерівномірному розподілу заряджених амінокислотних залишків, молекула білка намагається прийняти найбільш термодинамічно вигідну орієнтацію у електричному полі мембрани [175]. Так, зокрема, за допомогою методу індуктивно-резонансного переносу енергії специфічна орієнтація була виявлена для цитохрому *c* при зв'язуванні з кардіоліпін-вміщуючими ліпідними мембранами [176]. Зважаючи на здатність цитохрому *c* утворювати амілоїдоподібні агрегати у присутності негативно заряджених мембран [177], можна припустити, що цей процес починається із олігомеризації специфічно орієнтованих мономерних молекул. Численні дослідження антимікробних та амілоїдогенних білків та пептидів свідчать на користь переходу між поверхневою та трансмембранною локалізацією при підвищенні локальної концентрації сорбату, які відрізняються за своєю агрегаційною здатністю [161,178]. Наприклад, кластеризація амуліну, зв'язаного з негативно зарядженим ліпідним бішаром, спостерігалась лише при високій поверхневій концентрації пептиду та при орієнтації мономерних молекул перпендикулярно поверхні мембрани [17], висвітлюючи електростатичні білок-ліпідні взаємодії як важливий топологічний детермінант [180].

#### *1.6.2. Гідрофобний ефект як рушійна сила агрегації білків*

Загальноприйнятою наразі є ідея про те, що ключову роль в ініціації агрегації білків та забезпеченні стабільності агрегованих структур відіграє гідрофобний ефект. Для мінімізації ентропійних затрат, пов'язаних із впорядкуванням молекул води навколо неполярних фрагментів поліпептидного ланцюга, які експонуються за певних умов, молекули білка олігомеризуються з утворенням димерів чи агрегатів вищого порядку, які стабілізуються короткодійними гідрофобними взаємодіями із вільною енергією  $0.1 \text{ кДж/моль/Å}^2$ . Гідрофобність, заряд та здатність приймати  $\beta$ -конформацію вважаються основними детермінантами агрегаційного потенціалу білка [138]. Означені передумови, поряд із підвищенням локальної концентрації, конформаційними змінами та специфічною орієнтацією білкових молекул, можуть бути створені гідрофобними білок-ліпідними

взаємодіями. Гідрофобність сама по собі може лежати в основі акумуляції білка на поверхні мембрани, як було продемонстровано у ряді робіт по дослідженню розподілу білків та пептидів між водною та ліпідною фазами [181]. Окрім цього, існують докази на користь того, що незаряджені ліпідні домени можуть бути матрицею для кластеризації мономерів та їх послідууючої агрегації [182].

Відмітимо, що згортання частково чи повністю вбудованого у мембрану білка відрізняється від фолдінгу у розчині внаслідок конкуренції між неполярними групами ліпідів та білків за гідрофобні взаємодії. Перенос неполярної амінокислоти з водної у неполярну ліпідну фазу супроводжується виграшем енергії, який вважається основною рушійною силою фолдінгу мембранозв'язаних білків [183]. Агрегаційна здатність поліпептидного ланцюга контролюється балансом між силами, що стабілізують мономерний стан, та самоасоціацію гідрофобних фрагментів амінокислотної послідовності в олігомерне ядро. Цей баланс визначається відношенням висот енергетичних бар'єрів фолдінгу та агрегації [184]. Хоча наразі неможливо встановити точний взаємозв'язок між характером рефолдінгу білка у мембранному оточенні та змінами його агрегаційної здатності, були з'ясовані деякі особливості цих процесів. Зокрема, було показано, що гідрофобні та електростатичні білок-ліпідні взаємодії мають різний вплив на структуру білка та ступінь його олігомеризації. Наприклад, асоціація білка PrP з негативно зарядженими мембранами призводила до зростання вмісту  $\beta$ -структур, тоді як зв'язування з цвіттеріонними ліпідами супроводжувалось утворенням  $\alpha$ -спіралей [180]. Інший приклад представлений A $\beta$ -пептидом, характер структурних змін якого був різним при заякорюванні у мембрані гідрофобної С-термінальної ділянки чи гідрофільної N-термінальної ділянки, що призводило до експонування сегментів із різною рухливістю та різним шляхом згортання [185]. Було також зроблено припущення, що білкові молекули, які зв'язані з мембраною електростатичними взаємодіями, більш рухливі та характеризуються кращою здатністю приймати просторову конфігурацію, сприятливу для утворення  $\beta$ -листів, у порівнянні із білками, міцно зв'язаними з ліпідами гідрофобними взаємодіями [186]. Більш того, початкова

орієнтація білкових молекул на поверхні заряджених чи нейтральних мембран може також бути різною, обумовлюючи різні тенденції до самоасоціації.

Інший механізм, за допомогою якого мембрана може модулювати агрегаційну здатність білка, полягає у варіюванні глибини вбудовування поліпептидного ланцюга у ліпідний бішар. При цьому ступінь олігомеризації визначається електростатичними та гідрофобними властивостями вбудованої у бішар та локалізованої на поверхні мембрани ділянок білка, а також здатністю цих сегментів утворювати водневі зв'язки [10].

Необхідно зазначити, що агрегація білка у мембранному оточенні супроводжується значною реорганізацією усіх компонентів системи, включаючи білок, мембрану та зв'язану воду. Як було теоретично передбачено, агрегація може бути результатом невідповідності у розмірі між гідрофобною частиною вбудованого білка та товщиною неполярної ділянки бішару, що створює немонотонну силу між білками внаслідок еластичних деформацій мембрани. Окрім цього, локальні зміни еластичності мембрани, викликані білком, разом із тепловими флуктуаціями можуть призвести до ван-дер-Ваальсового дальнодіючого притягання між мономерами білка [187]. Цікаво, порівняння енергії ліпід-ліпідних взаємодій із енергією взаємодій між  $\alpha$ -спіралями та між ліпідами і  $\alpha$ -спіралями показало, що навіть незначне збільшення ступеня впорядкованості ацильних ланцюгів може призвести до олігомеризації трансмембранних  $\alpha$ -спіралей [188].

### *1.6.3. Водневі зв'язки як детермінант агрегаційної здатності білка*

Окрім електростатичних та гідрофобних взаємодій, процес мембрано-опосередкованої агрегації білка може контролюватись водневими зв'язками. Ці зв'язки відіграють важливу роль у стабілізації структури мембранозв'язаних білків, тому що у ліпідному середовищі відсутні конкурентні взаємодії між молекулами води та донорно-акцепторними групами водневих зв'язків поліпептидного ланцюга [189]. Разом з цим, водневі зв'язки вважаються однією з основних рушійних сил агрегації білка. Рядом авторів було висловлено припущення, що білкові агрегати стабілізуються неспецифічними

міжмолекулярними водневими зв'язками між незахищеними кінцями поліпептидного ланцюга [190,191]. Інший механізм, згідно з яким водневі зв'язки можуть бути залучені до самоасоціації білка, базується на так званій дегідронній гіпотезі [192]. Водневі зв'язки між амідними та карбонільними групами, доступні для води, були визначені Фернандезом як дегідрони [192]. Основна ідея полягає у тому, що структурні мотиви, такі як недостатньо десольватовані («незахищені») гідрофобні ділянки, сольові містки чи водневі зв'язки, представляють собою високореактивні групи. Видалення води з цих груп у процесі білок-білкових взаємодій є енергетично вигідним. Хоча гідрофобні ділянки визначаються як найбільш ймовірні області міжмолекулярних контактів у білкових агрегатах, кількість таких ділянок невелика внаслідок того, що для більшості білків відношення гідрофільних до гідрофобних амінокислотних залишків дорівнює 7:1 – 10:1 [192]. Окрім цього, умова відповідності між гідрофобними сайтами асоціюючих білків не завжди виконується, тому що це потребує специфічної орієнтації та певної глибини вбудовування поліпептидного ланцюга у мембрану. З огляду на це, можна припустити, що інші групи, зокрема, недостатньо дегідратовані водневі зв'язки, можуть вносити суттєвий внесок в утворення агрегатів білка. Нещодавні дослідження виявили взаємозв'язок між агрегаційною здатністю білка та ступенем «незахищеності» водневих зв'язків між амідними та карбонільними групами. Було продемонстровано, що чим менше водневі зв'язки захищені від води, тим вищим є амілоїдогенний потенціал білків та їх спорідненість до ліпідного бішару [191]. Показано, що білок-ліпідні комплекси, стабілізовані такими водневими зв'язками, відіграють визначальну роль в процесі нуклеації амілоїдних фібрил. Таким чином, можна зробити висновок, що часткове експонування гідрофобних зв'язків у воду є важливим детермінантом реактивності білка, який треба мати на увазі при дослідженні молекулярних засад агрегації поліпептидів.

### **1.7. Біомедичні та біотехнологічні застосування амілоїдів**

Незважаючи на те, що акцент у дослідженнях амілоїдних фібрил суттєво зміщений у бік з'ясування їх патологічної ролі, ці високовпорядковані агрегати,

завдяки своїм унікальним фізичним властивостям, привертають все більшу увагу як можливі компоненти наноматеріалів для різноманітних біотехнологічних, медичних та промислових застосувань (табл. 1.3) [8]. Одним із прикладів останніх досягнень у цій галузі є нанопроводи із пріонного детермінанту Sup35p. Можливість варіювання хімічного складу, товщини та довжини, оптичних, механічних та електричних властивостей таких фібрил створює передумови для розробки нових класів наноелектронних приладів. Переваги амілоїдних структур перед синтетичними полімерами полягають у значно більшій гнучкості, біосумісності, здатності до біодеградації, термо- та хімічній стабільності, тощо. У біотехнологічному аспекті амілоїдні фібрили є дуже перспективним матеріалом для створення скаффолдів для 3D клітинних культур та тканинної інженерії.

Таблиця 1.3

Застосування амілоїдних фібрил у біонанотехнології

<b>Фібрилярний білок</b>	<b>Застосування</b>	<b>Посилання</b>
Транстиретин	Адгезія клітин	[192]
$\alpha$ -синуклеїн	Гідрогель для іммобілізації ферментів	[152]
Sup35p	Нанопроводи	[194]
інсулін	Нанопроводи для оптоелектронних застосувань	[195]
	Світловипромінюючі діоди	[196]
лізоцим	Тонкі плівки	[197]
b2-мікроглобулін	Нанопористі матриці	[198]
GnRH-гормон	Доставка ліків	[9]

Окрім цього, амілоїдні структури можуть знайти застосування у медицині, зокрема, при створенні біосумісних гідрогелів для інкапсуляції та контрольованої доставки лікарських препаратів. У даному підрозділі будуть висвітлені основні застосування амілоїдних фібрил у якості природних наноматеріалів.

#### *1.7.1. Амілоїдні фібрили як біоактивні матриці для інжинірингу тканин*



Розробка біосумісних наноматриць, що створюють середовище, придатне для росту клітин *in vivo*, є надзвичайно актуальною проблемою. Структури, основані на білкових асоціатах, представляють собою перспективні біоматеріали, які імітують міжклітинну матрицю, яка сприяє адгезії клітин, міграції та диференціації [200,201]. Так, Чанг зі співавторами розробили новітні самокомплементарні пептиди із високим вмістом  $\beta$ -листів, використовуючи позитивні чи негативні L-амінокислоти, які здатні самоасоціювати за фізіологічних умов та формували гідрогелі [203]. Ці фібрилярні пептиди утворювали протяжні мережі, які відігравали роль підложки для іммобілізації клітин та їх послідууючої диференціації та росту. Окрім цього, було показано, що матриці, сформовані пептидними агрегатами, та функціоналізовані різними агентами (наприклад, остеогенний пептид росту для культур тканин остеобластів) є перспективним матеріалом для тривимірних систем клітинних культур [204].

Іншим прикладом використання амілоїдів для інжинірінгу клітин є робота, де було продемонстровано здатність матриць із фібрилярних пептидів сприяти проліферації та остеогенній диференціації клітин мишей культури MC3T3-E1, що свідчить про можливість використання амілоїдних фібрил у інжинірінгу клітин кісток [205]. Фібрилярні агрегати були також успішно застосовані для процесу васкуляризації, де вони імітували міжклітинний простір міокарду [206]. Окрім цього, Кісідей та ін. показали, що гідрогель, утворений амілоїдними фібрилами пептиду KLD-12, є ефективним скаффолдом для продукції та акумуляції хрящових клітин при репарації тканин [201]. У свою чергу, Грас зі співавторами використали фрагмент амілоїдогенного білку транстиретину для конструювання амілоїдних матеріалів для адгезії клітин, міграції та диференціації [193]. Амілоїдні фібрили містили додатковий структурний мотив RGD (амінокислоти Arg-Gly-Asp), який сприяє адгезії клітин. Авторами було показано, що сконструйований пептид швидко самоасоціює у водному розчині з утворенням амілоїдних фібрил, які характеризуються біоактивністю та здатністю взаємодіяти із клітинами.

Ще одним напрямом використання амілоїдних агрегатів в інжинірингу є стабілізація стовбурових клітин. Стовбурові клітини відзначаються здатністю до самовідновлення та диференціації у різні типи спеціалізованих клітин. Як наслідок, вони представляють найбільш універсальне джерело клітин для регенерації старих, ушкоджених та патологічних клітин. Однак, основним недоліком використання стовбурових клітин у терапії є необхідність підтримки активного стану клітин *ex vivo*. *In vivo* ці клітини існують у спеціальному мікрооточенні, відомому як «ніша стовбурових клітин». Це стало підґрунтям для ідеї, що імітація цієї «ніші» може привести до покращення контролю за відновленням стовбурових клітин та їх диференціацією *ex vivo*. Одним з основних компонентів «ніші» є міжклітинна матриця, яка відіграє роль структурної підложки для клітин, регулює їх ділення, адгезію і міграцію, та приймає участь у передачі сигналу. Жорсткість матриці та її топографія були ідентифіковані як два основних параметри, що контролюють функціонування стовбурових клітин. З огляду на можливість варіювання мікроструктури та механічної жорсткості амілоїдних фібрил, рядом авторів було запропоновано, що ці агрегати можуть бути використані у якості платформи для росту стовбурових клітин *in vitro*, їх диференціації та імплантації *in vivo*. Наприклад, у той час, як висока жорсткість амілоїдних фібрил може бути використана для диференціації стовбурових клітин у нейробласти, висока впорядкованість агрегатів створює передумови для застосування амілоїдів при диференціації цих клітин у нейрони [207]. Окрім цього, було запропоновано, що зміни взаємної орієнтації протофіламентів у фібрилі забезпечать диференціацію стовбурових клітин у клітини скелетних м'язів, суглобових хрящів чи кровоносних судин [8]. У свою чергу, Ім із співавторами показали, що мережа амілоїдних фібрил сприяла диференціації нейронів без додавання ретиноїдної кислоти [208].

#### 1.7.2. Нові системи доставки ліків на основі амілоїдів

Лікарські препарати білкової природи потребують спеціальних систем доставки, які б захищали їх від деградації протеазами [209]. У цьому аспекті

перспективним є використання нанопереносників на основі фібрилярних агрегатів. Зокрема, було показано, що кристалізація інсуліну та TGF- $\beta$ 3 забезпечує ефективний механізм вивільнення лікарського препарату, при якому мікрокристали виконують роль захисного резервуару для ліків [210]. Окрім цього, було показано, що амілоїдні фібрили, утворені *in vivo* аналогами гормону гонадотропіну, можуть слугувати системою доставки ліків, забезпечуючи їх вивільнення *in vitro* та *in vivo* [199]. Однією із переваг амілоїдних фібрил як систем доставки фармакологічних препаратів є їх здатність контролювано вивільнювати ліки протягом кількох тижнів. Однак, при цьому амілоїдні фібрили повинні бути нетоксичними та повинні не взаємодіяти із патологічними фібрилярними агрегатами [8]. Одним з прикладів використання амілоїдів у якості систем доставки ліків є робота Нагаї та ін., у якій було показано, що впорядковані агрегати пептиду RADA 16 можуть бути успішно застосовані як системи повільної доставки малих молекул, а також таких білків як лізоцим, альбумін та імуноглобулін G [211]. Інші успішні розробки включають конструювання нанопереносників ферментів на основі фібрилярного  $\alpha$ -синуклеїну, а також переносу ліків на основі амілоїдних агрегатів  $\beta_2$ -мікроглобуліну [119,207].

### 1.7.3. Розробка металевих нанопроводів та біосенсорів

Самоасоціація амілоїдогенних білків та пептидів у фібрилярні агрегати привертає також увагу при дизайні нанопроводів та наноелектронних матеріалів. Так, наприклад, нанотрубки, сформовані самоасоціатами феніл-фенілового діпептиду з центрального фрагменту амілоїд- $\beta$ -пептиду, були використані у якості матриці для утворення металевих нанопроводів [212,213]. Основними перевагами таких нанотрубок є простота формування та біодеградація. У роботі [194] для конструювання металевих нанопроводів, здатних проводити електричний струм низького опору, було використано NM-домен пептиду Sup35p. Процедура дизайну нанопроводу включала утворення цистеїнового мутанту NM-домену, його фібрилізацію, нанесення тонкого шару золота на фібрили, сорбція іонів срібла на фібрилярну матрицю. Еміні із співавторами показали, що амілоїдні

фібрили можуть бути використані не тільки для створення нанопроводів, але й для удосконалення характеристик провідних матеріалів [214]. Зокрема, виявлено, що електрохімічні властивості графітних та золотих електродів суттєво покращуються при розташуванні на їх поверхні пептидних нанотрубок. Цей факт вказує на можливість застосування амілоїдних фібрил для розробки біосенсорів із високою продуктивністю, адже нові нанокompозитні матеріали можуть бути створені шляхом інтеграції фібрилярних агрегатів із полімерами. Герланд та ін. поєднали напівпровідні олігоелектроліти з фібрилярним інсуліном для дизайну електроактивних люмінесцентних фібрилярних нанопроводів [195]. У роботі [196] декорування амілоїдних фібрил інсуліну люмінесцентним полімером PPF дозволило авторам розробити високопродуктивні світловипромінюючі діоди, а у роботі [215] було створено електрично активні нанопроводи шляхом кон'югації полімеру PEDOT з фібрилами інсуліну. Окрім цього, можливість функціоналізації поверхні амілоїду лігандами, такими як флуорофори, ферменти, короткі пептиди, тощо, може бути використана при розробці біосенсорів, адже хімічна та біологічна активність лігандів підвищується при їх іммобілізації на поверхні фібрили. Так, результатом іммобілізації органофосфат-гідролази амілоїдними фібрилами інсуліну за допомогою агенту глутаральдегіду було значне зростання термічної стабільності ферменту [9].

## **1.8. Короткі висновки до Розділу 1**

1. У процесі фібрилізації білків ліпідний бішар не тільки відіграє роль матриці, на якій відбувається агрегація, але й може бути прямою мішенню для токсичної дії білкових олігомерів та фібрил. Критична роль мембран в ініціації фібрилізації білків та амілоїд-індукованій загибелі клітини дає підстави для постановки питання, яким чином фізичні та хімічні властивості поверхні розділу ліпід-вода впливають на процес самозбирання амілоїду. Дати відповідь на це запитання виключно важливо не тільки для більш глибокого розуміння молекулярних основ конформаційних хвороб, але і для розробки ефективних стратегій для їх запобігання та лікування.

2. Аналіз сучасного стану досліджень патогенних білкових агрегатів вказує на актуальність проблем, пов'язаних з розробкою нових методичних підходів до детектування, характеристикації та модуляції процесу утворення амілоїдів на ліпідних матрицях. У цьому контексті, важливо охарактеризувати: i) фактори, відповідальні за посилення амілоїд-утворюючої здатності білків у мембранному оточенні; ii) агрегаційно-компетентні конформаційні стани пептидів та білків, адсорбованих на поверхні розділу; iii) вплив амілоїдних інтермедіатів різних типів на молекулярну організацію ліпідного бішару; iv) структурні особливості ліпід-індукованих білкових агрегатів; v) дію різноманітних чинників на процес самозбирання амілоїду на поверхні розділу ліпід-вода.

3. Завдяки своїм унікальним фізичним властивостям, амілоїдні агрегати є перспективними наноматеріалами. Основні області використання амілоїдів у біотехнології включають доставку ліків, інжинірінг тканин, створення нанопроводів та біосенсорів. Розширення сфери біомедичних застосувань амілоїдних фібрил потребує подальшого всебічного дослідження особливих структурних та фізичних властивостей фібрилярних агрегатів, що утворюються у мембранних системах.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Матеріали

У роботі використовували лізоцим з яєчного білка, цитохром *c* з серця коня, HEPES, Тіофлавін Т, пірен, флуоресцеїн 5'-ізотіоціанат, родамін-ізотіоціанат, пірен-малеїмід, дитіотреїтол (ДТТ), ЕДТА фірми Sigma (St. Louis, MO, USA). 1-пальмітоїл-2-олеоїл-*sn*-гліцеро-3-фосфохолін (ФХ), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-*sn*-гліцеро-3-фосфо-*rac*-гліцерол (ФГ), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-*sn*-гліцеро-3-фосфо-*rac*-серин (ФС) та холестерин (Хол) фірми «Avanti Polar Lipids» (USA), кардіоліпін (КЛ) концерну «Біолік» (Харків), дифенілгексатрієн (ДФГТ) фірми «EGA Chemie» (Німеччина), 1-етил-3-[3-діметиламінопропіл]карбодіїмід гідрохлорид (ЕДГ), DyLight 549 (DyL<sub>549</sub>) фірми Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA), SeTau-647-di-NHS (SeTau<sub>647</sub>) фірми SETA Biomedicals (Urbana, IL, USA). 2-(4,4-дифлуоро-5-метил-4-бора-3а,4а-діаза-*s*-індацен-3-додеканоїл)-1-гексадеканоїл-*sn*-гліцеро-3-фосфохолін (BODIPY-ФХ) фірми Invitrogen (Carlsbad, CA), 1-(1,2-діацил-*sn*-гліцеро-3-фосфо)-3-{1'-[7-(4,4-дифлуоро-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-діаза-*s*-індацен-8-їл)гептаноїл]-2'-ацил-*sn*-гліцеро-3-фосфо}гліцерол (BODIPY-КЛ) було синтезовано, як описано у [217]. Продан був із фірми Molecular Probes (Eugene, OR, USA), 4-диметиламінохалкон (ДМХ) та 3-метоксибензантрон (МБА) були із фірми Zonde (Латвія). Антрілвініл-мічені ФХ та КЛ (АВ-ФХ та АВ-КЛ) були синтезовані в Інституті Біоорганічної Хімії ім. М.М. Шемякіна та Ю. О. Овчинникова (м. Москва, Росія) [218]. Бензантронний флуорофор АБМ було синтезовано методом нуклеофільного заміщення атому

броду в молекулі 3-бромобензантрону в Даугавпільському університеті, м. Даугавпілс, Латвія [219]. Сквараїновий зонд SQ-1 та його структурний аналог поліметиновий зонд V2 було синтезовано в Університеті Софії «Св. Клімент Охридський», м. Софія, Болгарія [220]. N-термінальний фрагмент 1-83 аполіпопротеїну A-I та його монотриптофанові варіанти були синтезовані в університеті м. Токушіма, Японія [221].

## **2.2. Формування моношарів Ленгмюра**

Для формування моношарів Ленгмюра тефлонову комірку заповнювали 1.3 мл фільтрованого 10 мМ HEPES буфера, pH 7.4. Мономолекулярну ліпідну плівку формували шляхом нанесення розчину ліпідів у хлороформі (100 мкМ) за допомогою шприця Гамільтону на поверхню буфера до досягання бажаного початкового тиску (5 – 25 мН/м). Після стабілізації моношару, 25 мкл фібрилярного чи мономерного лізоциму додавали у субфазу. Зміни поверхневого тиску ліпідного моношару реєстрували за допомогою тензіометру DeltaPi-4 (Kibron, Фінляндія).

## **2.3. Формування бішарів на підложці**

Для формування ліпідних бішарів на підложці спочатку готували ліпосоми, як описано у підрозділі 2.4. Флуоресцентно-мічені ліпіди BODIPY-ФХ та BODIPY-КЛ додавали перед випаровуванням розчинника. Мольна частка цих ліпідів складала 0.3 мол%. Ліпідні бішари на підложці формували методом злиття ліпосом [222] у камерах, що склалися із предметного скла, до якого було приєднано два покривних скла. Камери очищували сонікацією протягом 30 хвилин при температурі 50 °C з використанням розчину детергенту, а потім промивали етанолом та очищеною водою. Далі камери відразу заповнювали суспензією ліпосом, що містила 100 мкМ ліпиду та 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Після інкубації протягом 20 хвилин у темряві, надлишок ліпосом змивали робочим буфером. Для позначення ліпідних бішарів, що містили 5 чи 25 мол% КЛ у тексті роботи (розділ 3) використовували скорочення КЛ5 та КЛ25, відповідно.

## **2.4. Формування ліпосом**

Уніламелярні ліпосоми різного складу готували методом екструзії [223]. Розчини ліпідів в етанолі чи хлороформі змішували в необхідних пропорціях та поміщали під вакуумний насос на 10-30 хвилин (в залежності від складу ліпосом) для випаровування розчинника. Ліпідні плівки гідратували 5 мМ натрій-фосфатним буфером чи 20 мМ HEPES буфером, рН 7.4. Одержані таким чином мультиламелярні ліпосоми пропускали крізь полікарбонатний фільтр з діаметром пор 100 нм за допомогою екструдеру. Концентрацію ліпиду визначали за методикою Бартлета [224].

## **2.5. Ковалентне мічення лізоциму флуоресцентними мітками**

*Мічення флуоресцеїном.* Реакційна суміш, що містила еквімолярну кількість Fl та лізоциму, була приготовлена у 100 мМ боратному буфері. Після інкубації розчину при 25 °С протягом 90 хвилин за умов постійного перемішування у темряві, рН було доведене до 7.4. Далі, розчин діалізували при 4 °С проти 20 мМ HEPES, рН 7.4. Ступінь мічення визначали, використовуючи коефіцієнти екстинкції  $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для Fl на 494 нм та  $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  на 280 нм для лізоциму. Отримане значення молярного відношення флуоресцеїн/білок складало 1.76.

*Мічення DyLight 549.* 0.5 мг лізоциму розчиняли у 0.5 мл 20 мМ HEPES, рН 7.4. Далі отриманий розчин змішували із ДТТ для відновлення дисульфідних зв'язків білка. Молярне відношення ДТТ:лізоцим дорівнювало 10:1. Після цього суміш інкубували протягом 1.5 годин при постійному перемішуванні та діалізували 2 години проти 20 мМ HEPES, рН 7.4. Розчин лізоциму з відновленими дисульфідними зв'язками змішували із DyL<sub>549</sub>, приготованого шляхом розчинення 1 мг мітки у 1 мл ДМСО. Реакційну суміш інкубували 2 години при 37 °С у темряві, а потім центрифугували при 14000 g 10 хвилин для преципітації білкових агрегатів, що можуть бути присутні у розчині. Після цього, супернатант, який містив мономери лізоциму, мічені DyL<sub>549</sub>, та вільну мітку, діалізували проти 20 мМ HEPES, рН 7.4 для розділення зв'язаного та незв'язаного барвника. Концентрацію білка та ступінь мічення (D/P) визначали спектрофотометричним методом, вимірюючи поглинання кон'югату на 280 та 562 нм, використовуючи



коефіцієнти екстинкції  $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  та  $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для лізоциму та  $\text{DyL}_{549}$ , відповідно. Розраховане таким чином D/P дорівнювало 0.35.

*Мічення SeTau-647-di-NHS.* Стоковий розчин лізоциму готували, розчиняючи 1 мг білка у 1 мл боратного буферу, pH 9. Перед приготуванням реакційної суміші функціональні групи мітки були додатково активовані, шляхом розчинення 1 мг  $\text{SeTau}_{647}$  та 0.4 мг ЕДГ у 1 мл фосфатного буферу, pH 7.4. Після цього розчини білка та активованої мітки змішували та інкубували при постійному перемішуванні протягом 6 годин. Після інкубації вільний та зв'язаний барвник було розділено за допомогою гель-фільтраційних колонок Sephadex G25. Для запобігання деградації  $\text{SeTau}_{647}$  усі розчини були обернені у фольгу та зберігались у темряві. Відношення D/P визначали, вимірюючи поглинання кон'югату при 280 та 650 нм та використовуючи коефіцієнти екстинкції  $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (280 нм) та  $3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (650 нм) для лізоциму та  $\text{SeTau}_{647}$ , відповідно. Отримане значення D/P складало 0.15.

## 2.6. Приготування амілоїдних фібрил лізоциму та аполіпопротеїну A-I

Фібрилярні агрегати лізоциму отримували двома способами. При застосуванні першого способу реакція фібрилізації лізоциму була ініційована, згідно з методологією Холлі та ін. [225]. Розчин білка (3 мг/мл) готували шляхом розчинення лізоциму у деіонізованій воді з послідовним повільним додаванням етанолу до кінцевої концентрації 80%. Далі, зразки ставили на постійне перемішування протягом 30 днів при кімнатній температурі. При дослідженні асоціації префібрилярних інтермедіатів лізоциму з модельними ліпідними мембранами використовували білкові олігомери, які утворились протягом лаг-фази реакції фібрилізації (9-10 днів). При отриманні фібрил лізоциму другим способом, білок розчиняли у 10 мМ гліциновому буфері (10 мг/мл), pH 2.0, та інкубували у термостаті при температурі при 60 °C протягом 7-10 днів. pH розчинів контролювали за допомогою іономеру універсального ЭВ-74 (ЗИП, Росія).

Для приготування амілоїдних фібрил N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I різні варіанти пептиду діалізували з розчину 6М гуанідін гідрохлориду у 10 мМ Тріс-буфер, 150 мМ NaCl, 0.01% NaN<sub>3</sub>, рН 7.4. Реакцію фібрилізації проводили в означеному буфері при 37 °С при постійному перемішуванні на орбітальному ротаторі.

Амілоїдна природа фібрилярних агрегатів лізоциму та аполіпопротеїну А-I була підтверджена трансмісійною електронною мікроскопією та вимірюваннями спектрів флуоресценції Тіофлавіну Т [226].

## 2.7. Флуоресцентні вимірювання та первинна обробка даних

Вимірювання флуоресценції проводили при кімнатній температурі на спектрофлуориметрі LS-55 (Perkin-Elmer, Великобританія) та на спектрофлуориметрі/спектрофотометрі CM2203 (ЗАО «SOLAR», Білорусь), обладнаних термостатованими кюветотримачами та магнітними мішалками, у кюветах 1×1 см. Спектри флуоресценції були скориговані на ефекти розведення, реабсорбції та внутрішнього фільтру.

### 2.7.1. Дослідження зв'язування АБМ, Тіофлавіну Т та SQ-1 з фібрилярним лізоцимом

Спектри флуоресценції зондів реєстрували у буфері та у присутності фібрилярних агрегатів лізоциму. Довжина хвилі збудження складала 430 нм (АБМ), 440 нм (Тіофлавін Т) та 640 нм (SQ-1). Кількісні параметри зв'язування білка з флуоресцентними зондами (константу асоціації  $K_a$ , стехіометрію зв'язування  $n$  та молярну флуоресценцію зв'язаного барвника  $a$ ) визначали, аналізуючи зміни інтенсивності флуоресценції зонду, викликані білком,  $\Delta I(C_p)$ , у рамках моделі Ленгмюра:

$$\Delta I = 0.5a \left[ Z_0 + nC_p + 1/K_a - \sqrt{(Z_0 + nC_p + 1/K_a)^2 - 4nC_pZ_0} \right] \quad (2.1)$$

де  $Z_0$  та  $C_p$  – загальна концентрація зонду та білка, відповідно. Концентрація зонду була визначена спектрофотометричним методом, використовуючи

коефіцієнти екстинкції  $\varepsilon_{444} = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (АБМ),  $\varepsilon_{662} = 2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (SQ-1),  $\varepsilon_{685} = 2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (V1) та  $\varepsilon_{412} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Тіофлавін Т).

При вимірюванні ефективності індуктивно-резонансного переносу енергії радіус Фьорстера визначали за формулою:

$$R_0 = 979 \left( \kappa^2 n_r^{-4} Q_D J \right)^{1/6} \quad (2.2)$$

$$J = \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \bigg/ \int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda$$

де  $J$  – інтеграл перекривання спектра випромінювання донора  $F_D(\lambda)$  зі спектром поглинання акцептору  $\varepsilon_A(\lambda)$ ,  $n_r = 1.4$  – показник заломлення середовища,  $\kappa^2$  – орієнтаційний фактор. У припущенні випадкової реорієнтації моментів переходу випромінювання донора і поглинання акцептора ( $\kappa^2 = 0.67$ ), величина  $R_0$  складала 3.5 нм для пари АБМ – SQ-1 та 6.4 нм для пари SQ-1 – V2.

### 2.7.2. Перенос енергії у донорно-акцепторних парах триптофан-пірен, пірен-флуоресцеїн та флуоресцеїн-родамін

При дослідженні ІРПЕ у цих донорно-акцепторних парах пірен (PM), флуоресцеїн (Fl) та родамін (Rd) були ковалентно приєднані до молекул лізоциму (п. 2.5). Кількісне визначення ефективності переносу енергії для пари Trp-PM було неможливим, тому що внутрішньомолекулярний перенос енергії може конкурувати з міжмолекулярним переносом.

Радіуси Фьорстера для пар PM-Fl та Fl-Rd, розраховані за рівнянням (2.2) при  $\kappa^2 = 0.67$ , дорівнювали 3.6 нм та 5.3 нм, відповідно. Ефективність переносу енергії визначали у рамках моделі Фанга та Страєра [227]:

$$E = 1 - \frac{Q_{DA}}{Q_D} = 1 - \int_0^\infty \exp(-\lambda) \exp[-C_a^s S(\lambda)] d\lambda, \quad (2.3)$$

$$S(\lambda) = \int_{d_a}^\infty \left[ 1 - \exp\left(-\lambda \left(\frac{R_0}{R}\right)^6\right) \right] 2\pi R dR, \quad (2.4)$$

де  $Q_D$  і  $Q_{DA}$  – квантовий вихід донора у відсутності та присутності акцептора, відповідно,  $\lambda = t/\tau_D$ ,  $\tau_D$  – час життя збудженого донора у відсутності акцептора,  $C_a^s$  – поверхнева концентрація акцепторів,  $d_c$  – відстань максимального зближення між донором і акцептором.

### 2.7.3. Часороздільний ІРПЕ

При вимірюванні часороздільного ІРПЕ донорно-акцепторна пара була представлена флуоресцеїном (Fl) та DyLight 549 (DyL<sub>549</sub>), ковалентно приєднаними до різних молекул лізоциму. Часороздільні вимірювання проводили за допомогою флуориметру FluoTime200 (PicoQuant GmbH, Germany), обладнаного швидким мікроканальним плоским детектором. У якості джерела збудження використовували 470 нм лазерний діод LDH-PC-470 у низькопотужному режимі, який дозволяє вимірювати затухання флуоресценції та час життя з похибкою  $\pm 10$  пс. Отримані результати були проаналізовані за допомогою програмного середовища FluoTime, версія 4.0 (PicoQuant GmbH, Germany). Затухання флуоресценції аналізували у рамках мультиекспоненційної моделі, використовуючи рівняння:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (2.5)$$

де  $I(t)$  – інтенсивність флуоресценції у момент часу  $t$ ,  $\alpha_i$  та  $\tau_i$  – амплітуда та час життя  $i$ -го компоненту, відповідно. Усереднений час життя  $\langle \tau \rangle$  розраховували наступним чином:

$$\tau = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2 / \left( \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i \right) \quad (2.6)$$

#### 2.7.4. ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням

Експерименти по вимірюванню ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням проводили на конфокальному флуоресцентному мікроскопі MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Germany). Промені лазеру з імпульсним збудженням (470 нм для донору та 635 нм для акцептору) були спрямовані дихроїчним дзеркалом на об'єктив з високою цифровою апертурою (60×1.2) та були сфокусовані в об'єм зразка на відстані 10 мкм над поверхнею покривного скла. Отриманий сигнал флуоресценції був розділений дихроїчним сплітером променів (600DCXR, Chroma Technology) та спектрально профільтрований за допомогою фільтру випромінювання 550/88 (Semrock) для донору та комбінацією довгохвильових фільтрів 647 та 650 (Semrock та Edmund Optics, відповідно) для акцептору. Флуоресцентний сигнал реєстрували одночасно двома фотодіодами (MPD, PDM 1CTC) та аналізували за допомогою модуля розрахунку кількості фотонів з часовою кореляцією PicoHarp300. Лазери запускались з частотою повторення 20 МГц, та імпульс лазеру на 470 нм мав затримку на 25 нс по відношенню до лазеру на 635 нм. Ефективність переносу енергії  $E$  була розрахована за рівнянням:

$$E = \frac{F_{D_{ex}}^{A_{em}}}{F_{D_{ex}}^{A_{em}} + \gamma F_{D_{ex}}^{D_{em}}}, \quad \gamma = \frac{\phi_D \eta_D}{\phi_A \eta_A} \quad (2.7)$$

де  $F_{D_{ex}}^{A_{em}}$  – інтенсивність флуоресценції акцептору після збудження донору,  $F_{D_{ex}}^{D_{em}}$  – інтенсивність флуоресценції донору після його збудження,  $\eta_D$  та  $\eta_A$  – ефективності донору та акцептору, що детектуються,  $\phi_D$  та  $\phi_A$  – квантовий вихід донора та акцептора, відповідно. При вимірюванні ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням донорно-акцепторна пара була представлена Fl та SeTau-647-di-NHS, відповідно, а коефіцієнт корекції  $\gamma$  становив 0.8.

#### 2.7.5. Флуоресцентна мікроскопія повного внутрішнього відбиття

При застосуванні методу флуоресцентної мікроскопії використовували інвертований флуоресцентний мікроскоп з повним внутрішнім відбиттям Olympus IX71. Джерелом збудження слугував аргонний іонний лазер (довжина хвилі

збудження 488 нм). Зображення отримували за допомогою камери Hamamatsu CCD та об'єктиву Olympus 60X з високим розділенням. Аналіз отриманих знімків проводили у середовищі ImageJ.

#### 2.7.6. Дослідження спектральних відгуків пірену, ДФГТ та Лаурдану

Спектри флуоресценції пірену реєстрували при довжині хвилі збудження 340 нм. Відношення вібронних смуг  $I_I/I_{III}$  розраховували, вимірюючи інтенсивності флуоресценції мономерів пірену при 372 нм ( $I_I$ ) та 383 нм ( $I_{III}$ ). Відношення інтенсивності флуоресценції ексимерів до інтенсивності флуоресценції мономерів пірену (Е/М) визначали шляхом вимірювання сигналу на 392 нм (пік мономерів) та 468 нм (пік ексимерів).

Стаціонарну анізотропію ДФГТ вимірювали, при довжинах хвиль збудження та випромінювання 350 та 450 нм, відповідно. Стоковий розчин зонду був приготований у тетрагідрофурані. Для інкорпорації ДФГТ у ліпідний бішар ліпосомальні суспензії інкубували із зондом протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Концентрація ліпиду складала 770 мкМ, ДФГТ – 3.9 мкМ.

Довжина хвилі збудження Лаурдану дорівнювала 364 нм. Генералізовану поляризацію (GP) зонду визначали за рівнянням:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (2.8)$$

де  $I_B$  та  $I_R$  інтенсивності флуоресценції блакитної (440 нм) та червоної (490 нм) спектральних компонент зонду.

#### 2.7.7. Аналіз зв'язування Продану, ДМХ та МБА з ліпосомами

Спектри флуоресценції Продану, ДМХ та МБА реєстрували при довжині хвилі збудження 350 нм (Продан) чи 420 нм (ДМХ та МБА). Для кількісного аналізу асоціації Продану з ліпідним бішаром використовували модель розподілу зонду між ліпідною та водною фазами [229]. У рамках цієї моделі зростання інтенсивності флуоресценції зонду ( $\Delta I = I_L - I_w$ ) при переході з водної у ліпідну фазу описується наступним рівнянням:

$$\Delta I = \frac{K_P V_L (I_{\max} - I_W)}{1 + K_P V_L} \quad (2.9)$$

де  $I_L$  – інтенсивність флуоресценції зонду у ліпосомальній суспензії при певній концентрації  $C_L$ ,  $I_W$  – інтенсивність флуоресценції Продану у буфері,  $I_{\max}$  – максимальна інтенсивність флуоресценції зонду у ліпідному оточенні,  $K_P$  – коефіцієнт розподілу, який визначається як:

$$K_P = \frac{N'_L V_W}{N'_W V_L} \quad (2.10)$$

де  $N'_L$  та  $N'_W$  – кількість молей зонду у ліпідній та водній фазах, відповідно,  $V_L$  та  $V_W$  – об'єми цих фаз. Об'єм ліпідної фази розраховували як:

$$V_L = N_A C_L \sum v_i f_i \quad (2.11)$$

де  $C_L$  – молярна концентрація ліпиду,  $f_i$  – молярна фракція  $i$ -го компоненту бішару,  $v_i$  – молекулярний об'єм  $i$ -го компоненту бішару, який дорівнював 1.58 нм<sup>3</sup> для ФХ та ФГ та 0.74 нм<sup>3</sup> для Хол [230]. Для Хол-вміщуючих систем приймали до уваги конденсуючий ефект холестерину, тому значення  $v$  були зменшені в 1.3 рази [230]. За застосованих експериментальних умов ( $C_L < 1$  мМ)  $V_L$  був значно менший, ніж загальний об'єм системи ( $V_t = 1$  дм<sup>3</sup>), тому  $V_W \approx V_t$ .

Трихвильова генералізована поляризація (3wGP) була розрахована як:

$$3wGP = \frac{R_{12} - 1}{R_{12} + 1}; R_{12} = \frac{I_1 k_{32}}{I_2 k_{32} - I_3 + I_1 R_{31}}; k_{32} = I_{3W} / I_{2W}; R_{31} = I_{3M} / I_{1M} \quad (2.12)$$

де  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  – інтенсивності флуоресценції Продану при 420, 480 та 530 нм, відповідно, індексами W та M позначені водна та мембранна фази, відповідно.

Деконволюцію спектрів Продану, ДМХ та МБА здійснювали у програмі Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Апроксимацію окремих спектральних компонент проводили з використанням лог-нормальної функції:

$$I(\lambda) = \sum_{i=1}^m \frac{A_i}{\sqrt{2\pi w_i \lambda}} \exp \left( -\frac{\left( \ln \left( \frac{\lambda}{\lambda_{\max}^i} \right) \right)^2}{2w_i^2} \right) \quad (2.13)$$

де  $A_i$ ,  $w_i$  та  $\lambda_{\max}^i$  – площа, ширина та позиція максимуму  $i$ -ї компоненти, відповідно. Відносний внесок  $i$ -тої компоненти визначали за рівнянням:

$$R_i = \frac{A_i}{A_1 + A_2} \quad (2.14)$$

#### 2.7.8. Гасіння власної флуоресценції мутантів аполіпопротеїну А-І

Флуоресценцію триптофанових залишків N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-І збуджували на довжині хвилі 296 нм. У якості гасника використовували іони цезію. Масиви експериментальних даних аналізували методом лінійної регресії з використанням рівняння Штерна-Фольмера [232]:

$$I_0 / I = 1 + k_q \tau_0 = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2.15)$$

де  $I_0$  та  $I$  – інтенсивності флуоресценції лізоциму у відсутності та присутності гасника,  $k_q$  – бімолекулярна константа гасіння,  $\tau_0$  – час життя флуорофору у відсутності гасника,  $K_{sv}$  – константа Штерна-Фольмера,  $[Q]$  – концентрація іонів цезію.

#### 2.7.9. Асоціація цитохрому с з ліпідними везикулами

При дослідженні взаємодії цитохрому с з ліпосомами вимірювали ефективність ІРПЕ між антрілвінільним флуорофором, ковалентно приєднаним до кінцевих метильних груп ФХ (АВ-ФХ) чи КЛ (АВ-КЛ) та гемовою групою білка. Інтенсивність флуоресценції у максимумі випромінювання АВ (434 нм) у присутності цитохрому с коригували на ефект внутрішнього фільтру та реабсорбції, використовуючи рівняння [232]:



$$k = \frac{(1 - 10^{-A_o^{ex}})(A_o^{ex} + A_a^{ex})(1 - 10^{-A_o^{em}})(A_o^{em} + A_a^{em})}{\left(1 - 10^{-(A_o^{ex} + A_a^{ex})}\right)A_o^{ex} \left(1 - 10^{-(A_o^{em} + A_a^{em})}\right)A_o^{em}} \quad (2.16)$$

де  $A_o^{ex}$ ,  $A_o^{em}$  – поглинання донора на довжині хвилі збудження та випромінювання у присутності акцептора,  $A_a^{ex}$ ,  $A_a^{em}$  – поглинання акцептора на довжині хвилі збудження та випромінювання, відповідно. Ефективність ІРПЕ визначали, вимірюючи зменшення інтенсивності флуоресценції АВ при додаванні цитохрому  $c$ :

$$E = 1 - \frac{Q_{DA}}{Q_D} = 1 - Q_r \quad (2.17)$$

де  $Q_D$ ,  $Q_{DA}$  – квантовий вихід донору у відсутності та присутності акцептору, відповідно,  $Q_r$  – відносний квантовий вихід.

Результати вимірювань ІРПЕ були кількісно проаналізовані у рамках моделі переносу енергії у двовимірних системах, сформульованої Фангом та Страєром [227] та розвинутою нами для випадку розподілу флуорофорів у двох площинах з урахуванням залежності орієнтаційного фактору від відстані між донором та акцептором. Припускали, що цитохром  $c$  – ліпідні системи містять одну площину донорів та дві площини акцепторів, розташованих на відстанях  $d_1$  та  $d_2$  від центру мембрани. Припускали, що існує дві популяції зв'язаного цитохрому  $c$  (асоційованого з протонним чи депротонним КЛ), які відповідають двом площинам акцепторів. Відносний квантовий вихід донору у цьому випадку дорівнює:

$$Q_r = \int_0^\infty \exp(-\lambda) \exp\left[-\left(\frac{B_1}{S_m} S_1(\lambda) + \frac{B_2}{S_m} S_2(\lambda)\right)\right] d\lambda \quad (2.18)$$

$$S_1(\lambda) = \int_{d_1}^\infty \left[1 - \exp\left(-\lambda \kappa_1^2(R) \left(\frac{R_o^r}{R}\right)^6\right)\right] 2\pi R dR \quad (2.19)$$

$$S_2(\lambda) = \int_{d_2}^\infty \left[1 - \exp\left(-\lambda \kappa_2^2(R) \left(\frac{R_o^r}{R}\right)^6\right)\right] 2\pi R dR \quad (2.20)$$

де  $R$  – відстань між донором та акцептором,  $\lambda = t/\tau_d$ ;  $\tau_d$  – час життя збудженого донору у відсутності акцептору. Коли моменти переходу випромінювання донору та поглинання акцептору симетрично розподілені у конусі із осями  $D_x$  та  $A_x$ , орієнтаційний фактор виражається як:

$$\kappa_{1,2}^2(R) = d_D d_A \left( 3 \left( \frac{d_c \mp 0.5 d_t}{R} \right)^2 - 1 \right) + \frac{1 - d_D}{3} + \frac{1 - d_A}{3} + \left( \frac{d_c \mp 0.5 d_t}{R} \right)^2 (d_D - 2 d_D d_A + d_A) \quad (2.21)$$

$$d_{D,A}^x = \langle d_{D,A}^x \rangle \left( \frac{3}{2} \cos^2 \alpha_{D,A} - \frac{1}{2} \right) \quad \langle d_{D,A}^x \rangle = \left( \frac{3}{2} \cos^2 \psi_{D,A} - \frac{1}{2} \right) \quad (2.22)$$

де  $\psi_{D,A}$  – половинні кути конусів,  $\alpha_{D,A}$  – кути, утворені  $D_x$  та  $A_x$  із нормаллю до площини бішару  $N$ . Аксіальні деполяризаційні фактори  $\langle d_D^x \rangle$  та  $\langle d_A^x \rangle$  пов'язані із експериментально вимірюваною анізотропією ( $r$ ) та фундаментальною анізотропією ( $r_0$ ) донору та акцептору [233]:

$$d_{D,A}^x = \pm (r_{D,A} / r_{0D,A})^{1/2} \quad (2.23)$$

Аналогічна модель була застосована при аналізі даних ІРПЕ між Лаурданом та Тіофлавіном Т.

## 2.8. Трансмісійна електронна та атомно-силова мікроскопія

Для отримання прямих доказів формування фібрилярних агрегатів досліджуваних білків використовували методи трансмісійної електронної мікроскопії та атомно-силової мікроскопії. При приготуванні зразків для ТЕМ 10 мкл розчину білка поміщали на мідний ґрид з карбоновим покриттям, та через одну хвилину збирали рештки розчину за допомогою паперового фільтру. Після цього на поверхню ґриду наносили 10 мкл 2% розчину ураніл ацетату, інкубували 30 сек, промивали дистильованою водою та висушували на повітрі. Для отримання електронно-мікроскопічних зображень використовували мікроскоп Tecnai 12 BioTWIN.

АСМ зображення були отримані за допомогою скануючого мікроскопу NanoScope IIIa, оснащеного п'єзокерамічним сканером. АСМ зонди були представлені монокристалічними силіконовими кантилеверами з резонансною частотою 300 кГц. 10 мкл робочого розчину наносили на слюдяну підложку. Після промивання підложки дистильованою водою зразки були візуалізовані із швидкістю 0.5 Гц у режимі переривчастого контакту.

## **2.9. Молекулярно-динамічне моделювання**

Розрахунки молекулярної динаміки проводили за допомогою програмного пакету GROMACS 5.1 [234]. Для моделювання використовували просторові структури лізоциму, цитохрому *c* та аполіпопротеїну А-I 1-83, визначені методом рентгеноструктурного аналізу та представлені у базі даних Protein Data Bank. Підготовку вхідних файлів для МД розрахунків здійснювали за допомогою графічного інтерфейсу CHARMM-GUI. Білок розміщували в періодичному боксі, що мав октаедричну форму з мінімальною відстанню від стінок боксу 10 Å. Бокс було заповнено молекулами води типу TIP3P. Для нейтралізації заряду системи частину молекул води заміняли на іони натрію (при нейтралізації негативного заряду апо А-I 1-83 та ліпідних бішарів, що містили аніонні ліпіди) чи хлору (при нейтралізації позитивного заряду лізоциму та цитохрому *c*). МД розрахунки проводили у силовому полі CHARMM36 [235]. Електростатичні взаємодії враховували за допомогою алгоритму PME. Мінімізацію енергії системи проводили протягом 100 пс, а еквілібрацію – протягом 1 нс. Інтегрування рівнянь руху здійснювали із кроком 2 фс. Координати атомів записували у файл траєкторії з періодичністю 2 пс. Розрахунки проводили у часовому інтервалі 100 нс для лізоциму та цитохрому *c* та 200 нс для аполіпопротеїну А-I при температурі 310 K та тиску 1 бар. Для аналізу траєкторій використовували набір інструментів модулів gmx\_energy та gmx\_rms. Візуалізацію розрахунків молекулярної динаміки проводили у програмі VMD.

## **2.10. Методи чисельного моделювання та обробки даних**

Чисельне моделювання та обробку експериментальних даних проводили у середовищі MathCad 2001 (MathSoft Inc., США). Чисельне інтегрування і оптимізацію проводили з використанням вбудованих алгоритмів MathCad та пакету розроблених нами програм [28,29,32,36,37,39,50,57]. Для обробки і графічної ілюстрації експериментальних даних та результатів моделювання використовували середовище OriginPro 7.0 (OriginLab Corp., США). Статистичну значимість різниці між вимірюваними параметрами оцінювали за допомогою критерію Фішера [236].

### **2.11. Короткі висновки до Розділу 2**

1. У якості модельних ліпідних мембран використовували ліпідні моношари, бішари на підложці та ліпосоми. Досліджуваними білками були лізоцим, цитохром *c* та N-кінцевий фрагмент аполіпопротеїну A-I
2. Експериментальні методи дослідження включали різні модифікації флуоресцентної спектроскопії (метод флуоресцентних зондів, гасіння флуоресценції, вимірювання анізотропії, індуктивно-резонансний перенос енергії), мікроскопію (флуоресцентну, електронну та атомно-силову), а також метод моношарів Ленгмюра.
3. Основними методами комп'ютерного моделювання були чисельне моделювання у середовищі MathCad та молекулярно-динамічне симулювання.

### **РОЗДІЛ 3**

#### **РОЗВИТОК НОВИХ ПІДХОДІВ ДО АНАЛІЗУ АГРЕГАЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БІЛКІВ У ВОДНОМУ ТА ЛІПІДНОМУ ОТОЧЕННІ**

З огляду на вирішальну роль білкових агрегатів у патогенезі великої кількості серйозних захворювань, детектування та характеристика агрегаційних станів білкових молекул має надзвичайно важливе значення. До теперішнього часу розроблено велику кількість аналітичних інструментів для диференціації білкових самоасоціатів (як олігомерних, так і амілоїдних), включаючи круговий дихроїзм [237], атомно-силову та електронну мікроскопію [238,239], електронний парамагнітний резонанс [110], флуоресцентну та абсорційну спектроскопію [10,15,33,39,42], тощо. Хоча результати, отримані за допомогою цих експериментальних методів, сприяли значному прогресу у розумінні молекулярних механізмів агрегації білка, складна природа цього процесу потребує розвитку ефективних, та, в той же час, зручних підходів, які можуть

забезпечити швидке детектування агрегатів разом із отриманням кількісної інформації щодо структурних параметрів самоасоціації білка. До того ж, традиційні методи ідентифікації високовпорядкованих білок-білкових комплексів (наприклад, за допомогою Тіофлавіну Т чи Конго червоного) часто виявляються недостатньо специфічними, особливо при вивченні мембранних систем, де частка амілоїдних агрегатів зазвичай досить низька і здатність барвників формувати комплекси з ліпідами може призвести до помилкового позитивного результату. У зв'язку з цим, існує нагальна потреба у розвитку нових методичних підходів до детектування амілоїдів та пошуку флуорофорів, яким притаманна висока селективність до амілоїдних агрегатів мембранозв'язаних білків. Особливу увагу у цьому контексті привертають флуоресцентні методи, можливості яких ще далеко не вичерпані. У даному розділі викладені результати досліджень, спрямованих на розробку нових флуоресцентних підходів до ідентифікації та структурної характеристики білкових асоціатів з різним ступенем агрегації.

### **3.1. Флуоресцентне визначення структурних параметрів амілоїдних фібрил**

На першому етапі роботи, на прикладі новосинтезованих флуоресцентних сполук, представників класів бензантронів (АБМ), скавараїнів (SQ-1) та поліметинів (V2), була проведена оцінка можливостей флуоресцентних методів при дослідженні структури фібрилярних білкових агрегатів, з використанням лізоциму у якості модельного білка.

Флуоресцентний барвник АБМ є похідною амінобензантрону з низкою фотофізичних властивостей, які роблять його особливо привабливим при вивченні біомолекул. Це, зокрема: і) значний Стоксів зсув; ii) високий коефіцієнт екстинкції; iii) дуже слабка флуоресценція у воді; iv) висока чутливість параметрів флуоресценції до полярності оточення [240]. Внутрішньомолекулярний перенос заряду від замісника аміну до карбонільної групи призводить до значного зростання дипольного моменту АБМ після збудження. Це, у свою чергу, супроводжується реорієнтацією диполей

розчинника навколо диполя зонду у збудженому стані (релаксація розчинника) та втратою енергії, що проявляється у червоному зсуві максимуму випромінювання ( $\lambda_{em}$ ). Зокрема, показано, що  $\lambda_{em}$  зсувається з 583 нм у неполярному розчиннику бензолі до 650 нм у полярному розчиннику етанолі [240].

У роботах [241-243] було продемонстровано, що АБМ характеризується високою специфічністю до модельних ліпідних бішарів та плазматичних мембран лімфоцитів, що робить цей зонд чутливим до змін імунного статусу організму при різних патологіях. З огляду на це, становило інтерес оцінити потенціал АБМ у характеристиці патогенних білкових агрегатів. На рис. 3.1 наведені спектри флуоресценції АБМ у розчині та у присутності фібрилярного лізоциму. Можна бачити, що зв'язування АБМ з білковими агрегатами призводить до значного зростання інтенсивності флуоресценції зонду з максимумом емісії  $\lambda_{em} \sim 580$  нм, що свідчить про перехід зонду у неполярне оточення.

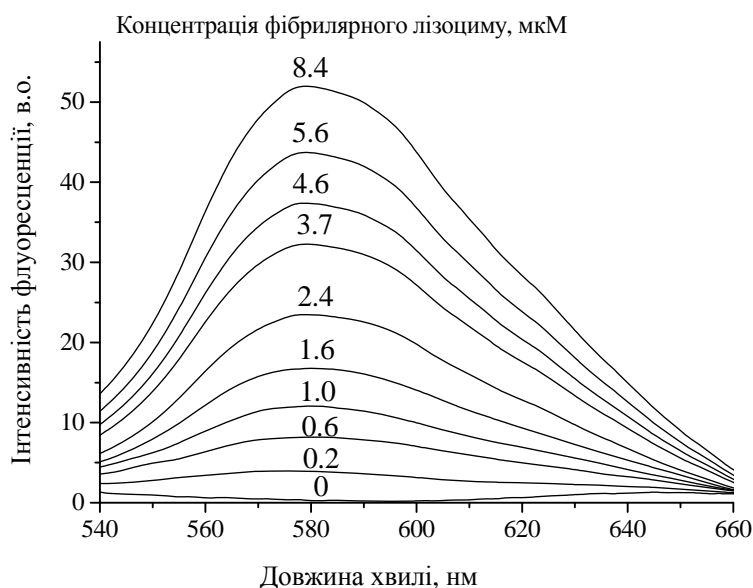


Рис. 3.1. Спектри флуоресценції АБМ при різних концентраціях фібрилярного лізоциму. Концентрація АБМ була 0.5 мкМ.

Для кількісної інтерпретації цього ефекту залежності зростання флуоресценції при 580 нм ( $\Delta I_{580}(P)$ ) від концентрації білка (рис. 3.2, А) були проаналізовані у рамках моделі адсорбції Ленгмюра (підрозділ 2.7.1), що

дозволило визначити константу асоціації ( $K_a$ ), кількість місць зв'язування ( $n$ ) та молярну флуоресценцію зв'язаного зонду ( $a$ ). Для порівняння, аналогічні параметри були розраховані з графіків  $\Delta I_{480}(P)$ , отриманих для класичного амілоїдного маркера Тіофлавіну Т (рис. 3.2, Б).

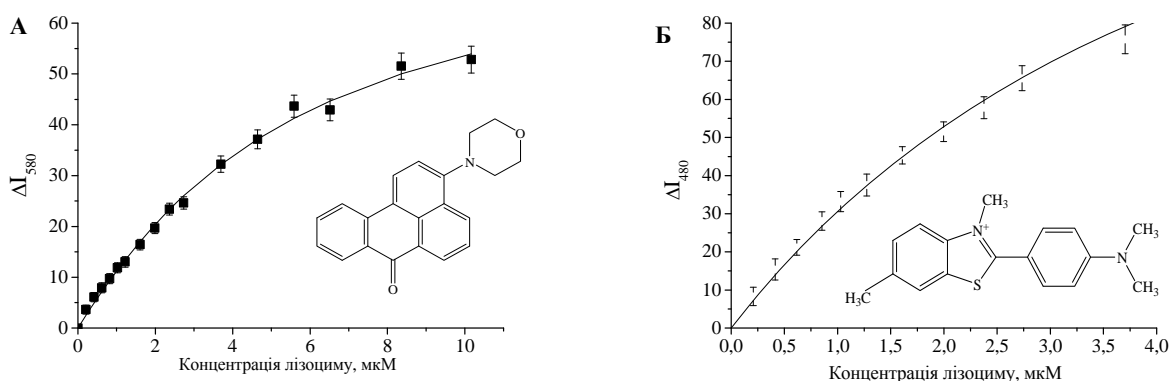


Рис. 3.2. Ізотерми зв'язування АБМ (А) та Тіофлавіну Т (Б) з фібрилярним лізоцимом.

Концентрація зонду була 0.5 мкМ (АБМ) чи 7.9 мкМ (Тіофлавін Т).

Як видно з табл. 3.1, спорідненість АБМ до амілоїдних фібрил на декілька порядків вища, ніж Тіофлавіну Т. Окрім цього, молярна флуоресценція АБМ (величина, пропорційна квантовому виходу зонда, зв'язаного з білком) перевищує аналогічний параметр для Тіофлавіну Т у  $\sim 8$  разів. Додатковою перевагою АБМ слугує великий Стоксів зсув ( $\sim 140$  нм), завдяки чому внесок розсіяного світла у спектри флуоресценції зонду стає нехтовно малим, на противагу до Тіофлавіну Т.

Таблиця 3.1

Параметри зв'язування флуоресцентних барвників з амілоїдними фібрилами

Зонд	$K_a$ , $\text{мкМ}^{-1}$	$n$	$a$ , $\text{мкМ}^{-1}$
АБМ	$1.2 \pm 0.3$	$0.2 \pm 0.06$	$165 \pm 38$
Тіофлавін Т	$0.04 \pm 0.01$	$7.6 \pm 2.1$	$22 \pm 5$
SQ-1	$4.4 \pm 1.1$	$0.25 \pm 0.08$	$4.5 \pm 1.4$
V2	$1.8 \pm 0.5$	$0.6 \pm 0.17$	$4.7 \pm 1.3$

Нарешті, зростання флуоресценції АБМ при зв'язуванні з нативним лізоцимом виявилось значно меншим, порівняно із фібрилярним білком. Так, наприклад, при



концентрації білка 8 мкМ інтенсивність флуоресценції АБМ зростала в 1.3 рази у присутності нативного білка, та у 49 разів при додаванні фібрилярних агрегатів. Ці результати дозволяють зробити припущення, що АБМ є більш ефективним амілоїдним маркером, ніж Тіофлавін Т. Зважаючи на те, що молекулярні розміри АБМ ( $1.3 \times 0.7$  нм) близькі до розмірів Тіофлавіну Т ( $1.5 \times 0.7$  нм), можна припустити, що АБМ, подібно до Тіофлавіну Т, локалізується у жолобках  $\beta$ -листів, діаметром 0.8 – 0.9 нм, при цьому вісь молекули зонду паралельна осі фібрили [226].

Для отримання більш детальної інформації стосовно поведінки АБМ у фібрилярному оточенні була проведена серія експериментів, яка базувалася на дослідженні ефектів релаксації розчинника. При вимірюванні стаціонарної флуоресценції це явище проявляється у червоному зсуві максимуму випромінювання при збільшенні довжини хвилі збудження [244]. Як показано на рис. 3.3, максимум флуоресценції зв'язаного з білком АБМ характеризується поступовим червоним зсувом при зростанні довжині хвилі збудження від 390 до 460 нм. Червоний зсув максимуму флуоресценції, що спостерігається у полярних середовищах для барвників, чутливих до властивостей розчинника, пояснюється неповною релаксацією диполей розчинника в оточенні флуорофору протягом часу життя збудженого стану [232].

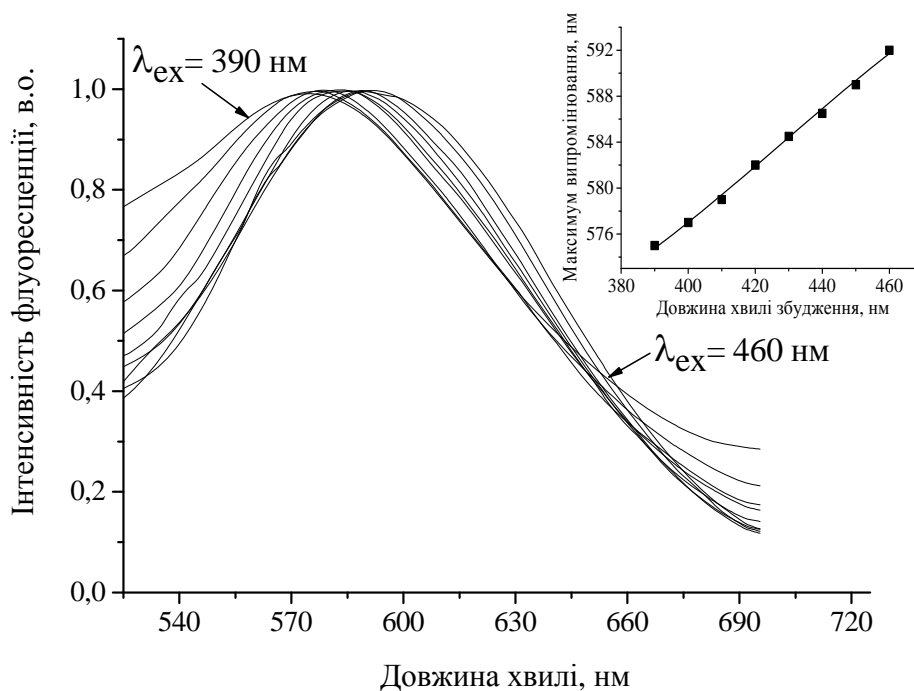


Рис. 3.3. Спектри флуоресценції АБМ, зв'язаного з фібрилярним лізоцимом, при варіюванні довжини хвилі збудження. У вкладці зображено залежність максимуму флуоресценції від довжини хвилі збудження. Концентрація лізоциму була 2 мкМ, АБМ – 4.8 мкМ.

Наявність червоного крайового зсуву в досліджуваних системах означає, що в структурі фібрил АБМ займає полярні сайти зв'язування, де рухливість гідратованих молекулярних груп поблизу флуорофору значно обмежена.

У подальших експериментах, з використанням методу індуктивно-резонансного переносу енергії були охарактеризовані структурні особливості фібрилярних агрегатів лізоциму. АБМ, сквараїновий зонд SQ-1 та поліметиновий зонд V2 слугували компонентами двох донорно-акцепторних пар, АБМ – SQ-1 та SQ-1 – V2. Результати вимірювань ІРПЕ були проаналізовані з використанням експоненційної моделі, що описує перенос енергії у системах з просторовими обмеженнями (як, наприклад, фібрилярні агрегати) [245]. У рамках цієї моделі, відносний квантовий вихід донору описується наступним рівнянням:

$$Q_r = \int_0^{\infty} \exp\left(-\lambda - C_A V_d \Gamma(1 - d/6) \lambda^{\frac{d}{6}}\right) d\lambda \quad (3.1)$$

де  $\lambda = t/\tau_D$ ,  $\tau_D$  – час життя флуоресценції донору у відсутності акцептору,  $V_d = \pi^{\frac{d}{2}} R_o^d / \Gamma\left(\frac{d}{2} + 1\right)$  – об'єм  $d$ -розмірної сфери радіусом  $R_o$ ,  $d$  – розмірність розподілу флуорофорів («фрактальна» розмірність),  $C_A = C_B / C_P V_{PF}$ ,  $C_P$  – загальна концентрація білка,  $V_{PF}$  – об'єм мономеру лізоциму у складі амілоїдної фібрили,  $C_B$  – молярна концентрація зв'язаного акцептору, яка була розрахована на основі параметрів, представлених у табл. 3.1. Отримані профілі ІРПЕ (рис. 3.4) були апроксимовані рівнянням (3.1), використовуючи значення  $R_o$ , дійсні за ізотропних та динамічно усереднених умов, коли донори та акцептори швидко обертаються та їх диполі можуть приймати довільні орієнтації за час, менший, ніж час переносу. Цим умовам відповідає ізотропне значення орієнтаційного фактору  $\kappa^2 = 0.67$ .

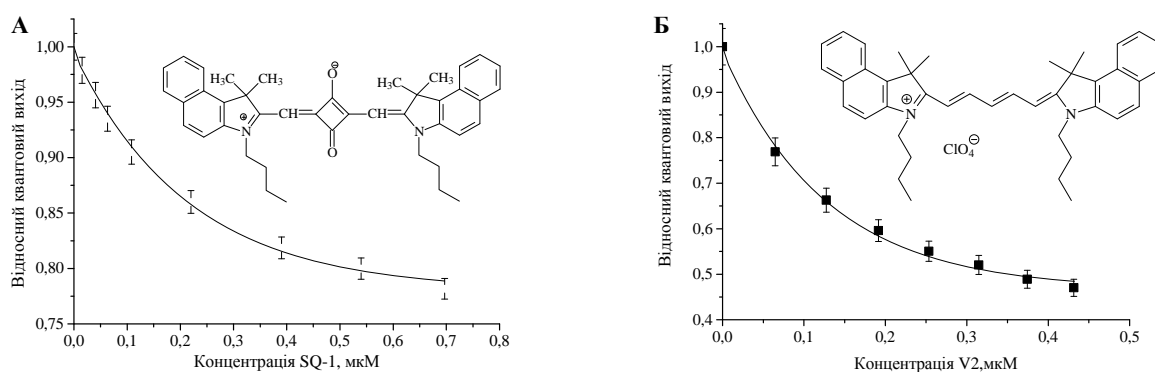


Рис. 3.4. Відносний квантовий вихід АБМ (А) та SQ-1 (Б) як функція концентрації акцептору. Концентрація фібрилярного лізоциму була 10.2 мкМ (А) чи 15.9 мкМ (Б). У вкладці зображено структурні формули SQ-1 (А) та V2 (Б).

На рис. 3.5, А показані набори модельних параметрів  $\{V_{PF}, d\}$ , що забезпечили найкращу апроксимацію експериментальних даних для  $\kappa^2 = 0.67$ . Здогадно, якщо припущення про довільну орієнтацію флуорофорів було вірним, залежності  $V_{PF}(d)$ , отримані для двох донор-акцепторних пар, повинні перетинатися одна з одною у певній точці  $(V_{PF}^*, d^*)$ , яка характеризує об'єм молекули білка та розмірність фібрил лізоциму. Відсутність такого перетину означає, що у нашому випадку некоректно використовувати ізотропні значення орієнтаційного фактору

(0.67) для розрахунку  $R_o$ . Правомірність цієї точки зору підтверджується високими значеннями анізотропії флуоресценції (0.33 для АВМ, 0.31 для SQ-1 та 0.18 для V2), що свідчать про значне обмеження обертальної рухливості донорів та акцепторів у фібрилярному оточенні. Для подолання проблеми невизначеності орієнтаційного фактору, у подальшому аналізі даних ІРПЕ  $\kappa^2$  варіювали у максимально можливому інтервалі значень, що охоплюють усі взаємні орієнтації диполей донорів та акцепторів, від перпендикулярної ( $\kappa^2 = 0$ ) до паралельної ( $\kappa^2 = 4$ ) [232].

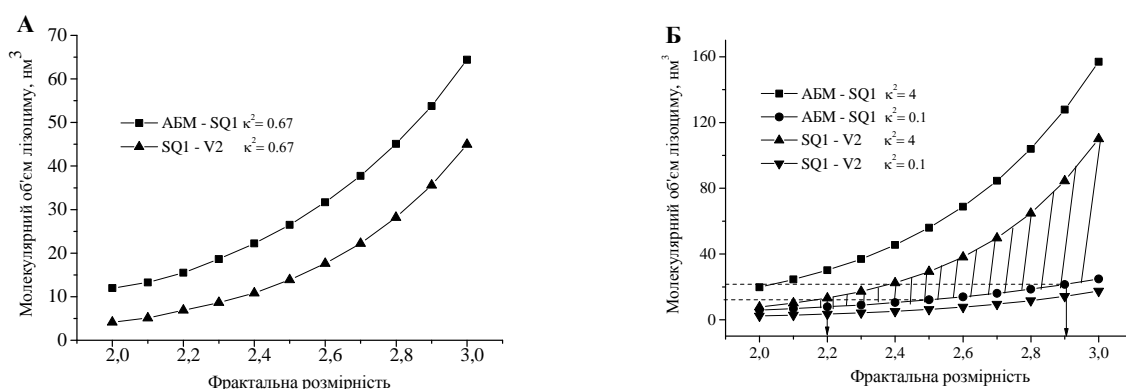


Рис. 3.5. Зв'язок між молекулярним об'ємом мономерної субодиниці лізоциму та фрактальною розмірністю амілоїдних фібрил, отриманим шляхом апроксимації даних ІРПЕ (рис. 3.4) рівнянням (3.1) з ізотропним значенням орієнтаційного фактору (0.67) (А) та при його варіюванні у межах 0.1 – 4 (Б).

Перекивання між областями, які обмежені значеннями  $V_{PF}(d)$ , отриманими для АВМ-SQ-1 та SQ-1-V2 донорно-акцепторних пар, дозволило виділити найбільш вірогідні значення  $\{V_{PF}, d\}$  (заштрихована площа на рис. 3.5, Б). Далі, цей інтервал значень був звужений з урахуванням наступних міркувань. Парціальний об'єм ( $\nu^o$ ) нативного лізоциму – 0.71 мл/г, значення, яке відповідає молекулярному об'єму 16.9  $\text{nm}^3$  на мономер [246]. Наявні дані про об'ємні властивості амілоїдних фібрил свідчать про те, що знак та величина змін об'єму при фібрилізації залежать від типу білка та навколишніх умов. Зокрема, для  $\beta_2$ -мікроглобуліну [247], транстиретину та  $\alpha$ -синуклеїну [248] характерне зростання об'єму, тоді як для полі-D-лізину, інсуліну та пептиду КЗ виявлена протилежна

тенденція [249]. Ці відмінності у тенденціях змін об'єму відображають тонкий баланс між детермінантами  $\nu^o$ , що включають ван-дер-Ваальсів та виключений об'єми, гідратаційний та температурний члени [247]. Примітно, що величина змін об'єму при переході білка з нативного до фібрилярного стану знаходиться у межах  $\pm 30\%$ . Наприклад, у випадку лізоциму, позбавленого дисульфідних містків, значення  $\nu^o$  зростає від 0.68 мл/г до 0.72 мл/г при трансформації мономерів у протофібрили [250]. Базуючись на цих фактах, було зроблено припущення, що молекулярний об'єм мономеру лізоциму у фібрилярному стані коливається у межах 12 – 22 нм<sup>3</sup>. Вибір цих меж (пунктирні лінії на рис. 3.5, Б) дає нижню (2.2) та верхню (2.9) границі для розмірності  $d$ . Слід відмітити, що залежності  $V_{PF}(d)$ , отримані для  $\kappa^2 < 0.1$  не розглядалися, тому що вони розташовані за межами розумних значень  $V_{PF}$ . Характерно, що запропонована процедура обмеження ряду модельних параметрів може бути більш ефективною при застосуванні декількох донор-акцепторних пар, які розрізняються критичною відстанню переносу енергії.

Фрактальна розмірність залежить від співвідношення маси та розміру поліпептидного ланцюга, що є мірою компактності білка. Цей параметр було розраховано для нативних ( $d \sim 2.2 - 2.8$  [252]), денатурованих ( $d \sim 2.5 - 1.8$  [253]) та агрегованих білків ( $d \sim 2.7$  [254]). Розгортання поліпептидного ланцюга при денатурації супроводжується зменшенням фрактальної розмірності, як було продемонстровано, зокрема, для альбуміну ( $d$  зменшується від 2.3 до 1.8 [255]) та лізоциму ( $d$  зменшується від 2.8 до 2.5 [253]).

Утворення амілоїдних агрегатів зарядженими білками, такими як лізоцим, контролюється рядом фактором, одним з найважливіших з яких є електростатичні взаємодії [256]. Було показано, що електростатичні взаємодії між мономерами білка визначають кінцеву морфологію амілоїдних суперструктур [256,257]. У рамках статистико-механічної моделі, вільна енергія сферичного кластеру радіусу  $R$  може бути записана як [257]:

$$\Delta F = -\frac{qU}{2} + \frac{3\gamma}{R} \frac{4\pi R^3}{3} + \frac{(Nn_c e)^2}{8\pi\epsilon\epsilon_0 R} - kT \log(X_N/N) \quad (3.2)$$

де  $q$  – загальна кількість контактів між парами мономерів в агрегаті,  $U$  – енергія, що припадає на один контакт,  $\gamma$  – поверхневий натяг,  $N$  – кількість молекул в кластері,  $n_c$  – ефективна кількість зарядів на мономері,  $e$  – елементарний заряд,  $\epsilon$  та  $\epsilon_0$  – відносна діелектрична стала та діелектрична проникність вакууму,  $X_N$  – об’ємна фракція молекул у кластері. Беручи до уваги наступні співвідношення:

$$q = Z \left( \frac{R}{a} \right)^{d_f}, \quad U = n_E kT, \quad \gamma = \frac{fUN_s}{s} = \frac{fn_E kT d_f N^{(d_f-1)/d_f}}{4\pi R^2},$$

$$X_N = \frac{N(4/3)\pi a^3}{(4/3)\pi R^3} = N \frac{a^3}{R^3} \quad (3.3)$$

де  $Z$  – кількість «сусідів» мономеру,  $a$  – радіус мономерної молекули,  $f$  – ефективна кількість взаємодій,  $d_f$  – фрактальна розмірність,  $n_E$  – енергія зв’язування в одиницях  $kT$ ,  $s$  – площа агрегату,  $N_s$  – кількість молекул на поверхні агрегату фрактальної розмірності  $d_f$ , рівняння (3.2) може бути переписане для випадку фрактального росту у вигляді:

$$\Delta F = -\frac{Z}{2} \left( \frac{R}{a} \right)^{d_f} n_E kT + \frac{fn_E kT d_f}{a^{(d_f-1)}} R^{(d_f-1)} + \frac{n_c^2 e^2}{8\pi\epsilon\epsilon_0 a^{2d_f}} R^{(2d_f-1)} - kT \log \frac{a^3}{R^3} \quad (3.4)$$

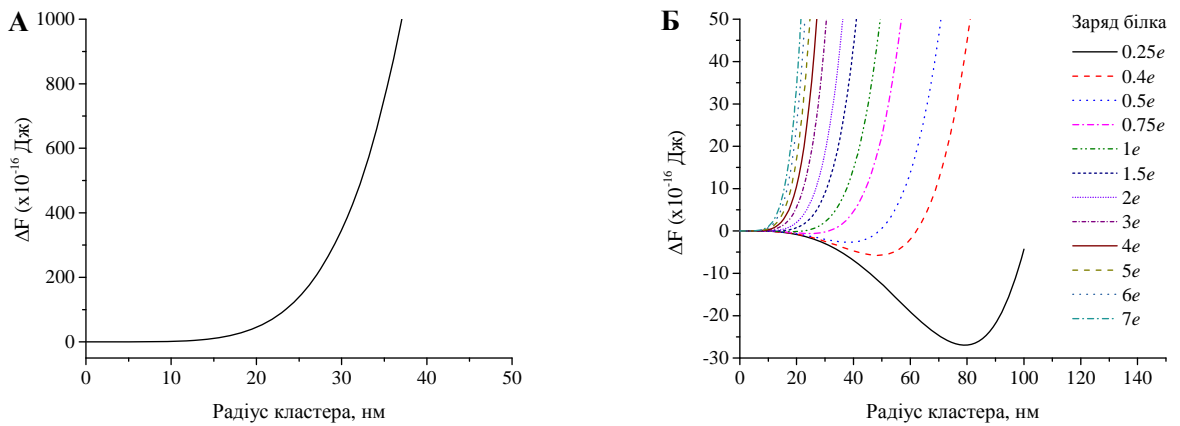


Рис. 3.6. Зміни вільної енергії білка при утворенні агрегатів, розраховані за рівнянням (3.4), при  $n_c = 8$  (А) та  $n_c = 0.25 - 7$ . Інші параметри складали:  $kT = 4.11 \times 10^{-21}$  Дж,  $a = 1.5$  нм,

$$\varepsilon = 80, \varepsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ Кл}^2 \text{ Дж}^{-1} \text{ м}^{-1}, d_f = 3, Z = 6, f = 3, n_E = 10.$$

Як видно з цього рівняння, вільна енергія є функцією декількох параметрів -  $n_c$ ,  $R$  та  $d_f$ . Якщо прийняти, що радіус лізоциму дорівнює  $\sim 1.5$  нм, а заряд  $+8e$  (тобто  $n_c = 8$ ), то вільна енергія може бути розрахована як функція радіусу кластеру (рис. 3.6, А). Зважаючи на те, що заряд білка може змінюватися при взаємодії з іншими мономерами, профілі вільної енергії були отримані при варіюванні значень  $n_c$  у межах  $0.25 - 8$  (рис. 3.6, Б). Цікавою рисою отриманих кривих є те, що при зменшенні  $n_c$  профілі  $\Delta F(R)$  характеризуються мінімумом, за яким слідує стрімке зростання в область позитивних значень. Іншими словами, заряд білка контролює ріст агрегатів. Після досягнення енергетичного мінімуму, агрегатам білка термодинамічно не вигідно залишатися у тій самій геометричній конфігурації. Інформація щодо структури кластеру міститься у параметрі  $d_f$ . Як проілюстровано на рис. 3.7, зниження цього параметру (тобто фрактальної розмірності) зсуває мінімум кривих  $\Delta F(R)$  у бік більших значень радіусу кластера.

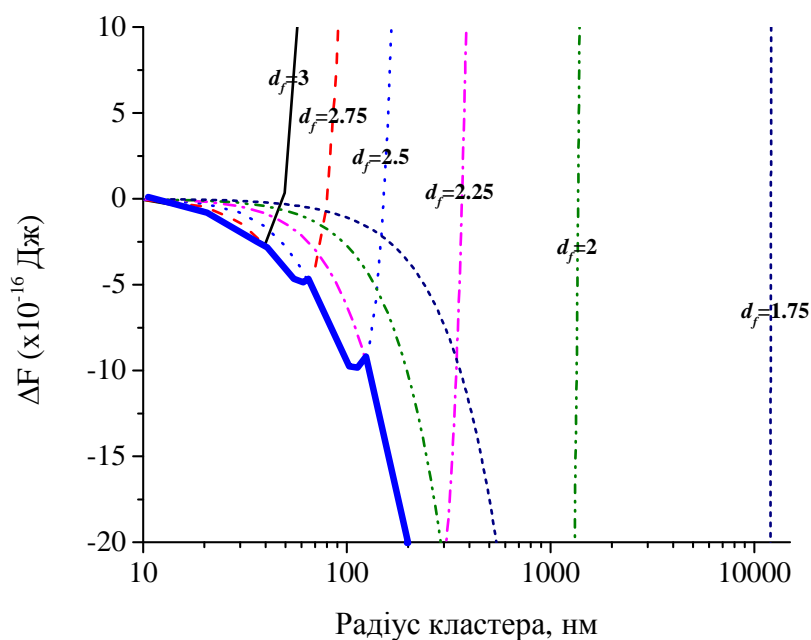


Рис. 3.7. Профіль вільної енергії зростаючого кластеру як функція його радіусу при

різних значеннях фрактальної розмірності. Синя суцільна лінія зображує найбільш термодинамічно вигідний маршрут для росту агрегата. Графік представлено в логарифмічних координатах по шкалі абсцис.

Це означає, що після досягнення першого мінімуму (при  $d_f = 3$ ), наступний мінімум можливий лише тоді, коли система змінює свою морфологію, тобто коли  $d_f$  зменшується. Такі зміни відбуваються постійно, що призводить до мультифрактального профілю вільної енергії (рис. 3.7), згідно з яким більш компактна структура енергетично вигідна на початку росту.

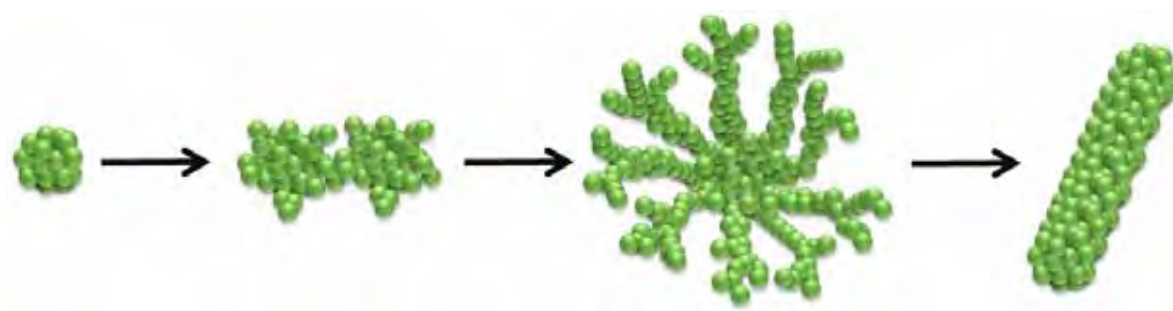


Рис. 3.8. Схематичне зображення еволюції амілоїдних фібрил із прекурсора по фрактальному механізму.

Система буде слідувати шляхом мінімізації енергії, як показано на рис. 3.7 (синя суцільна лінія). Результатом цього буде утворення агрегату з компактным ядром ( $d_f = 3$ ), яке називається прекурсором, та зовнішньою частиною, оболонкою, яка характеризується зменшенням фрактальної розмірності в залежності від радіусу кластера. На ранніх стадіях кластери мають невеликий радіус, тому вони швидко дифундують у розчині, тобто імовірність їх взаємодії один з одним досить висока. Це сприяє утворенню фракції молекул, форма яких відрізняється від сферичної. Зважаючи на збільшений розмір, взаємодія таких «несферичних» структур стає з часом енергетично невигідною, тому прекурсор починає взаємодіяти з олігомерами та/чи залишковими мономерами, що й лежить в основі елонгації оболонки (рис. 3.8). Нарешті, контакти між двома сусідніми «променями» оболонки призводять до формування високовпорядкованих фібрилярних агрегатів.



У цьому контексті варто зупинитись на отриманих нами даних по вивченню процесу агрегації лізоциму у ліпідному оточенні методом конфокальної мікроскопії. Було виявлено, що формування аморфних агрегатів білка (рис. 3.9, А, В) передують утворенню фібрил (рис. 3.9, Д). Цікаво, аналіз отриманих зображень в середовищі ImageJ за допомогою команди «Skeletonization» показав, що аморфні агрегати характеризуються фракталоподібною структурою (рис. 3.9, Б, Г), у той час коли для амілоїдних фібрил це не спостерігається. Команда «Skeletonization» поступово видаляє пікселі з країв об'єкту, доки не залишиться остов молекули, товщиною в один шар пікселів. Як показано на рис. 3.9, Є, фібрили мають чіткий рівний остов, в якому лише на кінці можна спостерігати залишки фрактальної конфігурації. Однак, здогадно, з часом увесь остов молекули буде візуалізуватись як лінія. Хоча ці експерименти були проведені для мембранозв'язаного білка, можна припустити, що шлях конформаційного переходу у фібрилярний стан схожий для білка у розчині та у ліпідному оточенні, та включає фрактальний механізм.

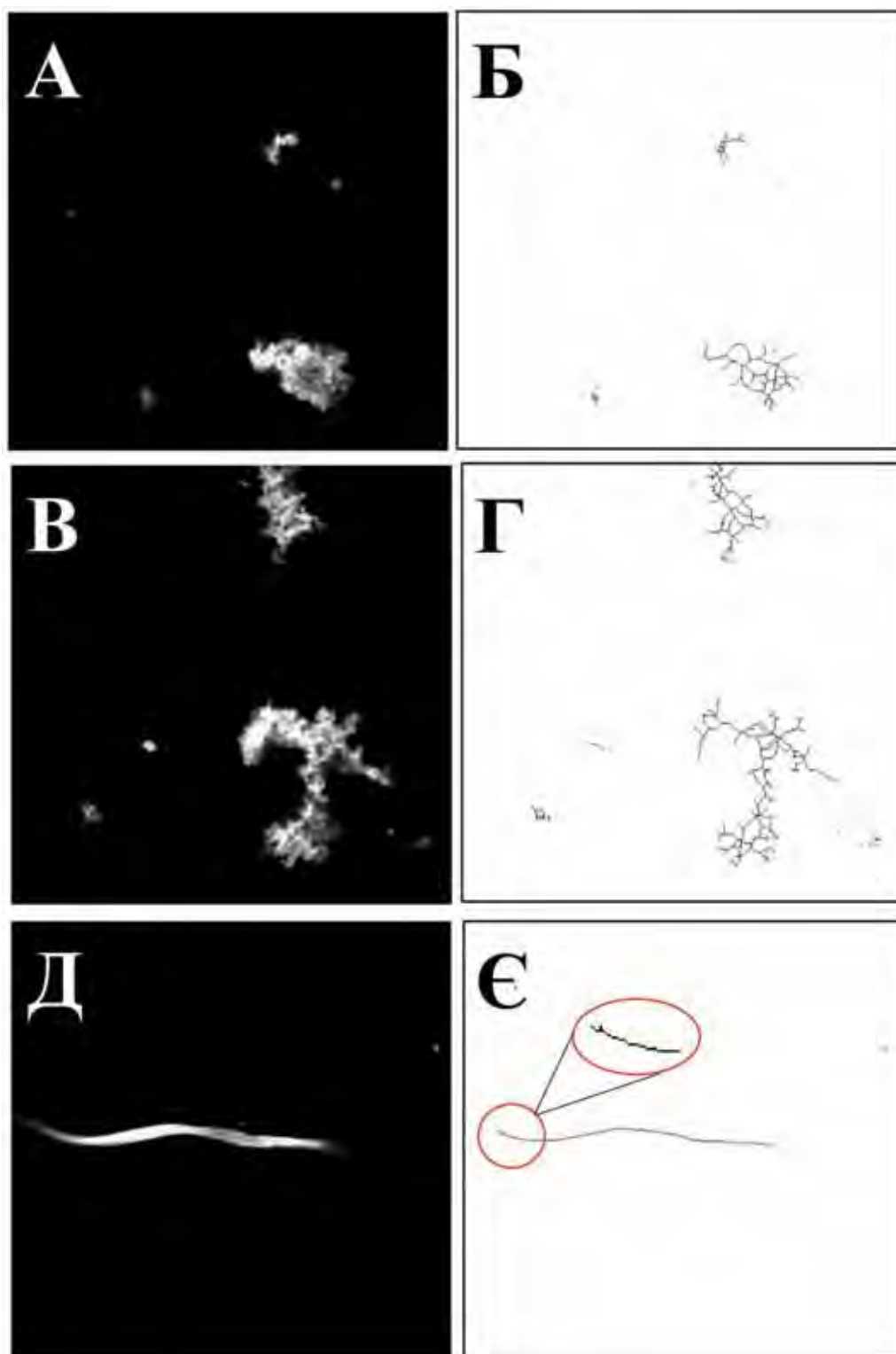


Рис. 3.9. Конфокальна мікроскопія флуоресцеїн-міченого лізоциму у присутності ФГ20 ліпосом. Фотографії А, В зроблені на п'ятий, а фотографія Д – на дванадцятий день інкубації білок-ліпідної системи. Б, Г та Є представляють зображення остову молекул, отримані шляхом обробки даних у середовищі ImageJ.

Ці результати добре узгоджуються з даними, представленими у роботі [258], де було продемонстровано, що утворення фракталоподібних структур лізоциму є проміжним етапом формування зрілих фібрил.

### **3.2. Аналіз агрегаційної поведінки лізоциму в ліпідному оточенні за даними внутрішньо- та міжмолекулярного переносу енергії**

Індуктивно-резонансний перенос енергії (ІРПЕ) представляє собою найкращу альтернативу серед інших методів аналізу біомолекулярних взаємодій. Унікальність цього методу полягає в елегантному комбінуванні надзвичайної чутливості ІРПЕ до відстані між донором та акцептором із перевагами флуоресцентної спектроскопії, такими як висока інформативність, відносна простота, неінвазивність, зручність проведення експериментів. Метод ІРПЕ був успішно застосований для моніторингу агрегації мелітину [259], фосфоламбану [260], кальцієвої АТФази [261], рецептору 5-НТ1А [262], глікофоріну А [263],  $\beta_2$ -адренорецептору [264], тощо. Нерідко вже сам факт відсутності чи наявності ІРПЕ або зміни ефективності переносу енергії в залежності від певних факторів є свідченням олігомерізації молекул.

#### *3.2.1. Внутрішньомолекулярний перенос енергії з залишків триптофану на пірен*

Стратегією, використаною для вивчення агрегації мембранозв'язаного лізоциму за допомогою внутрішньомолекулярного переносу енергії було мічення цистеїнових залишків білка N-(1-пірен)малеїмідом, тобто донорна-акцепторна пара була представлена залишком триптофану у якості донору та піреном у якості акцептору. На рис. 3.10, А показано спектри флуоресценції пірен-міченого лізоциму (Lz-PM). Можна бачити, що ці спектри характеризуються трьома смугами, які відповідають випромінюванню Trp ( $\lambda_{\text{max}} = 332$  нм), мономерів ( $\lambda_{\text{max}} = 390$  нм) та ексимерів пірену ( $\lambda_{\text{max}} = 460$  нм). Кількісне визначення ефективності переносу енергії для пари Trp-пірен неможливе, тому що внутрішньомолекулярний перенос енергії може інтерферувати з міжмолекулярним переносом. Як видно з рис. 3.10, Б, підвищення концентрації

Lz-PM призводило до збільшення відношення інтенсивності флуоресценції пірену до інтенсивності флуоресценції триптофану ( $I_{390}/I_{332}$ ).

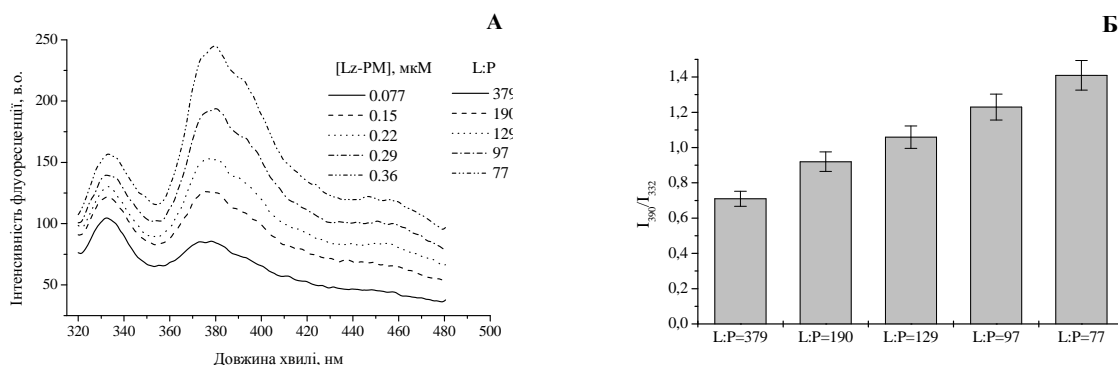


Рис. 3.10. Спектри флуоресценції Lz-PM (А) та відношення  $I_{390}/I_{332}$  (Б) при різних значеннях L:P. Ліпосоми містили 20 мол% ФГ. Довжина хвилі збудження була 296 нм. Концентрація ліпиду складала 28 мкМ. Експерименти проводилися при іонній силі розчину 20 мМ та pH 7.4.

Найбільш імовірною причиною цього ефекту є посилення переносу енергії. Той факт, що параметр  $I_{390}/I_{332}$  залежить від концентрації лізоциму вказує на те, що посилення ІРПЕ викликане агрегацією білка. На відміну від  $I_{390}/I_{332}$ , відношення Е/М залишалося практично незмінним при варіюванні концентрації білка. Цей факт вказує на те, що процес ексімеризації пірену є внутрішньомолекулярним. Згідно з існуючими в літературі даними, в залежності від конформації білка та локального оточення, внутрішньомолекулярні ексимери пірену можуть приймати стекінгову або нестекінгову конфігурації (рис. 3.11) [265]. Якщо «петля»<sup>1</sup>, яка розділяє мономери пірену, досить еластична, то переважатиме стекінгова конфігурація.

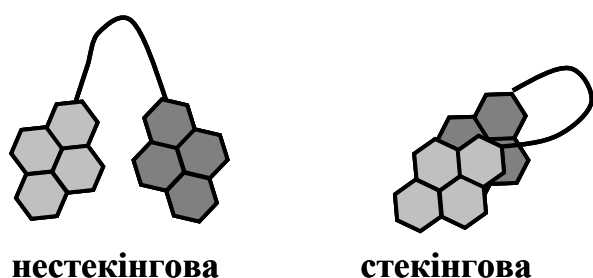


Рис. 3.11. Можливі конфігурації внутрішньомолекулярних ексімерів пірену.

<sup>1</sup> Під «петлею» мається на увазі фрагмент бокового ланцюга білка між мономерами пірену

Така конформація стабілізується гідрофобними взаємодіями мономерів пірену в основному стані. Однак, якщо «петля» представлена елементами вторинної та третинної структури білка, які пригнічують взаємодії між молекулами пірену, то рівновага зміститься у бік нестекінгової конфігурації. Спектрально зафіксувати ту чи іншу конформацію можна за наявністю/відсутністю випромінювання ексимерів – флуоресціюють тільки ексимери у стекінговій конформації [265]. Наявність смуги флуоресценції ексимерів пірену в спектрі випромінювання Lz-PM (рис. 3.10, А) свідчить на користь стекінгової конфігурації агрегатів флуорофору.

### 3.2.2. Перенос енергії між білковими мітками пірен – флуоресцеїн та флуоресцеїн – родамін

Моніторинг агрегаційного стану мембранозв'язаного лізоциму було проведено також за допомогою донорно-акцепторних пар пірен-флуоресцеїн та флуоресцеїн-родамін (Rd). Усі зазначені флуорофори були ковалентно приєднані до лізоциму. При кількісній обробці даних припускали, що донори та акцептори розподілені в одній площині. Ефективність переносу енергії була розрахована за рівняннями (2.3)-(2.4).

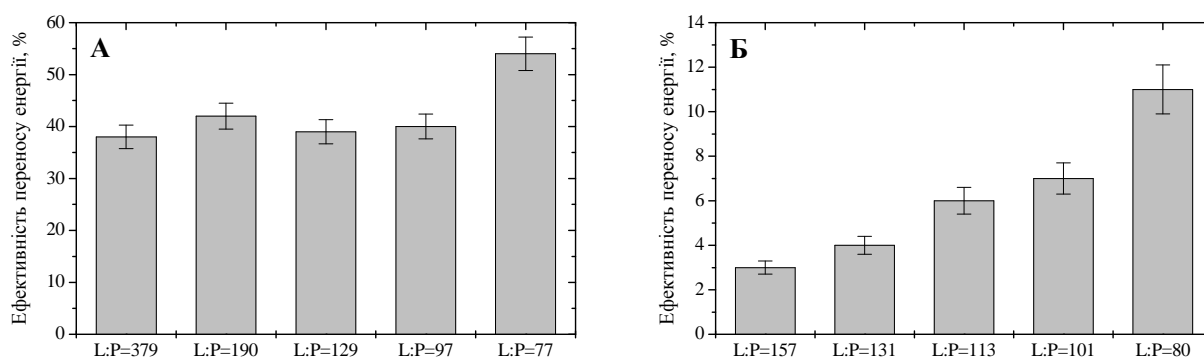


Рис 3.12. Ефективність переносу енергії між піреном й флуоресцеїном (А) та флуоресцеїном й родаміном (Б) при різних значеннях L:P. Концентрація ліпиду була 46 мкМ. Ліпосоми містили 20 мол% ФГ.

Як видно з рис. 3.12, А, ефективність переносу енергії між пірен- та флуоресцеїн-міченим лізоцимом практично не змінювалась при зниженні L:P від

380 до 98, однак при L:P=77 спостерігалось значне зростання цього параметру. Очевидно, таке посилення ІРПЕ є результатом зменшення відстані між донором та акцептором внаслідок агрегації лізоциму. Дане значення L:P, по всій видимості, є критичним для процесу самоасоціації лізоциму. Кількісне підтвердження олігомеризації білка було отримане також при аналізі ІРПЕ між флуоресцеїном та родаміном. Зростання ефективності переносу енергії зі збільшенням концентрації акцептора (тобто концентрації родамін-міченого лізоциму) вказує на утворення агрегатів лізоциму.

В ході апроксимації експериментальних значень ефективності переносу енергії (рис. 3.12, Б) теоретичною моделлю (рівняння (2.3)-(2.4)) методом найменших квадратів відстань максимального наближення між флуоресцеїном і родаміном виявилась рівною  $8 \pm 0.5$  нм.

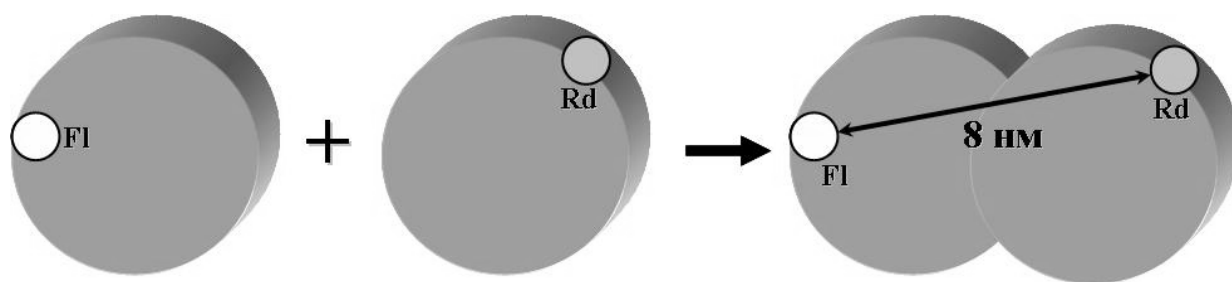


Рис. 3.13. Схематичне зображення агрегації лізоциму за даними ІРПЕ між флуоресцеїном та родаміном, ковалентно приєднаним до білка. Лізоцим зображений сірими дисками.

Отримана оцінка відстані між донором та акцептором перевищує розміри молекули білка лише у 2-2.5 рази, що є додатковим аргументом на користь агрегації лізоциму в ліпідному середовищі (рис. 3.13).

### *3.2.3. Дослідження процесу олігомеризації лізоциму за допомогою часороздільного ІРПЕ*

У підрозділах 3.2.1 та 3.2.2 методами стаціонарної флуоресценції були отримані докази на користь агрегації мембранозв'язаного лізоциму. Однак, стаціонарна флуоресценція усереднює сигнал по усім флуоресціюючим молекулам, тому за допомогою цього аналітичного інструменту важко отримати достовірну інформацію стосовно структури олігомерів білка. Для подолання цих

обмежень, у даному підрозділі наведено методологію вимірювання ІРПЕ, яка дозволяє з'ясувати молекулярні деталі самоасоціації білкових молекул у присутності мембран. Запропонований підхід базується на застосуванні часороздільного переносу енергії (чрІРПЕ) та мономолекулярного ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням (ІРПЕ-ІЗЗ). Донорно-акцепторні пари були представлені флуоресцеїн 5'-ізотіоціанатом (Fl) та DyLight 549 (DyL) (експерименти чрІРПЕ) або Fl та SeTau-647-di-NHS (SeTau) (експерименти ІРПЕ-ІЗЗ), ковалентно приєднаними до лізоциму. Експериментальні та теоретичні зусилля були спрямовані на: i) кількісне детектування ліпід-індукованої агрегації лізоциму, ii) розрахунок ступеня олігомеризації,  $n$ , відстані між мономерами в агрегаті,  $R_a$ , та фракції донору в олігомері,  $X$ , iii) з'ясування впливу заряду мембран та ступеня поверхневого покриття ліпідного бішару білком на вищевказані параметри. Модельні ліпідні мембрани склалися із ФХ та його сумішей з ФГ у різних молярних співвідношеннях.

У відсутності акцепторів затухання флуоресценції донору описується рівнянням [232]:

$$I_D(t) = \exp(-t/\langle\tau_0\rangle) \quad (3.5)$$

де  $\tau_0$  – час життя збудженого стану донора. Якщо донори та акцептори розподілені випадково, затухання флуоресценції донору може бути переписане у вигляді:

$$I_{DA}(t) = \exp\left(-t/\langle\tau\rangle - C(-t/\langle\tau\rangle)^{1/3}\right) \quad (3.6)$$

де

$$C = \Gamma\left(\frac{2}{3}\right) c_A^s \pi R_0^2 \quad (3.7)$$

Тут  $\Gamma$  – неповна гама-функція,  $c_A^s$  – поверхнева концентрація акцепторів, яка залежить від середньої площі на одну молекулу ліпіду,  $S_L$ , та молярної концентрації ліпіду, доступного для акцептора ( $0.5L$ ,  $L$  – загальна концентрація

ліпиду), і зв'язаного акцептора,  $B_A: c_A^s = B_A / 0.5LS_L$ .  $R_0$  – радіус Фьорстера, який дорівнює 5.6 нм для пари Fl-DyL та 5.8 нм для пари Fl-SeTau.

Припускаючи, що між донорами відсутній гомоперенос, та що виключений радіус донорно-акцепторної пари набагато менше  $R_0$ ,  $C$  приймає значення  $C \approx 4.25c_A^s R_0^2$  [266]. Поверхнева концентрація акцепторів була розрахована у рамках моделі адсорбції масштабованих частинок (Додаток А).

Результати вимірювання ІРПЕ в білкових олігомерах були проаналізовані, використовуючи методологію, розроблену Лі та співавторами. [260]. Агрегати лізоциму моделювались симетричними сферичними структурами, які складаються з  $n$  субодиниць (мономерів) (рис. 3.14).

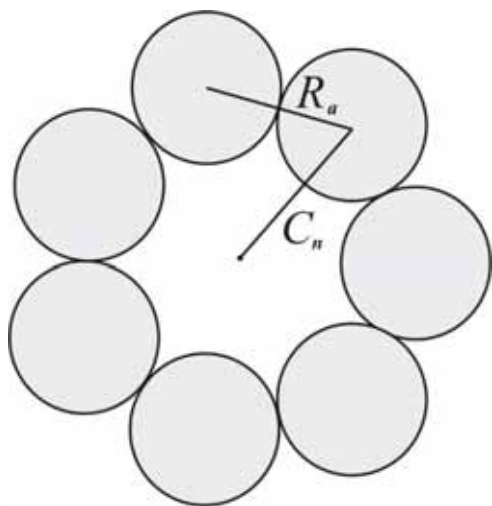


Рис. 3.14. Схематичне зображення олігомерів білка (у даному випадку гексамерів).  $C_n$  – радіус олігомеру,  $R_a$  – відстань між субодиницями.

Припускається, що усі субодиниці (індексовані  $j$ ) мічені донором чи акцептором та розподілені випадково. Олігомери білка знаходяться у термодинамічній рівновазі з мономерними молекулами. Ефективність переносу енергії розраховується у рамках бімодального розподілу:

$$E = 1 - 1 / \left[ n(1 - P_A) \right] \sum_{i=1}^n i * \binom{n}{i} * P_A^{n-1} * (1 - P_A)^i * [1 - E_i(R_a)] \quad (3.8)$$

де  $P_A$  – молярна фракція акцепторів, яка може бути знайдена з урахуванням ступеня мічення,  $R_a$  – відстань між мономерами білка в олігомері, яка дорівнює відстані між донором та акцептором, розташованими на різних субодиницях,



$E_i(R_a)$  – усереднена ефективність переносу енергії у припущенні, що олігомер містить  $i$  донорів.

Нормована інтенсивність флуоресценції донору у мономері може бути виражена як  $F(t)/F(0) = \exp(-k_D t)$ , де  $k_D$  – константа затухання флуоресценції донорів у відсутності акцепторів. Для димеру друга субодиниця містить або акцептор (з імовірністю  $P_A$ ), або донор (з імовірністю  $1 - P_A$ ), тому рівняння затухання флуоресценції донорів містить дві компоненти  $(1 - P_A)\exp(-k_D t)$  та  $P_A \exp[-(k_D + k_2)t]$ , де  $k_2$  – константа переносу енергії на акцептор у позиції 2. Кожна послідовна субодиниця буде подвоювати кількість компонент у рівнянні затухання флуоресценції. Наприклад, для тримеру нормоване затухання інтенсивності флуоресценції донору має вигляд:

$$\frac{F(t)}{F(0)} = P_D P_D \exp(-k_D t) + P_A P_D \exp(-(k_D + k_2)t) + P_D P_A \exp(-(k_D + k_3)t) + P_A P_A \exp(-(k_D + k_2 + k_3)t) \quad (3.9)$$

Результуюча константа переносу енергії для кожного донору є сумою констант кожного акцептору, тому експоненційні компоненти помножуються, що приводить до загального виразу затухання флуоресценції донора:

$$I(t) = \exp(-k_D t) \prod_{j=2}^n [P_D X + P_A \exp(-k_j t)] \quad (3.10)$$

де  $P_D$  – молярна фракція донорів,  $X$  – молярна фракція донорів, що приймають участь в олігомеризації,  $k_j$  – це константа переносу енергії з донора на акцептор на субодиниці  $j$ , що визначається як:

$$k_j = k_D (r_j / R_0)^{-6} \quad (3.11)$$

$r_j$  – відстань між донором та акцептором на субодиниці  $j$ :

$$r_j = 2(C_n / R_0) \sin[\pi(j-1)/n] \quad (3.12)$$

де  $C_n = R_a / [2 \sin(\pi/n)]$  – уявний радіус олігомеру. Варто відзначити, що  $C_n$  означає справжній радіус олігомеру, коли флуорофор розташований у центрі

субодиниці. Стаціонарна інтенсивність флуоресценції донора виражається наступним чином:

$$F_{DA} = \int_0^{\infty} I(t) dt \quad (3.13)$$

та відповідна ефективність переносу енергії:

$$E = 1 - F_{DA}/F_D \quad (3.14)$$

де  $F_{DA}$  та  $F_D$  – інтенсивності флуоресценції донора у присутності та відсутності акцепторів, відповідно.

Таблиця 3.2

Наявність/відсутність переносу енергії у досліджуваних системах

Буфер	—*			
	25 мкМ**	50 мкМ	75 мкМ	100 мкМ
<b>ФХ</b>	—	—	—	—
<b>ФГ5</b>	—	—	—	—
<b>ФГ10</b>	+ 20%***	+ 8%	—	—
<b>ФГ20</b>	+ 25%	+ 18%	+ 12%	+ 9%
<b>ФГ40</b>	+ 33%	+ 25%	+ 20%	+ 17%

\* символи «—» та «+» означають відсутність чи наявність ІРПЕ, відповідно

\*\* концентрація ліпіда

\*\*\* кількісне значення ефективності переносу енергії

На першому етапі дослідження вимірювали ІРПЕ між Fl та DyL, ковалентно приєднаними до лізоциму (Lz-Fl та Lz-DyL, відповідно). Однакові кількості донору (Lz-Fl) були проінкубовані з ліпідними везикулами різного складу при чотирьох концентраціях ліпіду ( $L=25, 50, 75$  та  $100$  мкМ), а потім були протитровані акцептором (Lz-DyL). Стаціонарну інтенсивність флуоресценції та затухання флуоресценції донора вимірювали у кожній точці титрування. Примітно, що результати стаціонарного та часороздільного ІРПЕ співпадали. Контрольні експерименти були проведені у буфері без ліпосом при аналогічних

концентраціях донора та акцептора. Виявилось, що перенос енергії відсутній у контрольних зразках та у випадку, коли Lz-Fl був інкорпорований у ФХ чи ФГ5 везикули при усіх значеннях  $L$  чи ФГ10 везикули при  $L = 75$  та  $100$  мкМ (табл. 3.2). Натомість, помітний перенос енергії спостерігався у присутності ФГ10 ліпосом при  $L = 25$  чи  $50$  мкМ та у ФГ20 і ФГ40 везикулах при усіх концентраціях ліпиду (табл. 3.2).

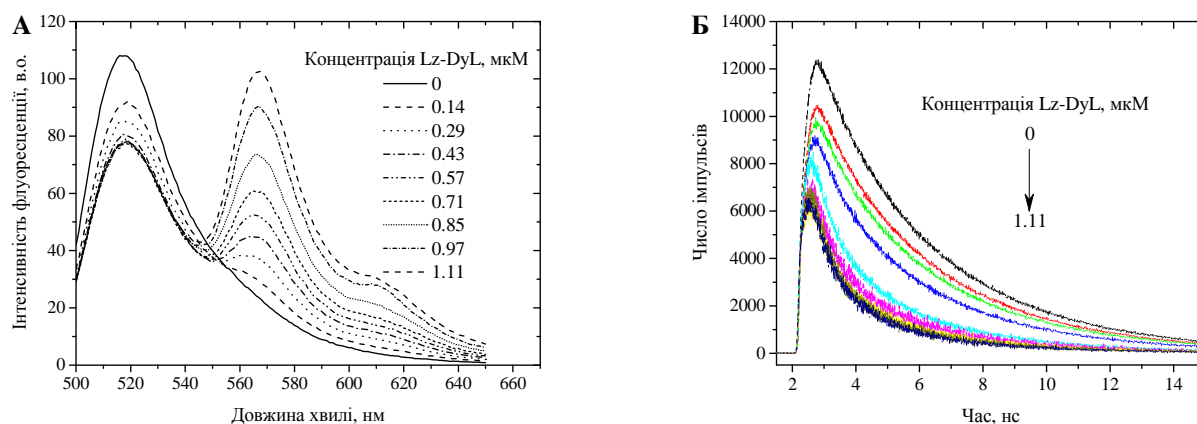


Рис. 3.15. Спектри флуоресценції (А) та затухання флуоресценції (Б) Lz-Fl при варіюванні концентрації акцептора у ФГ20 везикулах. Концентрація ліпиду складала 25 мкМ.

Додавання Lz-DyL призвело до а) зниження інтенсивності флуоресценції Lz-Fl, б) появи смуги випромінювання акцептора в спектрі флуоресценції донора (рис. 3.15, А), в) зменшення часу життя Lz-Fl, який був розрахований із профілів затухання флуоресценції (рис. 3.15, Б). Окрім цього, перенос енергії посилювався при підвищенні молярної фракції ФГ та зниженні концентрації ліпиду (табл. 3.2). При аналізі отриманих даних враховували той факт, що ІРПЕ може відбуватися між агрегованими донорами та акцепторами або ж неагрегованими, але розташованими близько один до одного. Для диференціації між цими двома випадками, інтенсивності флуоресценції  $I_D(t)$  та  $I_{DA}(t)$  були розраховані згідно з рівняннями (3.5) та (3.6). Функція  $\{\ln[I_D(t)/I_{DA}(t)]\}^3$  має бути прямолінійною, якщо ІРПЕ має місце між вільно дифундуючими донорами та акцепторами, та набувати кубічної форми у протилежному випадку [267].

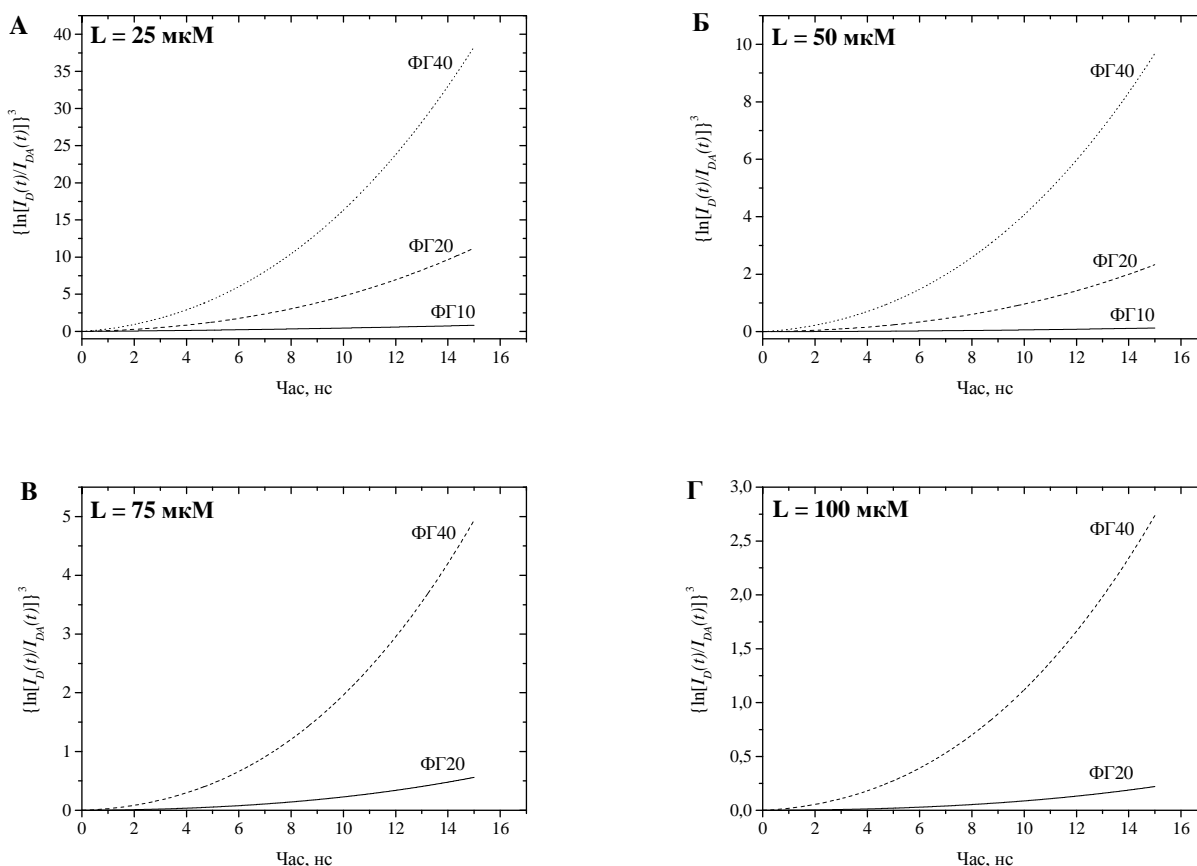


Рис. 3.16. Кубічна форма логарифмічної функції  $\ln[I_D(t)/I_{DA}(t)]$  в залежності від часу для різних концентрацій ліпиду. Концентрація ліпиду була 25 (А), 50 (Б), 75 (В) та 100 (Г) мкМ.

Дійсно, як показано на рис. 3.16, криві є лінійними для лізоциму, зв'язаного зі слабо зарядженими ФГ10 бішарами, та мають параболічну форму для білка, інкорпорованого у ФГ20 та ФГ40 мембрани. Ці ефекти можуть бути пояснені тим, що у системі лізоцим+ФГ10 білок залишається у мономерному стані, тоді як у системі лізоцим+ФГ20/ФГ40 перенос енергії відбувається між не випадково розташованими, агрегованими донорами та акцепторами. Далі, результати, отримані для ФГ20 та ФГ40 ліпосом були проаналізовані у рамках моделі ІРПЕ в олігомерах (рівняння (3.8) – (3.14)) з використанням наступного алгоритму: (1) побудова залежності ефективності переносу енергії ( $E$ ), визначеної на основі вимірювань стаціонарної флуоресценції, від молярної фракції акцепторів ( $P_A$ ) (рис. 3.17); (2) розрахунок профілю затухання флуоресценції Lz-FI за допомогою рівнянь (3.10) – (3.12); (3) знаходження інтенсивності флуоресценції донора

(рівняння (3.13)); (4) підгонка теоретично розрахованих кривих (рівняння (3.14)) до експериментальних залежностей  $E(P_A)$  шляхом мінімізації функції  $f = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (E_e - E_c)^2$  при варіюванні  $n$ ,  $R_a$  та  $X$  ( $N$  – кількість експериментальних точок,  $E_e$  та  $E_c$  – експериментальна та теоретична ефективності переносу енергії, відповідно).

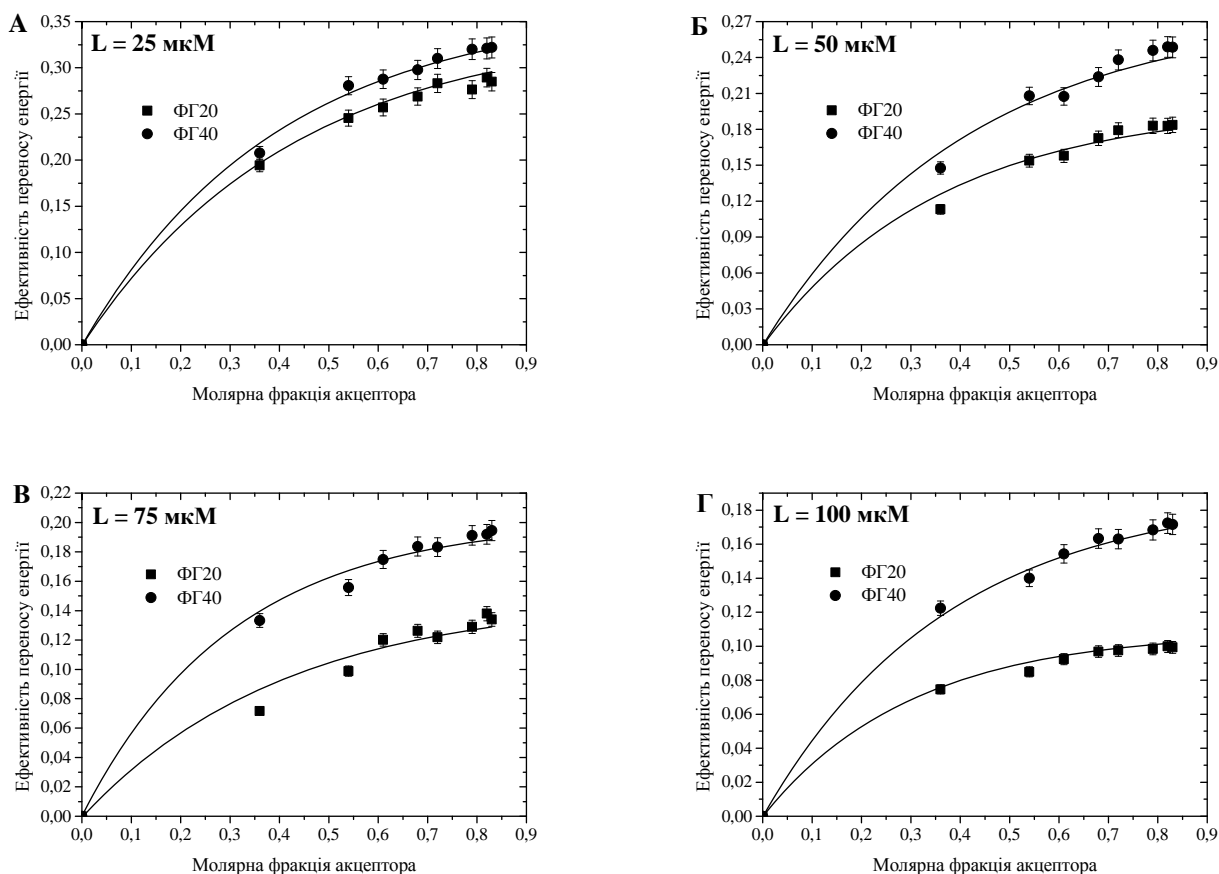


Рис. 3.17. Ефективність переносу енергії як функція молярної фракції акцепторів. Суцільними лініями представлені теоретичні криві, що забезпечують найкращу підгонку експериментальних даних.

Для отримання більш точних оцінок вищевказаних параметрів, ряд можливих значень  $R_a$  було визначено за допомогою мономолекулярного ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням (ІРПЕ-ІЗЗ). У той час коли результати вимірювань традиційного ІРПЕ можуть спотворюватись сигналом «нульової ефективності» внаслідок явищ, не пов'язаних з переносом енергії, такими, наприклад, як неповне

мічення, фотознебарвлювання донора чи акцептора, тощо, ІРПЕ-ІЗЗ дозволяє детектувати «істинний» ІРПЕ [268]. При вимірюваннях ІРПЕ-ІЗЗ система збуджується двома незалежними, але синхронізованими імпульсами лазера, які мають різну довжину хвиль (у нашому випадку 470 та 630 нм). Імпульси лазера мають затримку один відносно одного для того, щоб створити послідовність незалежних затухань донора та акцептора, збуджених кожним імпульсом окремо. Короткохвильовий імпульс збуджує і донор, і акцептор. Затухання флуоресценції донора можна легко відокремити за допомогою відповідних фільтрів. Довгохвильовий імпульс збуджує лише акцептор, тому спостерігається лише затухання акцептора. Роль довгохвильової компоненти збудження полягає у визначенні, чи присутній акцептор у даний конкретний час в аналізованій донорно-акцепторній парі. Під час обробки отриманих даних, програма виділяє та аналізує лише ті пари, де донор та акцептор присутні, та зміни часу життя донора є результатом виключно переносу енергії. При цьому пари ІРПЕ, які можуть викликати артефакти при вимірюванні традиційного ІРПЕ, виключаються із розгляду.

На рис. 3.18 представлено гістограми ефективності ІРПЕ та відстані між донором та акцептором. Можна бачити, що в системі існує дві популяції донорно-акцепторних пар – фракція, що характеризується низьким ІРПЕ ( $\sim 10\%$ ), та фракція з середніми значеннями ефективності переносу ( $\sim 27\%$ ). Відповідні відстані між донором та акцептором лежать в діапазоні 4.2 – 7 нм з максимумами  $\sim 4.7$  нм та  $\sim 5.8$  нм, відповідно. Отримані оцінки відстані між донором та акцептором були взяті як нижня та верхня границі  $R_a$  при аналізі даних стаціонарного та часороздільного ІРПЕ в рамках вищеописаної моделі переносу енергії в олігомерах. Однак, задовільна відповідність ( $f \leq 10^{-4}$ ) між теоретичними оцінками та експериментальними результатами була досягнута при нереалістичних значеннях ступеня олігомеризації ( $n \geq 25$ ). Це може бути пов'язане із невизначеністю орієнтаційного фактору ( $\kappa^2$ ), що є основним джерелом помилок при вимірюванні ІРПЕ.

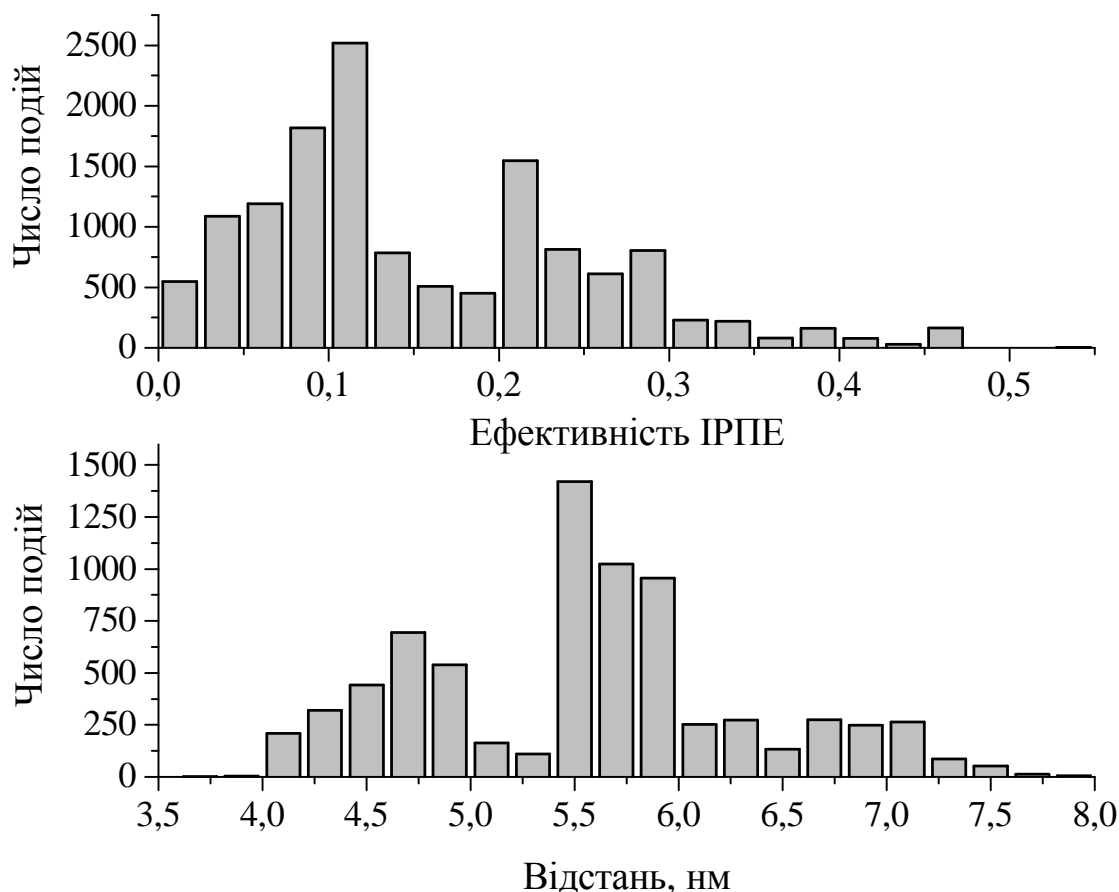


Рис. 3.18. Гістограми ІРПЕ-ІЗЗ для ефективності ІРПЕ (А) та відстані між донором та акцептором (Б) у ФГ40 мембранах. Донорно-акцепторна пара була представлена Lz-FI та Lz-SeTau.

Значення цього параметру лежать у межах від 0 до 4, в залежності від кута між диполями переходу випромінювання донора та поглинання акцептора, та кутами між цими диполями та вектором, що з'єднує донор та акцептор. Як зазначалось вище, для ізотропних та динамічно усереднених умов  $\kappa^2 = 0.67$ . Однак, очевидно, що ізотропні умови не виконуються для високоанізотропного мембранного середовища, де обертання диполів донора та акцептора суттєво обмежене. До того ж, утворення міжмолекулярних контактів між мономерами білка при його агрегації накладає ще більші обмеження на обертання донора та акцептора. Для подолання проблеми невизначеності орієнтаційного фактору,  $\kappa^2$  варіювали у максимально можливих межах (від 0 до 4), тобто радіус Фьорстера визначався за рівнянням:

$$R_0 = R_0^{0.67} \sqrt[6]{\frac{\kappa^2}{0.67}} \quad (3.15)$$

де  $R_0^{0.67}$  – радіус Фьорстеру, розрахований при  $\kappa^2 = 0.67$  ( $R_0^{0.67} = 5.63$  нм для пари Fl – DyL). Підстановка цього виразу у рівняння (3.11) значно покращила підгонку експериментальних даних та дозволила отримати набір параметрів ( $R_0, n, R_a, X$ ), який забезпечує найкращу відповідність між теоретичними та експериментальними кривими (рис. 3.17).

Таблиця 3.3

Параметри ІРПЕ в олігомерах лізоциму

Система	$L$ , мкМ	$R_0$ , нм	$n$	$R_a$ , нм	$X$	$f$ , $\times 10^{-5}$
<b>ФГ20</b>	25	3.21	5.8	6.3	0.52	8.5
	50	3.19	4.8	6.35	0.44	9.3
	75	3.18	3.9	6.31	0.35	1.8
	100	3.14	3.8	6.26	0.33	3.3
<b>ФГ40</b>	25	3.40	6.3	6.23	0.65	1.32
	50	3.20	5.6	6.3	0.54	9.8
	75	3.17	5.3	6.12	0.48	1.7
	100	3.14	4.9	6.13	0.4	7.1

Як показано у табл. 3.3, зростання вмісту аніонного ліпиду викликало збільшення  $n$  та  $X$ , зменшення  $R_a$ , що відображає зростання агрегаційного потенціалу лізоциму та більш щільне пакування мономерів в олігомерному кластері. Аналогічна тенденція була виявлена при зниженні концентрації ліпиду. Необхідно відзначити, що, як показано на рис. 3.19, тільки значення  $R_0, n, R_a, X$ , представлені в табл. 3.3, приводять до мінімуму функції помилки  $f$ .



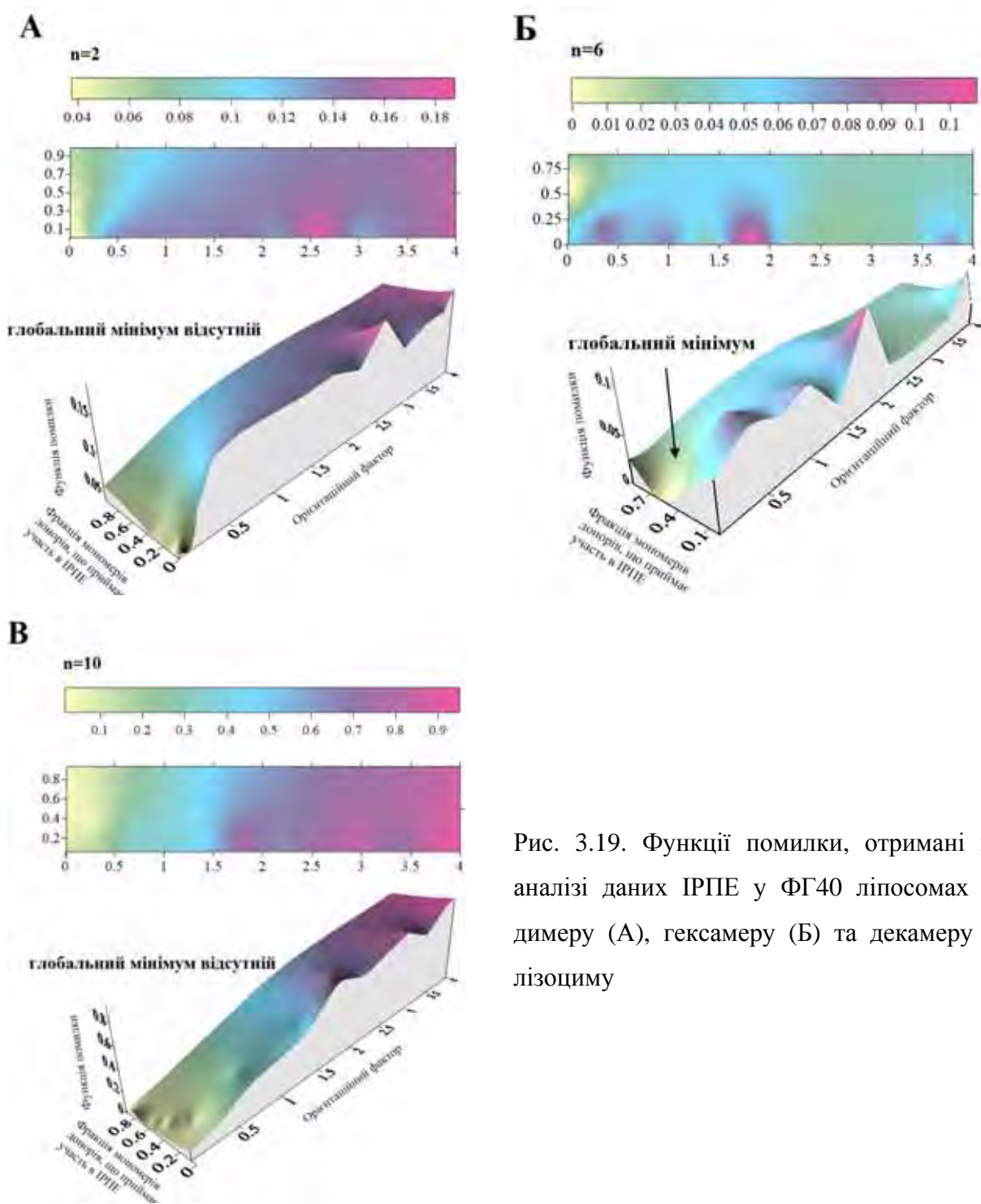


Рис. 3.19. Функції помилки, отримані при аналізі даних ІРПЕ у ФГ40 ліпосомах для димеру (А), гексамеру (Б) та декамеру (В) лізоциму

Таким чином, детальний аналіз інтермолекулярного ІРПЕ показав, що лізоцим зберігає свою мономерну форму у розчині та при зв'язуванні з ФХ, ФГ5 та ФГ10 мембранами (рис. 3.20). На противагу, коли вміст ФГ у ліпідному бішарі досягає 20 та 40 мол%, лізоцим переходить в олігомерну форму (рис. 3.20), причому цей ефект був більш виражений при зменшенні концентрації ліпиду.

Ефект посилення агрегації білків у мембранному оточенні пов'язаний з декомпактизацією їх третинної структури та підвищенням внутрішньомолекулярної рухливості [10]. Припускається, що ліпідний бішар знижує активаційний бар'єр для розгортання білка, забезпечуючи середовище зі зниженими значеннями рН та діелектричної сталої.

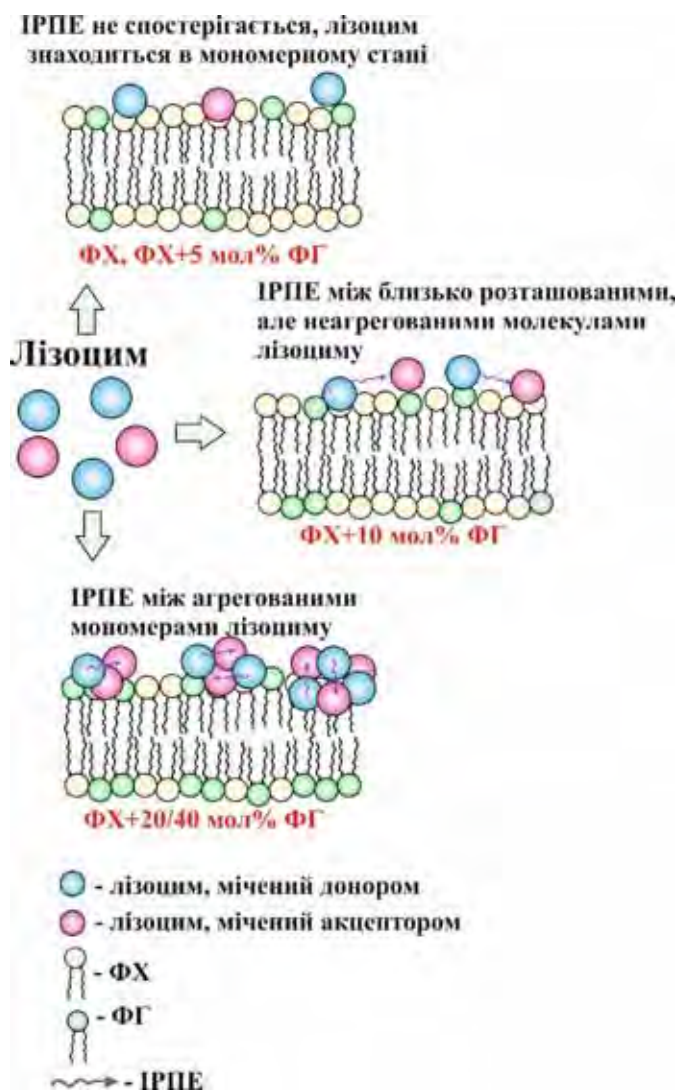


Рис. 3.20. Схематичне зображення процесів, що протікають в досліджуваних системах

Це посилює відштовхування бокових груп вздовж поліпептидного ланцюга та сприяє утворенню більш відкритої структури з експонованими ділянками, схильними до агрегації. Дійсно, згідно з нашими оцінками, примембранне значення рН нижче, ніж рН у розчині, на 0.6, 1, 1.6 та 2.2 для ФГ5, ФГ10, ФГ20 та ФГ40 везикул, відповідно. Однак, лізоцим – це досить стабільний білок, вторинна та третинна структури якого зберігаються навіть при рН = 0.6 [269]. Окрім цього, припущення про рН-контрольовану олігомеризацію лізоциму не може задовільно

пояснити зростання агрегаційного потенціалу білка при зниженні концентрації ліпиду. З огляду на це, знижене значення примембранного рН не можна вважати основним детермінантом самоасоціації лізоциму у мембранозв'язаному стані. Альтернативною причиною зростання ступеня олігомеризації при підвищенні молярної фракції аніонного ліпиду є екранування позитивно заряджених груп лізоциму негативно зарядженими групами полярних голівок ФГ. Однак, така інтерпретація протирічить результатам дослідження процесу агрегації білка при варіюванні концентрації ліпиду, або молярного співвідношення ліпід:білок (L/P). У роботі [270] при вивченні комплексоутворення цитохрому *c* з модельними мембранами було зроблено припущення, що при високих значеннях L/P, тобто, коли ліпід у надлишку, сорбція білка не призводить до істотних змін поверхневої густини заряду ліпідного бішару, та електростатичні білок-ліпідні взаємодії є превалюючими. Проте, при зниженні відношення L/P внесок електростатичних взаємодій в стабілізацію білок-ліпідних комплексів зменшується, внаслідок нейтралізації поверхневого заряду мембрани при зв'язуванні білка. У той же час, зростає внесок гідрофобних взаємодій, тобто вбудовування білка в гідрофобну область ліпідного бішару конкурує з поверхневою електростатично-контрольованою адсорбцією. Іншими словами, ці міркування означають, що якщо агрегація мембранозв'язаного лізоциму визначається електростатичними взаємодіями, то параметри  $n$  та  $X$  мають зростати при підвищенні L/P. Протилежна тенденція, виявлена в даній роботі, свідчить на користь того, що електростатичні чинники не є вирішальними для переходу білка в агрегований стан. Тому необхідно шукати інші механізми, які б дозволили відтворити інтегральну картину ліпід-опосередкованої агрегації лізоциму та забезпечити задовільне пояснення: (i) відсутності агрегації лізоциму в буфері та ФХ, ФГ5 чи ФГ10 ліпідних бішарах, (ii) посилення білок-білкових взаємодій при зростанні вмісту ФГ, (iii) послаблення агрегаційного потенціалу лізоциму при високих концентраціях ліпиду. У пошуках таких механізмів видається доцільним звернутися до великої групи теоретичних робіт, спрямованих на з'ясування природи олігомеризації білків у мембранному оточенні [271-273]. У цих роботах

здатність мембранозв'язаних білків до самоасоціації пояснюється дальнодіючим мембрано-опосередкованим притяганням між вбудованими в бішар поліпептидними ланцюгами. Такого роду притягання виникає внаслідок перекривання областей пертурбацій мембрани, викликаних інкорпорацією сторонньої молекули. Коли пертурбовані області перекриваються, виникає притягання між сусідніми вбудованими мономерами білка, обумовлене мінімізацією вільної енергії деформацій бішару. Деформації мембрани можуть включати електростатично-контрольований латеральний перерозподіл ліпідів, тобто акумуляцію протилежно заряджених молекул ліпіда навколо сорбованого білка, або еластичні деформації, викликані порушенням принципу гідрофобної відповідності та/чи змінами параметру порядку мембрани, товщини бішару та площі на одну ліпідну молекулу [274]. Ці пертурбації створюють градієнт параметрів ліпідного бішару на границі зони сорбції білка та породжують позитивну лінійну енергію, пропорційну поперечному перетину зони білок-ліпідної взаємодії. Це сприяє притягуванню між молекулами білка, тому що поперечний перетин двох агрегованих мономерів менший, ніж сума перетинів двох окремих молекул. На основі статистико-механічної теорії, у роботі [275] було показано, що перекривання пертурбованих зон бішару ефективно на відстанях між мономерами білка, що не перевищують 1.5 нм. Це можливо при відносно високих значеннях латеральної щільності сорбованого білка. Якщо цей механізм має місце в наших системах, тоді зниження концентрації ліпиду (при постійній концентрації білка) призведе до підвищення ступеня покриття мембрани лізоцимом та сприятиме перекриванню деформованих ліпідних областей навколо сорбованого мономерного білка, посилюючи тим самим агрегаційний потенціал лізоциму. Аналогічним чином може бути інтерпретовано зростання здатності лізоциму до агрегації при підвищенні молярної фракції ФГ. Вочевидь, зв'язування білка з ФХ, ФГ10 та ФГ20 везикулами недостатньо сильне для того, щоб забезпечити критичну поверхневу густину сорбованого білка, необхідну для перекривання пертурбованих областей ліпідного бішару. Зростання вмісту аніонного ліпиду підвищує концентрацію зв'язаного лізоциму та,

відповідно, його поверхневу густину, призводячи врешті рещт до зменшення відстані між сорбованими мономерами та перекриванню деформованих ділянок ліпідного бішару. Запропонований сценарій висвітлює ключову роль ступеня покриття мембрани білком в регулюванні процесу агрегації та свідчить на користь того, що ліпідний бішар не може бути описаний як пасивна матриця, на якій утворюються білкові кластери, а є активним учасником процесу самоасоціації білка.

Аналіз реакції димеризації лізоциму методами молекулярного моделювання дозволив ідентифікувати два типа енергетично вигідних комплексів [276]. Перший тип комплексів включає наступні контакти між амінокислотними залишками: Lys<sub>33</sub>-Asp<sub>48</sub>, Arg<sub>112</sub>-Glu<sub>35</sub>, Glu<sub>35</sub>-Arg<sub>73</sub> та Arg<sub>73</sub>-Asp<sub>101</sub>. Електростатична енергія взаємодії складає -4.75 ккал/моль, а контактна площа цього комплексу становить 224 Å<sup>2</sup>. У свою чергу, комплекси другого типу стабілізуються контактами Arg<sub>148</sub>- Asp<sub>48</sub> та Leu<sub>129</sub>- Arg<sub>61</sub>. Електростатична енергія взаємодії та контактна площа для цього комплексу дорівнюють -6.3 ккал/моль та 84 Å<sup>2</sup>, відповідно. З урахуванням цих фактів структура тетрамеру та гексамеру лізоциму (найбільш імовірні самоасоціати білка у наших системах згідно з табл. 3.3) може бути зображена, як показано на рис. 3.21. У даному контексті доцільно проаналізувати, як запропонована структура олігомерів лізоциму корелює із отриманими нами значеннями відстані між мономерними субодинацями, яка фактично дорівнює відстані між флуоресцентними мітками, що утворюють донорно-акцепторну пару. Ковалентне приєднання Fl до молекули білка відбувається по аміногрупам лізинових залишків, тоді як DyL приєднується до SH-груп цистеїнових залишків.

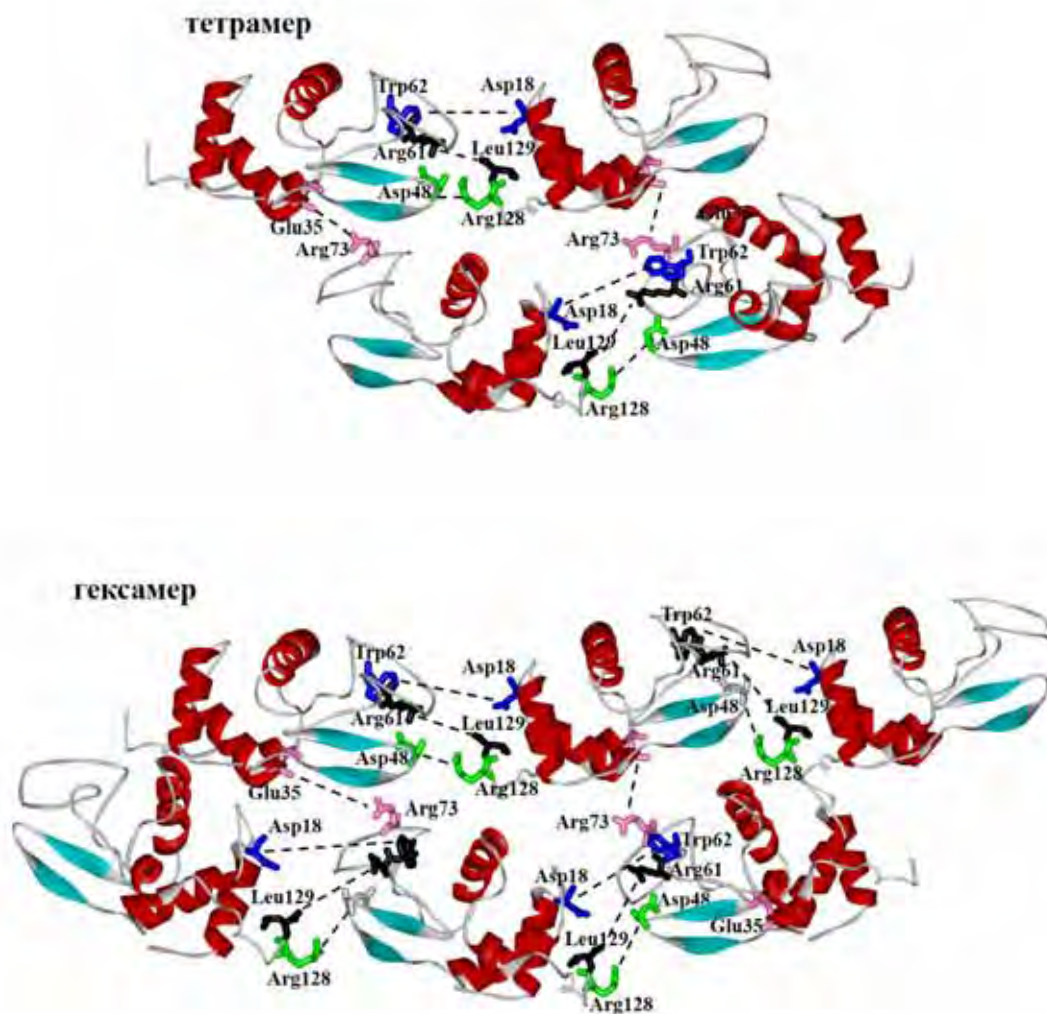


Рис.3.21. Передбачувана структура тетра- та гексамеру лізоциму.

До складу лізоциму входять шість лізинів та вісім цистеїнів. Теоретично, кожен з Lys чи Cys залишків може представляти собою мішень для ковалентного мічення Fl чи DyL. Однак, було показано, що лізинові залишки лізоциму відрізняються за своєю реакційною здатністю [277]. Згідно з даними мас-спектрометричного аналізу, найвища хімічна реактивність притаманна залишкам Lys<sub>33</sub> та Lys<sub>97</sub>. Тому логічно було припустити, що Fl приєднується, головним чином, саме до цих амінокислотних залишків. Визначення потенційних сайтів ковалентного зв'язування DyL ускладнюється відсутністю інформації стосовно хімічної активності цистеїнових залишків. Однак, якщо приблизно оцінити відстані між усіма донорно-акцепторними парами, що включають Lys<sub>33</sub> і Lys<sub>97</sub>, та

усіма Cys в двох сусідніх субодиницях олігомеру лізоциму, то середня відстань складає ~ 6 нм. Ця величина добре узгоджується із даними, представленими в табл. 3.3.

### **3.3. Дослідження лізоцим-ліпідних систем методом флуоресцентної мікроскопії повного внутрішнього відбиття**

У попередньому підрозділі були отримані докази стосовно посилення агрегації лізоциму в мембранозв'язаному стані. Ідея про те, що ліпідний бішар може індукувати взаємодії між сорбованими молекулами білка отримала своє підтвердження у великій кількості робіт [10,11,15,21,36]. Так, у 1984 році Морітсен та Блум запропонували «матричну» модель, яка описує взаємодії між сорбованими білками як результат порушення принципу гідрофобної відповідності між зануреними у бішар фрагментами поліпептидного ланцюга та ліпідними молекулами [278]. Роль локальних еластичних деформацій бішару в олігомеризації білків була пізніше обговорена у роботах [279]. Окрім цього, рядом авторів було показано, що самоасоціація білків може бути викликана градієнтом кривизни та поверхневого заряду бішару [280]. Така ситуація реалізується в мембранних системах, коли ліпідний бішар містить високодинамічні домени, насичені певними ліпідами чи білками. Ці супрамолекулярні структури зазвичай розглядаються як просторово обмежені мембранні області, що відрізняються від сусідніх ділянок за своїми фізико-хімічними властивостями. Рушійною силою для такої компартменталізації бішару є ліпід-ліпідні, білок-ліпідні та білок-білкові взаємодії, зміни осмотичного тиску, температури та інших умов навколишнього середовища [38,281]. Серед перелічених чинників, особливий інтерес викликає утворення ліпідних доменів у відповідь на сорбцію білків. Це обумовлено кореляцією двох процесів: а) сорбовані молекули білка можуть ініціювати формування ліпідних доменів, б) утворені домени внаслідок наявності в них градієнту фізико-хімічних характеристик бішару можуть бути рушійною силою агрегації зв'язаного білка. Зокрема, якщо мембрана складається з двох компонентів, скажімо, А та Б, та білок преференційно зв'язується з компонентом



А, то навколо сорбованого білка утворюються А-збагачені пертурбовані області, поверхнева густина яких спадає на відстанях, що визначаються балансом між внесками у вільну енергію зв'язування процесів, зумовлених і) відхиленням від преференційного складу мембрани та ii) виникненням композиційного градієнту. Коли дві молекули білка знаходяться на відстані, достатній для перекривання А-збагачених доменів, утворення білок-білкових контактів стає термодинамічно вигідним.

У подальших дослідженнях наші зусилля були спрямовані на з'ясування кореляції між процесами утворення лізоцим-ліпідних комплексів, латерального перерозподілу ліпідів та агрегації білка. Модельні ліпідні системи були представлені ліпідними бішарами на підкладці, які склалися з ФХ та його сумішей з 5 чи 25 мол% КЛ. В якості аналітичного інструменту використовували метод флуоресцентної мікроскопії повного внутрішнього відбиття (ФМПВВ). Для отримання флуоресцентного сигналу ліпідні бішари були доповані слідовими кількостями флуоресцентних ліпідів BODIPY-ФХ чи BODIPY-КЛ.

У відсутності лізоциму ліпідні бішари характеризуються гомогенною флуоресценцією без ознак мембранних дефектів (панель А на рис. 3.22 – 3.25). Додавання лізоциму до ФХ мембран не мало впливу на морфологію ліпідного бішару, як можна судити з інваріантності флуоресценції BODIPY-ФХ. Більш того, нейтрально заряджені бішари характеризувались гомогенним сигналом навіть після 60 хвилин білок-ліпідної взаємодії. Вочевидь, білок не спричиняє впливу на молекулярну структуру цього типу мембран, або ж пертурбації настільки малі, що знаходяться за межами оптичного розділення. На противагу, у ФХ/КЛ мембранах зв'язування білка викликало утворення великих чітких областей з посиленою флуоресценцією BODIPY-КЛ (рис. 3.22 – 3.25). Ці області мають мікрометровий розмір, та, в цілому, залишаються у площині бішару. Формування таких структур не спостерігалось у контрольних експериментах, коли замість білка додавався буфер.



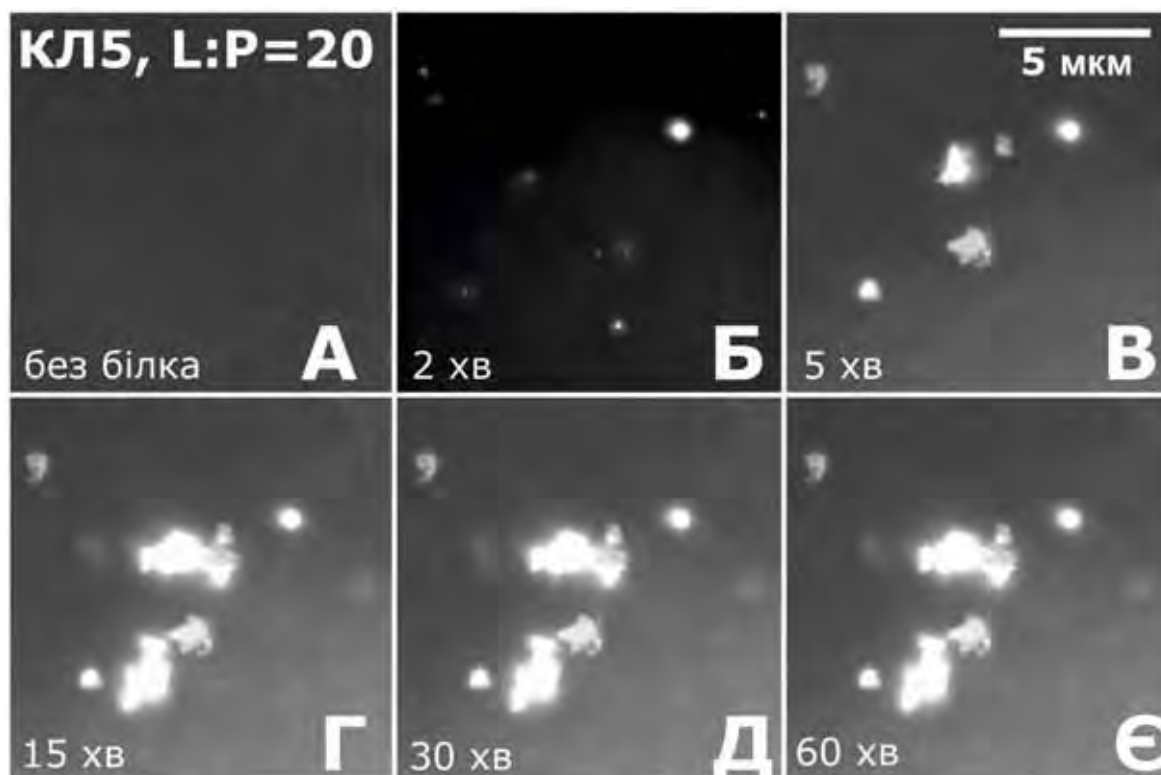


Рис. 3.22. Утворення КЛ-збагачених доменів у КЛ5 модельних мембранах. Мікрофотографії були зроблені до (А) та після (Б – Є) додавання лізоциму. Концентрація білка була 0.1 мкМ.

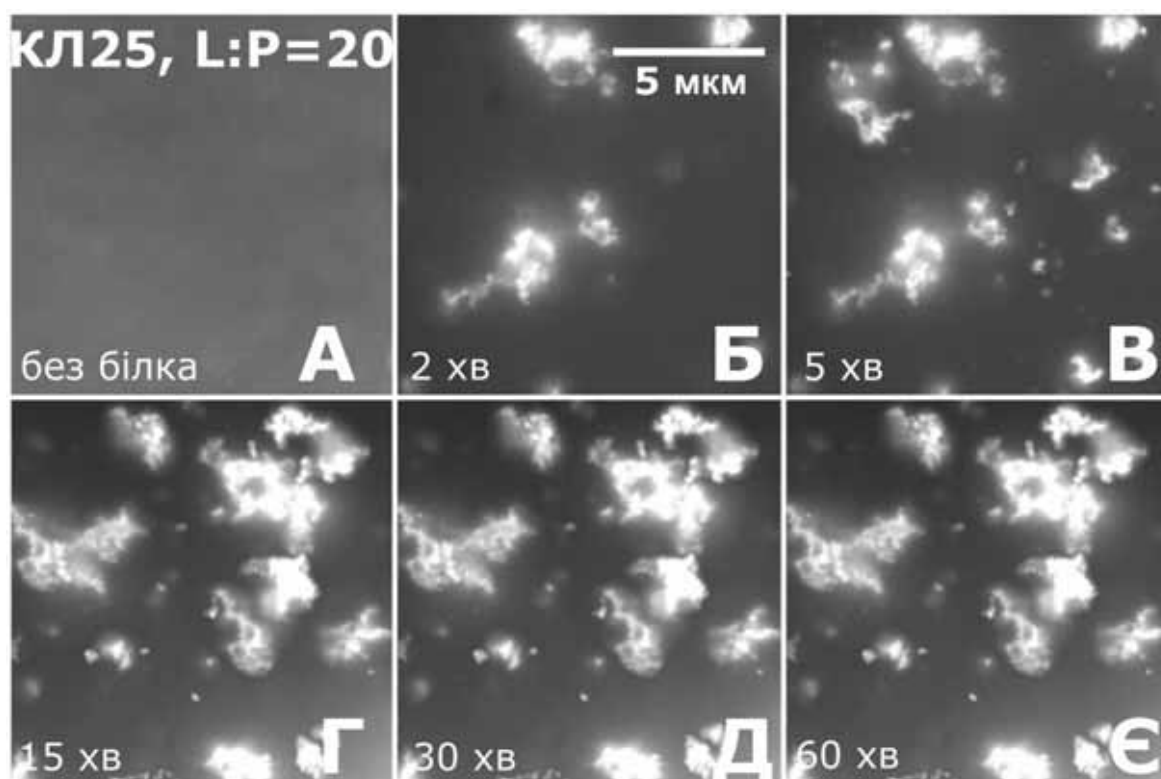


Рис. 3.23. Репрезентативні мікрофотографії КЛ25 бішарів до (А) та після (Б – Є) додавання 0.1 мкМ лізоциму.

Отримані дані свідчать про те, що утворені області представляють собою домени, насичені КЛ. Примітно, ці результати підтверджуються даними роботи [29], в якій докази на користь викликаного лізоцимом латерального перерозподілу ліпідів були отримані за допомогою ІРПЕ. Сегрегація КЛ у домени виявилась функцією трьох параметрів: а) вміст аніонного ліпиду, б) концентрація лізоциму, в) час утворення лізоцим-ліпідних комплексів ( $t$ ). Аналіз фотографій ФМПВВ у середовищі ImageJ дозволив визначити кількісні параметри доменів: площу,  $d$ , та зайнятість доменами поля зору зображення (ПЗЗ),  $\sigma$ . Отримані значення параметрів, представлені у табл. 3.4, вказують на те, що зростання концентрації лізоциму, молярної фракції КЛ та часу білок-ліпідної взаємодії призводить до збільшення числа та площі ліпідних доменів.

Таблиця 3.4

Структурні параметри ліпідних доменів, індукованих лізоцимом

[Лізоцим], мкМ	$t$ , хв	$d$ , мкм <sup>2</sup>		$\sigma$ , %	
		КЛ5	КЛ25	КЛ5	КЛ25
<b>0.1</b>	2	0.17-1.2	0.18-3.5	1.9	3.7
	5	0.21-1.64	0.24-5.2	3	10
	15	0.32-7.75	0.4-9.04	6.9	16.6
	30	0.32-7.75	0.4-9.04	6.9	16.6
	60	0.32-7.75	0.4-9.04	6.9	16.6
<b>0.4</b>	2	0.3-4.84	0.31-8.96	4.3	9.8
	5	0.34-18.6	0.34-12.2	10.4	18.7
	15	0.34-18.6	0.34-21.4	10.4	38.18
	30	0.34-18.6	0.34-21.4	10.4	38.18
	60	0.34-18.6	0.34-21.4	10.4	38.18

\* значення  $d$  відповідають мінімальним та максимальним значенням площі доменів, що спостерігались в досліджуваних системах

Для порівняння, після 15 хвилин взаємодії бішарів з 0.1 мкМ лізоциму (молярне відношення ліпід:білок складало 20:1),  $\sigma$  в КЛ25 було в 2.4 рази більшим, у

порівнянні з КЛ5 бішарами (панель Г на рис. 3.22 та 3.23), тоді як для концентрації білка 0.4 мкМ ( $L/P=5$ ) інкремент складав 3.7 (панель Г на рис. 3.24 та 3.25). Ці області утворюються молекулами КЛ, які кластеризуються навколо сорбованого лізоциму, оскільки BODIPY-КЛ є єдиним флуорофором в системі, який збуджується лазером при довжині хвилі 488 нм.

Зростання часу інкубації білок-ліпідних сумішей також призвело до посилення латеральної сегрегації КЛ. Максимальна площа доменів ( $21 \text{ мкм}^2$ ) спостерігалась для КЛ5 бішарів при  $L/P=5$ ,  $t=15$  хв. Аналіз мікрофотографій, що були зроблені у різні проміжки часу, показав, що зростання площі та кількості доменів відбувається протягом  $\sim 5$  хвилин для КЛ5,  $L/P=5$ ,  $\sim 30$  хвилин для КЛ25,  $L/P=5$  та  $\sim 15$  хвилин для КЛ5 та КЛ25 при  $L/P=5$  (табл. 3.4). Так, наприклад, результатом 2 хвилин взаємодії 0.4 мкМ лізоциму з КЛ25 мембранами є  $\sigma \sim 10\%$ , у той час як через 15 хвилин інкубації білка з ліпідами цей параметр дорівнював  $\sim 38\%$ . Іншою особливістю отриманих мікрофотографій є той факт, що при вмісті КЛ 5 мол% області з посиленою флуоресценцією мають відносно чітку форму, тоді як у КЛ25 бішарах ці області представляють собою мережу нерегулярних високофлуоресцентних структур, причому ефект був більш виражений при  $L/P=5$  (рис. 3.25, Г – Є). Ці структури містять області з високим сигналом, які накладаються на області з меншою флуоресценцією. В результаті, гістограми інтенсивності флуоресценції характеризуються поступовою зміною сигналу вздовж області (рис. 3.25, Є, вкладка). Крок таких змін дискретний та приблизно дорівнює інтенсивності флуоресценції ліпідного бішару у відсутності білка. Натомість, профілі розподілу флуоресценції у КЛ5 мембранах були неперервними та флюктували навколо певного середнього значення (рис. 3.24, Є, вкладка). Ці спостереження дозволили нам запропонувати гіпотезу, згідно з якою лізоцим утворює регулярні планарні домени в КЛ5 бішарах, та більш складні структури в КЛ25 мембранах, такі як складчасті мультисари, сформовані бішаром. Аналогічні трансформації були зафіксовані при взаємодії сурфактантних білків В та С з ліпідним моношаром [282,283].

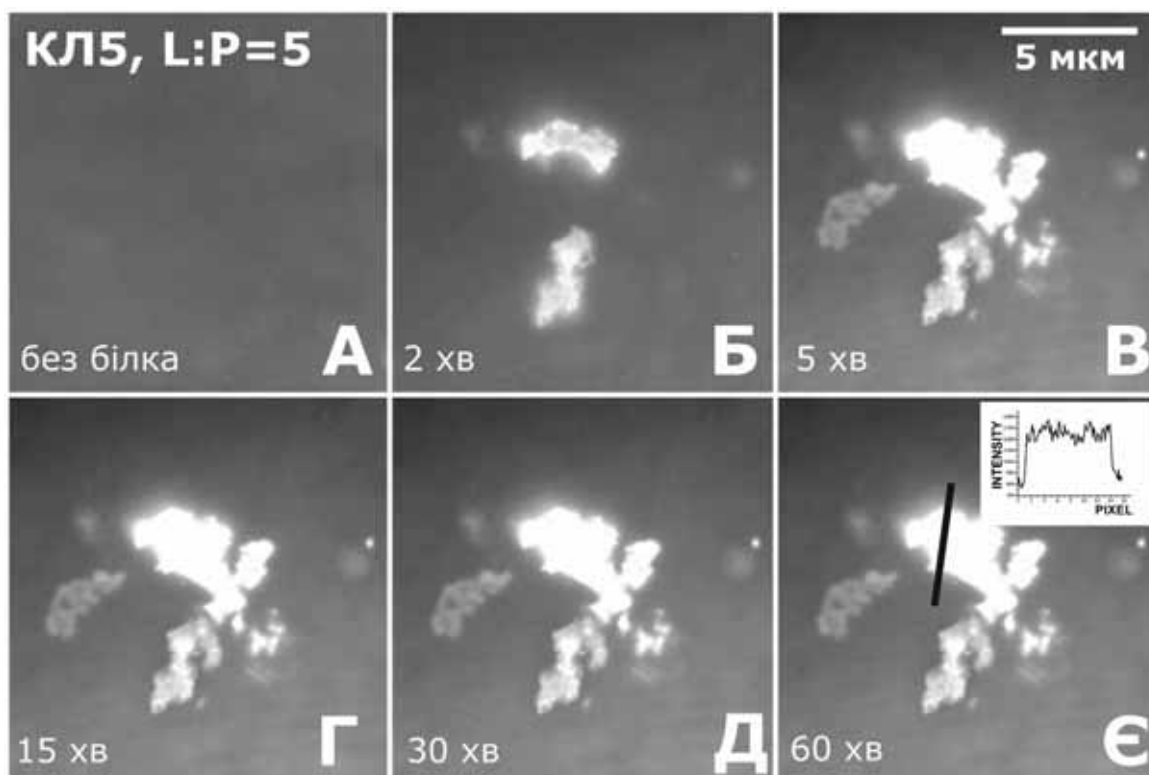


Рис. 3.24. Візуалізація планарних ліпідних доменів, утворених молекулами КЛ при сорбції лізоциму.

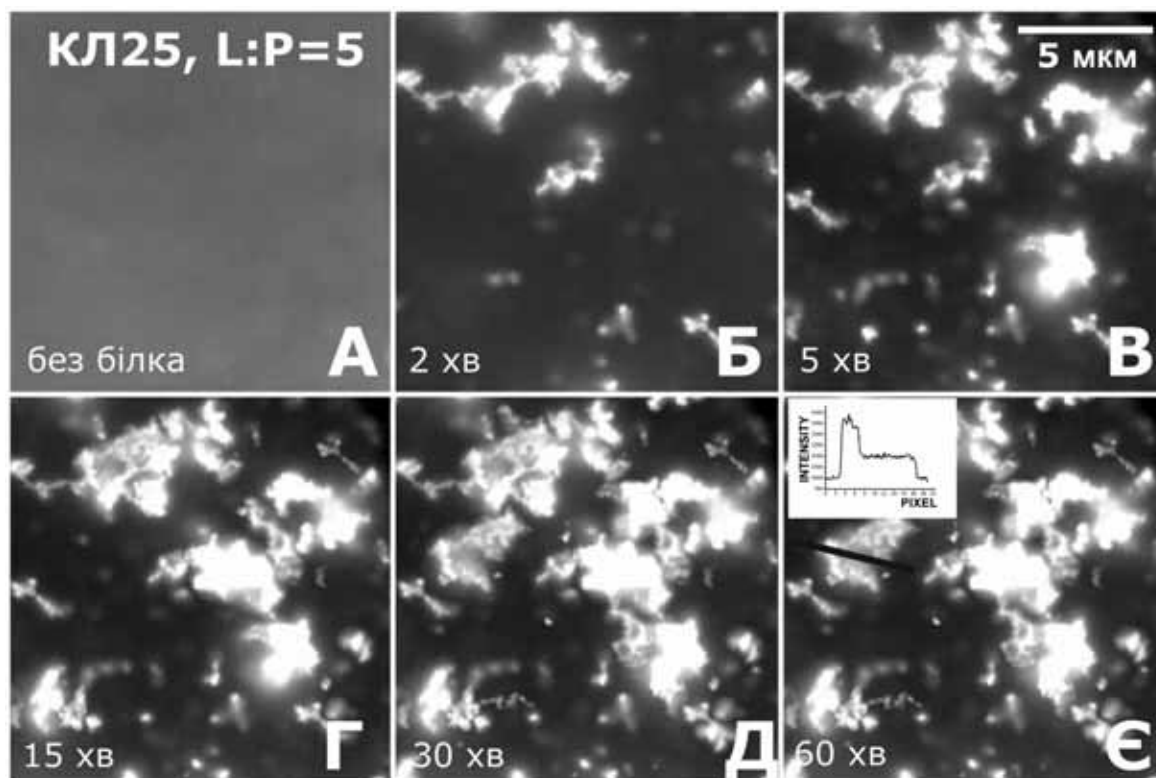


Рис. 3.25. Морфологічні зміни КЛ25 бішарів на підложці, викликані лізоцимом. Вкладка на панелі Є означає профіль інтенсивності флуоресценції вздовж чорної лінії.

Ліпідний бішар, ключовий елемент клітинних мембран, є вискоеластичним матеріалом, якій здатний деформуватись, утворюючи різні структури. Клітинні мембрани характеризуються значною гетерогенністю, зумовлену наявністю численних упорядкованих ліпідних та білок-ліпідних доменів. У більшості випадків білки є безпосередніми учасниками процесу деформації мембрани, викликаючи структурні перебудови та сегрегацію одного чи декількох ліпідних компонентів. Спектр білок-ліпідних взаємодій, які індукують цю структуризацію мембрани, включає ван-дер-ваальсові та стеричні взаємодії трансмембранних сегментів білків з гідрофобними ланцюгами ліпідів або електростатичне притягання чи водневі зв'язки між боковими амінокислотними залишками та полярними голівками ліпідів [32,274,284,285]. Зокрема, інтегральні мембранні білки викликають структурування ліпідного бішару згідно з принципом гідрофобної невідповідності – коли гідрофобний сегмент поліпептидного ланцюга, який вбудований в мембрану, не відповідає довжині ацильного ланцюга, білок індукує перерозподіл ліпідів таким чином, що ті ліпіди, які забезпечують найкращу гідрофобну відповідність, будуть кластеризуватися навколо білка [286]. У свою чергу, сегрегація ліпідів, викликана сорбцією периферичних водорозчинних білків, має переважно електростатичну природу та диктується принципом мінімізації електростатичної вільної енергії системи [32,280]. Той факт, що розмір та кількість доменів, індукованих лізоцимом, збільшуються зі зростанням вмісту КЛ вказує на роль електростатичних білок-ліпідних взаємодій як основної рушійної сили ліпідного перерозподілу. Важливими чинниками цього процесу є: а) присутність кластерів позитивно заряджених амінокислотних залишків на поверхні білка, що дозволяє білку взаємодіяти одночасно з кількома ліпідами та б) конформаційна рухливість поліпептидного ланцюга, що сприяє утворенню конформера, в якому відстань між позитивними зарядами амінокислотних залишків та аніонними полярними голівками мінімальна. У роботах [287,288] Ібрагім зі співавторами ідентифікували домен спіраль – петля – спіраль (СПС) (амінокислотні залишки Asp<sub>87</sub> – Arg<sub>114</sub>), розташований у верхній частині активного центру лізоциму та відповідальний за зв'язування білка з

мембраною. На основі цих даних було запропоновано гіпотетичну модель локалізації лізоциму відносно поверхні розділу ліпід/вода [164]. Згідно з цією моделлю, при взаємодії лізоциму з ліпідним бішаром поздовжня вісь молекули білка розташовується паралельно поверхні мембрани. У такій орієнтації частина білкової молекули, яка обернена до мембрани, містить кластер позитивно заряджених амінокислотних залишків, що включає Lys<sub>13</sub>, Arg<sub>14</sub>, Arg<sub>21</sub>, Lys<sub>96</sub>, Lys<sub>97</sub> та Arg<sub>114</sub>. Лізоцим – це полікатіонний білок з ізоелектричною точкою  $pI \sim 11$ . Базуючись на результатах комп'ютерного моделювання, Сабурова та співавтори показали, що на поверхні лізоциму є протяжні області з позитивним потенціалом [289]. Розподіл електростатичного потенціалу на поверхні білка визначається його мікрооточенням. Площа катіонних кластерів білка варіює від 1.1 до 3.4 нм<sup>2</sup>, а площа полярної голівки ліпиду складає  $\sim 0.65$  нм<sup>2</sup>. Для того, щоб мінімізувати енергетичні затрати, пов'язані із сорбцією високозарядженого білка, ліпідний бішар має структурно реорганізуватись для формування зон з підвищеною концентрацією аніонного ліпиду. Така реорганізація створює градієнт електростатичного потенціалу, який спадає при збільшенні відстані від центру зв'язування білка [274]. Електростатична природа латеральної сегрегації КЛ навколо сорбованого лізоциму задовільно пояснює спостережуване зростання розміру та числа ліпідних доменів з підвищенням концентрації білка та молярної фракції КЛ – чим більше молекул білка може зв'язатись з мембраною, тим більше позитивних зарядів має бути скомпенсоване, для чого необхідні КЛ-збагачені домени великого розміру.

Однак, як показують результати, представлені в даному підрозділі, утворення планарних доменів не є фінальною стадією процесу утворення білок-ліпідних комплексів у КЛ25 мембранах. Так, спостереження, що у цьому типі мембран і) ліпідні домени мають структуру нерегулярних мереж, де один моношар накладається на інший, та ii) профілі інтенсивності флуоресценції мають дискретний характер, дозволяє поставити, щонайменше, два запитання: 1) чи здатний лізоцим ініціювати утворення більш складних структур, таких як мультишарові стопки, та 2) які фактори контролюють морфологію ліпідних

структур, індукованих білком. Для відповіді на перше запитання, необхідно розглянути лізоцим з точки зору його антимікробної активності. Відомо, що лізоцим викликає пошкодження бактеріальної мембрани згідно з «килимовим» механізмом [290]. Припускається, що амфіпатичні  $\alpha$ -спіралі білка, які входять до складу СПС домену, сорбуючись на поверхні бішару, акумулюють навколо себе аніонні ліпіди, що призводить до локальної зміни складу та кривизни мембрани. В місці зв'язування (тобто в зоні підвищеної концентрації аніонних ліпідів) білок здійснює латеральний тиск на мембрану, результатом чого є вигин ліпідного бішару. Це, у свою чергу, ініціює стоншення мембрани, її деформацію, дефрагментацію та міцелізацію [291]. Здогадно, з деякими відмінностями, але послідовність подій у досліджуваних системах схожа. Лізоцим утворює електростатичні контакти з полярними голівками КЛ, викликаючи тим самим латеральну міграцію молекул КЛ, віддалених від білка, до зони білок-ліпідної взаємодії. Кластеризація кардіоліпіну створює градієнти кривизни та поверхневого натягу вздовж поверхні мембрани. Структурні трансформації ліпідного бішару, викликані лізоцимом в слабо заряджених КЛ5 мембранах, завершуються утворенням планарних доменів, (рис. 3.26, права панель). Однак, якщо радіус кривизни КЛ-збагачених зон значно перевищує середню кривизну бішару, то мембрана далі може мінімізувати енергію взаємодії шляхом подальших деформацій (розтяг та вигин) [292]. У той час як електростатичні білок-ліпідні взаємодії контролюють початкову сегрегацію аніонних ліпідів навколо адсорбату, подальші структурні трансформації КЛ-збагачених областей диктуються еластичними властивостями мембрани. На відміну від «килимового» механізму, такі трансформації включають утворення мультишарових стопок. Ці стопки представляють собою листи ліпідного бішару, зібрані у стопку та відділені один від одного молекулами білка (рис. 3.26, нижня панель). Варто зазначити, що в такій геометрії електростатична вільна енергія системи мінімальна, тому що більшість зарядів ліпідів знаходиться у контакті із зарядами білка. Запропонований механізм узгоджується з гіпотезою «обмежених ламелярних структур» Коутінхо та співавторів [293], яка пояснює викликану лізоцимом

зшивку ліпідних бішарів, що належать до різних везикул, утворенням численних білкових містків. Тим не менш, мультиламелярний стопковий механізм не дає задовільного пояснення, чому такого роду структури спостерігаються лише у КЛ25 мембранах. У пошуках факторів, відповідальних за трансформацію планарних доменів у мультишарові стопки, звернемось до результатів, викладених у підрозділі 3.2, де було показано, що при низькому вмісті ФГ лізоцим існує у мембранозв'язаному стані як мономер, тоді як при більш високих концентраціях ФГ (20 та 40 мол%) білок переходить в агрегований стан.

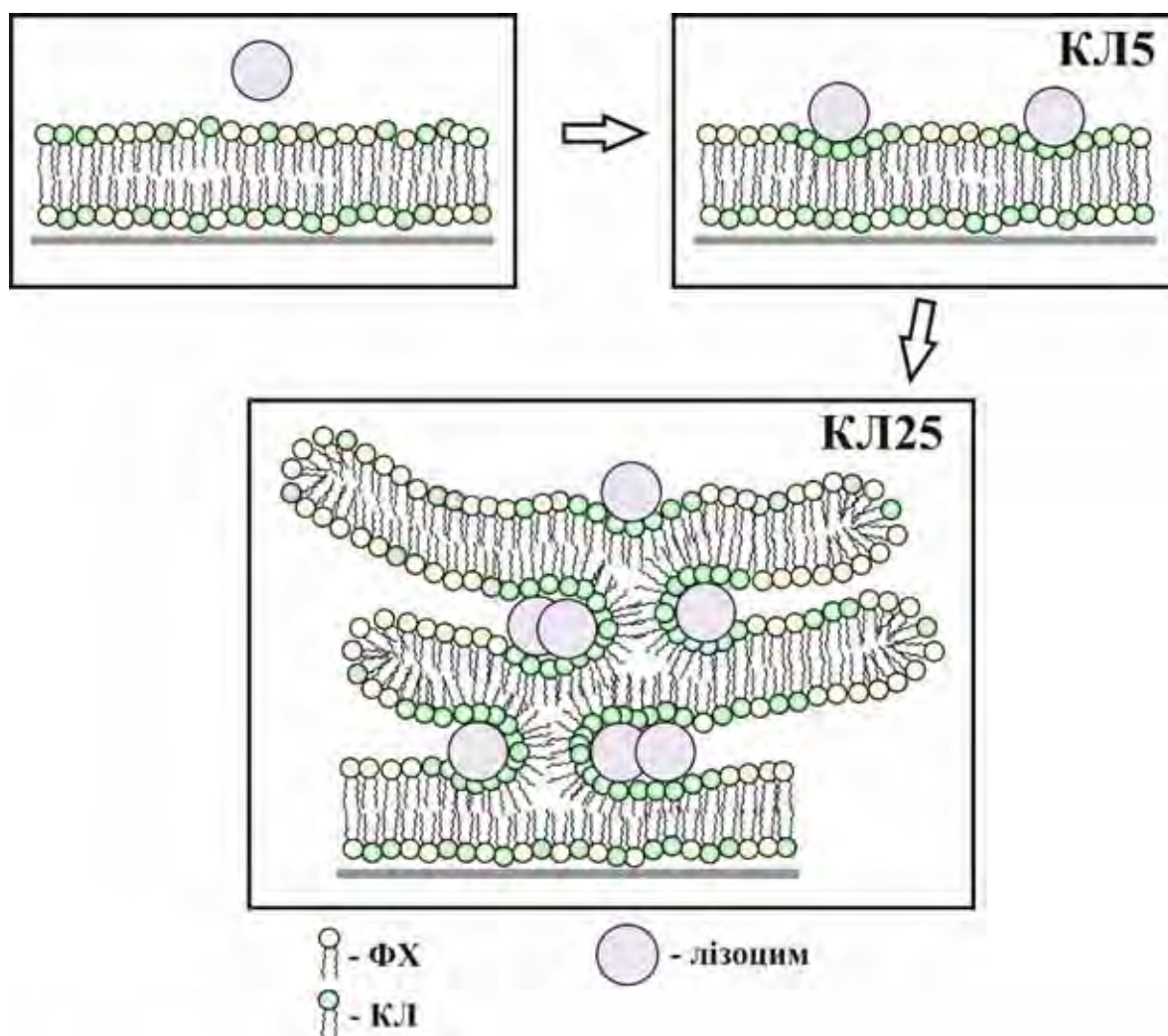


Рис. 3.26. Схематичне зображення утворення планарних доменів та мультишарових ліпідних стопок при сорбції лізоциму.

Зважаючи на унікальну структуру кардіоліпіну, до складу якого входить дві фосфатні групи та чотири ацильних ланцюга, концентрація фосфату в ФГ40 мембранах відповідає концентрації фосфату в КЛ-вміщуючих мембранах при частці КЛ 25 мол%. До того ж, поверхневий потенціал ФГ40 ліпідного бішару (-



126 мВ) незначно відрізняється від потенціалу КЛ25 мембрани (-116 мВ). Ці міркування дають підстави припустити, що з великою долею ймовірності лізоцим утворює агрегати при зв'язуванні з КЛ25 бішарами. Олігомеризація білка призведе до посилення сегрегаційного потенціалу лізоциму та утворення ліпідних областей, збагачених КЛ, з більшим радіусом кривизни у порівнянні з доменами, індукованими мономерним лізоцимом. Вочевидь, за таких умов планарні домени не здатні забезпечити мінімум вільної енергії зв'язування, тому шлях, за яким мембрана надалі зменшує цю енергію, включає трансформацію регулярних доменів у мультишарові структури. У КЛ5 мембранах, внаслідок нижчого початкового ступеня кластеризації КЛ, досягнення термодинамічної рівноваги не потребує переходу у 3D геометрію, та планарні домени, збагачені КЛ чи ФХ, забезпечують найбільш стабільний структурний стан мембрани.

На закінчення, необхідно відзначити, що біологічна значимість таких мультиламелярних структур має, щонайменше, два аспекти. Перший аспект пов'язаний з мембрано-опосередкованим утворенням амілоїдних агрегатів лізоциму. Враховуючи те, що відстань між моношарами в стопках дорівнює приблизно діаметру білка, можна припустити, що утворені резервуари слугують карманами, в яких відбувається олігомеризація лізоциму в критичне ядро амілоїдних фібрил. По-друге, такі білок-ліпідні системи можуть слугувати платформою для створення новітнього класу нанопереносників ліків, в яких фармакологічний препарат локалізується у водному кармані, а лізоцим обумовлює його цілеспрямовану доставку.

### **3.4. Короткі висновки до Розділу 3**

1. Проведена оцінка застосовності нового флуоресцентного зонду АБМ, амінопохідної бензантрону, для ідентифікації та структурного аналізу амілоїдних фібрил. Визначені термодинамічні параметри зв'язування флуорофору з фібрилярними агрегатами лізоциму. Показано, що досліджуваний зонд має ряд переваг перед класичним амілоїд-специфічним маркером Тіофлавіном Т, а саме: і) більш значне зростання флуоресценції

- при асоціації з фібрилами; ii) вища спорідненість до фібрилярних структур; iii) слабше зв'язування з нативним білком; iv) більший Стоксів зсув.
2. Запропоновано новий підхід, що дозволяє оцінити структурні параметри амілоїдних фібрил, такі як молекулярний об'єм мономерної субодиниці та фрактальна розмірність агрегатів, на основі вимірювань ефективності індуктивно-резонансного переносу енергії між амілоїд-специфічними флуорофорами. З використанням двох донорно-акцепторних пар, АБМ – SQ-1 та SQ-1 – V2, охарактеризовані структурні особливості фібрилярного лізоциму у розчині.
  3. Розроблено нову методологію визначення ступеня олігомеризації білків на мембранній матриці, що базується на комплексній інтерпретації даних стаціонарного і часороздільного міжмолекулярного переносу енергії. При аналізі профілів ІРПЕ, отриманих для донорно-акцепторних пар триптофан-пірен, пірен-флуоресцеїн, флуоресцеїн-родамін, флуоресцеїн- DyL та флуоресцеїн- SeTau за допомогою цієї методології отримано кількісну інформацію щодо процесу агрегації лізоциму у присутності модельних мембран, що склалися з ФХ та його сумішей з ФГ у різних молярних співвідношеннях. Виявлено, що при асоціації лізоциму з нейтральними чи слабозарядженими (5 чи 10 мол% ФГ) бішарами білок зберігає мономерну форму, тоді як зростання вмісту аніонного ліпиду до 20 чи 40 мол% призводить до формування агрегатів білка. Вперше розраховані параметри олігомеризації лізоциму – ступінь агрегації та відстань між мономерами в агрегаті. Запропоновано структурну модель тетра- та гексамерів лізоциму, що є домінантними білковими олігомерами при вмісті аніонного ліпиду 20 та 40 мол%.
  4. Методом флуоресцентної мікроскопії повного внутрішнього відбиття досліджено взаємодію лізоциму з ліпідними бішарами на підкладці, які склалися з ФХ та його сумішей з 5 чи 25 мол% КЛ та були доповані слідовими кількостями флуоресцентно-мічених ліпідів BODIPY-ФХ чи BODIPY-КЛ. Виявлено формування КЛ-збагачених доменів при сорбції

білка, структурні характеристики яких залежали від вмісту аніонного ліпиду, молярного співвідношення білок:ліпід та часу утворення білок-ліпідних комплексів. Продemonстровано здатність ліпідних доменів до трансформації у мультишарові стопки, стабілізовані молекулами білка, при підвищенні поверхневого заряду мембрани. Запропоновано модель синергізму процесів структурної трансформації ліпідного бішару та агрегації лізоциму.

## РОЗДІЛ 4

### ВПЛИВ ФІБРИЛЯРНИХ ІНТЕРМЕДІАТІВ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІПІДНОГО БІШАРУ

Незважаючи на встановлення причинного зв'язку між формуванням амілоїдних фібрил та розвитком патологій, молекулярні деталі пошкодження клітин патогенними білковими агрегатами залишаються предметом гострих дебатов. На теперішній час загальноприйнятою є гіпотеза про те, що в основі цитотоксичності агрегованих білків лежить дестабілізація плазматичних мембран, що спричиняє порушення клітинних функцій і загибель клітини. При цьому ключова роль у процесі пошкодження структури мембрани відводиться як зрілим фібрилам, так і раннім інтермедіатам фібрилізованих білків, тобто структурно-модифікованим мономерам та/чи олігомерам, які представляють собою сайти нуклеації для росту фібрил. Була запропонована ціла низка гіпотез для пояснення структурних та біохімічних засад токсичності амілоїдів [294]. Зокрема, згідно з так званою «канальною» гіпотезою, в основі цитотоксичності лежать взаємодії між частково розгорнутими білками, збагаченими експонованими гідрофобними ділянками, та клітинними мембранами. Ці взаємодії призводять до порушення структури мембран внаслідок утворення неспецифічних іонних каналів [294]. Інші гіпотези, що пояснюють порушення клітинних функцій пре-фібрилярними інтермедіатами модифікацією внутрішньоклітинного редокс-статусу та зміною рівня вільного кальцію [295,296], також розглядають дестабілізацію мембран як суттєвий детермінант цитотоксичності амілоїдів. З огляду на вищесказане, надзвичайної актуальності набуває дослідження молекулярних аспектів білок-ліпідних взаємодій у контексті цитотоксичної дії конформаційно-модифікованих (внаслідок зв'язування з мембраною) та агрегованих білків. У багатьох роботах отримала підтримку ідея про те, що ліпідний бішар може знижувати активаційний бар'єр для розгортання білка [4]. Часткове розгортання у мембранному оточенні спостерігалось для цитохрому *c*, фосфоліпази  $A_2$ , бактеріальних токсинів,

ацетилхолінестерази, феромон-зв'язуючого білка, рекомбінантного пріонного білка людини, тощо [297-302]. Згідно з сучасними уявленнями, роль ліпідів як структуро-формуєчого середовища не обмежується електростатичними явищами (зниженням рН на поверхні розділу чи нейтралізацією поверхневого заряду білка аніонними голівками фосфоліпідів), а визначається також структурними та фізико-хімічними характеристиками мембрани, такими, зокрема, як товщина гідрофобної зони, ступінь рухливості вуглеводневих ланцюгів, латеральний тиск, тощо. Характерно, що зміни конформаційного та агрегаційного стану білків у ліпідному оточенні тісно пов'язані з модифікацією структури ліпідного бішару.

У цьому та наступному розділах наведені результати досліджень, спрямованих на з'ясування закономірностей впливу фібрилярних інтермедіатів та зрілих фібрил ряду водорочинних білків та пептидів, зокрема, лізоциму, цитохрому *c* та різних варіантів N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну A-I, на структурно-динамічні та фізико-хімічні властивості модельних мембран. Для досягнення цієї мети були застосовані методи флуоресцентних зондів, індуктивно-резонансного переносу енергії, гасіння власної флуоресценції білка та моношарів Ленгмюра. Склад модельних ліпідних систем варіювали шляхом додавання до ФХ негативно заряджених фосфоліпідів КЛ, ФГ або ФС у різних молярних відношеннях або стеролу Хол (30 мол%).

#### **4.1. Мембранні ефекти префібрилярних інтермедіатів лізоциму**

##### *4.1.1. Дослідження модифікації ліпідного бішару за допомогою пірену та ДФГТ*

Вивчення впливу олігомерного лізоциму на структурний стан гідрофобної зони модельних мембран здійснювали за допомогою класичних мембранних зондів пірену та ДФГТ, що зазвичай використовуються для аналізу динамічних властивостей ліпідного бішару [232]. Пірен – це поліциклічна ароматична сполука, яка переважно розподіляється в області 4-13 вуглецевих атомів ліпідів, розташовуючись таким чином, що головна вісь молекули направлена вздовж нормалі бішару [303]. На рис. 4.1 представлені типові спектри флуоресценції пірену у досліджуваних білок-ліпідних системах. Як видно з рисунку, ці спектри

характеризуються наявністю п'яти вібронних смуг випромінювання мономерів пірену, які нумеруються від I до V, починаючи з найменшої довжини хвилі. Вібронні смуги відображають  $\pi$ - $\pi^*$  переходи в молекулі пірену. Зокрема, перша вібронна смуга (пік на 372 нм) відповідає 0-0 переходу, у той час як третя смуга (пік на 383 нм) описує 0-2 перехід [304]. Внаслідок тісного взаємозв'язку між електронним та вібронним станами молекули флуорофору, третій пік мономерів виявляється надзвичайно чутливим до змін полярності мікрооточення зонду, що проявляється у більших значеннях інтенсивності випромінювання в гідрофобних розчинниках порівняно із першою вібронною смугою, інтенсивність якої домінує у полярному середовищі. Відношення інтенсивності випромінювання першого піку до інтенсивності флуоресценції третього піку ( $I_I/I_{III}$ ) відоме як індикатор полярності мікрооточення зонду (так званий «ефект Хама», [305]).

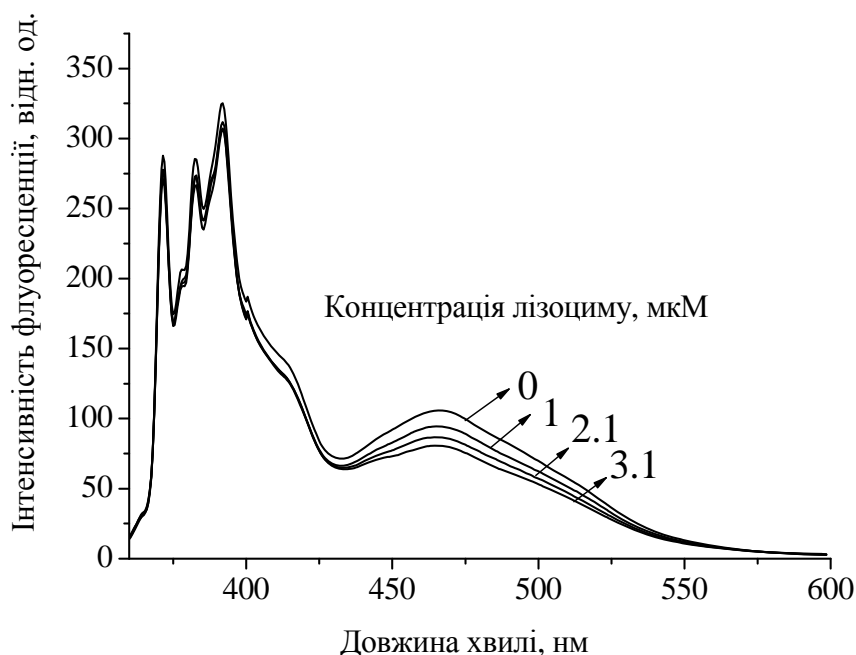


Рис. 4.1. Вплив олігомерного лізоциму на спектри флуоресценції пірену у ФХ ліпосомах. Концентрація ліпиду складала 24 (А) мкМ, зонду 0.6 мкМ.

Як видно з Таблиці 4.1, значення  $I_I/I_{III}$  практично не змінювалось при додаванні лізоциму до ліпідних везикул різного складу, що свідчить про

відсутність впливу мономерного та олігомерного білка на гідратацію гідрофобної частини ліпідного бішару.

Окрім піків мономерів пірену, в спектрі флуоресценції зонду можна виділити полосу випромінювання ексимерів. Зіткнення збудженої та незбудженої молекул пірену призводить до утворення збудженого димеру, або ексимеру, який має смугу власної флуоресценції в діапазоні 470-480 нм. Необхідною передумовою формування ексимерів є безпосередня близькість збудженого та незбудженого мономерів пірену та їхня стерична відповідність [306].

Таблиця 4.1

Вплив лізоциму\* на вібронну структуру пірену в залежності від ступеня агрегації білка

Система	Без білка	Мономери	Олігомери
ФХ	0.95±0.05	0.98±0.05	0.98±0.04
КЛ10	0.96±0.05	1.003±0.05	1.005±0.06
КЛ20	0.96±0.05	1.006±0.05	0.98±0.05
ФГ10	0.97±0.05	0.97±0.04	0.96±0.05
ФГ20	0.98±0.05	0.96±0.05	0.96±0.04
Хол30	0.94±0.05	0.93±0.04	0.94±0.04

\*концентрація білка складала 1 μМ

Відношення інтенсивностей флуоресценції ексимерів та мономерів (Е/М) відображає ступінь ексимеризації пірену. Як можна бачити із рис. 4.2, як мономери, так і олігомери лізоциму спричиняли зменшення ступеня ексимеризації пірену, однак для олігомерів цей ефект був значно більш вираженим. Ексимеризація пірену – це дифузійно-контрольований процес, який зазвичай інтерпретують у рамках моделі вільного об'єму мембрани [303]. Вільний об'єм мембрани характеризує різницю між ефективним та ван-дер-Ваальсовим об'ємами ліпідних молекул. Стеричні обмеження та теплові флуктуації викликають *транс-гош* ізомеризацію ацильних ланцюгів та появу динамічних дефектів у внутрішніх областях мембрани. Локальний вільний об'єм є наслідком латерального зміщення вуглеводневого ланцюга, що призводить до формування

кінку. Ця здатність залежить від складу ліпідного бішару, латерального розподілу ліпідів, ступеня ненасиченості ліпідів, рівня гідратації, температури, тощо [304].

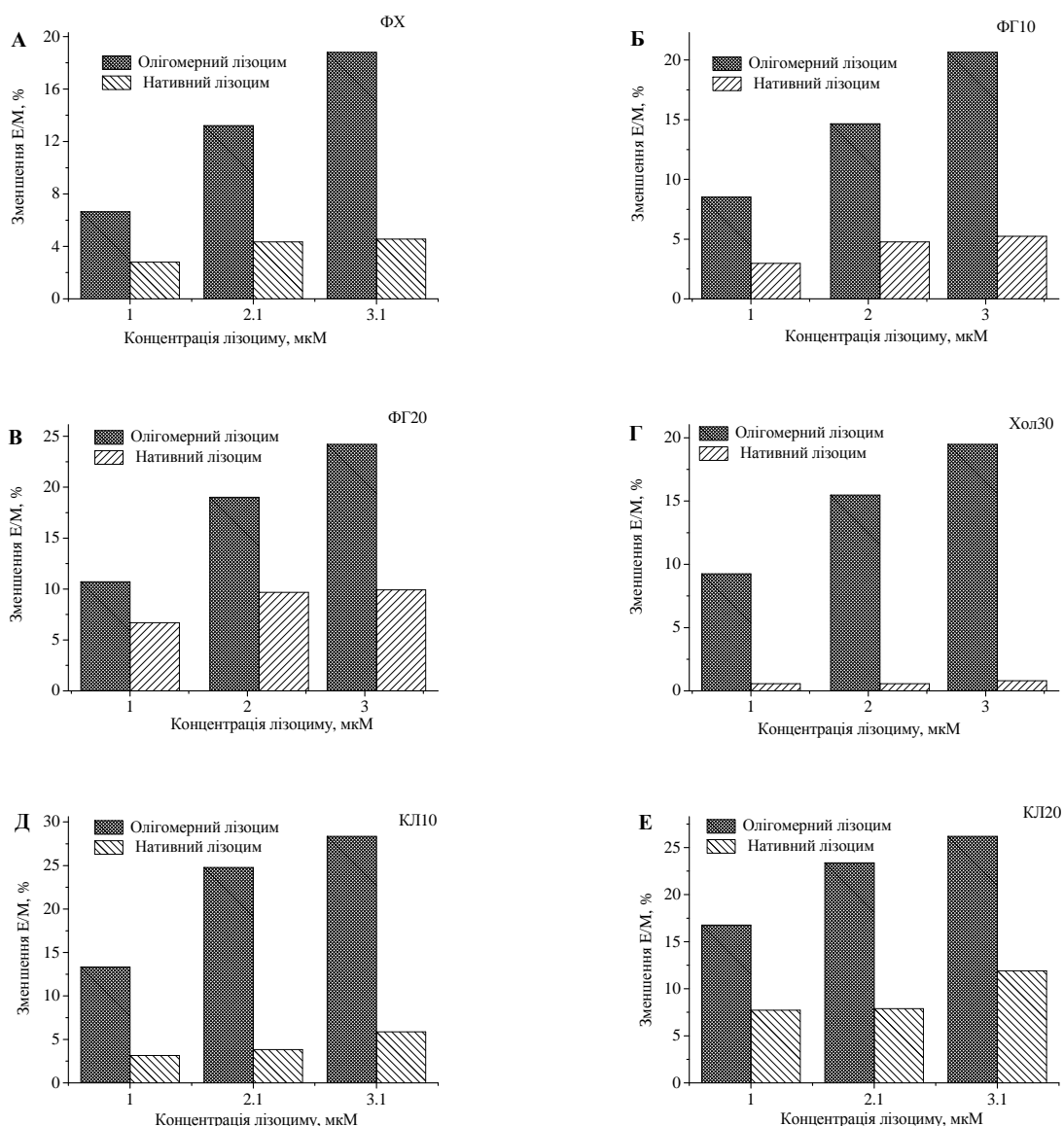


Рис. 4.2. Вплив олігомерного та мономерного лізоциму на ступінь ексимеризації пірену у модельних мембранах різного складу на дев'ятий день фібрилізації білка.

Модель вільного об'єму розглядає дифузію мембранних складових чи інших молекул, що знаходяться у ліпідному бішарі, як трьохстадійний процес: i) формування динамічних дефектів (кінків) в ацильних ланцюгах, що супроводжується утворенням пустот у ліпідному моношарі; ii) переміщення дифундуючої молекули в пустоти, що викликає утворення щілин; iii) заповнення щілин внаслідок рухів дефектів вздовж суміжних вуглеводневих ланцюгів.



Експериментально і теоретично обґрунтовано, що величина вільного об'єму відображає ступінь конформаційного впорядкування ацильних ланцюгів [307-309]. Наприклад, Джин та Хопфінгер [308], а також Маррінк зі співавторами [307] показали, що у зоні вуглеводневих хвостів параметр впорядкування ліпідів відносно високий до 8-го атома вуглецю, наслідком чого є малий розмір та незначна кількість порожнин. У свою чергу, середина бішару біля кінців аліфатичних ланцюгів характеризується низькою щільністю. Ліпідні хвости зазнають сильних флуктуацій, які супроводжуються зростанням вільного об'єму. Аналогічний висновок був зроблений у роботі [310], де спостерігалась безпосередня кореляція між кількістю гош станів торсійних кутів та величиною вільного об'єму. Було показано, що поява цих станів порушує транс-упорядкування ліпідних ланцюгів та таким чином збільшує вільний об'єм.

Виходячи з цих міркувань, можна припустити, що олігомери лізоциму спричиняють конденсуючий та ущільнюючий ефект на ліпідний бішар шляхом заповнення областей вільного об'єму у мембрані. Це зменшує частоту зіткнень мономерів пірену та, відповідно, ступінь ексімеризації зонду. Аналіз даних, представлених на рис. 4.2, дозволяє зробити висновок, що склад модельних мембран суттєво не впливає на величину пертурбацій ліпідного бішару, викликаних олігомерним лізоцимом. Так, наприклад, при максимальній концентрації білка (3.1 мкМ) зменшення ступеня ексімеризації пірену досягало 20% у ФХ, ФГ10 та Хол30 везикулах, та було дещо більш вираженим у ФГ10 (25%) та КЛ-вміщуючих мембранах (27%). Це свідчить про те, що електростатичні взаємодії не відіграють визначальної ролі у зв'язуванні олігомерів лізоциму з ліпідами. Якщо утворення білок-ліпідних комплексів відбувається за рахунок електростатичних контактів, можна очікувати зростання ступеня зв'язування білка при підвищенні молярної частки негативно заряджених ліпідів, та, відповідно, посилення модифікуючого ефекту олігомерів лізоциму на ліпідний бішар. Відсутність залежності спектральних змін пірену від вмісту аніонних ліпідів вказує на те, що гідрофобні взаємодії превалюють при асоціації білкових олігомерів з ліпідами. Вочевидь, олігомеризація лізоциму призводить до

експонування гідрофобних зон поліпептидного ланцюга розчиннику, що сприяє взаємодії білка з ацильними ланцюгами. Ці міркування знаходяться у згоді з результатами, представленими у інших роботах. Зокрема, аналіз флуоресцентних відгуків біс-АНС та ДФГТ показав, що величина зменшення текучості модельних мембран, викликаного агрегованим А $\beta$  амілоїдним пептидом, корелює зі ступенем поверхневої гідрофобності агрегатів [311]. Більш того, А $\beta$  олігомери спричиняли зростання ступеня впорядкованості ацильних ланцюгів у ліпідних бішарах, що склалися з аніонних, катіонних чи цвіттеріонних фосфоліпідів [312]. При цьому властивості регіону полярних голівок залишались практично незмінними, вказуючи на те, що електростатичні взаємодії не є визначальними для модифікації структури мембран. При вивченні виходу флуоресцентного зонду кальцеїну із ліпідних везикул під впливом олігомерів синуклеїну, було показано, що зміни складу бішару, що призводять до збільшення площі ліпідних голівок, роблять ліпосоми більш сприйнятливими до дестабілізуючої дії білка. Це свідчить про те, що взаємодія олігомерів з мембраною модулюється ступенем доступності гідрофобної частини ліпідного бішару.

Дані, отримані методом ексімеризації пірену, були доповнені результатами дослідження анізотропії ДФГТ, іншого неполярного флуоресцентного зонду, що розташовується в гідрофобній зоні ліпідного бішару. Згідно з теорією Поттела та ін. [313], залежність параметру порядку ацильних ланцюгів ліпідів ( $S$ ) від анізотропії ДФГТ ( $r_s$ ) описується наступним рівнянням:

$$S = \frac{\left[1 - 2(r_s/r_0) + 5(r_s/r_0)^2\right]^{1/2} - 1 + r_s/r_0}{2(r_s/r_0)}, \quad (4.1)$$

де  $r_0$  – це фундаментальна анізотропія<sup>2</sup> ДФГТ, яка дорівнює 0.36 [232].

Асоціація олігомерного лізоциму з модельними мембранами супроводжувалась зростанням анізотропії ДФГТ та, відповідно, параметру впорядкування вуглеводневих ланцюгів у всіх модельних мембранах окрім ФХ та Хол30 (табл.

<sup>2</sup> Під фундаментальною анізотропією розуміють анізотропію зонду за умов відсутності обертальної дифузії

4.2). Отримані результати підтверджують викладену вище гіпотезу щодо зменшення вільного об'єму ліпідного бішару під дією префібрилярних інтермедіатів лізоциму. Варто зазначити, що виявлені розбіжності між даними по ексимеризації пірену та анізотропії ДФГТ для ФХ та Хол30 щодо впливу лізоциму на вільний об'єм мембрани можуть бути пояснені різним молярним співвідношенням ліпід:білок, яке складало ~8 в експериментах з піреном та ~250 в експериментах з ДФГТ.

Таблиця 4.2

Вплив лізоциму на параметр впорядкованості ацильних ланцюгів ліпідів

<b>Система</b>	<b>Без білка</b>	<b>Мономери</b>	<b>Олігомери</b>
ФХ	0.51	0.50	0.50
КЛ10	0.50	0.57	0.65
КЛ20	0.38	0.48	0.62
ФГ10	0.50	0.57	0.65
ФГ20	0.39	0.48	0.62
Хол30	0.50	0.50	0.49

Аналогічні контрольні вимірювання, проведені з мономерним лізоцимом, показали, що олігомерний білок проявляє значно більш виражену мембранотропну активність. Окрім цього, зміни спектральних параметрів ДФГТ та пірену залежали від тривалості росту (а, відповідно, і розміру) агрегатів лізоциму. Наприклад, у КЛ10 мембранах при найвищій концентрації білка, що була застосована у даному дослідженні (3.1 мкМ), зменшення Е/М було 48 % на другий день росту олігомерів, та тільки 28 % на дев'ятий день (Рис. 4.3). Аналогічна тенденція спостерігалась і для КЛ20 ліпосом. Як можна судити з кінетики флуоресценції Тіофлавіну Т (рис. 5.2), лаг-фаза нуклеації фібрил складала приблизно 10-11 днів. Іншими словами, протягом 10-11 днів мономери лізоциму асоціюють у олігомерні ядра, та тільки після цього відбувається їх подальша трансформація у фібрилярні структури.

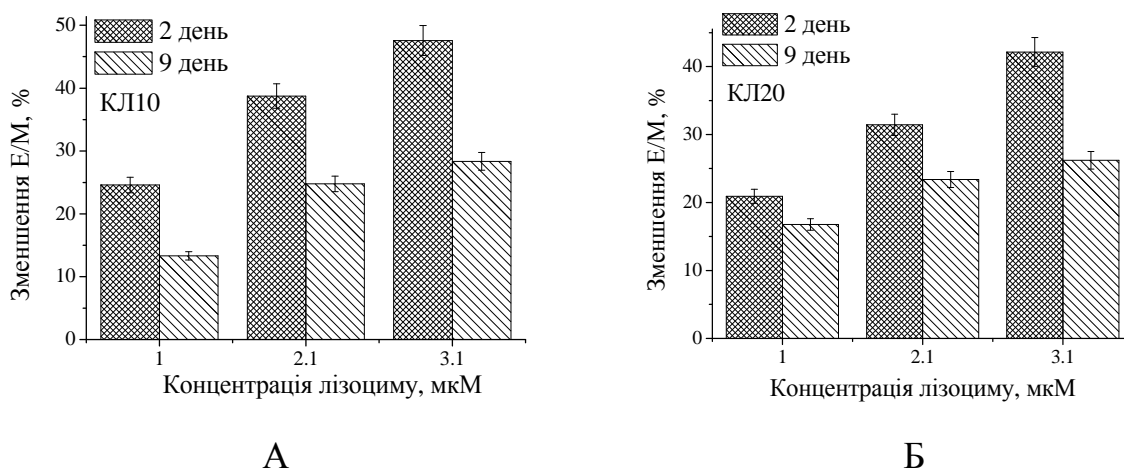


Рис. 4.3. Зміни ступеня ексимеризації пірену під впливом олігомерів лізоциму у KL10 (А) та KL20 (Б) модельних мембранах.

Це означає, що на другий день фібрилізації у розчині присутні, головним чином, ранні олігомерні інтермедіати, тоді як на дев'ятий день домінують високовпорядковані олігомери, що близькі до трансформації у фібрили. Таким чином, отримані результати вказують на те, що олігомерні інтермедіати лізоциму виявляють найбільшу деструктивну здатність по відношенню до ліпідного бішару.

#### 4.1.2. Дослідження впливу олігомерного лізоциму на полярну область ліпідного бішару за допомогою Продану та ДМХ

З метою виявлення мембранних ефектів лізоциму в полярній області ліпідного бішару були використані два флуоресцентні зонди, Продан та ДМХ, що розташовуються на границі розділу ліпід/вода та характеризуються надзвичайно високою чутливістю до полярності ліпідного бішару [244]. Експерименти були проведені на десятий день олігомеризації лізоциму.

Мембранний зонд Продан чутливий до цілої низки мембранних процесів, включаючи, зокрема, фазовий перехід гель-рідкий кристал [231], та структурні модифікації ліпідного бішару під впливом холестерину [315], анестетиків [316], спиртів [317], тощо. Внутрішньомолекулярний перенос енергії між алкіл-аміногрупою та карбонілом, пов'язаний з реорієнтацією молекул розчинника навколо диполу зонду у збудженому стані, разом зі специфічними водневими

взаємодіями, призводять до значного зсуву максимуму випромінювання Продану ( $\lambda_{em}$ ) при зростанні полярності розчинника [318]. При дослідженні спектральної поведінки Продану у мембранних системах слід звертати увагу на ряд суттєвих аспектів. По-перше, внаслідок розчинності Продану у воді, зонд може розподілятися між водною та ліпідною фазами [319]. Таким чином, точний аналіз спектрів випромінювання Продану у мембранних системах потребує віднімання внеску флуоресценції вільного зонду у буфері із його загальної флуоресценції. По-друге, електронні переходи Продану залежать від кислотності середовища, тобто, концентрації протонів у безпосередньому оточенні флуорофору [318]. По-третє, у високоанізотропних системах, таких як модельні та природні мембрани, збуджені молекули зонду можуть знаходитись у різному локальному оточенні. Як наслідок, навіть в однокомпонентному ліпідному бішарі спектри випромінювання Продану характеризуються бімодальним розподілом [231]. Позиція максимуму випромінювання Продану корелює з розташуванням зонду у ліпідному бішарі. Численні результати свідчать на користь того, що спектр флуоресценції Продану в модельних та біологічних мембранах складається з двох смуг, що відповідають молекулам зонду, що локалізуються а) у середовищі з низькою полярністю, тобто на границі гідрофобної та гідрофільної ділянок ліпідного бішару біля гліцеринового остову та початкових сегментів ацильних ланцюгів ( $\lambda_{max}^1 \sim 430 - 440$  нм), та б) у середовищі з високою полярністю біля фосфатної ( $\lambda_{max}^2 \sim 480 - 490$  нм) чи холінової ( $\lambda_{max}^2 \sim 500 - 510$  нм) груп. Нарешті, Продан може проявляти специфічність до певних типів ліпідів, як було продемонстровано, зокрема, для холестерину [315]. Беручи до уваги вищевикладене, експериментальна стратегія дослідження лізоцим-ліпідних систем включала декілька послідовних етапів, зокрема: 1) кількісну характеристику розподілу зонду між водною та ліпідною фазами; 2) оцінку внеску флуоресценції Продану в буфері та реконструкцію спектру випромінювання зонду в ліпідному оточенні із загального спектру флуоресценції; 3) деконволюцію спектру флуоресценції мембранозв'язаного

Продану; 4) аналіз спектральних відгуків Продану методом трихвильової узагальненої поляризації.

Як показано на рис. 4.4, розподіл Продану у ліпідну фазу супроводжувався зростанням інтенсивності флуоресценції, короткохвильовим зсувом максимуму випромінювання та уширенням спектру випромінювання.

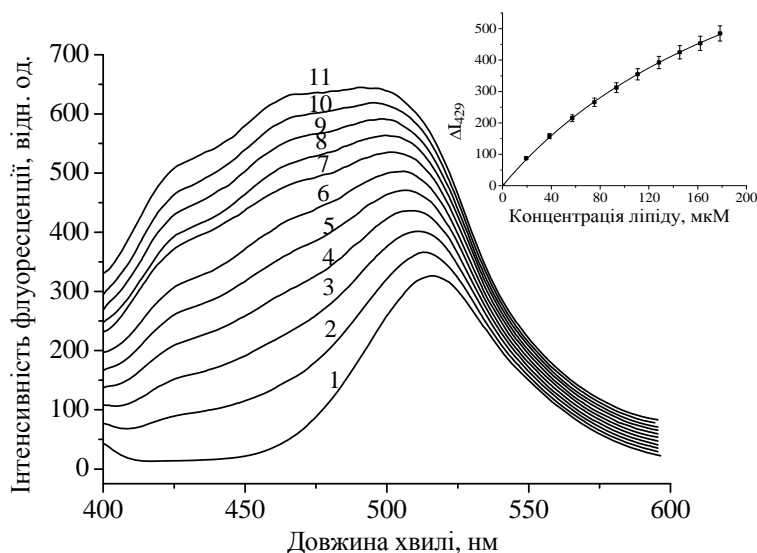


Рис. 4.4. Спектри флуоресценції Продану у ФХ ліпосомах. Концентрація ліпиду, мкМ: 1 – 0, 2 – 19, 3 – 38, 4 – 57, 5 – 75, 6 – 93, 7 – 111, 8 – 128, 9 – 145, 10 – 162, 11 – 178. Концентрація Продану 0.09 мкМ. На вкладці зображена ізотерма зв'язування Продану з ліпідним бішаром.

Результати флуориметричного титрування зонду ліпосомами були інтерпретовані у рамках моделі розподілу, описаної у підрозділі 2.7.7. Для визначення коефіцієнтів розподілу для різних ліпідних систем експериментальні залежності  $\Delta I(C_L)$  (рис. 4.4, вкладка) були проаналізовані за допомогою рівняння (2.9). Отримані значення  $K_p$  (табл. 4.3) свідчать про те, що спорідненість Продану до ліпосомальних мембран підвищується при включенні ФГ чи Хол у ФХ бішар. Ці результати співпадають з даними Бондаря та Рове, які показали, що розподіл Продану у ліпідну фазу значно зростає у присутності Хол [315]. Визначення коефіцієнтів розподілу дозволило оцінити кількість зонду, що залишається у

водній фазі, та розділити внески зв'язаних з мембраною та вільних молекул зонду у сумарний спектр флуоресценції (рис. 4.5).

Таблиця 4.3

Коефіцієнти розподілу Продану між водною та ліпідною фазами

Система	Коефіцієнт розподілу
ФХ	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^3$
ФГ10	$(4.5 \pm 0.6) \times 10^3$
ФГ20	$(5.3 \pm 0.8) \times 10^3$
Хол30	$(5.5 \pm 0.6) \times 10^3$

Далі, як показано на рис. 4.6, спектри флуоресценції Продану у ліпідному оточенні були розкладені на дві компоненти з позиціями максимумів  $\lambda_{\max}^1 \sim 435 - 441$  нм та  $\lambda_{\max}^2 \sim 488 - 508$  нм. Позиції спектральних смуг Продану у досліджуваних системах залишались практично незмінними при додаванні мономерного лізоциму, тоді як олігомерний білок призводив до червоного зсуву  $\lambda_{\max}^1$  ( $\sim 8$  нм) та  $\lambda_{\max}^2$  ( $\sim 3-5$  нм) у ФХ/ФГ бішарах (табл. 4.4).

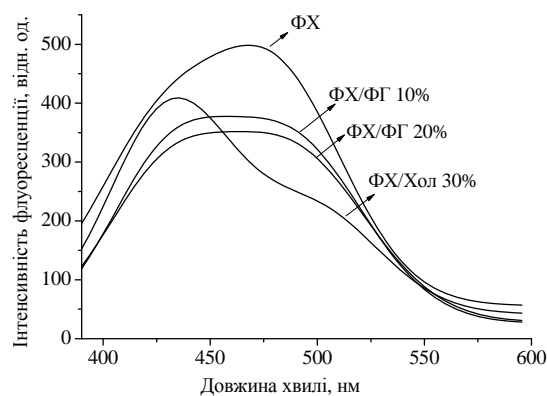
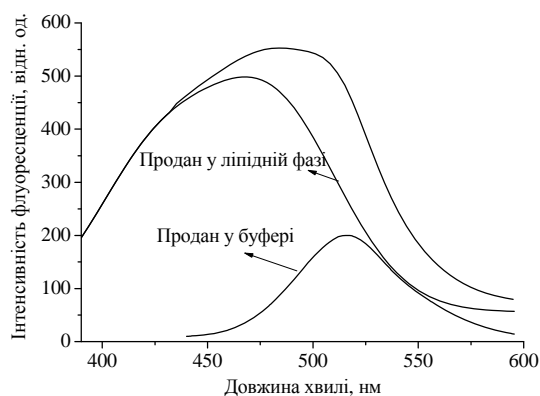


Рис. 4.5. Ілюстрація внеску Продану в буфері у загальний спектр флуоресценції у ФХ ліпосомах (А). Спектри флуоресценції Продану після віднімання флуоресценції Продану у буфері для різних видів ліпосом (Б). Концентрація Продану 0.17 мкМ. Концентрація ліпиду 174 мкМ.

Окрім цього, як видно з рис. 4.7, відносна сумарна інтенсивність короткохвильового піку ( $R_1$ ) зростала у присутності олігомерів лізоциму, причому величина цього ефекту була більш виражена (збільшення  $R_1$  на  $\sim 20\%$ ) для ФГ10 та ФГ20 ліпосом.

Таблиця 4.4

Деконволюція спектрів флуоресценції Продану на дві компоненти у присутності та відсутності лізоциму

Система	Без білка		Олігомери		Мономери	
	$\lambda_{\max}^1$	$\lambda_{\max}^2$	$\lambda_{\max}^1$	$\lambda_{\max}^2$	$\lambda_{\max}^1$	$\lambda_{\max}^2$
ФХ	$436 \pm 2$	$489 \pm 1$	$438 \pm 3$	$489 \pm 1$	$435 \pm 2$	$488 \pm 1$
ФГ10	$441 \pm 1$	$501 \pm 1$	$449 \pm 1$	$504 \pm 1$	$441 \pm 1$	$499 \pm 1$
ФГ20	$439 \pm 1$	$498 \pm 1$	$447 \pm 1$	$503 \pm 1$	$441 \pm 1$	$499 \pm 1$
Хол30	$436 \pm 1$	$506 \pm 1$	$438 \pm 1$	$508 \pm 1$	$436 \pm 1$	$506 \pm 1$

У свою чергу, мономерний лізоцим не впливав на цей параметр, за виключенням зростання  $R_1$  на  $\sim 8\%$  у ФГ20 ліпосомах. Обидві тенденції у поведінці  $R_1$  відображаються у варіюванні трихвильової узагальненої поляризації ( $3wGP$ ), іншого параметру, який був визначений зі спектрів флуоресценції Продану.

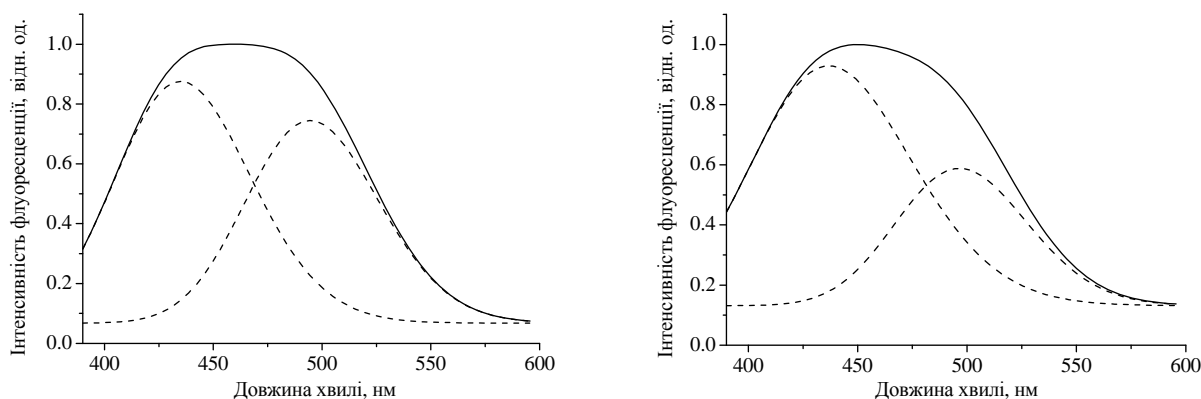


Рис. 4.6. Деконволюція спектрів випромінювання Продану у ФХ/ФГ 20% ліпосомах на дві компоненти у відсутності (А) та присутності (Б) олігомерів лізоциму. Концентрація білка 3.1 мкМ. Концентрація ліпиду 174 мкМ.



Цей параметр був введений Красновською та ін. замість чутливої до полярності величини  $2wGP$  для того, щоб враховувати неповний розподіл Продану у ліпідну фазу та усунути внесок вільного зонду у загальний сигнал флуоресценції [231]. У залежності від співвідношення інтенсивностей блакитної та червоної компонент спектру,  $3wGP$  може бути негативною (за умов домінування червоної компоненти) та позитивною (за умов домінування блакитної компоненти) величиною.

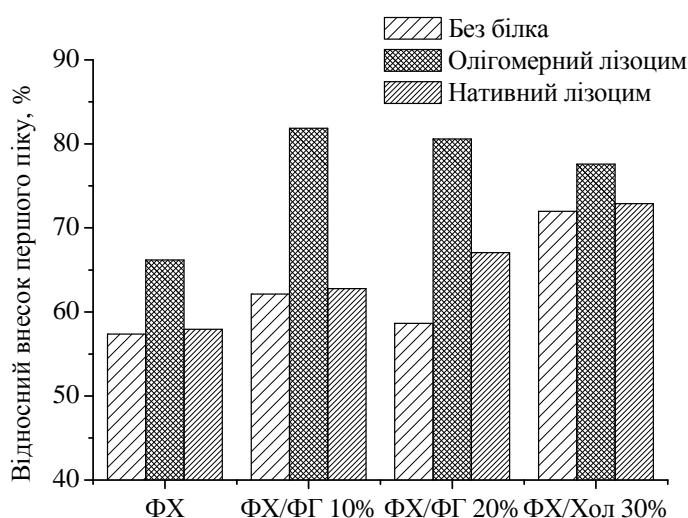


Рис. 4.7. Відносний внесок короткохвильової компоненти Продану у ліпідних та лізоцим-ліпідних системах. Концентрація білка складала 3.1 мкМ, концентрація ліпиду – 174 мкМ.

Як можна бачити з рис. 4.8, у ФХ, ФГ10 та ФГ20 ліпосомах  $3wGP$  має негативні значення, вказуючи на те, що в цих видах мембран молекули зонду розташовуються переважно в більш полярному оточенні. Натомість, для Хол30 ліпосом спостерігається протилежна ситуація – більшість молекул Продану локалізуються в сайтах з меншою полярністю, що проявляється у позитивному значенні  $3wGP$ . При додаванні олігомерного лізоциму цей параметр значно зростав у ФХ, ФГ10 та ФГ20 везикулах та несуттєво зменшувався у Хол30. У свою чергу, мономерний лізоцим показав значно меншу мембранотропну активність. Так, зміни  $3wGP$ , викликані мономерним білком, перевищували експериментальну похибку тільки у ФГ10 (зменшення  $3wGP$ ) та ФГ20 (збільшення  $3wGP$ ) модельних мембранах.

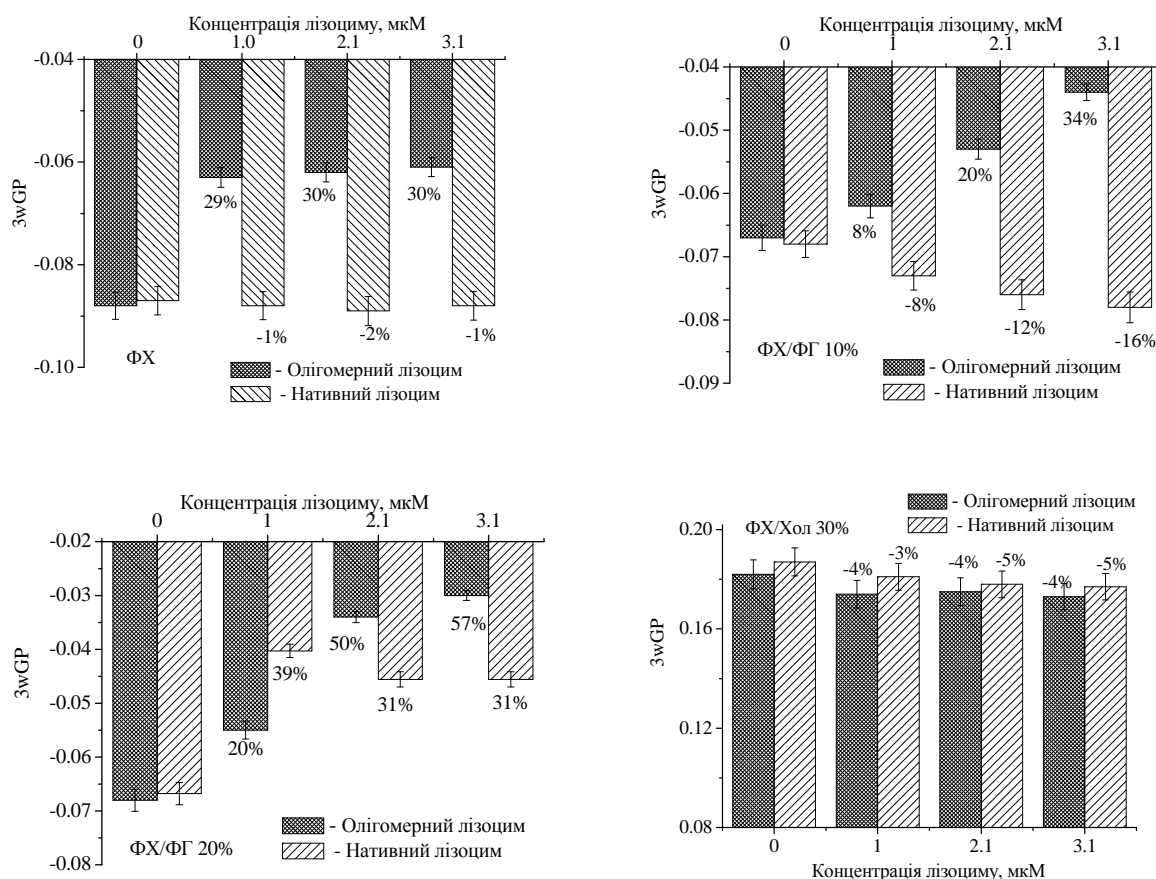


Рис. 4.8. Значення трихвильової узагальненої поляризації Продану, розраховані зі спектрів флуоресценції зонду, в залежності від концентрації лізоциму у ФХ (А), ФГ10 (Б), ФГ20 (В) та Хол30 (Г). Цифрами вказані процентні зміни  $3wGP$  відносно контролю (ліпідних везикул, що не містили білок).

В табл. 4.5 представлена узагальнена інформація щодо впливу олігомерного білка на спектральні параметри Продану. Ці зміни можна інтерпретувати у термінах полярності оточення, молекулярної упаковки ліпідів та перерозподілу зонду між центрами зв'язування на мембрані, що відрізняються за хімічною природою фосфоліпідних груп, ступенем гідратації та динамікою розчинника в оточенні флуорофору. Інтегральна інтенсивність флуоресценції ( $I \sim C_1 Q_1 + C_2 Q_2$ ) пропорційна концентраціям ( $C_1, C_2$ ) та квантовим виходам ( $Q_1, Q_2$ ) двох основних популяцій зонду, що розташовані, згодом, на рівні фосфатних груп ( $\lambda_{\max}^2 \sim 489 - 508$  нм) та гліцеринового остову ( $\lambda_{\max}^1 \sim 435 - 441$  нм). Зростання першої

спектральної компоненти (збільшення  $R_1$ ), що виявлено для ФХ, ФГ10 та ФГ20 систем, може походити із збільшення  $Q_1$  та/чи  $C_1$ .

Таблиця 4.5

Вплив олігомерного лізоциму на спектральні параметри Продану

Система	$\lambda_{\max}^1$	$\lambda_{\max}^2$	$R_1$	$3wGP$	Інтегральна інтенсивність
ФХ	NC*	NC	Зростання (9%)**	Зростання (30%)	NC
ФГ10	Червоний зсув	NC	Зростання (20%)	Зростання (34%)	NC
ФГ20	Червоний зсув	Червоний зсув	Зростання (22%)	Зростання (57%)	NC
Хол30	NC	NC	NC	NC	NC

\*NC – не було статистично значущих змін

\*\*Процентні зміни представлені для концентрація білка 3.1 мкМ

Ріст  $Q_1$  може бути пояснений зменшенням концентрації молекул води на рівні гліцеринового остову, тоді як зростання  $C_1$  означає, що вбудовування олігомерів білка у внутрішню область мембрани викликає витискання частини флуорофорів з регіону фосфатних груп та акомодацию переміщених молекул Продану на менш полярних сайтах зв'язування, що охоплюють гліцериновий остов та верхні вуглецеві атоми ацильних ланцюгів. Інша можливість зумовлена наявністю кореляції між розташуванням зонду у ліпідному бішарі та молекулярним пакуванням ліпідів. Було продемонстровано, що молекули Продану мають тенденцію займати більш полярні місця зв'язування на мембрані при зростанні поперечної площі ліпідних голівок [319]. Враховуючи ці дані, найбільш виражене збільшення  $R_1$ , спостережуване для ФГ10 та ФГ20 систем, важко пояснити переміщенням молекул зонду з регіону фосфатних груп до регіону гліцеринового скелета (зростання  $C_1$ ), тому що середня відстань між голівками ліпідів вища у

ліпосомах, які містять ФГ, внаслідок посиленого відштовхування однойменних зарядів.

Аналогічна стратегія була використана при аналізі спектральних властивостей ДМХ у білок-ліпідних системах. На рис. 4.9 показані типові спектри флуоресценції ДМХ у мембранному оточенні у відсутності та присутності олігомерного лізоциму.

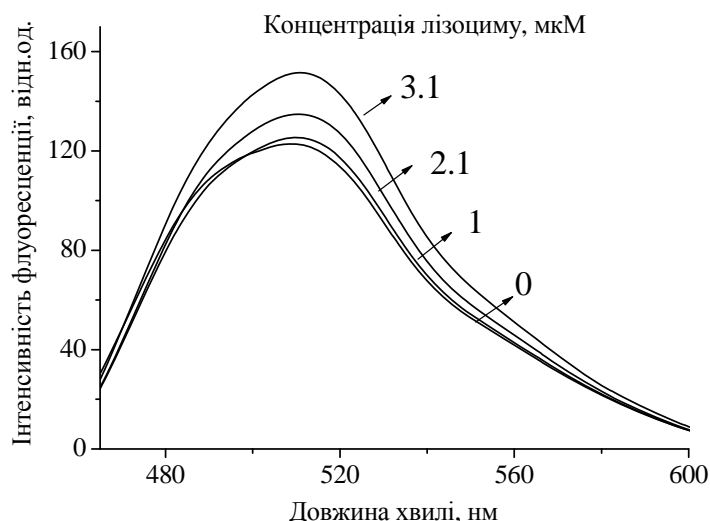


Рис. 4.9. Вплив олігомерного лізоциму на спектри флуоресценції ДМХ у ФХ ліпосомах. Концентрація ліпиду була 69 мкМ, концентрація зонду 0.17 мкМ.

Деконволюція спектрів флуоресценції ДМХ виявила дві популяції мембранозв'язаного зонду, що локалізуються у ліпідному бішарі в центрах зв'язування з меншою ( $\lambda_{\max}^1 \sim 496 - 509$  нм) та більшою полярністю ( $\lambda_{\max}^2 \sim 531 - 563$  нм) (ілюстративний приклад деконволюції наведено на рис. 4.10). Як видно з табл. 4.6, у КЛ10 та КЛ20 бішарах сорбція олігомерного білка призводила до блакитного зсуву  $\lambda_{\max}^2$ , тоді як  $\lambda_{\max}^1$  залишалась практично незмінною. Натомість, у ФХ, ФГ10 та ФГ20 модельних мембранах зв'язування олігомерів лізоциму викликало червоний зсув  $\lambda_{\max}^1$ , а статистично значимий червоний зсув  $\lambda_{\max}^2$  спостерігався тільки для ФХ бішару.

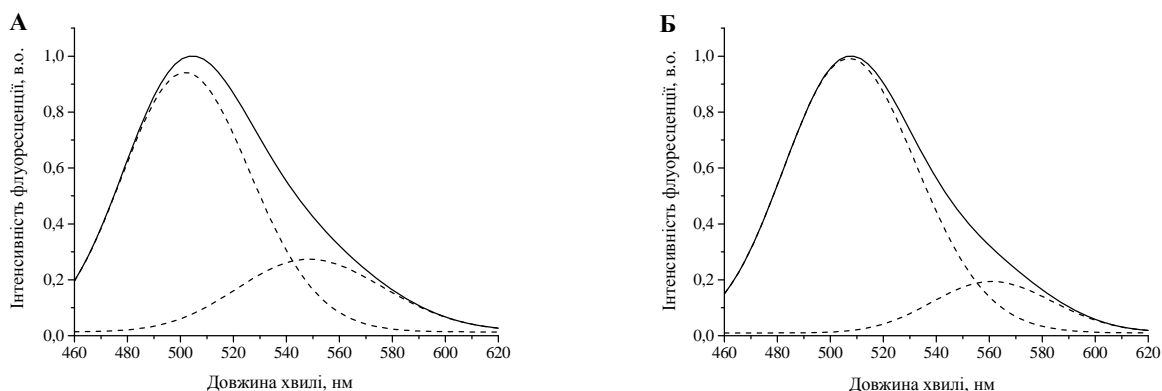


Рис. 4.10. Деконволюція спектрів флуоресценції ДМХ у ФГ20 везикулах у відсутності (А) та присутності (Б) олігомерів лізоциму. Концентрація білка 3.1 мкМ, концентрація ліпиду 69 мкМ.

Окрім цього, формування комплексів ліпідів із агрегованим лізоцимом спричиняло зростання повної інтенсивності флуоресценції до 25% у ФХ, ФГ10 та ФГ20 ліпідних мембранах та близько 100% у КЛ-вміщуючих бішарах (рис. 4.11, А, В).

Таблиця 4.6

Деконволюція спектрів флуоресценції ДМХ у різних системах

Система	Без білка		Олігомерний лізоцим		Нативний лізоцим	
	$\lambda_{\max}^1$	$\lambda_{\max}^2$	$\lambda_{\max}^1$	$\lambda_{\max}^2$	$\lambda_{\max}^1$	$\lambda_{\max}^2$
ФХ	503±2	550±5	509±1	563±2	502±2	552±4
ФГ10	497±2	537±7	504±2	549±5	498±2	536±6
ФГ20	496±2	535±8	504±1	547±6	494±2	534±6
Хол30	497±1	531±12	500±2	536±11	498±1	530±8
КЛ10	501±2	542±6	500±1	526±4	504±4	500±2
КЛ20	498±1	530±5	498±1	525±5	500±2	499±1

Ці зміни супроводжувались зростанням відносної інтегральної інтенсивності менш полярної спектральної компоненти ( $R_1$ ) у ФХ та ФГ10 ліпосомах та більш полярної компоненти ( $R_2$ ) у КЛ10 та КЛ20 мембранах (рис. 4.11, Б, Г).

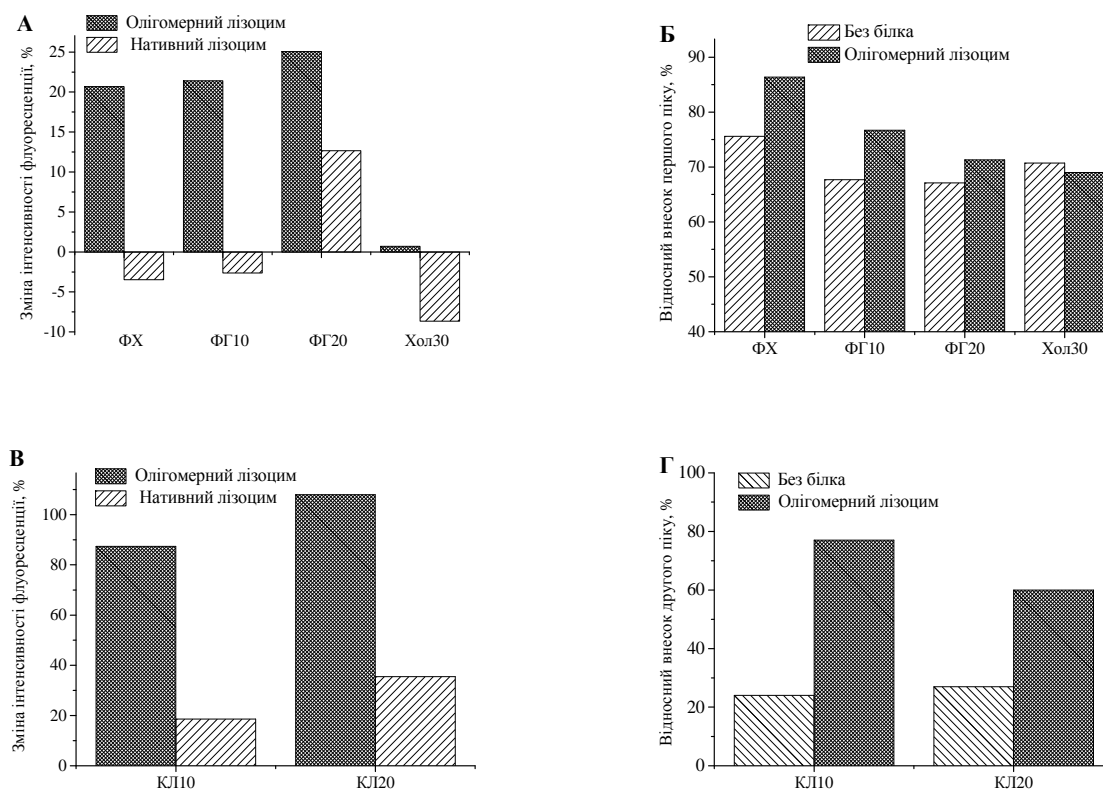


Рис. 4.11. Зміни інтенсивності флуоресценції (А, В) та відносного внеску короткохвильової (Б) або довгохвильової (Г) спектральних компонент ДМХ під впливом олігомерного лізоциму у модельних ліпідних системах різного складу.

Аргументи, використані для пояснення змін спектральних параметрів Продану, можуть бути застосовані також при інтерпретації спектральних ефектів ДМХ. Порівняння максимуму випромінювання ДМХ у модельних мембранах із аналогічним параметром в органічних розчинниках різної полярності показало, що цей зонд локалізується у полярному регіоні ліпідного бішару [320]. Показано, що полярне оточення стабілізує оптимальну для флуоресценції планарну конформацію ДМХ [321]. Аналогічно до Продану, ДМХ розподіляється між двома місцями зв'язування на бішарі, що знаходяться, згодом, на рівні фосфатних груп та гліцеринового остову. Зважаючи на те, що флуоресценція ДМХ сильно гаситься молекулами води, цей зонд має високу чутливість до ступеня гідратації мембрани [322]. Враховуючи вищесказане, спостережуване зростання відносних внесків спектральних компонент ДМХ до сумарного спектру, разом із ростом інтегральної інтенсивності флуоресценції (табл. 4.6, рис.

4.11, А, В) підтверджують попередню ідею про дегідратацію ліпідного бішару під впливом олігомерного лізоциму. Примітно, що додавання мономерного білка до ліпідних систем викликало значно менші зміни у  $\lambda_{\max}^1$ ,  $\lambda_{\max}^2$ ,  $R_1$  або  $R_2$  (табл. 4.6, рис. 4.11), що вказує на нижчу мембранотропну активність нативного білка у порівнянні з агрегованим білком.

У цьому контексті особливу увагу слід звернути на дві тенденції, які спостерігались як для Продану, так і для ДМХ: а) зміни положення максимумів короткохвильової та довгохвильової компонент, та б) відсутність впливу холестерину на характер та величину спектральних відгуків обох зондів у присутності лізоциму. У той час, як блакитний зсув  $\lambda_{\max}^2$  (табл. 4.6), що спостерігається у ФХ/КЛ везикулах є одним з класичних проявів зменшення полярності оточення згідно з рівнянням Ліпперта [232], червоний зсув обох спектральних компонент у ФХ, ФГ10 та ФГ20 мембранах (табл. 4.5 та 4.6) може бути пояснений кількома факторами, зокрема: і) вищим ступенем дипольної релаксації флуорофорів; ii) утворенням водневих зв'язків між протон-донорними групами білка та карбонільною групою Продану чи ДМХ; iii) змінами конформації полярних голівок ФГ при проникненні олігомерів лізоциму у внутрішню область мембрани, що сприяють формуванню водневих зв'язків між карбонільними групами зондів та ОН групами молекул ФГ.

Друга тенденція полягає у тому, що ані Продан, ані ДМХ не виявили ніяких змін у полярному регіоні Хол30 ліпосом у присутності олігомерного лізоциму (табл. 4.5 та 4.6). Відомо, що холестерин може істотно модифікувати властивості ліпідного бішару. У рідкокристалічному стані цей стерол може викликати і) зменшення щільності пакування полярних голівок ліпідів [323]; ii) зростання рухливості фосфорилхолінової групи [323]; iii) підвищення рівня гідратації полярних голівок [324]; iv) зменшення кількості *gauche* конформацій ацильних ланцюгів [325]; v) зростання параметру порядку вуглеводневих ланцюгів (конденсуючий ефект) [326]. Гідрофобна група холестерину занурюється у неполярну зону мембрани, тоді як ОН-група знаходиться у полярній області, де

утворює водневий зв'язок із карбонільною групою гліцеринового остову [327]. Завдяки присутності карбонільної групи у структурі Продану та ДМХ, ці зонди здатні утворювати водневі зв'язки із гідроксильною групою холестерину. Цей вид специфічних взаємодій може відображатись у нечутливості Продану та ДМХ до мембранних модифікацій. Однак, при застосуванні іншого зонду, ДСП-12, що розташований на гідрофобно-гідрофільній границі розділу та позбавлений здатності формувати водневі зв'язки, також не було виявлено ніяких індукованих лізоцимом змін ФХ/Хол бішарів. Це дозволило зробити висновок, що додавання холестерину запобігає впливу олігомерного білка на полярну область мембрани. Ці результати узгоджуються з даними інших досліджень. Зокрема, було продемонстровано, що холестерин захищає кортикальні нейрони від нейротоксичності розчинних олігомерних А $\beta$  форм шляхом модуляції фізичних властивостей ліпідного бішару. При вивченні модельних мембран було показано, що зростання вмісту холестерину перешкоджає агрегації та злиттю ліпосом, викликаних А $\beta$ (1-40) пептидом [328].

#### **4.2. Вплив префібрилярних інтермедіатів N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I на структурно-динамічні властивості ліпідного бішару**

Подальші експериментальні зусилля були зосереджені на з'ясуванні молекулярних деталей взаємодії різних мутантів N-термінального фрагменту (залишки 1-83) аполіпопротеїну А-I (апоА-I 83) з модельними мембранами. АпоА-I, головний компонент ліпопротеїдів високої щільності, відіграє ключову роль у метаболізмі ліпідів, спрямованій доставці холестерину до стероїдогенних клітин та у зворотньому транспорті холестерину. Було також показано, що конформація апоА-I регулює зростання числа частинок ліпопротеїдів високої щільності у плазмі крові через дію на активність лецитинхолестеринацилтрансферази [329]. Окрім цього, доставка холестерину для синтезу стероїдних гормонів та жовчних кислот також контролюється апоА-I [330]. Тому виявлення механізмів утворення комплексів апоА-I з ліпідними мембранами представляє інтерес не тільки у світлі



амілоїдогенних властивостей білка<sup>3</sup>, а й для більш глибокого розуміння принципів реалізації його фізіологічних функцій.

Аполіпопротеїн А-I має у своєму складі 243 амінокислотні залишки. На рівні вторинної структури залишки 44-243 представлені тандемом з 8 амфіпатичних  $\alpha$ -спіралей, кожна з яких містить 22 амінокислоти [331]. Сегрестом та співавторами було введено класифікацію амфіпатичних  $\alpha$ -спіралей білкових молекул в залежності від розподілу заряджених амінокислотних залишків навколо осі спіралі [332]. Так, спіралі класу А мають найвищу ліпідзв'язуючу активність та характеризуються розташуванням позитивно заряджених амінокислотних залишків біля границі розділу гідрофобної та гідрофільної ділянок спіралі, а негативно заряджені амінокислоти кластеризуються у центрі полярної області. Спіралі класу G\* відзначаються випадковим радіальним розподілом основних та кислотних залишків, у той час коли для спіралей класу Y характерна присутність трьох кластерів позитивних амінокислотних залишків у полярній області.  $\alpha$ -спіралі апоА-I укладаються у кільцеву гомо-тетрамерну структуру, в якій окремі мономери контактують один з одним за допомогою гідрофобних взаємодій між амфіпатичними спіралями.

На основі даних рентгеноструктурного аналізу та кругового дихроїзму було показано, що N- та C-термінальні домени апоА-I відрізняються за своїми конформаційними властивостями та спорідненістю до ліпідів [333]. Так, N-кінцевий фрагмент апоА-I (залишки 1-139) має високий процент спіральності та відповідає за стабільність усієї молекули білка в розчині. Натомість, C-кінцевий фрагмент характеризується меншою стабільністю та спіральністю.

Сукупність результатів досліджень різних наукових лабораторій свідчить на користь того, що асоціація апоА-I з ліпідами модулюється реорганізацією N-термінального фрагменту білка. Тому наступні експерименти були спрямовані на дослідження взаємодії фрагменту апоА-I, який включав амінокислотні залишки 1-83, з модельними ліпідними мембранами. Для більш детальної характеристики

---

<sup>3</sup> Див. підрозділ 5.2.

процесу утворення білок-ліпідних комплексів пептиди апоА-I (83) були представлені наступними варіантами, отриманими за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу:

- нативний N-термінальний фрагмент апоА-I (залишки 1-83) – апоА-I 83;
- апоА-I 83, в якому гліцин у положенні 26 заміщений на аргінін (так звана мутація Айова [334]) – G26R;
- апоА-I 83, в якому триптофан в позиціях 50 та 72 заміщений на фенілаланін – апоА-I/W@8<sup>4</sup>;
- апоА-I 83, в якому триптофан в позиціях 8 та 72 заміщений на фенілаланін – апоА-I/W@50;
- G26R, який містить лише один залишок триптофану в позиціях 8, 50 або 72 – G26R/W@8, G26R/W@50 та G26R/W@72, відповідно, а інші два залишки Trp заміщені на Phe.

Варто відмітити, що заміщення Trp на Phe не впливає на загальну стабільність та функціональну активність нативного апоА-I. Зокрема, це підтверджується спостереженням, що всі мутанти здатні утворювати частинки ліпопротеїдів високої щільності однакового розміру та структури [335]. Окрім цього, результати вимірювання електрофоретичної рухливості показали, що мутація не змінює значення заряду усіх варіантів апоА-I, що є додатковим аргументом на користь відсутності суттєвого впливу мутації на конформацію пептидів [336].

Дослідження взаємодії апоА-I з ліпідами включали два основних етапи: 1) визначення параметрів зв'язування та мембранної локалізації різних форм апоА-I 83, та 2) аналіз мембранотропної активності білка.

#### *4.2.1. Визначення параметрів зв'язування та локалізації мутантів апоА-I 83 у ліпідному бішарі*

Для оцінки кількісних характеристик процесу зв'язування апоА-I з мембранами та вивчення структурної організації білок-ліпідних комплексів було

<sup>4</sup> Тут і надалі скорочення W@8, W@50 та W@72 означають, що мутант містить лише один триптофановий залишок, де цифра після символу @ вказує на його положення.

застосовано методи індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) з триптофанових залишків апоА-I 83 на мембранозв'язаний флуоресцентний зонд ДМХ та гасіння власної флуоресценції білка. Нативний N-термінальний фрагмент апоА-I 83 містить три триптофанових залишки у положеннях 8, 50 та 72. Суперпозиція внесків флуорофорів білка призводить до відносно широкого спектру випромінювання з максимумом ~335 нм. Примітно, що положення максимуму флуоресценції апоА-I 83 співпадає з піками емісії одотриптофанових мутантів. Це свідчить про те, що усі три залишки Trp характеризуються приблизно однаковою локалізацією у молекулі білка. Бурштейн та ін. класифікували триптофанові залишки за положенням максимуму випромінювання [337]. До класу I належать триптофани, які мають максимум випромінювання 330-332 нм. Ці залишки розташовуються у гідрофобному ядрі білкової молекули. Клас II включає Trp з максимумом емісії 340-342 нм, що відповідає поверхневій локалізації, але з обмеженою доступністю для розчинника. Нарешті, клас III характеризується максимумом випромінювання 350-352 нм та розташуванням на поверхні білкової глобули, де доступність для розчинника максимальна. Згідно з цією класифікацією, триптофанові залишки апоА-I 83 мають властивості, проміжні між класами I та II, тобто локалізуються переважно у гідрофобному оточенні, мінімально доступному для розчинника. Детальний аналіз амінокислотної послідовності апоА-I, проведений Нолте та Аткінсом [338], свідчить про те, що Trp72 входить до складу  $\alpha$ -спіральної ділянки, а Trp8 та Trp50 знаходяться в неупорядкованому сегменті поліпептидного ланцюга. На противагу цьому, Робертс та співавтори зробили висновок, що усі триптофанові залишки апоА-I знаходяться у фрагментах з  $\alpha$ -спіральною конформацією [339]. Авторами було зроблено припущення, що ці фрагменти орієнтовані таким чином, що їх неполярні поверхні взаємодіють одна з одною, утворюючи гідрофобне ядро. Ця структурна модель узгоджується з результатами роботи Сайто та співавторів, згідно з якими усі три Trp належать до  $\alpha$ -спіральних сегментів, що охоплюють залишки Trp8-Phe33, Leu44-Gly65 та Pro66-Arg83 [340]. При цьому,  $\alpha$ -спіраль Trp8-Phe33 відноситься до класу G\*, а дві інші спіралі – до класу A. Аналіз  $\alpha$ -

спіралей N-термінального фрагменту апоА-I показав, що Trp8, Trp50 та Trp72 знаходяться біля границі розділу гідروفобних та гідрофільних сегментів амфіпатичних спіралей (рис. 4.13).

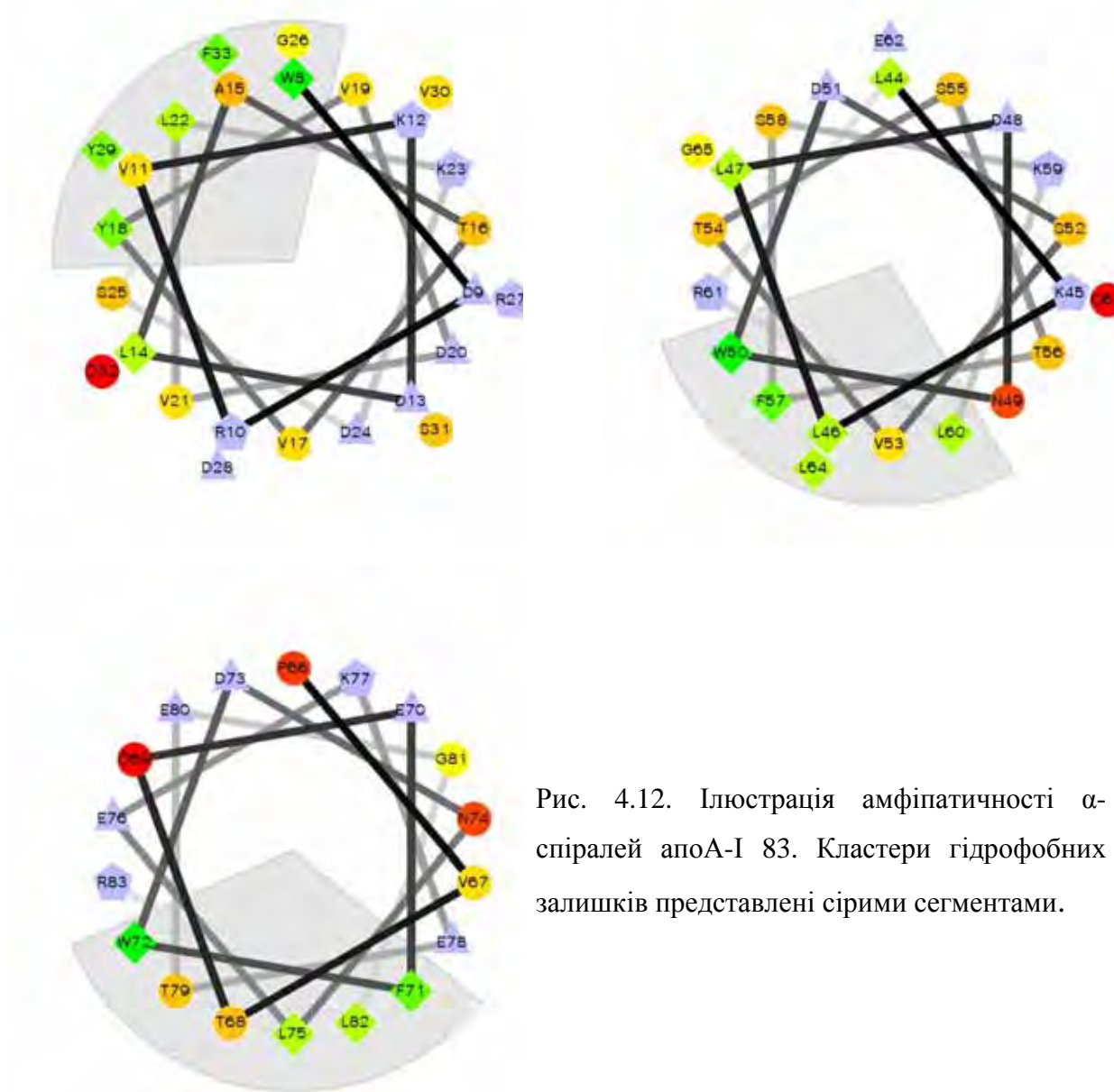


Рис. 4.12. Ілюстрація амфіпатичності  $\alpha$ -спіралей апоА-I 83. Кластери гідروفобних залишків представлені сірими сегментами.

Зв'язування з ліпідними везикулами не викликало значних змін ні в положенні максимуму спектрів флуоресценції, ні в інтенсивності флуоресценції усіх варіантів апоА-I 83. Тому для отримання інформації щодо молекулярних деталей білок-ліпідного зв'язування були проведені експерименти по переносу енергії та гасінню власної флуоресценції білка зовнішнім полярним гасником – іонами  $\text{Cs}^+$ .

На рис. 4.13 представлені типові спектри флуоресценції триптофанових залишків у присутності ДМХ. Ці спектри характеризуються зменшенням інтенсивності флуоресценції триптофану при підвищенні концентрації ДМХ, а також зростанням інтенсивності випромінювання акцептору, що свідчить про наявність переносу енергії. Одна з основних проблем при дослідженні ІРПЕ з триптофанових залишків на мембранозв'язаний флуорофор полягає у можливості спотворення вимірюваного сигналу флуоресценції внаслідок внеску розсіяння збуджуючого світла.

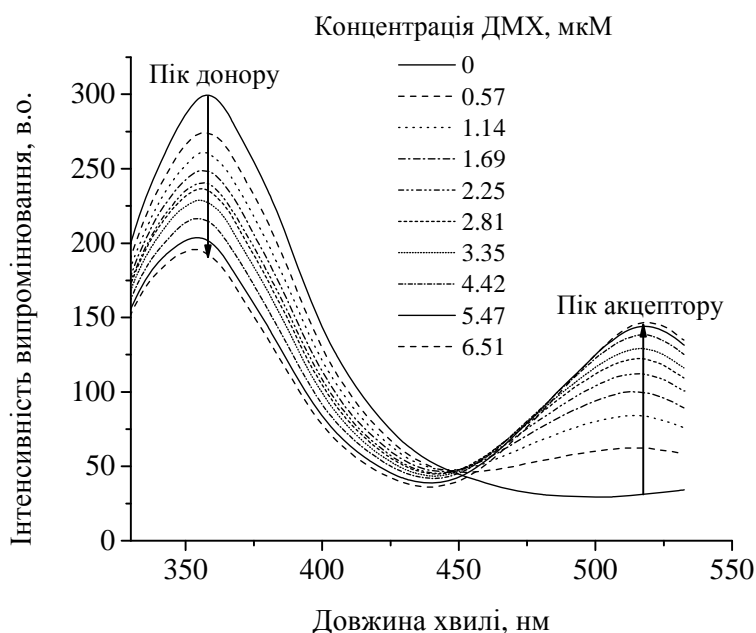


Рис. 4.13. Спектри флуоресценції апоА-I/W@50 у ФХ ліпосомах при різних концентраціях ДМХ. Концентрація білка була 1 мкМ, концентрація ліпиду 50 мкМ.

Для врахування цього ефекту сигнал, зумовлений розсіянням світла ліпосомальною суспензією, що не містила білок, віднімався від сигналу випромінювання білка у присутності везикул. Цей підхід є правомірним, коли поглинання флуорофору є нехтовно малою величиною. На рис. 4.14 проілюстровано, як профілі ІРПЕ залежать від способу корекції вимірюваного сигналу – представлені криві отримані з урахуванням ефектів розведення та внутрішнього фільтру, який виникає внаслідок реабсорції збудженого та випромінюваного світла (рівняння 2.13), без корекції на розсіяння ліпосом (верхні дві криві) та з відніманням фону ліпідних везикул (нижні дві криві). Окрім цього,

слід мати на увазі, що тільки мембранозв'язані молекули білка приймають участь в ІРПЕ, тому вимірювана інтенсивність флуоресценції ( $F^m$ ) складається зі змінної (яка залежить від концентрації акцептору) та практично незмінної (яка може незначно зменшуватись за рахунок ефектів розведення та реабсорбції) складових.

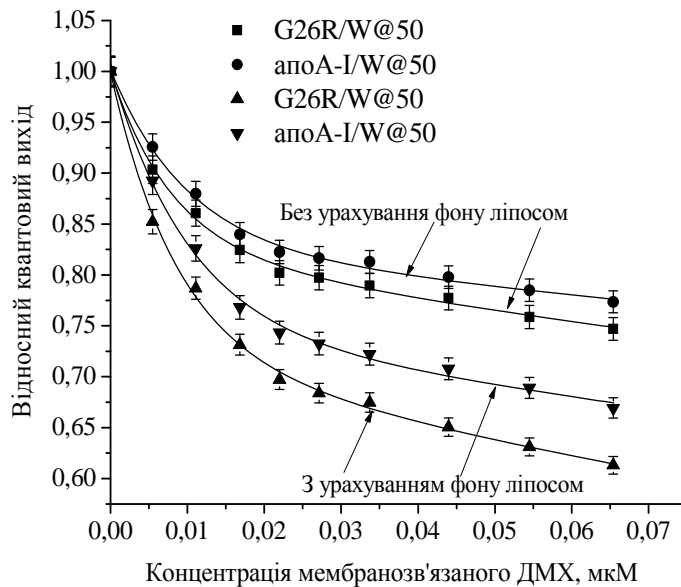


Рис. 4.14. Вплив розсіювання ліпідних везикул на профілі ІРПЕ. Концентрація білка була 1 мкМ, концентрація ліпиду 50 мкМ.

Для  $i$ -тої точки флуориметричного титрування білок-ліпідних сумішей зондом (акцептором)  $F^m$  може бути виражена як:

$$F_i^m = F_i^b + F_i^f + F_i^L \quad (4.2)$$

де верхні індекси  $b$  та  $f$  відносяться до зв'язаного та вільного білка,  $F_i^L$  означає внесок світлорозсіювання. Далі, різниця  $F_i^{corrL} = (F_i^m - F_i^L)K_{IFE}$  ( $K_{IFE}$  — це коефіцієнт корекції на ефекти внутрішнього фільтру) може бути представлена як лінійна комбінація молярних фракцій зв'язаного ( $f_b$ ) та вільного ( $1 - f_b$ ) білка, зважених на їх молярні флуоресценції ( $a_b$  та  $a_f$ , відповідно):

$$F_i^{corrL} = F_i^b + F_i^f + P_i [f_{bi}a_{bi} - (1 - f_{bi})a_f] \quad (4.3)$$

Фактично, відносний квантовий вихід донору ( $Q_{ri}$ ) визначається як відношення молярної флуоресценції зв'язаного білка при  $i$ -ій концентрації

акцептору ( $a_{bi}$ ) до молярної флуоресценції зв'язаного білка у початковій точці титрування, тобто у відсутності акцептору ( $a_{b0}$ ):

$$Q_{ri} = \frac{a_{bi}}{a_{b0}} \quad (4.4)$$

Рівняння (4.3) може бути записане у вигляді:

$$a_{bi} = \frac{F_i^{corrL} - (1 - f_{bi})a_f P_i}{f_{bi} P_i} \quad (4.5)$$

$$a_{b0} = \frac{F_0^{corrL} - a_f P_0}{f_{b0} P_0}$$

Усі ці міркування вказують на те, що коректний кількісний аналіз профілів ІРПЕ потребує одночасної оптимізації структурних параметрів (відстані Trp від центру бішару,  $d_c$ ) та параметрів зв'язування (константи дисоціації,  $K_d$ , та стехіометрії зв'язування,  $n$ ), які визначають фракцію зв'язаного білка. У світлі цього, було розроблено послідовний алгоритм аналізу даних, який базується на комбінуванні рівнянь (4.2)-(4.5) із відповідними моделями зв'язування та ІРПЕ, викладеними нижче.

Для кількісного аналізу даних ІРПЕ застосовували модель переносу енергії на поверхні, яка була запропонована Фангом та Страєром [227] та отримала свій подальший розвиток у роботі [341]. Згідно з цією моделлю, для донорів та акцепторів випадково розподілених у різних площинах, розташованих на відстані  $d_a$  одна від одної, ефективність переносу енергії визначається як:

$$E = 1 - \int_0^{\infty} \exp(-\lambda) \exp(-C_a^s S(\lambda)) d\lambda \quad (4.6)$$

$$S(\lambda) = \int_{d_a}^{\infty} \left[ 1 - \exp\left(-\lambda \left(\frac{R_o}{R}\right)^6\right) \right] 2\pi R dR \quad (4.7)$$

де  $\lambda_D = t/\tau_d$ ,  $\tau_d$  – час життя збудженого донора за умов відсутності акцептора,  $R_0$  – радіус Фьорстера,  $C_a^s$  – концентрація акцептора на одиницю площі, яка

залежить від молярної концентрації зв'язаного зонду ( $Z_b$ ) та загальної концентрації ліпідів ( $L_0$ ):

$$C_a^s = \frac{Z_b}{L_0(f_{\Phi X} S_{\Phi X} + f_{Xol} S_{Xol})} \quad (4.8)$$

де  $f, S$  – молярна фракція та середня площа на молекулу ФХ чи Хол ( $S_{\Phi X} = 0.65$  нм<sup>2</sup>,  $S_{Xol} = 0.39$  нм<sup>2</sup>). Концентрація зв'язаного зонду була знайдена шляхом аналізу даних по флуориметричному титруванню ДМХ ліпідними везикулами у рамках моделі розподілу між водною та ліпідною фазами (рівняння 2.7-2.9).

Радіус Фьорстера визначається квантовим виходом донора ( $Q_D$ ) та інтегралом перекривання спектру випромінювання донора ( $F_D(\lambda)$ ) зі спектром поглинання акцептора ( $\varepsilon_A(\lambda)$ ):

$$R_0 = 979(\kappa^2 n_r^{-4} Q_D J)^{1/6}; \quad J = \frac{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) d\lambda} \quad (4.9)$$

де  $n_r$  – показник заломлення середовища ( $n_r = 1.37$  для біомолекул у водному розчині),  $\kappa^2$  – орієнтаційний фактор, що характеризує взаємну орієнтацію дипольних моментів переходу донора та акцептора [233]:

$$\kappa^2 = (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (4.10)$$

$\theta_D$  та  $\theta_A$  – кути між моментами переходу випромінювання донора (**D**) або поглинання акцептора (**A**) та вектором **R**, який з'єднує молекули донора і акцептора,  $\phi$  – двогранний кут між площинами (**D, R**) та (**A, R**).

Однак, застосування рівняння (4.10) обмежується випадком, коли орієнтація векторів **D** та **A** не змінюється під час переносу енергії. У протилежному випадку, параметр  $R_0$  повинен бути розрахований з використанням динамічно усередненого значення орієнтаційного фактору ( $\langle \kappa^2 \rangle$ ). Зокрема, припускаючи, що моменти переходу випромінювання донора та поглинання акцептора симетрично



розподілені усередині конусів навколо центральних осей  $D_x$  і  $A_x$ , рівняння для  $\langle \kappa^2 \rangle$  може бути записане як:

$$\begin{aligned} \langle \kappa^2 \rangle = & (\sin \Theta_D \sin \Theta_A \cos \Phi - 2 \cos \Theta_D \cos \Theta_A)^2 \langle d_D^x \rangle \langle d_A^x \rangle + 1/3(1 - \langle d_D^x \rangle) + \\ & + 1/3(1 - \langle d_A^x \rangle) + \cos^2 \Theta_D \langle d_D^x \rangle (1 - \langle d_A^x \rangle) + \cos^2 \Theta_A \langle d_A^x \rangle (1 - \langle d_D^x \rangle) \end{aligned} \quad (4.11)$$

де  $\Theta_D$  та  $\Theta_A$  – кути між осями  $D_x$  і  $A_x$  та вектором  $R$ ,  $\Phi$  – кут між площинами, які містять осі конусів та вектор  $R$ ,  $\langle d_D^x \rangle$  та  $\langle d_A^x \rangle$  представляють собою так звані аксіальні деполаризаційні фактори, які можуть бути виражені через половинні кути конусів ( $\psi_{D,A}$ ) наступним чином:

$$\langle d_{D,A}^x \rangle = 3/2 \langle \cos^2 \psi_{D,A} \rangle - 1/2 \quad (4.12)$$

Ці фактори залежать від стаціонарної  $r$  та фундаментальної  $r_0$  анізотропії донора і акцептора [232,233]:

$$d_{D,A}^x = \pm (r_{D,A} / r_{0D,A})^{1/2} \quad (4.13)$$

Беручи до уваги той факт, що у переносі енергії задіяні численні донорно-акцепторні пари, у випадку, коли площини донорів та акцепторів розташовані на різних рівнях по відношенню до центру бішару, орієнтаційний фактор є функцією відстані між донором та акцептором ( $R$ ). Так, при орієнтації  $D_x$  та  $A_x$  паралельно до нормалі бішару кути  $\Theta_D$  та  $\Theta_A$  однакові та залежать від відстані між донором і акцептором ( $\Theta_A = \Theta_D = \theta$ ,  $\theta = f(R)$ ). Тому рівняння (4.11) може бути переписане у вигляді:

$$\begin{aligned} \langle \kappa^2(\theta) \rangle = & \langle d_D^x \rangle \langle d_A^x \rangle (3 \cos^2 \theta - 1)^2 + 1/3(1 - \langle d_D^x \rangle) + 1/3(1 - \langle d_A^x \rangle) + \\ & + \cos^2 \theta (\langle d_D^x \rangle - 2 \langle d_D^x \rangle \langle d_A^x \rangle + \langle d_A^x \rangle) \end{aligned} \quad (4.14)$$

де  $\cos^2 \theta = (d_a / R_{DA})^2$ . Представивши радіус Фьорстеру як  $R_0 = [\kappa^2(R)]^{1/6} \cdot R_0^r$ , можна записати:

$$S(t) = \int_{d_a}^{\infty} \left[ 1 - \exp \left( -\lambda \kappa^2(R) \left( \frac{R_0^r}{R} \right)^6 \right) \right] 2\pi R dR ; \quad (4.15)$$

$$R_0^r = 979 (n_r^{-4} Q_D J)^{1/6}$$

Аналіз даних ІРПЕ, викладених у даному підрозділі, базувався на припущенні, що ліпід-білкові системи містять одну площину донорів, яка знаходиться на відстані  $d_c$  від центру бішару, та дві площини акцепторів, відстань між якими  $d_t$ . Оскільки для зовнішньої площини<sup>5</sup> акцепторів  $d_a = |d_c - 0.5d_t|$ , а для внутрішньої  $d_a = d_c + 0.5d_t$ , отримуємо наступний набір рівнянь:

$$S_1(\lambda) = \int_{|d_c - 0.5d_t|}^{\infty} \left[ 1 - \exp \left( -\lambda \kappa_1^2(R) \left( \frac{R_0^r}{R} \right)^6 \right) \right] 2\pi R dR \quad (4.16)$$

$$S_2(\lambda) = \int_{d_c + 0.5d_t}^{\infty} \left[ 1 - \exp \left( -\lambda \kappa_2^2(R) \left( \frac{R_0^r}{R} \right)^6 \right) \right] 2\pi R dR \quad (4.17)$$

$$\begin{aligned} \kappa_{1,2}^2(R) = & \langle d_D^x \rangle \langle d_A^x \rangle \left( 3 \left( \frac{d_c \mp 0.5d_t}{R} \right)^2 - 1 \right) + \frac{1 - \langle d_D^x \rangle}{3} + \frac{1 - \langle d_A^x \rangle}{3} + \\ & + \left( \frac{d_c \mp 0.5d_t}{R} \right)^2 \left( \langle d_D^x \rangle - 2 \langle d_D^x \rangle \langle d_A^x \rangle + \langle d_A^x \rangle \right) \end{aligned} \quad (4.18)$$

$$E = 1 - \int_0^{\infty} \exp(-\lambda) \exp \left[ -C_a^s (S_1(\lambda) + S_2(\lambda)) \right] d\lambda \quad (4.19)$$

де  $S_1$  та  $S_2$  характеризують гасіння флуоресценції внаслідок переносу енергії на зовнішню та внутрішню площини акцепторів, відповідно. Рівняння (4.16)-(4.19) справедливі у випадку розподілу моментів переходу донора та акцептора навколо осей  $D_x$  та  $A_x$ , паралельних нормалі бішару  $N$ . У протилежному випадку необхідно ввести додаткові фактори деполяризації, які враховують відхилення  $D_x$  та  $A_x$  від нормалі:  $d_{D,A}^a = \frac{3}{2} \cos^2 \alpha_{D,A} - \frac{1}{2}$ , де  $\alpha_{D,A}$  представляють собою кути, утворені  $D_x$  та/чи  $A_x$  і  $N$ . Використання теореми Солей'є, яка стверджує

<sup>5</sup> Площина акцепторів, яка розташована у зовнішньому моношарі мембрани.

мультиплікативність незалежних деполяризаційних факторів дозволяє записати рівняння (4.18) у більш загальному вигляді:

$$\kappa_{1,2}^2(R) = d_D d_A \left( 3 \left( \frac{d_c \mp 0.5 d_t}{R} \right)^2 - 1 \right) + \frac{1-d_D}{3} + \frac{1-d_A}{3} + \left( \frac{d_c \mp 0.5 d_t}{R} \right)^2 (d_D - 2d_D d_A + d_A) \quad (4.20)$$

де  $d_{D,A} = \langle d_{D,A}^x \rangle d_{D,A}^a$ .

В описаній моделі ІРПЕ взаємна орієнтація донорів та акцепторів описується параметрами  $d_c$  та  $d_t$ , які характеризують відстань між площиною донорів і центром мембрани та відстань між зовнішньою та внутрішньою площинами акцепторів, відповідно. Параметр  $d_c$  було знайдено в результаті оптимізації експериментальних даних, тоді як параметр  $d_t$  брали рівним 2.6 нм, враховуючи, що молекули ДМХ локалізуються на рівні гліцеринового остову та початкових вуглецевих атомів ацильних ланцюгів.

Для кількісної інтерпретації зв'язування мутантів апоА-I з ліпідними везикулами використовували решіткову модель адсорбції великих лігандів на мембрані, запропоновану Станковскі [342]. В рамках цієї моделі ліпідний бішар розглядається як двомірна решітка, структурними центрами якої є молекули ліпідів, а ділянка зв'язування білка представляє собою певну комбінацію таких центрів в залежності від форми та розміру ліганду. Ця модель є більш коректною при термодинамічному аналізі процесу утворення білок-ліпідних комплексів, порівняно із традиційною моделлю Ленгмюра [343], тому що вона дозволяє врахувати ряд важливих особливостей білок-ліпідних взаємодій, зокрема: і) великий розмір білкової молекули, що призводить до здатності білка контактувати одночасно із декількома структурними елементами поверхні мембрани; ii) ефекти виключеної площі, обумовлені стеричними обмеженнями, які виникають при адсорбції; iii) залежність процесу адсорбції від форми ліганду, тобто від геометричного розташування центрів зв'язування в білок-ліпідному

комплексі. Решіткова модель описує асоціацію білка з ліпідним бішаром наступними рівняннями:

$$r = \frac{B}{L_0}; \quad \lambda = \frac{z_c - 2}{z_c} - \frac{2}{nz_c}; \quad K_a F = \frac{r}{1 - nr} \left( \frac{1 - (1 - \lambda)nr}{1 - nr} \right)^{n-1} \quad (4.21)$$

де  $B$ ,  $F$  – концентрації зв'язаного та вільного білка, відповідно,  $z_c$  – координаційне число решітки ( $z_c = 6$ ),  $n$  – стехіометрія зв'язування, тобто число молекул ліпідів, які формують центр зв'язування білка,  $K_a$  – константа асоціації. Ця модель була використана для знаходження фракції зв'язаного білка. Результати двох флуориметричних титрувань, проведених при одній концентрації ліпиду ( $L_0 = 50$  мкМ) та двох різних концентраціях білка ( $P = 1$  та  $P = 2$  мкМ), були одночасно проаналізовані з метою оптимізації параметрів  $d_c$ ,  $K_a$  та  $n$ . Основна ідея такого підходу полягала в тому, щоб знайти набір параметрів, який би забезпечував незалежність ІРПЕ від концентрації донорів, тобто найкращу відповідність між профілями ІРПЕ, отриманими при двох концентраціях донору (білка). Правомірність цієї методології була підтверджена комп'ютерним моделюванням, яке включало генерацію координат донора та акцептора, рівномірно розподілених у двох площинах.

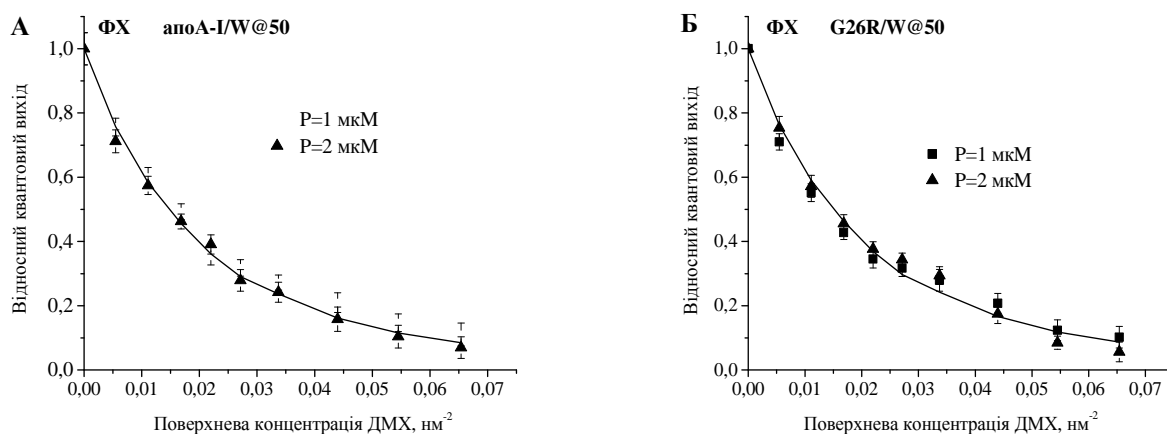


Рис. 4.15. Профілі ІРПЕ для apoA-I/W@50 (А) та G26R/W@50 (Б) у ФХ ліпосомах.

Виявилось, що для застосованих експериментальних умов (тобто, коли поверхнева густина донору не перевищувала 0.12 молекули на 1 нм<sup>2</sup>, а густина

акцепторів варіювала від 0 до 1), зміни  $Q_r$  при фіксованому  $C_a^s$  не перевищували 4%. На рис. 4.15 представлені репрезентативні профілі ІРПЕ, розраховані за рівняннями (4.2) – (4.5), та відповідні теоретичні криві, отримані на основі набору параметрів (табл. 4.7, 4.8), що забезпечують найкраще узгодження теорії з експериментом. Аналіз отриманих параметрів, представлених в табл. 4.7 та 4.8, дозволяє зробити наступні висновки:

- мутація G26R призводить до зростання константи асоціації варіантів W@50 та W@8 із ФХ та Хол30 ліпідними везикулами, у той час коли для Хол30 ліпосом цей ефект не спостерігається;
- взаємодія мутантів апоА-I з Хол30 модельними мембранами характеризується константою асоціації та розмірами білок-ліпідної контактної ділянки, які на 1-2 порядки менші, ніж  $K_a$  та  $n$  для ФХ мембран;
- мутація G26R суттєво не впливає на розташування W8 та W50 відносно поверхні розділу ліпід/вода в обох видах досліджуваних мембран;
- у ФХ бішарах W8 та W50 локалізуються на поверхні розділу ліпід/вода, зокрема, значення  $d_c$  варіюють від 1.9 до 2.3 нм, що відповідає розташуванню триптофанових залишків біля фосфорилхолінової групи ФХ;
- враховуючи, що напівширина мембрани дорівнює  $\sim 2.3$  нм, а діаметр  $\alpha$ -спіралі  $\sim 1.2$  нм, можна зробити припущення, що у Хол30 модельних мембранах триптофани W8 та W50 локалізуються у водній фазі. Різниця у значеннях  $d_c$  для W8 та W50 може бути пояснена утворенням поліпептидним ланцюгом кінка (петлі). Хоча вважається, що кінки утворюються проліном, не виключена можливість участі інших амінокислотних залишків у їх формуванні;
- стехіометрія зв'язування зменшується у Хол30 везикулах, порівняно із ФХ мембранами. Зокрема, у ФХ бішарах  $n=17$ , тобто 17 молекул ліпідів покриті однією молекулою білка. Приймаючи діаметр полярної голівки ФХ рівним  $\sim 0.9$  нм, маємо, що довжина контактної білок-ліпідної ділянки складає  $\sim 15.3$  нм. Якщо довжина ланцюга, що приходить на один

амінокислотний залишок складає 0.35 нм для повністю витягнутого ланцюга та 0.15 нм для  $\alpha$ -спіралі, отримуємо, що довжина молекул апоА-І 83 лежить у межах 13 – 28 нм, що дозволяє зробити висновок про переважно спіральну конформацію мутантів апоА-І у мембранному оточенні.

У подальших експериментах було досліджено гасіння триптофаної флуоресценції різних варіантів апоА-І іонами цезію. Зростання концентрації  $\text{Cs}^+$  призводило до зменшення інтенсивності флуоресценції без зміни положення максимуму спектру. Репрезентативні графіки Штерна-Фольмера проілюстровані на рис. 4.16. Апроксимація експериментально отриманих профілів гасіння рівнянням Штерна-Фольмера (рівняння 2.12) дозволила отримати значення константи гасіння для різних систем. Як слідує з таблиці 4.9, характер мутації N-кінцевого фрагменту апоА-І суттєво не впливає на ефективність гасіння флуоресценції іонами цезію. У той же час, зв'язування усіх пептидів з ліпідними везикулами призводило до зменшення константи Штерна-Фольмера ( $K_{sv}$ ), причому величина цього ефекту суттєво не залежала від типу ліпідних везикул. Гасіння власної флуоресценції білків іонами цезію протікає по механізму динамічного гасіння, який визначається дифузією гасника та числом його зіткнень із залишками Trp за час життя збудженого стану флуорофору. Це призводить до безвипромінювальної релаксації збудженого стану та зменшення інтенсивності флуоресценції. Константа  $K_{sv}$ , по суті, віддзеркалює відносну доступність триптофанових залишків для гасника. Найбільш імовірною причиною зниження  $K_{sv}$  при утворенні білок-ліпідних комплексів є перенос залишків Trp у мембранне оточення із меншою полярністю. Однак, відсутність блакитного зсуву максимуму спектра флуоресценції білка при зв'язуванні з ліпосомами говорить про те, що полярність оточення білкових флуорофорів істотно не змінюється внаслідок асоціації з ліпідами.

Таблиця 4.7

Структурні параметри та параметри зв'язування мутантів апоА-І 83 з ФХ мембранами

Мутант	Параметри	Фракція зв'язаного	Відстань
--------	-----------	--------------------	----------

	зв'язування		білка		Тгр від центру бішару, нм
	$K_a \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$	$n$	$f_{b1}$ $P_1=1 \text{ мкМ}$	$f_{b2}$ $P_2=2 \text{ мкМ}$	$d_c$
G26R/W@50	$8.33^{\pm 2.25}$	$17^{\pm 1.4}$	0.52	0.29	$1.9^{\pm 0.1}$
апоА-I/W@50	$0.36^{\pm 0.08}$	$11^{\pm 1.5}$	0.53	0.35	$2.0^{\pm 0.1}$
G26R/W@8	$2.50^{\pm 0.64}$	$17^{\pm 1.5}$	0.45	0.26	$2.1^{\pm 0.2}$
апоА-I/W@8	$0.31^{\pm 0.08}$	$17^{\pm 1.4}$	0.32	0.19	$2.3^{\pm 0.2}$

Таблиця 4.8

Структурні параметри та параметри зв'язування мутантів апоА-I 83 з Хол30 мембранами

Мутант	Параметри зв'язування		Фракція зв'язаного білка		Відстань Тгр від центру бішару, нм
	$K_a \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$	$n$	$f_{b1}$ $P_1=1 \text{ мкМ}$	$f_{b2}$ $P_2=2 \text{ мкМ}$	$d_c$
G26R/W@50	$4.06^{\pm 0.94}$	$10^{\pm 1.4}$	0.32	0.25	$2.8^{\pm 0.2}$
апоА-I/W@50	$2.17^{\pm 0.49}$	$6^{\pm 1.3}$	0.30	0.27	$2.8^{\pm 0.3}$
G26R/W@8	$5.88^{\pm 1.04}$	$9^{\pm 1.5}$	0.43	0.35	$3.5^{\pm 0.4}$
апоА-I/W@8	$1.66^{\pm 0.43}$	$14^{\pm 1.4}$	0.23	0.19	$3.5^{\pm 0.4}$

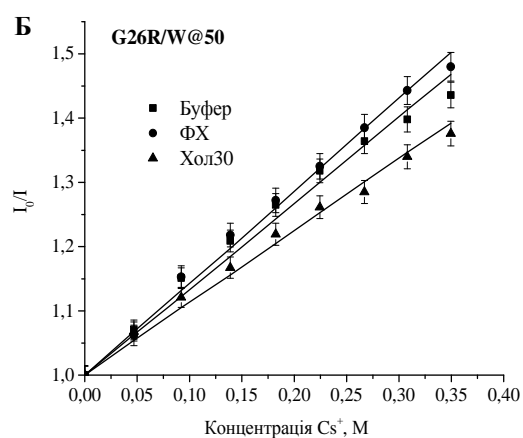
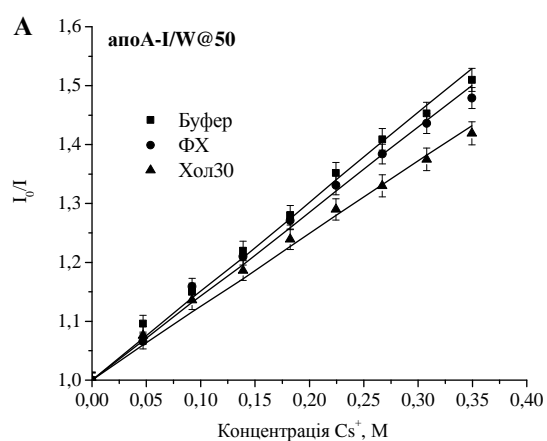


Рис. 4.16. Профілі гасіння власної флуоресценції мутантів апоА-I у буферному розчині та у мембранному оточенні. Концентрація білка була 1 мкМ, ліпиду – 50 мкМ.

Таблиця 4.9

Константи гасіння власної флуоресценції мутантів апоА-I іонами  $\text{Cs}^+$

Мутант	Буфер	ФХ	Хол30
G26R/W@50	$1.34^{\pm 0.08}$	$0.85^{\pm 0.05}$	$0.83^{\pm 0.04}$

апоА-I/W@50	1.33±0.09	0.91±0.05	0.95±0.06
G26R/W@8	1.35±0.14	1.05±0.07	1.15±0.08
апоА-I/W@8	1.32±0.06	1.04±0.06	1.09±0.06

Таблиця 4.10

Спорідненість різних фрагментів апоА-I 83 до ліпідного бішару, розрахована за допомогою серверу HeliQuest

<b>Фрагмент пептиду апоА-I 83</b>	<b>&lt;μH&gt;</b>	<b>z</b>	<b>D</b>
<sub>8</sub> WDRVKDLATVYVDVLKDS <sub>25</sub>	0.509	-1	0.150
<sub>9</sub> DRVKDLATVYVDVLKDSG <sub>26</sub>	0.463	-1	0.107
<sub>10</sub> RVKDLATVYVDVLKDSGR <sub>27</sub>	0.477	1	0.780
<sub>11</sub> VKDLATVYVDVLKDSGRD <sub>28</sub>	0.478	-1	0.121
<sub>12</sub> KDLATVYVDVLKDSGRDY <sub>29</sub>	0.464	-1	0.108
<sub>13</sub> DLATVYVDVLKDSGRDYV <sub>30</sub>	0.422	-2	-0.262
<sub>14</sub> LATVYVDVLKDSGRDYVS <sub>31</sub>	0.385	-1	0.033
<sub>15</sub> ATVYVDVLKDSGRDYVSQ <sub>32</sub>	0.335	-1	-0.014
<sub>16</sub> TVYVDVLKDSGRDYVSQF <sub>33</sub>	0.408	-1	0.055
<sub>44</sub> LKLLDNWDSVTSTFSKLR <sub>61</sub>	0.457	1	0.761
<sub>45</sub> KLLDNWDSVTSTFSKLRE <sub>62</sub>	0.552	0	0.490
<sub>46</sub> LLDNWDSVTSTFSKLREQ <sub>63</sub>	0.534	-1	0.174
<sub>47</sub> LDNWDSVTSTFSKLREQL <sub>64</sub>	0.534	-1	0.174
<sub>65</sub> GPVTQEFWDNLEKETEG <sub>82</sub>	0.465	-4	-0.881
<sub>66</sub> PVTQEFWDNLEKETEGLR <sub>83</sub>	0.461	-3	-0.555

До того ж, результати ІРПЕ, викладені вище, свідчать на користь поверхневої локалізації мутантів апоА-I 83 без занурення у гідрофобну область ліпідного бішару. Ці міркування дозволяють висловити припущення щодо інших причин зниження доступності триптофану для гасника. Агрегація пептидів або формування додаткових внутрішньомолекулярних контактів можуть бути



альтернативним поясненням зменшення  $K_{sv}$ . Зокрема, процес агрегації амфіпатичних  $\alpha$ -спіралей, опосередкованої ліпідами, був теоретично описаний на основі теорії середнього поля пакування ацильних ланцюгів ліпідів [272].

Згідно з цією теорією, гідрофобна невідповідність між товщиною неполярної зони мембрани та ліпідзв'язаного фрагменту поліпептидного ланцюга є визначальним чинником самоасоціації пептидів та білків. До того ж, утворення пептид-пептидних комплексів може додатково обмежувати термодинамічно не вигідні контакти гідрофобних поверхонь  $\alpha$ -спіралей з водним оточенням. У цьому контексті уявляється доцільним проаналізувати, який фрагмент апоА-I 83 може відповідати за асоціацію цього поліпептиду з ліпідним бішаром. Для цього було використано сервер HeliQuest [344], який дозволяє розрахувати середнє значення гідрофобності ( $\langle H \rangle$ ), гідрофобного моменту ( $\langle \mu H \rangle$ ), заряду ( $z$ ) та фактор дискримінації ліпідів ( $D$ ), що характеризує спорідненість певного фрагменту поліпептидного ланцюга до ліпідних молекул.

При значенні  $D > 0.68$  вважається, що спіраль має високий ліпідзв'язуючий потенціал. Аналіз спіралей апоА-I показав, що найвищу спорідненість до ліпідного бішару мають два фрагмента поліпептидного ланцюга, які охоплюють залишки  $_{10}\text{RVKDLATVYVDVLKDSGR}_{27}$  та  $_{44}\text{LKLLDNWDSVTSTFSKLR}_{61}$  (табл. 4.10). Ці оцінки добре узгоджуються із результатами роботи [345], в якій було показано, що сегмент N-термінальної ділянки апоА-I, відповідальний за асоціацію з ліпідами включає залишки  $_{44}\text{LKLLDNWDSVTSTFSKLREQLG}_{65}$ . Окрім цього, згідно з запропонованою у роботі моделлю, процес утворення білок-ліпідних комплексів протікає у два етапи. На першому етапі перша та восьма  $\alpha$ -спіралі апоА-I зв'язуються з ліпідним бішаром, заякорюючи усю молекулу білка в мембрані. За цим слідує взаємодія між іншими спіралями апоА-I (з другої по сьому), що стабілізує мембранозв'язану конформацію поліпептидного ланцюга. Можна припустити, що дана модель справедлива й для N-термінального фрагменту апоА-I 83. У цьому випадку формування контактів між спіралями білка слугує додатковим поясненням зниження константи Штерна-Фольмера у мембранному оточенні (табл. 4.9).

#### 4.2.2. Вплив апоА-I 83 на фізико-хімічні властивості ліпідного бішару

При дослідженні мембранних ефектів різних варіантів апоА-I 83, по аналогії з лізоцимом, застосовували флуоресцентні зонди, які відрізняються за своєю локалізацією в ліпідному бішарі. Вивчення спектральної поведінки пірену показало, що всі мутанти не мають статистично значимого впливу на значення параметрів  $I_I/I_{III}$  та Е/М (табл. 4.11), тобто полярність та вільний об'єм гідрофобної зони модельних мембран залишаються незмінними у присутності білка. Ці дані добре узгоджуються з оцінками глибини занурення варіантів апоА-I у ліпідний бішар (див. табл. 4.7), які свідчать про поверхневу локалізацію поліпептидів. У той же час, утворення білок-ліпідних комплексів призводило до зростання узагальненої поляризації (GP) Лаурдану у ФХ ліпосомах, з величиною ефекту ~13 – 16%, практично незалежною від виду мутації. Натомість, у Хол30 везикулах зміни GP не перевищували 7% (табл. 4.11).

Лаурдан – це мембранний флуоресцентний зонд, аналогічний за своїми спектральними властивостями Продану. Цей флуорофор розташовується на рівні гліцеринового остову фосfolіпідних голівок. Як і Продан, Лаурдан характеризується надзвичайно високою чутливістю до полярності мікроточення та залежністю максимуму випромінювання від ступеня реорієнтації диполів розчинника навколо диполу збудженого стану зонду. Це проявляється у наявності двох компонент у спектрі флуоресценції Лаурдану, які відносяться до релаксованого (довгохвильова компонента) та нерелаксованого (короткохвильова компонента) станів [346].

Таблиця 4.11

Відносні зміни спектральних параметрів пірену ( $I_I/I_{III}$ , Е/М) та Лаурдану (GP) у білок-ліпідних системах різного складу

Мутант	ФХ			Хол30		
	$I_I/I_{III}$	Е/М	GP	$I_I/I_{III}$	Е/М	GP
апоА-I 83	-0.7*	4.8	14.1	-0.7	4.5	3.1

G26R	-0.9	0.9	15.6	-1.1	0.6	4.2
апоА-I/W@8	-0.5	1.3	ND <sup>**</sup>	-0.5	-4.6	3.1
апоА-I/W@50	-0.6	1.3	ND	1.4	-1.8	-2.2
G26R/W@8	0.2	2.9	14.7	-0.4	-2.5	2.3
G26R/W@50	-0.3	3.5	14.1	-1.2	1.9	5.1
G26R/W@72	-0.9	0.3	13.5	-1.2	0.6	6.5

\* негативні значення означають зменшення параметру, а позитивні – збільшення

\*\* не визначено

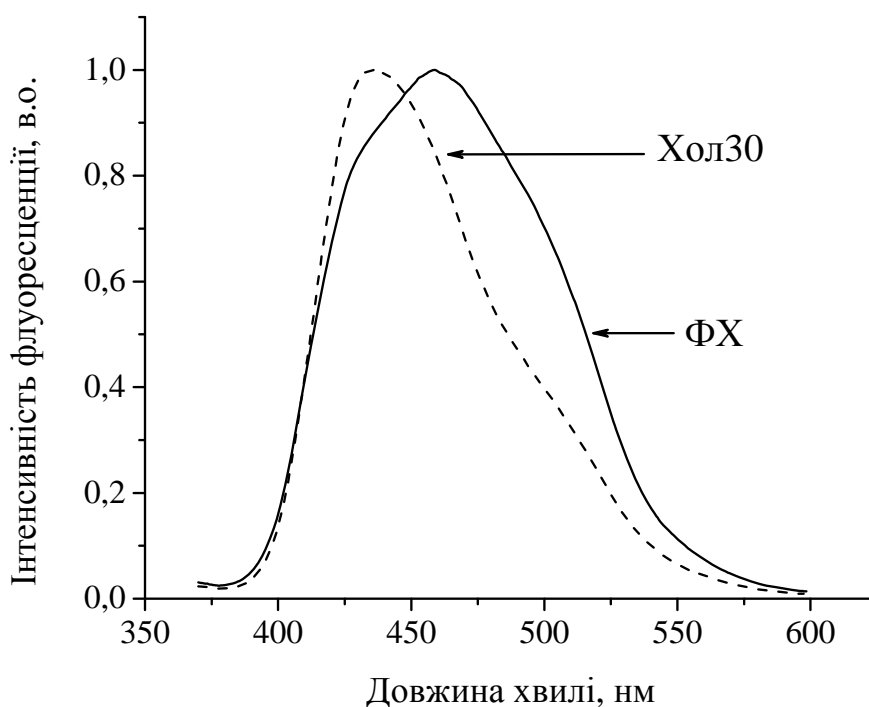


Рис. 4.17. Нормовані спектри флуоресценції Лаурдану у ФХ та Хол30 ліпосомах. Концентрація ліпиду 16 мкМ, концентрація зонду – 0.6 мкМ.

Спостережуване зростання значення GP можна пояснити дегідратацією ліпідного бішару при вбудовуванні варіантів апоА-I 83 у полярну область мембрани, що супроводжується витисненням частки молекул розчинника з контактної ділянки. Окремого обговорення потребує інваріантність GP у Хол30 ліпідних везикулах при додаванні досліджуваних поліпептидів. Як можна судити із значень  $d_c$  (табл. 4.7), мутанти апоА-I сорбуються на поверхні холестеринових ліпосом, тобто

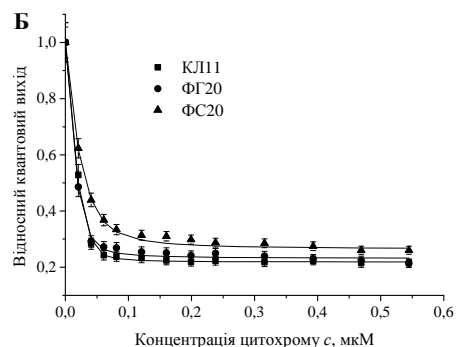
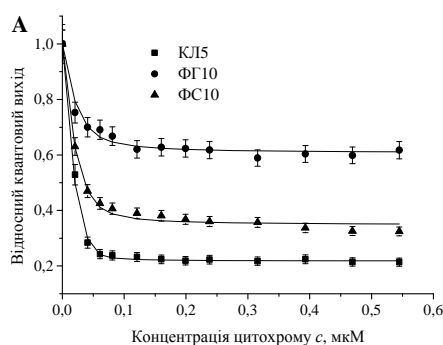
стерол перешкоджає вбудовуванню білка у внутрішню область мембрани. До того ж, контрольні спектри флуоресценції Лаурдану (тобто у відсутності білка) у Хол30 ліпосомах характеризуються блакитним зсувом максимуму та зменшенням напівширини спектру по відношенню до ФХ бішарів (рис. 4.17). Загальноприйнятим поясненням такого роду ефектів є зниження полярності мікрооточення флуорофору та швидкості релаксації молекул води на поверхні розділу ліпід/вода [347]. Примітно, при дослідженні флуоресценції Лаурдану у двох ліпідних фазах (гелевій та рідинно-кристалічній), Парасассі та співавтори зробили висновок, що зменшення рухливості молекул води відображає обмеження динаміки ліпідів [346,347]. На цей час запропоновано багато теорій для пояснення конденсуючого ефекту холестерину на ліпідний бішар. Серед них, модель конденсованих станів [348], супер-решіткова модель [349], модель «парасольки» [350], матрична модель [351]. У цих моделях припускається, що холестерин викликає встановлення дальнього порядку [349], сприяє переходу ліпідів у більш витягнуту, впорядковану конформацію, яка забезпечує створення вільного місця для молекули стерола, захищає його від не вигідних контактів з водою [350] та максимізує число гідрофобних контактів та щільність пакування ацильних ланцюгів [351]. Напевне, саме конденсуючий ефект лежить в основі спостережуваної здатності холестерину перешкоджати взаємодії поліпептидів апоА-I 83 з ліпідними мембранами.

#### **4.3. Модифікація структури ліпідних мембран під дією цитохрому с**

Цитохром с – це мітохондріальний мембранний гемо протеїн, який виконує важливі фізіологічні функції. По-перше, цитохром с є одним з ключових елементів дихального ланцюга, що транспортує електрони з цитохром с редуктази (комплекс bc<sub>1</sub>) на цитохром с оксидазу [297]. По-друге, вивільнення цитохрому с з міжмембранного простору мітохондрій в цитозоль ініціює програмовану загибель клітини, апоптоз [352]. Все більшого теоретичного та експериментального обґрунтування набуває гіпотеза про те, що специфічні взаємодії між цитохромом с та кардіоліпіном (КЛ), основним компонентом

мітохондріальних мембран, є критичним фактором в реалізації функцій білка [353]. Тому детальне вивчення асоціації білка з КЛ є необхідною передумовою для глибинного розуміння фізіологічної активності цитохрому *c*. Окрім цього, в експериментах *in vitro* виявлена здатність цього білка утворювати амілоїдні фібрили [19]. Уявляється вельми вірогідною гіпотеза про те, що фібрилізація цитохрому *c* може бути опосередкована ліпідами [10]. У даному підрозділі викладені результати досліджень, спрямованих на характеристику зв'язування цитохрому *c* з ліпідними мембранами, які склалися з ФХ та його сумішей з ФГ, ФС та КЛ у різних молярних співвідношеннях. Для вирішення цієї задачі використовували міжмолекулярний ІРПЕ з антрілвінільного (АВ) флуорофору, ковалентно приєднаного до ФХ (АВ-ФХ) або КЛ (АВ-КЛ), на гемову групу білка.

Перший етап дослідження процесу утворення цитохром *c* – ліпідних комплексів був спрямований на оцінку специфічності білка до різних аніонних ліпідів. З цією метою були проведені вимірювання ІРПЕ між АВ-ФХ та білком, зв'язаним з ліпідними везикулами, які містили ФГ, ФС чи КЛ у якості аніонного компонента. Асоціація цитохрому *c* з мембранами супроводжувалась зниженням інтенсивності флуоресценції донору в результаті переносу енергії з АВ-групи на гем. Як показано на рис. 4.18, А, серед слабозаряджених мембран найбільш ефективний перенос енергії спостерігався для ФХ/КЛ ліпосом. Однак, підвищення вмісту аніонних ліпідів призвело до зникнення цього ефекту для усіх концентрацій ліпиду, що застосовувалися в експерименті (5, 10, 20 та 40 мкМ). Для пояснення цього явища, сукупність профілів ІРПЕ було проаналізовано у рамках методичного підходу, аналогічного описаному в підрозділі 4.2.1.



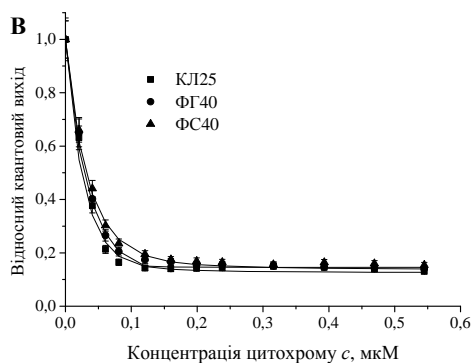


Рис. 4.18. Відносний квантовий вихід АВ-ФХ в різних білок-ліпідних системах. Неперервними лініями представлено криві, що забезпечують найкращу відповідність між теорією та експериментом.

Таблиця 4.12

Структурні параметри та параметри зв'язування цитохрому *c* з ліпідними везикулами

Система	$d_c$ , nm	$K_d$ , $\mu\text{M}$	$n$
КЛ5	$3.22^{\pm 0.17}$	$0.81^{\pm 0.04}$	$62^{\pm 3.2}$
ФГ10	$3.53^{\pm 0.21}$	$1.23^{\pm 0.06}$	$54^{\pm 2.9}$
ФС10	$3.47^{\pm 0.18}$	$0.94^{\pm 0.05}$	$61^{\pm 3.3}$
КЛ11	$3.51^{\pm 0.19}$	$0.54^{\pm 0.03}$	$47^{\pm 2.5}$
ФГ20	$3.86^{\pm 0.18}$	$0.91^{\pm 0.05}$	$50^{\pm 2.7}$
ФС20	$3.68^{\pm 0.22}$	$0.78^{\pm 0.04}$	$53^{\pm 2.9}$
КЛ25	$3.85^{\pm 0.21}$	$0.47^{\pm 0.03}$	$42^{\pm 2.2}$
ФГ40	$3.91^{\pm 0.21}$	$0.51^{\pm 0.03}$	$49^{\pm 2.6}$
ФС40	$3.93^{\pm 0.22}$	$0.52^{\pm 0.03}$	$41^{\pm 2.2}$

Цей підхід базується на аналізі двомірних масивів даних, отриманих при варіюванні концентрацій білка та ліпиду, для одночасного знаходження структурних параметрів білок-ліпідного комплексу та параметрів зв'язування за рахунок комбінування аналітичної моделі ІРПЕ у мембранних системах із моделлю зв'язування. Для порівняння специфічності цитохрому *c* до аніонних ліпідів модель ІРПЕ, описана рівняннями (2.14)-(2.20), була комбінована з моделлю адсорбції Ленгмюра, яка не враховує можливість гетерогенності центрів

зв'язування (рівняння 2.21). Як можна бачити з таблиці 4.12, відстань гемової групи цитохрому  $c$  від центру ліпідного бішару ( $d_c$ ) залежить від складу досліджуваних систем. При цьому, найбільша глибина занурення у внутрішню область мембрани (найменше значення  $d_c$ ) спостерігалась для КЛ5 везикул. Окрім цього, ФХ/КЛ системи характеризувались нижчими константами дисоціації, порівняно з ФХ/ФГ та ФХ/ФС, що свідчить про найвищу спорідненість цитохрому  $c$  до КЛ-вміщуючих ліпосом. Отримані дані добре узгоджуються з результатами Степанова та співавторів [354], які показали переважну асоціацію цитохрому  $c$  з КЛ, порівняно з іншими аніонними ліпідами. Авторами було зроблено припущення щодо існування кореляції між спорідненістю білка до ліпідів та їх здатністю модифікувати активний центр цитохрому  $c$ . Аналізуючи дані, представлені в табл. 4.12, можна бачити, що зростання вмісту аніонного ліпиду супроводжувалось нівелюванням відмінностей між КЛ-, ФГ- та ФС-вміщуючими мембранами. Іншими словами, специфічність цитохрому  $c$  до того чи іншого ліпиду проявлялась лише при низькому поверхневому електростатичному потенціалі бішару. Одним з можливих пояснень цього факту може бути залежність кількості зв'язаного білка від заряду мембран. Як показано на рис. 4.19, А, тільки 44%, 36% та 22% від загальної концентрації цитохрому  $c$  асоціюють з КЛ5, ФС10 та ФГ10 ліпосомами, відповідно, тоді як при високому вмісті аніонних ліпідів майже увесь білок знаходиться в мембранозв'язаному стані завдяки сильним електростатичним взаємодіям.

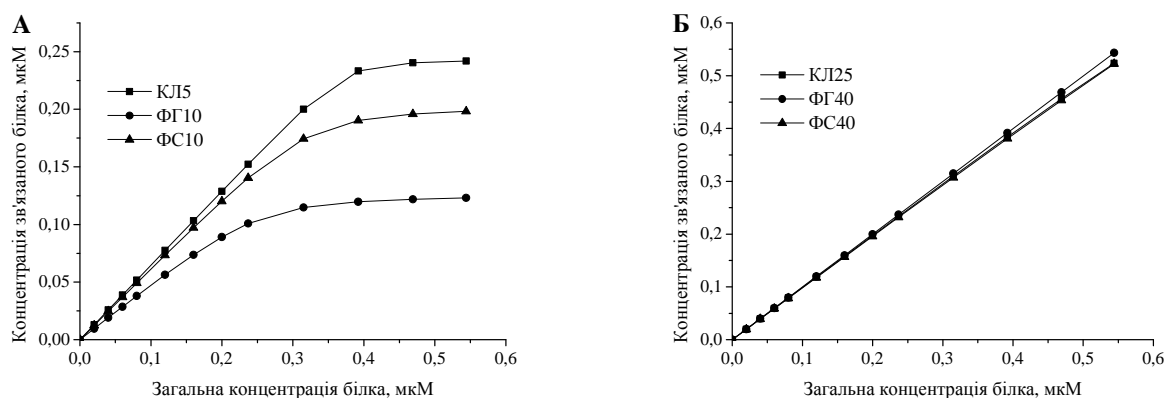


Рис. 4.19. Концентрація зв'язаного цитохрому  $c$  як функція загальної концентрації білка у

мембранах з низьким (А) та високим (Б) зарядом.

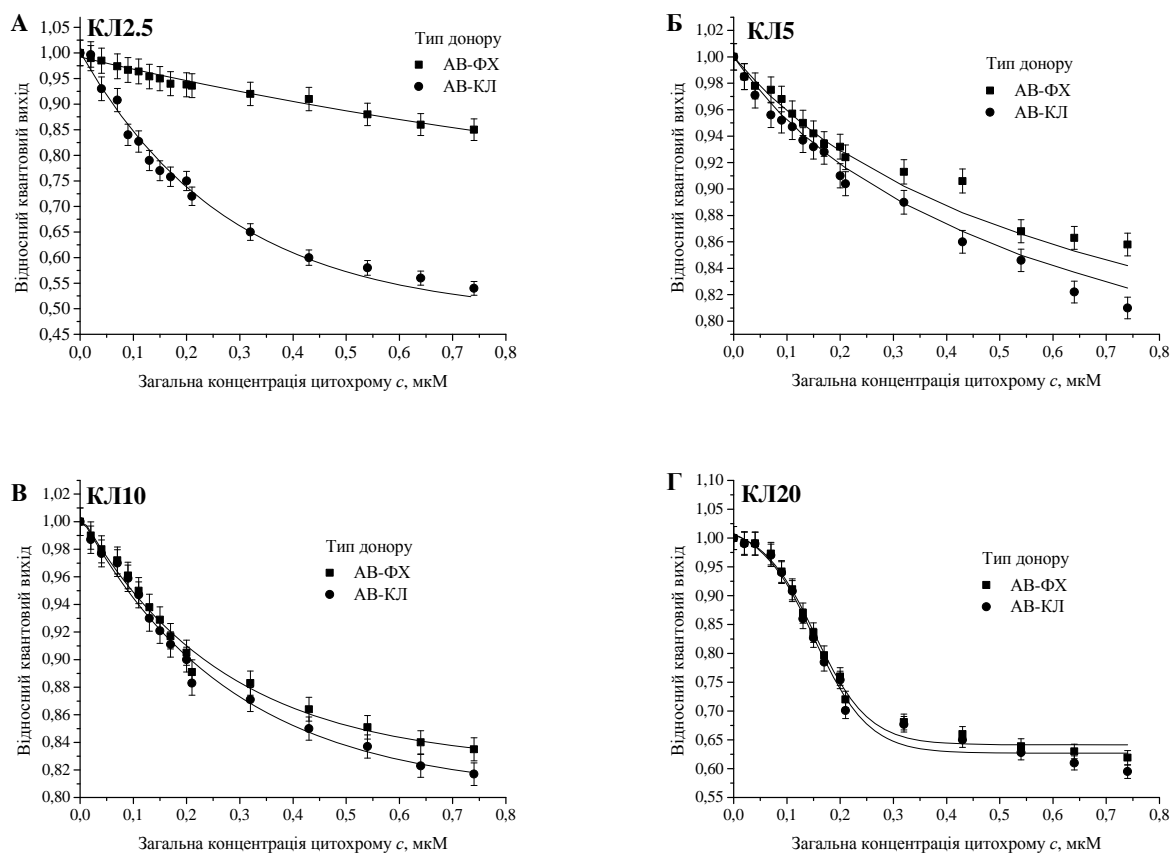


Рис. 4.20. Профілі переносу енергії з АВ-ФХ чи АВ-КЛ на гемову групу цитохрому с у різних ліпідних системах. Вимірювання проводились за умов низької іонної сили (20 мМ). Концентрація ліпиду була 20 мкМ.

У даному контексті варто відзначити, що експериментальні залежності  $Q_r(P)$  віддзеркалюють, по суті, поведінку кривих  $B_a(P)$ . Тому при низькому вмісті аніонних ліпідів, коли криві  $B_a(P)$  відрізняються одна від одної, профілі ІРПЕ залежать від хімічної природи полярної головки ліпідів. Натомість, високий вміст негативно заряджених ліпідів забезпечує практично повне зв'язування цитохрому с, що призводить до нерозрізненості кривих  $B_a(P)$  та, відповідно,  $Q_r(P)$ . Отримані результати дозволяють поставити запитання – які молекулярні механізми обумовлюють специфічність цитохрому с до КЛ? Для відповіді на це запитання, подальша експериментальна стратегія базувалась на отриманні



багатовимірних масивів даних шляхом вимірювання відносного квантового виходу донору (АВ-ФХ чи АВ-КЛ) як функції концентрації акцептору при варіюванні наступних експериментальних параметрів: а) вміст КЛ – 2.5, 5, 10 та 20 мол%, б) концентрація ліпиду (L) – 20 та 50 мкМ, в) іонна сила (I) – 20, 40 та 60 мМ. Зважаючи на те, що вимірювання ІРПЕ проводилися у чотирьох видах ліпосом (КЛ2.5, КЛ5, КЛ10 та КЛ20) з використанням двох донорів, загальна кількість отриманих кривих складала близько 100, тому у подальшому будуть наведені тільки репрезентативні графіки.

#### *А. Особливості профілів ІРПЕ в залежності від складу ліпосом та типу донору*

На рис. 4.20 представлено криві ІРПЕ, які були отримані для різних донорів (АВ-ФХ чи АВ-КЛ) при варіюванні молярної фракції КЛ. Слід відмітити наступні характерні риси профілів переносу енергії:

- *відсутність чіткої залежності ІРПЕ від вмісту КЛ*, що свідчить про стабілізацію комплексів цитохрому *c* з ліпідами не тільки електростатичними, але й гідрофобними взаємодіями;
- *значне посилення переносу енергії з аніонного донору АВ-КЛ у порівнянні з цвіттеріонним АВ-ФХ у КЛ2.5 модельних мембранах* (рис. 4.20, А), найбільш імовірним поясненням якого є акумуляція аніонних ліпідів навколо зв'язаного білка;
- *інвертована S-форма кривих ІРПЕ у КЛ20 системах для обох донорів АВ-ФХ та АВ-КЛ*, яка не може бути пояснена латеральною сегрегацією ліпідів та, напевне, є наслідком зміни локалізації цитохрому *c* у ліпідному бішарі. Відповідно, зважаючи на те, що приріст концентрації акцептора у початкових точках титрування був відносно малий ( $\sim 0.02$  мкМ), сигмоїдність експериментальних кривих є, згодом, результатом суперпозиції двох кривих з різними рівнями насичення, що відповідають двом популяціям молекул мембранозв'язаного білка, які локалізуються на поверхні бішару (рівень насичення досягається на третій точці титрування) та вбудовуються в мембрану (рівень насичення співпадає з рівнем насичення всієї кривої). Крім того, сигмоїдні криві характеризуються

початковою лаг-фазою (концентрація білка  $\leq 0.1$  мкМ), що, можливо, відображає акумуляцію білка на поверхні розділу ліпід/вода до певної критичної поверхневої концентрації, достатньої для того, щоб подолати енергетичний бар'єр для проникнення білка у мембрану. Примітно, що сигмоїдна залежність ефективності ІРПЕ від концентрації акцептора була отримана також Бакалумом та Раду при дослідженні переносу енергії з триптофанових залишків поріну із зовнішньої мембрани бактерій на діфенілгексатрієн, на основі чого були зроблені висновки про проникнення донора у ліпідний бішар [355].

#### *Б. Вплив концентрації ліпиду на поведінку кривих ІРПЕ*

На наступному етапі досліджень було поставлено запитання – чи впливає ступінь покриття мембрани білком на хід кривих ІРПЕ? Аналіз даних, наведених на рис. 4.21, показав, що:

- зниження концентрації ліпиду супроводжується значним посиленням переносу енергії, що може бути пояснене збільшенням поверхневої концентрації акцептору при зниженні концентрації ліпиду,
- лаг-фаза сигмоїдних кривих ІРПЕ у КЛ20 мембранах залежить від  $L$  (рис. 4.21, Б). Наприклад, при  $L = 20$  мкМ початкове плато кривих закінчується при  $P \sim 0.1$  мкМ, тоді як для  $L = 50$  мкМ це відбувається при  $\sim 0.15$  мкМ. Здогадно, цей ефект зумовлений різними типами взаємодій цитохрому  $c$  з ліпідним бішаром, які залежать від поверхневого покриття мембрани білком, тобто від молярного співвідношення ліпід:білок ( $L:P$ ). Оеллеріхом та ін. була висловлена гіпотеза, згідно з якою при високих значеннях  $L:P$ , коли ліпід у надлишку, багато центрів зв'язування доступно для білка, та електростатичні білок-ліпідні взаємодії превалюють [270]. Зниження співвідношення  $L:P$  збільшує поверхневе покриття бішару та послаблює електростатичні взаємодії завдяки нейтралізації зарядів як білка, так і мембрани внаслідок формування білок-ліпідних контактів. Як результат, вбудовування у гідрофобну область бішару починає конкурувати з периферичним, електростатично-контрольованим зв'язуванням білка. Якщо

припустити, що закінчення лаг-фази приблизно відповідає початку вбудовування цитохрому  $c$  в бішар, залежність крутизни кривих, представлених на рис. 4.21, Б, від концентрації ліпиду може означати, що при  $L = 50$  мкМ концентрація цитохрому  $c$  0.1 мкМ недостатня для проникнення білка у бішар. Аналогічний механізм може пояснити трансформацію залежностей  $Q_r(P)$  з гіперболічної до сигмоїдної форми при зростанні молярної фракції КЛ (рис. 4.20). У однаковому діапазоні концентрацій білка (від 0 до 0.1 мкМ) у КЛ20 мембранах, де конкуренція між електростатичними та гідрофобними білок-ліпідними взаємодіями сильніша, порівняно із КЛ2.5 везикулами, процес вбудовування цитохрому  $c$  у бішар повільніший та призводить до появи лаг-фази на кривих ІРПЕ.

#### *В. ІРПЕ між АВ-ліпідами та цитохромом $c$ при різних іонних силах*

На рис. 4.22 наведені профілі ІРПЕ у КЛ10 системах в залежності від іонної сили середовища ( $I$ ). Як видно з рисунку, підвищення іонної сили призвело до аномальної поведінки кривих переносу енергії, коли замість АВ-ФХ ліпідний бішар був допований АВ-КЛ.

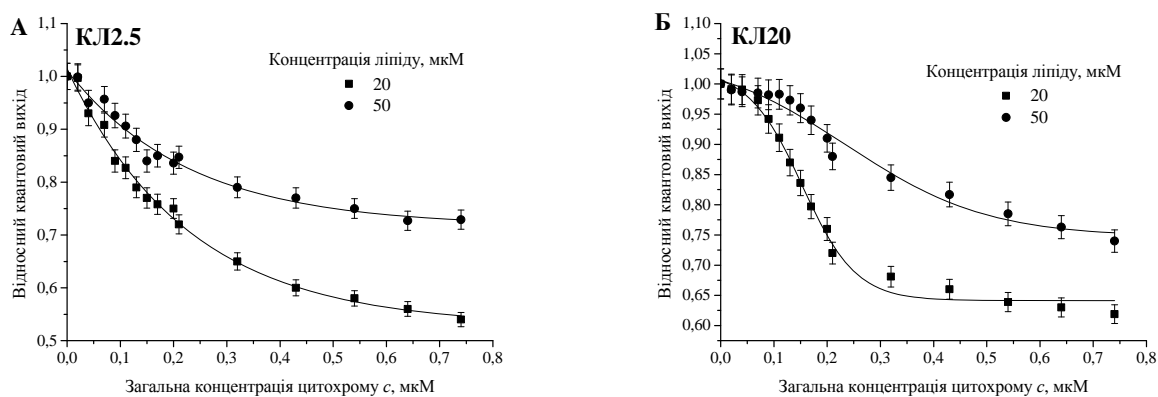


Рис. 4.21. Вплив концентрації ліпиду на перенос енергії у КЛ<sub>АВ-КЛ</sub>-вміщуючих модельних мембранах. Іонна сила складала 20 мМ.

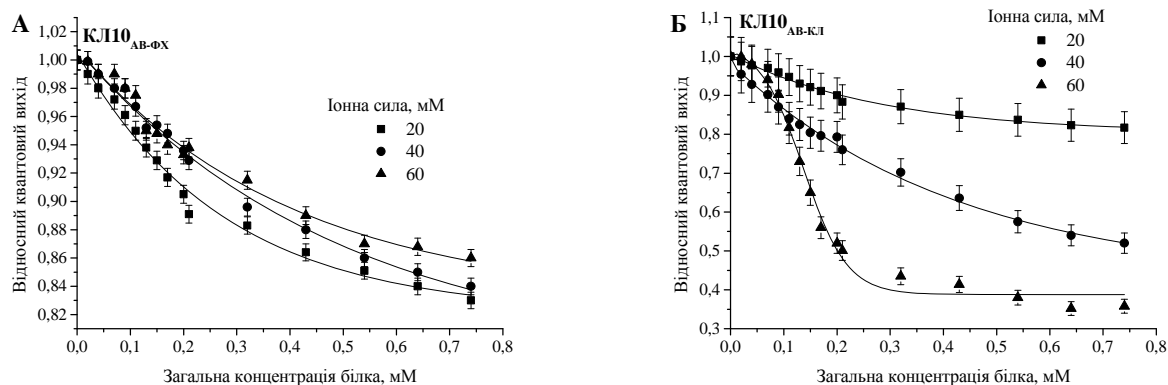


Рис. 4.22. Концентраційні залежності гасіння флуоресценції АВ-ФХ чи АВ-КЛ цитохромом  $c$  у ФХ/КЛ ліпосомах при варіюванні іонної сили. Концентрація ліпиду була 20 мкМ.

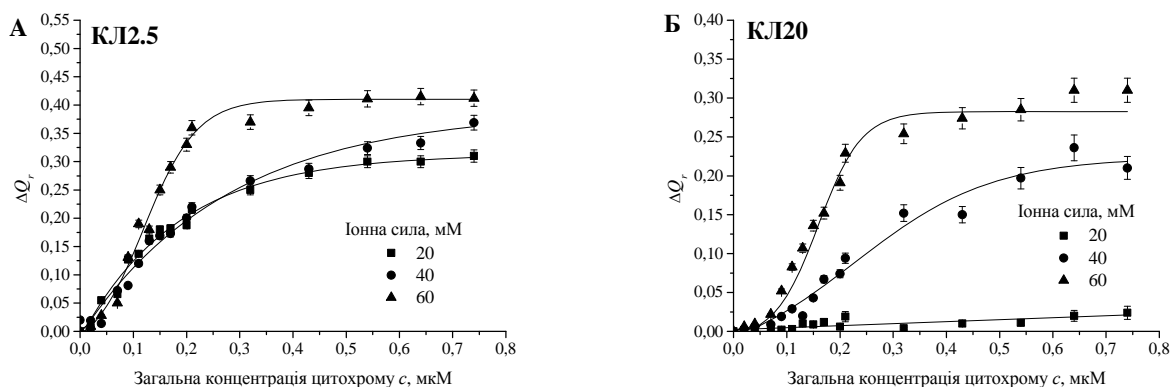


Рис. 4.23. Різниця між відносним квантовим виходом АВ-ФХ та АВ-КЛ як функція загальної концентрації білка. Концентрація ліпиду була 20 мкМ.

Концептуально, зростання концентрації моновалентних іонів має зменшувати силу електростатичних білок-ліпідних взаємодій та призводити до загального послаблення переносу енергії. Ця тенденція спостерігалась для ліпосом, що містили АВ-ФХ (рис. 4.22, А). Однак, коли донором енергії виступав АВ-КЛ, було виявлено неочікуване посилення переносу енергії зі збільшенням іонної сили (рис. 4.22, Б). Як наслідок, різниця між відносним квантовим виходом АВ-ФХ та АВ-КЛ ( $\Delta Q_r$ ) зростала із іонною силою, причому цей ефект був більш вираженим для слабозаряджених КЛ2.5 мембран (рис. 4.23). Після короткого викладення отриманих результатів, перейдемо до кількісного аналізу даних. Як проілюстровано на рис. 4.23, перенос енергії з аніонного донору був більш

виражений, ніж з цвіттеріонного, окрім КЛ5, КЛ10 та КЛ20 систем при  $I=20$  мМ, коли криві ІРПЕ, отримані для АВ-ФХ чи АВ-КЛ майже не відрізнялись. Серед можливих причин цього ефекту найбільш ймовірною здається локальний перерозподіл ліпідів при сорбції цитохрому *c* на поверхні протилежно заряджених мембран – молекули КЛ рухаються до місця зв'язування білка для того, щоб мінімізувати електростатичну компоненту енергії зв'язування. Це явище добре узгоджується з результатами роботи Мея та співавторів, які показали, що сегрегація аніонних ліпідів є найбільш ефективною для слабозарядженої мембрани та високозарядженого білка [280]. Для кількісного урахування цього явища був застосований метод Монте Карло. Процедура аналізу включала три основні етапи: 1) визначення структурних параметрів (відстань гемової групи від центру бішару,  $d$ ) та параметрів зв'язування (константи асоціації  $K_1^0$  та  $K_2^0$ , стехіометрія  $n$ ) у рамках моделі адсорбції масштабованих частинок та двомірної моделі ІРПЕ (підрозділ 2.7.9, Додаток А); 2) розрахунок концентрації зв'язаного білка,  $B_a$ ; 3) визначення розміру домену, збагаченого аніонними ліпідами, з використанням алгоритму Монте Карло. При оптимізації експериментальних даних у рамках комбінованої моделі адсорбції та ІРПЕ найкращу відповідність між теорією та експериментом було досягнуто при значеннях параметрів, представлених у табл. 4.13. Можна бачити, що а) константи зв'язування зменшуються зі зростанням молярної фракції КЛ; б)  $K_1^0$  збільшується зі зростанням іонної сили, тоді як для  $K_2^0$  характерна протилежна поведінка.

Таблиця 4.13

Кількісні параметри комплексоутворення цитохрому *c* з ФХ/КЛ ліпідними везикулами

Система		$K_1^0, \mu\text{M}^{-1}$	$K_2^0, \mu\text{M}^{-1}$	$d_1, \text{nm}$	$d_2, \text{nm}$
КЛ2.5	$I=20$ мМ	$120^{\pm 32}$	$900^{\pm 262}$	$3.5^{\pm 0.97}$	$3.2^{\pm 0.91}$
	$I=40$ мМ	$500^{\pm 145}$	$820^{\pm 234}$	$3.0^{\pm 0.89}$	$2.9^{\pm 0.82}$
	$I=60$ мМ	$2000^{\pm 564}$	$740^{\pm 212}$	$2.9^{\pm 0.91}$	$2.7^{\pm 0.75}$
КЛ5	$I=20$ мМ	$14^{\pm 3.1}$	$50^{\pm 12}$	$4.1^{\pm 0.94}$	$3.9^{\pm 0.82}$

	I=40 mM	$50^{\pm 10.5}$	$39^{\pm 15.2}$	$3.3^{\pm 0.66}$	$3.0^{\pm 0.6}$
	I=60 mM	$200^{\pm 48}$	$27^{\pm 12}$	$3.0^{\pm 0.72}$	$2.7^{\pm 0.65}$
КЛ10	I=20 mM	$10^{\pm 2.6}$	$10^{\pm 2.6}$	$4.1^{\pm 1.1}$	$3.9^{\pm 1}$
	I=40 mM	$30^{\pm 7.4}$	$8.2^{\pm 2.2}$	$3.5^{\pm 0.77}$	$3.1^{\pm 0.68}$
	I=60 mM	$50^{\pm 10.5}$	$7^{\pm 2.1}$	$3.0^{\pm 0.63}$	$2.8^{\pm 0.59}$
КЛ20	I=20 mM	$10^{\pm 2.7}$	$9^{\pm 2.7}$	$4.1^{\pm 1.1}$	$3.9^{\pm 1.05}$
	I=40 mM	$30^{\pm 7.2}$	$7.1^{\pm 2.4}$	$3.8^{\pm 0.9}$	$3.6^{\pm 0.8}$
	I=60 mM	$30^{\pm 8.4}$	$5.8^{\pm 2.8}$	$3.5^{\pm 0.9}$	$3.1^{\pm 0.8}$

$K_1^0, d_1$  відносяться до депротонowanego КЛ,  $K_2^0, d_2$  – до частково протонowanego КЛ

При інтерпретації отриманих результатів важливо підкреслити, що адсорбція периферичних білків на мембрані – це складний процес, який включає ряд взаємозалежних подій. Утворення електростатичних та гідрофобних білок-ліпідних контактів, а також водневих зв'язків супроводжується конформаційними переходами білкової молекули та структурною реорганізацією ліпідного бішару. Більш того, модифікація електростатичних характеристик мембрани варіюванням вмісту КЛ або іонної сили також може впливати на структурні властивості ліпідного бішару (щільність пакування ліпідних молекул, вільний об'єм, параметр порядку ацильних ланцюгів, тощо). Усі ці явища, разом із іншими важливими чинниками, такими як стеричні фактори, гідрофобна невідповідність, поверхнева комплементарність, глибина вбудовування білка в бішар, можуть лежати в основі спостережуваного немонотонного характеру залежності  $K^0$  від типу ліпосом та експериментальних умов.

Отримані значення констант асоціації були далі використані для оцінки концентрації зв'язаного білка та числа донорів і акцепторів, необхідного для імплементації алгоритму Монте Карло. При реалізації цього алгоритму, позиції донорів та акцепторів генерувались випадковим чином у квадратному боксі з використанням періодичних граничних умов для запобігання крайовим ефектам.

Відносний квантовий вихід, усереднений по усім донорам, був розрахований на основі координат флуорофору наступним чином:

$$Q_r = \frac{1}{N_D} \sum_{j=1}^{N_D} \left[ 1 + \sum_{i=1}^{N_{AC}} \left( \frac{R_o^r \kappa^2(r_{ij})}{r_{ij}} \right)^6 \right]^{-1} \quad (4.22)$$

де  $N_D$  та  $N_{AC}$  – число донорів та акцепторів, відповідно,  $r_{ij}$  – відстань між  $j$ -им донором та  $i$ -им акцептором. Процедуру моделювання повторювали щонайменше для 1000 конфігурацій донорів та акцепторів, доки стандартне відхилення у  $Q_r$  не складало  $<2\%$ . При верифікації розробленого алгоритму шляхом порівняння з моделлю ІРПЕ Фанга та Страєра [227], було отримано добре узгодження між результатами аналітичного та чисельного моделювання [29].

При аналізі процесу утворення ліпідних доменів, індукованих білком, припускали, що загальне число дископодібних доменів ( $N_{dm}$ ) дорівнює числу молекул зв'язаного цитохрому  $c$ , тобто  $N_{dm} = B_a N_A$ , де  $N_A$  – число Авогадро. Загальна кількість молекул ліпиду та число молекул КЛ ( $N_{KL}^{dm}$ ) чи ФХ ( $N_{\Phi X}^{dm}$ ) у домені можуть бути знайдені з наступних рівнянь:

$$N_L^{dm} = N_{KL}^{dm} + N_{\Phi X}^{dm} = \frac{B_a N_A \pi r_{dm}^2}{S_L}; \quad N_{KL}^{dm} = f_{KL} k N_L^{dm}; \quad N_{\Phi X}^{dm} = (1 - f_{\Phi X} k) N_L^{dm} \quad (4.23)$$

де  $k$  – відношення концентрацій КЛ при не випадковому (при наявності латеральної сегрегації) та випадковому розподілі заряджених ліпідів. Для молярної фракції донорів (АВ-ФХ чи АВ-КЛ)  $f_D$ , загальне число молекул АВ-ФХ чи АВ-КЛ у зовнішньому моношарі може бути виражене як:

$$N_{AB-\Phi X}^{tot} = N_{AB-KL}^{tot} = L_{out} f_D N_A \quad (4.24)$$

Припускаючи, що фракція КЛ ( $f_{KL}^{dm}$ ) чи ФХ ( $f_{\Phi X}^{dm}$ ) у домені дорівнює

$$f_{KL}^{dm} = \frac{B_a N_A f_{KL} k \pi r_{dm}^2}{L_{out} N_A f_{KL} S_L} = \frac{B_a k \pi r_{dm}^2}{L_{out} S_L}; \quad f_{\Phi X}^{dm} = \frac{B_a \pi r_{dm}^2 (1 - f_{\Phi X} k)}{L_{out} S_L (1 - f_{\Phi X} k)} \quad (4.25)$$

вирази для числа молекул АВ-КЛ у доменній ( $N_{KL}^{dm}$ ) та недоменній ( $N_{KL}^{ndm}$ ) областях мають вигляд:

$$N_{AB-KЛ}^{dm} = N_{AB-KЛ}^{tot} f_{КЛ}^{dm} = \frac{B_a k \pi r_{dm}^2 N_A f_D}{S_L}; \quad N_{AB-KЛ}^{ndm} = L_{out} N_A f_D - N_{AB-KЛ}^{dm} \quad (4.26)$$

Поверхнева густина АВ-КЛ у доменній ( $\delta_{КЛ}^{dm}$ ) та недоменній ( $\delta_{КЛ}^{ndm}$ ) ділянках дорівнює:

$$\delta_{AB-KЛ}^{dm} = \frac{N_{AB-KЛ}^{dm}}{B_a N_A \pi r_{dm}^2} = \frac{f_D k}{S_L} \quad (4.27)$$

$$\delta_{AB-KЛ}^{ndm} = \frac{N_{AB-KЛ}^{ndm}}{L_{out} S_L N_A - B_a N_A \pi r_{dm}^2} = \frac{f_D (L_{out} S_L - k B_a \pi r_{dm}^2)}{S_L (L_{out} S_L - B_a \pi r_{dm}^2)}$$

Аналогічно, для АВ-ФХ отримуємо:

$$N_{AB-ФХ}^{dm} = N_{AB-ФХ}^{tot} f_{PC}^{dm} = \frac{B_a \pi r_{dm}^2 N_A f_D (1 - f_{CL} k)}{S_L (1 - f_{CL})}; \quad N_{AB-ФХ}^{ndm} = L_{out} N_A f_D - N_{AB-ФХ}^{dm} \quad (4.28)$$

$$\delta_{AB-ФХ}^{dm} = \frac{N_{AB-ФХ}^{dm}}{B_a N_A \pi r_{dm}^2} = \frac{f_D (1 - f_{КЛ} k)}{S_L (1 - f_{КЛ})} \quad (4.29)$$

$$\delta_{AB-ФХ}^{ndm} = \frac{f_D}{S_L (1 - f_{КЛ})} \left( 1 - \frac{f_{КЛ} (L_{out} S_L - k B_a \pi r_{dm}^2)}{L_{out} S_L - B_a \pi r_{dm}^2} \right)$$

Примітно, що для систем, що містили КЛ<sub>АВ-ФХ</sub>, число донорів у доменах  $N_{ФХ}^{dm}$  мало ненульове значення ( $N_{ФХ}^{dm} = 1$ ) тільки при найвищих поверхневих густинах цитохрому  $c$ , що призвело до нечутливості профілів ІРПЕ до зміни радіусу домену ( $r_{dm}$ ) та ступеня сегрегації КЛ у зоні сорбції білка ( $k$ ). Тому дані по переносу енергії, отримані для КЛ<sub>АВ-ФХ</sub> ліпосом, були спочатку проаналізовані у рамках алгоритму Монте Карло при оптимізації тільки двох параметрів –  $d_1$  та  $d_2$ .



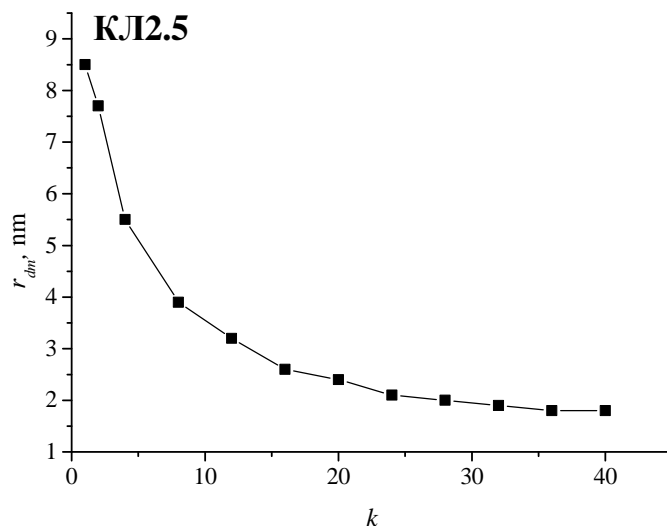


Рис. 4.24. Залежність радіусу домену від ступеня зростання молярної фракції КЛ у зоні білок-ліпідної взаємодії ( $k$ ), отримана методом Монте Карло для КЛ2.5/I20 везикул

Далі, знайдені значення  $d_1$  та  $d_2$  були зафіксовані, та набір параметрів ( $r_{dm}, k$ ), що забезпечують найкращу відповідність між теоретично передбаченими та експериментальними даними був визначений на основі аналізу даних КЛ<sub>AB</sub>-КЛ. Необхідно відмітити, що базовий алгоритм Монте Карло виявився придатним лише для аналізу даних ІРПЕ, отриманих при низькій іонній силі ( $\delta$ , відносна різниця між експериментальними та теоретичними значеннями  $Q_r$ , не перевищувала 2%). Апроксимація кривих ІРПЕ для КЛ2.5 мембран при  $I = 20$  мМ показала, що радіус КЛ-збагаченої області не перевищує 8.5 нм при варіюванні  $k$  від 1 до 40 (рис. 4.24). На противагу цьому, при спробі проаналізувати результати вимірювань ІРПЕ при іонних силах 40 та 60 мМ базовим алгоритмом Монте Карло не вдалося досягти задовільної точності підгонки ( $\delta > 15\%$ ). Це означає, що утворення регулярних доменів не є фінальною стадією взаємодії цитохрому  $c$  з усіма типами мембран при іонних силах 40 та 60 мМ. Тому було запропоновано декілька гіпотез щодо можливих факторів, відповідальних за спостережуване посилення переносу енергії при підвищенні концентрації моновалентних іонів.

### Гіпотеза І. Недосконалість теоретичних моделей

Кількісний аналіз даних ІРПЕ базується на знаходженні концентрації зв'язаного білка ( $B_a$ ) на основі комбінування моделі адсорбції з моделлю ІРПЕ. Виникає питання, у якій мірі недосконалість моделей, зумовлена ігноруванням таких факторів, як вбудовування цитохрому  $c$  у ліпідний бішар, конформаційні перебудови білка, нерівномірний розподіл заряду на поверхні білкової глобули, тощо, може впливати на результати аналізу даних. Для відповіді на це запитання, були промодельовані дві ситуації – повне зв'язування білка,  $B_a = P$  (випадок I на рис. 4.25) та локалізація білка у центрі бішару, тобто  $d_1 = 0$  та  $d_2 = 0$  (випадок II на рис. 4.25). Були розглянуті лише ці два випадки, тому що з математичної точки зору зростання  $B_a$  та зниження  $d$  викликають зменшення  $Q_r$ . Однак, як показано на рис. 4.25, теоретичні криві, розраховані за допомогою алгоритму Монте Карло для цих двох випадків лежать вище експериментальної кривої, що говорить про те, що недооцінка  $B_a$  чи переоцінка  $d$  не можуть задовільно пояснити розбіжність між теоретичними та експериментальними даними. Додатковим аргументом на користь цього твердження є той факт, що моделювання адсорбційної поведінки цитохрому  $c$  у рамках моделей адсорбції масштабованих частинок та ІРПЕ показало, що при  $B_a = P$   $d_1$  та  $d_2$  набувають нереалістичного значення 10 нм, тоді як максимально допустиме значення  $d$  для наших систем складає  $\sim 4.5$  нм.

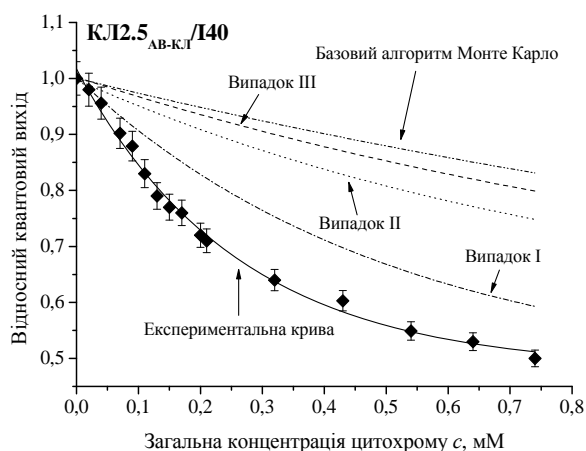


Рис. 4.25. Моделювання квантового виходу АВ-КЛ методом Монте Карло для випадків базової моделі ліпідної сегрегації (---) або з урахуванням повного зв'язування білка (—), локалізації цитохрому  $c$  у центрі бішару (— · —) чи агрегації мембранозв'язаного білка (—).

Отже, на основі вищевикладеного можна зробити висновок, що розбіжність між теоретичними та експериментальними кривими не є наслідком недосконалості процедури мінімізації.

## Гіпотеза II. Агрегація мембранозв'язаного цитохрому *c*

Велика кількість досліджень свідчить про те, що асоціація цитохрому *c* з негативно зарядженими мембранами, біля поверхні значення рН знижене внаслідок акумуляції протонів, ініціює конформаційні перебудови білка, які включають часткове розгортання білкової глобули [297,356]. Ліпідний бішар може знижувати активаційний бар'єр для денатурації білка шляхом посилення відштовхування між зарядами на поверхні білка, що призводить до більш відкритої конформації поліпептидного ланцюга з експонованими агрегаційними ділянками. Згідно з нашими розрахунками, примембранне значення рН нижче, ніж рН розчину на 0.6, 0.9, 1.3 та 1.8 одиниць для КЛ2.5, КЛ5, КЛ10 та КЛ20 везикул, відповідно. Більш того, теоретичний аналіз, проведений Геймбургом та Маршем, підкріплений даними ЕПР вимірювань, показав, що при іонній силі розчину більше 40 мМ мономери білка, денатуровані на поверхні, проявляють посилену тенденцію до агрегації [357].

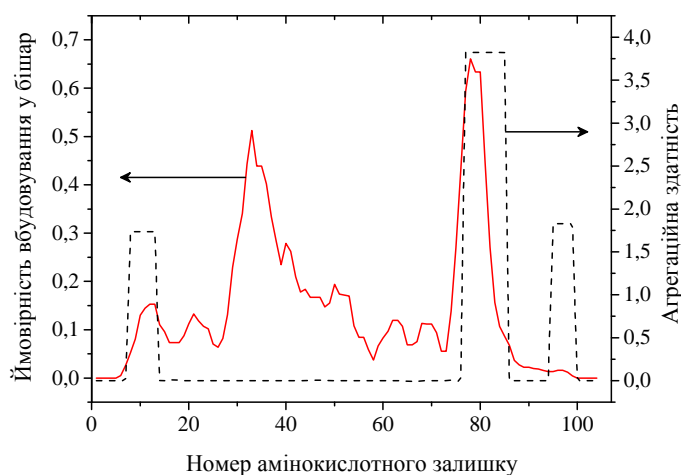


Рис. 4.26. Кореляція між агрегаційним потенціалом цитохрому *c* та його здатністю проникати у ліпідний бішар

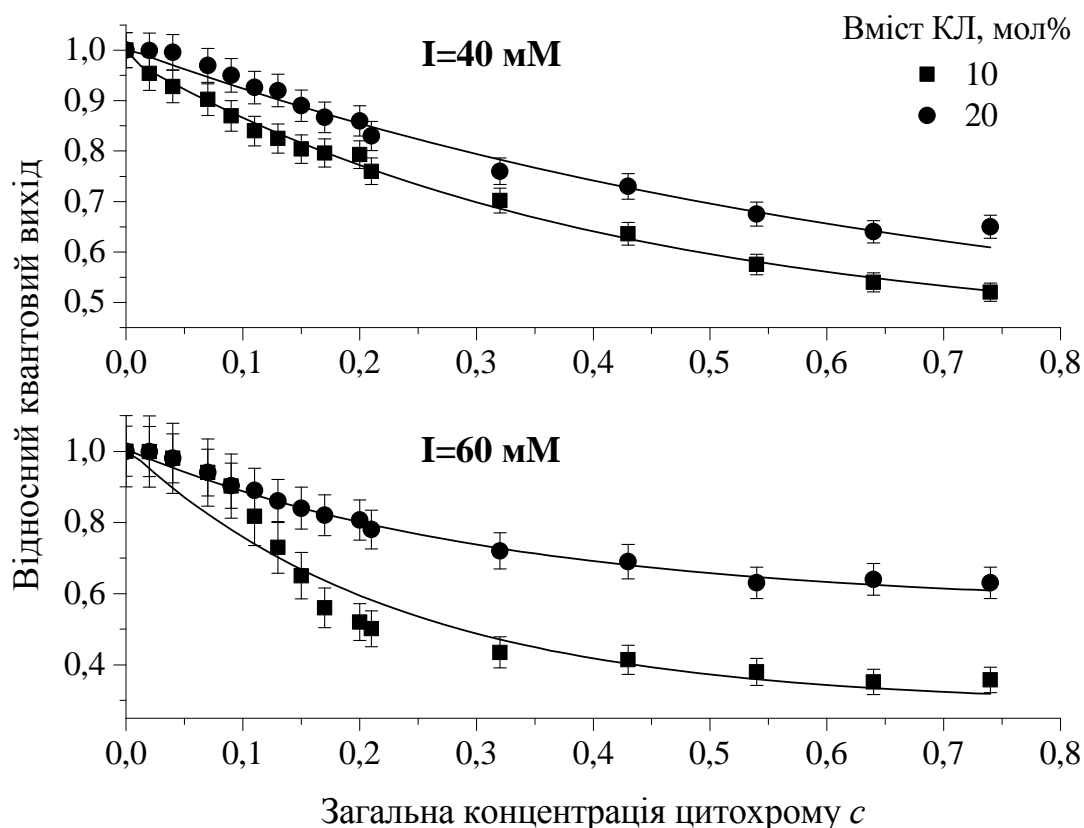


Рис. 4.27. Відносний квантовий вихід АВ-КЛ у КЛ10 чи КЛ20 везикулах як функція загальної концентрації цитохрому *c* при іонних силах 40 та 60 мМ. Теоретичні криві були отримані у рамках алгоритму Монте Карло з урахуванням сегрегації ліпідів та витягнутої конформації КЛ.

Аналіз структури цитохрому *c* за допомогою онлайн-серверу AGGRESCAN [358], який передбачає сегменти білка з підвищеною здатністю до самоасоціації, дозволив ідентифікувати три агрегаційні області в молекулі білка: Lys<sub>7</sub> – Cys<sub>14</sub>, Pro<sub>76</sub> – Lys<sub>86</sub> та Leu<sub>94</sub> – Lys<sub>100</sub>, причому сегмент Pro<sub>76</sub> – Lys<sub>86</sub> характеризується найвищим агрегаційним потенціалом (рис. 4.26). Паралельно із цим, дослідження структури цитохрому *c* за допомогою сервера MemBrain, розробленого для визначення ділянок білка, які можуть вбудовуватись в ліпідний бішар, виявило два сегмента цитохрому *c*, яким притаманна здатність до проникнення у мембрану: His<sub>26</sub> – Tyr<sub>48</sub> та Lys<sub>73</sub> – Lys<sub>86</sub> (рис. 4.26). Ці результати свідчать на користь того, що фрагмент Lys<sub>73</sub> – Lys<sub>86</sub> відповідає одночасно і за агрегацію білка, і за його вбудовування у ліпідний бішар. Більш того, частина цього фрагменту,

разом із сегментом His<sub>26</sub> – Tyr<sub>48</sub> входять до складу простетичної групи білка. Іншими словами, можна зробити висновок, що гем цитохрому *c*, який виступає акцептором енергії в експериментах ІРПЕ, може приймати участь в самоасоціації білка та його транслокації у бішар. Ці процеси можуть впливати на поведінку кривих ІРПЕ та призводити до їх відхилення від профілів переносу енергії, які відповідають випадковому розподілу акцепторів. Відповідно, якщо припустити, що ліпідні домени утворюються навколо олігомерів білка, адсорбованих чи частково вбудованих у бішар, загальна кількість доменів може бути визначена як  $N_{dm} = B_a N_A / z_p$ , де  $z_p$  – це ступінь олігомеризації білка. Однак, як можна бачити з рис. 4.25 (випадок 3), це припущення не призвело до суттєвого покращення підгонки даних, тому дана гіпотеза була також виключена із розгляду.

### Гіпотеза III. Перехід КЛ у витягнуту конформацію

На протязі останнього десятиріччя молекулярні деталі взаємодії цитохрому *c* з ліпідними мембранами знаходяться у фокусі інтенсивних теоретичних та експериментальних досліджень [32,34,165,177,297]. Незважаючи на деякі розбіжності, була сформульована єдина гіпотеза, яка постулює існування двох сайтів зв'язування цитохрому *c* з молекулами КЛ, так званих А- та С-сайтів. Припускається, що асоціація білка з А-сайтом відбувається за рахунок електростатичних взаємодій з депротонованими молекулами КЛ, тоді як при адсорбції на С-сайті цитохром *c* утворює водневі зв'язки з протонованими фосфатними групами ліпиду, поряд із електростатичними контактами з депротонованими фосфатами білка [359]. Специфічні структурні особливості кардіоліпіну, паралельно із існуванням гідрофобної щілини в молекулі цитохрому *c* дозволили ряду авторів висунути ідею щодо так званої витягнутої конформації ліпиду, в якій гідрофобні хвости КЛ спрямовані у різні напрямки відносно полярної голівки та утворюють кут 180° [360]. У цій орієнтації один ацильний ланцюг ліпиду залишається у площині бішару, тоді як інший витягується у протилежний бік та розташовується у гідрофобному каналі білка біля гемової групи. Ця трансформація специфічна для КЛ та диктується тенденцією ліпиду

мінімізувати енергію вигину, створену внаслідок негативної кривизни КЛ-вміщуючих мембран.

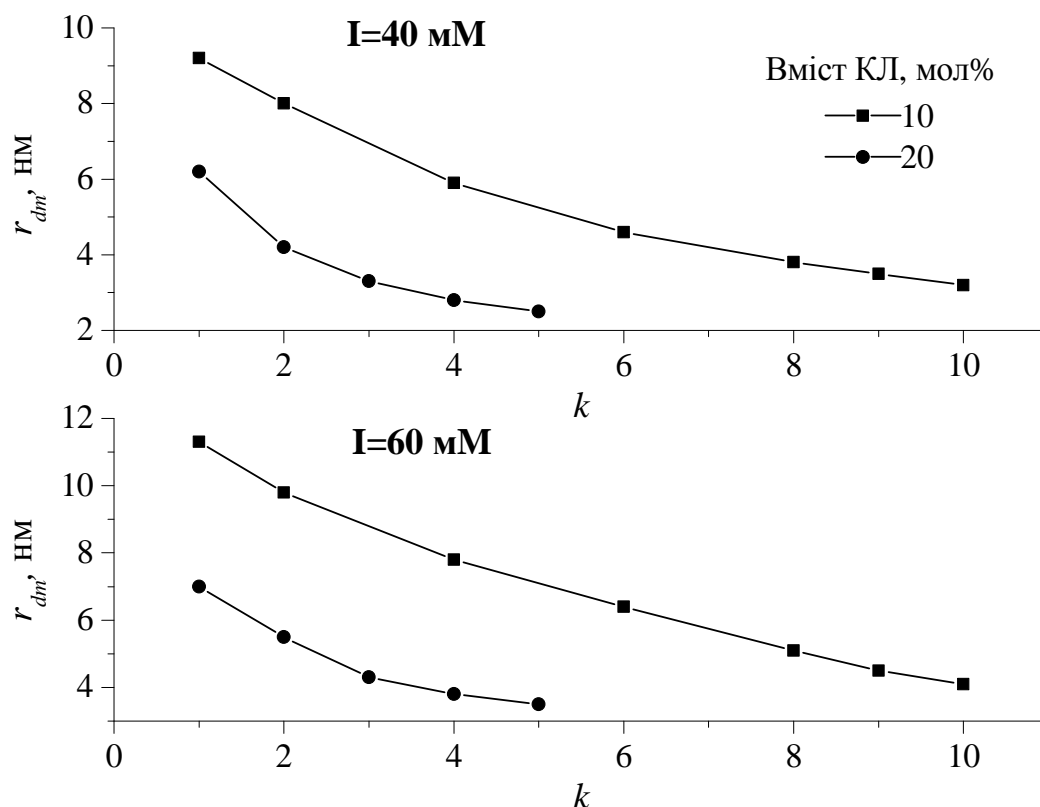


Рис. 4.28. Структурні параметри ліпідних доменів для КЛ10 та КЛ20 мембран при іонній силі 40 мМ (верхня панель) та 60 мМ (нижня панель), розраховані у рамках алгоритму Монте Карло у припущенні деміксінгу ліпідів та витягнутої конформації КЛ.

Витягнута конформація стабілізується електростатичними взаємодіями між позитивно зарядженими амінокислотними залишками (Lys<sub>72</sub>, Lys<sub>73</sub> та Lys<sub>86</sub>) та депротонованим КЛ у випадку білок-ліпідного зв'язування через А-сайт та водневими зв'язками у випадку С-сайта. Якщо припустити, що кардіоліпін переходить у витягнуту конформацію та ацильний ланцюг, до якого ковалентно приєднаний АВ-флуорофор вивертається у гідрофобне ядро цитохрому *c*, то можна очікувати посилення переносу енергії внаслідок зближення донору та акцептору. Насправді, включення цього ефекту в алгоритм Монте Карло шляхом варіювання *z*-координати донору та введення додаткового параметру  $D_{CE}$ , який характеризує відстань між центром бішару та площиною донорів у витягнутій конформації, призвело до задовільної підгонки експериментальних даних для

КЛ10 та КЛ20 ліпосом (рис. 4.27). Апроксимація експериментальних даних з використанням комбінованого алгоритму Монте Карло, який враховує утворення ліпідних доменів та перехід КЛ у витягнуту конформацію, показала, що радіус КЛ-збагачених ділянок коливається у межах 3.2 – 9.2 (КЛ10<sub>AB-КЛ</sub>/I40), 2.5 – 6.2 (КЛ20<sub>AB-КЛ</sub>/I40), 4.1 – 11.3 (КЛ10<sub>AB-КЛ</sub>/I60) та 3.5 – 7 нм (КЛ20<sub>AB-КЛ</sub>/I60), в залежності від  $k$  (рис. 4.28).

У подальшому аналізі, доцільно ввести додаткові параметри, такі як: 1) глибина проникнення білка у бішар,  $D_p$ , 2) відстань між поверхнею мембрани та площиною донорів у витягнутій конформації,  $D_{SE}$ , 3) напівширина ліпідного бішару,  $D_m \approx 2.3$  нм. Глибина вбудовування ацильного ланцюга КЛ у гідрофобну щілину цитохрому  $c$ ,  $D_E$ , може бути розрахована як:

$$D_E = D_p + D_{SE} = D_p + D_{CE} + D_m \quad (4.30)$$

Далі, можна визначити граничні значення глибини проникнення білка в бішар, якщо розглянути дві можливі орієнтації мембранозв'язаного цитохрому  $c$  – орієнтації, при яких гемова група знаходиться вище або нижче центру білка. Тоді, максимальне та мінімальне значення  $D_p$  можуть бути виражені наступним чином:

$$D_p^{\min, \max} = D_m - d_{1,2} + R_p \mp r_t \quad (4.31)$$

де  $R_p \approx 2.1$  нм – ефективний радіус цитохрому  $c$  у мембранозв'язаному стані [361],  $r_t \approx 0.7$  нм – зміщення гемової групи відносно центру білкової молекули.

Даний вираз може набути більш визначеного вигляду, якщо звернутися до роботи Каланхі та Валласу [360], у якій було запропоновано механістичну модель утворення витягнутої конформації КЛ. Згідно з цією моделлю, іонні контакти між фосфатною групою ліпиду та Lys<sub>72</sub> і Lys<sub>73</sub> утримують КЛ в гідрофобному кармані цитохрому  $c$ , який утворюється двома неполярними кластерами білка (Tyr<sub>67</sub> – Pro<sub>71</sub> та Phe<sub>82</sub> – Ile<sub>85</sub>). Запропонована орієнтація цитохрому  $c$ , схематично представлена на рис. 4.29, припускає, що гемова група розташована вище центру білка, тому у рівнянні (4.31) необхідно розглядати верхнє граничне значення  $D_p$ .

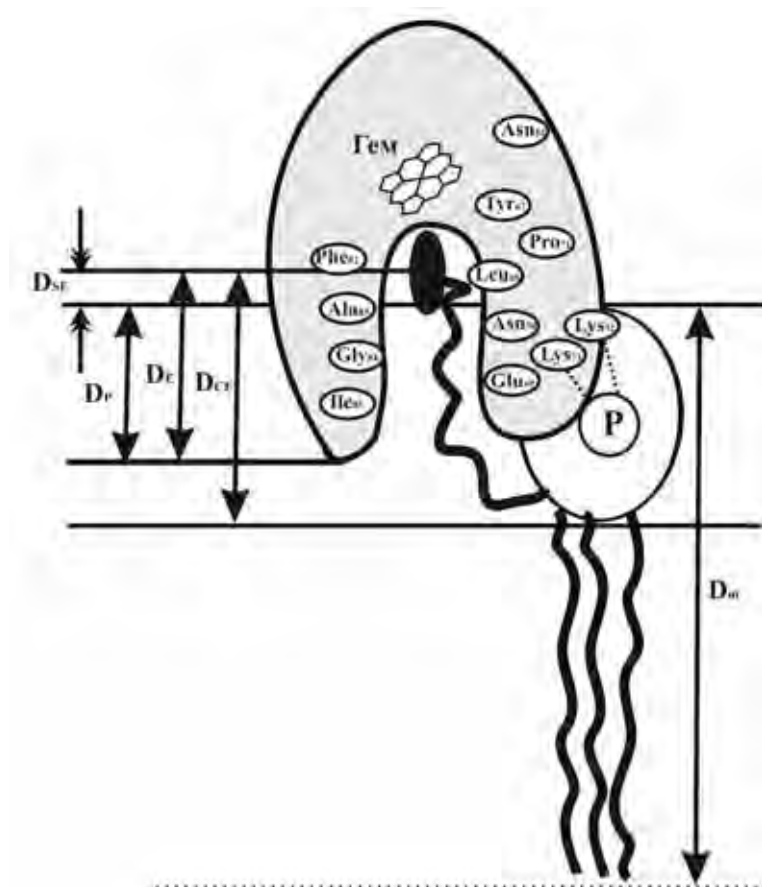


Рис. 4.29. Схематичне зображення витягнутої конформації КЛ. Виділені амінокислотні залишки утворюють гідрофобний карман цитохрому *c*. *P* – фосфатна група молекули КЛ. Чорний овал представляє собою АВ-флуорофор

Окрім цього, у описаній структурі білок-ліпідного комплексу Asn<sub>52</sub> знаходиться на відстані від фосфатної групи ліпиду більш ніж 1 нм. Беручи до уваги, що типова довжина водневого зв'язку ~0.2 нм, можна зробити висновок, що утворення водневих зв'язків між білком та протонованими молекулами КЛ малоймовірно, тому ліпід переходить у витягнуту конформацію лише тоді, коли білок-ліпідний комплекс утворюється через А-сайт. З огляду на вищесказане, рівняння (4.31) приймає вигляд:

$$D_P = D_m - d_1 + R_P - r_i \quad (4.32)$$

На основі рівняння (4.33) був отриманий набір структурних параметрів, які характеризують локалізацію цитохрому *c* відносно поверхні розділу ліпід/вода (табл. 4.14). Аналіз отриманих параметрів свідчить на користь того, що посилення ІРПЕ при зростанні іонної сили може бути результатом переходу КЛ у витягнуту конформацію. У даному контексті уявляється доцільним розглянути роботу Ханске та ін., в якій конформаційні властивості КЛ-зв'язаного цитохрому *c* були вивчені за допомогою чотирьох флуоресцентно-мічених варіантів білка [356].



Авторами було показано, що підвищення іонної сили не призводить до повного пригнічення взаємодії між цитохромом *c* та КЛ, а сприяє утворенню специфічних гідрофобних білок-ліпідних контактів. Ці контакти відрізняються від звичайних гідрофобних взаємодій між експонованими неполярними ділянками білка та ацильними ланцюгами ліпідів, тому що було показано, що популяція таких ділянок зменшується зі збільшенням іонної сили. Альтернативою традиційним гідрофобним контактам була запропонована витягнута конформація КЛ, що й підтверджується отриманими у даній роботі даними.

Таблиця 4.14

Структурні параметри комплексів цитохрому *c* з КЛ у витягнутій конформації

Параметр	I = 40 мМ		I = 60 мМ	
	КЛ10	КЛ20	КЛ10	КЛ20
$D_p$ , нм	$0.3^{\pm 0.02}$	$0.1^{\pm 0.007}$	$0.7^{\pm 0.04}$	$0.4^{\pm 0.03}$
$D_{CE}$ , нм	$2.7^{\pm 0.4}$	$3^{\pm 0.7}$	$2.4^{\pm 0.4}$	$2.9^{\pm 0.1}$
$D_E$ , нм	$0.7^{\pm 0.06}$	$0.8^{\pm 0.09}$	$0.8^{\pm 0.09}$	$1.0^{\pm 0.12}$

Однак, для везикул КЛ2.5<sub>AB-КЛ</sub> та КЛ5<sub>AB-КЛ</sub> використання комбінованої моделі деміксінгу ліпідів та витягнутої конформації КЛ все ж не забезпечило задовільну відповідність теоретичних та експериментальних даних, тому було зроблено припущення стосовно існування інших факторів, що лежать в основі цього явища.

#### Гіпотеза IV. Утворення небішарових структур

Як зазначалось вище, незвичайна поведінка профілів ІРПЕ при підвищенні іонної сили у КЛ10 та КЛ20 мембранах може бути пояснена вивертанням ацильного ланцюга КЛ з приєднаним АВ-флуорофором у гідрофобний карман цитохрому *c*. Однак, питання щодо спостережуваного посилення переносу енергії при зростанні концентрації моновалентних іонів залишилось невирішеним. Тому було зроблено припущення, що цей ефект обумовлений здатністю цитохрому *c* ініціювати утворення небішарових структур. У своїх дослідженнях Круїф та Кулліс продемонстрували, що специфічні взаємодії цитохрому *c* з КЛ можуть

призвести до формування гексагональної фази ліпідів ( $H_{II}$ ) [362]. Було показано, що утворення білок-індукованих небішарових структур включає декілька послідовних етапів: електростатично-контрольована сорбція білка на поверхні мембрани  $\rightarrow$  латеральний перерозподіл ліпідів та утворення КЛ-збагачених доменів  $\rightarrow$  локальна дестабілізація ліпідного бішару, яка включає інвагінацію мембрани  $\rightarrow$  перехід в  $H_{II}$ -фазу.

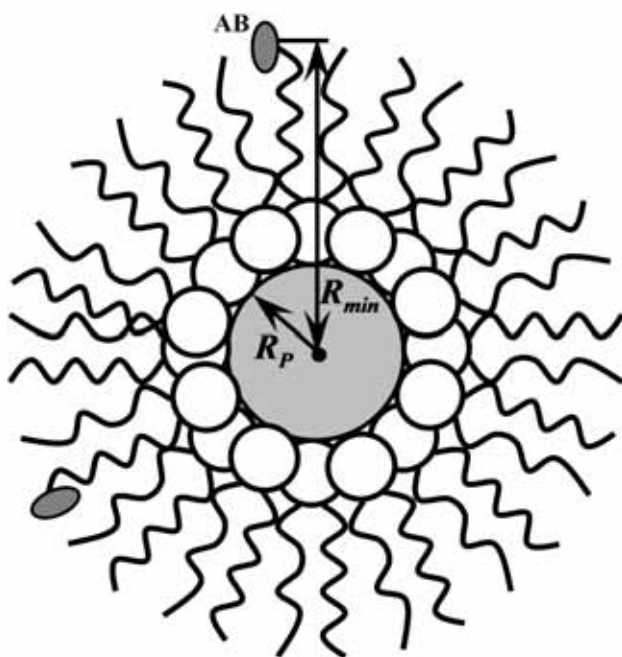


Рис. 4.30. Геометрія гексагональної фази молекул КЛ, індукованої сорбцією цитохрому *c*. Білок зображений сірим колом.

Якщо аналогічні процеси мають місце у наших системах, то посилення ІРПЕ може бути пояснене сегрегацією КЛ в області з негативною кривизною, тобто в гексагональні циліндри, утворені навколо цитохрому *c*, та витисненням молекул ФХ з контактної білок-ліпідної ділянки. Іншими словами, мінімальна відстань між донором та акцептором у такій конфігурації становить  $R_{\min} = R_p + D_m \approx 4.4$  нм (рис. 4.30). Згідно з фундаментальним законом переносу енергії, відносний квантовий вихід донору при гексагональній конфігурації дорівнює:

$$Q_r = 1 - \frac{1}{\left(\frac{R_{\min}}{R_0}\right)^6 + 1} \approx 0.4 \quad (4.34)$$

де радіус Фьорстера  $R_0 = 4.7$  нм. Найбільш виражений перенос енергії спостерігався для КЛ2.5<sub>AB-КЛ</sub>/I60 ліпосом, де відносний квантовий вихід донору набував значення 0.44 при найвищій концентрації білка. Ці міркування

дозволяють зробити висновок, що утворення небішарових структур може представляти собою механізм, здатний задовільно пояснити аномальне зниження  $Q_r$  в КЛ2.5<sub>AB-КЛ</sub> та КЛ5<sub>AB-КЛ</sub> мембранах при зростанні  $I$ .

Владимиров та співавтори охарактеризували гексагональну конформацію цитохром  $c$  – кардіоліпінового комплексу як сферичну наночастинку діаметром  $\approx 11$  нм, в якій білок повністю покритий полярними голівками 35-40 молекул КЛ [363]. Окрім цього, було показано, що формування такого роду структур супроводжується набуханням білка, тобто зростанням його молекулярного об'єму. Автори інтерпретували цей ефект проникнення одного з ацильних ланцюгів КЛ у внутрішню область молекули цитохрому  $c$ . Реалізація такого процесу можлива за рахунок конформаційного переходу білка у стан розпавленої глобули, структурного конформеру білка з підвищеною флуктуаційною рухливістю, але зі збереженою нативною вторинною структурою [364,365]. Ці міркування дають підстави вважати, що перехід КЛ у витягнуту конформацію та у Н<sub>II</sub>-фазу є взаємопов'язаними процесами. Вочевидь, здатність КЛ утворювати обидві конформації обумовлена кінчною формою молекули ліпиду, яка викликає зменшення локальної кривизни ліпідного бішару [366]. Для компенсації зміни поверхневого латерального тиску молекули КЛ приймають ту чи іншу конформацію (витягнуту чи гексагональну).

#### *4.3.1. Гіпотетична модель структурних змін ліпідного бішару, викликаних цитохромом $c$*

Викладені вище результати показують, що асоціація цитохрому  $c$  з ФХ/КЛ модельними мембранами представляє собою складний процес, який контролюється складом ліпідного бішару та іонною силою розчину. Зокрема, в КЛ2.5/120 ліпосомах сорбція білка на поверхні мембрани ініціює утворення регулярних КЛ-збагачених доменів<sup>6</sup>. У свою чергу, в КЛ10/140, КЛ20/140, КЛ10/160 та КЛ20/160 везикулах утворення сегрегованих кардіоліпінових ділянок

<sup>6</sup> Під регулярними доменами мається на увазі КЛ-збагачені області, в яких ацильні ланцюги ліпідів знаходяться у площині ліпідного бішару

супроводжується додатковим переходом молекул КЛ у витягнуту конформацію, а в КЛ2.5/І40, КЛ5/І40, КЛ2.5/І60 та КЛ5/І60 мембранах за латеральним перерозподілом ліпідів слідує формування гексагональної фази. Перейдемо тепер до розгляду молекулярних механізмів, які можуть визначати кінцеву структуру білок-ліпідних комплексів. Надзвичайно велику кількість теоретичних та експериментальних досліджень було присвячено вивченню морфологічних трансформацій ліпідів під впливом протилежно заряджених катіонних білків [280,284,286]. На основі цих досліджень був запропонований механізм латеральної сегрегації ліпідів, згідно з яким рідиннокристалічна природа ліпідного бішару дозволяє молекулам ліпідів з високою спорідненістю до білка мігрувати у зону білок-ліпідної взаємодії, що призводить до локальних змін структури мембран. Фактори, які сприяють преференційній взаємодії білка з аніонними ліпідами, включають:

- наявність кластерів позитивно заряджених амінокислотних залишків на поверхні білка, що робить можливою асоціацію молекули з кількома аніонними ліпідами одночасно;
- конформаційна еластичність поліпептидного ланцюга, що призводить до утворення конформеру білка, в якому відстань між позитивними зарядами та аніонними ліпідними голівками мінімальна;
- умови зовнішнього середовища, які забезпечують послаблення електростатичного відштовхування між зарядженими ліпідами – підвищена іонна сила та знижене значення рН.

Однак, якщо радіус кривизни ліпідних доменів перевищує радіус загальної кривизни мембрани, то енергія білок-ліпідних взаємодій може бути знижена за рахунок подальших еластичних деформацій ліпідного бішару.

Повертаючись до наших систем, можна припустити, що при іонній силі 20 мМ часткова нейтралізація зарядів ліпідних молекул адсорбованим цитохромом с викликає утворення регулярних ліпідних доменів у КЛ2.5 мембранах. Це припущення узгоджується із результатами Мея та ін., які показали, що найбільш ефективна кластеризація аніонних ліпідів спостерігається для слабозарядженої

мембрани та високозарядженого білка [280]. Підвищення іонної сили посилює здатність КЛ утворювати домени, тому що, поряд зі зв'язуванням білка, акумуляція моновалентних іонів поблизу поверхні мембрани робить суттєвий внесок у нейтралізацію заряду бішару. Однак, при  $I = 40 \text{ мМ}$  та  $I = 60 \text{ мМ}$  формування регулярних доменів не є фінальною стадією асоціації цитохрому *c* з ФХ/КЛ везикулами. Сегрегація молекул КЛ створює градієнти кривизни та лінійного натягу вздовж поверхні мембрани. Це призводить до «стискання» мембрани у зоні зв'язування білка (рис. 4.31, верхня панель, 3). Для слабозаряджених мембран сорбція кожної наступної молекули білка буде призводити до подальшого вигину бішару у тому ж напрямку. Термічні ундуляції ліпідної мембрани посилюють ймовірність притягання між двома сегментами бішару зі зміненими фізичними та структурними властивостями, призводячи до злиття тих сегментів бішару, які знаходяться між собою у безпосередній близькості [367]. Результатом цього процесу може бути утворення замкненої ліпідної структури навколо молекули цитохрому *c* (рис. 4.31, верхня панель, 4). Такий комплекс описується багатьма авторами як «здуття» мембрани та представляє собою гідрофобну наносферу, інтегровану між двома ліпідними моношарами [368]. При даній геометрії електростатична вільна енергія досягає свого мінімуму, тому що усі ліпідні заряди знаходяться у контакті із зарядами білка, тоді як у ламелярній фазі тільки частина аніонних ліпідів взаємодіє з білком. Той факт, що ряд аніонних ліпідів можуть приймати гексагональну конформацію при низькому рН чи високій іонній силі, вказує на те, що поліморфізм ліпідів є електростатично-контрольованим процесом [366]. Зазвичай, це явище пояснюється нейтралізацією заряду полярних голівок аніонних ліпідів, яка сприяє формуванню  $H_{II}$ -фази. Здогадно, підвищення концентрації моно- чи дивалентних іонів посилює здатність КЛ утворювати домени таким чином, що найбільш стабільною конфігурацією білок-ліпідного комплексу стає моношар з високою кривизною, замкнений навколо молекули білка.

У високозаряджених ліпосомах, перехід у гексагональну фазу дещо утруднюється через високий початковий поверхневий електростатичний

потенціал ліпідного бішару. Окрім цього, внаслідок нижчого ступеня деміксінгу, утворення  $H_{II}$ -конформації не є необхідним кроком для досягнення термодинамічної рівноваги, тому шлях, по якому система знижує свою енергію включає перехід КЛ у витягнуту конформацію (рис. 4.31, нижня панель, 3). Варто відзначити, що чинники, які полегшують утворення витягнутої конформації, включають зростання кривизни бішару, збільшення поверхневого заряду та зменшення розміру полярної голівки ліпідів [361].

Іонна сила 40 та 60 мМ

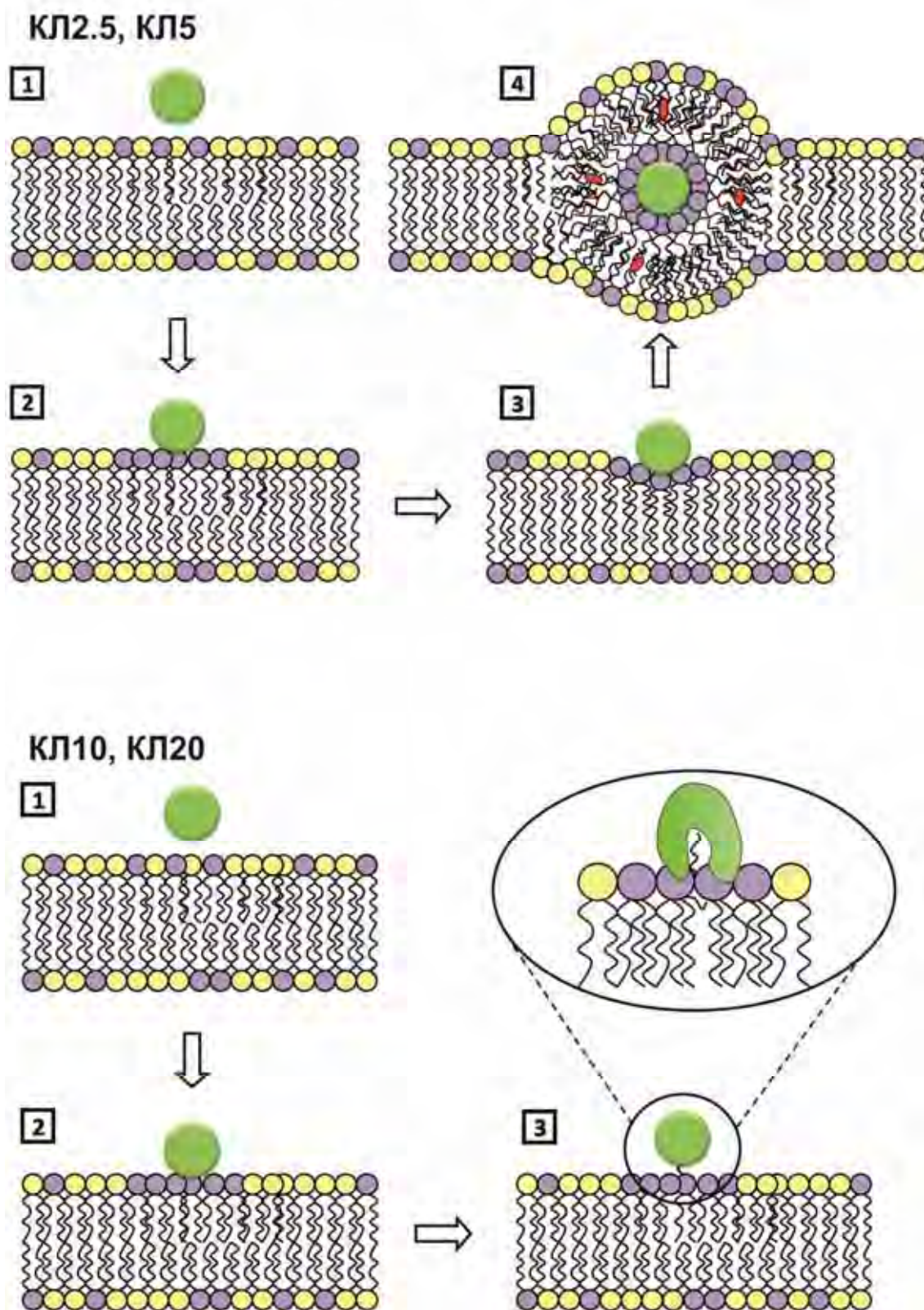


Рис. 4.31. Гіпотетична модель структурних перебудов ліпідного бішару, викликаних цитохромом *c*.

Ці фактори посилюють електростатичні білок-ліпідні взаємодії, що призводить до більш виражених конформаційних змін як цитохрому *c* (вищий ступінь розгортання поліпептидного ланцюга та ширше відкриття гідрофобного карману), так і ліпідних молекул, полегшуючи проникнення ацильного ланцюга КЛ у внутрішню область молекули білка. З використанням вищезазначених аргументів можна пояснити, чому витягнута конформація КЛ спостерігається тільки для ліпосом, що містили 10 або 20 мол% аніонного ліпиду – у діапазоні концентрацій КЛ, використовуваних у даній роботі, найвища кривизна і заряд та найменший середній розмір полярної голівки притаманні саме для КЛ10 та КЛ20 везикул. Між тим, в основі підвищеної здатності КЛ переходити у витягнуту конформацію зі зростанням іонної сили можуть лежати зміни градієнту полярності на границі розділу ліпід-вода. З термодинамічної точки зору, для того, щоб один ацильний ланцюг вивернувся з площини бішару у гідрофобний карман цитохрому *c*, молекулам ліпідів необхідно подолати енергетичний бар'єр, пов'язаний із проходженням неполярних хвостів крізь високополярну поверхню мембрани. Підвищення концентрації іонів у розчині викликає зниження діелектричної сталої на поверхні розділу ліпід/вода та, як наслідок, зменшення полярності на поверхні мембрани, що робить акомодацию одного з ацильних ланцюгів КЛ у гідрофобному кармані білка більш термодинамічно вигідною.

Підводячи підсумок, необхідно зауважити, що утворення КЛ-збагачених доменів має важливе фізіологічне значення. По-перше, було показано, що кристи внутрішньої мембрани мітохондрій та контактні центри внутрішньої та зовнішньої мембран мають ділянки з гексагональною конфігурацією [369]. З огляду на безпосередню роль цитохрому *c* у стабілізації такого роду кардіоліпінових структур, та, як наслідок, у стабілізації мітохондріальних крист, виникає питання, яке потребує подальшого детального розгляду, – чи може реструктуризація крист, що має місце під час апоптозу, бути викликана виходом цитохрому *c* у цитозоль? По-друге, було продемонстровано, що утворення доменів КЛ прискорює швидкість переносу електрона цитохромом *c*. Більш того, виявлена ключова роль кластеризації КЛ у посиленні апоптотичного сигналу



[370]. Нарешті, утворення КЛ-збагачених зон є важливим етапом у електростатично-контрольованому спрямуванні PIN-білків до клітинних мембран [371].

#### **4.4. Короткі висновки до Розділу 4**

1. Аналіз спектральних відгуків ряду мембранних флуоресцентних зондів пірену,ДФГТ, Продану та ДМХ показав, що зв'язування олігомерів лізоциму з модельними ліпідними мембранами із ФХ, та його сумішей із ФГ, КЛ чи Хол призводить до зменшення ступеня гідратації та вільного об'єму ліпідного бішару. Виявлена здатність холестерину запобігати модифікуючому впливу агрегованого білка на полярну область мембран.

2. При дослідженні переносу енергії з триптофану на ДМХ та гасіння власної флуоресценції білків іонами цезію встановлено, що мутанти N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I локалізуються на границі розділу ліпід-вода у ФХ та ФХ/Хол мембранах, не проникаючи у гідрофобну область ліпідного бішару. З використанням флуоресцентних зондів пірену та Лаурдану отримані аргументи на користь дегідратації полярної зони мембран під впливом варіантів апоА-I.

3. Методом ІРПЕ отримані докази того, що взаємодія цитохрому *c* з ФХ/КЛ везикулами контролюється такими чинниками, як поверхнева густина заряду ліпідного бішару та іонна сила розчину. Продемонстровано, що в залежності від експериментальних умов, білок може викликати формування КЛ-збагачених доменів, перехід КЛ у витягнуту конформацію або утворення гексагональної фази.

## РОЗДІЛ 5

### АМІЛОЇДНІ ФІБРИЛИ ЯК ОСОБЛИВИЙ КЛАС МЕМБРАНОТРОПНИХ АГЕНТІВ

У попередньому розділі було показано, що ранні інтермедіати фібрилярних ансамблів білків порушують цілісність ліпідного бішару. В основі цього лежать різні процеси, які визначаються як конформаційними та фізико-хімічними властивостями білка, так і структурно-динамічними характеристиками мембрани. У даному підрозділі було зроблено акцент на дослідженні мембранних ефектів зрілих фібрил лізоциму та різних мутантів N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну A-I.

#### 5.1. Загальна характеристика амілоїдних агрегатів лізоциму та апоA-I 83

Перший етап досліджень було спрямовано на характеристику фібрилярних агрегатів лізоциму, а також апоA-I 83 та його варіантів G26R, G26R/W@8, G26R/W@50 та G26R/W@72, у відсутності ліпідних везикул. Амілоїдні фібрили були сформовані, як описано у підрозділі 2.6. На фотографіях трансмісійної електронної мікроскопії фібрилярні агрегати візуалізувались як ниткоподібні структури різної довжини, діаметром 15-20 нм у випадку лізоциму та 5-10 нм у випадку апоA-I 83 та його мутантів (рис. 5.1).

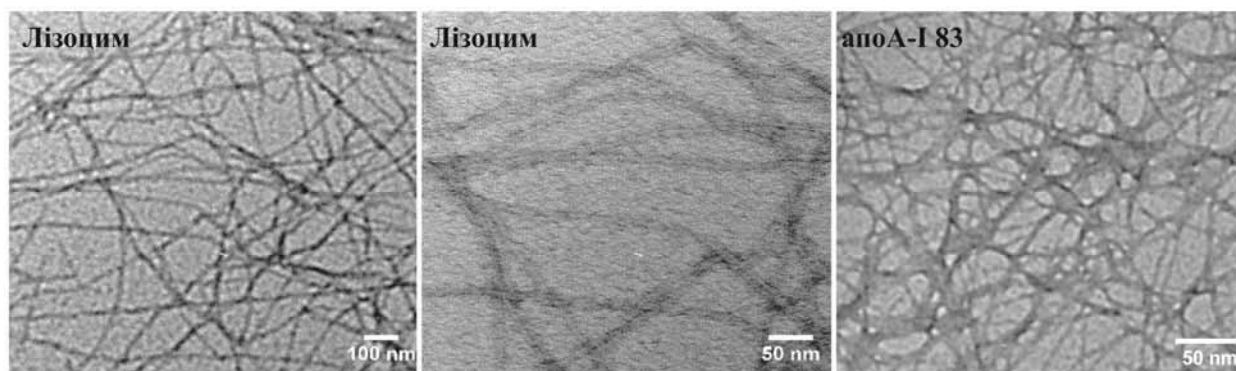


Рис. 5.1. Фотографії трансмісійної електронної мікроскопії амілоїдних фібрил

У роботі [372] було запропоновано структурну модель амілоїдних фібрил пептиду апоA-I 83. Згідно з цією моделлю, фібрили мають U-подібну форму, в якій дві  $\beta$ -шпильки, що включають сегменти Leu<sub>14</sub>-Val<sub>31</sub> та Gln<sub>41</sub>-Ser<sub>58</sub>, утворюють

самокомплементарну «застібку-блискавку», яка стабілізується ван-дер-Ваальсовими та гідрофобними взаємодіями, а також сольовим містком між Arg<sub>27</sub> та Asp<sub>48</sub>.

Розшифруванню структури амілоїдних фібрил лізоциму також було присвячено низку робіт [373-375]. Так, на основі комбінації методів протеолізу та інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є Фрає та співавтори показали, що фібрилярні структури утворюються фрагментом білка, що включає залишки 32-108. Цей фрагмент знаходиться у крос- $\beta$ -конформації, у той час як решта амінокислотних залишків приймають неупорядковану структуру. Далі, у роботі [374] було показано, що нанопептид лізоциму, який охоплює залишки <sub>54</sub>GILQINSRW<sub>62</sub>, є ключовим при утворенні фібрилярних агрегатів лізоциму та представляє собою гідрофобне ядро амілоїдних ансамблів. Спираючись на результати атомно-силового мікроскопії, Лара та співавтори провели дослідження механічних властивостей фібрил лізоциму та розраховали модуль Юнга, який складав  $2.8 \pm 0.9$  ГПа [376].

Оцінка амілоїдогенного потенціалу лізоциму та варіантів апоА-I 83 була проведена з використанням специфічного амілоїдного флуорофору Тіофлавіну Т. При вимірюванні флуоресценції цього барвника у залежності від часу спостерігались сигмоїдні кінетичні криві, характерні для процесу фібрилізації (рис. 5.2, 5.3). При цьому відмічається, що Тіофлавін Т специфічний лише до зрілих фібрил та не взаємодіє з фібрилярними інтермедіатами [377]. В основі посилення флуоресценції зонду при його зв'язуванні з амілоїдами лежать унікальні фотофізичні властивості Тіофлавіну Т. Цей флуорофор відноситься до класу так званих молекулярних роторів, спектральні характеристики яких контролюються в'язкістю оточення. У розчинах з низькою в'язкістю бензиламінове та бензотіазолове кільця вільно обертаються навколо центрального С-С зв'язку, що призводить до гасіння флуоресценції зонду [378].

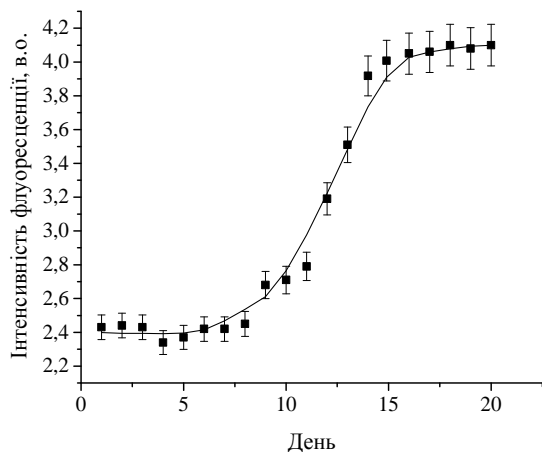


Рис. 5.2. Кінетичний профіль Тіофлавіну Т, зв'язаного з амілоїдними фібрилами лізоциму. Інтенсивність флуоресценції вимірювали при довжині хвилі 484 нм.

Тіофлавін Т – це класичний маркер, що використовується для детектування амілоїдних фібрил [226]. Цей зонд є похідною бензотіазолу та застосовується для візуалізації та кількісного визначення фібрилярних структур.

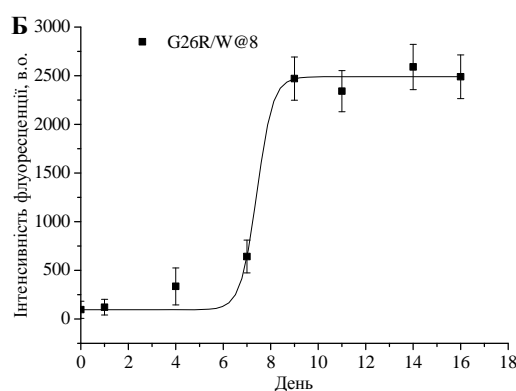
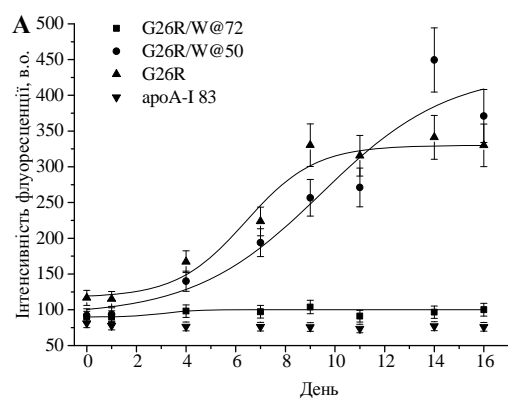


Рис. 5.3. Кінетика флуоресценції Тіофлавіну Т при довжині хвилі 484 нм у присутності різних мутантів апоА- I 83.

Коли Тіофлавін Т утворює комплекси з амілоїдними фібрилами, іммобілізація молекули флуорофору гальмує обертання навколо С–С зв'язку, результатом чого є посилення інтенсивності флуоресценції. Специфічність зонду до фібрилярних агрегатів визначається особливим розташуванням флуорофору на амілоїдних фібрилах. Згідно з канальною моделлю, Тіофлавін Т локалізується в боріздках, утворених боковими амінокислотними залишками (рис. 5.4). При цьому вісь молекули барвника паралельна осі фібрили. Це призводить до суттєвого обмеження рухливості зонду та зростання його флуоресценції на декілька порядків.

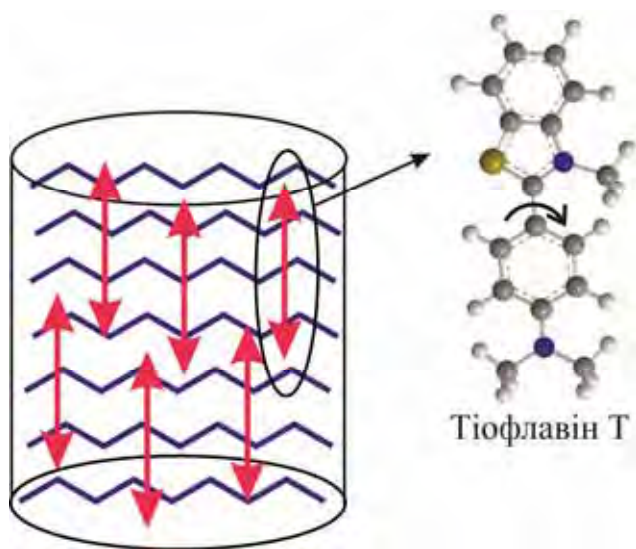


Рис. 5.4. Схематичне зображення локалізації Тіофлавіну Т в амілоїдних фібрилах. Циліндр представляє собою фібрилу, зигзагом зображені  $\beta$ -тяжі.

Примітно, кінетичні профілі випромінювання Тіофлавіну Т у присутності варіантів апоА-I залежали від типу мутанту (рис. 5.3). Зокрема, ступінь фібрилізації зростала у наступному порядку: апоА-I 83 – G26R/W@72 – G26R/W@50 – G26R – G26R/W@8. Необхідно відмітити, що у даному контексті не уявляється можливим точно визначити, що лежить в основі спостережуваної різниці у ступені фібрилізації варіантів апоА-I 83 – тип мутації чи неконтрольовані незначні варіації експериментальних умов. Так, наприклад, Сеччіні та ін. продемонстрували роль залишків триптофану в амілоїдогенезі апоміоглобіну [379]. Аналіз різних варіантів білка, в яких один чи декілька Trp були заміщені на Phe, виявив, що позиція триптофанових залишків вздовж поліпептидного ланцюга впливає на ступінь агрегації білка. Причиною цього ефекту може бути той факт, що Phe нездатний підтримувати дальнодіючі взаємодії, притаманні для Trp. Коли такого роду мутація має місце у фрагменті білка, критичному для його самоасоціації, загальний агрегаційний потенціал знижується. Примітно, вплив мутації на здатність апоА-I утворювати фібрили був показаний у роботі Адачі та ін. [221]. На основі результатів вимірювання флуоресценції АНС та Тіофлавіну Т автори зробили висновок, що заміщення Gly на Lys у позиції 26 гальмує кінетику фібрилізації пептиду. Було зроблено припущення, що мутація модифікує міжмолекулярні контакти між мономерами апоА-I внаслідок різної гідрофобності гліцинового та лізинового залишків.

## 5.2. Мембранні ефекти фібрилярних агрегатів лізоциму

Утворення амілоїдних агрегатів лізоциму *in vivo* та їх акумуляція в тканинах людського організму відіграє ключову роль у розвитку ряду хвороб, зокрема, аутосомного спадкоємного системного амілоїдозу. Це захворювання пов'язане із точковими мутаціями в гені лізоциму, що призводить до заміщень I56T та D67N [380]. Кристалографічні та біофізичні дослідження показали, що такого роду мутації призводять до підвищення амілоїдогенного потенціалу білка внаслідок зниження його термодинамічної стабільності.

### 5.2.1. Дослідження сорбції амілоїдних фібрил лізоциму на моношарах Ленгмюра

Перший етап аналізу взаємодії фібрилярних агрегатів лізоциму з ліпідами був спрямований на дослідження адсорбції білка на поверхні мембрани, першого етапу процесу утворення білок-ліпідних комплексів. Для з'ясування молекулярних аспектів поведінки білків та пептидів на поверхні розділу було розроблено велику кількість модельних систем [381-383]. Серед них, ліпідні моношари представляють собою один із найкращих прототипів клітинних мембран завдяки своїй гомогенності, стабільності та простій геометрії [384]. Більш того, ця методологія дозволяє проаналізувати кінетику вбудовування білка в ліпідну плівку та кількісно охарактеризувати спорідненість поліпептидного ланцюга до ліпідних моношарів різного складу. З огляду на це, дані модельні системи були застосовані для моніторингу сорбції фібрилярних агрегатів лізоциму.

Ліпідні моношари складались з ДМФХ та його сумішей із 10, 20 та 40 мол% ДМФГ чи ДМФС. Необхідно відмітити, що у роботах [385,386] була продемонстрована повна змішуваність ДМФХ з ДМФГ чи ДМФС. Окрім цього, для цих систем були отримані ізотерми поверхневого тиску [387], з яких можна бачити, що фазовий стан ДМФГ не змінюється навіть у суміші 1:1 з ДМФХ.

Впорскування амілоїдного лізоциму у суб-фазу призвело до швидкого зростання поверхневого тиску. На рис. 5.5 показана кінетика зв'язування білка із ДМФХ моношаром при різних значеннях початкового поверхневого тиску  $\pi_0$ .

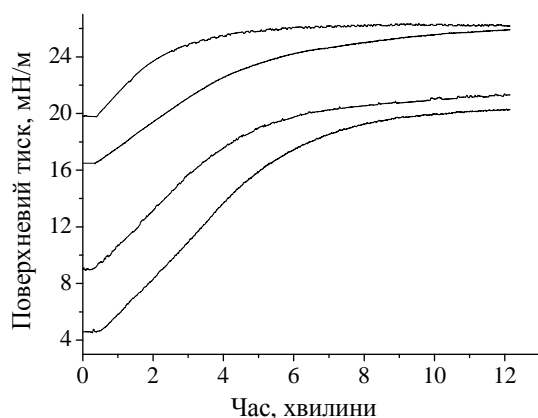


Рис. 5.5. Кінетика сорбції фібрілярного лізоциму на ДМФХ моношарах. Криві отримані при різних значеннях початкового поверхневого тиску. Концентрація білка була 0.17 мкМ.

Аналогічні криві були отримані для інших моношарів. Наведені результати вказують на швидку дифузію та інкорпорацію білка у ліпідні плівки. Наявність плато на кінетичних кривих означає, що протягом приблизно 6-8 хвилин після додавання фібрілярного лізоциму ступінь насичення моношару білком досягає максимального значення. Величина зростання поверхневого тиску під впливом лізоциму залежала від складу моношару. Залежність зміни поверхневого тиску ( $\Delta\pi$ ) та початковим поверхневим тиском ( $\pi_0$ ), представлена на рис. 5.6, відображає спорідненість білка до ліпідного моношару [388]. Чим вище значення  $\Delta\pi$ , тим більше ступінь проникнення білка у ліпідний моношар. Для того, щоб кількісно охарактеризувати здатність фібрил лізоциму до вбудовування у ліпідні плівки різного складу, був визначений максимальний поверхневий тиск, при якому білок не може проникнути у ліпідний моношар. Цей параметр визначається шляхом екстраполяції залежностей  $\Delta\pi(\pi_0)$  до перетину з віссю  $x$ . Аналіз значень граничного тиску, отриманих для різних модельних систем, показав, що найвищий граничний тиск спостерігається для системи фібрили+ДМФГ40 (Табл. 5.1).

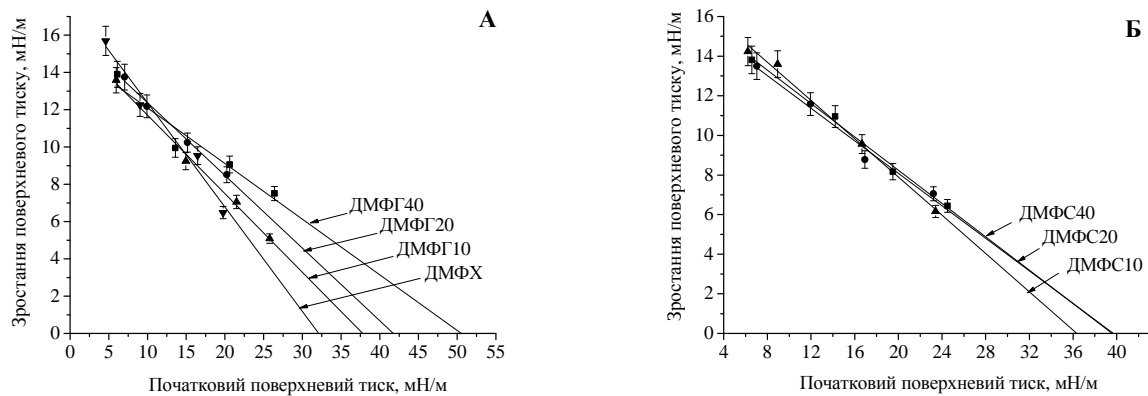


Рис. 5.6. Зростання поверхневого тиску під впливом фібрилярного лізоциму як функція початкового поверхневого тиску. Концентрація білка була 0.17 мкМ.

Можна бачити, що зменшення молярної фракції ДМФГ призвело до зниження граничного тиску. У ДМФХ моношарах цей параметр приймав значення, що незначно перевищували 30 мН/м. Аналогічною, але менш вираженою, була залежність ефективності проникнення білка в моношар від молярної фракції ДМФС.

Таблиця 5.1

Граничний тиск для вбудовування фібрил лізоциму в ліпідні плівки

Склад моношару	Граничний тиск, мН/м
ДМФХ	$32.1 \pm 2.5$
ДМФГ10	$37.8 \pm 1.1$
ДМФГ20	$41.8 \pm 1.9$
ДМФГ40	$50.6 \pm 7.0$
ДМФС10	$36.4 \pm 1.3$
ДМФС20	$39.7 \pm 2.4$
ДМФС40	$39.6 \pm 1.3$

Беручи до уваги, що щільність пакування ліпідів біологічних мембран відповідає поверхневому тиску  $\sim 30$  мН/м [389], отримані результати свідчать про те, що фібрилярний лізоцим може проникати у внутрішню область мембран за фізіологічних умов. Слід зазначити, що граничний тиск для мономерного лізоциму не перевищував  $\sim 40$  мН/м для ДМФГ40 моношарів, тобто амілоїдні фібрили мають вищу здатність до проникнення у ліпідний моношар, у порівнянні з нативним білком. Ця властивість амілоїдних агрегатів є об'єктом гострих



дебатів [390,391]. Наприклад, з використанням методу моношарів Ленгмюра було показано, що фібрилярні форми людського амілоїдного поліпептиду нездатні до вбудовування у ліпідні плівки, тоді як мономери легко інкорпорується у мембрану [390]. Цю ідею підтверджують дослідження мембранної взаємодії Аβ пептиду у різних агрегаційних станах, де розчинні Аβ олігомери, на відміну від мономерів, показали нездатність до проникнення в мембрану [391]. Крім того, занурення Аβ мономерів у мембрану супроводжувалось їх швидким збиранням у каналоподібні олігомери. Однак, поряд із цим, велика кількість досліджень демонструють мембранотропну активність фібрилярних агрегатів [21,23,392]. Зокрема, було встановлено, що фібрили лізоциму, на відміну від мономерного та нефібрилярного білка, руйнують як нейтральні, так і негативно заряджені ліпосоми [392]. Однак, незважаючи на експериментальні докази токсичної природи зрілих амілоїдних фібрил, питання щодо здатності фібрилярних агрегатів проникати у ліпідний бішар до цього часу залишається відкритим. З огляду на вищесказане, факт вбудовування фібрил лізоциму у фосфоліпідні моношари, що встановлений у наших дослідженнях, може мати значення при поясненні токсичних ефектів агрегатів лізоциму.

Наші результати показують, що електростатичні взаємодії між катіонними групами білка та негативно зарядженими голівками фосфоліпідів відіграють значну роль у зв'язуванні фібрил лізоциму з модельними мембранами. Дійсно, значимість електростатичних взаємодій для вбудовування позитивно заряджених амілоїдогенних пептидів у ліпідний бішар була показана у попередніх дослідженнях [390,391]. Електростатичні взаємодії сприяють більш тісному контакту білка з ліпідами, тим самим підвищуючи ймовірність його вбудовування у мембрану. Примітно, отримані нами результати узгоджуються з даними, що свідчать про здатність фібрил лізоциму до індукування більш сильного витікання кальцеїну з ліпосом із ДОФХ:ДОФГ (1:1), у порівнянні з ДОФХ везикулами [392].

Електростатично-контрольовану природу може мати й більш виражений ступінь проникнення фібрилярного білка у ліпідний моношар, порівняно з мономерним білком. Утворення фібрил може призвести до зростання поверхневої

густини заряду поліпептидного ланцюга. З іншого боку, амілоїдні фібрили лізоциму проникають у ДМФХ моношар при поверхневому тиску менше 32 мН/м. Це вказує на наявність гідрофобних білок-ліпідних взаємодій, обумовлених експонуванням гідрофобних ділянок на поверхні фібрили.

В окремій серії експериментів було досліджено залежність процесу зв'язування лізоциму з ліпідними моношарами від концентрації білка. На рис. 5.7 показана кінетика проникнення фібрилярних агрегатів у ДМФГ40 та ДМФС40 моношари при різних концентраціях білка.

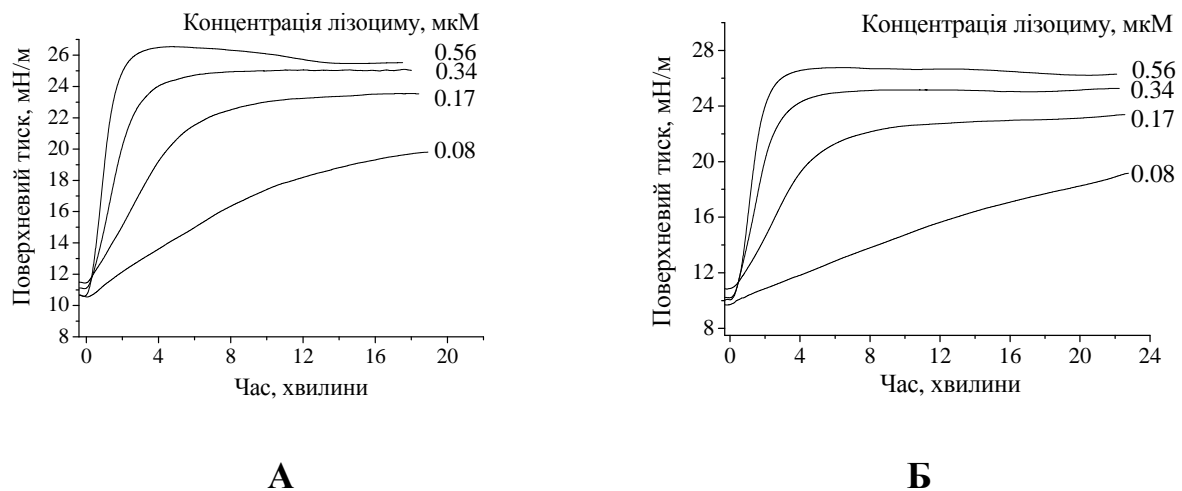


Рис. 5.7. Профіль поверхневого тиску ДМФГ40 (А) та ДМФС40 (Б) моношарів після додавання фібрил лізоциму.

Аналогічні залежності були отримані для інших моношарів. Виявлено, що ступінь зв'язування залежить від концентрації білка. Відповідно, при найменшій концентрації лізоциму (0.08 мкМ) час, необхідний для повного проникнення, складав близько 18 хвилин. Зростання концентрації лізоциму призвело до прискорення процесу зв'язування. Наприклад, при концентрації білка 0.56 мкМ моношар був насичений за 3 хвилини після вприскування. Ці результати показують, що ступінь проникнення обмежується дифузією фібрил лізоциму у суб-фазі. Чим вище концентрація білка, тим більша кількість білкових агрегатів досягає поверхні розділу ліпід/вода та в результаті проникає у ліпідний моношар.

Специфічною властивістю отриманих кривих при високій концентрації лізоциму є наявність максимуму, за яким слідує слабке зменшення поверхневого

тиску. Це може бути наслідком структурної реорганізації поліпептиду або зміни орієнтації зв'язаного білка, як припускалось у [393]. Ці зміни призводять до зменшення площі та зниження поверхневого тиску до рівноважного значення. Більш того, фазовий перехід ліпідів може викликати аналогічний ефект. У нашому випадку тимчасове зростання поверхневого тиску може також бути наслідком швидкої кінетики вбудовування лізоциму. Поряд зі швидкістю зв'язування, ступінь проникнення білка у моношар також залежав від його концентрації. Ефективність вбудовування, що реєструється як зростання поверхневого тиску, зростала пропорційно концентрації лізоциму (рис. 5.8).

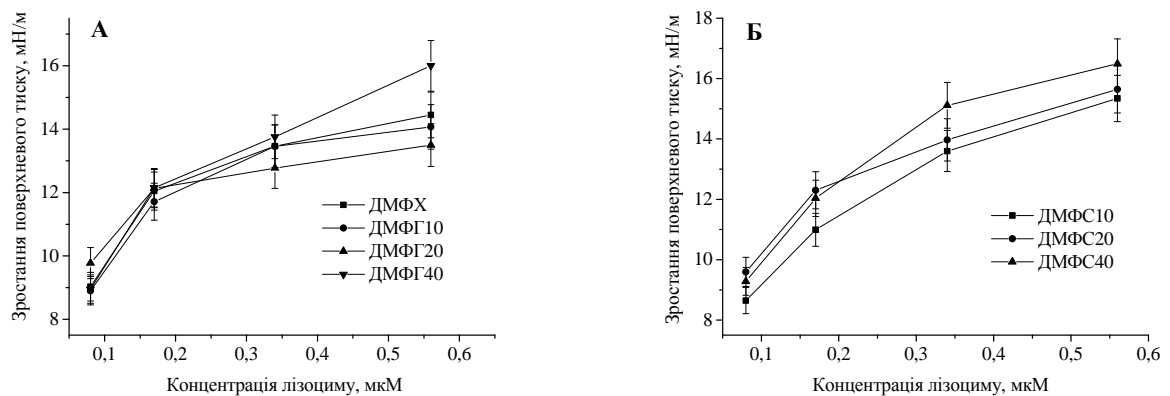


Рис. 5.8. Вплив концентрації лізоциму на ступінь проникнення фібрил у різні моношари. А – ДМФХ:ДМФГ моношари, Б – ДМФХ:ДМФС моношари.

Слід відмітити, що залежність  $\Delta\pi$  від концентрації лізоциму є нелінійною, та моношар насичується при певній концентрації білка, тому концентрацію лізоциму, при якій спостерігалось максимальне зв'язування, можна розглядати як додаткову характеристику здатності білка до проникнення у ліпідний моношар.

Отже, отримані результати показують, що фібрилярні агрегати лізоциму ефективно зв'язуються з ліпідними плівками. Цей процес може супроводжуватись структурною реорганізацією мембрани. Тому для подальшої характеристики асоціації фібрилярного лізоциму з ліпідами були проведені дослідження асоціації білка з ліпідними везикулами з використанням методу флуоресцентних зондів, описані нижче.

### 5.2.2. Моделювання адсорбції білків на поверхні ліпідного моношару

Теоретичному описанню адсорбції білків на ліпідних моношарах було присвячено цілу низку робіт [394-396]. Один з найпоширеніших підходів базується на використанні моделі Фрумкіна [397]. На противагу моделі адсорбції Ленгмюра, яка постулює відсутність міжмолекулярних взаємодій на поверхні, теоретичний підхід Фрумкіна враховує неідеальні взаємодії (відштовхувальні та притягальні) між молекулами адсорбату. Згідно з цією моделлю, енергії активації для адсорбції та десорбції ( $E_a$  та  $E_d$ , відповідно) лінійно залежать від поверхневої концентрації компоненту  $i$  ( $\Gamma_i$ ), де  $i=1,2$  характеризують ліпідний чи білковий компонент, відповідно:

$$E_{a,d} = E_{a,d}^0 + \sum_{i=1,2} \nu_{a,d_i} \Gamma_i \quad (5.1)$$

де  $\nu_{a,d_i}$  – константи адсорбції чи десорбції, відповідно. Модифікована ізотерма Фрумкіна може бути отримана шляхом підстановки рівняння (5.1) у вирази для потоків, які залежать від фракції поверхні, зайнятої ліпідним чи білковим компонентом:

$$x_i = \Gamma_i / \Gamma_{\infty i} \quad (5.2)$$

де  $\Gamma_{\infty i}$  – максимальне поверхнєве пакування компоненту  $i$ . Окрім цього, для розрахунку ізотерм адсорбції були введені додаткові параметри:

а) *число адсорбції а*:

$$a = \frac{\alpha_0}{\beta_0} \exp\left(\frac{E_{d0} - E_{a0}}{RT}\right) \quad (5.3)$$

де  $\alpha_0, \beta_0$  – кінетичні константи десорбції та адсорбції, відповідно,

б) *безрозмірна концентрація білка в розчині,  $k = C_2/a$* ,  $C_2$  – молярна концентрація білка,

в) *параметри взаємодії*:

$$K_i = \frac{(\nu_{a_i} - \nu_{d_i}) \Gamma_{\infty i}}{RT} \quad (5.4)$$

де  $K_{12}$  та  $K_{22}$  – параметри, що характеризують ліпід-ліпідні та білок-ліпідні взаємодії, відповідно. Негативні значення цих параметрів описують притягальні взаємодії, а позитивні – відштовхувальні. Загальний вираз для ізотерми адсорбції у рамках методології Фрумкіна має вигляд:

$$\frac{x_2}{1-x_1} = \frac{k}{k + \exp(K_{12}x_1 + K_{22}x_2)} \quad (5.5)$$

Відповідні зміни поверхневого тиску ліпідного моношару ( $\Delta\pi$ ) дорівнюють:

$$\Delta\pi = -RT\Gamma_{\infty 2} \left[ \ln \left( 1 - \frac{x_2}{1-x_1} \right) - K_{12}x_1x_2 - \frac{K_{22}}{2}x_2^2 \right] \quad (5.6)$$

де  $\Gamma_{\infty 2}$  означає максимальне поверхнєве пакування білка, яке складає  $4.6 \times 10^{-6}$  мол/м<sup>2</sup> [398].

**а) Білок-ліпідні взаємодії ( $K_{12} \neq 0, K_{22} = 0$ )**

На рис. 5.9 та 5.10 представлені залежності  $x_2(\log(k))$  та відповідні криві  $\Delta\pi(\pi_0)$ , розраховані при різних значеннях  $K_{12}$  за відсутності білок-білкових взаємодій. Як видно з рисунку, ізотерми характеризуються сигмоїдною формою та зниженням значень  $x_2$  при зростанні  $x_1$ . Поведінка залежностей  $\Delta\pi(\pi_0)$  виявилась більш цікавою. Зокрема, при  $K_{12} < 0$   $\Delta\pi$  підвищується зі зростанням  $\pi_0$ , тоді як при  $K_{12} > 0$  – знижується.

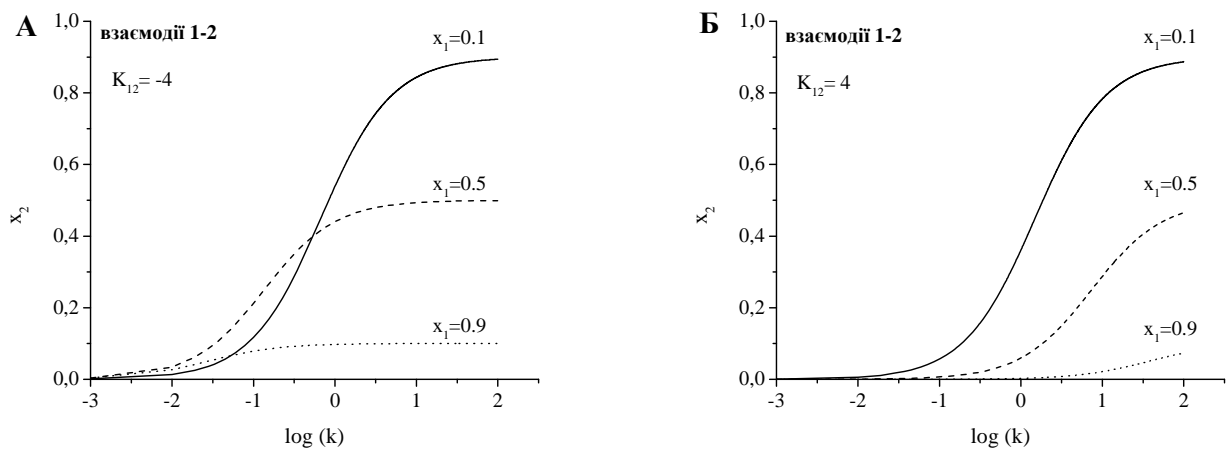


Рис. 5.9. Модифіковані ізотерми Фрумкіна для білок-ліпідного притягання (А) та відштовхування (Б).

З фізичної точки зору зниження  $\Delta\pi$  при збільшенні  $\pi_0$  пояснюється щільнішим пакуванням ліпідних молекул у більш конденсованому моношарі. Це перешкоджає проникненню адсорбату у ліпідну плівку, результатом чого є зменшення  $\Delta\pi$ . Ці міркування припускають, що ліпідний моношар відіграє блокуючу роль у процесі проникнення білка [397,398]. Вочевидь, у випадку  $K_{12} > 0$  внесок блокуючого ефекту ліпідного моношару більший, ніж внесок притягальних взаємодій, тому поведінка кривих  $\Delta\pi(\pi_0)$  є очікуваною. Однак, при негативних значеннях  $K_{12}$  притягальні взаємодії домінують над стеричними перешкодами, які створюються ліпідними молекулами, що виражається у посиленні зв'язування білка зі збільшенням  $\pi_0$ . Ймовірно, за цих умов може спостерігатись мультишарова сорбція білка на поверхні ліпідного моношару.

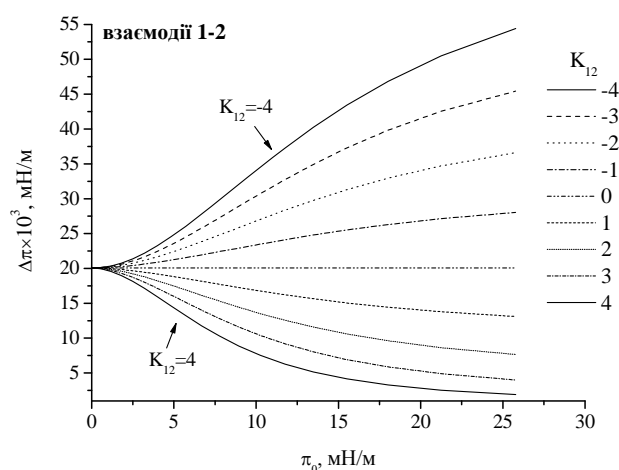


Рис. 5.10. Зміни поверхневого тиску як функція початкового поверхневого тиску при сорбції білка.

У даному контексті уявляється доцільним інтерпретувати результати моделювання, отримані у даній роботі, в рамках теоретичної методології, розробленої Калвезом та ін. [399]. Авторами було показано, що зміни поверхневого тиску моношару можуть бути представлені у вигляді  $\Delta\pi = a\pi_0 - \pi_0 + b$ , де  $a$  – це так званий параметр синергізму, пропорційний нахилу кривих  $\Delta\pi(\pi_0)$ , а  $b$  характеризує перетин цих кривих з віссю  $y$ . В обговорюваній роботі було показано, що позитивні значення  $a$  описують позитивний синергізм між ліпідним моношаром та молекулами білка, тоді як  $a < 0$  відображає негативний синергізм. Примітно, наші результати узгоджуються із запропонованою теорією. Зокрема, у випадку притягальних білок-ліпідних

взаємодій профілі  $\Delta\pi(\pi_0)$  мають позитивний нахил, віддзеркалюючи позитивний синергізм між ліпідами та зв'язаним білком. Це означає, що ліпідний моношар представляє собою середовище, сприятливе для сорбції білка, навіть незважаючи на стеричні обмеження, що створюються підвищеною щільністю пакування ліпідів при зростанні  $\pi_0$ . Позитивний синергізм може виражатись у релокації центрів зв'язування білка з гідрофобної ділянки моношару в область полярних голівок. Теоретичні розрахунки прогнозують, що енергія гідрофобних взаємодій складає близько 8-15 кДж/моль, у той час як енергія електростатичних контактів та водневих зв'язків має значення 20-40 кДж/моль [400,401]. Згодом, низький ступінь пакування ліпідів при малих значеннях  $\pi_0$  сприяє проникненню білка в ліпідний моношар та утворенню гідрофобних контактів з ацильними ланцюгами. У свою чергу, високі значення  $\pi_0$  викликають підвищення щільності пакування ліпідів, тому буде енергетично вигідно для адсорбату залишатись на поверхні моношару, підвищуючи його поверхневий тиск.

**б) Білок-білкові взаємодії** ( $K_{12} = 0$ ,  $K_{22} \neq 0$ )

На рис. 5.11 представлені ізотерми адсорбції для різних  $x_1$  як функція  $k$ . Як видно з рисунку, у випадку притягальних взаємодій  $x_2$  зростає зі збільшенням  $k$  та досягає плато. Натомість, відштовхувальні контакти призводять до більш повільного зростання  $x_2$  майже без насичення кривих.

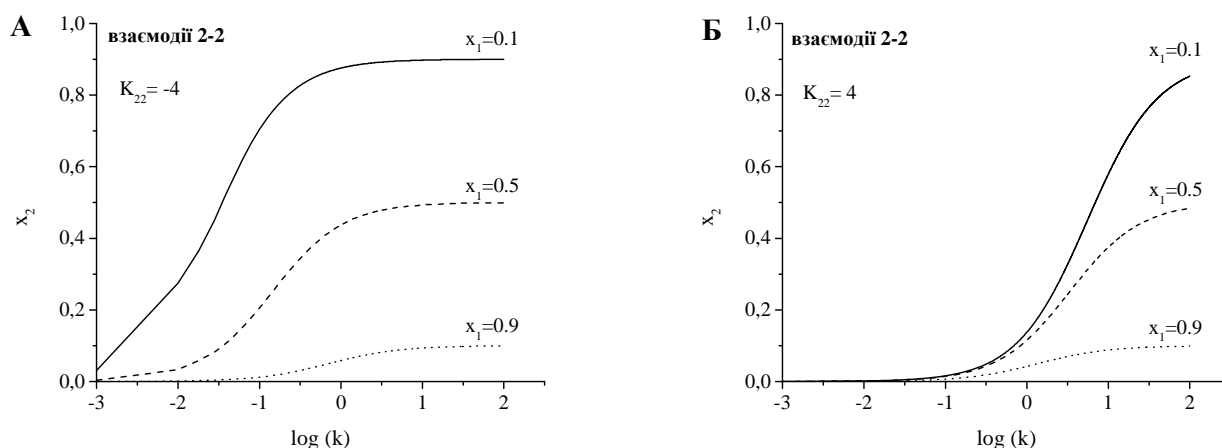


Рис. 5.11. Ізотерми адсорбції білка на поверхні ліпідного моношару для випадку білок-білкового притягання (А) та відштовхування (Б).

Рис. 5.12 ілюструє профілі  $\Delta\pi(\pi_0)$  для різних значень  $K_{22}$ . З огляду на те, що білок-ліпідні взаємодії не були враховані ( $K_{12} = 0$ ), ліпідний моношар може розглядатись лише з точки зору своєї блокуючої ролі, тому  $\Delta\pi$  має зменшуватись із ростом  $\pi_0$ , як було обговорено вище.

Однак, така поведінка спостерігалась лише при негативних значеннях  $K_{22}$  (притягальні білок-білкові взаємодії). Для позитивних  $K_{22}$  (відштовхувальні білок-білкові взаємодії)  $\Delta\pi$  збільшувалось зі зростанням  $\pi_0$ . Цей ефект може мати місце, коли заряджені амінокислотні залишки не утворюють кластерів, а рівномірно розподіляються по поверхні молекули білка. Такого роду молекули не мають протяжних гідрофобних ділянок, які б сприяли міжмолекулярним контактам між білковими молекулами та проникненню адсорбату в моношар.

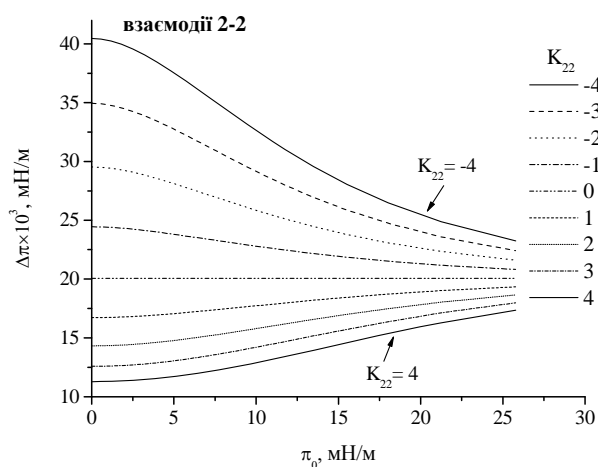


Рис. 5.12. Вплив білок-білкових взаємодій на залежності  $\Delta\pi(\pi_0)$ .

Тому, буде енергетично вигідною буде локалізація білків на поверхні ліпідів. Цукерман та Геймбург висунули гіпотезу, згідно з якою білки утворюють двовимірний газ на поверхні ліпідного бішару, який створює латеральний тиск на мембрані та викликає локальні зміни її кривизни [402]. Цей процес супроводжується стисненням мембрани біля зони білок-ліпідних контактів, результатом чого є зростання  $\Delta\pi$ .

**в) Білок-ліпідні та білок-білкові взаємодії ( $K_{12} \neq 0$ ,  $K_{22} \neq 0$ )**

У випадку, коли у системі реалізуються як білок-ліпідні, так і білок-білкові взаємодії, поведінка кривих  $x_2(\log(k))$  та  $\Delta\pi(\pi_0)$  залежить від відносних внесків



параметрів  $K_{12}$  та  $K_{22}$ . Наприклад, при  $K_{12} = 1$ ,  $K_{22} = -3$  (відштовхувальні білок-ліпідні та притягальні білок-білкові взаємодії), профілі  $\Delta\pi(\pi_0)$  мають негативний нахил, що свідчить про зменшення величини змін поверхневого тиску при зростанні  $\pi_0$ . У свою чергу, значення  $K_{12} = -2$ ,  $K_{22} = 4$  (притягальні білок-ліпідні та відштовхувальні білок-білкові взаємодії) призводять до висхідної кривої, віддзеркалюючи протилежний ефект (рис. 5.13).

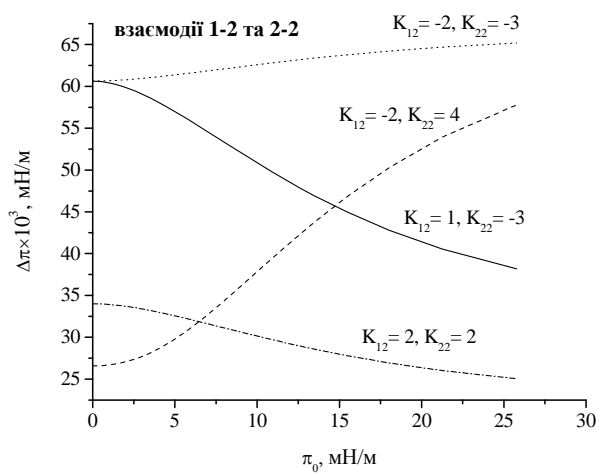


Рис. 5.13. Профілі сорбції білка для різних типів білок-ліпідних та білок-білкових взаємодій.

Варто відзначити, що коли обидва параметри мають негативні значення, криві  $\Delta\pi(\pi_0)$  характеризуються висхідним напрямком, тоді як для позитивних значень – низхідним напрямком. Ці спостереження означають, що внесок білок-ліпідних взаємодій в загальну поведінку залежностей  $\Delta\pi(\pi_0)$  превалює над внеском білок-білкових взаємодій. Цікаво, криві  $x_2(\log(k))$  мали сигмоїдну форму (дані не наведені), як і у випадку 1-2 та 2-2 взаємодій (див. вище). При цьому крутизна кривих була вищою у випадку притягальних білок-ліпідних взаємодій та відштовхувальних білок-білкових контактів.

### г) Порівняння з експериментальними результатами

Загальною тенденцією, виявленою у більшості експериментальних досліджень сорбції білків на поверхні ліпідного моношару є негативний нахил профілів  $\Delta\pi(\pi_0)$  [53,397]. Аналіз зв'язування амілоїдних фібрил лізоциму з ліпідним плівками також виявив низхідний напрямок кривих  $\Delta\pi(\pi_0)$  (див. підрозділ 5.2.1). У рамках теоретичного підходу, представленого в даній роботі,

такі спостереження означають, що підвищення початкового поверхневого тиску перешкоджає вбудовуванню фібрилярного лізоциму у ліпідний моношар. Тим не менш, рядом авторів була продемонстрована аномальна поведінка  $\Delta\pi(\pi_0)$ . Зокрема, нетипові двофазні криві  $\Delta\pi(\pi_0)$  були виявлені Бургером та ін. при дослідженні взаємодії гемагглютинину вірусу грипу з ліпідними моношарами [403]. Цей ефект був пояснений залежністю поверхневої активності білка від початкового поверхневого тиску моношару та ліпід-індукованими конформаційними переходами поліпептидного ланцюга.

Нелінійний взаємозв'язок між  $\Delta\pi$  та  $\pi_0$  був продемонстрований Кіратом та співавторами при вивченні асоціації фосфоліпази Д з ліпідними активаторами – діацилгліцеролом та фосфатидною кислотою [404]. Висхідна гіперболічна експериментальна крива була інтерпретована у рамках поверхневих білок – ліпідних взаємодій, які не супроводжуються проникненням фосфоліпази у регіон гідрофобних хвостів.

Неочікувана поведінка діаграм  $\Delta\pi(\pi_0)$  також спостерігалась у роботі [405] при дослідженні зв'язування протипухлинного препарату адриаміцину з ліпідними моношарами, що містили поліетиленгліколь (ПЕГ). Нелінійність кривих  $\Delta\pi(\pi_0)$  була пояснена ПЕГ-індукованою структурною реорганізацією ліпідного моношару, результатом чого є специфічна поверхнева орієнтація фармакологічного препарату. Такий ефект моношару сприяє стекінг-взаємодіям між молекулами адриаміцину та надає позитивної кооперативності асоціації препарату з ліпідами, що виражається у гіперболічній залежності  $\Delta\pi(\pi_0)$ . Окрім цього, нелінійні профілі  $\Delta\pi(\pi_0)$  були виявлені цими ж авторами при вивченні проникнення цитохрому *c* у нейтральні та негативно заряджені ліпідні моношари. Для пояснення цього ефекту, було зроблено припущення, що конформаційний стан зв'язаного білка та тип цитохром *c* – ліпідних взаємодій залежить від початкового поверхневого тиску моношару. Наведені приклади ілюструють, що залежність  $\Delta\pi(\pi_0)$  відображає складний взаємозв'язок між білок-ліпідними та

білок-білковими взаємодіями, а також структурно-динамічними змінами ліпідних та білкових молекул, які супроводжують ці взаємодії.

### 5.2.3. Вплив фібрилярних білкових агрегатів на неполярну зону ліпідного бішару

Окрім методу моношарів Ленгмюра, при дослідженні модифікуючої дії зрілих фібрил лізоциму на молекулярну організацію ліпідного бішару був застосований метод флуоресцентних зондів. Для з'ясування характеру модифікацій, що відбуваються на рівні ацильних ланцюгів, використовували мембранні зонди пірен та ДФГТ, які локалізуються у гідрофобній зоні ліпідного бішару. На рис. 5.9 зображено типові спектри флуоресценції пірену в модельних ліпідних мембранах при різних концентраціях фібрилярного білка.

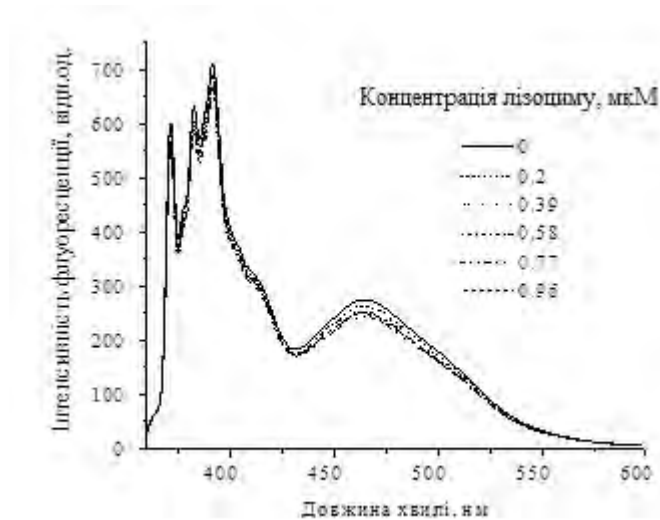
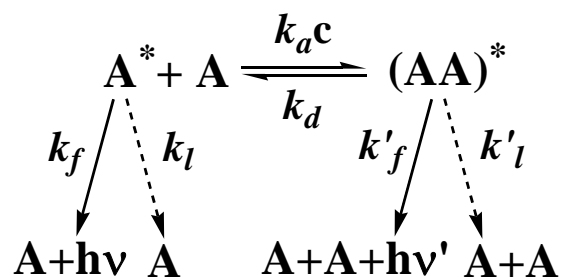


Рис. 5.9. Спектри флуоресценції пірену в ФХ ліпосомах. Концентрація ліпиду була 38.3 мкМ, пірену – 0.96 мкМ.

Інтенсивності флуоресценції мономерів та ексимерів були виміряні при довжинах хвиль 391 та 466 нм, відповідно. Як відзначалось у підрозділі 4.1.1, ексимеризація пірену є дифузійно-контрольованим процесом, що залежить від динамічних властивостей ліпідного бішару. Утворення збуджених димерів може бути описане наступною схемою:



де  $A$  та  $A^*$  – мономери пірену в основному та збудженому станах, відповідно,  $k_a$  – константа утворення димерів,  $k_f, k'_f$  – ймовірності випромінювального затухання збуджених мономерів та ексимерів, відповідно,  $k_l, k'_l$  – ймовірності безвипромінювального затухання,  $k_d$  – константа дисоціації ексимера.

Для кількісного опису ексимеризації пірена як дифузійно-контрольованого процесу було розроблено велику кількість теоретичних моделей [305,306,407-409]. Найбільшого поширення отримала модель «випадкового блукання», сформульована Монтролом [409] та розвинута Галла та співавторами [408]. В рамках цієї моделі ліпідний бішар розглядається як двомірна решітка, на якій мономери пірену утворюють підрешітку. Збуджені мономери розташовуються у центрах цієї підрешітки та є «пастками» для незбуджених молекул. Середня кількість кроків, які необхідно зробити незбудженому мономеру, щоб потрапити у «пастку» та утворити комплекс зі збудженою молекулою, дорівнює:

$$\langle n_s \rangle = \frac{2}{\pi f_{pyr}} \ln \frac{2}{f_{pyr}} \quad (5.1)$$

де  $f_{pyr}$  – молярна фракція центрів решітки, які зайняті піреном. Параметр  $\langle n_s \rangle$  пов'язаний із частотою зіткнень збудженого та незбудженого мономерів:

$$\nu_{col} = \langle n_s \rangle^{-1} \cdot \nu_j \quad (5.2)$$

де  $\nu_j$  – частота дифузійних кроків (кількість дифузійних кроків в секунду).

З іншого боку,  $\nu_{col}$  можна виразити наступним чином:

$$\nu_{col} = \frac{E}{M \cdot \kappa} \cdot \frac{k_f}{k'_f} \cdot \frac{1}{\tau_0^E} \quad (5.3)$$

де  $E$  та  $M$  – інтенсивності флуоресценції ексимерів та мономерів, відповідно,  $\kappa$  – коефіцієнт пропорційності між відношеннями квантових виходів та інтенсивностей флуоресценції ексимерів та мономерів,  $\tau_0^E$  – час життя ексимерів пірену.

Рівняння (5.3) може бути спрощено, якщо припустити, що  $\kappa \approx 0.8$ ,  $k_f/k'_f \approx 0.1$ ,  $\tau_0^E \approx 38$  нс [407,408].

Комбінуючи рівняння (5.1) – (5.3), отримуємо:

$$\nu_j = \frac{E}{M \cdot \kappa} \cdot \frac{k_f}{k'_f} \cdot \frac{1}{\tau_0^E} \cdot \frac{2}{\pi f_{pyr}} \ln \frac{2}{f_{pyr}} \quad (5.4)$$

Коефіцієнт дифузії пірену дорівнює:

$$D_{diff} = \frac{1}{4} \nu_j \cdot \lambda^2 \quad (5.5)$$

де  $\lambda \approx 0.8$  нм – середня довжина «стрибка» мономерної молекули. В рамках описаної вище моделі пірен розглядається як індикатор вільного об'єму ліпідного бішару, оскільки було показано, що саме наявність вільного об'єму в гідрофобній частині бішару визначає частоту зіткнень молекул пірену та його коефіцієнт дифузії. Вільний об'єм ліпідного бішару є наслідком утворення обертальних ізомерів ацильного ланцюга (так званих *гош-транс-гош* кінків) внаслідок термічних ундуляцій гідрофобних хвостів. Формування кінка призводить до латерального зміщення ланцюга, створюючи тим самим локальний вільний об'єм (рис. 5.10).

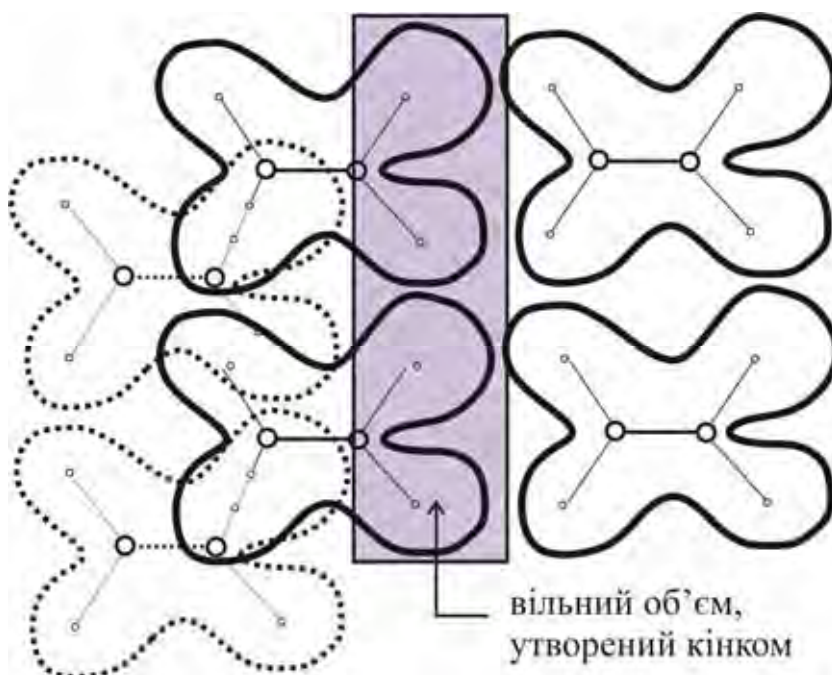


Рис. 5.10. Ілюстрація утворення вільного об'єму в гідрофобній ділянці ліпідного бішару.

Вид перпендикулярно площині мембрани. Контури представляють ван-дер-Ваальсові поверхні ацильних ланцюгів у напрямку, перпендикулярному осі ланцюга. Ліва половина відображає латеральне зміщення частини ланцюга внаслідок утворення кінка. Нова позиція цієї частини ланцюга після зміщення зображена пунктирними контурами.

Дифузійний крок молекули пірену вважається завершеним лише тоді, коли щілина, утворена в результаті перескоку молекули, закриється внаслідок зміщення дефекту сусіднього ланцюга. Таким чином, частота дифузійних кроків  $\nu_j$  прямо пропорційна частоті зміщення дефектів вздовж ацильного ланцюга,  $\nu_k$ :

$$\nu_j = \frac{2d_k^2}{L^2} \nu_k \quad (5.6)$$

де  $d_k = 0.13$  нм – це латеральне зміщення вуглеводневого ланцюга при утворенні кінка,  $L = 0.7$  нм – довжина молекули пірену.

Таблиця 5.2

Параметри ексімеризації пірену в ліпідних системах у відсутності фібрилярного лізоциму\*

	$I_I/I_{III}$	Е/М	$\nu_{col}$ , нс <sup>-1</sup>	$\nu_j$ , нс <sup>-1</sup>	$\nu_k$ , нс <sup>-1</sup>	$D_{diff}$ , см <sup>2</sup> с <sup>-1</sup> , $\times 10^{-8}$
ФХ	0.95	0.39	$1.28 \times 10^{-3}$	0.07	2.11	1.21
КЛ10	0.96	0.52	$1.71 \times 10^{-3}$	0.09	2.82	1.64
Хол30	0.94	0.34	$1.12 \times 10^{-3}$	0.06	1.84	1.13

\* похибка не перевищувала 6%

Таблиця 5.3

Параметри ексімеризації пірену в ліпідних системах у присутності амілоїдних фібрил лізоциму\*

	$I_I/I_{III}$	Е/М	$\nu_{col}$ , нс <sup>-1</sup>	$\nu_j$ , нс <sup>-1</sup>	$\nu_k$ , нс <sup>-1</sup>	$D_{diff}$ , см <sup>2</sup> с <sup>-1</sup> , $\times 10^{-8}$
ФХ	0.94	0.37	$1.22 \times 10^{-3}$	0.07	2.05	1.18
КЛ10	0.96	0.50	$1.65 \times 10^{-3}$	0.09	2.78	1.57
Хол30	0.93	0.32	$1.05 \times 10^{-3}$	0.06	1.81	0.99

\* похибка не перевищувала 6%

У табл. 5.2 та 5.3 наведено спектральні (ступінь ексімеризації пірену,  $E/M$ , та співвідношення інтенсивностей першої та третьої вібронних смуг,  $I_I/I_{III}$ ) та динамічні ( $\nu_{col}, \nu_j, \nu_k$  та  $D_{diff}$ ) характеристики ексімеризації пірену, розраховані на основі отриманих даних та рівнянь (5.1) – (5.6), у ліпідних та білок-ліпідних системах. Як проілюстровано у таблицях, жоден із досліджуваних параметрів пірену не зазнавав статистично значимих змін під дією фібрилярних агрегатів лізоциму. На основі отриманих даних можна зробити висновок, що амілоїдні фібрили лізоциму не впливають на динамічні властивості неполярної частини ліпідного бішару та величину вільного об'єму мембрани. Для перевірки цього твердження було використано інший мембранний неполярний зонд ДФГТ, анізотропія флуоресценції якого корелює зі змінами в'язкості мембрани [232]. Вимірювання анізотропії ДФГТ, виконані у ряді досліджень з метою з'ясування цитотоксичних ефектів амілоїдних білків, привели до суперечливих висновків [311,410]. Так, в роботах Кремера та ін. за допомогою ДФГТ було показано, що агрегований  $\beta$ -амілоїдний пептид взаємодіє з неполярною областю мембрани та зменшує текучість бішарів, що складались із аніонних, катіонних та цвіттеріонних ліпідів [311]. Мюлер та співавтори виявили аналогічну дію  $A\beta$ -пептиду на мембрани клітин головного мозку людини [410]. При цьому вплив білка на текучість мембран на границі розділу ліпід/вода виявився кількісно меншим, ніж на рівні ацильних ланцюгів. Натомість, згідно з даними Ма, агрегований  $A\beta$ -пептид модифікує, здебільшого, поверхневу частину бішару та спричиняє незначний вплив на його гідрофобну область [411]. Розбіжності в отриманих даних можуть бути обумовлені гетерогенністю та поліморфізмом амілоїдних агрегатів. Нещодавні дослідження показали, що різні дестабілізуючі умови змінюють фолдінг одного й того ж білка різними шляхами, в результаті чого утворюються олігомери з різними конформаційними властивостями, які, у свою чергу, утворюють поліморфні зрілі фібрили [117,145]. Виявлено, що структурний поліморфізм амілоїдів у значній мірі визначає особливості їх взаємодії з плазматичними мембранами та, як наслідок, на характер і ступінь пошкодження ліпідного бішару [412]. На рис. 5.11 наведено результати вимірювання анізотропії

ДФГТ в ФХ, КЛ10 та Хол30 ліпідних везикулах у відсутності та присутності лізоциму. Як видно з рисунку, досліджуваний спектральний параметр залишався практично незмінним зі зростанням концентрації амілоїдних фібрил лізоциму.

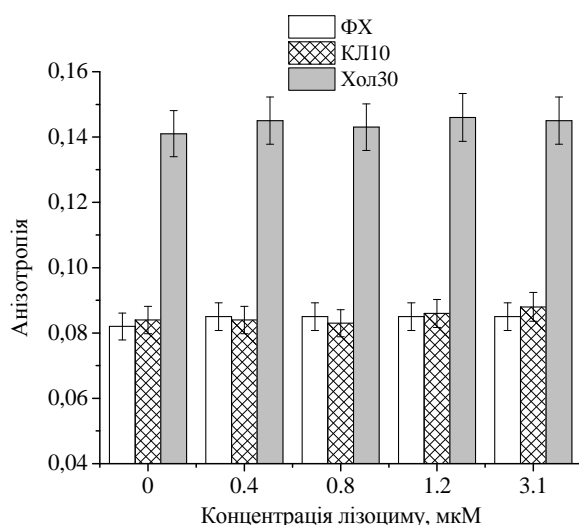


Рис. 5.11. Анізотропія флуоресценції ДФГТ у ліпосомах різного складу як функція концентрації амілоїдних фібрил лізоциму. Концентрація ліпиду складала 173.9 мкМ, концентрація зонду – 1.8 мкМ

Таким чином, сукупність даних, отриманих з використанням пірену та ДФГТ, дозволяє зробити висновок, що фібрилярний лізоцим не взаємодіє з неполярною частиною ліпідного бішару та не модифікує його структурно-динамічних властивостей у цій частині мембрани.

#### 5.2.4. Зміни фізико-хімічних властивостей полярної зони мембрани під дією амілоїдних фібрил лізоциму

У подальших експериментах, для дослідження впливу фібрил лізоциму на поверхню розділу ліпід/вода використовували флуоресцентні зонди Лаурдан та МБА. МБА має ряд особливостей, які обумовлюють його широке застосування у якості молекули-репортера при дослідженні мембранних процесів. Зокрема, МБА практично не розчиняється у воді та легко асоціює з мембранами у водному оточенні, що супроводжується значним посиленням інтенсивності його флуоресценції. Зважаючи на те, що флуоресценція МБА сильно гаситься водою, цей зонд характеризується надзвичайно високою чутливістю до ступеня гідратації ліпідного бішару. У високоанізотропних середовищах, таких як клітинні мембрани, популяція молекул зонду гетерогенна [320]. МБА, подібно до інших



зондів, розподіляється у мембрані між двома центрами зв'язування, які розташовані на рівні фосфатних груп та гліцеринового остову. Відповідно, спектр флуоресценції МБА у ліпідних везикулах може бути представлений сумою двох компонент з максимумами близько 520 та 560 нм. Форма та позиція максимуму загального спектру випромінювання МБА визначаються відносними внесками цих компонент.

На рис. 5.12 представлені результати деконволюції спектрів флуоресценції МБА на дві компоненти у різних ліпідних та білок-ліпідних системах, а також внесок короткохвильової компоненти (R1) у сумарну емісію зонду. Отримані дані показують незначне, але статистично значиме зростання R1 при зв'язуванні фібрилярного лізоциму з усіма типами модельних мембран. Зростання внеску короткохвильової спектральної компоненти МБА може бути спричинено зниженням концентрації молекул води в поверхневій області мембрани, що призводить до збільшення квантового виходу цієї компоненти і/або переміщенням молекул зонду із регіону фосфатних груп до області гліцеринових залишків. Оскільки подібні за величиною ефекти були виявлені у ліпідних везикулах, що складались з ФХ, ФХ:КЛ (10%) и ФХ:Хол (30%), найбільш імовірним поясненням збільшення R1 може бути дегідратація ліпідного бішару під дією амілоїдних фібрил лізоциму. На наступному етапі досліджень були проведені вимірювання анізотропії флуоресценції МБА. Як зазначалося у підрозділі 5.2.2, анізотропія та поляризація флуоресценції зонду надають інформацію про середнє кутове зміщення флуорофору між поглинанням та випромінюванням фотонів. Це зміщення залежить від швидкості обертальної дифузії зонду за час збудженого стану. Дифузійні рухи, у свою чергу, визначаються в'язкістю розчинника. Зміни анізотропії флуоресценції МБА під впливом фібрил лізоциму наведені на рис. 5.13 та у табл. 5.4.

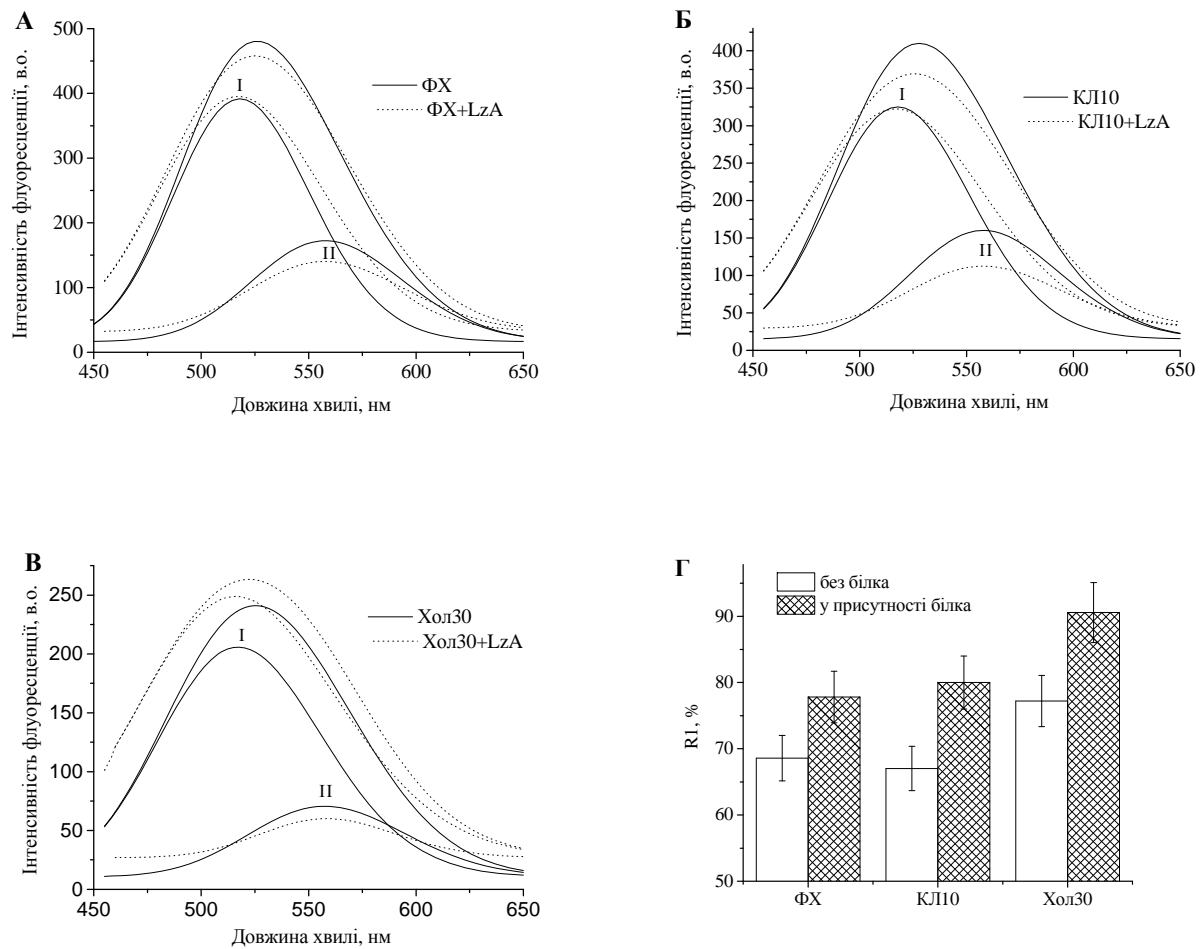


Рис. 5.12. Розкладання спектрів флуоресценції МБА в ліпосомах на дві компоненти у ліпідних везикулах у відсутності та присутності амілоїдного лізоциму (3.1 мкМ). А – ФХ, Б – КЛ10, В – Хол30, Г – відносний внесок короткохвильової флуоресцентної форми зонду в сумарний спектр. Концентрація ліпиду складала 19 мкМ, концентрація МБА – 0.5 мкМ.

Таблиця 5.4

Зміни анізотропії МБА під впливом фібрилярних агрегатів лізоциму

Концентрація білка, мкМ	ФХ	КЛ10	Хол30
0	0.035±0.001	0,038±0.002	0.052±0.002
0.4	0.044±0.001	0.050±0.002	0.065±0.001
0.8	0.053±0.001	0.064±0.001	0.080±0.001
1.2	0.062±0.001	0.077±0.001	0.092±0.001
3.1	0.156±0.001	0.122±0.001	0.162±0.001

Як можна бачити з наведених даних, додавання фібрил лізоциму призвело до значного зростання анізотропії флуоресценції МБА навіть при низькій концентрації білка (0.4 мкМ) – близько 26 % у ФХ ліпосомах, 32 % у КЛ10 та 25 % у Хол30 ліпідних везикулах.

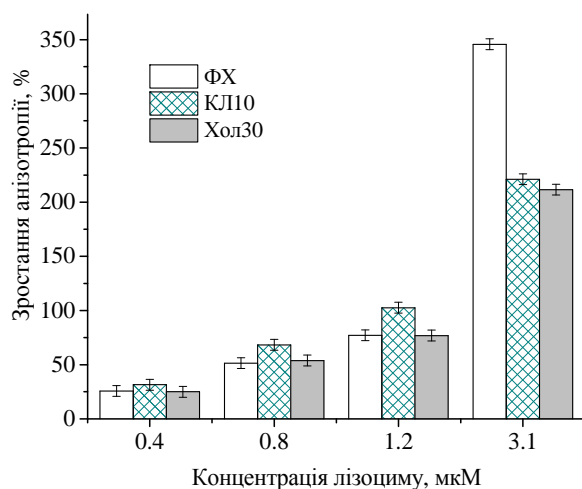


Рис. 5.13. Відносне збільшення анізотропії флуоресценції МБА під дією амілоїдних фібрил лізоциму. Концентрація ліпиду 19 мкМ, концентрація МБА 0.5 мкМ.

З ростом концентрації лізоциму до 3.1 мкМ значення анізотропії збільшилось приблизно в 4 рази у ФХ ліпосомах та 3 рази в інших модельних мембранах. Підвищення анізотропії відображає зниження рухливості зонду у присутності амілоїдних фібрил і, отже, підвищення мікров'язкості мембран під впливом високовпорядкованих агрегатів лізоциму.

Для отримання додаткової інформації щодо мембрано-модифікуючих властивостей фібрил лізоциму було залучено флуоресцентний зонд Лаурдан, спектральні особливості якого описані у підрозділі 4.2.2. Максимум випромінювання цього зонду характеризується високою чутливістю до щільності пакування ліпідних молекул та ступеня гідратації ліпідного бішару. Так, наприклад, у стані гелю максимум флуоресценції Лаурдану знаходиться близько 440 нм, тоді як у рідиннокристалічному стані – близько 490 нм. При температурах вище фазового переходу зростання температури приводить до червоного зсуву піку емісії. Цей зсув пояснюється підвищенням концентрації та рухливості молекул води в області гліцеринового остову. При температурах нижче фазового переходу ліпідні молекули щільно упаковані, тому довгохвильового зсуву максимуму не спостерігається.

Зміни спектральних властивостей флуоресценції Лаурдану можуть бути кількісно охарактеризовані параметром узагальненої поляризації (GP). Цей параметр визначається процесами релаксації диполів розчинника, які відбуваються за той час, коли Лаурдан знаходиться у збудженому стані. Узагальнену поляризацію розраховували за формулою (2.6), інтенсивності ( $I_B$ ) та ( $I_R$ ) були взяті на довжинах хвиль 440 та 490 нм відповідно.

Значення GP Лаурдану в залежності від концентрації амілоїдного білка у трьох типах ліпідних везикул показано на рис. 5.14. Як можна бачити з наведених даних, у ФХ ліпосомах та везикулах, що містили КЛ, значення GP було негативним (близько -0.10 і -0.08, відповідно), що вказує на переважну локалізацію молекул Лаурдану у більш полярному оточенні. Однак, у холестерин-вміщуючих везикулах узагальнена поляризація Лаурдану виявилась позитивною (близько 0.16), що відображає розподіл молекул зонду на менш полярних ділянках ліпідного бішару.

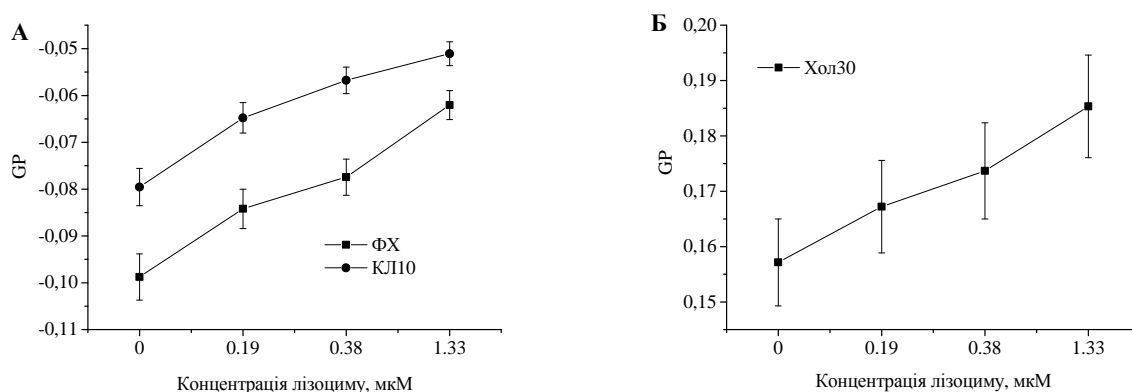


Рис. 5.14. Залежності узагальненої поляризації флуоресценції Лаурдану від концентрації амілоїдних фібрил лізоциму. А – ФХ, ФХ:КЛ (10 %), Б – ФХ:Хол (30 %). Концентрація ліпиду складала 58 мкМ, Лаурдану – 0.17 мкМ

Додавання амілоїдних фібрил лізоциму призвело до зростання значення GP у всіх досліджуваних модельних системах. Збільшення даного параметру може бути пояснено зниженням рівня гідратації бішару та підвищенням щільності пакування ліпідів. Варто відзначити, що у ліпосомах, які містили 30 мол% холестерину, відносні зміни GP виявились значно меншими (близько 18%), у порівнянні з ФХ

везикулами (близько 37%). Ці дані свідчать про те, що холестерин перешкоджає зв'язуванню фібрилярних агрегатів з мембраною. Превентивна роль холестерину при модифікації структури мембран олігомерними агрегатами лізоциму описана у підрозділі 4.1.2 та підтверджується результатами ряду робіт [328,410,413]. Зокрема, показано, що підвищення вмісту холестерину пригнічує процеси агрегації та злиття ліпосом, індуковані A $\beta$  (1-40) пептидом [328]. Окрім того, було встановлено, що плазматичні мембрани, які мають високий вміст холестерину, відзначаються високою резистентністю до модифікуючої дії пре-фібрилярних агрегатів [413].

Таким чином, результати досліджень, описаних в даному підрозділі, дають підстави зробити висновок, що фібрилярні агрегати лізоциму взаємодіють лише з поверхневою областю мембрани, не проникаючи в її гідрофобну зону. Цей факт може бути пояснений структурними особливостями амілоїдних фібрил білка. Для того, щоб вбудуватись в неполярну зону ліпідного бішару, агрегати лізоциму повинні мати експоновані гідрофобні ділянки. У даному контексті заслуговує на увагу припущення щодо амфіфільних властивостей протофібрил: гідрофобна поверхня фібрили взаємодіє з неполярною зоною бішару, а гідрофільні фрагменти відповідають за структурно-динамічні дефекти мембрани [414]. Окрім цього, було виявлено існування кореляції між конформаційними і структурними (експонування гідрофобних ділянок та еластичність) властивостями амілоїдних ансамблів та їх здатністю змінювати проникність клітинних мембран. Наприклад, високоеластичні, менш компактні олігомери НурF-N з протяжними експонованими гідрофобними зонами виявились більш токсичними, ніж інші конформаційні варіанти білка [415]. Було також показано, що структурні та динамічні властивості амілоїдних фібрил лізоциму обумовлюють їх цитотоксичність. Зокрема, фібрилярні агрегати, утворені при фізіологічному рН, були менш впорядковані та спричиняли більш виражений цитотоксичний ефект, у порівнянні з високовпорядкованими фібрилами, утвореними при кислих рН, які мали незначний вплив на життєздатність клітин [375]. Поряд з цим, важливість такого чинника, як гідрофобність поверхні амілоїдних фібрил, у зниженні

текучості мембрани була продемонстрована для A $\beta$ -пептиду [311]. Зважаючи на вищесказане, можна зробити висновок, що висока впорядкованість та стабільність, разом із незначною кількістю експонованих залишків та високим поверхневим зарядом перешкоджають вбудовуванню фібрилярного лізоциму у неполярну область ліпідного бішару. Тому взаємодія відбувається у полярній зоні мембрани, де амілоїдний білок викликає структурні зміни на рівні полярних голівок фосфоліпідів.

#### *5.2.5. Амілоїдні фібрили як конкурентний ліганд для мембранних білків*

У попередніх підрозділах були отримані докази на користь модифікуючої дії амілоїдного лізоциму на структурно-динамічні властивості ліпідного бішару. Однак, в біологічних мембранах порушення цілісності бішару може призвести до зміни функціонального стану іншого важливого компоненту мембрани – мембранних білків. Існують дані про те, що зміни конформаційного стану та біологічної активності мембраноасоційованих білків є результатом їх прямих взаємодій з фібрилярними агрегатами [416]. Дослідження, представлені в даному підрозділі, спрямовані на з'ясування закономірностей впливу фібрилярних агрегатів лізоциму на взаємодії мембранного мітохондріального білка цитохрому *c* з ліпідним бішаром. Вибір цитохрому *c* в якості модельного білка був продиктований існуванням так званої мітохондріальної каскадної гіпотези амілоїдогенезу. Ця гіпотеза постулює, що дисфункція мітохондрій є початковим етапом акумуляції амілоїдних фібрил в тканинах, синаптичної дегенерації та утворення нейрофібрилярних клубків [417].

Модельні ліпідні мембрани були представлені ліпідними везикулами, що склалися з ФХ та його сумішей з 10, 20, 40 мол% ФГ чи ФС або 5.3, 11.1 та 25 мол% КЛ. Амілоїдні агрегати лізоциму були сформовані, як описано в підрозділі 2.6. Фібрилярна структура агрегатів була підтверджена трансмісійною електронною мікроскопією (рис. 5.1). Для дослідження зв'язування цитохрому *c* з модельними мембранами та з'ясування впливу мономерного (LzN) або полімеризованого (LzF) лізоциму, вимірювали ефективність переносу енергії між

антрілвініл-міченим ФХ (АВ-ФХ) у якості донора та гемовою групою цитохрому *c* у якості акцептора. На основі даних  $^1\text{H}$ -ЯМР та гасіння флуоресценції було показано, що АВ-флуорофор локалізується на рівні кінцевих метиленових груп ліпідів, розташовуючись паралельно ацильним ланцюгам [418]. Спектр випромінювання АВ-ФХ перекривається зі спектром поглинання цитохрому *c*, що обумовлює відносно високе значення радіусу Фьорстера (4.7 нм, [341]).

Як проілюстровано на рис. 5.15, ІРПЕ між АВ-ФХ та цитохромом *c* супроводжується значним зниженням інтенсивності флуоресценції АВ-ФХ та, відповідно, квантового виходу ( $Q_r$ ) при зростанні концентрації білка. При дослідженні конкуренції між цитохромом *c* та лізоцимом за місця зв'язування з ліпідним бішаром, експерименти ІРПЕ були проведені у двох форматах: а) при фіксованій концентрації цитохрому *c* варіювали концентрацію лізоциму (формат F1), та б) при фіксованій концентрації лізоциму варіювали концентрацію цитохрому *c* (формат F2).

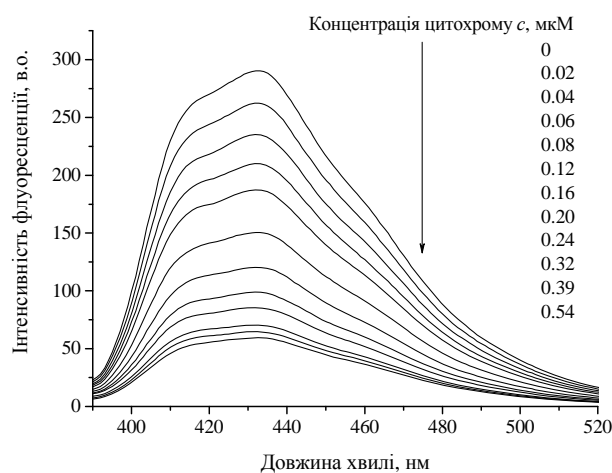


Рис. 5.15. Спектр флуоресценції АВ-ФХ в ФГ20 мембранах при різних концентраціях цитохрому *c*. Концентрація ліпиду була 40 мкМ.

На рис. 5.16 представлено відносний квантовий вихід АВ-ФХ як функцію концентрації лізоциму в різних мембранних системах.

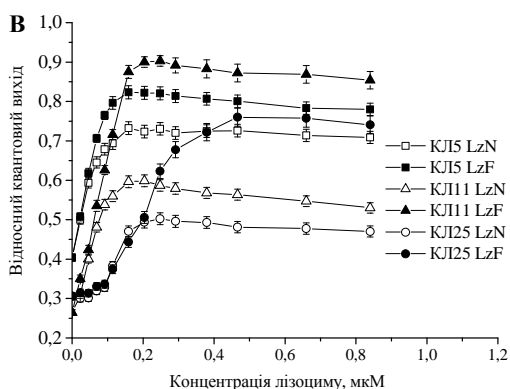
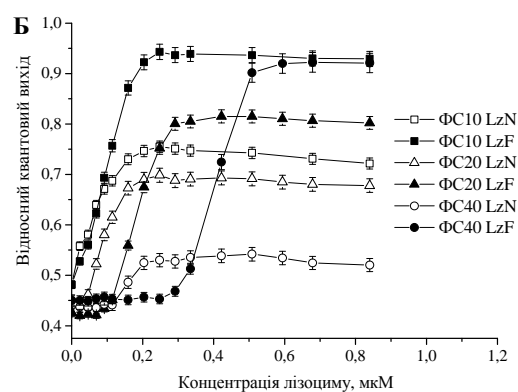
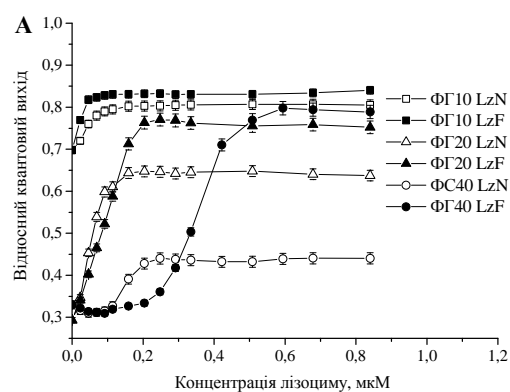


Рис. 5.16. Відносний квантовий вихід АВ-ФХ в білок-ліпідних системах як функція концентрації лізоциму. Концентрація ліпиду була 10 мкМ, концентрація цитохрому  $c$  – 0.08 мкМ.

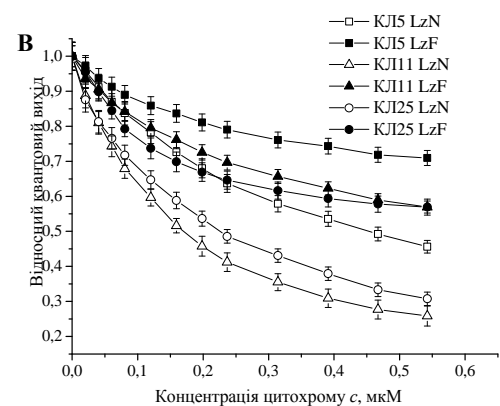
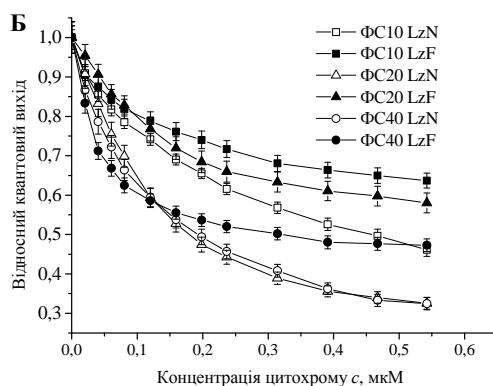
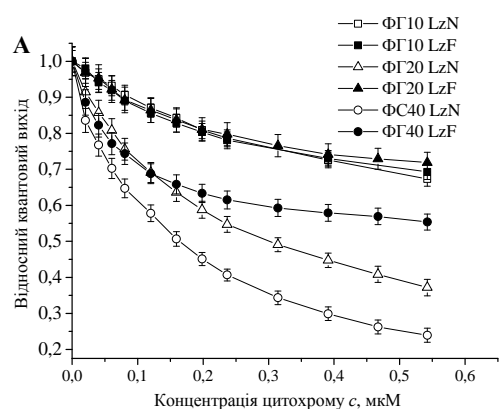


Рис. 5.17. Відносний квантовий вихід АВ-ФХ в білок-ліпідних системах як функція концентрації цитохрому  $c$ . Концентрація ліпиду була 10 мкМ, лізоциму – 0.5 мкМ.



Основний висновок, який можна зробити на основі аналізу цих кривих, полягає в тому, що фібрилярний лізоцим викликає більш ефективну десорбцію цитохрому *c*, у порівнянні з нативним білком. Однак, поведінка лізоциму як конкурентного ліганду виявилась залежною від хімічної природи фосфоліпідів та поверхневого заряду мембрани. Зокрема, у ФГ10 практично не було різниці між LzN та LzF, тоді як у ФС10 та КЛ5 ліпосомах ступінь дисоціації цитохрому *c* з мембрани, викликаной LzF, був вищим, ніж у LzN. Ця тенденція була підтверджена також результатами вимірювання ІРПЕ у форматі F2 (рис. 5.17). Окрім цього, додавання LzF до ФГ40 чи ФС40 везикул супроводжувалось зростанням порогової концентрації білка, при якій починалась десорбція, порівняно з LzN. Натомість, у випадку КЛ25 початок дисоціації цитохрому *c* відповідав приблизно однаковим концентраціям LzN та LzF. При дослідженні взаємодій між катіонними білками та негативно зарядженими ліпосомами необхідно брати до уваги можливість агрегації везикул внаслідок нейтралізації їх поверхневого заряду. Для оцінки ступеня кореляції лізоцим-індукованої дисоціації комплексів цитохрому *c* з ліпідами із утворенням мультивезикулярних структур були проведені експерименти по динамічному світлорозсіянню. На рис. 5.18, А показано, як впливає лізоцим, у мономерній та фібрилярній формі, на агрегацію ліпосом. У присутності LzN розмір ліпідних везикул починав зростати при концентрації білка 0.1 мкМ, тоді як у присутності LzF діаметр везикул залишався постійним навіть при концентрації білка 0.4 мкМ. На додаток, порівняння концентраційних залежностей відносного квантового виходу АВ-ФХ та нормованого середнього розміру ліпідних везикул виявило відсутність кореляції між десорбцією цитохрому *c* при зв'язуванні лізоциму та агрегацією модельних ліпідних мембран (рис. 5.18, Б). Для отримання додаткової інформації стосовно впливу лізоциму на цитохром *c* – ліпідні взаємодії, експерименти по переносу енергії та світлорозсіянню були доповнені аналізом гасіння триптофаної флуоресценції лізоциму.

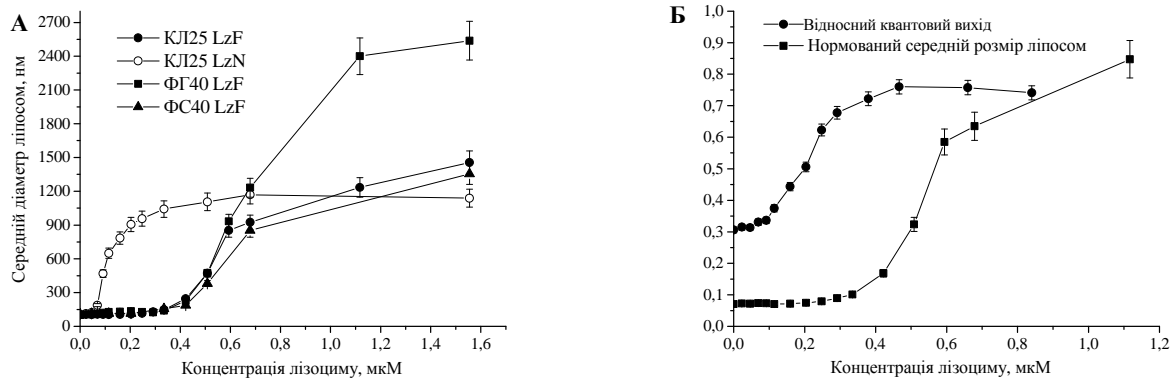


Рис. 5.18. Середній діаметр ліпосом як функція концентрації лізоциму (А). Порівняння концентраційних залежностей середнього розміру везикул та відносного квантового виходу АВ-ФХ у КЛ 25 ліпосомах (Б). Концентрація ліпиду складала 10 мкМ.

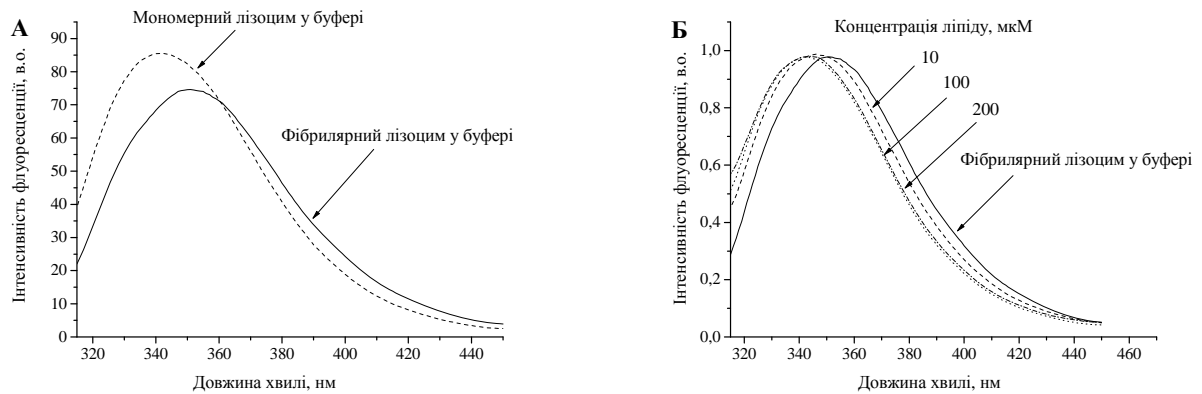


Рис. 5.19. Спектри флуоресценції мономерного та фібрилярного лізоциму у буферному розчині (20 мМ HEPES, 0.1 мМ EDTA, рН 7.4), записані при довжині хвилі збудження 296 нм (А). Зсув максимуму випромінювання фібрилярного лізоциму при асоціації з ФГ40 ліпідними везикулами (Б).

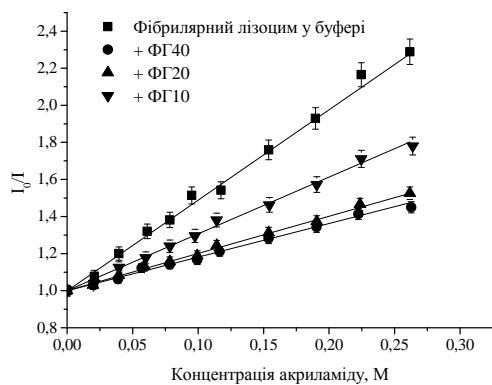


Рис. 5.20. Типові профілі гасіння власної флуоресценції фібрилярного лізоциму акриамідом. Довжина хвилі випромінювання була 352 нм. Концентрація ліпиду складала 100 мкМ, білка – 0.95 мкМ.

Відомо, що 80% власної флуоресценції лізоциму визначається двома флуорофорами, Trp<sub>62</sub> та Trp<sub>108</sub>, розташованими на поверхні молекули білка [419]. Ці флуорофори мають максимуми випромінювання ( $\lambda_{em}$ ) при 352 та 342 нм, відповідно. Решта флуоресценції належить Trp<sub>28</sub> та Trp<sub>111</sub>, які локалізуються в гідрофобному кармані білка, з  $\lambda_{em}$  близько 323 нм [420].

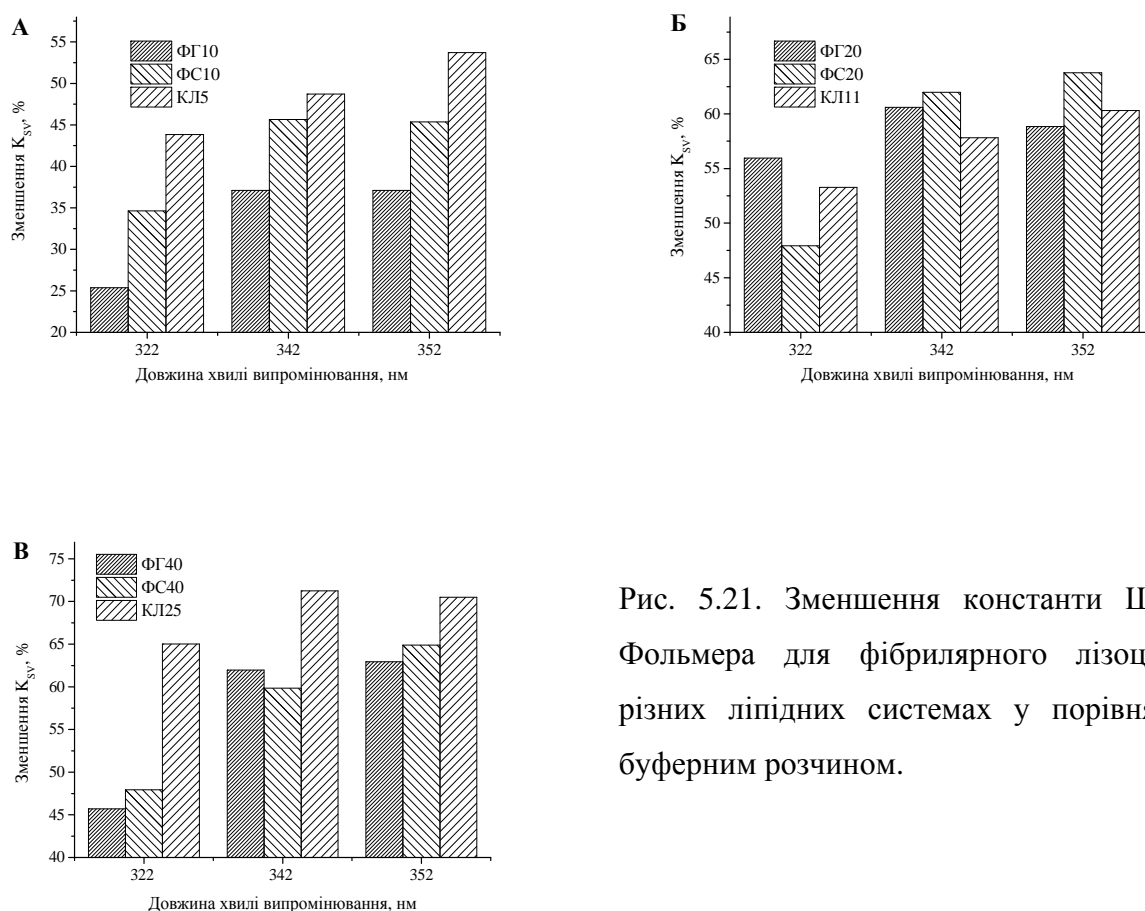


Рис. 5.21. Зменшення константи Штерна-Фольмера для фібрилярного лізоциму в різних ліпідних системах у порівнянні із буферним розчином.

Суперпозиція спектральних внесків від флуорофорів з різною локалізацією дає відносно широкий спектр випромінювання мономерного лізоциму з  $\lambda_{em} \sim 340$  нм. Натомість, максимум флуоресценції фібрилярного білка зсувається на 10 нм у червону область, що може бути результатом часткового розгортання білка за умов високої кислотності (рис. 5.19, А). Як продемонстровано на рис. 5.19, Б, зв'язування LzF з ліпосомальними мембранами супроводжувалось короткохвильовим зсувом максимуму випромінювання з 352 до 343 нм, що віддзеркалює зниження доступності триптофанових залишків для розчинника. На рис. 5.20 наведені типові графіки Штерна-Фольмера для гасіння флуоресценції LzF полярним гасником акриламідом. Апроксимація представлених залежностей

рівнянням 2.12 дозволила отримати значення констант Штерна-Фольмера. Як видно з табл. 5.5, ці константи залежать від довжини хвилі випромінювання, що свідчить про різну доступність окремих залишків триптофану для гасника. Окрім цього, перехід LzF з вільного у мембранозв'язаний стан призводив до зниження константи Штерна-Фольмера, причому величина цього ефекту була більш виражена при зростанні довжині хвилі випромінювання (рис. 5.21).

Основною метою даного етапу досліджень було порівняння мембранних взаємодій мономерного та фібрилярного лізоциму з акцентом на конкурентне зв'язування двох лігандів (лізоциму та цитохрому *c*). Ступінь зв'язування цитохрому *c* з ліпосомами було оцінено за допомогою ІРПЕ для донорно-акцепторної пари АВ-ФХ – гем.

Таблиця 5.5

Константи Штерна-Фольмера для гасіння власної флуоресценції фібрилярного лізоциму акриламідом

Система	Довжина хвилі випромінювання, нм		
	322	342	352
Буфер	3.0±0.15	4.5±0.13	4.9±0.14
ФГ40	1.6±0.03	1.7±0.03	1.8±0.02
ФГ20	1.3±0.05	1.8±0.04	2.0±0.04
ФГ10	2.2±0.02	2.8±0.04	3.1±0.05
ФС40	1.6±0.02	1.8±0.03	1.7±0.03
ФС20	1.6±0.03	1.7±0.03	1.8±0.04
ФС10	1.9±0.03	2.4±0.02	2.7±0.04
КЛ25	1.0±0.03	1.3±0.02	1.4±0.03
КЛ11	1.4±0.02	1.9±0.04	1.9±0.04
КЛ5	1.7±0.03	2.3±0.03	2.3±0.03

Зростання відносного квантового виходу АВ-ФХ, викликане лізоцимом, може бути пояснене дисоціацією цитохром *c* – ліпідних комплексів. Більш того,

мономерний та фібрилярний лізоцим показали різну здатність заміщувати мембранозв'язаний цитохром *c*. Це проявлялось як у ступені десорбції, так і в залежності цього процесу від концентрації лізоциму. Як видно з рис. 5.16, в області виходу кривих на плато, яка відповідає максимальній десорбції цитохрому *c*, LzF характеризується більшою здатністю конкурувати за центри зв'язування на мембрані порівняно з LzN, особливо в ліпосомах з високим вмістом аніонних ліпідів. Наприклад, при концентрації лізоциму  $\sim 0.7$  мкМ, зростання  $Q_r$ , викликане LzF у ФГ40, ФС40 та КЛ25 системах було на 80, 76 та 58% більшим, ніж для LzN. Окрім цього, характер конкурентного зв'язування з мембранами відрізнявся для фібрилярного та мономерного лізоциму при найвищій молярній фракції аніонних ліпідів. Так, криві десорбції для ФГ40, ФС40 та КЛ25 ліпосом мали сигмоїдну форму, причому крутизна кривих була більша для LzF (рис. 5.16), що може бути наслідком кооперативності процесу дисоціації комплексів цитохрому *c* з ліпідами.

Адсорбція білків на поверхні мембрани – це складний процес, який контролюється ван-дер-Ваальсовими та електростатичними взаємодіями, гідрофобним ефектом та короткодійними силами стеричного відштовхування. Теоретичні дослідження термодинаміки та кінетики адсорбції у двокомпонентній системі заряджених модельних білків висвітлюють важливість молекулярних параметрів, таких як розмір, форма, розподіл зарядів, у визначенні конкурентної поведінки білка [421]. Зважаючи на те, що лізоцим ( $pI \sim 11$ ) та цитохром *c* ( $pI \sim 10.2$ ) мають високий позитивний заряд ( $\sim +9e$ ), їх зв'язування з негативно зарядженими мембранами ініціюється, головним чином, електростатичними взаємодіями. За умов сильної кислотності,  $pH$  2 (фібрилізуючі умови), заряд лізоциму досягає  $+15e$ . Примітно, що саме відштовхування між білковими мономерами сприяє росту фібрил, тоді як притягання приводить до осадження білка [422]. До того ж, припускається, що ступінь відштовхування визначає морфологію фібрилярних структур [392]. При низькій іонній силі обмеження, які накладаються відштовхуванням, можуть бути подолані лише при утворенні довгих зрілих фібрил лізоциму, які складаються з трьох мономерних філаментів. Нещодавні дослідження вказують на загальний заряд фібрил як один з основних

фізичних детермінантів цитотоксичності амілоїдів [392]. Той факт, що фібрилярним агрегатам лізоциму притаманна більш виражена модифікуюча дія на структурно-динамічний стан ФХ/ФГ мембран, порівняно з мономерним білком, був пояснений посиленням електростатичних взаємодій внаслідок збільшення густини поверхневого заряду при агрегації білка. На додаток, позитивно заряджені фібрили лізоциму відрізнялись за своєю мембранотропною активністю від негативно заряджених фібрил А $\beta$ -пептиду [423]. На основі цих фактів Хірано та ін. припустили, що незважаючи на підвищену гідрофобність лізоциму внаслідок фібрилізації, електростатичні взаємодії є вирішальними для білок-ліпідного зв'язування та пошкодження бішару [392]. Аналогічним чином, ймовірно, електростатика відіграє важливу роль у десорбції цитохрому *c* з ліпідного бішару. Це припущення узгоджується з результатами гасіння власної флуоресценції лізоциму. Той факт, що зменшення константи Штерна-Фольмера при зв'язуванні LzF з ліпідними везикулами є більш вираженим при зростанні поверхневого заряду ліпосом, свідчить про значимість електростатичної компоненти в асоціації фібрилярного лізоциму з мембранами. Конкурентні взаємодії фібрил лізоциму та глобулярного цитохрому *c* з ліпідними везикулами можуть бути проаналізовані в рамках моделі конкуренції великих лігандів лінійної та сферичної форми [424]. У випадку електростатично-контрольованої адсорбції рівноважна константа асоціації має електростатичну та неелектростатичну компоненти [164]. Електростатична компонента залежить від поверхневого потенціалу бішару, експериментальних умов (рН та іонної сили) та ступеня покриття мембрани білком. З ростом вмісту аніонних ліпідів, цитохром *c* – ліпідні взаємодії посилюються, та число центрів зв'язування білка на мембрані зростає, тому вища концентрація лізоциму необхідна для зниження заряду бішару та, відповідно, константи комплексоутворення цитохрому *c* з ліпідами, до значень, при яких починається конкуренція між білками. Це може бути причиною ефекту існування порогової концентрації лізоциму, який спостерігався у ФГ40, ФС40 та КЛ25 везикулах. Той факт, що у Ф40 та ФС40 системах необхідні вищі концентрації LzF, ніж LzN для індукування дисоціації цитохрому *c* означає, що

мономерна та фібрилярна форми білка відрізняються за типом взаємодії з мембраною та величиною константи асоціації. Хоча в рамках даної роботи точне значення молекулярної ваги LzF не визначалось, дані електронної мікроскопії свідчать про те, що довжина фібрил лізоциму перевищує 2 мкм, тобто ступінь полімеризації вище 500. З огляду на це, асоціація ліпосом з амілоїдним лізоцимом, напевне, включає сорбцію декількох везикул на одній фібрилі або ж обгортання фібрили навколо везикули. Варто зауважити, що не було виявлено однозначного взаємозв'язку між зарядом мембрани та ступенем білок-білкової конкуренції. Зокрема, для ФГ20, ФС20 та КЛ11 бішарів, які мають приблизно однакові значення електростатичного потенціалу (-92, -80 та -79 мВ, відповідно),  $Q_r$  збільшився у 2.6, 1.9 та 3.2 рази при додаванні LzF. На основі цього можна зробити висновок, що кількість десорбованого цитохрому *c* контролюється не лише електростатичними чинниками. У цьому аспекті, такі мембранні характеристики, як конформація ліпідів, розподіл поверхневого заряду, здатність полярних голівок утворювати водневі зв'язки, щільність пакування ліпідних молекул, також можуть відігравати істотну роль. Важливість специфічних взаємодій між фібрилярним лізоцимом та фосфоліпідними голівками підтверджується тим спостереженням, що зміни константи гасіння відрізняються для ліпідних бішарів з однаковим поверхневим зарядом (рис. 5.21). Згідно з моделлю дискретних класів триптофанових залишків, запропонованою Бурштейном,  $\lambda_{em}$  для флуорофорів, повністю експонованих у розчин, становить 350 – 353 нм, для флуорофорів, доступних для молекул зв'язаної води з обмеженою рухливістю, ці значення коливаються у межах 340 – 342 нм, а для триптофанів у гідрофобному ядрі білка – 316 – 332 нм [337]. Зважаючи на цю класифікацію, вищезгаданий блакитний зсув випромінювання LzF з 352 до 343 нм може бути пояснений переносом головних триптофанових залишків фібрилярного лізоциму у примембранну область, яка містить шар гідратованої води.

### **5.3. Модифікація фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару під дією амілоїдних фібрил фрагментів апоА-I**

Фібрилізація аполіпопротеїну А-I лежить в основі патогенезу спадкового та системного амілоїдозу. Генетичні мутації пептиду порушують його функціональну активність та підвищують агрегаційний потенціал. У більшості випадків амілодні фібрили, утворені *in vivo*, сформовані N-термінальним фрагментом аполіпопротеїну А-I. Зокрема, було виявлено, що N-кінцевий фрагмент, який охоплює залишки 1-83, відіграє ключову роль в утворенні фібрилярних структур [425,426]. При цьому, мутація G26R, відома як мутація Айова, значно підвищує здатність N-термінального фрагменту апоА-I переходити в амілоїдний стан. Молекулярною основою прискорення росту амілоїдних агрегатів вважається структурна реорганізація поліпептиду, результатом чого є експонування гідрофобних ділянок на поверхні молекули та її перехід в амілоїдогенну конформацію [427].

#### 5.3.1. Спектральні властивості пірену в системі ліпосоми+фібрилярний апоА-I 83

На рис. 5.22 представлено типові спектри флуоресценції пірену, інкорпорованого у ліпідні везикули, у відсутності та присутності мутантів апоА-I 83.

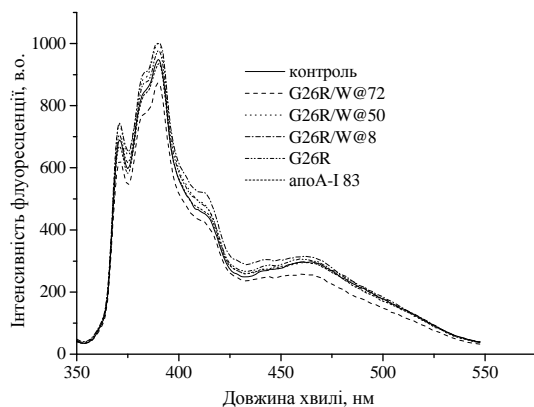


Рис. 5.22. Спектри флуоресценції пірену у ФХ везикулах у відсутності (контроль) та присутності мутантів апоА-I 83. Концентрація ліпиду була 16 мкМ, білка – 1 мкМ, пірену – 0.1 мкМ



Таблиця 5.6

Вплив фібрилярних варіантів апоА-I 83 на спектральні властивості пірену в ФХ ліпосомах\*

	$I_I/I_{III}$	Е/М	$\nu_{col}, \text{нс}^{-1}$	$\nu_j, \text{нс}^{-1}$	$\nu_k, \text{нс}^{-1}$	$D_{diff}, \text{см}^2 \text{с}^{-1}, \times 10^{-8}$
контроль	0.82	0.31	$1.02 \times 10^{-3}$	0.59	17.38	0.92
G26R/W@72	0.81	0.29	$0.97 \times 10^{-3}$	0.56	16.83	0.89
G26R/W@50	0.83	0.29	$0.97 \times 10^{-3}$	0.56	16.83	0.89
G26R/W@8	0.82	0.31	$1.02 \times 10^{-3}$	0.59	17.38	0.91
G26R	0.81	0.31	$1.02 \times 10^{-3}$	0.59	17.38	0.91
апоА-I 83	0.81	0.32	$1.04 \times 10^{-3}$	0.60	17.13	0.95

\* похибка не перевищувала 7%

Таблиця 5.7

Вплив фібрилярних варіантів апоА-I 83 на спектральні властивості пірену в Хол30 ліпосомах\*

	$I_I/I_{III}$	Е/М	$\nu_{col}, \text{нс}^{-1}$	$\nu_j, \text{нс}^{-1}$	$\nu_k, \text{нс}^{-1}$	$D_{diff}, \text{см}^2 \text{с}^{-1}, \times 10^{-8}$
контроль	0.78	0.18	$0.59 \times 10^{-3}$	0.33	9.64	0.53
G26R/W@72	0.78	0.17	$0.58 \times 10^{-3}$	0.31	9.25	0.50
G26R/W@50	0.81	0.17	$0.58 \times 10^{-3}$	0.31	9.25	0.50
G26R/W@8	0.80	0.18	$0.59 \times 10^{-3}$	0.33	9.64	0.53
G26R	0.79	0.17	$0.58 \times 10^{-3}$	0.31	9.25	0.50
апоА-I 83	0.79	0.17	$0.58 \times 10^{-3}$	0.31	9.25	0.50

Як видно з таблиць 5.6 та 5.7 утворення білок-ліпідних комплексів не призводить до статистично значимих змін спектральних характеристик пірену, що свідчить про відсутність впливу фібрилярних агрегатів апоА-I 83 на полярність та вільний об'єм гідрофобної ділянки ліпідного бішару. Очікуваним також є той факт, що пік випромінювання ексимерів є невираженим в Хол30 везикулах, оскільки конденсуючий ефект холестерину перешкоджає латеральній дифузії зонду, що призводить до зниження ймовірності зіткнень між мономерами пірену та зменшення ступеня ексимеризації флуорофору.

### 5.3.2. Вплив варіантів апоА-I на полярну область мембрани

Для з'ясування змін фізико-хімічних властивостей полярної зони ліпідного бішару під впливом амілоїдних фібрил досліджуваних варіантів аполіпопротеїну

А-І використовували флуоресцентний зонд Лаурдан. На рис. 5.23 зображено типові спектри флуоресценції Лаурдану у ліпідних та пептид-ліпідних системах. На основі приведених спектрів було розраховано параметр GP, який віддзеркалює зміни полярності мікрооточення флуорофору. Як видно з рис. 5.24, додавання фібрилярних агрегатів апоА-І 83 викликало неоднозначні зміни GP. У Хол30 бішарах відносні зміни GP не перевищували 4% та були статистично незначимими (рис. 5.24, Б), що підтверджує описану раніше гіпотезу щодо превентивної ролі холестерину в реалізації модифікуючого впливу агрегованих білків на структурно-динамічний стан мембран.

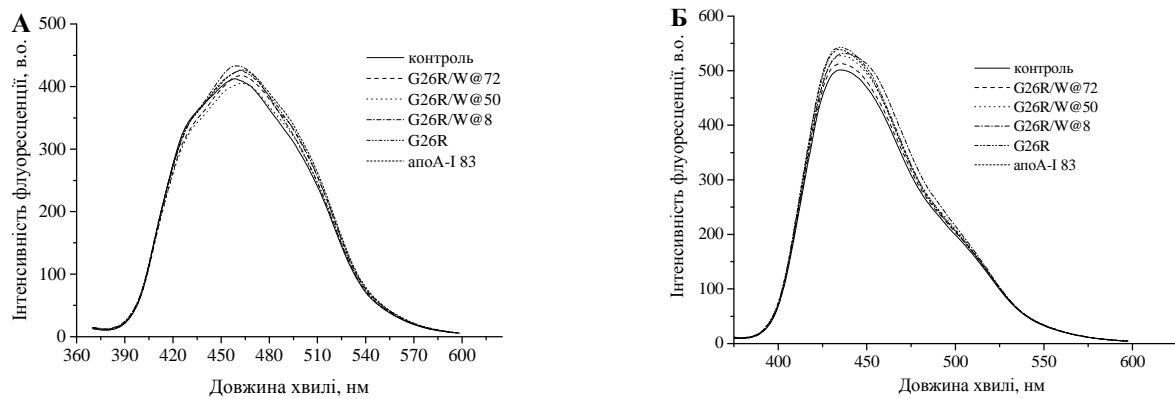


Рис. 5.23. Спектри флуоресценції Лаурдану у ФХ (А) та Хол30 (Б) ліпідних везикулах у відсутності (контроль) та присутності фібрилярних агрегатів апоА-І 83

Натомість, в ФХ мембранах утворення білок-ліпідних комплексів супроводжувалось зниженням GP, причому величина цього ефекту коливалась у межах від 25 до 70%.

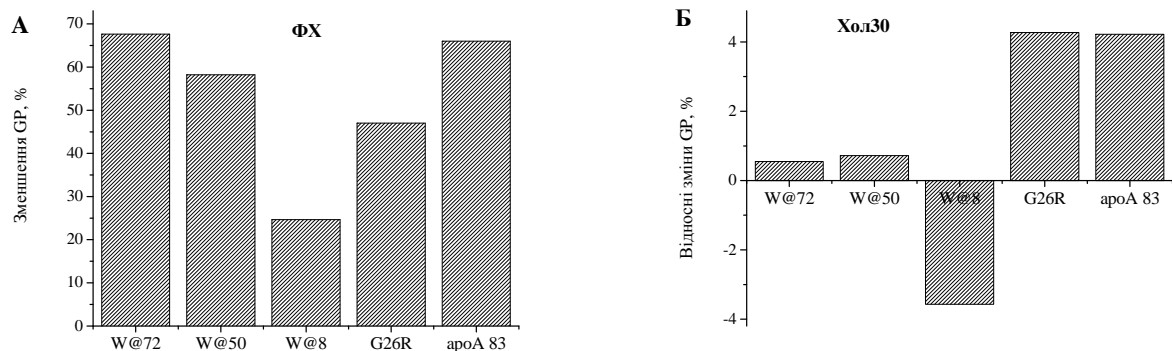


Рис. 5.24 Вплив фібрилярних агрегатів апоА-I 83 на генералізовану поляризацію Лаурдану у ФХ (А) та Хол30 ліпідних везикулах.

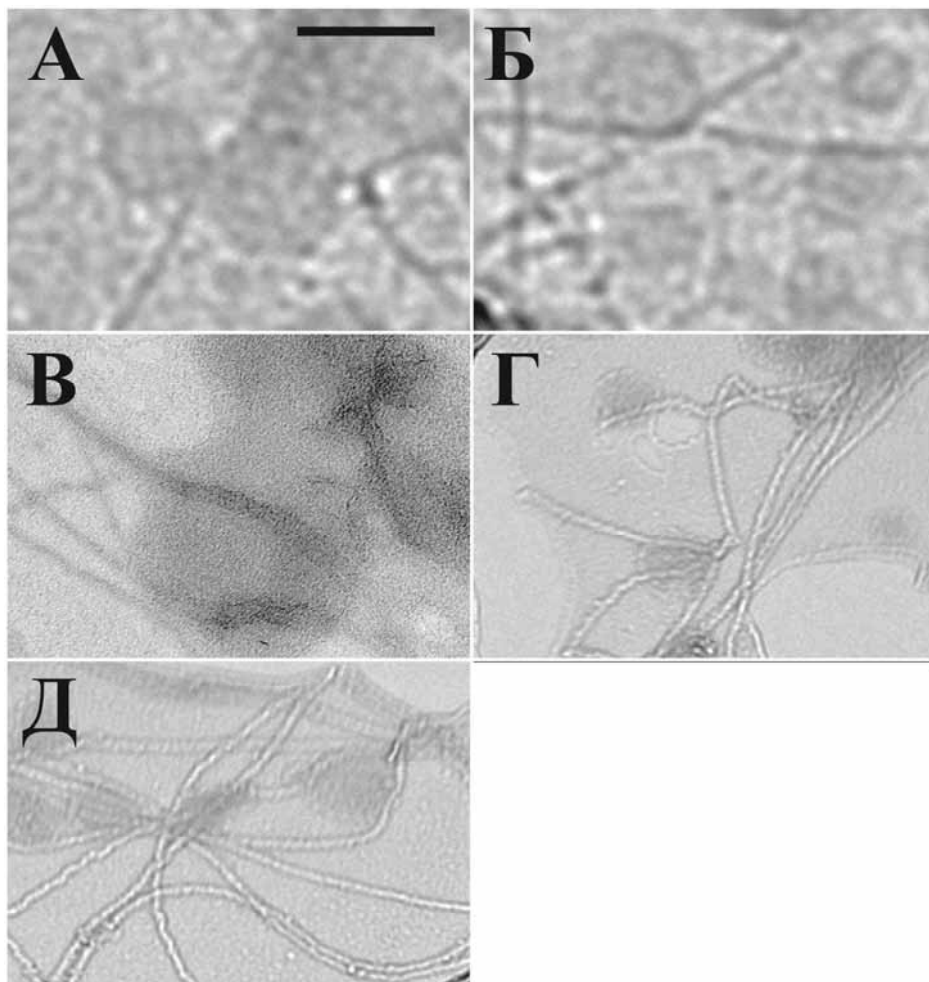


Рис. 5.25. Електронномікроскопічні фотографії комплексів G26R/W@8 з ліпосомами. Масштабний відрізок дорівнював 50 нм

Окрім цього, зменшення GP було зворотно пропорційне ступеню фібрилізації пептиду. Так, найменші зміни GP викликав мутант G26R/W@8, який, в свою чергу, характеризувався найвищим агрегаційним потенціалом (рис. 5.3, Б). Зниження генералізованої поляризації Лаурдану зазвичай відображає зростання концентрації молекул води в оточенні зонду. Однією з найбільш ймовірних причин спостережуваного посилення гідратації бішару може бути зменшення щільності пакування ліпідних молекул внаслідок сорбції фібрил апоА-I 83.

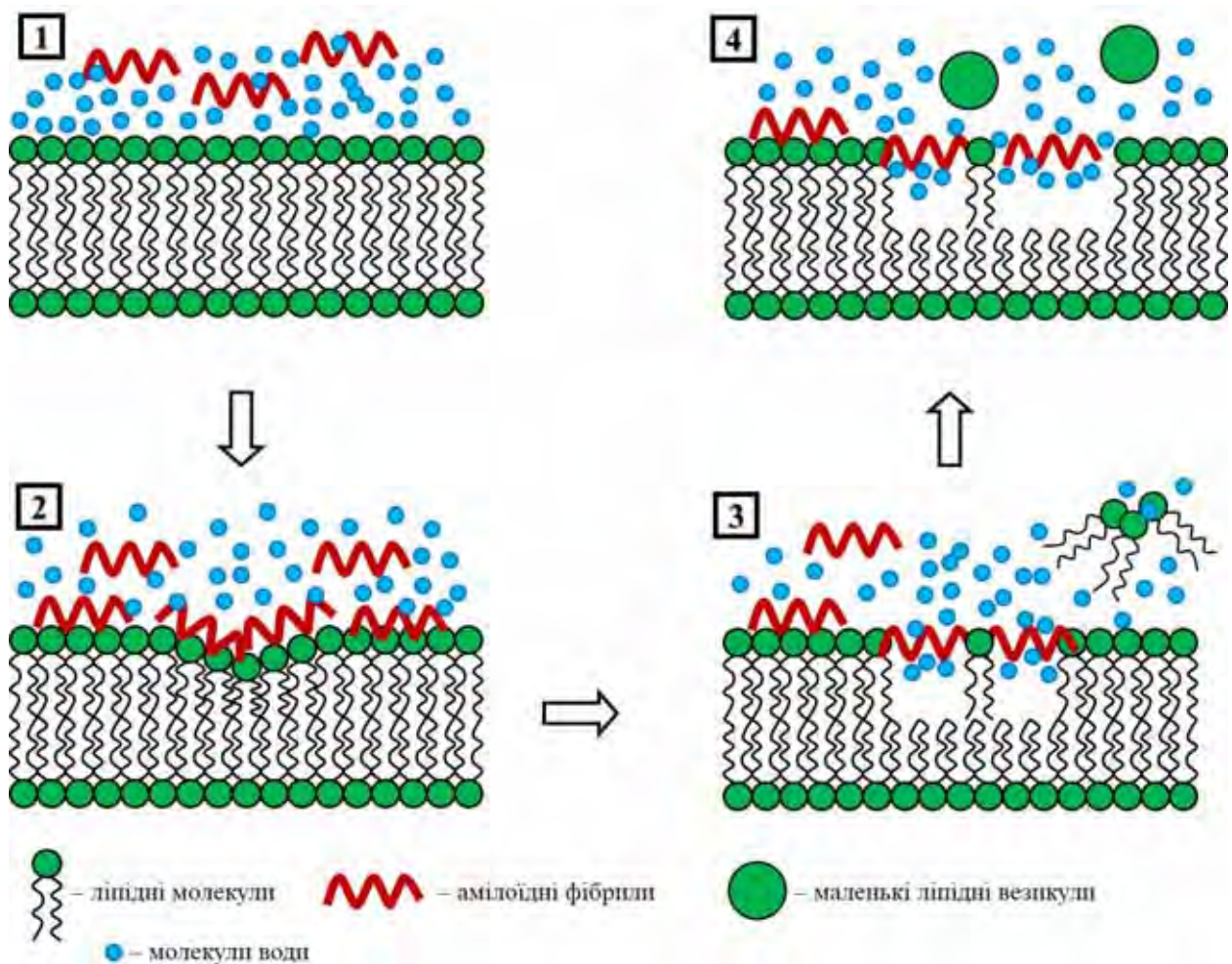


Рис. 5.26. Схематичне зображення дестабілізації мембрани, викликаній амілоїдними фібрилами мутантів апоА-I 83.

В основі цих ефектів може лежати виключення фібрилою частини ліпідних молекул з мембрани та утворення змішаних надмолекулярних агрегатів, що містять ліпіди. Подібні явища спостерігались для амуліну [428], олігомерного Аβ пептиду [429], а також для ряду водорозчинних білків [19]. Для отримання додаткової інформації, комплекси ліпосом з фібрилами апоА-I 83 були проаналізовані за допомогою електронної мікроскопії. Інтактні ліпідні везикули візуалізувались як сферичні структури з діаметром  $50 \pm 2$  нм. Інкубація ліпосом з амілоїдними варіантами аполіпопротеїну А-I призвела до кластеризації везикул, причому ці агрегати були обгорнуті фібрилярними агрегатами. У більшості випадків поверхня фібрил колокалізувалась із поверхнею ліпідного бішару, що підтверджує висновок про адсорбцію амілоїдних фібрил на поверхні мембрани

(рис. 5.25, А-В). У присутності фібрилярних агрегатів ліпідні везикули зберігали переважно сферичну форму, однак спостерігались також інвагінації (рис. 5.25, Д). У деяких випадках амілоїдні фібрили були зібрані в пучки навколо везикул (рис. 5.25, Г, Д). Окрім цього, на електронномікроскопічних фотографіях біля фібрил або нативних везикул візуалізувались також маленькі сферичні структури (рис. 5.25, Б, Г, Д). Здогадно, ці структури представляють собою везикули, сформовані ліпідними молекулами, що екстрагуються агрегатами апоА-I 83 із ліпідного бішару. На основі отриманих даних можна припустити, що послідовність подій, які лежать в основі дестабілізації мембрани під дією амілоїдних фібрил апоА-I, включає наступні стадії: сорбція білка на поверхні мембрани → інвагінація бішару та його локальне стоншення → дефрагментація мембрани та втрата її структурної цілісності (рис. 5.26). У роботі [430] було показано, що специфічні гідрофобні амілоїд-ліпідні взаємодії, які включають інтеркаляцію білкових клиноподібних доменів, призводять до дестабілізації бішару та видаленню частини ліпідів у розчин. Міланесі та ін. розглядають цей тип білок-ліпідних взаємодій як особливий клас ушкодження мембрани, притаманний амілоїдним агрегатам [431]. Варто відзначити, що запропонована модель дестабілізації мембрани амілоїдними фібрилами апоА-I 83 нагадує «килимовий механізм» мембранотропної дії антимікробних пептидів. Згідно з цим механізмом, пептиди зв'язуються з мембраною у мономерному або олігомерному стані та локалізуються таким чином, що гідрофобна поверхня амфіпатичних  $\alpha$ -спіралей проникає у ліпідний бішар, а гідрофільна експонована у розчин [432]. Коли поверхнева концентрація адсорбованого пептиду досягає певного порогового значення, відбувається дестабілізація мембрани внаслідок зміни локальної кривизни ліпідного бішару.

#### **5.4. Короткі висновки до Розділу 5**

1. З використанням методу моношарів Ленгмюра досліджено взаємодію фібрилярних агрегатів лізоциму з модельними мембранами із з ДМФХ та його сумішей із 10, 20 та 40 мол% ДМФГ чи ДМФС. Виявлено зростання поверхневого

тиску при адсорбції агрегованого білка. На основі залежностей змін поверхневого тиску був визначений граничний тиск, який є кількісною характеристикою здатності білка до проникнення у ліпідний моношар. Порівняльний аналіз значень граничного тиску показав, що ефективність інкорпорації фібрил лізоциму у моношар знижується при підвищенні вмісту аніонного ліпиду, причому цей ефект був більш вираженим для ДМФГ.

2. В рамках моделі адсорбції Фрумкіна, яка враховує взаємодії між молекулами адсорбату, проведений теоретичний аналіз процесу адсорбції білків на ліпідних моношарах. Продемонстровано, що характер експериментально спостережуваних залежностей змін поверхневого тиску від початкового тиску визначається співвідношенням внесків відштовхувальних та притягальних білок-ліпідних і білок-білкових взаємодій.

3. За допомогою флуоресцентних зондів пірену, ДФГТ, Лаурдану та МБА охарактеризовані закономірності впливу фібрилярного лізоциму на молекулярну організацію ліпідних бішарів із ФХ та його сумішей з КЛ (10 мол%) та Хол (30 мол%). Показано, що агрегований білок здійснює модифікуючий вплив тільки на полярну область модельних мембран, викликаючи зростання щільності пакування полярних голівок ліпідів та зниження ступеня гідратації ліпідного бішару.

4. Вперше при дослідженні модельних білок-ліпідних систем, що містили в якості білкових компонентів фібрилярний лізоцим та мономерний цитохром *c*, продемонстрована можливість конкурентної взаємодії амілоїдних фібрил і периферичних мембранних білків з ліпідним бішаром. Вимірювання ІРПЕ між антрілвініл-міченим ФХ у якості донора та гемовою групою у якості акцептора, показало, що фібрилярний лізоцим викликає більш ефективну десорбцію цитохрому *c*, у порівнянні з нативним білком. Встановлена залежність конкурентної поведінки лізоциму від хімічної природи фосфоліпідів та поверхневого заряду мембран. Виявлено сигмоїдний характер кривих десорбції цитохрому *c* з ліпідних бішарів, що складались із сумішей ФХ з ФГ (40 мол%), ФС (40 мол%) чи КЛ (25 мол%), що може бути проявом кооперативності процесу дисоціації білок-ліпідних комплексів, ініційованого фібрилами лізоциму.

Показано, що конкуренція між фібрилярним та мономерним білками за мембранні центри зв'язування контролюється як електростатичними, так і специфічними нелектростатичними чинниками.

5. З використанням флуоресцентних зондів пірену та Лаурдану охарактеризовані особливості модифікуючої дії фібрилярних агрегатів N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I на структурно-динамічний стан модельних мембран із ФХ та його сумішей із Хол (30 мол%). Виявлено зростання ступеня гідратації ФХ бішару під впливом агрегованого білка. На основі даних флуоресцентної спектроскопії та електронної мікроскопії запропонована модель дестабілізації структури мембран під впливом фібрил апоА-I 83, що включає інвагінацію, стоншення та дефрагментацію ліпідного бішару.

6. Вперше показано, що ступінь модифікації структурного стану та фізико-хімічних властивостей модельних мембран під впливом амілоїдних фібрил лізоциму та N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I істотно знижується при додаванні до їх складу холестерину.

## РОЗДІЛ 6

### СТРУКТУРНА МОДИФІКАЦІЯ ФІБРИЛЯРНИХ АГРЕГАТІВ БІЛКІВ НА ЛІПІДНІЙ МАТРИЦІ

Як зазначалось вище, клітинні мембрани наразі вважаються однією із головних мішеней токсичної дії агрегованих білків [15,16,23,428,429]. Домінуючі концепції патогенності амілоїдів розглядають ранні олігомерні інтермедіати як найбільш токсичні структури, високий мембрано-деструктивний потенціал яких обумовлюється наявністю протяжних гідрофобних областей та структурною лабільністю [414]. Однак, останнім часом з'являється все більше аргументів на користь гіпотези про цитотоксичність крос- $\beta$ -листових структур, тобто зрілих амілоїдних фібрил. Так, наприклад, продемонстровано, що фібрилярні агрегати лізоциму здатні викликати дисфункцію мітохондрій, підвищення проникності плазматичних мембран [433], гемоліз та агрегацію еритроцитів [434], тощо. Все більшого експериментального підтвердження набуває ідея стосовно наявності кореляції між токсичним потенціалом амілоїдних структур та їх морфологією [435]. Припускається, що поліморфна поведінка є фундаментальною характеристикою фібрилярного стану. Існування різних поліморфних форм було показано для ряду білків, включаючи  $A\beta$ -пептид [436], пріонні білки [437],  $\alpha$ -синуклеїн [438], альбумін [145], інсулін [439],  $\beta$ -лактоглобулін [120] та ін. З огляду на можливу кореляцію між токсичністю амілоїдів та їх морфологією, можна очікувати, що взаємодії фібрилярних агрегатів з компонентами клітин, зокрема, плазматичними мембранами, в значній мірі контролюються супрамолекулярною структурою цих агрегатів. З іншого боку, зв'язування з мембранами може змінювати морфологічні особливості фібрилярних структур. У даному розділі викладені результати досліджень, спрямованих на: а) вивчення поліморфної поведінки одного з мутантів аполіпопротеїну А-I (мутант G26R/W@8); б) аналіз його механічних властивостей; та в) з'ясування характеру впливу білок-ліпідних взаємодій на топологію фібрилярних структур G26R/W@8.

#### 6.1. Поліморфізм амілоїдних структур фрагменту апоА-I 83



На рис. 6.1 представлено зображення амілоїдних фібрил мутанту G26R/W@8, отримані методом атомно-силової мікроскопії. З рисунку видно, що фібрили візуалізуються як гладкі або як закручені структури. Це спостереження свідчить на користь існування щонайменше двох різних поліморфів фібрилярного пептиду. Аналіз профілів висоти вздовж контурної довжини показав, що ці поліморфи відповідають конфігураціям закрученої стрічки (ЗС) та спіральної стрічки (СС) (рис. 6.2, ліва панель) [145].

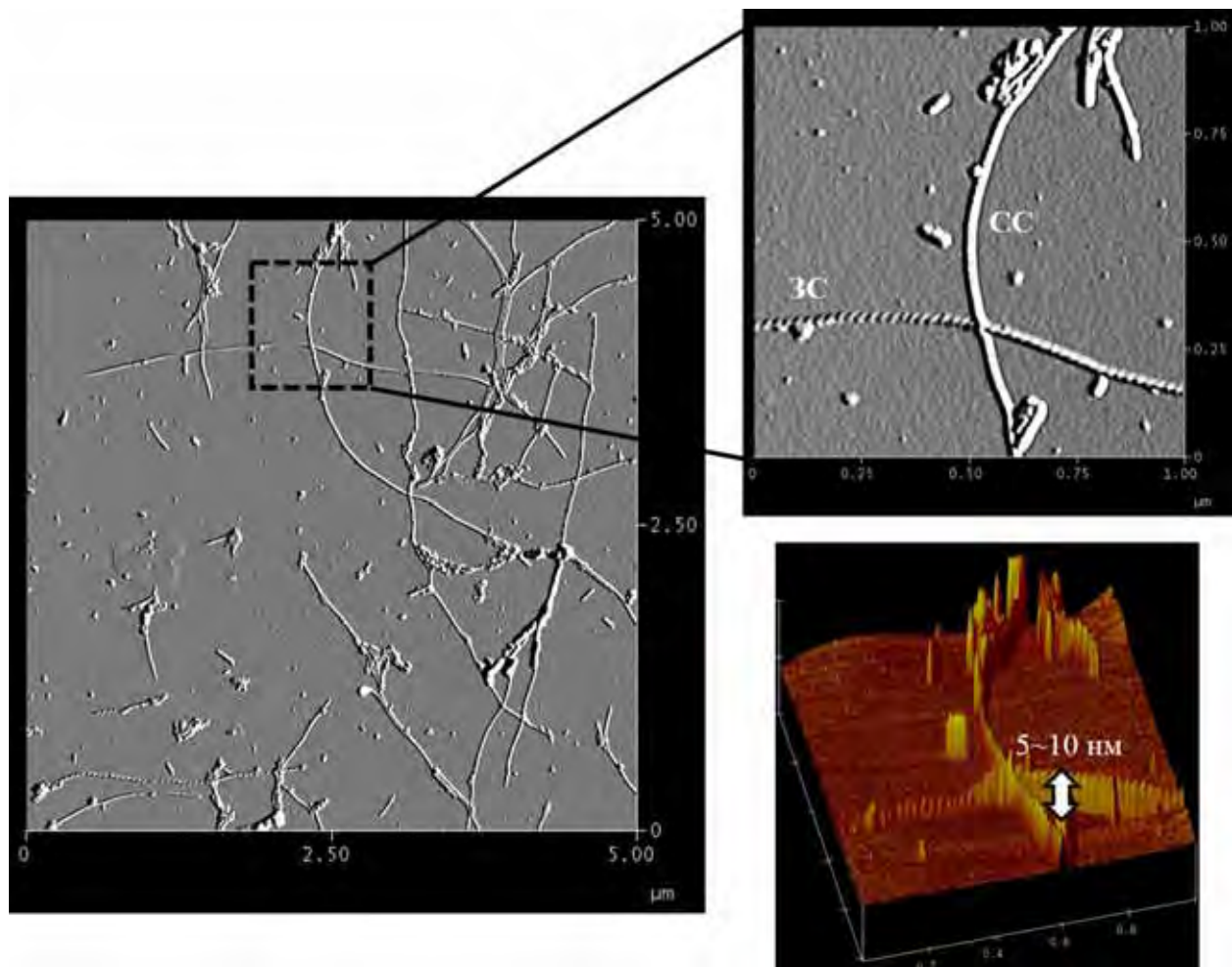


Рис. 6.1. АСМ зображення амілоїдних фібрил G26R/W@8.

Варто зазначити, що конформації закрученої та спіральної стрічки характеризують так званий латеральний поліморфізм протофіламентів. Більш того, СС представляє собою проміжний етап при топологічному переході ЗС до ще однієї поліморфної форми – нанотрубки (рис. 6.2, права панель). Окрім G26R/W@8, такі структурні переходи експериментально спостерігались для

низки амілоїд-утворюючих білків та пептидів, включаючи  $\beta$ -лактоглобулін [440], лізоцим [440], A $\beta$ -пептид [441], тощо.

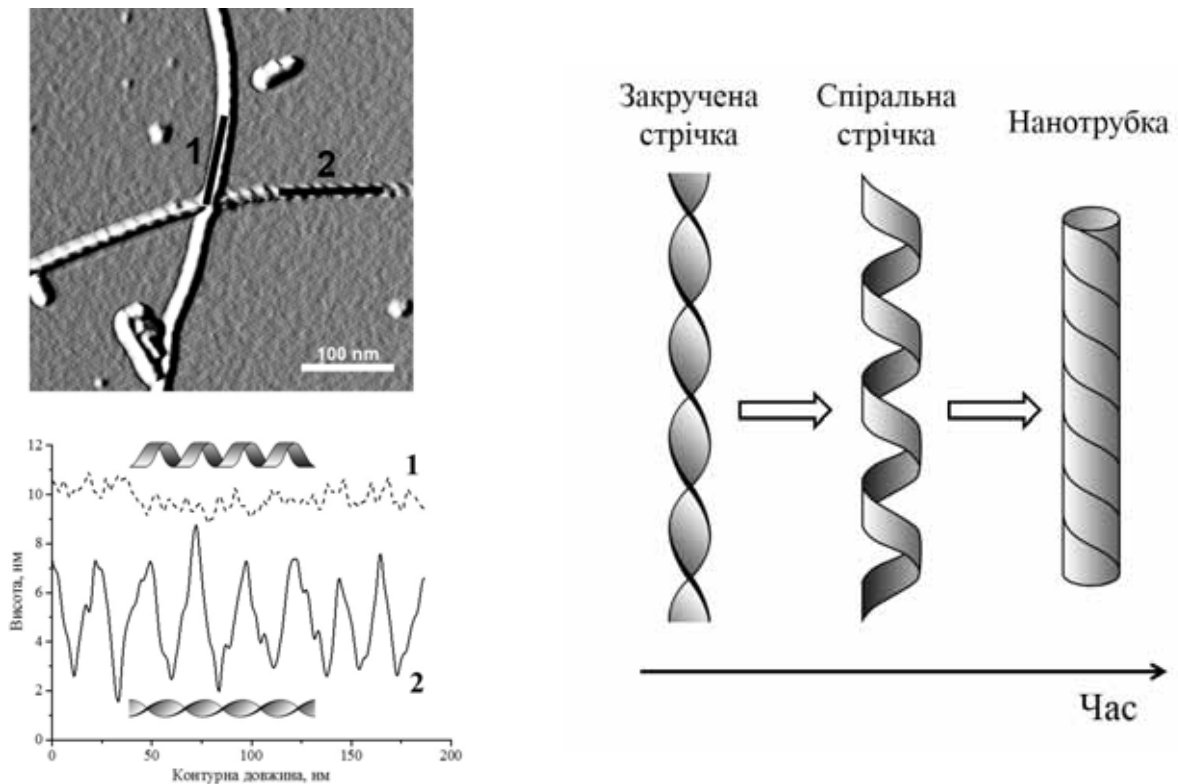


Рис. 6.2. Профілі висоти амілоїдних фібрил G26R/W@8 вздовж контурної довжини (ліва панель). Схематичне зображення різних поліморфів фібрилярних агрегатів (права панель).

Закручена стрічка представляє собою найбільш стабільну конфігурацію, яка характеризується ненульовою гауссовою кривизною, прямою головною віссю та постійним кроком. У свою чергу, спіральні стрічки та нанотрубки мають майже нульову гауссову кривизну, спіральну центральну вісь та постійний кут нахилу [3]. Фізичне пояснення такого поліморфізму може бути надане в рамках теорії еластичності та диференційної геометрії, а також розглядаючи фібрилярні агрегати як перекручені нематичні еластомери, унікальний клас матеріалів, які утворюються рідинно-кристалічними полімерами та мають високу еластичність, притаманну гумі, та орієнтаційний порядок, характерний для рідких кристалів [442,443]. Зокрема, було показано, що поліморфний перехід може виникати, коли хоча б один з механічних параметрів (наприклад, модуль Юнга) є анізотропним,

та головна вісь кривизни не співпадає із головною геометричною віссю [443]. Наявність механічної анізотропії породжує геометричну нелінійність, яка може призводити до утворення різних конформаційних форм. Основні детермінанти, що визначають переходи між різними поліморфами, були ідентифіковані як кривизна фібрили, кут дезорієнтації та ширина стрічки [444]. Додаткові фактори включають температуру, тиск, рН розчину, тощо.

Кінцева конфігурація стрічки визначається конкуренцією між енергетичною компонентою, відповідальною за вигин стрічки, та компонентою, відповідальною за розтяг та перекручення стрічки. У контексті механічних властивостей амілоїдних фібрил, перехід з ЗС до СС конфігурації контролюється відношенням її ширини до товщини. При низькому значенні цього відношення більш вигідною є витягнута конформація, ніж вигнута, тобто конфігурація закрученої стрічки. Натомість, при високих значеннях відношення ширини до товщини спостерігається протилежна ситуація, та фібрила приймає форму спіральної стрічки [3]. Перехід ЗС  $\rightarrow$  СС відбувається при критичному значенні числа Фьопля-фон-Кармана, яке визначається як безрозмірне відношення енергії розтягу, що приходить на одиницю площі стрічки, до аналогічної латеральної енергії вигину [445]. При низькій енергії розтягу (низькі значення числа Фьопля-фон-Кармана), морфологія фібрили відповідає ЗС. Однак, коли енергія розтягу значно перевищує енергію вигину (тобто високі значення числа Фьопля-фон-Кармана), переважною є конфігурація СС.

Залежність поліморфної форми від ширини фібрили підтверджується також експериментальним спостереженням часової еволюції поліморфізму, яка свідчить на користь того, що утворення спіральної стрічки та нанотрубки має місце на пізніших стадіях процесу фібрилязації, коли відношення ширини до товщини амілоїдів набуває великих значень внаслідок збільшення числа протофіламентів у зрілій фібрилі [443].

У даному контексті доцільно звернутись до роботи [446], де різні поліморфні форми крос- $\beta$ -ансамблів розглядаються як мережа паракристалічних фаз, які організовані за своїм структурним порядком в ієрархічне дерево. Ці фази

характеризуються високим ступенем короткодійного упорядкування (стопки  $\beta$ -листів, зв'язаних між собою водневими зв'язками), але їм бракує дальнодіючого порядку. Аналогічно, було показано, що перехід між ЗС та СС залежить від ширини фібрили. Напруга, створена водневими зв'язками між  $\beta$ -тяжами, сприяє утворенню закрученої стрічки, тоді як стопкове пакування бокових груп зріючої фібрили визначає спіральну кривизну товстих фібрилярних агрегатів.

Рівняння рівноваги для різних поліморфів можуть бути записані на основі рівнянь Ейлера-Лагранжа для еластичної стрічки, вільна енергія якої дорівнює [447]:

$$F(\kappa, \tau, \alpha, \alpha') = \frac{A}{2} \kappa^2 \cos \alpha + \frac{B}{2} \kappa^2 \sin \alpha + C(\tau + \alpha' - \tau_0)^2 \quad (6.1)$$

де  $\kappa$  – кривизна стрічки,  $\alpha$  – зенітний кут,  $\tau$  та  $\tau_0$  представляють кручення та спонтанне закручення, відповідно,  $A, B$  та  $C$  – жорсткості при вигині та закрученні, які залежать від еластичних властивостей стрічки та геометрії її поперечного перетину. Перша похідна  $\alpha'$  характеризує швидкість обертання навколо головної осі полімерного ланцюга.

Відповідні рівняння рівноваги для еластичної стрічки у загальному вигляді можуть бути записані наступним чином:

$$\begin{aligned} \kappa[\alpha''(B \cos \alpha - A \sin \alpha) - \left( (\alpha')^2 - \frac{\kappa^2}{2} + \tau^2 \right)(A \cos \alpha + B \sin \alpha) + \\ + C(\tau + \alpha' - \tau_0)(3\tau - 3\alpha' + \tau_0)] + \frac{4C\tau\alpha'''}{\kappa} = 0 \end{aligned} \quad (6.2)$$

$$-\frac{1}{\kappa} \left[ 2C\alpha^{(4)} + 2C\alpha'' \left( \frac{\tau^2}{\kappa} - \kappa \right) \right] + 2\tau\alpha'\kappa(B \cos \alpha - A \sin \alpha) = 0 \quad (6.3)$$

$$-\frac{A}{2} \kappa^2 \sin \alpha + \frac{B}{2} \kappa^2 \cos \alpha - 2C\alpha'' = 0 \quad (6.4)$$

Кривизна еластичної стрічки  $\kappa$  може бути розрахована на основі параметричних рівнянь для гвинтової лінії. Відповідно, ці рівняння мають вигляд:

$$\begin{aligned} x &= r \cos \psi \\ y &= r \sin \psi \\ z &= h\psi \end{aligned} \quad (6.5)$$

де  $r$  – радіус стрічки,  $\psi$  – азимутальний кут,  $\psi \in [0, 2\pi)$ ,  $h = r \tan \psi$ , та  $2\pi h$  означає крок стрічки,  $P$ . Розв’язання цих рівнянь у термінах векторної функції дає вирази для кривизни закрученої ( $\kappa_{3C}$ ) та спіральної ( $\kappa_{CC}$ ) стрічки:

$$\begin{aligned}\kappa_{3C}(d) &= \frac{d}{d^2 + h^2} \\ \kappa_{CC} &= \frac{r}{r^2 + h^2}\end{aligned}\tag{6.6}$$

де  $d$  – відстань від головної осі ЗС. Як слідує з рівняння (6.6), конформація спіральної стрічки має постійну кривизну, тоді як кривизна закрученої стрічки змінюється в залежності від  $d$ .

Для фібрили у СС конфігурації  $B = 0$ , тому результуюче рівняння рівноваги може бути записане наступним чином [447]:

$$3Ch^2 + \frac{A}{2}(r^2 - 2h^2) - C\tau_0(r^2 + h^2)[2h + \tau_0(r^2 + h^2)] = 0\tag{6.7}$$

У випадку, коли  $\tau_0 = 0$ , азимутальний кут дорівнює:

$$\psi = \arctan \left[ \frac{1}{\sqrt{2(1 - 3C/A)}} \right]\tag{6.8}$$

Для СС з ненульовим  $\tau_0$ :

$$\psi = \arctan \left[ \left( \frac{1}{2 \left[ 2 + \frac{C}{A} \left( \frac{\tau_0}{\tau} + 3 \right) \left( \frac{\tau_0}{\tau} - 1 \right) \right]} \right)^{1/2} \right]\tag{6.9}$$

Необхідно зазначити, що згідно з сучасними концепціями, існує ще один тип поліморфізму фібрилярних структур – субструктурний поліморфізм протофіламентів, який обумовлюється наявністю різних конформацій стеричних блискавок в залежності від орієнтації  $\beta$ -тяжів в  $\beta$ -листі та  $\beta$ -листів по відношенню один до одного та до осі фібрили [448]. Савая та співавтори запропонували класифікацію такого роду конформерів, згідно з якою існує [113]: 1) реєстраційний поліморфізм в залежності від відносної орієнтації сусідніх  $\beta$ -тяжів в одному  $\beta$ -листі (паралельні та антипаралельні поліморфи); 2) поверхневий

поліморфізм, який означає пакування  $\beta$ -листів з однаковими чи різними поверхнями контакту; 3) сегментальний поліморфізм, який визначається орієнтацією сусідніх  $\beta$ -листів (в одному чи різному напрямку). Різні комбінації цих стеричних конфігурацій дають вісім можливих класів стеричних блискавок та, відповідно, вісім класів поліморфів. Хоча ця модель конформаційних варіацій стеричних блискавок отримала своє експериментальне підтвердження, нещодавні теоретичні дослідження продемонстрували, що не 8, а 15 класів поліморфів можуть охопити усі можливі субструктурні конформери [449]. Аналіз проводився з використанням системи координат, в якій вісь стеричної блискавки орієнтована таким чином, що водневі зв'язки між боковими групами C=O and N-H орієнтовані паралельно осі  $y$ , а  $\beta$ -тяжі – паралельно осі  $z$ .

Взаємодії між двома  $\beta$ -листами  $A$  та  $B$  у поліморфі описуються енергією зв'язування [450]:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{AB} - \Delta G_A - \Delta G_B \quad (6.10)$$

Вільна енергія  $A$ ,  $B$  та  $AB$  складається з трьох компонентів:

$$\Delta G_i = E_{mech} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (6.11)$$

де нижній індекс  $i$  відповідає  $A$ ,  $B$  чи  $AB$ ,  $E_{mech}$  – механічна енергія, яка визначається як сума внутрішньої (залежної від довжини зв'язків, кутів та двогранних кутів) ( $E_i$ ), електростатичної ( $E_e$ ) та ван-дер-Ваальсової ( $E_{vdW}$ ) енергій:

$$E_{mech} = E_i + E_e + E_{vdW} \quad (6.12)$$

Складова  $G_{solv}$  в рівнянні (6.2) представляє собою енергію сольватації, яка може бути виражена через полярну та неполярну складові:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{polar} + \Delta G_{nonpolar} \quad (6.13)$$

Полярна компонента характеризує електростатичний внесок в енергію сольватації та може бути розрахована з лінійного рівняння Пуассона-Больцмана. У свою чергу, неполярна складова лінійно залежить від площі поверхні, доступної для розчинника.

Молекулярно-динамічне моделювання, проведене у рамках описаного теоретичного підходу дозволило оцінити структурні (відстань між  $\beta$ -листами та  $\beta$ -тяжами) та енергетичні параметри різних поліморфів амілоїдних фібрил [450]. Основний висновок, який було зроблено на основі цих розрахунків, полягав у тому, що конформери, утворені однією і тією ж амінокислотою послідовністю, відрізняються за своєю термодинамічною стабільністю.

## 6.2. Механічні властивості фібрилярних агрегатів фрагменту апоА-I

Наступний етап роботи було присвячено дослідженню механічних характеристик двох поліморфних форм G26R/W@8 (закрученої стрічки та спіральної стрічки, рис. 6.1 та 6.2). З фізичної точки зору амілоїдні фібрили розглядаються як супрамолекулярні напівеластичні полімери, які не підлягають гауссовій статистиці. Причина негауссовості амілоїдних фібрил полягає в їх підвищеній жорсткості, котра приводить до того, що незалежних сегментів ланцюга стає занадто мало для забезпечення застосовності гауссової статистики. Підвищена жорсткість полімерних ланцюгів може бути обумовлена різними факторами, включаючи: а) стеричні обмеження, що є наслідком відштовхування атомів, які зближаються при обертанні ланок; б) електростатичні взаємодії; в) формування водневих зв'язків. При описі жорстких молекул зазвичай використовують модель персистентного або черв'якоподібного ланцюга (модель Порода-Краткі). Скористаймося цим підходом для аналізу механічних властивостей амілоїдних фібрил G2R/W@8. У рамках цього підходу для персистентного ланцюга виконуються наступні умови: а) довжина сегмента  $l \rightarrow 0$ ; б) кут між сегментами  $\alpha \rightarrow \pi$ , внаслідок чого ланцюг має неперервну кривизну, рівну середньому значенню косинуса кута  $\psi$  між дотичними до ланцюга у даній точці та в початковій точці. Кривизна персистентного ланцюга описується співвідношенням:

$$\langle \cos \psi \rangle = \exp(-s / l_p) \quad (6.14)$$

де  $s$  – контурна довжина ланцюга (тобто довжина ланцюга від його початку до даної точки),  $l_p$  – персистентна довжина. Як слідує із рівняння (6.14), при проходженні вздовж ланцюга довжини  $l_p$  кривизна змінюється в  $e$  разів.

Знайдемо середньоквадратичну відстань між кінцями персистентного ланцюга. Позначимо повну контурну довжину ланцюга –  $\Lambda$ . Введемо одиничний вектор  $\vec{u}(s)$ , що характеризує напрямок ланцюга в точці, яка знаходиться на відстані  $s$  вздовж контура ланцюга від його початку. Тоді вектор  $\vec{R}$ , що з'єднує початок ланцюга з його кінцем, можна представити як:

$$\vec{R} = \int_0^{\Lambda} \vec{u}(s) ds \quad (6.15)$$

Середнє значення квадрата цієї величини визначається наступним чином:

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \int_0^{\Lambda} \vec{u}(s_1) ds_1 \int_0^{\Lambda} \vec{u}(s_2) ds_2 \quad (6.16)$$

Скалярний добуток одиничних векторів дорівнює:

$$\vec{u}(s_1) \vec{u}(s_2) = \cos(d\vec{s}_1, d\vec{s}_2) = \exp\left(\frac{-(s_1 - s_2)}{l_p}\right); \quad s_1 > s_2 \quad (6.17)$$

Таким чином, маємо:

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \int_0^{\Lambda} \int_0^{\Lambda} \exp\left(-\frac{(s_1 - s_2)}{l_p}\right) ds_1 ds_2 = 2 \int_0^{\Lambda} \int_0^{s_1} \exp\left(-\frac{(s_1 - s_2)}{l_p}\right) ds_2 ds_1 \quad (6.18)$$

$$\int_0^{s_1} \exp\left(-\frac{s_1}{l_p}\right) \exp\left(\frac{s_2}{l_p}\right) ds_2 = \exp\left(-\frac{s_1}{l_p}\right) l_p \exp\left(\frac{s_2}{l_p}\right) \Big|_0^{s_1} =$$

$$l_p \left(1 - \exp\left(-\frac{s_1}{l_p}\right)\right) \quad (6.19)$$

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = 2l_p \int_0^{\Lambda} \left(1 - \exp\left(-\frac{s_1}{l_p}\right)\right) ds_1 = 2l_p \Lambda + 2l_p^2 \exp\left(-\frac{s_1}{l_p}\right) \Big|_0^{\Lambda} =$$

$$2l_p^2 \left\{ \frac{\Lambda}{l_p} - 1 + \exp\left(-\frac{\Lambda}{l_p}\right) \right\} \quad (6.20)$$



Важливо відзначити, що вираз для середньоквадратичної відстані між кінцями персистентного ланцюга може бути використаний для оцінки середньої відстані між двома довільними точками ланцюга –  $s_1$  і  $s_2$ :

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = f(s_1 - s_2) = 2l_p^2 \left\{ \frac{|s_1 - s_2|}{l_p} - 1 + \exp\left(-\frac{|s_1 - s_2|}{l_p}\right) \right\} \quad (6.21)$$

З іншого боку, персистентна довжина пов'язана з двома найважливішими еластичними характеристиками амілоїдних фібрил:

$$l_p = EI/k_B T \quad (6.22)$$

де  $E$  – модуль пружності (модуль Юнга),  $I$  – другий момент інерції. У той час, коли модуль Юнга визначається, здебільшого, амінокислотою послідовністю мономерного поліпептидного ланцюга, другий момент інерції є геометричним фактором, який залежить від форми та розмірів поперечного перетину фібрили [145]. Зважаючи на те, що поперечний перетин фібрили у конфігурації закрученої стрічки – прямокутник, а у конфігурації спіральної стрічки – коло, другі моменти інерції для ЗС ( $I_{3C}$ ) та СС ( $I_{CC}$ ) можуть бути записані як:

$$I_{3C} = \frac{wh^3}{12}, \quad I_{CC} = \frac{\pi h^4}{64} \quad (6.23)$$

У свою чергу, модуль пружності та другий момент інерції пов'язані між собою наступним рівнянням:

$$E = B/I \quad (6.24)$$

де  $B$  – коефіцієнт жорсткості при вигині.

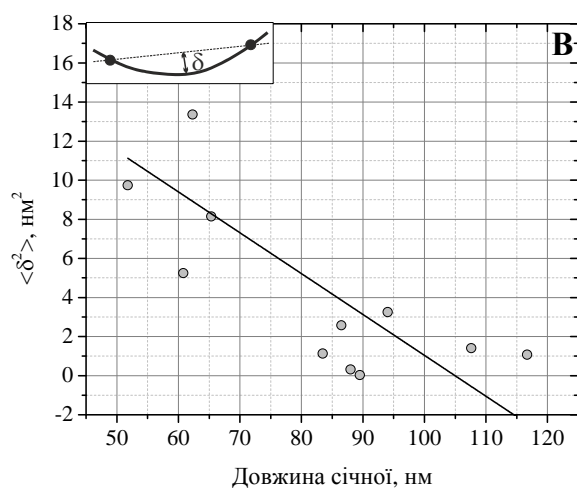
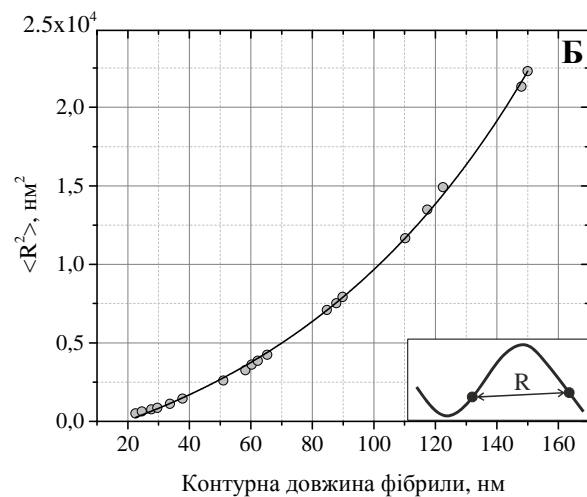
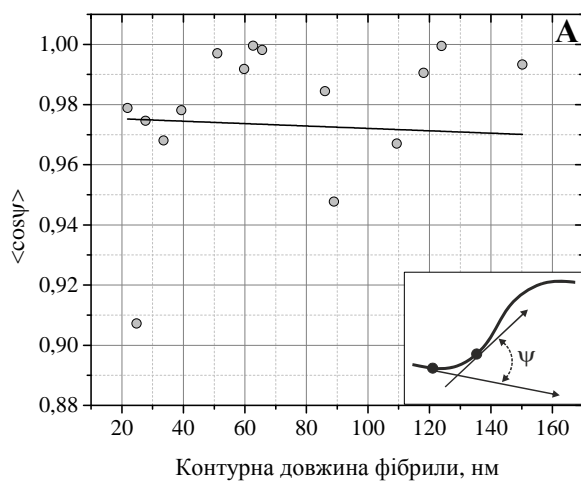


Рис. 6.3. Три режими вимірювання персистентної довжини, що використовуються в середовищі Easyworm.

Таблиця 6.1

Механічні параметри двох поліморфних форм амілоїдних фібрил G26R/W@8

Параметр	ЗС	СС
Персистентна довжина, мкм	$2.23 \pm 0.24$	$4.17 \pm 0.61$
Жорсткість при вигині, Н·м <sup>2</sup>	$(9.17 \pm 1.07) \times 10^{-27}$	$(17.15 \pm 2.11) \times 10^{-27}$
Другий момент інерції, м <sup>4</sup>	$(2.91 \pm 0.93) \times 10^{-35}$	$(4.91 \pm 0.93) \times 10^{-34}$
Модуль Юнга, ГПа	$3.15 \pm 0.72$	$3.54 \pm 0.77$

Для кількісної оцінки механічних параметрів (персистентної довжини, модуля Юнга, другого моменту інерції) амілоїдних фібрил G26R/W@8 в рамках моделі черв'якоподібного ланцюга, АСМ зображення (рис. 6.1) аналізували в середовищі Easyworm [451]. Розрахунки проводили окремо для конформацій закрученої стрічки та спіральної стрічки. Ця програма представляє собою графічний інтерфейс алгоритму обробки даних АСМ, математичний апарат якого створений на базі пакету MATLAB. В рамках програми Easyworm для розрахунку персистентної довжини використовується три режими (рис. 6.3, вкладки):

**Режим 1** – вимірювання кута між дотичними у двох точках сегменту фібрили. Персистентна довжина визначається рівнянням (6.14).

**Режим 2** – вимірювання середнього значення квадрату відстані між двома точками сегменту ланцюга. Персистентна довжина визначається рівнянням (6.20).

**Режим 3** – вимірювання відхилення сікучої між двома точками від ланцюга. Персистентна довжина визначається з наступного рівняння:

$$\langle \delta^2 \rangle = \frac{L^3}{24l_p} \quad (6.25)$$

На рис. (6.3) представлено апроксимацію даних атомно-силової мікроскопії, отриманих для амілоїдних фібрил G26R/W@8 у конфігурації ЗС, рівняннями (6.14), (6.20) та (6.25). З рисунку видно, що найкраща відповідність між теорією та експериментом досягається при використанні **Режиму 2** (рис. 6.3, Б). Аналогічний результат було отримано і для конфігурації СС. Тому значення персистентної довжини, розраховані за рівнянням (6.20), були використані для знаходження  $E$ ,  $I$  та  $B$ . Визначені таким чином параметри еластичності двох поліморфів амілоїдного G26R/W@8 представлені в табл. 6.1. Отримані результати свідчать, що амілоїдні фібрили G26R/W@8 є жорсткими, механічно-стабільними структурами. Для порівняння, модуль пружності гуми дорівнює 0.005 ГПа, скла та алюмінію – 70 ГПа, кісток – 30 ГПа, сталі – 200 ГПа [147,148].

Іншою механічною особливістю амілоїдних фібрил G26R/W@8 є той факт, що фібрили в конформації СС мають майже удвічі більшу персистентну довжину, порівняно з ЗС конформацією, що свідчить про більшу жорсткість спіральної

стрічки. Це спостереження віддзеркалює очікуване підвищення жорсткості фібрили при топологічній еволюції від закрученої стрічки до спіральної стрічки по мірі матурації фібрили та збільшення її товщини.

### **6.3. Реструктуризація амілоїдних фібрил на ліпідному бішарі**

Для дослідження структурних змін фібрилярних агрегатів G2R/W@8 при зв'язуванні з ліпідним бішаром використовували метод індуктивно-резонансного переносу енергії між двома флуоресцентними зондами, Тіофлавіном Т та мембранним зондом Лаурданом. Тіофлавін Т – це класичний амілоїдний маркер. Його зв'язування з амілоїдними фібрилами, зокрема, з фібрилами апоА-I 83 супроводжується суттєвим зростанням інтенсивності флуоресценції (рис. 5.3, Б). Як зазначалось вище, значне посилення випромінювання зонду в присутності фібрилярних агрегатів пояснюється обмеженими торсійними осциляціями бензотіазолового та амінобензольного кілець та майже планарною конформацією молекули Тіофлавіну Т, вбудованого у жолобки фібрил [226]. Така локалізація зонду припускає, що його просторовий розподіл відображає топологію поверхні фібрили. Це припущення обумовило використання Тіофлавіну Т в якості акцептору енергії, тому що саме орієнтація молекул акцептора навколо донора у значній мірі визначає ефективність переносу. Ідея полягала у тому, щоб за допомогою амілоїдзв'язаного Тіофлавіну Т та мембрано-асоційованого Лаурдану отримати інформацію не тільки стосовно білок-ліпідних взаємодій, а й стосовно змін морфології білкових агрегатів на поверхні мембрани. На рис. 6.4 зображені репрезентативні спектри флуоресценції Лаурдану в ФХ чи Хол30 модельних мембранах у відсутності та присутності фібрилярних варіантів апоА-I 83. Зменшення інтенсивності флуоресценції зонду при зростанні концентрації Тіофлавіну Т свідчить про наявність переносу енергії між двома флуорофорами. Характерною рисою Лаурдану є бімодальний розподіл у мембрані, що виражається в існуванні двох спектральних компонент з максимумами близько 440 та 490 нм, відповідно (див. розділ 5). Для отримання профілів ІРПЕ зміни

флуоресценції Лаурдану реєстрували на довжині хвилі 440 нм, що відповідає максимуму емісії фракції зонду, розташованої на рівні гліцеринових залишків.

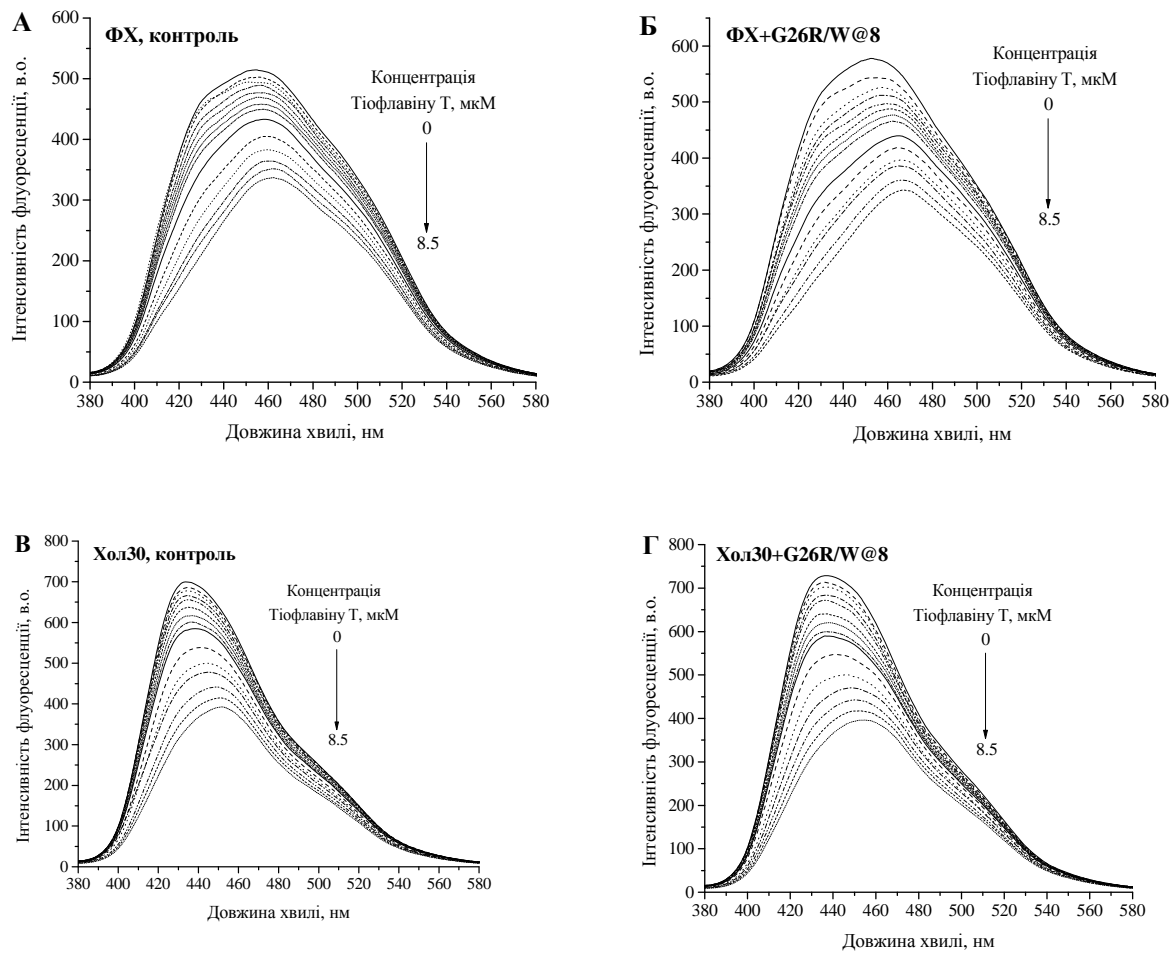


Рис. 6.4. Типові спектри флуоресценції Лаурдану при різних концентраціях Тіофлавіну Т в ліпідних та білок-ліпідних системах. Концентрація ліпиду була 13мкМ, білка – 1.6 мкМ, Лаурдану – 0.5 мкМ.

Як видно з рис. 6.5, у  $\Phi X$  та  $\Phi X + \text{apoA-I } 83$  системах криві ІРПЕ були практично ідентичні, тоді як у присутності G26R та G26R/W@8 перенос енергії посилювався. Наявність ІРПЕ у відсутності білка свідчить, що Тіофлавін Т здатний проникати у ліпідний бішар. Коли зонд додається до  $\Phi X$  ліпосом преінкубованих із варіантами apoA-I, Тіофлавін Т розподіляється між мембранними та білковими центрами зв'язування. Вочевидь, у випадку нефібрилізованого поліпептиду, який не містить специфічні центри зв'язування для Тіофлавіну Т, кількість мембранозв'язаних акцепторів та їх орієнтація відносно площини

донорів подібні до ФХ везикул, які не містили білка, що виражається у схожості кривих переносу для ФХ та ФХ+апоА-I 83 систем. На противагу, адсорбція фібрилярних мутантів апоА-I на поверхні ліпідних везикул супроводжується змінами поверхневої густини та конфігурації Тіофлавіну Т, асоційованого з мембанами, результатом чого є посилення переносу енергії.

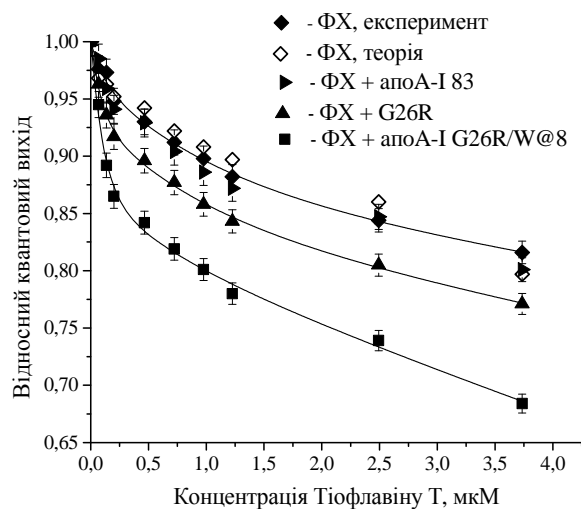


Рис. 6.5. Відносний квантовий вихід Лаурдану в ФХ бішарах у відсутності та присутності різних варіантів апоА-I. Концентрація ліпиду складала 13мкМ, білка – 1.6 мкМ, Лаурдану – 0.5 мкМ. Білі ромби відповідають значенням відносного квантового виходу, розрахованим з рівняння (4.22) зі значеннями параметрів  $\lg K_p = 2.8$  та  $d_a = 0$ , які забезпечують найкращу відповідність між теорією та експериментом.

Зростання ефективності ІРПЕ у присутності G26R та G26R/W@8 означає, що зв'язування фібрил з ФХ бішаром призводить до збільшення числа акцепторів у радіусі переносу енергії<sup>7</sup>. Зважаючи на те, що у випадку з нефібрилізованим апоА-I 83 перенос енергії між Лаурданом та Тіофлавіном Т практично не відрізняється від переносу енергії у ФХ ліпосомах, які не містили білок, можна зробити висновок, що посилення ІРПЕ у присутності G26R та G26R/W@8 відбувається лише за рахунок Тіофлавіну Т, зв'язаного з амілоїдними фібрилами.

З огляду на високу чутливість переносу енергії до просторового розподілу акцепторів, наступний етап досліджень був спрямований на з'ясування придатності ІРПЕ придатним для моніторингу структурних змін фібрилярних агрегатів. Для відповіді на це запитання дані переносу енергії, отримані для

<sup>7</sup> Відповідає приблизно двом радіусам Фьорстеру

випадку G26R/W@8 (мутанту з найвищим ступенем фібрилізації, розділ 5), були проаналізовані у рамках модифікованої моделі, описаної нижче. Як показано на рис. 6.1, амілоїдні фібрили G26R/W@8 характеризуються двома поліморфними формами, закрученої стрічки та спіральної стрічки. Такий структурний поліморфізм може також проявлятися у гетерогенності центрів зв'язування Тіофлавіну Т. У роботі [372] було показано, що нелінійність кривих зв'язування зонду з фібрилами G26R/W@8 у координатах Скетчарда обумовлена існуванням двох типів центрів зв'язування Тіофлавіну Т, які відповідають поліморфним конфігураціям фібрил – ЗС та СС. За даними подвійного флуориметричного титрування були отримані наступні параметри асоціації зонду з амілоїдним білком:  $K_{a1} = (6.2 \pm 0.7) \text{ мкМ}^{-1}$ ,  $n_1 = 0.1 \pm 0.02$  (центри зв'язування з високою спорідненістю);  $K_{a2} = (0.14 \pm 0.03) \text{ мкМ}^{-1}$ ,  $n_2 = 0.17 \pm 0.03$  (центри зв'язування з низькою спорідненістю), де  $K_a$  та  $n$  означають константу асоціації та стехіометрію зв'язування, яка визначалась як кількість молей Тіофлавіну Т, що приходяться на один моль мономерного білка. У роботі була також запропонована структурна модель амілоїдних фібрил G26R/W@8, згідно з якою протофіламенти пептиду мають структуру  $\beta$ -тяж – петля –  $\beta$ -тяж.  $\beta$ -тяжі, утворені залишками L14\_T16\_Y18\_D20\_L22\_D24\_R26\_D28\_V30 N-кінця та Q41\_N43\_K45\_L47\_N49\_D51, S52\_T54\_T56\_S58 С-кінця формують стеричну блискавку, яка стабілізується ван-дер-Ваальсовими силами, а також сольовим містком між R27 and D48. Схематичне зображення запропонованої структури амілоїдних фібрил представлено на рис. 6.6. Також, ця модель припускає, що два типи центрів зв'язування Тіофлавіну Т відповідають амінокислотним залишкам T16 – Y18 (центр зв'язування з високою спорідненістю) та D20 – L22 (центр зв'язування з низькою спорідненістю). На основі даних переносу енергії між W8 та Тіофлавіном Т [342], перший тип центрів (T16 – Y18) було віднесено до конфігурації спіральної стрічки, а другий тип (D20 – L22) – до конфігурації закрученої стрічки.

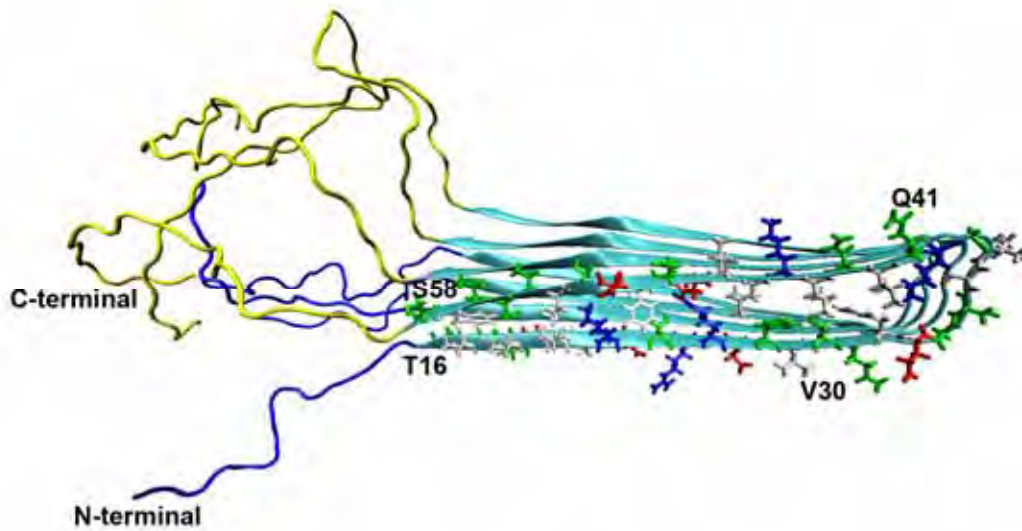


Рис. 6.6. Схематичне зображення тривимірної структури амілоїдних фібрил G26R/W@8. Модель побудована для чотирьох мономерів на основі симуляції у середовищі Rosetta.

Усі ці міркування склали основу для кількісної інтерпретації результатів ІРПЕ, представлених у даному підрозділі, у рамках моделювання методом Монте Карло. Стратегія обробки даних включала наступні кроки: а) кількісна оцінка параметрів зв'язування Тіофлавіну Т з ЗС та СС фібрилярними структурами чи ліпідним бішаром; б) генерація координат донора та акцептора у віртуальному боксі; в) розрахунок ефективності переносу енергії для певної просторової конфігурації донорів та акцепторів; г) визначення просторового розподілу акцепторів відносно донорів, який відповідає експериментальним профілям ІРПЕ. Відносний квантовий вихід, усереднений по усім донорам, дорівнює:

$$Q_r = \frac{1}{N_D} \sum_{j=1}^{N_D} \left[ 1 + \sum_{i=1}^{N_{AC}} \left( \frac{R_o^r \kappa^2}{r_{ij}} \right)^6 \right]^{-1} \quad (6.26)$$

де  $N_D$ ,  $N_{AC}$  означають число донорів та акцепторів у боксі, відповідно;  $l_b$  – сторона квадратного боксу, яка дорівнювала  $10 R_0$ . Значення орієнтаційного фактору варіювали від  $\kappa_{\min}^2 = 2/3(1 - 0.5(d_D + d_A))$  до  $\kappa_{\max}^2 = 2/3(1 + d_D + d_A + 3d_D d_A)$ , де  $d_D$  та  $d_A$  були розраховані на основі



вимірювання анізотропії флуоресценції (рівняння 2.20) [233].  $N_{AC}$  визначали як суму кількості Тіофлавіну Т, зв'язаного з СС ( $N_{CC}$ ), ЗС ( $N_{3C}$ ) та ліпідами ( $N_L$ ). Молярні концентрації цих фракцій ( $B_{CC}, B_{3C}, B_{AL}$ , відповідно) були розраховані шляхом розв'язання системи наступних рівнянь:

$$\begin{aligned} B_{CC} &= \frac{n_1 P(Z - B_{CC} - B_{3C} - B_{AL})}{1/K_{a1} + (Z - B_{CC} - B_{3C} - B_{AL})}; & B_{3C} &= \frac{n_2 P(Z - B_{CC} - B_{3C} - B_{AL})}{1/K_{a2} + (Z - B_{CC} - B_{3C} - B_{AL})} \\ B_{AL} &= \frac{K_P(Z - B_{CC} - B_{3C} - B_{AL})V_L}{V_W} \end{aligned} \quad (6.27)$$

де  $P$  – загальна концентрація мономерів білка,  $K_P$  – коефіцієнт розподілу зонду, який характеризує взаємодію Тіофлавіну Т з ліпідним бішаром,  $Z$  – загальна молярна концентрація Тіофлавіну Т,  $V_L$ ,  $V_W$  – об'єми ліпідної та водної фаз, відповідно. Значення  $K_P$  були визначені на основі аналізу кривих ІРПЕ, отриманих у відсутності білка, методом Монте-Карло, шляхом мінімізації функції:

$$\chi^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Q_{ri}^e - Q_{ri}^t)^2 \quad (6.28)$$

де  $N$  – число експериментальних точок,  $Q_r^e$  – експериментальне значення  $Q_r$ ,  $Q_r^t$  – відносний квантовий вихід, розрахований по аналогії із рівнянням (4.22).  $B_{AL}$  було виражене наступним чином:

$$B_{AL} = \frac{K_P V_L Z}{V_W + K_P V_L} \quad (6.29)$$

Як показано на рис. 6.7, у випадку ФХ ліпосом функція помилки досягає свого мінімуму при  $\lg K_P \sim 2.8$  та  $d_a \sim 0$ , що відповідає локалізації флуорофорів Лаурдану та Тіофлавіну Т приблизно на одному рівні у ліпідному бішарі.

Оцінки кількісних характеристик асоціації Тіофлавіну Т з ліпідним бішаром, а також поліморфами фібрилярних агрегатів G26R/W@8 (ЗС та СС) дозволили охарактеризувати розподіл цього зонду між ліпідними та білковими центрами зв'язування (рис. 6.8).

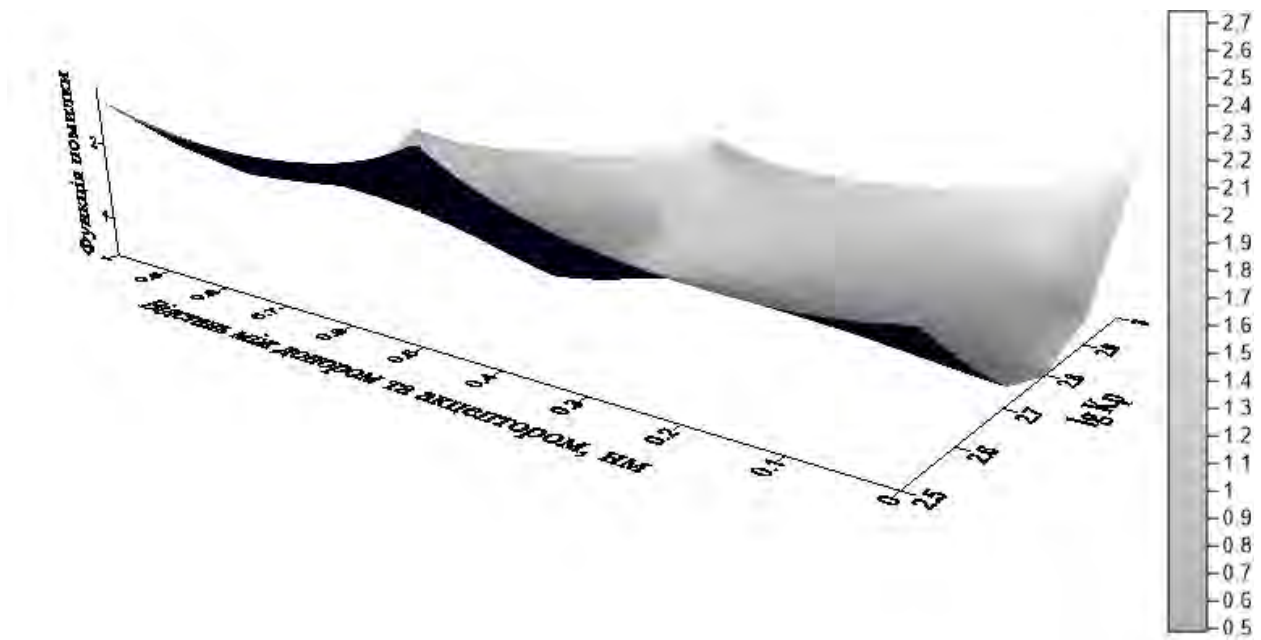


Рис. 6.7. Функція помилки, розрахована за рівнянням (6.28), при мінімізації даних ІРПЕ між Лаурданом та Тіофлавіном Т методом найменших квадратів. На осі  $z$  представлені значення  $\chi^2$ , помножені на  $10^3$ .

Визначення поверхневої густини ліпід-зв'язаних акцепторів та лінійної густини (число молекул Тіофлавіну Т на одну молекулу мономерного білка) акцептору, зв'язаного з ЗС чи СС, уможливило розрахунок числа різних фракцій Тіофлавіну Т ( $N_L$ ,  $N_{CC}$  та  $N_{ЗС}$ ) у боксі.

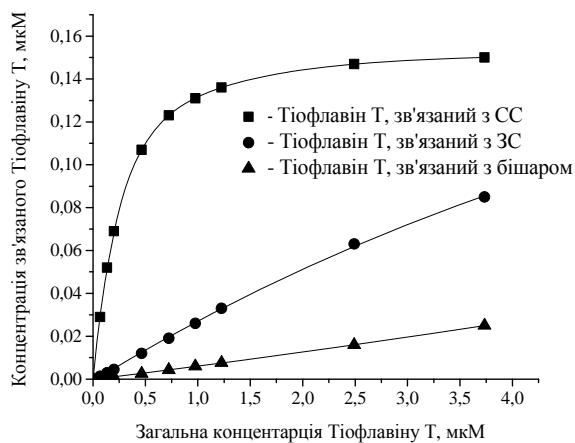


Рис. 6.8. Розподіл Тіофлавіну Т між центрами зв'язування на ліпідному бішарі та у жолобках G26R/W@8 фібрил (сайти з високою спорідненістю – СС, з низькою спорідненістю – ЗС).

У подальшому аналізі даних було розглянуто кілька можливостей. По-перше, припускали, що фібрили зберігають конфігурацію закрученої чи спіральної стрічки при асоціації з ліпідним бішаром. Окрім цього, вважали, що

донори розподіляються у площині, паралельній поверхні мембрани, та розташовані на відстані  $r_{fd}$  від осі фібрили (рис. 6.9). Довжина фібрил у конформації СС ( $l_{CC}$ ) та ЗС ( $l_{3C}$ ) по відношенню до  $l_b$  була визначена параметрами  $s_{CC} = l_{CC} / l_b$ ,  $s_{3C} = l_{3C} / l_b$ .

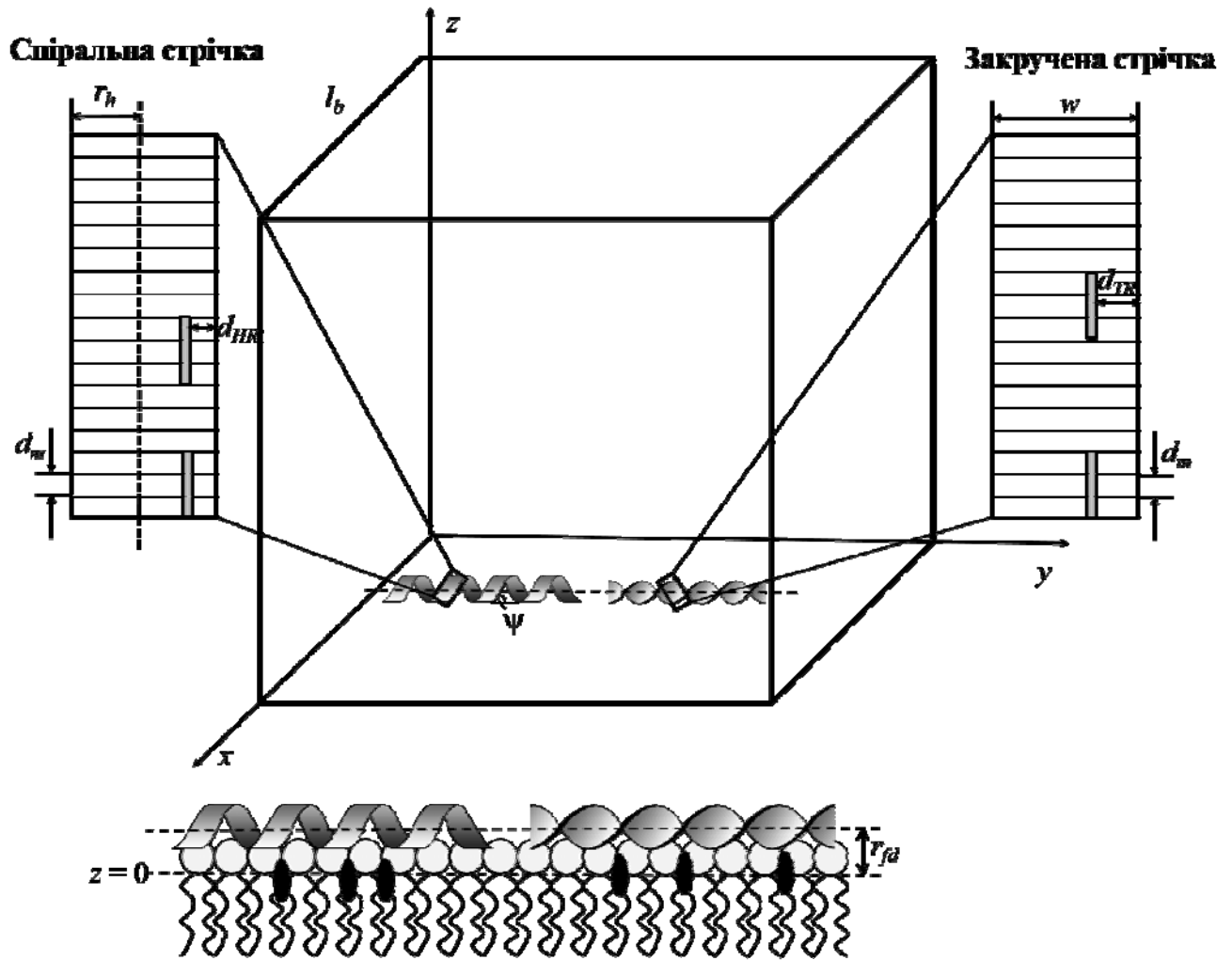


Рис. 6.9. Схематичне зображення параметрів, що використовувались при теоретичному аналізі процесу ІРПЕ. Молекули Тіофлавіну Т зображені сірими прямокутниками, а Лаурдану – чорними овалами.

За умови, що вісь фібрили спрямована вздовж осі  $y$ , координати молекул Тіофлавіну Т, розподіленого у конформері ЗС, визначаються наступним чином:

$$X_{A_k} = (l_b - 0.5w + d_{3C})N_R + (0.5w - d_{3C})\cos\left(\frac{2\pi d_m n_{3C} k}{P_{3C}}\right); \quad Y_{A_k} = n_{3C} d_m k;$$

$$Z_{A_k} = (0.5w - d_{3C}) \sin\left(\frac{2\pi d_m n_{3C} k}{P_{3C}}\right) \quad (6.30)$$

де  $w$  – ширина фібрили,  $P_{3C}$  – крок закрученої стрічки,  $d_m$  – відстань між мономерами білка (вздовж осі  $y$ ),  $n_{3C}$  – число мономерів білка, що приходить на одну молекулу акцептору,  $d_{BC}$  – відстань від Тіофлавіну Т до краю протофіламенту у конфігурації 3С,  $N_R$  – випадкове число, вибране з рівномірного розподілу від 0 до 1. Аналогічні вирази були використані для генерації координат акцепторів при зв'язуванні з конфігурацією СС:

$$X_{A_i} = (l_b - r_h)N_R + r_h \cos\left(\frac{2\pi d_h n_{CC} l}{P_{CC}}\right); \quad Y_{A_i} = \frac{d_{CC}}{\cos\psi} + n_{CC}d_h l; \quad Z_{A_i} = r_{fd} - r_h + r_h \sin\left(\frac{2\pi d_h n_{CC} l}{P_{CC}}\right);$$

$$P_{CC} = 2\pi r_h \tan\psi \quad (6.31)$$

де  $r_h$  – радіус спіралі,  $P_{CC}$  – крок спіральної стрічки,  $\psi$  – азимутальний кут нахилу,  $d_h = d_m \sin\psi$  – відстань між мономерами білка вздовж осі  $y$ , яка співпадає з віссю спіралі,  $n_{CC}$  – число мономерів білка, що приходить на одну молекулу акцептору,  $d_{CC}$  – відстань від Тіофлавіну Т до краю протофіламенту у конфігурації СС.

Використовуючи рівняння (6.26) – (6.31), були промодельовані криві переносу енергії між Лаурданом та Тіофлавіном Т для двох типів поліморфів фібрил. Структурні параметри фібрилярних агрегатів були отримані на основі аналізу АСМ зображень (рис. 6.1). Ширина та крок закрученої стрічки дорівнювали  $w \sim 10$  нм,  $P_{3C} \sim 50$  нм, у той час як радіус та азимутальний кут спіральної стрічки складали  $r_h \sim 5$  нм та  $\psi \sim 70^\circ$ . Значення  $d_m$  було 0.47 нм, що відповідає відстані між  $\beta$ -тяжами у  $\beta$ -листі,  $n_{3C}$  та  $n_{CC}$  знаходили з результатів флуориметричного титрування ( $n_{3C} = 11$  та  $n_{CC} = 10$ ).

Оцінки  $d_{BC}$  and  $d_{CC}$  були отримані на основі структурної моделі амілоїдних фібрил G26R/W@8, запропонованої у роботі [372] та описаної вище (рис. 6.6), згідно з якою жолобок спіральної стрічки T16\_Y18 та жолобок закрученої стрічки D20\_L22 є найбільш ймовірними центрами зв'язування Тіофлавіну Т.

Припускаючи, що інкремент поліпептидного ланцюга на один амінокислотний залишок  $\sim 0.35$  нм, можна зробити висновок, що максимальна відстань між W8 та жолобком T16\_Y18 складає  $\sim 3.2$  нм. Для жолобка D20\_L22 цей параметр дорівнює  $\sim 4.6$  нм. Аналогічні розрахунки для залишку L14, який розташовується на початку жорсткого ядра фібрили, показали, що ця відстань становить  $\sim 1.1$  нм та  $2.4$  нм, відповідно. З огляду на те, що W8 розташований на зовнішній стороні  $\beta$ -листів, приблизно у середині неупорядкованого фрагменту поліпептидного ланцюга, уявлялось доцільним прийняти відстань Тіофлавіну Т від L14 та W8 за нижню та верхню границі  $d_{CC}$  та  $d_{3C}$ , відповідно, тому параметр  $d_{CC}$  варіювали у межах  $1.1 - 3.2$  нм, а  $d_{3C}$  – від  $2.4$  до  $4.6$  нм.

Такий аналіз даних був спрямований на визначення набору параметрів  $\{r_{fd}, s_{CC}, s_{3C}\}$ , який забезпечує найкращу відповідність між експериментальним та теоретичним значенням відносного квантового виходу донору. Однак, спираючись на припущення, що амілоїдні фібрили зберігають свою конформацію закрученої чи спіральної стрічки при асоціації з ліпідним бішаром, виявилось неможливим знайти комбінацію параметрів, здатну описати експериментальні профілі ІРПЕ. Тому була запропонована гіпотеза стосовно ліпід-індукованої структурної реорганізації фібрилярного варіанту G26R/W@8, що включає розгортання CC та 3C. Насправді, як показано на рис. 6.10, А, розбіжність між експериментальними та теоретичними кривими зменшується у припущенні, що акцептори, зв'язані з фібрилами, орієнтовані вздовж лінії паралельно поверхні мембрани. Така орієнтація акцептору можлива при локалізації Тіофлавіну Т у жолобках амілоїдних фібрил, розташованих на поверхні фібрили, паралельно її довгій осі [452]. Окрім цього, найкраща підгонка досягалась у випадку, коли орієнтаційний фактор був залежний від відстані між донором та акцептором (рис. 6.10, А), вказуючи на те, що Тіофлавін Т схожий у своїй орієнтаційній поведінці з мембранними флуорофорами. Найбільш вірогідним поясненням цього ефекту є структурна трансформація зовнішніх жолобків фібрили при адсорбції певного фібрилярного фрагменту на поверхні ліпідного бішару. Така трансформація може

бути результатом реорганізації мережі водневих зв'язків білкових агрегатів у ліпідному середовищі. Як наслідок, центри зв'язування Тіофлавіну Т мають властивості, середні між мембранною та фібрилярною фазами, а орієнтаційні характеристики Тіофлавіну Т як акцептору енергії для Лаурдану схожі з характеристиками мембранозв'язаних флуорофорів.

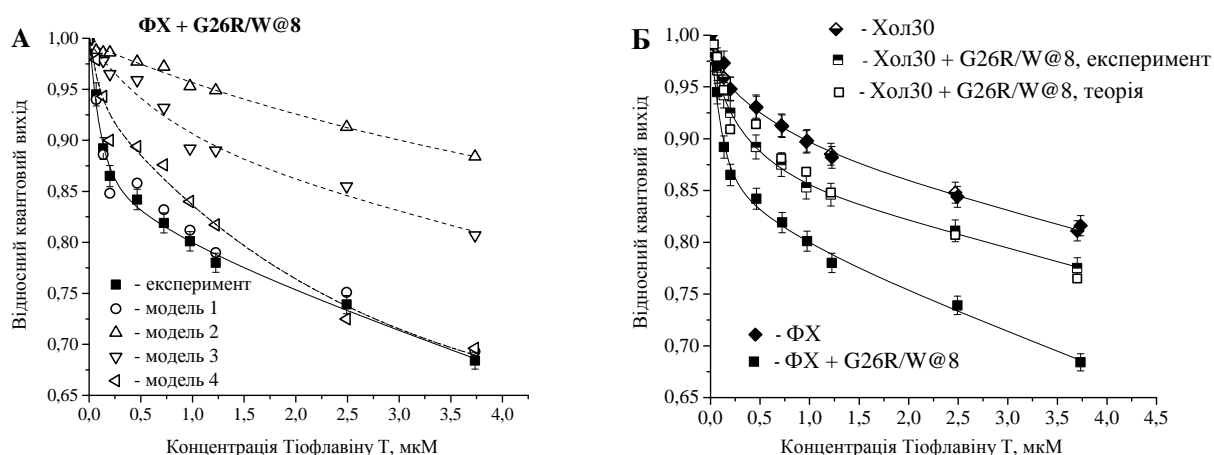


Рис. 6.10. Відносний квантовий вихід Лаурдану у FX та Хол30 ліпосомах як функція концентрації Тіофлавіну Т у відсутності та присутності G26R/W@8. **А** – незафарбовані символи означають  $Q_r$ , розрахований у рамках наступних моделей: *модель 1* – лінійне розташування акцепторів, орієнтаційний фактор залежить від відстані між донором та акцептором, три популяції акцепторів (Тіофлавін Т зв'язаний з розгорнутою СС, ЗС чи ліпідним бішаром); *модель 2* – спіральне розташування акцепторів, постійне значення орієнтаційного фактору, три популяції акцепторів (Тіофлавін Т зв'язаний з немодифікованими СС, ЗС чи ліпідним бішаром); *модель 3* – лінійне розташування акцепторів, фіксований орієнтаційний фактор, три популяції акцепторів (Тіофлавін Т зв'язаний з розгорнутими СС, ЗС чи ліпідним бішаром); *модель 4* – лінійне розташування акцепторів, орієнтаційний фактор залежить від відстані між донором та акцептором, дві популяції акцепторів (Тіофлавін Т зв'язаний з центрами зв'язування, локалізованими на СС або ЗС та ліпідному бішарі). **Б** – порівняння профілів ІРПЕ, отриманих для FX та Хол30 систем. Незафарбовані квадратні символи означають  $Q_r$ , розрахований у рамках *моделі 1* для системи Хол30+G26R/W@8.

Виявилось, що найкраща відповідність між експериментальними та теоретичними результатами досягається при  $l_{CC} \sim 29$  нм,  $l_{3C} \sim 6$  нм. При цьому орієнтація адсорбованих протофіламентів є паралельною до поверхні мембрани, а відстань між лінійно впорядкованими акцепторами та площиною донорів дорівнює  $d_{CC} \sim 1$  нм,  $d_{3C} \sim 1$  нм. Зважаючи на те, що Лаурдан у ліпідному бішарі розташовується на поверхні розділу полярної та неполярної областей, отримані оцінки відстані між донором та акцептором означають, що лінійні масиви фібрилозв'язаного Тіофлавіну Т орієнтуються на поверхні розділу ліпід/вода з молекулами зонду, локалізованими у жолобках, які обернені до водної фази. Далі, враховуючи той факт, що відстань між  $\beta$ -листами у стеричній блискавці складає близько 1 нм, отримані значення  $d_{CC}$  та  $d_{3C}$  свідчать про проникнення  $\beta$ -тяжів у мембрану на глибину  $\sim 1$  нм, приблизно до рівня початкових вуглецевих атомів ацильних ланцюгів. На наступному кроці аналізу даних була зроблена спроба описати взаємодію фібрил з ліпідним бішаром у термінах числа ліпідних молекул, які приходяться на один мономер білка. Враховуючи те, що площа ліпідної головки складає  $0.65 \text{ нм}^2$ , маємо, що квадратний бокс з довжиною сторони 29 нм містить 1294 молекул ліпідів, у той час як загальна довжина розгорнутих 3С чи СС  $\sim 35$  нм, що відповідає  $\sim 75$  мономерам білка. Тому, у конфігурації плоскої стрічки при асоціації G26R/W@8 фібрил з ФХ ліпосомами число ліпідних молекул на один мономер білка дорівнює  $\sim 17$ . Аналогічні оцінки для Хол30 везикул (рис. 6.10, Б) дорівнювали:  $l_{CC} \sim 17$  нм,  $l_{3C} = 0$ ,  $d_{CC} \sim 2$  нм, число ліпідних молекул на один мономер білка  $\sim 34$ . Це означає, що холестерин перешкоджає вбудовуванню фібрили у полярну зону ліпідного бішару, а розмір контактної ділянки вдвічі менший.

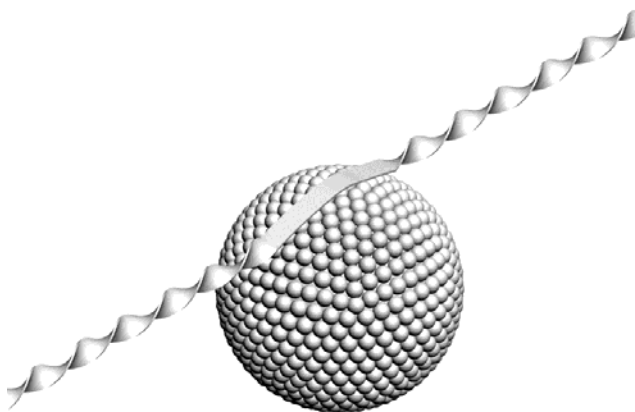


Рис. 6.11. Схематичне зображення розгортання фібрили на поверхні ліпідного бішару.

Як було показано в попередньому підрозділі, модуль Юнга амілоїдних фібрил G26R/W@8 складає 3 – 3.5 ГПа, тоді як ліпідний бішар більш еластичний (модуль Юнга  $\sim 1$  МПа) [453]. Сорбція ліпідних везикул вздовж протяжних фібрилярних агрегатів може призводити до формування своєрідного композитного матеріалу, жорсткість якого визначається усередненим значенням модулів Юнга його складових згідно з правилом сумішей [454]. Тому амілоїдні фібрили можуть порушувати цілісність бішару та модифікувати його еластичні властивості. Справді, зміни характеристик мембрани були виявлені при асоціації фібрилярного А $\beta$ -пептиду [455], лізоциму [392],  $\beta_2$ -мікроглобуліну [431]. У свою чергу, мембрани можуть впливати на персистентну довжину та жорсткість фібрилярних агрегатів. Результати обробки даних ІРПЕ, представлені у даному підрозділі, свідчать, що обидві поліморфні форми амілоїдних фібрил G26R/W@8 частково розгортаються на поверхні ФХ та Хол30 бішарів (рис. 6.11). Необхідно відмітити, що отримані результати добре узгоджуються з нещодавнім теоретичним аналізом конформаційної поведінки поверхневозв'язаних закручених полімерів з анізотропною жорсткістю при вигині [456]. У роботі було продемонстровано, що існує кореляція між кутом закручування та силою поверхневих взаємодій. Показано, що вище деякого критичного значення енергії зв'язування, полімер може приймати конформацію з нульовим закручуванням, тобто стан з гомогенною жорсткістю. Розглядаючи як приклад електростатичні взаємодії полімеру з поверхнею, автори зробили висновок, що поверхневий заряд клітинних мембран є одним з основних детермінантів, який контролює



розгортання спіральних філаментів F-актину [123]. У білок-ліпідних системах, досліджуваних у даній роботі, електростатичні взаємодії навряд чи є ключовим фактором, тому що експерименти ІРПЕ проводились з незарядженими ліпосомами та при підвищеній іонній силі (0.15 М). На основі цих міркувань, можна припустити, що асоціація фібрилярних варіантів G26R/W@8 з мембранами регулюється ван-дер-Ваальсовими та гідрофобними взаємодіями, які за силою порівняні або перевищують електростатичні контакти, що створює передумови для розгортання закручених та спіральних стрічок на поверхні розділу ліпід/вода.

### **6.3. Короткі висновки до Розділу 6**

1. Проведено аналіз еластичних властивостей двох поліморфних форм амілоїдних фібрил G26R/W@8 апоА-I 83 – закрученої та спіральної стрічок. Розраховані такі механічні параметри, як модуль Юнга, персистентна довжина та другий момент інерції.
2. Розроблена нова стратегія дослідження топологічних модифікацій фібрилярних агрегатів, що базується на аналізі результатів вимірювання ІРПЕ між мембранозв'язаним флуорофором та амілоїд-специфічним зондом методом Монте-Карло. При застосуванні цієї стратегії для аналізу даних ІРПЕ між Лаурданом, вбудованим у ФХ чи ФХ/Хол (30 мол%) ліпідні бішари, та Тіофлавіном Т, асоційованим з фібрилами, отримані аргументи на користь мембрано-опосередкованого структурного переходу амілоїдних фібрил G26R/W@8 апоА-I 83 із конфігурацій закрученої чи спіральної стрічки до планарної конфігурації.
3. Оцінка відстані між донором (Лаурданом) та акцептором (Тіофлавіном Т) показала, що  $\beta$ -тяжі амілоїдних фібрил G26R/W@8 апоА-I 83 вбудовуються у полярну область ФХ бішару. При цьому жолобки, в яких локалізується Тіофлавін Т, обернені у водну фазу.

## **РОЗДІЛ 7**

### **МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСУ АГРЕГАЦІЇ МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНИХ БІЛКІВ**

Розуміння структури та принципів утворення самоасоціатів білкових молекул є визначальним чинником при розробці стратегій лікування та своєчасного попередження конформаційних захворювань. Між тим, складна природа процесу агрегації поліпептидів, поряд із особливостями білок-білкових комплексів (структурна впорядкованість, нерозчинність у воді, специфічні взаємодії з мембранами) може суттєво ускладнювати експериментальне вивчення олігомеризації та фібрилізації білків. Тому для опису процесу агрегації білків та пептидів на атомарному та молекулярному рівнях доцільно доповнювати експериментальні дослідження результатами комп'ютерного моделювання. Даний розділ присвячено теоретичному аналізу різних аспектів мембрано-опосередкованої агрегації білків.

#### **7.1. Електростатично-контрольована адсорбція білків на поверхні ліпідного бішару: моделювання агрегаційної поведінки адсорбату**

Як вже неодноразово підкреслювалось, одним із основних детермінантів олігомеризації білків є дестабілізація їх структури при сорбції на поверхні мембрани [10-13]. З огляду на це, все більшої актуальності набуває вивчення процесу агрегації поверхнево-сорбованих білків. При аналізі адсорбції поліпептидів на ліпідному бішарі, можна очікувати, що самі по собі криві зв'язування будуть містити інформацію стосовно змін в агрегаційному стані білка. Експериментально, ізотерми адсорбції можуть бути отримані двома групами методів [456]. Перша включає прямі методи (зокрема, гель-фільтрацію та центрифугування), які базуються на фізичному розділенні зв'язаного та вільного білка. Однак, ці методи мають серйозні недоліки – вони потребують багато часу та можуть зсувати рівновагу між фракціями вільних та зв'язаних молекул. Друга група включає непрямі спектроскопічні методи, які ґрунтуються на існуванні взаємозв'язку між зміною певного вимірюваного параметру (поглинання,

інтенсивності флуоресценції, анізотропії, часу життя, ефективності переносу енергії, тощо) та кількістю зв'язаного білка. Ці методи дозволяють диференціювати процеси адсорбції мономерів та олігомерів, якщо спектральні відповіді мономерного та агрегованого білка відрізняються [457,458]. При отриманні ізотерм зв'язування, важливо оцінити, який стан білка відповідає за спостережуваний хід кривої. Виникає питання, чи можуть експерименти по дослідженню білок-ліпідної сорбції бути проведені таким чином, щоб мінімізувати неоднозначність інтерпретації даних? Один з підходів, який може бути використаний для відповіді на це запитання, базується на аналізі теоретичних кривих зв'язування, розрахованих для ряду параметрів, що можуть варіюватись в експерименті. У даному підрозділі розглянута проблема мембранної сорбції самоасоціюючих білків з акцентом на практичні рекомендації щодо планування та обробки результатів дослідження білок-ліпідного зв'язування. Головна мета полягала у диференціюванні білкових станів (мономерного чи олігомерного), відповідальних за спостережувані характеристики ізотерм адсорбції, та розробці експериментальної стратегії, що дозволить мінімізувати невизначеність в інтерпретації даних. Теоретичне моделювання кривих електростатично-контрольованого зв'язування проводили в рамках моделі адсорбції масштабованих частинок та теорії подвійного електричного шару (Додаток А).

#### *7.1.1. Загальна форма ізотерм адсорбції при утворенні агрегатів білка*

При дослідженні комплексоутворення в білок-ліпідних системах експериментально можуть бути отримані декілька типів кривих зв'язування, зокрема, залежності концентрації різних фракцій зв'язаного білка (мономер ( $B_1$ ) чи олігомери ( $B_z$ )), або концентрації всього сорбованого білка ( $B = B_1 + z_a B_z$ ) від загальної концентрації білка ( $P$ ) чи ліпиду ( $L$ ). По-перше, уявлялось важливим з'ясувати, як форма ізотерм адсорбції залежить від ступеня олігомеризації ( $z_a$ ). На рис. 7.1 представлені ізотерми адсорбції, розраховані при варіюванні  $L$  та постійному значенні  $P$  ( $P = \text{const}$ ,  $L = \text{var}$ ).

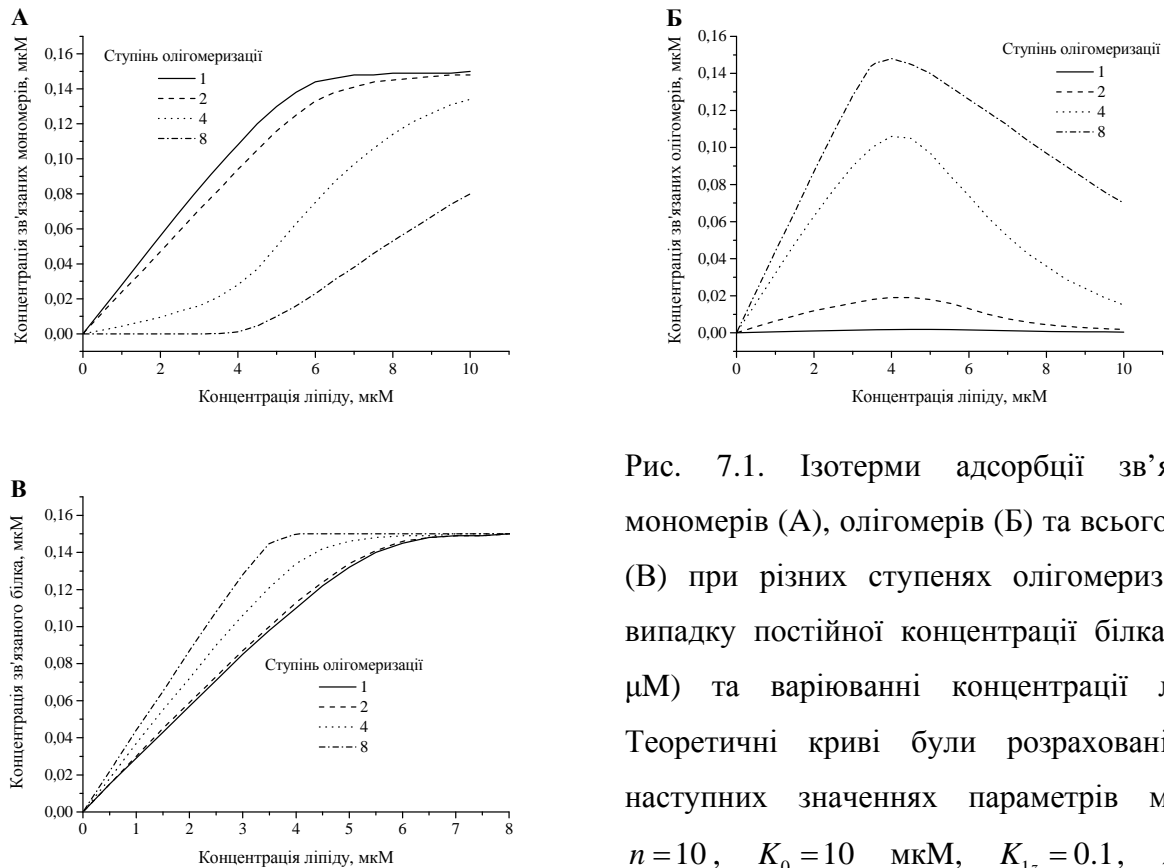


Рис. 7.1. Ізотерми адсорбції зв'язаних мономерів (А), олігомерів (Б) та всього білка (В) при різних ступенях олігомеризації у випадку постійної концентрації білка (0.15  $\mu\text{M}$ ) та варіюванні концентрації ліпиду. Теоретичні криві були розраховані при наступних значеннях параметрів моделі:  $n = 10$ ,  $K_0 = 10$  мкМ,  $K_{1z} = 0.1$ ,  $z_a = 4$ ,  $f_A = 0.4$ ,  $c = 20$  мМ, pH=7.4.

Слід відзначити наступні особливості кривих зв'язування:

- *зв'язані мономер* (рис. 7.1, А) – форма ізотерм адсорбції змінювалась з Ленгмюрівської на сигмоїдну при  $z_a > 2$ , точка перегину зростає з ростом  $z_a$ . Сигмоїдні криві характеризуються початковою «лаг-фазою» (при концентраціях ліпиду від 0 до  $\sim 4$  мкМ), що пов'язано з накопиченням зв'язаних олігомерів;
- *зв'язані олігомери* (рис. 7.1, Б) – ізотерми адсорбції мають асиметричну дзвоноподібну форму з максимумом при певному молярному співвідношенні білок:ліпід (L:P) (у нашому випадку  $\approx 27$ ). Примітно, асиметрія зростає при збільшенні  $z_a$  ( $z_a \rightarrow \infty$ ,  $B_z \rightarrow B$ );
- *зв'язаний білок* (мономер + олігомери) (Рис. 7.1, В) – ізотерми мають типову Ленгмюрівську форму, крутизна яких зростає, а точка насичення

зменшується при зростанні ступеня олігомеризації (що є характерною ознакою кооперативних процесів).

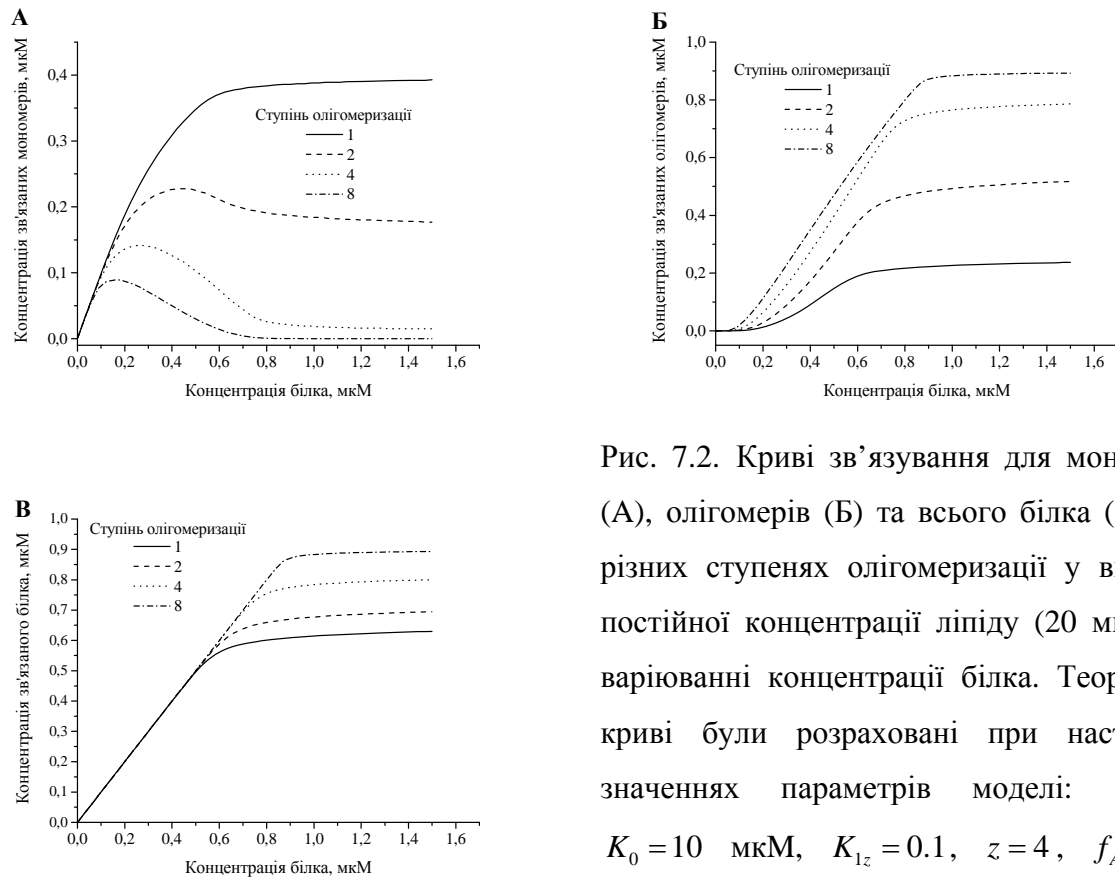


Рис. 7.2. Криві зв'язування для мономерів (А), олігомерів (Б) та всього білка (В) при різних ступенях олігомеризації у випадку постійної концентрації ліпиду (20 мкМ) та варіюванні концентрації білка. Теоретичні криві були розраховані при наступних значеннях параметрів моделі:  $n = 10$ ,  $K_0 = 10$  мкМ,  $K_{1z} = 0.1$ ,  $z = 4$ ,  $f_A = 0.4$ ,  $c = 20$  мМ,  $pH = 7.4$ .

Як показано на рис. 7.2, у випадку постійної концентрації ліпиду за змінної концентрації білка ( $L = \text{const}$ ,  $P - \text{var}$ ), ізоТЕРМИ адсорбції характеризувались іншою поведінкою:

- *зв'язані мономер* (рис. 7.2, А) – при відсутності олігомеризації ( $z_a = 1$ ) крива зв'язування має гіперболічну форму, тоді як при самоасоціації білка ( $z_a \geq 2$ ) вона набуває асиметричної дзвоноподібної форми. Положення максимуму, яке залежить від ступеня олігомеризації, спостерігається при  $L:P = 33, 50, 83, 135$  для  $z_a = 1, 2, 4, 8$ , відповідно;
- *зв'язані олігомери* (рис. 7.2, Б) – ізоТЕРМИ мають сигмоїдну форму, концентрація зв'язаних агрегатів зростає зі збільшенням  $z_a$ , точка перегину зменшується з підвищенням  $z_a$ ;

- *зв'язаний білок* (рис. 7.2, В) – ізотерми мають гіперболічну форму. Важливо відзначити, що всі криві початково співпадають при малих концентраціях білка ( $0 - 0.5$  мкМ), тоді як при  $P > 0.5$  мкМ вища ступінь олігомеризації призводить до збільшення лінійної ділянки ізотерми адсорбції. Іншими словами, зростання  $z_a$  пов'язане з підвищенням рівня насичення.

Результати моделювання продемонстрували, що утворення білкових олігомерів може бути ідентифіковано тільки при вивченні ізотерм адсорбції мономерів, форма яких зазнає характерних змін (з Ленгмюрівської на сигмоїдну ( $P = \text{const}$ ,  $L = \text{var}$ ) чи асиметричну дзвоноподібну ( $L = \text{const}$ ,  $P = \text{var}$ )) при зростанні ступеня олігомеризації.

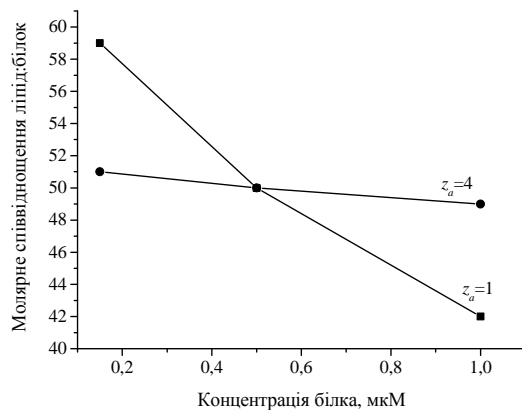


Рис. 7.3. Значення молярного співвідношення ліпід:білок, які відповідають насиченню кривих  $B(L)$ , розрахованих для різних концентрацій білка (0.15, 0.5 та 1 мкМ).

Натомість, форма кривих зв'язування для олігомерів та білка в цілому залишається практично незмінною при утворенні білкових агрегатів. При подальшому аналізі результатів моделювання була виявлена інша ознака олігомеризації білка. Ізотерми адсорбції  $B(L)$  ( $P = \text{const} = 0.15$  мкМ) мають точки насичення, які відрізняються для  $z_a = 1$  та  $z_a \geq 2$  (рис 7.1, В). Однак, коли  $P$  збільшується до 0.5 чи 1 мкМ, значення  $L:P$ , що відповідає насиченню, зменшується для  $z_a = 1$  та залишається практично незмінним для  $z_a = 4$  (рис. 7.3). Це означає, що порівняння точок насичення ізотерм  $B(L)$ , отриманих при варіюванні  $P$ , може дати додаткові аргументи на користь агрегації білка.

### 7.1.2. Вплив заряду білка та мембрани на поведінку кривих адсорбції

На наступному етапі досліджень уявлялося доцільним проаналізувати, чи може процес утворення білкових олігомерів впливати на характеристики кривих зв'язування, залежних від заряду. Експериментально, заряд білка може змінюватись, наприклад, при мутації певної зарядженої амінокислоти або/та при ковалентному міченні поліпептиду, варіюванні рН та іонної сили середовища. У свою чергу, поверхневий заряд ліпідного бішару контролюється фракцією аніонних фосфоліпідів та зовнішніми чинниками, такими як рН та іонна сила.

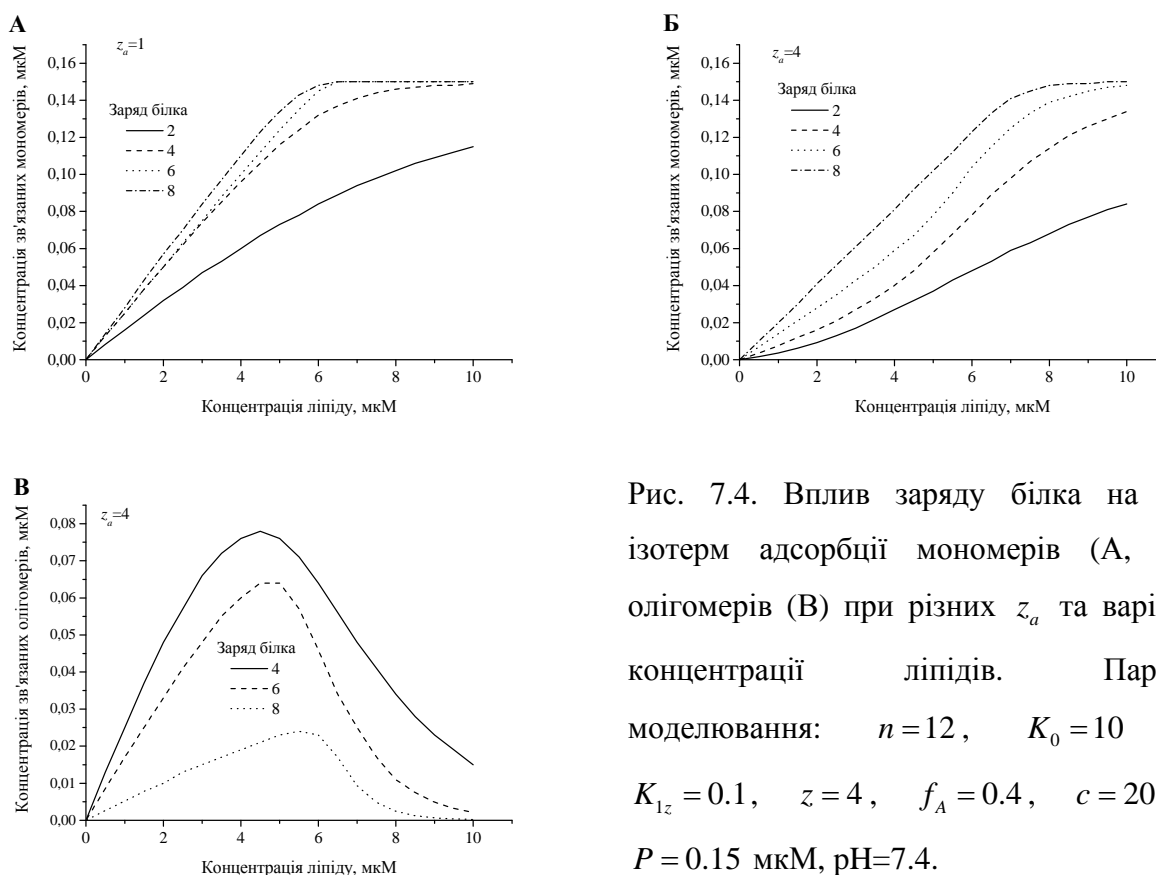


Рис. 7.4. Вплив заряду білка на форму ізотерм адсорбції мономерів (А, Б) чи олігомерів (В) при різних  $z_a$  та варіюванні концентрації ліпідів. Параметри моделювання:  $n = 12$ ,  $K_0 = 10$  мкМ,  $K_{1z} = 0.1$ ,  $z = 4$ ,  $f_A = 0.4$ ,  $c = 20$  мМ,  $P = 0.15$  мкМ, рН=7.4.

Із рис. 7.4 видно, що концентрація зв'язаних мономерів зростає зі збільшенням заряду білка від 2 до 8. У відсутності олігомеризації, збільшення  $B_1$  супроводжується зростанням крутизни кривих зв'язування (рис. 7.4, А), тоді як при  $z_a = 4$  зміни заряду білка призводять до модифікації форми ізотерм з сигмоїдної ( $z = 2, 4, 6$ ) на Ленгмюрівську ( $z = 8$ ) (рис. 7.4, Б). Якісно цей ефект може бути пояснений наступним чином. Латеральні білок-білкові взаємодії,

результатом яких є утворення білкових ансамблів, стають можливими внаслідок нейтралізації заряду поліпептидів аніонними ліпідними голівками в контактній ділянці. Здогадно, при відносно низькому  $z$  ( $\leq 6$ ) нейтралізація заряду достатня для того, щоб почалась самоасоціація. Однак, при більш високих  $z$ , наприклад,  $z=8$  ступінь нейтралізації заряду білка ліпідами значно нижчий, тому білок-білкове відштовхування буде перешкоджати утворенню агрегатів. У цьому випадку концентрація олігомерів зменшується (рис. 7.4, В), та ізотерма адсорбції мономерів стає нечутливою до присутності білкових агрегатів (рис. 7.4, Б). Цей приклад демонструє, що Ленгмюрівська форма експериментальних кривих зв'язування не є однозначним індикатором відсутності олігомеризації білка.

Необхідно відзначити, що вплив заряду білка на поведінку ізотерм адсорбції мономерів при фіксованій концентрації ліпиду та змінній концентрації білка був схожим – при  $z_a=1$  збільшення  $z$  супроводжується лише посиленням зв'язування (рис. 7.5, А), у той час коли при  $z_a=4$  залежності  $B_1(P)$  змінюють свою форму з асиметричної дзвоноподібної на гіперболічну (рис. 7.5, Б). Ці спостереження можуть слугувати додатковими аргументами на користь припущення стосовно зниженої чутливості кривих зв'язування мономерів до присутності олігомерів при високому заряді білка ( $z > 6$ ).

Поряд з цим, нетипова поведінка була виявлена для залежностей  $B(P)$ . Концептуально, посилення електростатичних білок-ліпідних взаємодій зі збільшенням  $z$  призводитиме до зростання концентрації зв'язаного білка. Саме це й спостерігалось у відсутності олігомеризації (рис. 7.5, В), але при  $z_a=4$  збільшення заряду білка супроводжувалось значним зменшенням  $B$  (рис. 7.5, Г). З математичної точки зору цей ефект є відображенням суперпозиції протилежних змін концентрацій мономерів та олігомерів при зростанні заряду білка. Наприклад,  $B_1$  зростає майже удвічі при збільшенні  $z$  (рис. 7.5, Б), тоді як зміни концентрації зв'язаних олігомерів були більш виражені –  $B_z$  зменшилось майже у чотири рази при  $z_a=4$  (дані не проілюстровані). Вочевидь, результатом



домінуючого зниження  $B_z$  є загальне зменшення концентрації зв'язаного білка (рис. 5, Г).

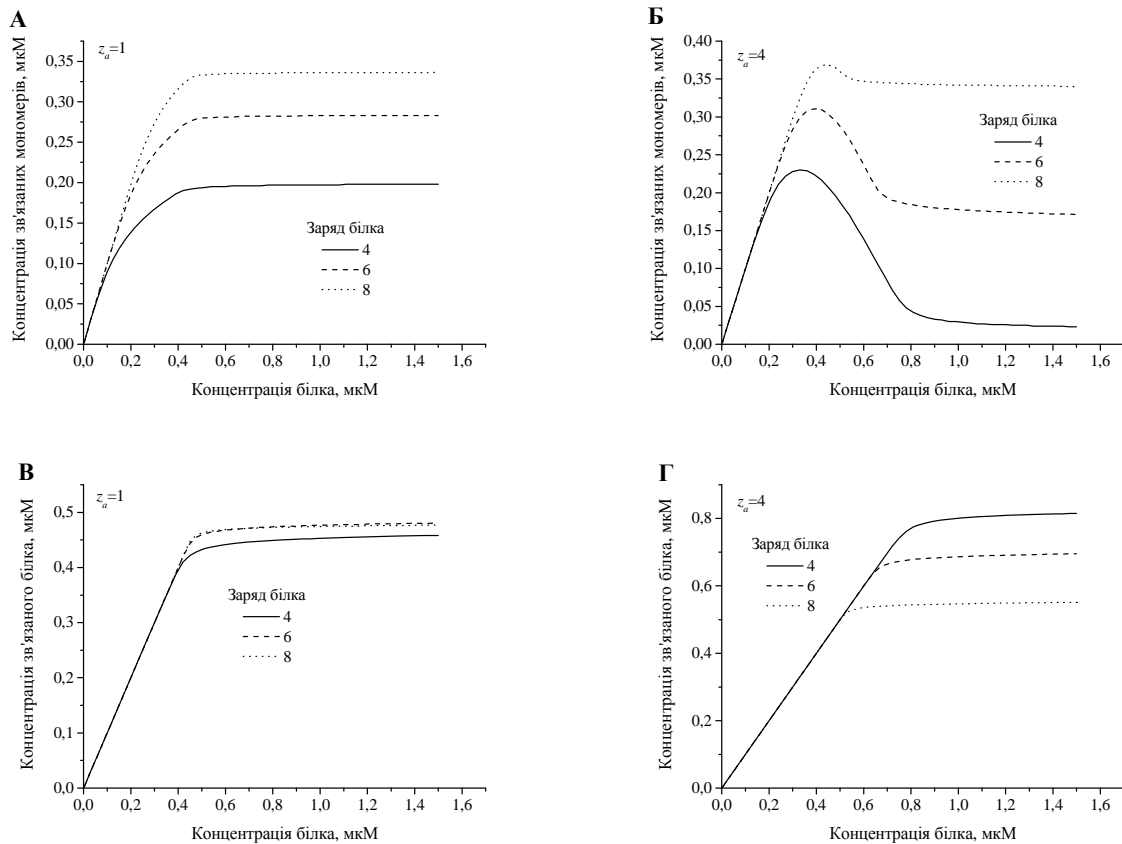


Рис. 7.5. Концентрація зв'язаних мономерів (А, Б) та всього білка (В, Г) як функція  $P$  при різних значеннях заряду білка. Параметри моделювання були:  $n=12$ ,  $K_0=10$  мкМ,  $K_{1z}=0.1$ ,  $z=4$ ,  $f_A=0.4$ ,  $c=20$  мМ,  $L=20$  мкМ,  $pH=7.4$ .

На ефективність електростатичних білок-ліпідних взаємодій може впливати також поверхневий заряд ліпідного бішару. При  $z_a=1$  усі види ізоTERM адсорбції характеризувались посиленням білок-ліпідного зв'язування при збільшенні молярної фракції аніонного ліпиду (табл. 7.1). Натомість, у випадку агрегації білка поведінка кривих зв'язування була більш складною. Зокрема, при  $z_a=4$  ізоТЕРМИ адсорбції мали наступні відмітні риси:

- *зв'язані мономер* (рис. 7.6, А, Г) – криві змінюють форму з Ленгмюрівської на сигмоїдну ( $P=\text{const}$ ,  $L-\text{var}$ ) чи асиметричну дзвоноподібну ( $L=\text{const}$ ,  $P-\text{var}$ ) зі збільшенням поверхневої густини заряду бішару;

- *зв'язані олігомери* (рис. 7.6, Б) –  $B_z$  значно зростає з підвищенням вмісту аніонних ліпідів  $f_A$ ;
- *зв'язаний білок* (рис. 7.6, В) –  $B$  збільшується, молярне співвідношення ліпід:білок, яке відповідає насиченню, зменшується зі зростанням  $f_A$ .

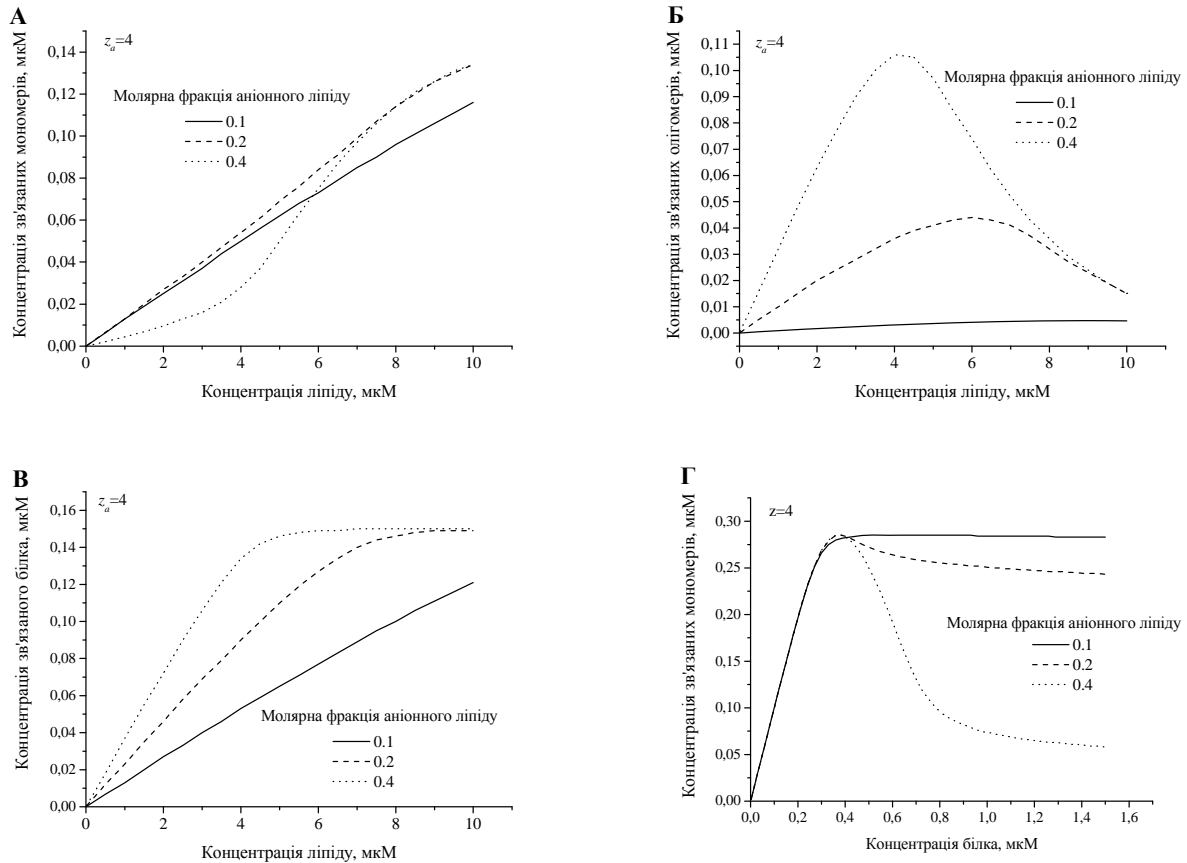


Рис. 7.6. Вплив поверхневого заряду ліпідного бішару на криві зв'язування мономерів (А, Г), олігомерів (Б) та всього білка (В) у випадку агрегації білка.

Здогадно, спостережувана поведінка ізотерм адсорбції мономерів (рис. 7.6, А, Г) є результатом превалюючої ролі електростатичної компоненти білок-ліпідного комплексоутворення  $K_{el}$  (яка в значній мірі залежить від поверхневого електростатичного потенціалу мембран (Додаток А). Як показано на рис. 7.7,  $K_{el}$  (та, як наслідок,  $K_d$ ) зростає з підвищенням концентрації ліпиду та зменшується зі зростанням концентрації білка. Ці тенденції віддзеркалюють зміни ступеня нейтралізації заряду мембрани сорбованим білком. Однак, електростатично-

контрольоване зростання константи асоціації не може задовільно пояснити зміни форми ізотерм при збільшенні молярної фракції аніонного ліпиду.

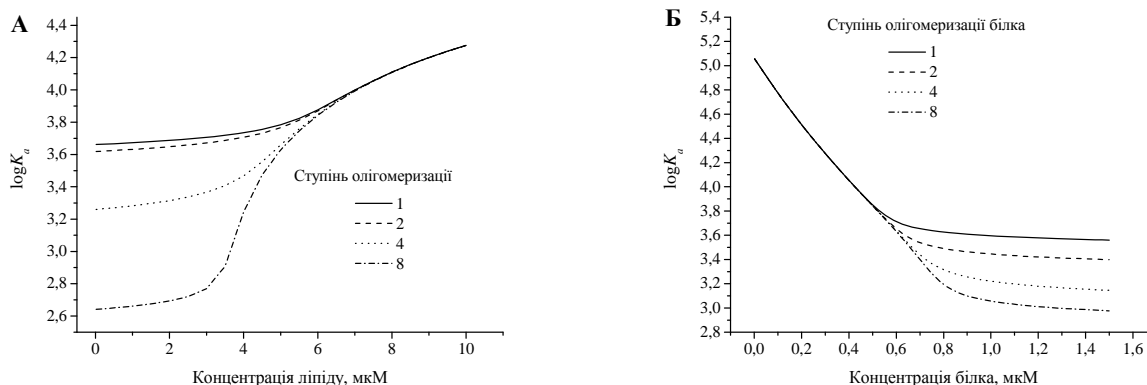


Рис. 7.7. Константа асоціації як функція концентрації ліпиду (А) чи білка (Б). Теоретичні криві були розраховані при наступних значеннях параметрів моделі:  $n = 10$ ,  $K_0 = 10$  мкМ,  $K_{1z} = 0.1$ ,  $z_a = 4$ ,  $z = 4$ ,  $f_A = 0.4$ ,  $c = 20$  мМ, рН=7.4, (А) –  $K_{1z} = 0.1$ ,  $P = 0.15$  мкМ, (Б) –  $K_{1z} = 10$ ,  $L = 20$  мкМ.

Більш того, зростання  $K_0$  та  $K_{1z}$  не призводило до сигмоїдної залежності  $B_1(L)$  (чи дзвоноподібної  $B_1(P)$ ), коли молярна фракція аніонних ліпідів не перевищувала 0.2. Тому, ймовірно, модифікації ізотерм адсорбції мономерів не мають суто математичну природу, а є результатом посилення агрегаційного потенціалу білка при підвищенні заряду мембрани. Можна припустити, що у випадку слабозаряджених мембран концентрація зв'язаних олігомерів недостатньо висока для того, щоб забезпечити сигмоїдну форму кривих зв'язування мономерного білка. Натомість, при високому вмісті аніонних фосфоліпідів значне посилення електростатичної компоненти зв'язування сприяє акумуляції білка на поверхні розділу ліпід/вода, посилюючи тим самим його агрегацію. Це виражається не тільки у зростанні  $B_z$ , але й у трансформації форми ізотерм адсорбції мономерів з Ленгмюрівської на сигмоїдну чи дзвоноподібну (рис. 7.6, А, Д). Припущення стосовно посилення агрегаційної здатності білка при збільшенні заряду мембрани підтверджується також спостереженням, що чим

вище  $f_A$ , тим нижче значення  $L:P$ , яке відповідає максимальній концентрації зв'язаних олігомерів (рис. 7.6, Б).

Відзначимо, що описане вище явище може мати пряме біологічне значення. Як відомо, структура клітинних мембран відзначається високою гетерогенністю. Такі чинники як температура [459], ліпід-ліпідна [460] або білок-ліпідна [278] гідрофобна невідповідність, поверхневі електростатичні взаємодії [461] чи водневі зв'язки між ліпідними голівками [462] можуть індукувати латеральне розділення фаз у ліпідному бішарі. Велика кількість досліджень свідчить про те, що гетерогенна організація мембран контролює асоціацію заряджених макромолекул [278,461]. Адсорбція білків на латеральних ліпідних доменах, які відрізняються за своїм ліпідним складом та зарядом, може суттєво модулювати агрегаційний потенціал поліпептидів. Більш того, сама по собі сорбція білка може призвести до утворення доменів [274,284,285]. Ступінь білок-індукованої сегрегації ліпідів контролюється балансом між енергетичними затратами, пов'язаними зі змінами електростатичної енергії сорбції та ентропії змішування ліпідів. Моделі латерального перерозподілу ліпідів підкреслюють важливість як електростатичних, так і неелектростатичних механізмів, які включають ліпід-опосередковане притягання між сорбованими білками, що може супроводжуватись еластичними деформаціями мембрани.

### *7.1.3. Поведінка ізотерм зв'язування в залежності від рН та іонної сили розчину*

На наступному етапі досліджень уявлялось доцільним проаналізувати модифікації ізотерм адсорбції у відповідь на зміни рН та іонної сили розчину. На рис. 7.8 представлені результати чисельного моделювання, отримані при різних значеннях рН. У випадку фіксованої концентрації білка  $P$  зростання рН від 3 до 8 супроводжувалось посиленням зв'язування мономерів та збільшенням крутизни ізотерм при  $z_a = 1$ , а також трансформацією кривих з гіперболічної форми на сигмоїдну при  $z_a = 4$  (рис. 7.8, А, Б). Для залежностей  $B_z(L)$  та  $B(L)$  зростання рН призвело тільки до збільшення  $B_z$  та  $B$  без змін у формі кривих (табл. 7.1). Зауважимо, що усі розрахунки були проведені зі значеннями  $pK_a$ , які відповідають

константі іонізації фосфатидилгліцерину. Здогадно, форма ізотерм адсорбції мономерів при  $z_a = 4$  контролюється різницею між  $pH$  та  $pK_a$ .

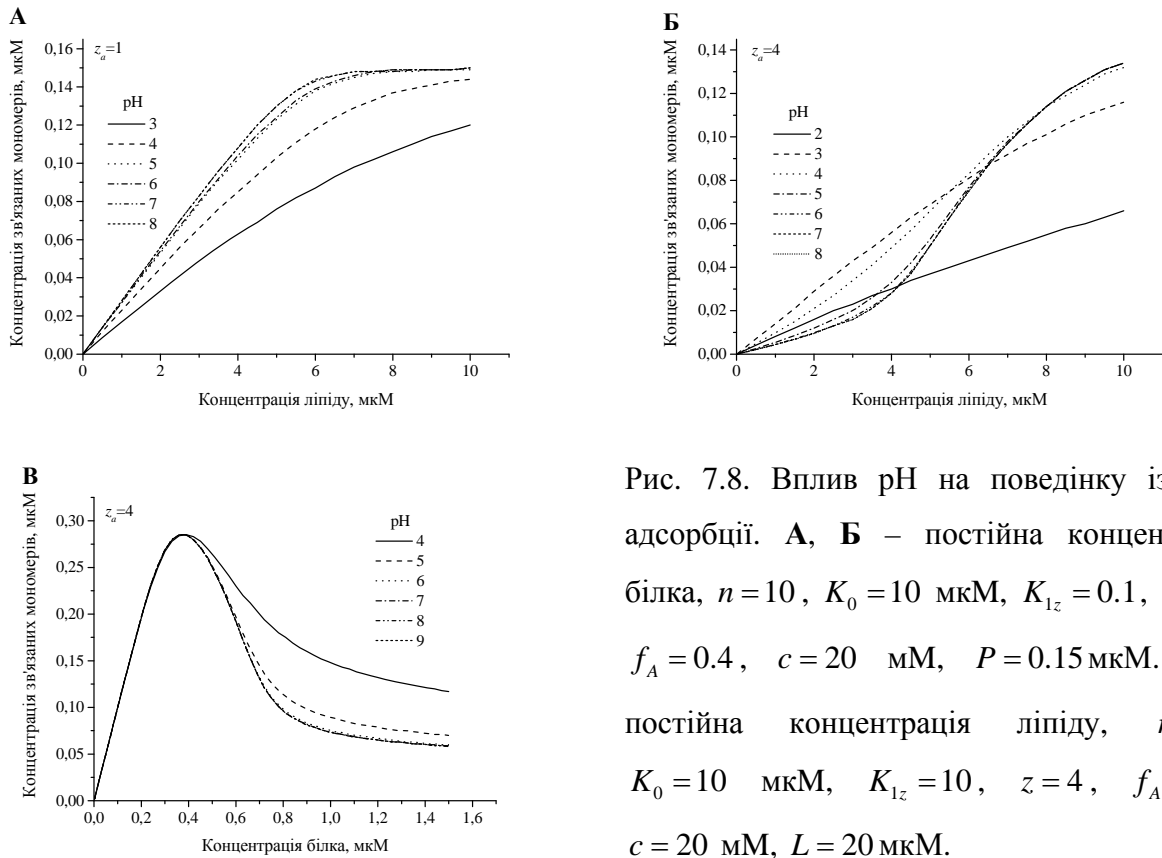


Рис. 7.8. Вплив  $pH$  на поведінку ізотерм адсорбції. **А, Б** – постійна концентрація білка,  $n = 10$ ,  $K_0 = 10$  мкМ,  $K_{1z} = 0.1$ ,  $z = 4$ ,  $f_A = 0.4$ ,  $c = 20$  мМ,  $P = 0.15$  мкМ. **В** – постійна концентрація ліпиду,  $n = 10$ ,  $K_0 = 10$  мкМ,  $K_{1z} = 10$ ,  $z = 4$ ,  $f_A = 0.4$ ,  $c = 20$  мМ,  $L = 20$  мкМ.

Тому при інтерпретації експериментальних результатів слід мати на увазі, що Ленгмюрівська форма кривих  $B_1(L)$  не є індикатором зниженої агрегаційної здатності білка та може бути результатом малої різниці  $|pH - pK_a|$ . З огляду на це, експериментальні умови повинні бути обрані таким чином, щоб константа іонізації аніонного ліпиду та  $pH$  розчину суттєво відрізнялись. Варто відзначити, що константа іонізації аніонних ліпідів коливається у межах від 2.5 (для фосфатидилінозитолу) до 5.5 (для фосфатидилсерину) [463]. Більш складна ситуація спостерігається, коли аніонна складова ліпідного бішару представлена фосфоліпідом, для якого характерне двоступінчасте депротонування, як, наприклад, для кардіоліпіну. Цей ліпід містить дві фосфатні групи та чотири ацильних ланцюга та має два  $pK_a$  – перше дорівнює 2.8, а друге варіює у межах від 7.5 до 9.5 [464]. У цьому випадку форма кривих  $B_1(L)$  визначається не тільки

різницею  $|\text{pH}-\text{p}K_a|$ , але й балансом між депротонованими та частково протонованими фракціями кардіоліпіну.

Необхідно зауважити, що у рамках даної роботи заряд білка не розглядався як функція рН. В реальних біологічних системах ізоелектрична точка поліпептиду визначає залежність  $z$  від рН, тому криві зв'язування можуть відображати внески, зумовлені різницями  $|\text{pH}-\text{p}K_a|$  та  $|\text{pH}-\text{p}I|$ .

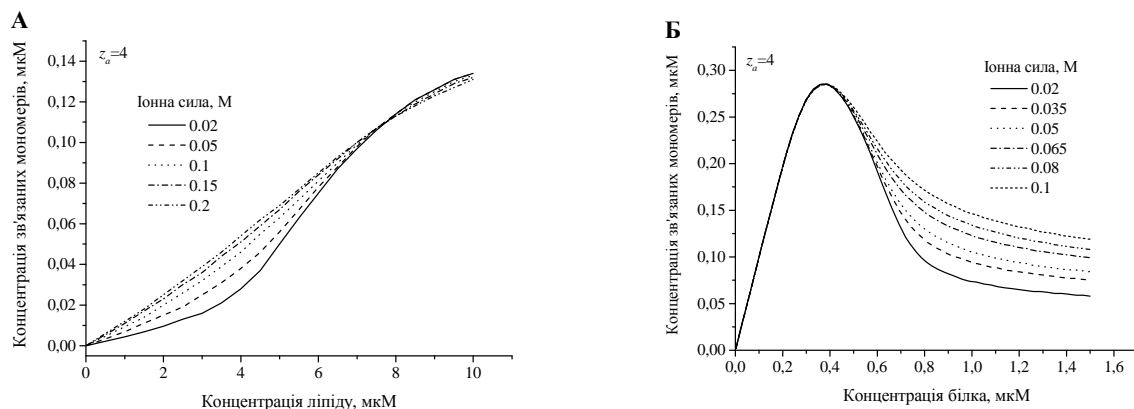


Рис. 7.9. Криві зв'язування мономерів при різних іонних силах розчину для випадку самоасоційованого білка. Використані параметри моделі:  $n = 10$ ,  $K_0 = 10$  мкМ,  $z = 4$ ,  $f_A = 0.4$ , **A** –  $K_{1z} = 0.1$ ,  $P = 0.15$  мкМ, **Б** –  $K_{1z} = 10$ ,  $L = 20$  мкМ,

Аналіз ізотерм адсорбції, розрахованих при різних рН та фіксованій концентрації ліпиду виявив деякі особливості лише для кривих  $B_1(P)$  при  $z_a = 4$  (рис. 7.8, В). У той час, коли для залежностей  $B_1(P)$ ,  $B_z(P)$ ,  $B(P)$  при  $z_a = 1$  та  $B_z(P)$ ,  $B(P)$  при  $z_a = 4$  зростання рН призвело до посилення зв'язування, концентрація зв'язаних олігомерів зменшувалась. Подібний ефект спостерігався і при варіюванні іонної сили. Зокрема, лише криві  $B_1(P)$  та  $B_1(L)$  змінювались при наявності агрегації білка, тоді як інші залежності відображали зниження спорідненості білка до мембрани (табл. 7.1), як і очікувалось для електростатично-контрольованої адсорбції. Трансформація кривої  $B_1(L)$  з сигмоїдної на Ленгмюрівську (рис. 7.9, А, Б) може бути інтерпретована у рамках зниженої чутливості ізотерм адсорбції мономерів до утворення білкових агрегатів, як було обговорено для рис. 7.4 та 7.5. У свою чергу, збільшення  $B_1$  з

підвищенням іонної сили (рис. 7.9, Б), разом із рН-індукованим зниженням  $B_1$  при  $z_a = 4$  (рис. 7.8, В) може бути ідентифіковано як ознака агрегації білка, тобто такі аномальні зміни  $B_1(P)$  мають місце лише тоді, коли в системі зв'язаний білок представлений не лише мономерними, а й олігомерними молекулами.

#### *7.1.4. Порівняння з експериментальними результатами*

Адекватність запропонованого методологічного підходу була продемонстрована у роботі [164]. Зокрема, для детектування сорбції лізоциму на поверхні аніонних мембран білок був ковалентно мічений флуоресцеїном. Криві зв'язування мономерів отримували шляхом реєстрації змін флуоресценції мітки як функцію концентрації ліпиду та молярної фракції аніонних фосфоліпідів. Модифікація форми ізотерм адсорбції з Ленгмюрівської на сигмоїдну при збільшенні заряду мембрани була пояснена посиленням агрегаційного потенціалу білка. Хіндерлітер та Мей також продемонстрували, що сигмоїдність кривих зв'язування є характерною ознакою агрегації білка [465]. При дослідженні адсорбції домену C2A білка синаптоагміну на поверхні аніонних везикул сигмоїдна форма кривих зв'язування була інтерпретована в рамках уявлень про утворення самоасоціатів білка на ліпідній матриці. Авторами було показано, що формування таких самоасоціатів надає кооперативності процесу агрегації, відмінною рисою якої є сигмоїдна форма кривих зв'язування. Варто відмітити, що кооперативність білок-ліпідного комплексоутворення може виникати не лише внаслідок білок-білкових взаємодій, але і в результаті структурної реорганізації ліпідного бішару.

Таблиця 7.1

Вплив агрегації білка на характеристики ізотерм адсорбції

Параметр	Особливості кривих зв'язування					
	Мономери		Олігомери		Весь білок	
	$L - \text{var}$	$P - \text{var}$	$L - \text{var}$	$P - \text{var}$	$L - \text{var}$	$P - \text{var}$
$z_a$	СФ** при $z_a > 2$	ДФ** при $z_a > 2$ , позиція максимуму залежить від $z_a$	асиметрична ДФ, максимум при певному значенні L:P, асиметрія $\uparrow^{***}$ із $z_a$	СФ при усіх значеннях $z_a$	ЛФ**, крутизна $\uparrow$ із $z_a$	ЛФ, всі криві мають рівномірний нахил, $B \uparrow$ із $z_a$
	$B_l \downarrow^{***}$ із $\uparrow z_a$		$B_z \uparrow$ із $z_a$			
$z$	$z_a=1$ : $\uparrow$ крутизни кривих, $z_a=4$ : зміна кривих з СФ на ЛФ	$z_a=4$ : зміна кривих з ДФ на ЛФ	асиметрична ДФ, максимум зсувається у бік вищих L:P із $\uparrow z$	незмінна СФ при усіх $z$	незмінна ЛФ при усіх $z$ незалежно від $z_a$ , $B$ та крутизна кривих $\uparrow$ із $z$	незмінна ЛФ при усіх $z$ незалежно від $z_a$ , $z_a=1$ : $B \uparrow$ із $z$ , $z_a=4$ : $B \downarrow$ із $z$
	$B_l \uparrow$ із $z$		$B_z \downarrow$ із $\uparrow$ in $z$			
$f_A$	$z_a=1$ : $B_l$ та крутизна кривих $\uparrow$ , $z_a=4$ : зміни кривих з ЛФ та СФ при $\uparrow f_A$	$z_a=1$ : ЛФ, $B_l \uparrow$ , $z_a=4$ : зміна кривих з ЛФ та ДФ, $B_l \downarrow$ із $\uparrow$ у $f_A$	асиметрична ДФ, максимум зсувається у бік нижчих L:P із $\uparrow$ у $f_A$	СФ при усіх $f_A$	ЛФ при усіх $f_A$ незалежно від $z_a$ , крутизна $\uparrow$ із $f_A$	незмінна ЛФ при усіх $f_A$ , немає залежності від $z_a$
			$B_z \uparrow$ із $f_A$		$B \uparrow$ із $f_A$	



pH	$z_a=1$ : ЛФ, $B_I$ та крутизна кривих $\uparrow$ , $z_a=4$ : ізотерми змінюють форму з ЛФ на СФ при $\uparrow$ pH	$z_a=1$ : ЛФ, $B_I \uparrow$ , $z_a=4$ : ДФ, $B_I \downarrow$ при $\uparrow$ pH	асиметрична ДФ, максимум не залежить від pH	СФ при усіх pH	ЛФ при усіх pH незалежно від $z_a$ , крутизна $\uparrow$ із pH	ЛФ при усіх pH незалежно від $z_a$
			$B_z \uparrow$ із pH		$B \uparrow$ із pH	
c	$z_a=1$ : ЛФ, $B_I$ та крутизна $\downarrow$ , $z_a=4$ : ізотерми змінюють форму з СФ на ЛФ при $\uparrow$ c	$z_a=1$ : ЛФ, $B_I \downarrow$ , $z_a=4$ : ДФ, $B_I \uparrow$ при $\uparrow$ c	асиметрична ДФ, максимум зсувається у бік вищих значень L:P при $\uparrow$ c	СФ при усіх c	ЛФ при усіх pH незалежно від $z_a$ , крутизна $\downarrow$ при $\uparrow$ c	ЛФ при усіх c незалежно від $z_a$
			$B_z \downarrow$ із $\uparrow$ c		$B \downarrow$ із $\uparrow$ c	

\* – сірим виділені особливі риси ізотерм адсорбції, які можна вважати індикатором олігомеризації білка,

\*\* – СФ – сигмоїдна форма, ДФ – дзвоноподібна форма, ЛФ – Ленгмюрівська форма,

\*\*\* – стрілки вгору та вниз означають зростання та зменшення певного параметру, відповідно.

Кооперативна взаємодія з ліпідним бішаром спостерігалось також для ряду пептидів, включаючи аламетицин, маганін, антибіотик трихогін GA IV, тощо [466-468]. Концентрація зв'язаних агрегатів, визначена на основі даних орієнтованого кругового дихроїзму та часороздільної флуоресценції, мала сигмоїдну залежність від загальної концентрації пептидів [467,468]. Це спостереження підтверджується і нашими даними, як показано на рис. 7.2, Б. Аналіз кривих зв'язування, отриманих при варіюванні іонної сили для нативного та денатурованого цитохрому *c*, сорбованого на негативно заряджених ліпідних мембранах дозволив авторам роботи [357] зробити висновок щодо посиленої здатності денатурованого білка агрегувати на поверхні бішару. Хоча спостережувані залежності  $B(P)$  мали типову Ленгмюрівську форму, було показано, що ізотерми адсорбції для денатурованого білка можуть бути описані в рамках моделі електростатично-контрольованої адсорбції ван-дер-Ваальса тільки у випадку ненульових позитивних значень параметру, який характеризує білок-білкові взаємодії (тобто, у випадку утворення агрегатів цитохрому *c*).

На закінчення необхідно підкреслити, що моделі адсорбції, обговорені у даному підрозділі, представляють собою компроміс між складністю застосованого теоретичного підходу та здатністю моделі відобразити загальні тенденції агрегаційної поведінки білка на поверхні. Зрозуміло, жодна модель не в змозі врахувати усі можливі чинники. Зокрема, у даній роботі електростатична компонента константи асоціації була розрахована у припущенні рівномірного розподілу заряду на поверхні білка [469]. Хоча цей підхід є спрощеним, він широко використовується та у ряді випадків є найбільш адекватним [164,280,357], тому що альтернативна модель фіксованих зарядів [470] потребує знання точної локалізації заряджених груп на поверхні білка. У цьому випадку, з використанням формалізму Тенфорда-Кірквуда загальна електростатична вільна енергія білка розраховується як сума вільних енергій взаємодії між кожною парою точкових зарядів [470].

При з'ясуванні загальних закономірностей протікання процесу самоасоціації поверхнево-зв'язаних білків концепція рівномірного розподілу зарядів та ефективного заряду білка здається більш раціональною, ніж білок-специфічна модель фіксованих зарядів. Окрім цього, варто зауважити, що літературні дані свідчать про незначну різницю між електростатичними вільними енергіями білка, розрахованими у рамках моделей «розмазаних» та фіксованих зарядів. Це було продемонстровано, зокрема, при аналізі кривих титрування лізоциму, де точне врахування локалізації заряджених груп на поверхні білка призвело до значень вільної енергії, близьких до отриманих у припущенні рівномірно розподілених зарядів [471].

Інший фактор, який не брався до уваги у описаних моделях адсорбції, стосується можливості існування численних конформацій адсорбованого білка. У ряді робіт було показано, що різні типи поверхонь індують конформаційні зміни поліпептидного ланцюга, що призводять до розгортання білкової глобули [472-475]. Як слідує з напівемпіричної моделі, запропонованої Фернандезом та Рамсденом, поверхнево-індукована денатурація згорнутих білків обумовлена недостатньою компенсацією втрат ентальпії внаслідок утворення білок-ліпідних контактів [476]. Адсорбований білок може приймати більш ніж одну конформацію. Така можливість була врахована у моделях масштабованих частинок шляхом представлення різних конформерів білка різними площинами перетину [477]. У найпростішому випадку розглядаються два конформаційні стани – «кінцевий» з квадратною або сферичною формами контактної ділянки та «поверхневий» з прямокутною чи еліптичною формами контактної ділянки. Модель випадкової адсорбції розглядає конформаційні зміни сорбованого білка як процес, що супроводжується зростанням розміру білка [478]. Однак, як було показано у роботі [164], тільки існування численних конформацій білка не може забезпечити сигмоїдну форму ізотерм адсорбції. У модельних експериментах модифікація форми кривих зв'язування з гіперболічної на сигмоїдну спостерігалась лише у припущенні, що хоча б один із конформерів

утворює олігомери. Враховуючи усі ці міркування, у даній роботі при ідентифікації типових ознак агрегації білка на поверхні розділу ліпід/вода було зроблено висновок, що ускладнювати модель додатковими параметрами, які б враховували численні конформації адсорбату, є недоцільним.

## **7.2. Комп'ютерні підходи до ідентифікації агрегаційних ділянок поліпептидного ланцюга**

Численні дослідження свідчать про те, що здатність утворювати амілоїдні фібрили не обмежується амілоїдогенними білками, які пов'язані із конформаційними хворобами, а є фундаментальною властивістю різних структурно незалежних білків [1,3,4,5]. Все більшого теоретичного та експериментального обґрунтування набуває ідея про те, що здатність білка до фібрилізації задовжена у його амінокислотній послідовності. Рядом авторів була висунута гіпотеза, згідно з якою за утворення амілоїдних фібрил відповідають короткі фрагменти амінокислотної послідовності поліпептидів [479]. Однак, у більшості випадків експериментальне визначення амілоїдогенних фрагментів білків такими методами, як кристалографія чи ЯМР-спектроскопія, утруднюється внаслідок низької розчинності фібрил. З огляду на це, для ідентифікації ділянок з високим агрегаційним потенціалом та з'ясування загальних принципів і закономірностей патологічної агрегації білків наразі широко застосовуються комп'ютерні методи прогнозування амілоїдогенного потенціалу поліпептидного ланцюга на основі його амінокислотної послідовності. Основною метою даного підрозділу було застосування цих методів для оцінки амілоїдогенного потенціалу лізоциму, цитохрому *c* та N-термінального фрагменту аполіпопротеїну A-I. Варто відзначити, що список розроблених до теперішнього часу алгоритмів не обмежується лише тими методами, які будуть описані нижче. При розв'язанні поставлених задач ми використовували найпоширеніші алгоритми, які відрізняються за принципом імплементації.

### *7.2.1. Загальна характеристика методів прогнозування амілоїдогенних ділянок поліпептидного ланцюга*

Численні дослідницькі групи спрямовували свої зусилля на розробку методів ідентифікації ділянок, відповідальних за утворення амілоїдів [480-487]. Один з широко застосовуваних алгоритмів, що має назву FoldAmyloid, був запропонований групою Галзитської та співавторів [480]. Цей метод базується на принципі ентальпійно-ентропійної компенсації, який постулює, що для компенсації втрати конформаційної ентропії при переході білка у більш впорядковану конформацію, необхідна достатня кількість контактів між амінокислотними залишками, які визначають ентальпійний внесок у вільну енергію стабілізації білка. З огляду на те, що ентальпія залежить від енергії короткодіючих взаємодій, було зроблено припущення, що у випадку, коли очікувана середня густина пакування, яка визначає усереднену кількість контактів між залишками на окремій ділянці, нижче граничної, тобто густини пакування для глобулярних білків, білок залишиться незгорнутим. На противагу, якщо очікувана середня густина пакування перевищує граничну, то ймовірність утворення фібрилярних агрегатів досить висока. Фактично, висока термостабільність амілоїдних фібрил, їх стійкість до дії протеаз та насиченість  $\beta$ -структурами і передбачає той факт, що ці самоасоціати містять ділянки з високою густиною пакування. Результати верифікації описаної гіпотези показали, що здатність поліпептидного ланцюга утворювати амілоїди дійсно корелює із числом ділянок з високою густиною пакування.

Алгоритм Tango, розроблений Фернандез-Ескамілою та ін. прогнозує імовірність утворення тієї чи іншої вторинної структури [481]. В основі методу лежить статистичний аналіз емпіричних властивостей амінокислот з метою розрахунку відносної імовірності згортання окремих ділянок поліпептидного ланцюга в одну з наступних конформацій:  $\alpha$ -спіраль,  $\beta$ -петля,  $\beta$ -лист та невпорядкована структура.

Метод Waltz використовує базу даних пептидів з експериментально визначеними амілоїдогенними властивостями для ідентифікації агрегаційних ділянок білків [482]. База даних включає пептиди, що складаються з шости амінокислотних залишків. При цьому, як мінімум три залишки утворюють амілоїдогенну ділянку. Автори використовують так звану позиційно-специфічну оцінювальну матрицю, яка віддзеркалює ймовірність того, що певна амінокислота буде розташовуватись в амілоїдогенному гексапептиді.

Серед розмаїття методів прогнозування особливе місце посідають AmylPred2 та MetAmyl, мета-сервери для консенсус-аналізу [483,484], які комбінують декілька методів аналізу, включаючи FoldAmyloid, Tango та Waltz. На основі коефіцієнту кореляції Метьюса, ці алгоритми пропонують усереднені результати прогнозування амілоїдних фрагментів білка.

На основі функції розподілу Больцмана алгоритм Pasta2 визначає, які фрагменти білка стабілізуються крос- $\beta$ -структурою. Даний аналіз базується на прогнозуванні здатності двох залишків розташовуватись у сусідніх  $\beta$ -тяжах у паралельній чи антипаралельній орієнтації [485]. Далі на основі регресійного аналізу передбачається переважна локалізація агрегаційних фрагментів та їх відносна орієнтація.

Принцип алгоритму BetaScan подібний до Pasta2, однак BetaScan розглядає лише паралельну орієнтацію  $\beta$ -тяжів з огляду на те, що ця орієнтація є більш поширеною у порівнянні із антипаралельною [486].

Сервер Aggrescan базується на припущенні, що короткі фрагменти (5-7 залишків) можуть ініціювати агрегацію в пептидах та білках, та що амілоїдогенний потенціал цих фрагментів залежить від їх амінокислотної послідовності [487]. Шкала агрегаційної здатності амінокислот була розрахована на основі експериментальних даних. Програма аналізує короткі фрагменти досліджуваного білка (5 чи 7 залишків) та визначає середній амілоїдогенний потенціал кожного фрагменту на основі цієї шкали. Фрагменти з найвищим середнім потенціалом вважаються агрегаційними ділянками білка.

### 7.2.2. Прогнозування амілоїдогенного потенціалу білків

Для ідентифікації амілоїдогенних сегментів лізоциму, цитохрому *c* та N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну A-I були використані алгоритми, описані у попередньому підрозділі. При аналізі припускали, що фрагмент є агрегаційним, якщо він ідентифікований як мінімум чотирма методами прогнозування.

Лізоцим з яєчного білка містить 129 амінокислотних залишків та у базі даних кристалічних структур білків (Protein Data Bank, PDB) має код 1AKI. Як видно з табл. 7.2, білок характеризується п'ятьма амілоїдогенними ділянками, які охоплюють залишки 27-31 (NWVCA), 53-60 (YGILQINS), 81-90 (SALLSSDITA), 106-110 (NAWVA) та 121-125 (QAWIR). При цьому, найвищим агрегаційним потенціалом характеризуються фрагменти 53-60 та 81-90.

Лізоцим людини схожий за своїми властивостями та первинною структурою із лізоцимом яєчного білка. Лізоцим людини містить 130 амінокислотних залишків (PDB код 1REX) та згідно з результатами прогнозування з використанням різних комп'ютерних алгоритмів, має три амілоїдогенні фрагменти: залишки 25-33 (LANWMCLAK), 55-62 (GIFQINSR) та 107-112 (RAWVAW). Агрегаційний потенціал збільшується у порядку (25-33) < (107-112) < (55-62). Варто відзначити, що фрагменти з найвищою агрегаційною здатністю аналогічні для людського та курячого аналогу – вони знаходяться майже в однаковому місці в поліпептидному ланцюзі (55-62 та 53-60 для першого та другого випадку, відповідно) та мають схожу амінокислотну послідовність.

Таблиця 7.2

Агрегаційні ділянки (виділені червоним) лізоциму з яєчного білка, прогнозовані різними алгоритмами. Кольоровими прямокутниками показані амілоїдогенні фрагменти, які були ідентифіковані чотирма та більше методами

	10	20	30	40	50	60	70
Pasta2	KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS	TDYGILQINS	RWWCNDGRTP
AmylPred2	KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS	TDYGILQINS	RWWCNDGRTP
Tango	KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS	TDYGILQINS	RWWCNDGRTP
MetAmyl	KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS	TDYGILQINS	RWWCNDGRTP
Waltz	KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS	TDYGILQINS	RWWCNDGRTP
Aggrescan	KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS	TDYGILQINS	RWWCNDGRTP
BetaScan	KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS	TDYGILQINS	RWWCNDGRTP
FoldAmyloid	KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS	TDYGILQINS	RWWCNDGRTP
	80	90	100	110	120		
Pasta2	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS	DGNGMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRL	
AmylPred2	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS	DGNGMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRL	
Tango	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS	DGNGMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRL	
MetAmyl	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS	DGNGMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRL	
Waltz	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS	DGNGMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRL	
Aggrescan	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS	DGNGMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRL	
BetaScan	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS	DGNGMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRL	
FoldAmyloid	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS	DGNGMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRL	



Таблиця 7.3

Агрегаційні ділянки (виділені червоним) лізоциму людини, прогнозовані різними алгоритмами. Кольоровими прямокутниками показані амілоїдогенні фрагменти, які були ідентифіковані чотирма та більше методами

	10	20	30	40	50	60	70
<b>Pasta2</b>	KVFERCELAR	TLKRLGMDGY	RGISLANWMC	LAKWESGYNT	RATNYNAGDR	STDYGIFQIN	SRYWCNDGKT
<b>AmylPred2</b>	KVFERCELAR	TLKRLGMDGY	RGISLANWMC	LAKWESGYNT	RATNYNAGDR	STDY <b>GIFQIN</b>	<b>SRYWCNDGKT</b>
<b>Tango</b>	KVFERCELAR	TLKRLGMDGY	RGISLANWMC	LAKWESGYNT	RATNYNAGDR	STDY <b>YGIFQIN</b>	SRYWCNDGKT
<b>MetAmyl</b>	KVFERCELAR	TLKRLGMDGY	RGISLANWMC	LAKWESGYNT	RATNYNAGDR	STDYGIFQIN	SRYWCNDGKT
<b>Waltz</b>	KVFERCELAR	TLKRLGMDGY	RGISLANWMC	LAKWESGYNT	RATNYNAGDR	STDY <b>GIFQIN</b>	<b>SRYWCNDGKT</b>
<b>Aggrescan</b>	KVFERCELAR	TLKRLGMDGY	RGISLANWMC	LAKWESGYNT	RATNYNAGDR	STDY <b>YGIFQIN</b>	<b>SRYWCNDGKT</b>
<b>BetaScan</b>	KVFERCELAR	TLKRLGMDGY	RGISLANWMC	LAKWESGYNT	RATNYNAGDR	STDY <b>YGIFQIN</b>	<b>SRYWCNDGKT</b>
<b>FoldAmyloid</b>	KVFERCELAR	TLKRLGMDGY	RGISLANWMC	LAKWESGYNT	RATNYNAGDR	STDY <b>GIFQIN</b>	<b>SRYWCNDGKT</b>
	80	90	100	110	120	130	
<b>Pasta2</b>	PGAVNACHLS	CSALLQDNIA	DAVACAKRVV	RDPQGI <b>RAWV</b>	AWRNRCQNRD	VRQYVQGCGV	
<b>AmylPred2</b>	PGAVNACHLS	CSALLQDNIA	<b>DAVACAKRVV</b>	RDPQGI <b>RAWV</b>	<b>AW</b> ARNRCQNRD	VRQYVQGCGV	
<b>Tango</b>	PGAVNACHLS	CSALLQDNIA	<b>DAVACAKRVV</b>	RDPQGI <b>RAWV</b>	<b>AW</b> ARNRCQNRD	VRQYVQGCGV	
<b>MetAmyl</b>	PGAVNACHLS	<b>CSALLQDNIA</b>	DAVACAKRVV	RDPQGI <b>RAWV</b>	AWRNRCQNRD	<b>VRQYVQGCGV</b>	
<b>Waltz</b>	PGAVNACHLS	CSALLQDNIA	DAVACAKRVV	RDPQGI <b>RAWV</b>	AWRNRCQNRD	VRQYVQGCGV	
<b>Aggrescan</b>	PGAVNACHLS	<b>CSALLQDNIA</b>	DAVACAKRVV	RDPQGI <b>RAWV</b>	<b>AW</b> ARNRCQNRD	VRQYVQGCGV	
<b>BetaScan</b>	PGAVNACHLS	<b>CSALLQDNIA</b>	DAVACAKRVV	RDPQGI <b>RAWV</b>	<b>AWRNRCQNRD</b>	VRQYVQGCGV	
<b>FoldAmyloid</b>	PGAVNACHLS	CSALLQDNIA	DAVACAKRVV	RDPQGI <b>RAWV</b>	<b>AWRNRCQNRD</b>	VRQYVQGCGV	

Таблиця 7.4

Агрегаційні ділянки (виділені червоним) апоА 83, прогнозовані різними алгоритмами. Кольоровими прямокутниками показані амілоїдогенні фрагменти, які були ідентифіковані чотирма та більше методами

		10	20	30	40	50	60	70
Pasta2	DEPPQSPWDR	VKD	LATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL	REQLGPVTQE
AmylPred2	DEPPQSPWDR	VKD	LATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL	REQLGPVTQE
Tango	DEPPQSPWDR	VKD	LATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL	REQLGPVTQE
MetAmyl	DEPPQSPWDR	VKD	LATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL	REQLGPVTQE
Waltz	DEPPQSPWDR	VKD	LATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL	REQLGPVTQE
Aggrescan	DEPPQSPWDR	VKD	LATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL	REQLGPVTQE
BetaScan	DEPPQSPWDR	VKD	LATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL	REQLGPVTQE
FoldAmyloid	DEPPQSPWDR	VKD	LATVYVD	VLKDSGRDYV	SQFEGSALGK	QLNLKLLDNW	DSVTSTFSKL	REQLGPVTQE
		80						
Pasta2	FWDNLEKETE	GLR						
AmylPred2	FWDNLEKETE	GLR						
Tango	FWDNLEKETE	GLR						
MetAmyl	FWDNLEKETE	GLR						
Waltz	FWDNLEKETE	GLR						
Aggrescan	FWDNLEKETE	GLR						
BetaScan	FWDNLEKETE	GLR						
FoldAmyloid	FWDNLEKETE	GLR						



Таблиця 7.5

Агрегаційні ділянки (виділені червоним) цитохрому *c*, прогнозовані різними алгоритмами. Кольоровими прямокутниками показані амілоїдогенні фрагменти, які були ідентифіковані чотирма та більше методами

	10	20	30	40	50	60	70
Pasta2	GDVEKGKK <b>IF VQK</b> CAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	
AmylPred2	GDVEKGKK <b>IF VQK</b> CAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	
Tango	GDVEKGKK <b>IF VQK</b> CAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	
MetAmyl	GDVEK <b>GKKIF VQK</b> CAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	
Waltz	GDVEKGKK <b>IF VQK</b> CAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	
Aggrescan	GDVEKGKK <b>IF VQK</b> CAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	
BetaScan	GDVEKGKK <b>IF VQK</b> CAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	
FoldAmyloid	GDVEKGKK <b>IF VQK</b> CAQCHTV	EKGGKHKTGP	NL <b>HGLF</b> GRKT	GQAPGFTYTD	ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	
	80	90	100				
Pasta2	PKKYIPG <b>TKM IFAGI</b> KKKTE	REDLIAYLKK	ATNE				
AmylPred2	PKKYIPG <b>TKM IFAGI</b> KKKTE	RED <b>LIAYL</b> KK	ATNE				
Tango	PKKYIPG <b>TKM IFAGI</b> KKKTE	REDLIAYLKK	ATNE				
MetAmyl	PKKYIPG <b>TKM IFAGI</b> KKKTE	REDLIAYLKK	ATNE				
Waltz	PKKYIPG <b>TKM IFAGI</b> KKKTE	REDLIAYLKK	ATNE				
Aggrescan	PKKYIP <b>GTKM IFAGI</b> KKKTE	RED <b>LIAYL</b> KK	ATNE				
BetaScan	PKKYIPG <b>TKM IFAGI</b> KKKTE	REDLIAYLKK	ATNE				
FoldAmyloid	PKKYIPG <b>TKM IFAGI</b> KKKTE	REDLIAYLKK	ATNE				

При прогнозуванні амілоїдогенних фрагментів білків має сенс проаналізувати не тільки нативний білок, але і його мутанти, які пов'язані із розвитком конформаційних хвороб. Так, зокрема, відомо, що *in vivo* білок утворює амілоїдні фібрили при мутаціях I56T, F57I, W64R та D67H, F57I/T70N та W112R/T70N [374]. Тому у даному контексті уявлялось доцільним не тільки ідентифікувати амілоїдогенні фрагменти нативного білка, але й порівняти агрегаційні потенціали білка дикого типу та мутантів. Аналіз, проведений з використанням різних методів прогнозування виявив, що усі мутанти характеризуються тими ж амілоїдогенними ділянками, що й нативний лізоцим людини, однак для мутантних білків агрегаційний потенціал кожної ділянки вище, у порівнянні з нативним білком (табл. 7.3, рис. 7.10).

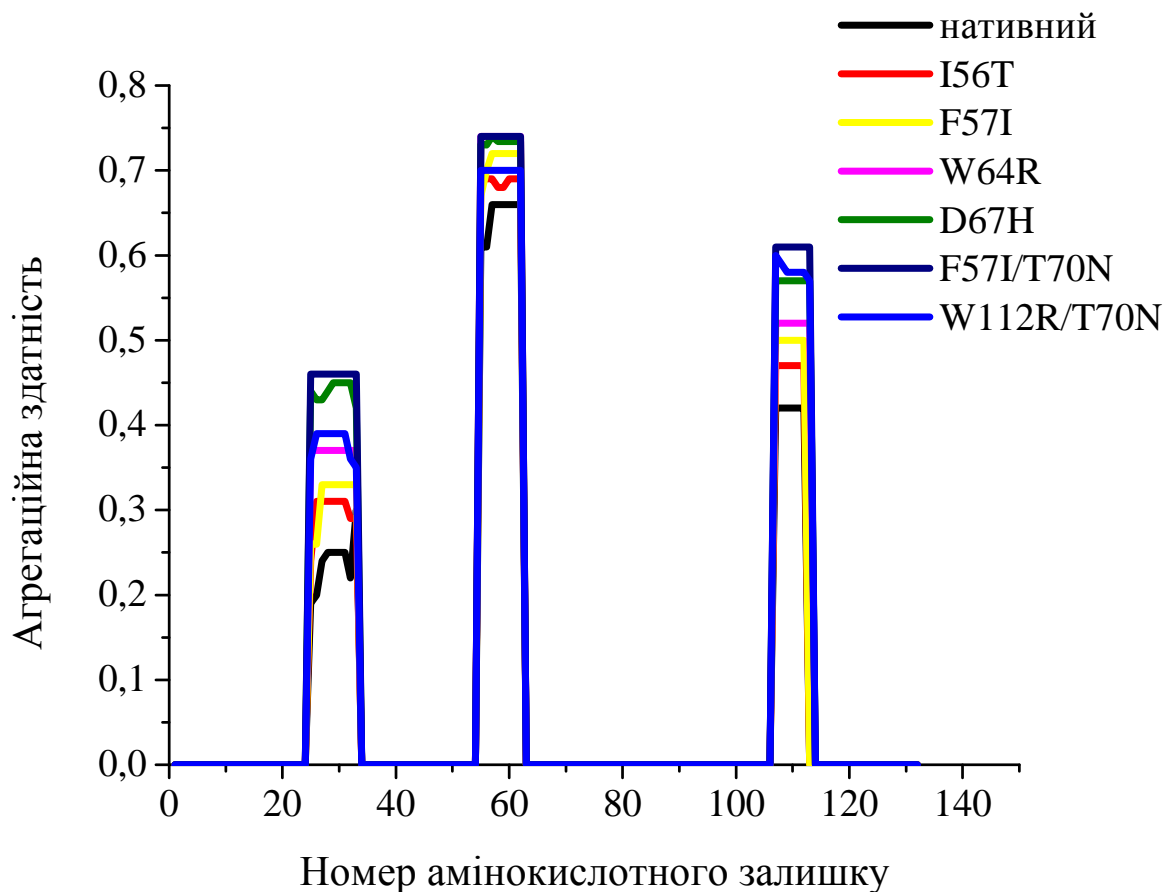


Рис. 7.10. Агрегаційна здатність нативного лізоциму людини та його амілоїдогенних мутантів за даними прогнозування серверу Pasta2.

На відміну від лізоциму, у молекулах апоА 83 та цитохрому *c* були ідентифіковані два амілоїдогенних сегмента, локалізовані на залишках 14-22 (LATVYVDVL), 52-

58 (VTSTFS) (апоА 83) та 9-13 (IFVQK), 80-84 (MIFAG) (цитохром *c*) (табл. 7.4, 7.5). Важливо, що ділянка 14-22 апоА 83 була ідентифікована усіма алгоритмами прогнозування, а також підтверджена експериментальними дослідженнями [488]. Необхідно також зазначити, що аналогічно лізоциму, введення точкової амілоїдогенної мутації G26R у амінокислотну послідовність апоА 83 не призвело до змін агрегаційних фрагментів білка, однак майже у 1.5 рази підвищило його амілоїдогенну здатність.

Відмітними рисами агрегаційних сегментів усіх білків є їх висока гідрофобність, збагаченість залишками Ile, Phe, Val, Gln, Tyr та Ala, а також наявність, щонайменше, одного ароматичного амінокислотного залишку. Згідно з сучасними фізичними теоріями, ключова роль у забезпеченні стабільності фібрилярних структур належить гідрофобності поліпептидного ланцюга [489]. Мережа водневих зв'язків виступає у ролі остову, який утримує усю архітектуру молекули. Аналогічно фолдингу глобулярних білків, самоасоціація білкових мономерів в амілоїдні структури ініціюється гідрофобним ефектом. Конформаційний перехід поліпептидного ланцюга у стан розплавленої глобули при зміні концентрації білка, температури, рН чи іонної сили розчину є початком процесу нуклеації. Мінімізація числа термодинамічно не вигідних контактів між неполярними залишками, які експонуються у ході розгортання білкової глобули, та розчинником призводить до утворення олігомерних інтермедіатів. Зрілі фібрили, поряд з гідрофобними взаємодіями, стабілізуються також мережею водневих зв'язків. Численні експериментальні дослідження підтверджують ідею про те, що зростання гідрофобності поліпептидного ланцюга прискорює швидкість фібрилізації та підвищує термодинамічну стабільність агрегатів [8]. Окрім цього, окремий клас гідрофобних взаємодій – ароматичні взаємодії – також відіграють суттєву роль у стабілізації фібрил [490]. У той час як Марек зі співавторами [491] припустили, що  $\pi$ - $\pi$  взаємодії кінетично важливі лише у ході лаг-фази, Газіт зробив висновок, що роль ароматичних контактів включає два аспекти [492]: і) вони роблять позитивний енергетичний внесок за рахунок  $\pi$ - $\pi$

стекингу, та ii) їх специфічний орієнтуючий ефект лежить в основі енергетично оптимального пакування  $\beta$ -тяжів у структурі фібрил.

### 7.3. Моделювання процесу зв'язування амілоїдних фібрил з мембраною

Молекулярна архітектура фібрилярних агрегатів, які відрізняються наявністю крос- $\beta$ -складчастої структури, стабілізується водневими та іонними зв'язками, а також ван-дер-Ваальсовими та  $\pi$ - $\pi$  взаємодіями. Інша фундаментальна властивість фібрилярного стану пов'язана з утворенням топологічно різних структур, таких як закручена стрічка, спіральна стрічка та нанотрубки (див. розділ 6). Здатність амілоїдних протофіламентів закручуватись навколо власної осі контролюється хіральністю, електростатичними взаємодіями, а також ентропійними ефектами, пов'язаними з реорганізацією розчинника навколо бокових залишків амінокислот та динамікою поліпептидного остову [493]. Незначні варіації умов росту фібрил, поряд із різними типами внутрішньомолекулярних взаємодій амінокислотних залишків, можуть призвести до утворення великого набору амілоїдних поліморфів з різною молекулярною архітектурою [3]. Як зазначалось вище, морфологія амілоїдних ансамблів є важливим детермінантом їх цитотоксичності. Зокрема, ступінь порушення цілісності клітинних мембран, які вважаються основною мішенню токсичної дії амілоїдів, залежить від структурних характеристик білкових агрегатів [45]. У зв'язку з цим, актуальним є встановлення кореляції між структурними особливостями амілоїдних агрегатів та їх здатністю взаємодіяти з ліпідним бішаром та модифікувати його структуру. Експериментальне вирішення цієї проблеми не завжди буває можливим, тому все більшого поширення набувають комп'ютерні аналітичні інструменти. У даному підрозділі викладені результати дослідження взаємодій різних структурних варіантів амілоїдних фібрил з ліпідними мембранами методами комп'ютерного моделювання. У ході цього дослідження були вирішені наступні задачі: а) з використанням програмного пакету CreateFibril сконструювати поліморфи амілоїдних фібрил пептиду лізоциму, А $\beta$ -пептиду та аполіпопротеїну А-I, які відрізняються кутом закручування; б) оцінити стабільність отриманих фібрил у воді за допомогою

серверу AQUASOL та ідентифікувати найбільш енергетично стабільні поліморфи;  
в) проаналізувати характер зв'язування модельних фібрил з ліпідним бішаром, використовуючи PPM сервер.

### 7.3.1. Моделювання амілоїдних фібрил пептидів

Для створення амілоїдних фібрил пептидів лізоциму, А $\beta$  та аполіпопротеїну А-I використовували програму CreateFibril. Зокрема, досліджувані амінокислотні послідовності включали:

- К-пептид лізоциму, GILQINSRW, залишки 54-62 нативного білка (**Lz1**),
- похідну К-пептиду, IFQINS (**Lz2**),
- пептид (залишки 24-50) аполіпопротеїну А-I з мутацією G26R, DSRRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNW (**A-I**)
- пептид з А $\beta$ -білка, LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA, залишки 17-42 А $\beta$  (**A $\beta$** ).

Структуру димеру **Lz1**, яка використовувалась в якості вхідних даних для CreateFibril, було згенеровано з мономеру **Lz1** у  $\beta$ -складчастій конформації за допомогою інструментів PatchDock та FireDock [494,495]. Димер **Lz2** було отримано подібним чином, але мономерну структуру було взято з Protein Data Bank (PDB-код 4R0P). Димер **A-I** було створено, як описано у [372], тоді як тетрамер **A $\beta$**  було взято з Protein Data Bank (PDB-код 2BEG). Вибір пептидів **Lz1**, **A-I** and **A $\beta$**  був продиктований тим фактом, що вони представляють собою ядро амілоїдних фібрил відповідних білків. Пептид **Lz2** був вибраний з метою вивчення впливу амінокислотної послідовності на стабільність фібрилярних агрегатів та фібрил-ліпідні взаємодії.

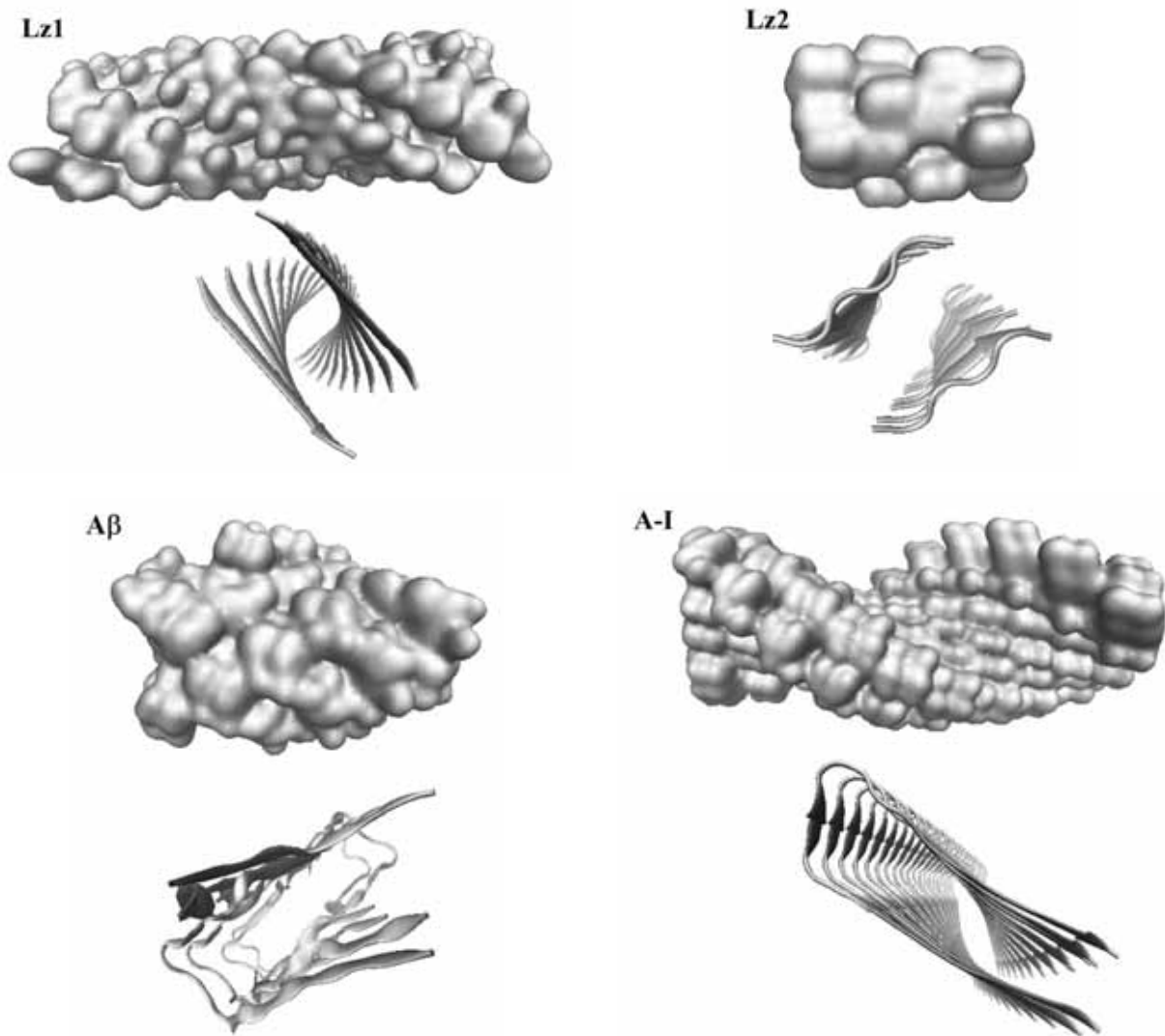


Рис. 7.11. Бокова та ортогональна проекції фібрил, сконструйованих за допомогою програми CreateFibril.

Математичний апарат програми CreateFibril базується на трансляційному та поворотному афінних перетвореннях, які дозволяють створити декілька ідентичних копій фрагменту фібрили та розташувати їх у стопку, що приводить до елонгації фібрилярної структури [494]. Процедура конструювання фібрил базується на наступних вхідних параметрах: 1) число протофіламентів та відстань між ними, перпендикулярна осі фібрили,  $n$  та  $R$ , відповідно; 2) напрямок осі фібрили; 3) довжина фібрили (число мономерів),  $r$ ; 4) відстань між  $\beta$ -тяжами вздовж осі фібрили,  $d$ ; 5) кут закручування мономерів навколо осі фібрили,  $\theta$ . При моделюванні амілоїдних структур параметри  $R$  та  $d$  дорівнювали  $5 \text{ \AA}$ ,  $n$  складало 2, 4, 1 та 2 для **Lz1**, **Lz2**, **A $\beta$**  та **A-I**, відповідно. Параметр  $r$  був рівний 4 для **A $\beta$**  та



10 для решти пептидів. Кут закручування варіювали від 0 до 40° (із кроком 5°). Різниця у вхідних параметрах пояснюється різними структурними особливостями та амілоїдогенними властивостями пептидів. Використання такого підходу дозволило отримати дев'ять фібрилярних структур для кожного пептиду, репрезентативні зображення яких представлено на рис. 7.11.

На наступному етапі було досліджено стабільність створених модельних фібрил. З цією метою, за допомогою серверу AQUASOL були розраховані вільні енергії фібрил у воді, як сума енергій Леннарда-Джонса, сольватації та кулонівської енергії [496]. Програма AQUASOL розв'язує полярне рівняння Пуассона-Больцмана-Ланжевена (ППБЛ) для даної системи. У рамках формалізму ППБЛ розчинник розглядається як набір орієнтованих диполів з нерівномірною концентрацією. Це призводить до нелінійної залежності діелектричної проникності середовища від позиції атому та локального електричного поля в цій позиції. Вважається, що такий підхід є найбільш адекватним при знаходженні енергетичних профілів біомолекул. Процедура симуляції AQUASOL включала гідратацію амілоїдних фібрил та їх еквілібрацію у воді, з подальшим розрахунком вільної енергії. Отримані залежності енергії фібрили від кута закручування проілюстровані на рис. 7.12. Аналіз цих профілів показав, що найбільш стабільні фібрилярні агрегати мають кути закручування 15, 5, 20 та 20° для **Lz1**, **Lz2**, **Aβ** та **A-I**, відповідно.

У даному контексті варто відзначити, що молекулярна основа топологічної варіабельності амілоїдних фібрил є предметом гострих дебатів. Головним чинником, який обумовлює закручування протофіламентів, вважається хіральність амінокислотних залишків [116].

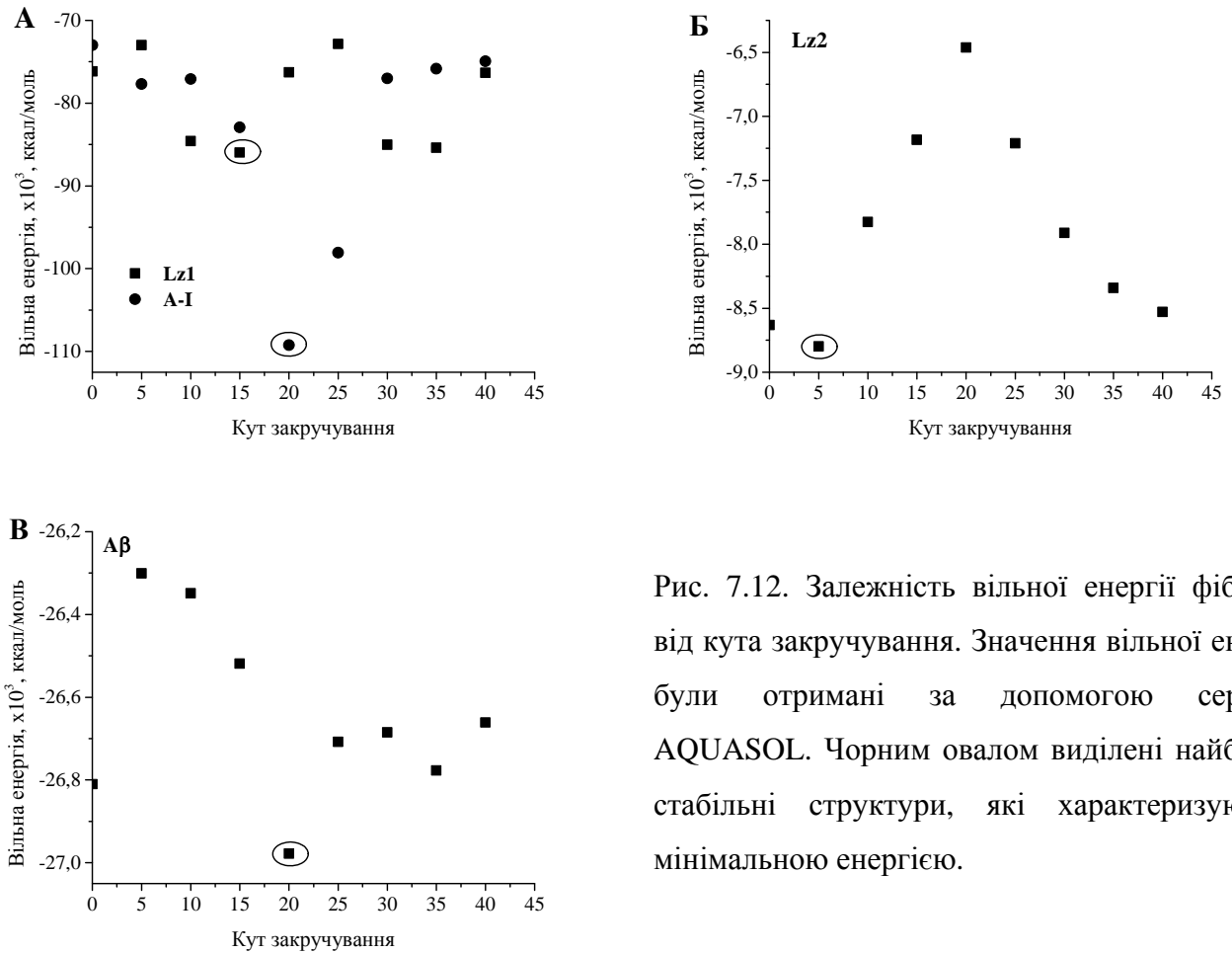


Рис. 7.12. Залежність вільної енергії фібрили від кута закручування. Значення вільної енергії були отримані за допомогою серверу AQUASOL. Чорним овалом виділені найбільш стабільні структури, які характеризуються мінімальною енергією.

Однак, все більшого обґрунтування набуває ідея про те, що закручування фібрилярних агрегатів визначається балансом між еластичністю фібрили та електростатичним відштовхуванням [123]:

$$U = \frac{1}{2} M \theta^2 + \frac{k_B T 2 \pi \nu^2 Q e^{-\kappa D}}{\kappa \sin \theta} \quad (7.1)$$

де  $U$  – загальна енергія закручування,  $M$  – торсійний модуль фібрили,  $\nu, \kappa$  та  $Q$  – лінійна густина заряду фібрили, обернена довжина Дебая та довжина Б'єррума,  $\theta$  – кут закручування. Перший доданок цього рівняння визначає еластичну торсійну енергію, яка перешкоджає закручуванню, тоді як другий доданок характеризує електростатичний потенціал фібрили, який сприяє закручуванню. У планарній конфігурації відстань між зарядами однакового знаку може бути недостатньою для того, щоб компенсувати енергетичні затрати, пов'язані із електростатичним відштовхуванням. У свою чергу, обертання навколо центральної осі збільшує відстань між зарядами, мінімізуючи тим самим відштовхування. Однак, зростання

відстані між сусідніми сегментами поліпептидного ланцюга призводить до затрат еластичної енергії, які сприяють планарній конфігурації. Кінцевий кут закручування фібрили визначається балансом між описаними вище процесами.

Загальноприйнята модель структури фібрилярних агрегатів припускає, що протофіламенти закручуються таким чином, що періодична структура з 24  $\beta$ -тяжів складає повний спіральний оборот навколо осі фібрили [7]. При такій конфігурації кут закручування між сусідніми  $\beta$ -тяжами складає  $15^\circ$ . Ця модель добре узгоджується з кутом закручування у  $15\text{--}20^\circ$ , який відповідає найбільш стабільній конфігурації **Lz1**, **A $\beta$**  та **A-I** фібрил. Виключення становлять **Lz2** фібрили, для яких найбільш стабільна структура відповідає куту закручування  $5^\circ$ . Це може бути зумовлено малою довжиною сконструйованих фібрил, яка перешкоджає більшому куту закручування. Однак, можна очікувати, що елонгація фібрили призведе до зростання кута закручування.

### *7.3.2. Моделювання взаємодії амілоїдних фібрил з мембранами*

Метою наступного етапу роботи була симуляція адсорбції модельних фібрилярних агрегатів на ліпідному бішарі. Моделювання проводили на базі онлайн серверу RPM, який дозволяє визначити найбільш імовірну локалізацію та орієнтацію білкових молекул відносно поверхні розділу ліпід/вода шляхом мінімізації енергії переносу амінокислотних залишків із води в ліпідну фазу [497]. Вихідні параметри включають глибину вбудовування поліпептиду у неполярну область ліпідного бішару, кут нахилу (кут між віссю білка та нормаллю до поверхні мембрани) та номери залишків, які вбудовуються в гідрофобну зону мембрани. Розрахунки спираються на загальну сольватаційну модель, яка приймає до уваги гідрофобні, ван-дер-Ваальсові, електростатичні взаємодії та водневі зв'язки між молекулами [498]. Ліпідний бішар розглядається як анізотропне середовище, що характеризується діелектричною константою ( $\epsilon$ ), сольватохромним дипольним параметром ( $\pi^*$ ) та параметрами кислотності та основності ( $\alpha$  та  $\beta$ ). Неполярна область мембрани моделюється як пластина із фізико-хімічними властивостями декадієну.

У рамках сольватаційної моделі вираз для енергії переносу молекули з водної фази у мембранне оточення враховує залежність сольватаційних параметрів  $\sigma_i$  та  $\eta$  від позиції атома вздовж нормалі бішару ( $z_i$ ):

$$\Delta G^{transfer}(d, \varphi, \tau) = \sum_{i=1}^N \sigma_i^{wat \rightarrow bil}(z_i) ASA_i + \sum_{j=1}^M \eta_j^{wat \rightarrow bil}(z_j) \mu_j + \sum_{k=1}^L \min \{ \Delta E_k^{ion}, \Delta E_k^{neutr} \} \quad (7.2)$$

де  $\sigma_i(z_i)$  – сольватаційний параметр, який залежить від типу атому та описує поверхневу енергію переносу  $i$ -го атома із водної фази на мембрану у точку  $z_i$ ,  $ASA_i$  – площа поверхні атома, доступна для розчинника,  $\eta(z_j)$  характеризує затрати енергії, пов'язані з переносом дипольного моменту в 1 Д з водної фази до точки  $z_j$ ,  $\mu_j$  – дипольний момент групи  $j$ ,  $E_k^{ion}$  та  $E_k^{neutr}$  – енергії групи  $k$  в іонізованому та нейтральному станах, відповідно,  $N$  – число атомів у молекулі,  $M$  – число диполів,  $L$  – число іонізованих груп,  $d, \varphi$  та  $\tau$  означають зсув вздовж нормалі бішару, кути обертання та нахилу, відповідно.

Припускається, що індивідуальні дипольні внески лінійно зменшуються до 0, коли  $ASA$  атому стає меншою, ніж площа, яку займає одна молекула води ( $\sim 14 \text{ \AA}^2$ ):

$$\Delta G_{dip,j} = \eta_j^{wat \rightarrow bil}(z_j) \mu_j, \text{ якщо } ASA_j > ASA_{water} \quad (7.3)$$

$$\Delta G_{dip,j} = \eta_j^{wat \rightarrow bil}(z_j) \mu_j (ASA_j / ASA_{water}), \text{ якщо } ASA_j \leq ASA_{water} \quad (7.4)$$

Аналогічна апроксимація енергії Борна для іонізованих груп дає:

$$\Delta E_k^{ion} = \frac{166e_{Born}}{r_k} [F_{Abe}^{wat} - F_{Abe}(z_k)] f_k + \sum_{i=1}^{L_k} \sigma_{l,ion}^{wat \rightarrow bil}(z_l) ASA_l, \text{ якщо } ASA_k > ASA_{water} \quad (7.5)$$

$$\Delta E_k^{ion} = \frac{166e_{Born}}{r_k} [F_{Abe}^{wat} - F_{Abe}(z_k)] * (ASA_k / ASA_{water}) f_k + \sum_{i=1}^{L_k} \sigma_{l,ion}^{wat \rightarrow bil}(z_l) ASA_l, \text{ якщо } ASA_k \leq ASA_{water} \quad (7.6)$$

де  $f_k = 0.5$ , якщо група приймає участь в утворенні іонних контактів, та  $f_k = 1$  для решти випадків.

Таблиця 7.6

Структурні та термодинамічні параметри, які характеризують локалізацію у мембрані та орієнтацію фібрил **Lz1** та **Lz2**

Кут закручування	$\Delta G$ , ккал/моль		Глибина*, Å		Кут нахилу		Вбудовані залишки	
	<b>Lz1</b>	<b>Lz2</b>	<b>Lz1</b>	<b>Lz2</b>	<b>Lz1</b>	<b>Lz2</b>	<b>Lz1</b>	<b>Lz2</b>
0	-34	-18.8	7	3.9	89	90	I2, L3, W9, I10**	F2, I4, S6
5	-32	-18.4	5.1	4.4	90	87	I2, L3, W9, I10	F2, I4, S6
10	-24	-16.7	4.4	4.7	989	86	I2, L3, W9, I10	F2, I4, S6
15	-16	-16.1	4.2	7.9	87	80	I2, L3, W9, I10	I1 – I4
20	-12.5	-12.4	2.5	5.8	89	82	I2, I10	I1 – I4
25	-12.3	-11.5	2.1	5.2	90	88	I10	I1, F2, S4
30	-11	ND	1.7	ND	90	ND	I10	ND
35	-9.5	-9.8	1.5	5.2	89	87	I10	I1, F2, S4
40	-10.3	-8.2	1.7	5.3	90	90	I10	I1, F2, S4

\* глибина проникнення у гідрофобну область ліпідного бішару

\*\* I10 означає десятий залишок другого мономеру

Аналіз зв'язування модельних фібрил з ліпідними мембранами в рамках описаного підходу дозволив визначити термодинамічно вигідну локалізацію та орієнтацію агрегатів відносно поверхні розділу ліпід/вода. Нещодавно методом АСМ було виявлено, що періодичність амілоїдних агрегатів є параметром, який може змінюватись в залежності від експериментальних умов [123].

Таблиця 7.7

Структурні та термодинамічні параметри, які характеризують локалізацію у мембрані та орієнтацію фібрил **Aβ** та **A-I**

Кут закручування	$\Delta G$ , ккал/моль		Глибина*, Å		Кут нахилу		Вбудовані залишки	
	<b>Aβ</b>	<b>A-I</b>	<b>Aβ</b>	<b>A-I</b>	<b>Aβ</b>	<b>A-I</b>	<b>Aβ</b>	<b>A-I</b>
0	-36.6	-26.8	18.4	2	90	88	G17-V23, F28*-I40, G42	L38
5	-34	-23.4	19	2.1	85	88	G17-I24, F28-I41	L38
10	-36.4	-18.8	17.8	3.6	85	87	G17-I24, F28-I40	L38
15	-33.5	-14.9	16.4	4.3	84	83	G17-I24, A30-I41	L38
20	-28.9	-11.9	16.8	4.1	89	79	G17-V22, F29-I40	L38
25	-22.4	-9.9	17.4	4.4	59	81	G17-G21, V33-I40	L38
30	-20	-8.5	19.2	5.3	47	74	G17-V22, V33-I40	L38
35	-23.2	-8.3	23.2	2	14	87	G17-V22, A30-G38	D24, L38
40	-26.2	-8.9	23.8	1.4	7	85	G17-V22, E31-G38	S36, L38

\* залишок 26 та далі належать наступному мономеру

Зокрема, було показано, що підвищення іонної сили призводить до зменшення періодичності фібрили та, відповідно, кута закручування, згідно з рівнянням:

$$L_2 = L_1 \left[ \left( \frac{\kappa_1}{\kappa_2} \right)^{1/2} + \frac{\alpha_2}{4\pi} (\kappa_1 - \kappa_2) L_1^{3/2} \right]^{-2/3} \quad (7.7)$$

де  $L$ ,  $\kappa$  – період фібрили та обернена довжина Дебая, відповідно, нижній індекс означає режим іонної сили (тобто іонна сила  $I_1$  чи  $I_2$ ),  $\alpha_2$  – параметр при іонній силі  $I_2$ , який залежить від характеристик фібрили (густини заряду, геометрії, жорсткості). Зростання іонної сили послаблює електростатичні взаємодії та знижує внесок другого члену рівняння (7.1), результатом чого є розкручування

фібрили. У свою чергу, послаблення електростатичних взаємодій може змінювати розподіл водневих зв'язків вздовж фібрилярних агрегатів та їх механічну стабільність, тобто модифікувати параметри, які визначають топологію амілоїдних структур.

Результати комп'ютерного моделювання, проведеного за допомогою серверу RRM, представлені у таблицях 7.6 і 7.7 та репрезентативні зображення проілюстровані на рис. 7.13.

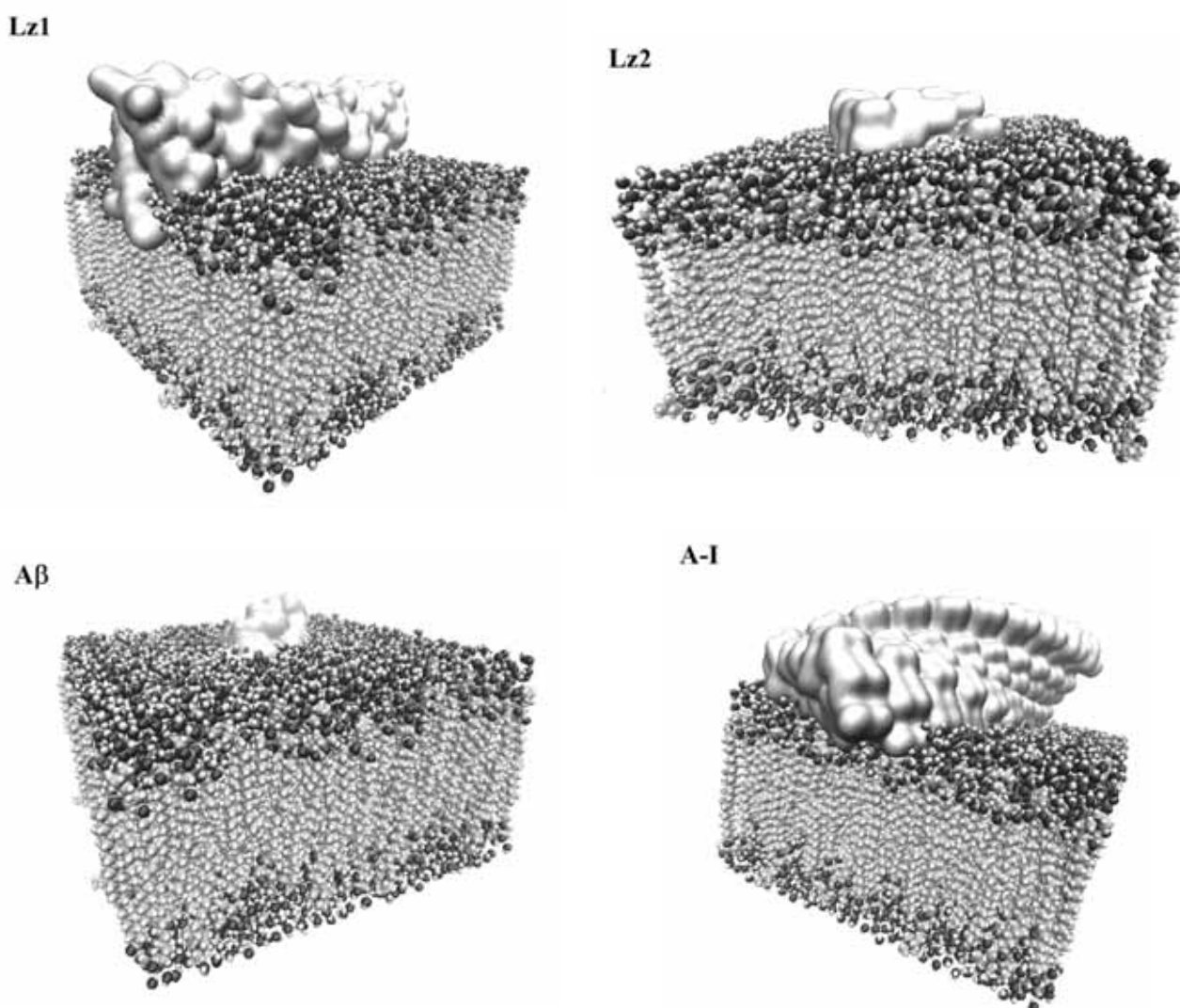


Рис. 7.13. Репрезентативні зображення зв'язування амілоїдних фібрил з ліпідним бішаром, отримані за допомогою серверу RRM.

Як можна бачити з таблиць 7.6 і 7.7, локалізація амілоїдних фібрил на мембрані та енергетика білок-ліпідного зв'язування залежать від амінокислотної послідовності та кута закручування поліпептидного ланцюга. Отримані значення кута нахилу означають, що амілоїдні фібрили пептидів **Lz1**, **Lz2** та **A-I** розташовуються паралельно або із невеликим нахилом відносно поверхні бішару. На відміну від цього, паралельна орієнтація фібрил **Aβ** пептиду була виявлена тільки при куті закручування до  $20^\circ$ , тоді як подальше збільшення  $\theta$  супроводжувалось зміною кута нахилу до  $7^\circ$  (табл. 7.3), тобто до величини, яка відповідає майже перпендикулярній орієнтації відносно поверхні бішару. Окрім цього, загальна тенденція, виявлена для усіх пептидів, полягає у зниженні енергії переносу при зростанні кута закручування фібрил. Це означає, що вбудовування у ліпідний бішар стає енергетично не вигідним при збільшенні періодичності, тому фібрилярні агрегати локалізуються на поверхні розділу ліпід/вода чи у полярній ділянці бішару.

Спостережуваний ефект може бути пояснений, щонайменше, двома факторами. По-перше, різні амінокислотні залишки приймають участь у білок-ліпідному зв'язуванні в залежності від кута закручування фібрили. Згідно зі шкалою гідрофобності Уімлі-Уайта, вільна енергія переносу окремих амінокислотних залишків з водної у ліпідну фазу суттєво змінюється в залежності від хімічної структури амінокислоти та контролюється зарядом та полярністю залишку [499]. Наприклад, для пептиду **Lz1** при  $\theta = 5^\circ$  приблизна оцінка внесків окремих амінокислотних залишків у загальну енергію переносу ( $\Delta G^{sum}$ ) дає  $\Delta G^{sum} = \Delta G^{I2} + \Delta G^{L3} + \Delta G^{W9} + \Delta G^{I10} = -0.31 - 0.56 - 1.85 - 0.31 = -3.03$  ккал/моль, тоді як при  $\theta = 40^\circ$   $\Delta G^{sum} = \Delta G^{I10} = -0.31$  ккал/моль. Аналогічно, для фібрил **A-I** при  $\theta = 5^\circ$   $\Delta G^{sum} = \Delta G^{L38} = -0.56$  ккал/моль, а при  $\theta = 40^\circ$   $\Delta G^{sum} = \Delta G^{L38} + \Delta G^{D24} = -0.56 + 1.23 = 1.59$  ккал/моль. Ці розрахунки показують, що заміна навіть одного амінокислотного залишку, який контактує з неполярною ділянкою бішару, може суттєво вплинути на вільну енергію переносу. Більш того, варто відзначити, що додатковими чинниками, від яких залежить  $\Delta G^{sum}$  (та, як



наслідок, загальна енергія переносу  $\Delta G^{transfer}$ ) у наших системах, можуть бути структурні та фізико-хімічні особливості амінокислотних залишків, а також взаємодії між ними у фібрилі.

Однак, варіації у хімічній природі амінокислотних залишків, які вбудовуються в гідрофобну область мембрани, не є єдиною причиною збільшення абсолютних значень  $\Delta G^{transfer}$ . Зокрема, для усіх пептидів було виявлено, що вільна енергія зростає зі збільшенням кута закручування, хоча при цьому амінокислотні залишки, які локалізуються в неполярній зоні бішару, залишаються незмінними. Наприклад, у випадку **Lz1** підвищення кута закручування з 5 до 15 призвело до збільшення  $\Delta G^{transfer}$  удвічі, тоді як амінокислотні залишки в обох випадках були однаковими (табл. 7.6). Цей ефект може бути інтерпретований у рамках уявлень про модифікацію фізико-хімічних та структурних властивостей амінокислотних залишків (таких як ASA, здатність утворювати водневі зв'язки, полярність, пакування у  $\beta$ -стопках, тощо) при підвищенні кута закручування.

Примітно, моделювання збільшення періодичності фібрилярних агрегатів аналогічне процесу матурації амیلіоїду з олігомерного ядра. На початку фази росту протофіламенти характеризуються планарною структурою, їх закручування відбувається у кількох випадкових точках вздовж контурної довжини фібрили. Однак, величина кута та число точок закручування зростає із часом інкубації фібрил [3]. Окрім цього, згідно з сучасними уявленнями, амیلіодні інтермедіати (олігомерні агрегати з малим періодом) мають більш значний вплив на структуру та цілісність мембрани, порівняно зі зрілими фібрилами. З огляду на це, результати моделювання, описані у даному підрозділі, можуть слугувати свідченням того, що термодинамічно не вигідно для зрілої фібрили проникати у мембрану, оскільки це буде супроводжуватись великими затратами енергії, пов'язаними із реорганізацією мембрани при створенні контактної ділянки для взаємодії із закрученими структурами.

#### **7.4. Дослідження конформаційних змін білкових молекул на ліпідній матриці методом молекулярної динаміки**

Аналіз наявних літературних даних та результатів досліджень, викладених у попередніх розділах, безперечно вказує на те, що асоціація білків з ліпідним бішаром є одним з основних механізмів, який ініціює утворення структурно-модифікованих олігомерних структур поліпептидів, здатних еволюціонувати в амілоїдні агрегати. Наразі вважається, що саме ранні префібрилярні інтермедіати відіграють ключову роль у порушенні цілісності біологічних мембран, що врешті решт призводить до загибелі клітини [43,46]. Однак, внаслідок того, що ці інтермедіати є короткоживучими та постійно знаходяться у динамічній рівновазі із частково розгорнутими мономерами, їх важко охарактеризувати на атомарному рівні традиційними біофізичними методами. Тому при дослідженні структурних особливостей префібрилярних інтермедіатів значного поширення набули методи комп'ютерного моделювання [500,501]. Серед них чільне місце посідає метод молекулярної динаміки (МД) [502-504]. Метод молекулярної динаміки – це чисельний метод моделювання, який базується на прямому знаходженні координат та швидкостей великої кількості молекул (атомів) шляхом розв'язання рівнянь класичної механіки, тобто рівнянь руху Ньютона, для багаточастинкової системи. Це дозволяє охарактеризувати процес часової еволюції молекулярної системи та визначити певні характеристики цієї системи. Молекулярно-динамічне моделювання застосовується для вирішення широкого спектру проблем, пов'язаних, зокрема, з конформаційними змінами біополімерів у розчині та у мембранному оточенні, фолдінгом та місфолдінгом білків, перебігом ферментативних реакцій, комплексоутворенням, тощо [505,506]. Оскільки типові часові інтервали МД розрахунків становлять від нано- до мікросекунд, а тривалість процесу утворення зрілих фібрилярних агрегатів з нативного мономерного білка зазвичай складає від кількох днів до кількох тижнів, молекулярно-динамічне моделювання успішно використовується для аналізу ранніх стадій агрегації поліпептидів [502,504]. Для ілюстрації можна навести наступні приклади. Застосування методу МД при дослідженні структурних

особливостей олігомерів  $A\beta_{40}$  пептиду дозволило ідентифікувати амінокислотні залишки, відповідальні за утворення  $\beta$ -листів в амілоїдних агрегатах [507]. Окрім цього, за допомогою цього методу були охарактеризовані конформаційні стани лізоциму, які ініціюють формування фібрилярних ансамблів [508]. Аналіз траєкторій внутрішньомолекулярних рухів транстиретину дозволив зробити висновок, що центральний фрагмент білка відповідає за його самоасоціацію, а олігомерні агрегати мають антипаралельну структуру [509].

У даному підрозділі викладені результати МД симуляції процесів, які передують утворенню амілоїдних фібрил на ліпідній матриці. Зокрема, метод молекулярної динаміки було використано для з'ясування ролі мембранного оточення в утворенні конформаційно-модифікованих білкових мономерів, що представляють собою ранні інтермедіати фібрилярних ансамблів.

#### 7.4.1. Молекулярна динаміка лізоцим-ліпідних систем

Утворення фібрилярних агрегатів лізоциму пов'язане із розвитком такої патології, як системний амілоїдоз [374]. *In vivo* перехід білка з нативного глобулярного стану в амілоїдогенний стан індукується точковими мутаціями I56T, F57I, W64R та D67H, а також подвійними мутаціями F57I/T70N та W112R/T70N [375]. Окрім цього, лізоцим здатний утворювати амілоїдні агрегати *in vitro* при зниженні рН, підвищенні температури чи гідростатичного тиску, додаванні органічних розчинників, тощо [225,239]. Ідентифікація амілоїдогенних фрагментів лізоциму у розчині була у фокусі численних робіт, на основі чого було запропоновано декілька структурних моделей фібрилярних агрегатів білка [373-375]. На противагу, аналізу молекулярних деталей конформаційних перебудов поліпептидного ланцюга у мембранному оточенні, які призводять до агрегаційно-компетентної конформації, приділялось недостатньо уваги. Зважаючи на це, метою наступного етапу роботи було дослідження змін вторинної структури саме ліпідзв'язаного білка.

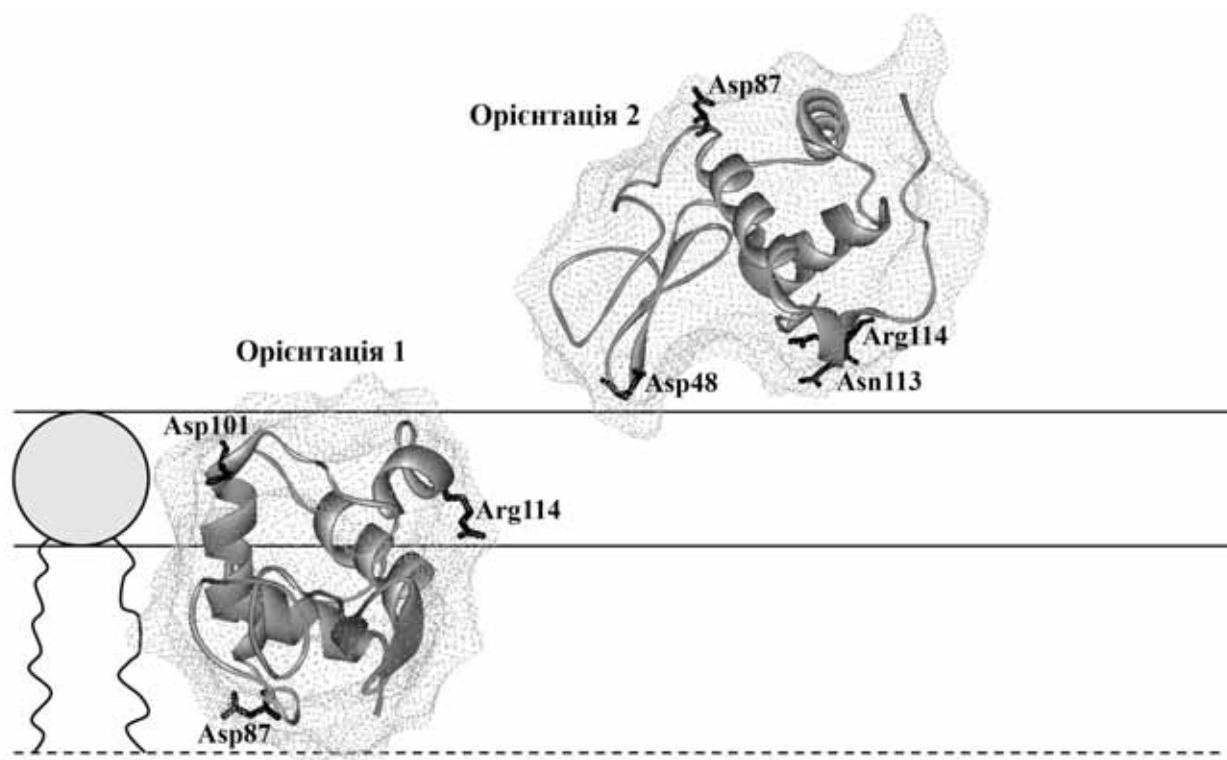


Рис. 7.14. Два типи просторової будови лізоцим-ліпідних комплексів, що використовувались при молекулярно-динамічному моделюванні.

При молекулярно-динамічному моделюванні лізоцим-ліпідних комплексів розглядали дві орієнтації білка відносно поверхні розділу ліпід/вода (рис. 7.14). Занурена орієнтація (Орієнтація 1) притаманна білку, що вбудовується в бішар, при цьому залишки 87-95 взаємодіють з неполярною зоною мембрани, а залишки 101-114 контактують з полярним голівками ліпідів. Правомірність такої орієнтації витікає із структурної моделі лізоцим-ліпідних комплексів, запропонованої Ібрагімом та співавторами [228]. Орієнтація 2 (поверхнева орієнтація) була отримана за допомогою веб-серверу RRM [497]. На рис. 7.15 представлені виявлені методом МД зміни вторинної структури лізоциму при його зв'язуванні в орієнтації 1 з ліпідними бішарами, що складались з ФХ та його сумішей із ФГ у молярних співвідношеннях 9:1, 3:2 та 1:4. Як видно з рисунку, асоціація білка з мембранами супроводжується структурними модифікаціями поліпептиду, характер яких залежить від молярної фракції ФГ

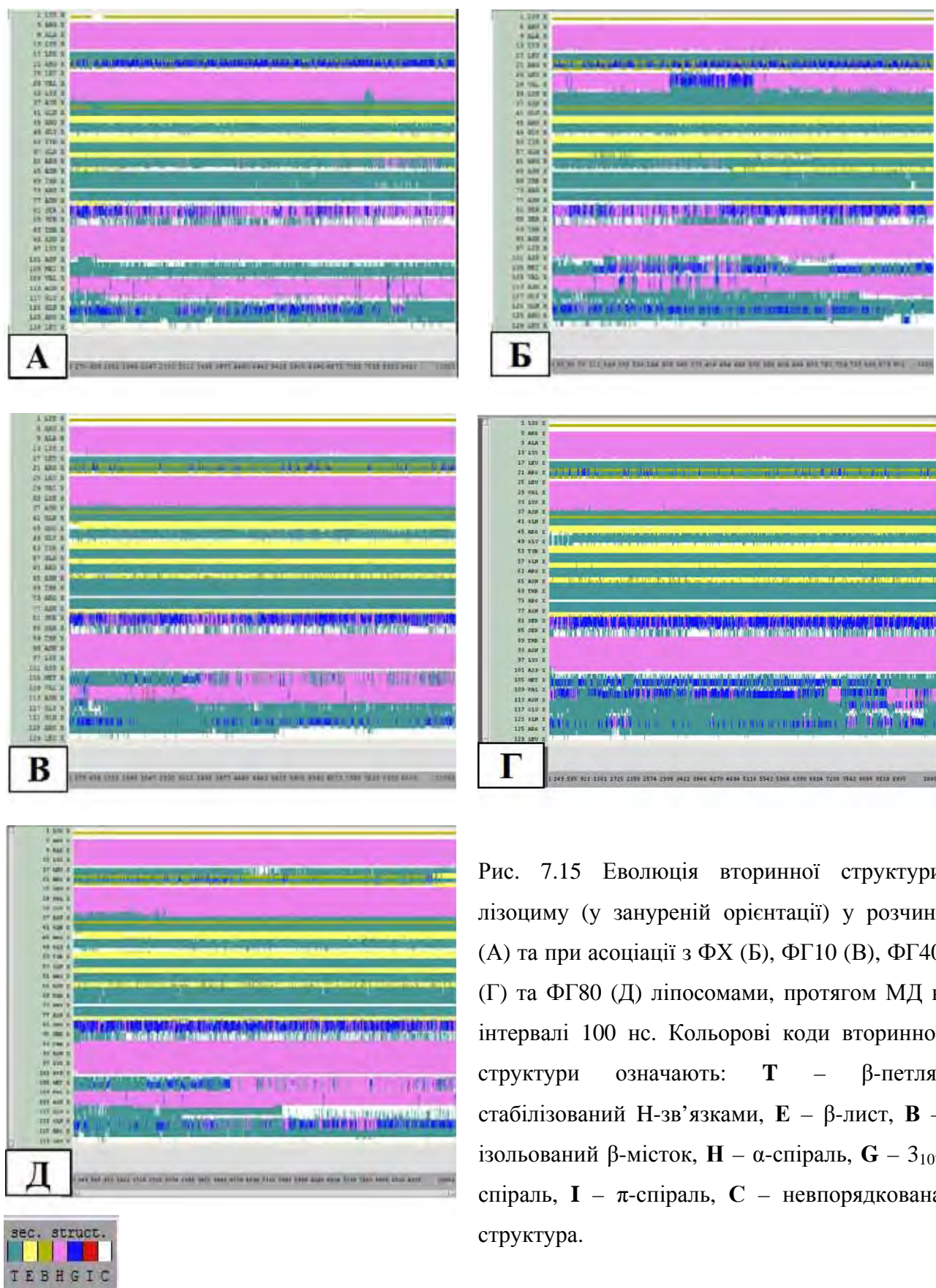


Рис. 7.15 Еволюція вторинної структури лізоциму (у зануреній орієнтації) у розчині (А) та при асоціації з ФХ (Б), ФГ10 (В), ФГ40 (Г) та ФГ80 (Д) ліпосомами, протягом МД в інтервалі 100 нс. Кольорові коди вторинної структури означають: **Т** –  $\beta$ -петля, стабілізований Н-зв'язками, **Е** –  $\beta$ -лист, **В** – ізолюваний  $\beta$ -місток, **Н** –  $\alpha$ -спіраль, **Г** –  $3_{10}$ -спіраль, **І** –  $\pi$ -спіраль, **С** – невпорядкована структура.

Зокрема, перебудови структури лізоциму характеризувались наступними тенденціями: а) залишки 64-65 та 78-79 – невпорядковані сегменти білка переходять у  $\beta$ -листову конформацію. У присутності нейтральних везикул ця конформація з'являється лише на  $\sim 50$  нс симуляції, тоді як асоціація лізоциму з негативно зарядженими мембранами сприяє утворенню  $\beta$ -листів майже відразу; б) залишки 79-83 – у розчині та присутності ФХ мембран цей фрагмент білка флюктує між  $\alpha$ -спіраллю та  $3_{10}$ -спіраллю, тоді як підвищення вмісту аніонного ліпиду призводить до утворення стабільної  $3_{10}$ -спіралі; в) залишки 117-129 – зв'язування лізоциму з мембранами супроводжується підвищенням вмісту невпорядкованих сегментів та петель. Величина ефекту незначно зростає при підвищенні молярної фракції ФГ; г) залишки 17-25 –  $3_{10}$ -спіраль переходить у два ізольованих містка (тобто утворення з однієї пари водневих зв'язків  $\beta$ -листа) між залишками 19-20 та 23-24, ефект посилюється при зростанні вмісту ФГ. Окрім цього, у ФГ80 ліпосомах цей місток переходить у  $\beta$ -лист під кінець симуляції (на  $\sim 90$  нс).

Для отримання додаткової інформації стосовно конформаційних перебудов лізоциму в мембранному оточенні були проаналізовані зміни двох важливих характеристик поліпептидного ланцюга – радіусу інерції ( $R_{gyr}$ ) та середньоквадратичного відхилення поточної конформації від початкової структури (RMSD). Радіус інерції – це параметр, який характеризує ступінь структурної компактності білкової молекули. Так, менший  $R_{gyr}$  відповідає щільнішому пакуванню поліпептидного ланцюга, тоді як підвищення  $R_{gyr}$  відображає часткове розгортання білка [510]. Аналіз змін радіусу інерції лізоциму у вільному та мембранозв'язаному станах виявив, що асоціація з ліпідним бішаром призводить до збільшення  $R_{gyr}$  (рис. 7.16, А), тобто до зниження ступеня компактності молекули лізоциму та його часткової денатурації. Поряд з цим, зв'язування білка з ліпідами викликало зменшення середньоквадратичних флуктуацій поліпептидного ланцюга (рис. 7.16, Б). Цей ефект віддзеркалює зменшення внутрішньомолекулярної рухливості білка.

Вочевидь, розгортання лізоциму на ліпідній матриці призводить до збільшення площі молекули білка, доступної для контакту з мембраною та іммобілізації поліпептидного ланцюга на бішарі, результатом чого є обмеження внутрішньомолекулярної динаміки білка.

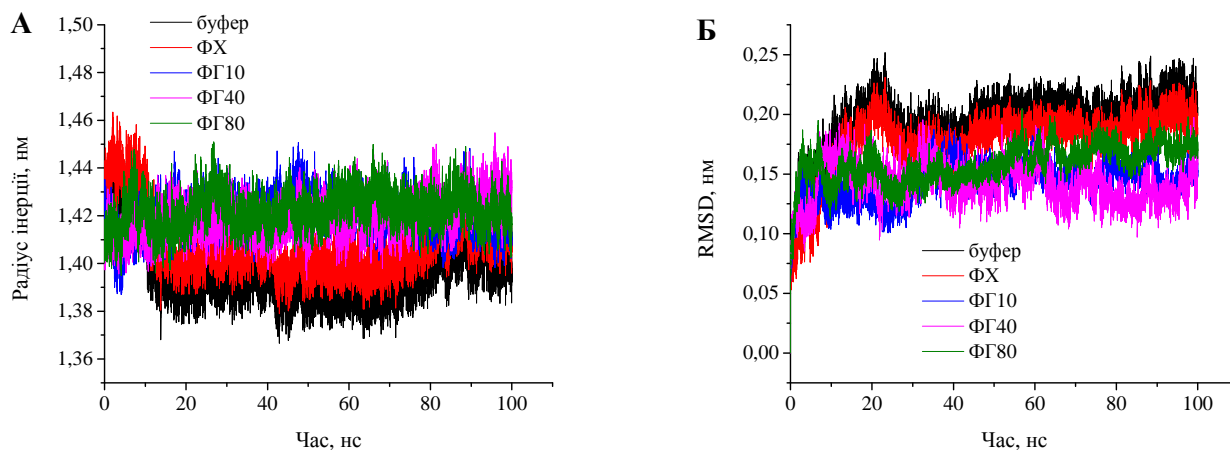


Рис. 7.16. Радіус інерції та середньоквадратичне відхилення лізоциму у відсутності та присутності ліпідних мембран.

Примітно, ступінь структурних модифікацій лізоциму зростала при підвищенні вмісту ФГ. Це спостереження підтверджується отриманими у розділі 3 доказами на користь посилення агрегаційного потенціалу лізоциму із ростом молярної фракції аніонних ліпідів, що висвітлює важливу роль електростатичних білок-ліпідних взаємодій в олігомеризації лізоциму.

На відміну від Орієнтації 1, асоціація білка з ліпідним бішаром в Орієнтації 2 призвела до менш значних модифікацій структури лізоциму (рис. 7.17). До того ж, не було виявлено кореляції між конформаційними перебудовами білка та зарядом мембрани. Зокрема, утворення  $\beta$ -листів залишками 64-65 та 78-79 спостерігалось у присутності мембран, однак у ФХ мембранах ця конформація утворювалась на  $\sim 45$  нс симуляції, а у ФГ40 та ФГ80 ліпідних бішарах – на  $\sim 75$  нс. На залишках 117-125 з'являється більше  $\beta$ -петель у присутності ФХ, ФГ40 та ФГ80, однак при асоціації лізоциму з ФГ10 бішаром  $\beta$ -петля переходить в  $\alpha$ -спіраль. Окрім цього, радіус інерції та величина середньоквадратичних відхилень залишались практично незмінними. Отримані дані дозволяють зробити висновок, що



занурення білка у бішар є необхідною передумовою переходу лізоциму в структурно-модифікований стан (стан фібрилярних інтермедіатів). Іншими словами, ключовими детермінантами мембрано-опосередкованої агрегації білка є не тільки електростатичні, але й гідрофобні лізоцим-ліпідні взаємодії. Вочевидь, роль електростатичних взаємодій полягає, перш за все, в акумуляції мономерних молекул білка на поверхні ліпідного бішару та підвищенні таким чином його локальної концентрації. Це сприяє самоасоціації білка за рахунок того, що а) компактний агрегований стан молекули відповідає мінімуму вільної енергії системи; б) знижена активність води призводить до зменшення розчинності поліпептиду; в) підвищена в'язкість мікрооточення обмежує дифузійні рухи білка.

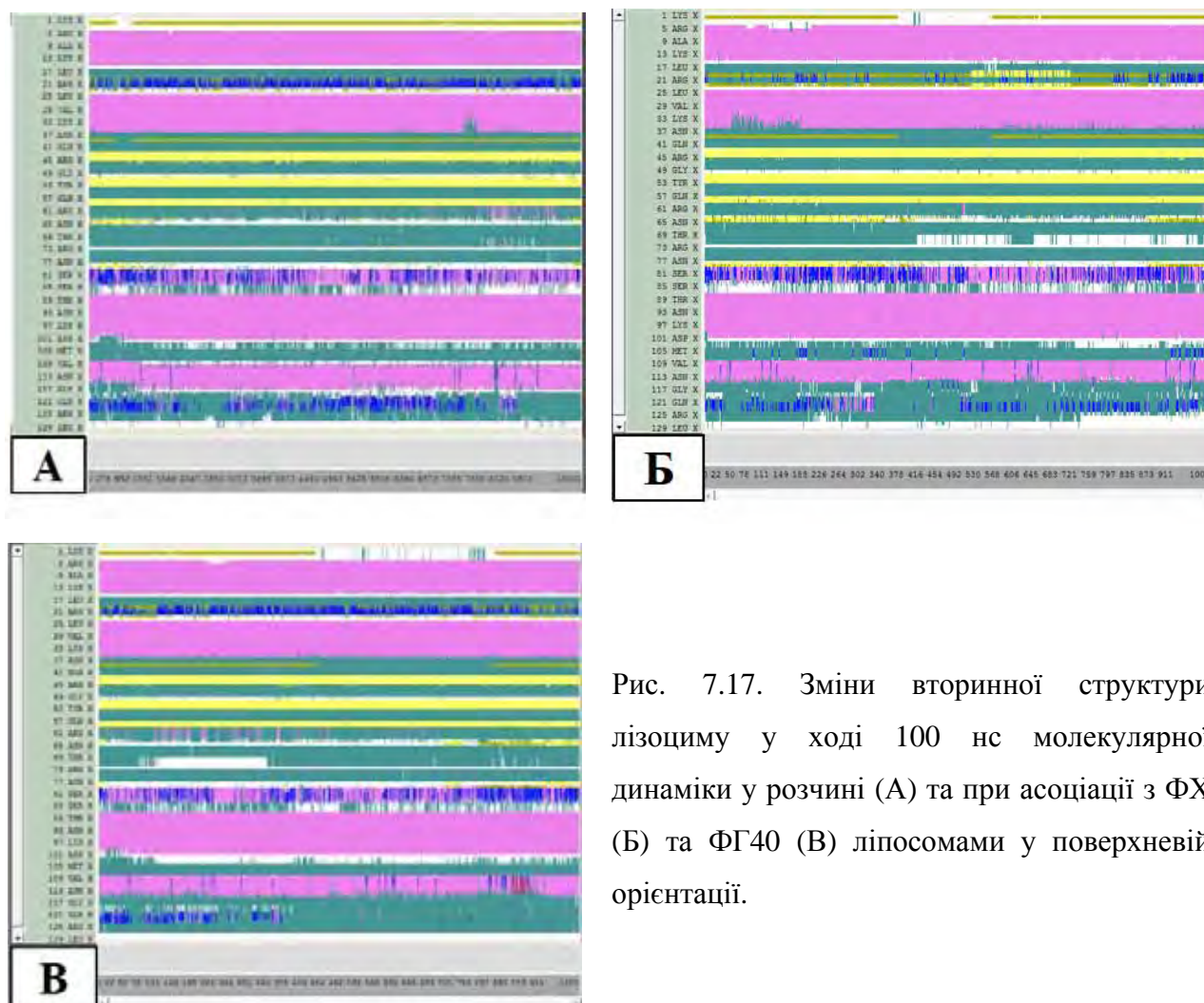


Рис. 7.17. Зміни вторинної структури лізоциму у ході 100 нс молекулярної динаміки у розчині (А) та при асоціації з ФХ (Б) та ФГ40 (В) ліпосомами у поверхневій орієнтації.



З іншого боку, мережа внутрішньомолекулярних зв'язків білкової молекули може зазнавати суттєвої реорганізації у відповідь на а) електричне поле, створене зарядженими ліпідними групами, фосфохоліновими диполями та диполями зв'язаної води; б) зміни діелектричної проникності, концентрації іонів та рН на границі розділу ліпід/вода, у порівнянні з розчином; в) утворення іонних контактів зі специфічними ліпідними групами [42]. Для нативно згорнутих білків, таких як лізоцим, описані процеси призводять до часткового розгортання поліпептидного ланцюга до стану розплавленої глобули, який є агрегаційно-компетентною конформацією та представляє собою найважливіший проміжний стан на шляху фібрилізації білка [4]. Перехід білка у стан структурного інтермедіату супроводжується експонуванням гідрофобних ділянок поліпептиду, які у пошуках найбільш термодинамічно вигідного для них середовища, вбудовуються у ліпідний бішар. У ліпідній фазі фолдінг поліпептидного ланцюга відрізняється від фолдингу у розчині, тому що неполярні ліпідні групи конкурують з неполярними білковими групами за гідрофобні взаємодії. Перенос експонованих ділянок білка з водної фази у неполярне мембранне оточення створює енергетичний виграш, який лежить в основі подальшої олігомеризації білка. Агрегаційна здатність поліпептидів визначається балансом між силами, які стабілізують мономерний стан, і силами, що спричиняють самоасоціацію білкових молекул, та контролюється висотою енергетичних бар'єрів згортання та агрегації білка [42,58].

На закінчення даного підрозділу, важливо обговорити гіпотетичну модель структури амілоїдних фібрил лізоциму, нуклеація яких відбувається у мембранному оточенні. На цей час загальновизнаними стали уявлення про те, що основними структурними детермінантами амілоїдогенних властивостей білків є підвищення вмісту  $\beta$ -структур та зниження структурної стабільності поліпептидного ланцюга [511]. У роботі [512], на основі даних інфрачервоної спектроскопії було продемонстровано, що конформери білка, які містять  $3_{10}$ -спіралі та  $\beta$ -петлі представляють собою проміжні стани між нативним та агрегованим білком. Більш того, згідно з запропонованою у цій роботі гіпотезою,

один з можливих агрегаційних шляхів лізоциму включає перехід з  $\alpha$ -спіралі у  $3_{10}$ -спіраль, а потім у  $\beta$ -структуру. Таким чином, виявлені у ході розрахунків молекулярної динаміки зміни нативної конформації лізоциму свідчать на користь того, що при асоціації з ліпідним бішаром білок переходить в структурно-модифікований агрегаційно-компетентний стан з підвищеним вмістом  $\beta$ -структур, який представляє собою сайт для нуклеації олігомерного ядра та росту амілоїдних фібрил. Виявлені в процесі молекулярної динаміки переходи у  $\beta$ -конформацію біля залишків 64-65 та 78-79 дозволяють зробити висновок, що ці фрагменти лізоциму характеризуються найвищим агрегаційним потенціалом у мембранному оточенні. Вочевидь, ці залишки представляють собою центральну частину фібрили, через яку, згодом, проходить головна вісь. З огляду на те, що означені пари амінокислотних залишків розділені між собою  $\beta$ -петлею, можна припустити, що фібрилярні агрегати лізоциму, які формуються на мембрані, матимуть структуру стеричної блискавки, в якій  $\beta$ -листи, сформовані залишками 64-65 та 78-79, є комплементарними (рис. 7.18). Додаткова стабілізація фібрили відбувається, вочевидь, за рахунок  $\beta$ -містків у N-термінальному фрагменті лізоциму (залишки 19-20 та 23-24), а також за рахунок  $\beta$ -петель та неупорядкованих сегментів, які локалізуються у C-кінцевому фрагменті (залишки 117-129) білка, відповідно. Також здається ймовірним, що у зрілій фібрилі  $\beta$ -листи мають більш протяжну структуру та охоплюють фрагменти білка Gly54-Asn65 та Ile78-Thr89 (рис. 7.18, ліва панель). Це припущення базується на результатах прогнозування сегментів лізоциму з найвищою агрегаційною здатністю на основі аналізу амінокислотної послідовності (підрозділ 7.2), який виявив, що фрагменти 27-31, 53-60, 81-89 та 106-110 є амілоїдогенними.

Хоча, як видно з графіків змін вторинної структури білка (рис. 7.15), залишки 78-89 знаходяться у  $3_{10}$ -спіральній та неупорядкованій конформації. Можна припустити, що цей фрагмент поліпептидного ланцюга перейде у  $\beta$ -конформацію, адже, як було зазначено вище, попередниками цієї конформації якраз і можуть бути  $3_{10}$ -спіраль та неупорядковані структури, як було зазначено вище, але для такого конформаційного переходу, вочевидь, необхідно більше часу, ніж час

симуляції (100 нс). Зважаючи на те, що основною метою даного етапу досліджень було встановлення принципової можливості індукції агрегаційно-компетентної конформації білка на ліпідній матриці, а не опис усього процесу фібрилізації, запропонована модель амілоїдних фібрил лізоциму у мембранному оточенні є гіпотетичною, тому спирається, частково, на припущення, викладені вище. Цікаво, ця модель узгоджується з моделлю Токунага та ін., які показали, що амінокислотні залишки 54-62 знаходяться у гідрофобному ядрі фібрил лізоциму [513].

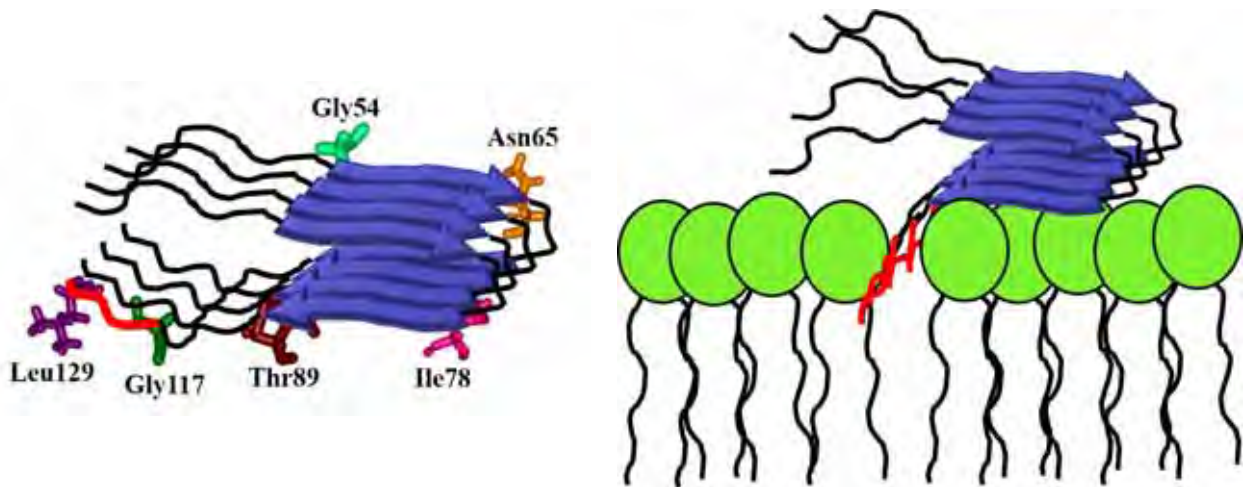


Рис. 7.18. Гіпотетична структурна модель амілоїдних фібрил лізоциму, індукованих ліпідним бішаром (ліва панель), та їх орієнтація на мембрані (права панель). Червоним виділений невпорядкований кінцевий фрагмент фібрили, який приймає участь у зв'язуванні з мембраною. Блакитні стрілочки показують  $\beta$ -листи, різними кольорами виділені амінокислотні залишки, що знаходяться на початку та у кінці  $\beta$ -тяжа.

З іншого боку, згідно з гіпотезою Кребса та ін., ділянка поліпептидного ланцюга лізоциму, яка приймає участь в утворенні фібрилярних агрегатів білка включає залишки 49-64 [514], тоді як Фраре та ін. показали, що амілоїдогенний фрагмент лізоциму більш великий та охоплює амінокислоти 32-108 [374]. Варто відзначити, що ці дані були отримані при дослідженні росту амілоїдних фібрил лізоциму у розчині. Здогадно, нуклеація на ліпідному бішарі може дещо модифікувати кінцеву конформацію фібрилярних агрегатів. У даному контексті варто висвітлити роль С-термінального сегменту лізоциму (залишки 117-129), який характеризується підвищенням ступеня невпорядкованості при зв'язуванні з

ліпідним бішаром. У роботі [375] було показано, що структурний поліморфізм амілоїдних фібрил лізоциму відіграє ключову роль у їх цитотоксичності. Зокрема, фібрилярні агрегати з меншим розміром центрального впорядкованого ядра та більшим вмістом неупорядкованих структур та петель мали вищий цитотоксичний ефект, порівняно з фібрилами, в яких майже увесь поліпептидний ланцюг знаходився у  $\beta$ -конформації. Одним із вірогідних механізмів даного ефекту автори вважають високу мембранотропну активність неупорядкованих фрагментів білка. Припускається, що сегменти поліпептидного ланцюга, які знаходяться за межами центральної частини фібрили, відіграють роль сайтів зв'язування з ліпідним бішаром. Лабільна неупорядкована або петльова структура цих білкових фрагментів сприяє їх більш ефективній асоціації з мембраною, у порівнянні із жорстким впорядкованим ядром фібрили. Аналогічні процеси відбуваються, ймовірно, і у лізоцим-ліпідних системах, досліджуваних в даній роботі. Здогадно, фрагмент фібрилярних агрегатів лізоциму, що включає залишки 117-129, зв'язується з мембраною та закорює усю фібрилу на ліпідній матриці, що може призводити до незворотних порушень цілісності бішару. Аналіз фізико-хімічних властивостей амінокислотних залишків показав, що цей фрагмент характеризується досить високою гідрофобністю, що забезпечує його вбудовування у ліпідний бішар, середовище із зниженою полярністю, але, поряд з цим, містить кілька полярних заряджених залишків, здатних утворювати контакти із полярними голівками ліпідів. Усі ці міркування дозволяють зробити висновок, що фрагмент фібрил лізоциму, який охоплює залишки 117-129, локалізується на границі розділу полярної та неполярної частини бішару, а центральна частина амілоїдних агрегатів розташовується на поверхні мембрани, що також може спричиняти структурні дефекти бішару (рис. 7.18, права панель). Описана модель узгоджується із результатами експериментальних досліджень, представлених у підрозділі 5.2, які свідчать про те, що мембранотропна активність фібрилярного лізоциму спрямована, головним чином, на поверхневий шар мембрани.

#### *7.4.2. Дослідження амілоїдогенного потенціалу цитохрому c у мембранному оточенні*

Для виявлення загальних принципів ліпід-опосередкованого амілоїдогенезу, метою подальших досліджень було вивчення конформаційних перебудов мембранозв'язаного цитохрому *c*. Цей білок дуже схожий з лізоцимом за своїми фізико-хімічними властивостями. Зокрема, обидва поліпептиди характеризуються відносно невеликою молекулярною вагою (~14 кДа та ~12 кДа для лізоциму та цитохрому *c*, відповідно), позитивним зарядом (ізоелектрична точка обох білків ~10.5-11) та компактною глобулярною структурою, утвореною згортанням одного поліпептидного ланцюга із 129 (лізоцим) чи 104 (цитохром *c*) залишків. Однак, хоча існують неспростовні докази фібрилізації лізоциму *in vivo* та *in vitro*, агрегація цитохрому *c* у високовпорядковані структури була описана лише в декількох роботах [515,516]. З огляду на це, уявлялось доцільним залучити методи комп'ютерного моделювання для порівняльного аналізу конформаційних змін цитохрому *c* та лізоциму на ліпідній матриці.

На рис. 7.19 представлено зміни вторинної структури цитохрому *c* у присутності КЛ-вміщуючих мембран із різною фракцією аніонного ліпиду. Як можна судити з рисунку, у розчині білок характеризується наявністю чотирьох  $\alpha$ -спіралей та двох  $\beta$ -листів (рис. 7.19, А). У свою чергу, асоціація з негативно зарядженими мембранами супроводжувалась незначними змінами вторинної структури цитохрому *c* (рис. 7.19, Б-Г). Зокрема, модифікуюча дія ліпідів спостерігалась лише для фрагменту білка, який включає амінокислотні залишки 16-31, хоча чіткої кореляції між змінами структури цитохрому *c* та молярною фракцією КЛ виявлено не було.

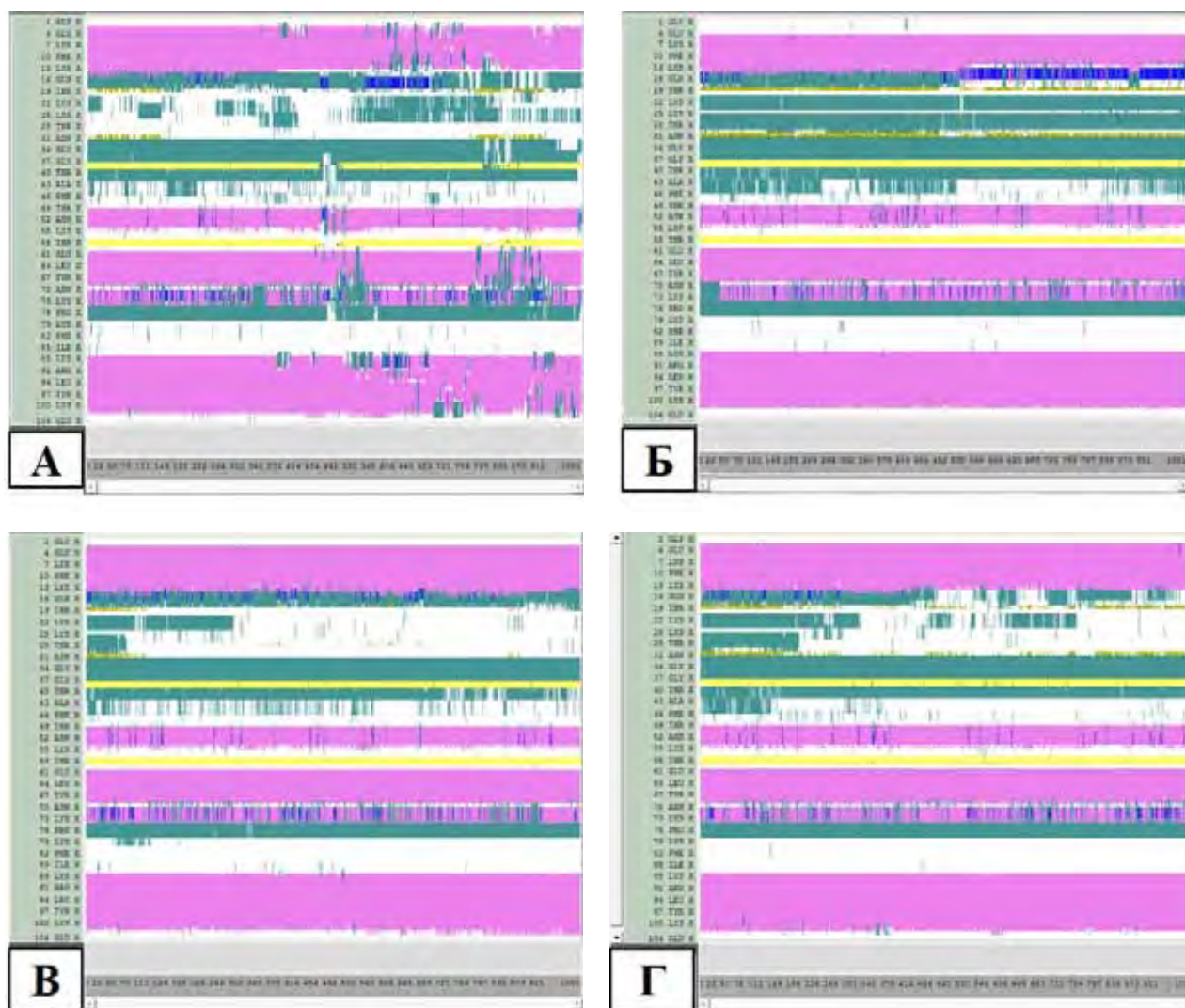


Рис. 7.19. Зміни вторинної структури цитохрому *c* у процесі молекулярної динаміки (100 нс) у розчині (А) та у присутності КЛ5 (Б), КЛ25 (В) та КЛ67 (Г) ліпідних мембран.

Так, наприклад, у вільному стані (рис. 7.19, А) залишки 16-31 знаходяться у неупорядкованому стані або приймають конформацію петлі. У присутності КЛ5 мембран неупорядковані ділянки майже зникають та залишається лише конформація петлі (рис. 7.19, Б), однак додавання КЛ25 та КЛ67 мембран має протилежний ефект – залишки 16-31 переходять до неупорядкованого стану (рис. 7.19, В, Г), тобто спостерігається дестабілізація структури цитохрому *c* та його часткове розгортання у цьому фрагменті поліпептидного ланцюга. Примітно, що означений сегмент примикає до щілини, в якій розташована гемова група білка (гемовий карман).



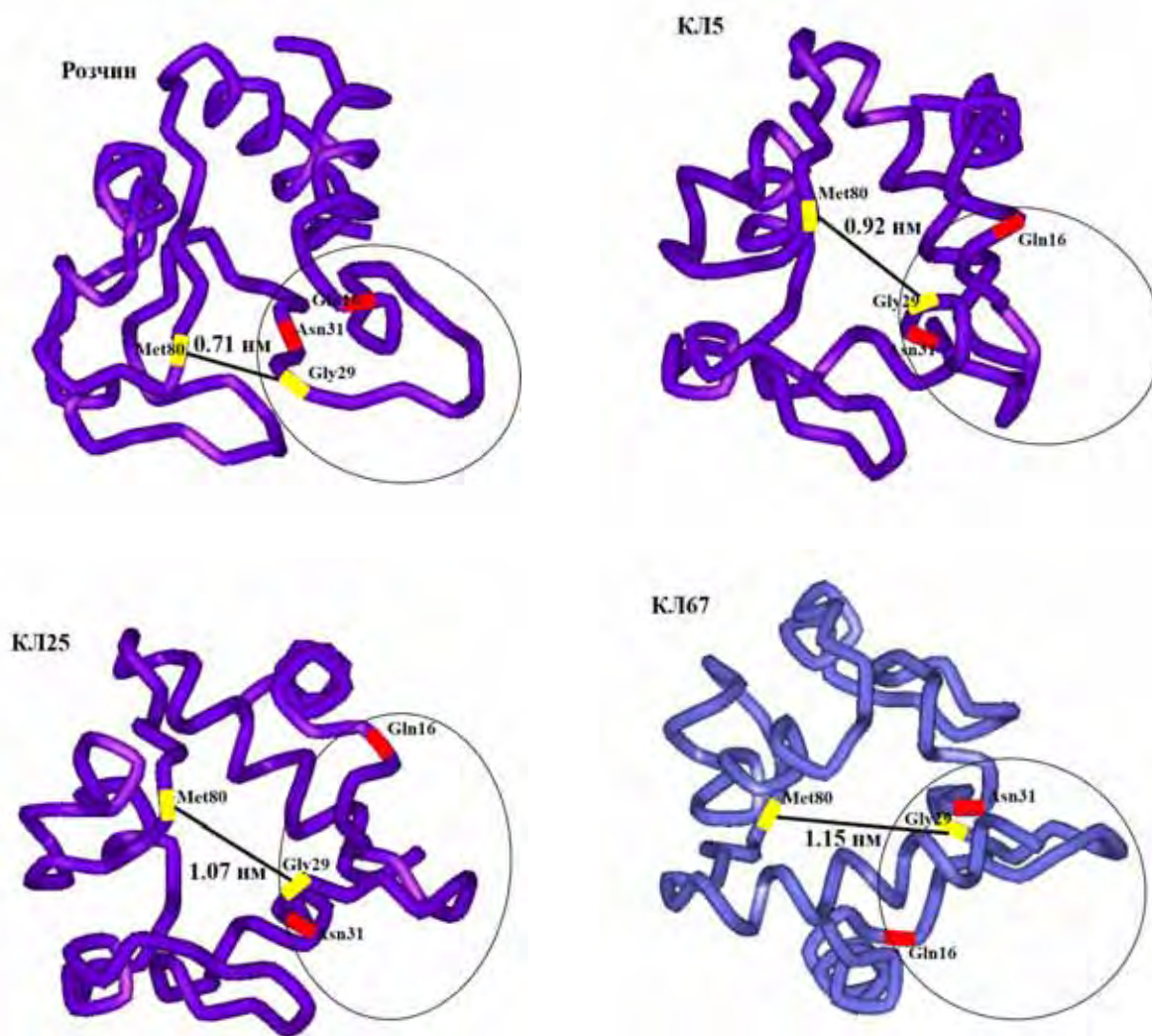


Рис. 7.20. Структура цитохрому *c* після молекулярної динаміки (100 нс) у розчині та у присутності ФХ/КЛ мембран. Жовтим виділені амінокислотні залишки, які знаходяться на протилежних сторонах гемового карману. Розрахунок ширини карману проводили між Gly29 та Met80. Овалом виділений фрагмент поліпептидного ланцюга, який охоплює залишки Gln16-Asn31, що зазнає структурних перебудов під час симуляції.

У ряді експериментальних робіт було показано, що взаємодія цитохрому *c* з ліпідними везикулами, що містили кардіоліпін, ініціює процес перекисного окиснення ліпідів [67]. Цьому передують дестабілізація структури білка, яка проявляється у частковій денатурації поліпептидного ланцюга та розширенні карману, в якому знаходиться гем, що збільшує його доступність для ліпідних молекул. За цим слідує порушення гем-глобінового зв'язку та перехід атому заліза в активний стан. Вочевидь, саме ці конформаційні перебудови і відображаються у

профілях змін вторинної структури цитохрому *c* у ході молекулярної динаміки. Дійсно, аналіз просторової структури білка виявив, що ширина гемового карману зростає з 0.71 нм у розчині до 1.15 нм у КЛ67 мембранах (рис. 7.20). Розширення гемового карману призвело до незначного збільшення радіусу інерції цитохрому *c* у присутності мембран (рис. 7.21, А), однак величина середньоквадратичних флуктуацій залишалась практично незмінною (рис. 7.21, Б). Отримані дані свідчать, що, на відміну від лізоциму, цитохром *c* характеризується меншим амплітогенним потенціалом. Примітно, що у роботі [517] також було продемонстровано, що цитохром *c* характеризується більшою стабільністю, порівняно із лізоцимом.

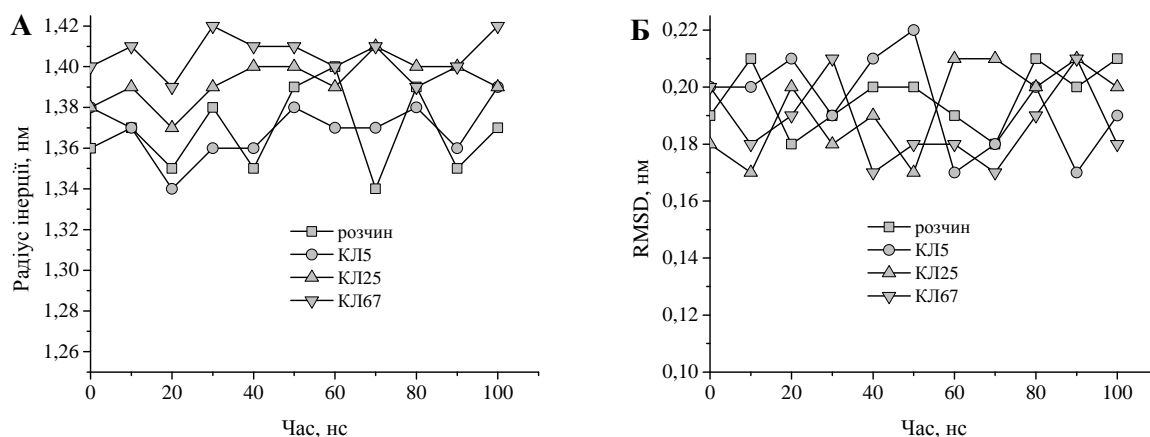


Рис. 7.21. Радіус інерції та середньоквадратичне відхилення цитохрому *c* у розчині та у мембранному оточенні.

Причиною цих відмінностей автори вважають той факт, що лізоцим характеризується доменною структурою, яка складається з  $\alpha$ - та  $\beta$ -доменів, розділених активним центром білка. На відміну від лізоциму, структура цитохрому *c* описується як єдине ціле, тому є більш стабільною. Ймовірно, це є поясненням того, що вторинна структура цитохрому *c* не зазнає суттєвих перебудов при зв'язуванні з мембранами у ході молекулярної динаміки.



#### 7.4.3. Амілоїдогенні властивості N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I: вплив мутації та ліпідного оточення

Численні дослідження свідчать на користь того, що N-термінальний фрагмент аполіпопротеїну А-I, який включає амінокислотні залишки 1-83, характеризується високим амілоїдогенним потенціалом [83,334,372]. Окрім цього, існують неспростовні докази того, що цей потенціал може бути посилений рядом чинників, серед яких мутація Айова (мутація G26R) та зв'язування з ліпідними мембранами [3]. Однак, молекулярні механізми цих ефектів досі залишаються недостатньо дослідженими. Зважаючи на це, основною задачею останнього етапу роботи було вивчення структури нативного та мутованого N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I у розчині та у ліпідному оточенні методом молекулярної динаміки.

Як видно з рис. 7.22 А, у розчині апоА 83 характеризується наявністю  $\alpha$ -спіралей,  $3_{10}$ -спіралей,  $\beta$ -петель та неупорядкованих сегментів. Спіралі, що охоплюють залишки 8-17 та 56-62, залишаються стабільними майже на протязі всього часу симуляції (200 нс). Натомість, спіральні фрагменти, які утворюються залишками 20-32 та 68-80, дестабілізуються у процесі молекулярної динаміки та переходять у  $\beta$ -петлі та  $3_{10}$ -спіралі. Окрім цього, фрагмент 44-56 також змінює свою структуру з  $\beta$ -петлі на неупорядковану конформацію приблизно після 110 нс моделювання. У свою чергу, структура мембранозв'язаного апоА 83 характеризується більшою стабільністю, порівняно із пептидом у розчині. Як видно з рис. 7.22, Б, ліпідний бішар зберігає кристалічну структуру апоА 83, тоді як у розчині ця структура доволі швидко руйнується. Асоціація апоА 83 з фосфатидилхоліновими мембранами супроводжувалась наступними конформаційними перебудовами пептиду:

- залишки 8-22 –  $\alpha$ -спіраль переходить у  $\beta$ -петлю та  $3_{10}$ -спіраль;
- залишки 1-5 – фрагмент переходить частково із неупорядкованої конформації у  $\beta$ -петлю;

- залишки 43-55 – невпорядкована конформація, яка спостерігається приблизно з середини симуляції, переходить у  $\beta$ -петлю;
- залишки 36-41 –  $3_{10}$ -спіраль переходить у  $\alpha$ -спіраль.

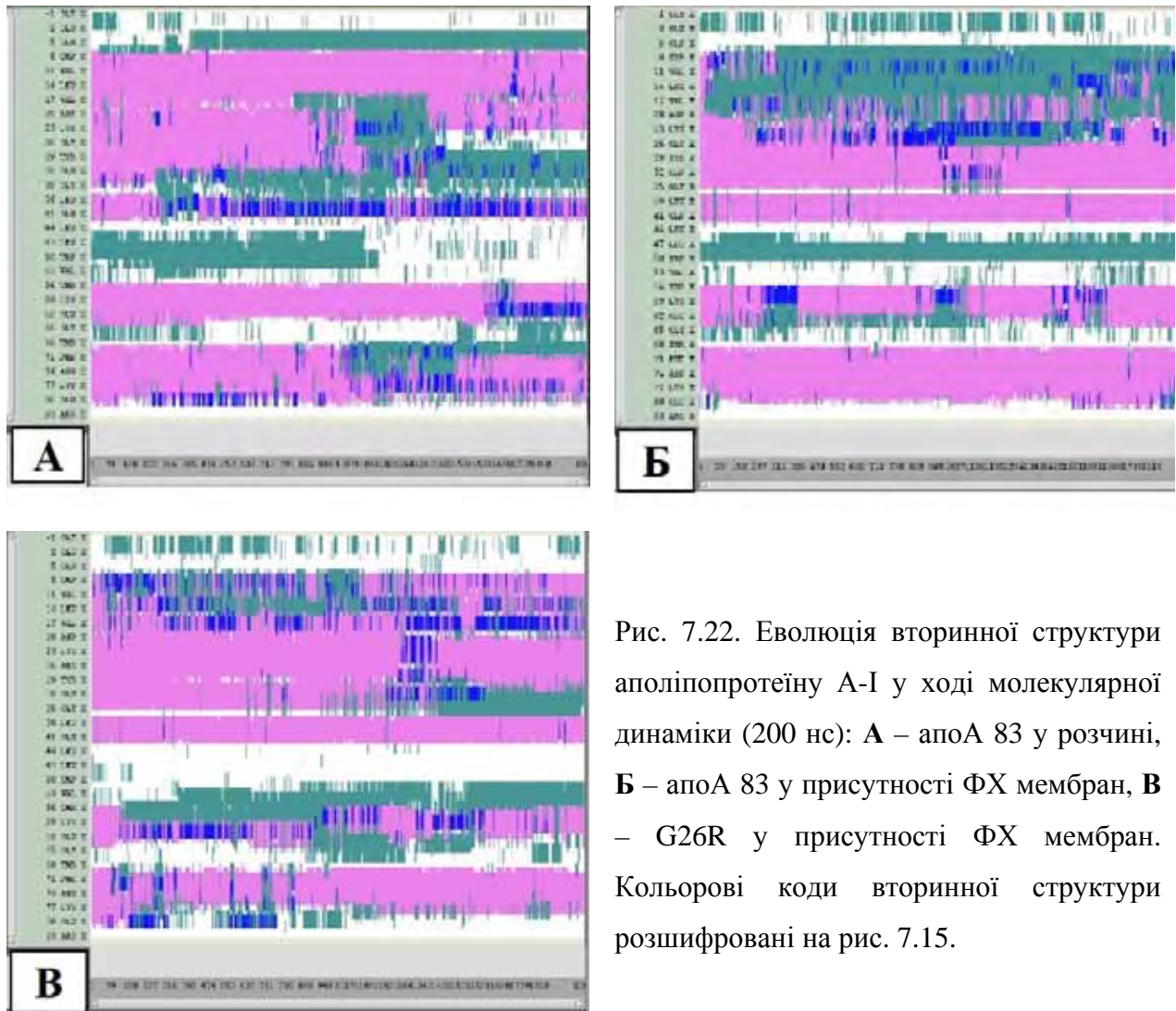


Рис. 7.22. Еволюція вторинної структури аполіпопротеїну А-I у ході молекулярної динаміки (200 нс): **А** – апоА 83 у розчині, **Б** – апоА 83 у присутності ФХ мембран, **В** – G26R у присутності ФХ мембран. Кольорові коди вторинної структури розшифровані на рис. 7.15.

Окрім цього, більш детальний аналіз змін вторинної структури апоА 83 виявив, що утворення пептид-ліпідних комплексів супроводжується незначним зростанням вмісту спіральних структур (з ~33% у розчині до ~38% у ліпідному оточенні, рис. 7.23, А), а також збільшенням вмісту  $\beta$ -петель на 14% (з ~28 до ~42%, рис. 7.23, Б). Описані ефекти означають, що асоціація апоА 83 з ФХ мембранами призводить до підвищення вмісту елементів  $\beta$ -структури, які є агрегаційно-компетентними. Примітно, зв'язування з ліпідним бішаром майже не

вплинуло на такі фізичні характеристики пептиду, як радіус інерції чи величина середньоквадратичних флуктуацій.

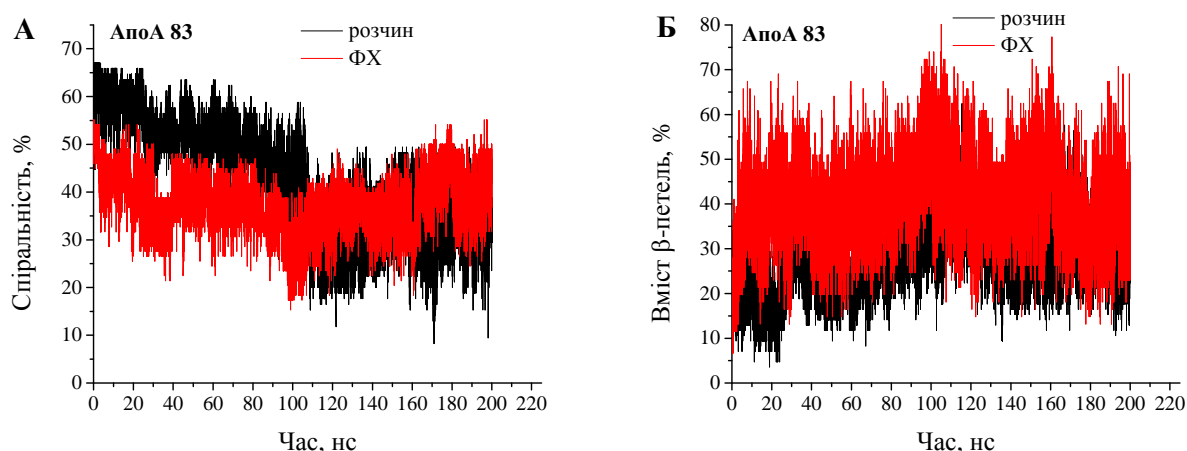


Рис. 7.23. Вміст  $\alpha$ -спіралей (А) та  $\beta$ -петель (Б) у розчині та у присутності ФХ ліпідного бішару у процесі молекулярної динаміки.

Необхідно підкреслити, що отримані результати не можуть бути однозначно інтерпретовані у рамках посилення амілоїдогенного потенціалу апоА 83 у мембранному оточенні, адже молекулярно-динамічна симуляція не виявила утворення  $\beta$ -листів ані у структурі вільного, ані у структурі мембранозв'язаного пептиду. Однак, відомо, що пептид утворює амілоїдні агрегати як у вільному стані, так і у присутності мембран. До того ж, існують експериментальні докази того, що ліпідний бішар уповільнює перехід апоА 83 у високовпорядкований фібрилярний стан [518]. Здогадно, результати МД моделювання, представлені вище, можуть говорити лише про те, що різні механізми фібрилізації притаманні для апоА 83 у розчині та на ліпідній матриці. Ймовірно, при рості амілоїду у розчині утворення нуклеусу починається лише тоді, коли присутні декілька мономерних молекул апоА 83, тобто існує порогова концентрація пептиду на одиницю об'єму, при якій починаються конформаційні зміни пептиду, що призводять врешті решт до агрегації. З огляду на те, що у процесі молекулярної динаміки у боксі знаходилась лише одна молекула апоА 83, наведені міркування пояснюють відсутність суттєвого збільшення частки  $\beta$ -конформацій у ході симуляції. У свою чергу, можна припустити, що у присутності ліпідного бішару

пептид навіть у мономерному стані здатний утворювати  $\beta$ -структури, які потенційно є зародками амілоїдних фібрил.

Введення точкової мутації G26R суттєво не вплинуло на вторинну структуру N-кінцевого фрагменту мембранозв'язаного аполіпопротеїну A-I (рис. 7.22, В). Цей висновок підтверджується також даними інших дослідників, які свідчать про те, що стабільність апоА 83 не порушується мутацією G26R [335]. Аналіз еволюції вторинної структури G26R виявив наступні зміни у процесі молекулярної динаміки:

- залишки 5-26 –  $\alpha$ -спіраль більш стабільна у ході симуляції в мутантному пептиді, у порівнянні із нативним;
- залишки 29-35 –  $\alpha$ -спіраль руйнується та переходить у  $\beta$ -петлю;
- залишки 42-52 – фрагмент з частково неупорядкованого стану переходить у повністю неупорядковану конформацію;
- залишки 56-65 –  $\alpha$ -спіраль нестабільна у ході молекулярно-динамічної симуляції.

Наявні літературні дані вказують на те, що роль мутації Айова (мутація G26R) у посиленні амілоїдогенезу пептиду полягає у підвищенні доступності аполіпопротеїну A-I до протеолізу та індукуванні вивільнення N-термінального фрагменту з цілого пептиду. Згідно з результатами прогнозування амілоїдогенних ділянок поліпептидного ланцюга, описаними у попередньому підрозділі, апоА 83 містить дві агрегаційні ділянки – залишки 14-22 та 52-58, причому агрегаційний потенціал мутантного пептиду перевищує агрегаційний потенціал білка дикого типу. Як видно з рис. 7.22, Б, половина другої ділянки (залишки 55-58) знаходиться у  $\alpha$ -спіральній конформації, тоді як фрагмент 52-55 перекривається із сегментом 44-55, який приймає неупорядковану конформацію чи конформацію  $\beta$ -петлі. Аналіз тривимірної структури апоА 83 показав, що у нативному пептиді залишок G26 знаходиться біля залишку W8, який локалізується у середині фрагменту 44-55 (рис. 7.24).

Цей сегмент характеризується частково розупорядкованою структурою та утворює специфічні контакти із іншими ділянками поліпептидного ланцюга.

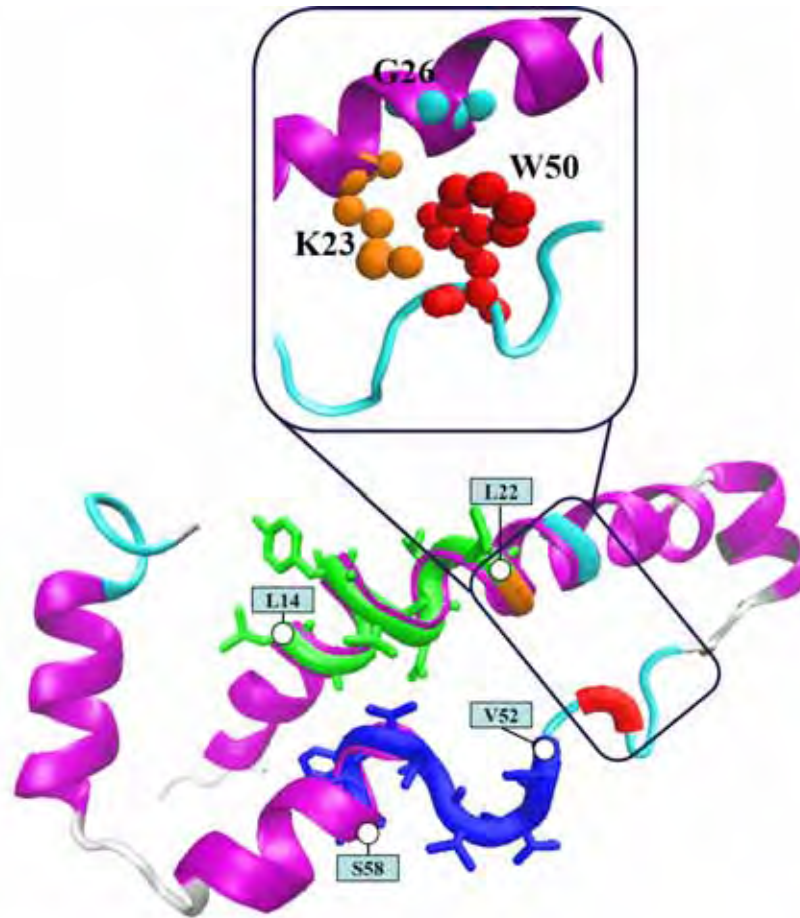


Рис. 7.24. Взаємна орієнтація амінокислотних залишків у пептиді апоА 83. Протяжні зелені та сині ділянки означають амілоїдогенні сегменти пептиду L14-L22 та V52-S58.

Згідно з гіпотезою Дас та співавторів, мутація G26R модифікує взаємодії між амінокислотними залишками у даному фрагменті [427]. Зокрема, між залишками R26 та K23 виникають відштовхувальні кулонівські взаємодії, які порушують  $\pi$ -катионні контакти W50-K23. Це, у свою чергу, призводить до пертурбацій локальної структури та підвищення динаміки сегменту 44-55 та прилягаючої агрегаційної ділянки. Результатом зростання внутрішньомолекулярної рухливості пептиду є збільшення його доступності для протеолізу та вивільнення з ліпідного комплексу, коли й починається фібрилізація. Вочевидь, аналогічний механізм має місце і в наших системах. Мембранозв'язаний пептид G26R характеризується

більш неупорядкованою структурою, у порівнянні із ліпід-асоційованим апоА 83, про що свідчить зростання вмісту неупорядкованої конформації (рис. 7.25, А) та збільшення величини середньоквадратичних флуктуацій поліпептидного ланцюга (рис. 7.25, Б) у ході молекулярної динаміки. Ймовірно, зростання внутрішньомолекулярної рухливості мутантного поліпептиду призводить до більшого експонування амілоїдогенних ділянок G26R, прискорюючи тим самим його фібрилізацію.

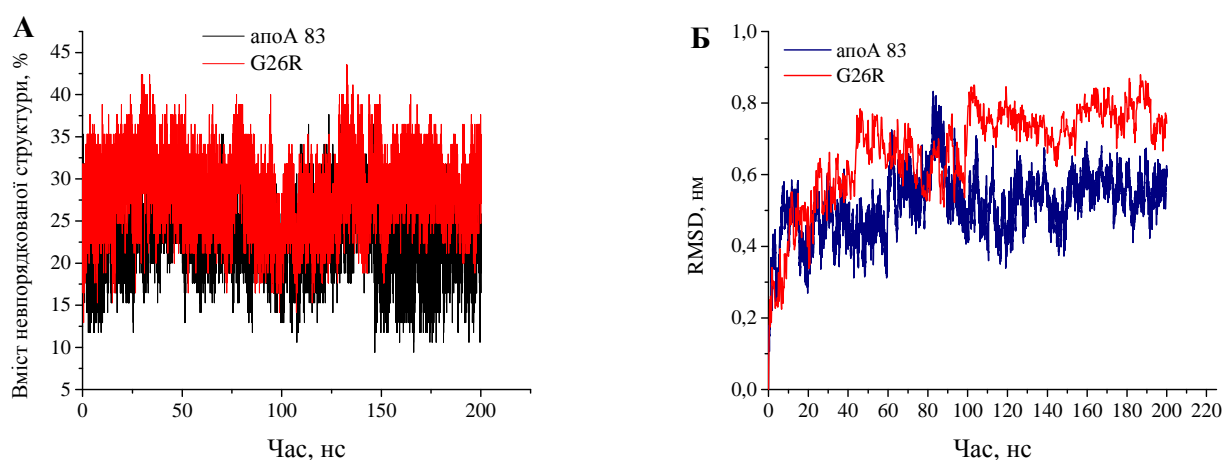


Рис. 7.25. Вміст неупорядкованої структури (А) та величина середньоквадратичних відхилень (Б) у пептидах апоА 83 та G26R у присутності ФХ ліпідних мембран.

Непрямим доказом утворення агрегаційно-компетентної конформації мембранозв'язаного G26R може слугувати той факт, що амілоїдогенна ділянка 14-22 у процесі МД симуляції флуктує між  $\alpha$ - та  $3_{10}$ -спіраллю. Окрім цього, вміст  $3_{10}$ -спіралі на ділянці 55-60 вищий у G26R пептиді, ніж у апоА 83. Як відзначалось вище, для деяких білків перехід у конформацію  $3_{10}$ -спіралі передуює процесу фібрилізації. До того ж, превалюючою на сьогодні є гіпотеза, згідно з якою структурні інтермедіати амілоїдних агрегатів аполіпопротеїну А-I на ліпідній матриці знаходяться у спіральній конформації, яка відрізняється від нативної  $\alpha$ -спіралі. Можна припустити, що утворення саме  $3_{10}$ -спіралі передуює фібрилізації пептиду в мембранному оточенні.

На закінчення, необхідно підкреслити, що результати комп'ютерного моделювання, описані в даному підрозділі, не дозволяють зробити однозначний висновок стосовно молекулярної структури амілоїдних фібрил аполіпопротеїну А-I. Наразі існує три структурні моделі фібрил, сформованих N-термінальним сегментом апоА 83. Згідно з моделлю Лоуроса та ін., два  $\beta$ -тяжі утворюються залишками 15-27 та 54-64 [519]. Ці тяжі розташовуються паралельно один напроти одного, формуючи тим самим стеричну застібку. Окрім водневих зв'язків, стекінг мономерів стабілізується сольовим містком між K23 одного мономера та E62 іншого мономера. Альтернативна структурна модель, запропонована Гіричем та ін., припускає, що амілоїдні фібрили також знаходяться у конформації  $\beta$ -тяж – петля –  $\beta$ -тяж, однак стерична застібка антипаралельна та утворюється залишками 14-31 та 41-58 [372]. Нарешті, модель Дас та ін. постулює, що залишки 1-75 утворюють ядро фібрилярних агрегатів апоА-I, однак укладки у стеричну застібку не відбувається.  $\beta$ -листи амілоїду складаються з  $\beta$ -тяжів різних мономерних молекул, які знаходяться у паралельній орієнтації [427]. Здогадно, кожна з описаних структур може утворюватись як *in vivo*, так і *in vitro*, однак кінцева морфологія фібрили залежить від умов, що спричиняють патологічну агрегацію аполіпопротеїну А-I.

### 7.5. Короткі висновки до Розділу 7

1. В рамках моделі адсорбції масштабованих частинок та теорії подвійного електричного шару проведене чисельне моделювання процесу електростатично-контрольованої адсорбції білків на поверхні мембран при варіюванні таких параметрів, як концентрація білка та ліпідів, ступінь олігомеризації та заряд білка, вміст аніонних ліпідів у ліпідному бішарі, рН та іонна сила. Встановлено, що характерною ознакою олігомеризації білка є зміна форми кривих зв'язування мономерів з ленгмюрівської на сигмоїдну чи асиметричну дзвоноподібну. Розроблена нова експериментальна стратегія, спрямована на підвищення інформативності аналізу ізотерм адсорбції при оцінці агрегаційної здатності мембранозв'язаних білків.



2. За допомогою алгоритмів FoldAmyloid, Tango, Waltz, AmylPred2, MetAmyl, Pasta2, BetaScan та Aggrescan ідентифіковані амілоїдогенні фрагменти лізоциму, цитохрому *c* та N-термінального фрагменту аполіпопротеїну A-I. Проведено порівняльний аналіз агрегаційних властивостей білків дикого типу та мутантів. Продemonстровано, що амілоїдогенні мутації лізоциму та аполіпопротеїну A-I не змінюють положення агрегаційно-компетентних ділянок, але підвищують їх агрегаційний потенціал.

3. З використанням серверів молекулярного докінгу PatchDock і FireDock, та програмного пакетів CreateFibril та AQUASOL сконструйовані амілоїдні фібрили пептидів лізоциму, аполіпопротеїну A-I і A $\beta$ -пептиду, та проведена оцінка їх стабільності в залежності від кута закручування протофіламентів. На базі серверу RRM визначені параметри, що характеризують локалізацію та орієнтацію модельних фібрил відносно поверхні розділу ліпід/вода. Встановлено, що фібрили пептидів лізоциму та аполіпопротеїну A-I переважно орієнтуються паралельно поверхні мембрани. Продemonстровано, що зростання кута закручування протофіламентів призводить до зменшення глибини занурення фібрилярних агрегатів в ліпідний бішар.

4. Методом молекулярної динаміки охарактеризована роль ліпідів в утворенні агрегаційно-компетентної конформації лізоциму, цитохрому *c* та N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну A-I. Аналіз змін вторинної структури лізоциму при його зв'язуванні з ліпідними бішарами, що склались із ФХ та його сумішей із ФГ (10, 40 та 80 мол%) показав, що мембранозв'язаний стан білка характеризується підвищеним вмістом  $\beta$ -структур. Отримані докази часткового розгортання молекули лізоциму на ліпідній матриці, ступінь якого зростала при підвищенні вмісту аніонного ліпиду ФГ. Продemonстровано, що як електростатичні, так і гідрофобні білок-ліпідні взаємодії є ключовими детермінантами мембрано-опосередкованої агрегації білка. Вперше запропонована модель нуклеації амілоїдних фібрил лізоциму у мембранному оточенні. Показано, що цитохром *c* характеризується меншим амілоїдогенним потенціалом, порівняно з лізоцимом. Виявлено підвищення вмісту агрегаційно-



компетентних елементів  $\beta$ -структури при зв'язуванні апоА-I 83 з ФХ мембранами та зростання ступеня структурної неупорядкованості цього поліпептиду при наявності мутації G26R. Висунута гіпотеза про існування різних механізмів фібрилізації апоА 83 у розчині та на ліпідній матриці.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі зроблено внесок у вирішення однієї з актуальних проблем молекулярної біофізики – встановлення ролі білок-ліпідних взаємодій у процесі патологічної агрегації білків. З використанням низки експериментальних та теоретичних методів проведено комплексне дослідження взаємодії ряду білків та пептидів, у мономерній, олігомерній та фібрилярній формах, з модельними ліпідними мембранами різного складу, а також розроблені нові методичні підходи до диференціації різних стадій агрегації білка у водній та ліпідній фазах. Отримані у роботі дані створюють підґрунтя для більш глибокого розуміння молекулярних механізмів цитотоксичної дії амілоїдних фібрил та розробки нових ефективних стратегій запобігання розвитку конформаційних патологій.

5. Запропоновано нову методологію структурної характеристики фібрилярних білкових агрегатів, що базується на вимірюванні індуктивно-резонансного переносу енергії між амілоїд-специфічними флуоресцентними зондами та аналізі експериментальних даних в рамках моделей переносу енергії в просторово обмежених системах. З використанням цієї методології визначено структурні характеристики амілоїдних фібрил лізоциму – молекулярний об'єм мономерних субодиниць та фрактальну розмірність агрегатів білка.
6. Розвинуто новий підхід до отримання якісної і кількісної інформації щодо процесу олігомеризації білків у мембранному оточенні на основі комбінованого застосування методів стаціонарного і часороздільного міжмолекулярного переносу енергії. Охарактеризовані агрегаційні властивості білка у модельних мембранних системах. Вперше визначені параметри олігомеризації лізоциму, ступінь агрегації та відстань між мономерами в агрегаті, у залежності від вмісту аніонного ліпиду, та запропоновано структурну модель білкових олігомерів.
7. Встановлено кореляцію між характером структурної гетерогенності ліпідного бішару та агрегаційним потенціалом лізоциму. Показано, що сорбція лізоциму на поверхні бішарів на підложці призводить до латеральної сегрегації ліпідних компонентів. Вперше отримані докази на користь трансформації планарних доменів у мультишарові стопки при підвищенні поверхневого

електростатичного потенціалу мембрани. Запропоновано модель, що пов'язує структурну модифікацію ліпідного бішару з утворенням агрегатів білка при високому вмісті аніонних ліпідів.

8. Охарактеризовані особливості впливу префібрилярних олігомерів та зрілих фібрил лізоциму на молекулярну організацію модельних ліпідних мембран різного складу. Встановлено, що олігомери білка характеризуються більш вираженою структурно-модифікуючою дією, у порівнянні зі зрілими фібрилами. Показано, що олігомерний лізоцим спричиняє зниження ступеня гідратації, зменшення вільного об'єму гідрофобної зони та зростання параметру впорядкування ацильних ланцюгів у негативно заряджених ліпідних бішарах. Натомість, фібрилярний білок призводить до структурних змін тільки полярної області модельних мембран, викликаючи зростання щільності пакування полярних голівок ліпідів та дегідратацію ліпідного бішару. Виявлена здатність холестерину запобігати модифікуючому впливу як олігомерного, так і фібрилярного лізоциму на структурно-динамічний стан модельних мембран.
9. З'ясовані молекулярні механізми структурної реорганізації мембран під впливом амілоїдних фібрил N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I. Виявлено зростання ступеня гідратації ліпідного бішару під впливом агрегованого білка. Запропонована модель дестабілізації мембран, що включає інвагінацію, стоншення та дефрагментацію ліпідного бішару при адсорбції фібрилярних агрегатів. Вперше показано, що ступінь модифікації структурного стану та фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару під впливом амілоїдних фібрил N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I істотно знижується при додаванні до їх складу холестерину.
10. Вперше при дослідженні модельних білок-ліпідних систем, що містили в якості білкових компонентів мономерний чи фібрилярний лізоцим та мономерний цитохром *c*, продемонстрована можливість конкурентної взаємодії амілоїдних фібрил і периферичних мембранних білків з ліпідним бішаром. Показано, що фібрилярний лізоцим викликає більш ефективну дисоціацію цитохром *c* – ліпідних комплексів, ніж мономерний білок. Отримані докази

того, що взаємодія цитохрому *c* з ліпідними везикулами контролюється такими факторами, як поверхнева густина заряду ліпідного бішару та іонна сила розчину.

11. Вперше охарактеризовані еластичні властивості амілоїдних фібрил N-термінального фрагменту аполіпопротеїну A-I з амілоїдогенною мутацією G26R. Визначені такі механічні параметри фібрилярного поліпептиду, як персистентна довжина, модуль Юнга та другий момент інерції. Встановлено, що конфігурація амілоїдних фібрил «спіральна стрічка» характеризується вищою жорсткістю у порівнянні із «закрученою стрічкою».
12. Розроблена нова стратегія дослідження топологічних модифікацій фібрилярних агрегатів, що базується на аналізі результатів вимірювання ІРПЕ між мембранозв'язаним флуорофором та амілоїд-специфічним зондом методом Монте-Карло. Отримані аргументи на користь мембрано-опосередкованого структурного переходу амілоїдних фібрил N-термінального фрагменту аполіпопротеїну A-I з мутацією G26R із конфігурацій закрученої чи спіральної стрічки до планарної конфігурації.
13. В рамках континуальних моделей адсорбції, що базуються на теорії масштабованих частинок та подвійного електричного шару, проведене чисельне моделювання процесу електростатично-контрольованої адсорбції мономерних та олігомерних білків на поверхні мембран при варіюванні таких параметрів, як концентрації білка та ліпиду, заряд білка, поверхневий електростатичний потенціал мембрани, рН та іонна сила. Встановлено, що характерною ознакою олігомеризації білка є зміна форми кривих зв'язування мономерів з ленгмюрівської на сигмоїдну чи асиметричну дзвоноподібну. Запропоновано нову стратегію оптимального планування експериментів по зв'язуванню, що спрямовані на отримання доказів самоасоціації мембранозв'язаних білків.
14. Методом молекулярної динаміки вперше проведено дослідження ролі ліпідів в утворенні агрегаційно-компетентної конформації лізоциму, цитохрому *c* та N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну A-I. Виявлено, що

мембранозв'язаний стан лізоциму характеризується підвищеним вмістом  $\beta$ -структур. Отримані докази часткового розгортання молекули лізоциму на ліпідній матриці, ступінь якого зростала при підвищенні вмісту аніонного ліпіду. Вперше запропонована модель нуклеації амілоїдних фібрил лізоциму у мембранному оточенні, що вказує на залежність процесу мембрано-опосередкованої агрегації білка як від електростатичних, так і від гідрофобних білок-ліпідних взаємодій. Вивчення конформаційних перебудов цитохрому *c* при його асоціації з ліпідним бішаром виявило розширення гемового карману білка. Продемонстровано, що цитохром *c* характеризується меншим амілоїдогенним потенціалом, порівняно з лізоцимом. Отримані докази на користь підвищення вмісту агрегаційно-компетентних елементів  $\beta$ -структури при зв'язуванні N-термінального фрагменту аполіпопротеїну A-I з ліпідними мембранами та зростання ступеня структурної непорядкованості цього поліпептиду при наявності амілоїдогенної мутації G26R.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Buell K. The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation / A. Buell, C. Dobson, T. Knowles // *Essays Biochem.* – 2014. – V. 56. – P. 11 – 39.
2. Volpatti L. Polymer physics inspired approaches for the study of the mechanical properties of amyloid fibrils / L. Volpatti, T. Knowles // *J. Polymer Sci. A.* – 2014. – V. 52. – P. 281-292.
3. Adamcik J. Protein fibrils from a polymer physics perspective / J. Adamcik, R. Mezzenga // *Macromolecules.* – 2012. – V. 45. – P. 1137-1150.
4. Uversky V. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded / V.N. Uversky, A.L. Fink // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1698. – P. 131-153.
5. Zerovnik E. Amyloid-fibril formation / E. Zerovnik // *FEBS J.* – 2002. – V. 269. – P. 3362-3371.
6. Tycko R. Solid state NMR studies of amyloid fibril structure / R. Tycko // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2011. – V. 62. – P. 279-299.
7. Sunde M. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction / M. Sunde, L.C. Serpell, M. Bartlam et al. // *J. Mol. Biol.* – 1997. – V. 273 – P. 729-739.
8. Chiti F. Protein misfolding, functional amyloid and human diseases / F. Chiti, C. Dobson // *Annu. Rev. Biochem.* – 2006. – V. 75. – P. 333-366.
9. Mankar S. Nanomaterials: amyloid reflect their brighter side / S. Mankar, A. Anoop, S. Sen et al. // *Nano Rev.* – 2011. – V. 2. – P. 6032-6043.
10. Gorbenko G. The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation / G. Gorbenko, P. Kinnunen // *Chem. Phys. Lipids.* – 2006. – V. 141. – P. 72-82.
11. Yip C. A $\beta$ -42-peptide assembly on lipid bilayers / C.M. Yip, A.A. Darabie, J. McLaurin // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 318. – P. 97-107.

12. Cao P. Islet amyloid polypeptide toxicity and membrane interactions / P. Cao, A. Abedini, H. Wang et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110. – P. 19279-19284.
13. Bokvist M. Two types of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid (1–40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation / M. Bokvist, F. Lindstrom, A. Watts et al. // J. Mol. Biol. – 2004. – V. 335. – P. 1039-1049.
14. Sharp J. Surface denaturation and amyloid fibril formation of insulin at model lipid-water interfaces / J.S. Sharp, J.A. Forrest, R.A.L. Jones // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – P. 15810-15819.
15. Zhao H. Binding of endostatin to phosphatidylserine-containing membranes and formation of amyloid-like fibers / H. Zhao, A. Jutila, T. Nurminen et al. // Biochemistry. – 2005. – V. 44. – P. 2857-2863.
16. Jo E.  $\alpha$ -synuclein – synaptosomal membrane interactions. Implications for fibrillogenesis / E. Jo, A.A. Darabie, K. Han et al. // Eur. J. Biochem. – 2004. – V. 271. – P. 3180-3189.
17. Knight J. Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly / J.D. Knight, A.D. Miranker // J. Mol. Biol. – 2004. – V. 341. – P. 1175-1187.
18. Chirita C. Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization *in vitro* / C.N. Chirita, M. Necula, J. Kuret // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 25644-25650.
19. Zhao H. Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes / H. Zhao, E.K.J. Tuominen, P.K.J. Kinnunen // Biochemistry. – 2004. – V. 43. – P. 10302-10307.
20. Wang S. The influence of phospholipid membranes on bovine calcitonin peptide's secondary structure and induced neurotoxic effects / S.S. Wang, T.A. Good, D.L. Rymer // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2005. – V. 37. – P. 1656-1669.
21. Kazlauskaite J. Structural changes of the prion protein in lipid membranes leading to aggregation and fibrillization / J. Kazlauskaite, N. Sanghera, I. Sylvester et al. // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – P. 3295-3304.

22. Harrison R. Amyloid peptides and proteins in review / R. Harrison, P. Sharpe, Y. Singh et al. // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2007. – V. 179. – P. 1-77.
23. Sparr E. Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers / E. Sparr, M.F.M. Engel, D.V. Sakharov et al. // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 577. – P. 117-120.
24. Lee H. Membrane-bound  $\alpha$ -synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form / H.J. Lee, C. Choi, S.J. Lee // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 671-678.
25. Ege C. Insertion of Alzheimer's A $\beta$ -40 peptide into lipid monolayers / C. Ege, K.Y.C. Lee // *Biophys. J.* – 2004. – V. 87. – P. 1732-1740.
26. Zhu M. Annular oligomeric amyloid intermediates observed by *in situ* atomic force microscopy / M. Zhu, S. Han, F. Zhou et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 24452-24459.
27. Trusova V. Chlorpromazine effect on lysozyme-lipid interactions / V. Trusova // *Біофізичний Вісник.* – 2008. – Т. 21, № 2. – С. 42-44.
28. Trusova V. Electrostatically-controlled protein adsorption onto lipid bilayer: modeling adsorbate aggregation behavior / V. Trusova, G. Gorbenko // *Biophys. Chem.* – 2008. – V. 133. – P. 90-103.
29. Gorbenko G. Resonance energy transfer study of lysozyme-lipid interactions / G. Gorbenko, V. Ioffe, P. Kinnunen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1778. – P. 1213-1221.
30. Trusova V. Intrinsic fluorescence of lysozyme in model protein-lipid systems / V. Trusova // *Біофізичний Вісник.* – 2009. – Т. 22, № 1. – С. 62-67.
31. Trusova V. A novel squarylium dye for monitoring oxidative processes in lipid membranes / V. Trusova, G. Gorbenko, T. Deligeorgiev et al. // *J. Fluoresc.* – 2009. – 19. – P. 1017-1023.
32. Gorbenko G. Cytochrome *c* induces lipid demixing in weakly charged phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol model membranes as evidenced by resonance energy transfer / G. Gorbenko, V. Trusova, J. Molotkovsky et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1788. – P. 1358-1365.



33. Trusova V. Lipid-mediated lysozyme aggregation: Forster resonance energy transfer study / V. Trusova // Біофізичний Вісник. – 2010. – Т. 25, №2. – С. 40-46.
34. Trusova V. Cytochrome *c* – cardiolipin interactions: extended lipid anchorage revisited / V. Trusova // Біофізичний Вісник. – 2010. – Т. 24, № 1. – С. 59-63.
35. Kastorna A. Lipid bilayer modification induced by fibrillar lysozyme: fluorescence spectroscopy study / A. Kastorna, V. Trusova, G. Gorbenko // Біофізичний Вісник. – 2010. – Т. 25, №2. – С. 47-54.
36. Trusova V. Forster resonance energy transfer evidence for lysozyme oligomerization in lipid environment / V. Trusova, G. Gorbenko, P. Sarkar et al. // J. Phys. Chem. B. – 2010. – V. 114. – P. 16773-16782.
37. Trusova V. Cytochrome *c* – lipid interactions: new insight from resonance energy transfer / V. Trusova, G. Gorbenko, J. Molotkovsky et al. // Biophys. J. – 2010. – 99. – P. 1754-1763.
38. Trusova V. Morphological changes of supported lipid bilayers induced by lysozyme: planar domain formation vs. multilayer stacking / V. Trusova, G. Gorbenko, I. Akopova et al. // Colloids Surf. B. – 2010. – V. 80. – P. 219-226.
39. Gorbenko G. New fluorescent probes for detection and characterization of amyloid fibrils / G. Gorbenko, V. Trusova, E. Kirilova et al. // Chem. Phys. Lett. – 2010. – V. 495. – P. 275-279.
40. Kaloyanova S. Synthesis and fluorescence characteristics of novel asymmetric cyanine dyes for DNA detection / S. Kaloyanova, V. Trusova, G. Gorbenko et al. // J. Photochem. Photobiol. A. – 2011. – V. 217. – P. 147-156.
41. Kastorna A. Influence of oligomeric and fibrillar lysozyme on physical properties of model membranes / A. Kastorna, V. Trusova, G. Gorbenko // Біофізичний Вісник. – 2011. – Т. 26, № 1. – С. 34-41.
42. Gorbenko G. Protein aggregation in a membrane environment / G. Gorbenko, V. Trusova // Adv. Prot. Chem. Struct. Biol. – 2011. – V. 84. – P. 114-152.
43. Gorbenko G. Effect of oligomeric lysozyme on structural state of model membranes / G. Gorbenko, V. Trusova // Biophys. Chem. – 2011. – V. 154. – P. 73-81.

44. Trusova V. Novel benzanthrone aminoderivatives for membrane studies / V. Trusova, G. Gorbenko, E. Kirilova et al. // *J. Fluoresc.* – 2012. – V. 22. – P. 953-959.
45. Kastorna A. Membrane effects of lysozyme amyloid fibrils / A. Kastorna, V. Trusova, G. Gorbenko, P. Kinnunen // *Chem. Phys. Lipids.* – 2012. – V. 165. – P. 331-337.
46. Trusova V. Fluorescence study on aggregated lysozyme and lipid bilayer interactions / V. Trusova, G. Gorbenko // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2012. – V. 113. – P. 51-55.
47. Trusova V. Modulation of physiological and pathological activities of lysozyme by biological membranes / V. Trusova // *Cell Mol. Biol. Lett.* – 2012. – V. 17. – P. 349-375.
48. Gorbenko G. The effect of lysozyme amyloid fibrils on cytochrome *c* – lipid interactions / G. Gorbenko, V. Trusova, R. Sood et al. // *Chem. Phys. Lipids.* – 2012. – V. 165. – P. 769-776.
49. Yudintseva A. Interaction of lysozyme amyloid fibrils with Langmuir monolayers / A. Yudintseva, V. Trusova, G. Gorbenko et al. // *J. Biol. Phys. Chem.* – 2013. – V. 13. – P. 77-84.
50. Trusova V. Modeling protein adsorption onto lipid monolayer surface / V. Trusova // *Біофізичний Вісник.* – 2013. – Т. 29, № 1. – С. 30-38.
51. Trusova V. Europium coordination complexes as potential anticancer drugs: their partitioning and permeation into lipid bilayers as revealed by pyrene fluorescence quenching / V. Trusova, A. Yudintsev, L. Limanskaya et al. // *J. Fluoresc.* – 2013. – V. 23. – P. 193-202.
52. Trusova V. Structural aspects of cytochrome *c* – cardiolipin interactions: Forster resonance energy transfer study / V. Trusova, J. Molotkovsky, P. Kinnunen et al. // *Cytochromes b and c: Biochemical properties, biological functions and electrochemical analysis.* – Nova Science Publishers. – 2014. – P. 173-223.
53. Trusova V. Interaction of europium chelates with lipid monolayers / V. Trusova, A. Yudintsev, O. Kutsenko et al. // *East Eur. J. Phys.* – 2014. – V. 1. – P. 100-105.

54. Trusova V. Membrane effects of N-terminal fragment of apolipoprotein A-I: a fluorescent probe study / V. Trusova, G. Gorbenko, M. Girych et al. // J. Fluoresc. – 2015. – V. 25. – P. 253-261.
55. Gorbenko G. Interactions of lipid membranes with fibrillar protein aggregates / G. Gorbenko, V. Trusova, M. Girych et al. // Springer Subcellular Biochemistry Series: Lipids in Protein Misfolding. – 2015. – V. 855. – P. 135-155.
56. Trusova V. Modeling of amyloid fibril binding to the lipid bilayer / V. Trusova // East Eur. J. Phys. – 2015. – V. 2. – P. 51-58.
57. Gorbenko G. FRET evidence for untwisting of amyloid fibrils on the surface of model membranes / G. Gorbenko, V. Trusova, M. Girych et al. // Soft Matter. – 2015. – V. 11. – P. 6223-6234.
58. Trusova V. Protein fibrillar nanopolymers: molecular-level insights into their structural, physical and mechanical properties / V. Trusova // Biophys. Rev. Lett. – 2015. – V. 10. – P. 135-156.
59. Пат. 80912 Україна. МПК G01N 21/64 (2006.01). Спосіб детектування вільних радикалів / В.М. Трусова, Г. Горбенко, О. Куценко та ін.; заявн. і патентовласник Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – № u201300475; заяв. 14.01.2013; опубл. 10.06.2013, Бюл. № 11 / 2013.
60. Пат. 58045 Україна. МПК G01N 21/64 (2011.01). Спосіб детектування та характеризувannya амілоїдних фібрил / Г. Горбенко, В. Трусова, О. Кирилова та ін.; заявн. і патентовласник Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – № u201011220; заяв. 20.09.2010; опубл. 25.03.2011, Бюл. № 6 / 2011.
61. Трусова В.М. Флуоресцентное исследование лизоцим-липидного комплексообразования // Тезисы докладов Школы-семинара “Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения”. – 17-20 сентября 2008 г. – Харьков. – 2008. – С. 37.
62. Trusova V.M. Chlorpromazine effect on lysozyme-lipid interactions // Тези доп. III Міжнародної конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери». – 18-21 листопада 2008 р. – Харків. – 2008. – С. 82-83.

63. Trusova V.M., Gorbenko G.P., Deligeorgiev T., Vasilev A., Gadjev N., Novel donor-acceptor pair for energy transfer studies // *Materialy IV Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji “Naukowy potencjał świata - 2008”*. – September 12-20, 2008. – Przemyśl. – 2008. – P. 75-77.
64. Trusova V.M., Gorbenko G.P., Kutsenko O.K., Deligeorgiev T., Gagjev N., Vasilev A., Squaraine dyes as perspective visualizing components of lipid-based drug delivery nanosystems // *Proc. International Conference “Nanobiophysics: fundamental and applied aspects NBP-2009”*. – October 5-8, 2009. – Kharkov. – 2009. – P. 54.
65. Trusova V.M. Gorbenko G.P. Protein adsorption onto charged lipid bilayers: modeling adsorbate aggregation behavior // *Матеріали I Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології»*. – 23-26 лютого 2009 р. – Донецьк. – 2009. – С. 190-191.
66. Trusova V.M., Gorbenko G.P., Deligeorgiev T., Vasilev A., Gadjev N. Europium-loaded liposomes as a novel form of antineoplastic drugs // *Матеріали IX Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих учених в Україні»*. – 28-29 жовтня 2009 р. – Київ. – 2009. – С. 80.
67. Trusova V.M., Gorbenko G.P., Deligeorgiev T., Gadjev N., Vasilev A. A novel squaraine-based marker of lipid peroxidation // *Abstracts of 11th Conference on Methods and Applications of Fluorescence*. – September 6-9, 2009. – Budapest. – 2009. – P. 78.
68. Trusova V.M. An intriguing ability of cytochrome *c* to promote extended cardiolipin conformation // *Proc. V International Young Scientists' Conference “Biology: from a molecule up to the biosphere”*. – November 22-25, 2010. – Kharkov. – 2010. – P. 28-29.
69. Gorbenko G.P., Trusova V.M., Kirilova E.M., Kirilov G.K., Kalnina I. Fluorimetric determination of lysozyme amyloid fibrils with a new benzanthrone dye // *Сборник статей Международной научной конференции “Молекулярные, мембранные и*

клеточные основы функционирования биосистем”. – 23-25 июня 2010 г. – Минск. – 2010. – С. 283-285.

70. Трусова В.М. О возможности создания нанопереносчиков лекарств на основе белок-структурированных липидных мультислоев // Тезисы II Международной научной конференции «Наноструктурные материалы – 2010: Беларусь – Россия – Украина». – 19-22 октября, 2010. – Киев. – С. 688.

71. Trusova V.M. Protein effect on biophysical characteristics of liposomes // Materials of VII International Science-Technical Conference “Modern trends in biological physics and chemistry BPPC – 2011”. – April 26-30, 2011. – Sevastopol. – 2011. – P. 146-147.

72. Трусова В.М. Конформаційні зміни лізоциму при утворенні білок-ліпідних комплексів // Тези доповідей V з’їзду Українського біофізичного товариства. – 22-25 червня 2011 р. – Луцьк. – 2011. – С. 127.

73. Trusova V.M., Kalnina I., Fedorov P., Kirilova E., Kirilov G., Gorbenko G.P. Aminobenzanthrone derivatives as novel fluorescent probes for membrane studies // Abstracts of 12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence. – September 11-14, 2011. – Strasbourg. – 2011. – P. 197.

74. Trusova V.M. Membranotropic activity of lysozyme prefibrillar aggregates // Матеріали X Міжнародної конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна – 2012: біологічні науки». – 19-23 березня 2012 р. – Київ. – 2012. – С. 25-26.

75. Трусова В.М. Агрегация лизоцима в липидном окружении // Тезисы докл. Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии». – 30 июля – 3 августа 2012 г. – Пущино (Россия). – 2012. – С. 33-34.

76. Trusova V.M. Lipid bilayer-modifying effects of aggregated lysozyme // Материалы докладов IV съезда биофизиков России. – 20-26 августа 2012 г. – Нижний Новгород. – 2012. – С. 335.

77. Trusova V.M. Fluorescence approaches to detection of protein aggregates // Proc. International Conference “Development and application of new fluorescent materials and methods”. – September 12, 2012. – Daugavpils (Latvia). – 2012. – P. 31.

78. Trusova V., Gorbenko G., Molotkovsky J., Kinnunen P. Fluorescence Study of Cytochrome *c* binding to model membranes // Proc. International Conference “Development and application of new fluorescent materials and methods”. – September 12, 2012. – Daugavpils (Latvia). – 2012. – P. 32.
79. Gorbenko G., Trusova V., Adachi E., Mizuguchi C., Saito H. Resonance energy transfer study of lipid bilayer interactions of apolipoprotein A-I variants // Proc. International Conference “Development and application of new fluorescent materials and methods”. – September 12, 2012. – Daugavpils (Latvia). – 2012. – P. 24.
80. Trusova V.M., Simulation-based analysis of protein adsorption onto nanoscale lipid monolayer // Proc. International Conference “Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects”. – October 7-10, 2013. – Kharkov. – 2013. – P. 103.
81. Trusova V.M., Gorbenko G., Deligeorgiev T., Kinnunen P. Adsorption of europium chelates onto lipid monolayers // Proc. International Research and Practice Conference “Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2013). – 2013. – August 25 – September 1, 2013. – Bukovel. – P. 324.
82. Trusova V.M., Gorbenko G.P., Molotkovsky J.G. Cytochrome *c* – lipid interactions: resonance energy transfer study // Тезисы докладов Международной конференции молодых ученых “Экспериментальная и теоретическая биофизика-13”. – 2013. – 2-23 октября 2013. – Пущино, Россия. – С. 99.
83. Trusova V.M., Gorbenko G.P., Molotkovsky J.G., Kinnunen P.K. Fluorescence study of competitive protein-lipid interactions // Abstracts of 13th Conference on Methods and Applications of Fluorescence. – September 8-11, 2013. – Genoa, Italy. – 2013. – P. 242.
84. Trusova V. Lipid-assisted protein fibrillization: insights from fluorescence spectroscopy // Abstracts of 4<sup>th</sup> International Scientific and Technical Conference for Young Scientists “Luminescent processes in condensed state of matter”. – 2015. – October 7-9, 2015. – Kharkiv. – P. 21.
85. Trusova V., Gorbenko G., Girysh M., Adachi M., Mizuguchi C., Saito H. Lipid bilayer interactions of apolipoprotein A-I variants // Abstracts of 14th Conference on

Methods and Applications of Fluorescence. – September 13-16, 2015. – Wurzburg, Germany. –2015. – P. 239.

86. Lee A. Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective / A. Lee // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – V. 1612. – P. 1-40.

87. Palsdottir H. Lipids in membrane protein structures / H. Palsdottir, C. Hunte // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1666. – P. 2-18.

88. Dowhan W. Diversity and versatility of lipid–protein interactions revealed by molecular genetic approaches / W. Dowhan, E. Mileykovskaya, M. Bogdanov // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1666. – P. 19-39.

89. Jensen M. Lipids do influence protein function - the hydrophobic matching hypothesis revisited / M.O. Jensen, O.G. Mouritsen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1666. – P. 205-226.

90. Han X. pH-dependent self-association of influenza hemagglutinin fusion peptides in lipid bilayers / X.Han, L.K.Tamm // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V. 304. – P. 953-965.

91. Fernandes F. Dependence of M13 major coat protein oligomerization and lateral segregation on bilayer composition / F. Fernandes, L.M.S. Loura, M. Prieto et al. // *Biophys. J.* – 2003. – V. 85. – P. 2430-2441.

92. Serpell L. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly / L. Serpell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – V. 1502. – P. 16-30.

93. Khurana R. A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy / R. Khurana, C. Ionescu-Zanetti, M. Pope et al. // *Biophys. J.* – 2003. – V. 85. – 1135-1144.

94. Thirumalai D. Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation / D. Thirumalai, D.K. Klimov, R.I. Dima // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2003. – V. 13. – P. 1-14.

95. Stefani M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world / M. Stefani // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1739. – P. 5-25.

96. Lindstrom F. Association of amyloid-  $\beta$  peptide with membrane surfaces monitored by solid state NMR / F. Lindström, M. Bokvist, T. Sparrman et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2002. – V. 4. – P. 5524-5530.
97. Zhu M. The association of  $\alpha$ -synuclein with membranes affects bilayer structure, stability and fibril formation / M. Zhu, J. Li, A.L. Fink // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 40186-40197.
98. Jo E. Synuclein membrane interactions and lipid specificity / E. Jo, J. McLaurin, C.M. Yip et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 34328-34334.
99. Choo-Smith L. Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of A $\beta$ -(1-40) peptide to ganglioside-containing model membranes / L.P. Choo-Smith, W. Garson-Rodrigues, C.G. Glabe et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 22987-22990.
100. Necula M. Rapid anionic micelle-mediated  $\alpha$ -synuclein fibrillization in vitro / M. Necula, C.N. Chirita, J. Kuret // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 46674-46680.
101. Lin H. Amyloid  $\beta$  protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology / H. Lin, R. Bhatia, R. Lal // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – P. 2433-2444.
102. Yip C. Cholesterol, a modulator of membrane-associated A $\beta$ -fibrillogenesis and neurotoxicity / C.M. Yip, E.A. Elton, A.A. Darabie et al. // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V. 311. – P. 723-734.
103. Dobson C. Experimental investigation of protein folding and misfolding / C. Dobson // *Methods.* – 2004. – V. 34. – P. 4-14.
104. Chauhan A. Interaction of amyloid beta-protein with anionic phospholipids: possible involvement of Lys<sup>28</sup> and C-terminus aliphatic amino acids / A. Chauhan, I. Ray, V.P.S. Chauhan // *Neurochem. Res.* – 2000. – V. 25. – P. 423-429.
105. Onuchic J. The theory of protein folding / J. Onuchic, P. Wolynes // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2004. – V. 14. – P. 70-75.
106. Plotkin S. Investigation of routes and funnels in protein folding by free energy functional methods / S. Plotkin, J. Onuchic // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – P. 6509-6514.



107. Dill K. Polymer principles and protein folding / K. Dill // *Prot. Sci.* – 1999. – V. 8. – P. 1166-1180.
108. Straub J. Towards a molecular theory of early and late events in monomer to amyloid fibril formation / J.E. Straub, D. Thirumalai // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2011. – V. 62. – P. 437-463.
109. Morris K. X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils / K. Morris, L. Serpell // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – V. 849. – P. 121-135.
110. Sepkhanova I. Monitoring Alzheimer amyloid peptide aggregation by EPR / I. Sepkhanova, M. Drescher, N. Meeuwenoord et al. // *Appl. Magn. Reson.* – 2009. – V. 36. – P. 209-222.
111. Gras S. Transmission electron microscopy of amyloid fibrils / S. Gras, L. Waddington, K. Goldie // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – V. 752. – P. 197-214.

112. Jimenez J. Structural diversity of *ex vivo* amyloid fibrils studied by cryo-electron microscopy / J. Jimenez, G. Tennent, M. Pepys et al. // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 311. – P. 241-247.
113. Sawaya M. Atomic structure of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers / M.R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson et al. // Nature. – 2007. – V. 447. – P. 453-457.
114. Vitagliano L. Dynamics and stability of amyloid-like steric zipper assemblies with hydrophobic dry interfaces / L. Vitagliano, F. Stanzione, A. De Simone et al. // Biopolymers. – 2009. – V. 91. – P. 1161-1171.
115. Rellini A. Ultrastructural organization of *ex vivo* amyloid fibrils formed by the apolipoproteinA-I Leu174Ser variant: an atomic force microscopy study / A. Rellini, R. Rolandi, M. Bolognesi // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – 1690. – P. 33-41.
116. Dzwolak W. Chirality and chiroptical properties of amyloid fibers / W. Dzwolak // Chirality. – 2014. – V. 26. – P. 580-587.
117. Volpatti L. A clear view of polymorphism, twist, and chirality in amyloid fibril formation / L.R. Volpatti, M. Vendruscolo, C.M. Dobson et al. // Nano. – 2013. – V. 7. – P. 10443-10448.
118. Dzwolak W. Chiral bias of amyloid fibrils revealed by the twisted conformation of Thioflavin T: an induced circular dichroism/DFT study / W. Dzwolak, M. Pecul // FEBS Lett. – 2005. – V. 579. – P. 6601-6603.
119. Aggeli A. Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide  $\beta$ -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers / A. Aggeli, I. Nyrkova, M. Bell et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. – P. 11857-11862.
120. Adamcik J. Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images / J. Adamcik, J. Jung, J. Flakowski // Nat. Nanotechnol. – 2010. – V. 5. – P. 423-428.

121. Shamovsky I. Theoretical studies on the origin of  $\beta$ -sheet twisting / I. Shamovsky, G. Ross, R. Riopelle // J. Phys. Chem. B. – 2000. – V. 104. – P. 11296-11307.
122. van Gestel J. The formation of fibrils by intertwining of filaments: model and application to amyloid A $\beta$ -protein / J. van Gestel, S. de Leeuw // Biophys. J. – 2007. – V. 92. – P. 1157-1163.
123. Adamcik J. Adjustable twisting periodic pitch of amyloid fibrils / J. Adamcik, R. Mezzenga // Soft Matter. – 2011. – V. 7. – P. 5437-5443.
124. Assenga S. Universal behavior in the mesoscale properties of amyloid fibrils / S. Assenza, J. Adamcik, R. Mezzenga et al. // Phys. Rev. Lett. – 2014. – V. 113. – P. 268103.
125. Gilliam J. Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth / J. Gilliam, C. MacPhee // J. Phys. Condens. Matt. – 2013. – V. 25. – P. 373101-373120.
126. Jarret J. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? / J. Jarrett, P. Lansbury // Cell. – 1993. – V. 73. – P. 1055-1058.
127. Lomakin A. Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid  $\beta$ -protein / A. Lomakin, D. Teplow, D. Kirschner et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – P. 7942-7947.
128. van Gestel J. A statistical-mechanical theory of fibril formation in dilute protein solutions / J. van Gestel, S. de Leeuw // Biophys. J. – 2006. – V. 90. – P. 3134-3145.
129. Li M. Probing the mechanisms of fibril formation using lattice models / M. Li, D. Klimov, J. Straub // J. Chem. Phys. – 2008. – V. 129. – P. 175101-175110.
130. Oosawa F. G-F transformation of actin as a fibrous condensation / F. Oosawa, S. Asakura, K. Hotta // J. Polymer Sci. – 1959. – V. 37. – P. 323-336.
131. Griffith J. Self-replication and scrapie / J. Griffith // Nature. – 1967. – V. 215. – P. 1043-1044.

132. Ferrone F. Kinetic studies on photolysis-induced gelation of sickle cell hemoglobin suggest a new mechanism / F. Ferrone, J. Hofrichter, F.A. Ferrone et al. // *Biophys. J.* – 1980. – V. 32. – P. 361-377.
133. Prusiner S. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie / S. Prusiner // *Science*. – 1982. – V. 216. – P. 136-144.
134. Prusiner S. Molecular biology of prion diseases / S. Prusiner // *Science*. – 1991. – V. 252. – P. 1515-1522.
135. Lomakin A. On the nucleation and growth of amyloid  $\beta$ -protein fibrils: detection of nuclei and quantification of rate constants / A. Lomakin, D. Chung, G. Benedek et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1996. – V. 93. – P. 1125-1129.
136. Serio T. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant / T. Serio, A. Cashikar, A. Kowal et al. // *Science*. – 2000. – V. 289. – P. 1317-1321.
137. Pallito M. A mathematical model of the kinetics of beta-amyloid fibril growth from the denaturated state / M. Pallito, R. Murphy // *Biophys. J.* – 2001. – V. 81. – P. 1805-1822.
138. Chiti F. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates / F. Chiti, M. Stefani, N. Taddei // *Nature*. – 2003. – V. 424. – P. 805-808.
139. Schmit J. What drives amyloid molecules to assemble into oligomers and fibrils? / J. Schmit, K. Ghosh, K. Dill // *Biophys. J.* – 2011. – V. 100. – P. 450-458.
140. Knowles T. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials / T. Knowles, M. Buehler // *Nat. Nanotechnol.* – 2011. – V. 6. – P. 469-479.
141. Yoon G. Relationship between disease-specific structures of amyloid fibrils and their mechanical properties / G. Yoon, Y. Kim, K. Eom // *Appl. Phys. Lett.* – 2013. – V. 102. – P. 011914-011918.

142. Ganchev D. Nanomechanical properties of human prion protein amyloid as probed by force spectroscopy / D. Ganchev, N. Cobb, K. Surewicz et al. // *Biophys. J.* – 2008. – V. 95. – P. 2909-2915.
143. Keten S. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of  $\beta$ -sheet crystals in silk / S. Keten, Z. Xu, B. Ihle et al. // *Nat. Mater.* – 2010. – V. 9. – P. 359-367.
144. Witte T. Time-resolved structure analysis of growing  $\beta$ -amyloid fibers / T. Witte, L. Haller, E. Luttmann et al. // *J. Struct. Biol.* – 2007. – V. 159. – P. 71-81.
145. Usov I. Correlation between nanomechanics and polymorphic conformations in amyloid fibrils / I. Usov, R. Mezzenga // *ACS Nano.* – 2014. – V. 8. – P. 11035-11041.
146. Fukuma T. Explanation for the mechanical strength of amyloid fibrils / T. Fukuma, A. Mostaert, S. Jarvis // *Tribology Lett.* – 2006. – V. 22. – P. 233-237.
147. Smith J. Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils / J. Smith, T. Knowles, C. Dobson et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – P. 15806-15811.
148. Choi B. Mechanical deformation mechanisms and properties of amyloid fibrils / B. Choi, G. Yoon, S. Lee et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2015. – V. 17. – P. 1379-1389.
149. Knowles T. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils / T. Knowles, A. Fitzpatrick, S. Meehan et al. // *Science.* – 2007. – V. 318. – P. 1900-1903.
150. Karsai A. Mechanical manipulation of Alzheimer's amyloid beta 1-42 fibrils / A. Karsai, Z. Martonfalvi, A. Nagy et al. // *J. Struct. Biol.* – 2006. – V. 155. – P. 316-326.
151. Kellermayer M. Reversible mechanical unzipping of amyloid  $\beta$ -fibrils / M. Kellermayer, L. Grama, A. Karsai et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 8464-8470.

152. Bhak G. Amyloid hydrogel derived from curly protein fibrils of alpha-synuclein / G. Bhak, S. Lee, J. Park et al. // *Biomaterials*. – 2010. – V. 31. – P. 5986-5995.
153. Jung J. Liquid crystalline phase behavior of protein fibers in water: experiments versus theory / J. Jung, R. Mezzenga // *Langmuir*. – 2010. – V. 26. – P. 504-514.
154. Onsager L. The effect of shape on the interaction of colloidal particles / L. Onsager // *Annu. N. Y. Acad. Sci.* – 1949. – V. 51. – P. 627-659.
155. Bolisetty S. Gelation, phase behavior, and dynamics of  $\beta$ -lactoglobulin amyloid fibrils at varying concentrations and ionic strengths / S. Bolisetty, L. Harnau, J. Jung et al. // *Biomacromolecules*. – 2012. – V. 13. – P. 3241-3252.
156. Li C. Isotropic-nematic phase transition in amyloid fibrillization / C. Li // *Phys. Rev. E*. – 2009. – V. 80. – P. 031902-031907.
157. Dill K. Dominant forces in protein folding / K. Dill // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – P. 7133-7155.
158. Hebda J. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes / J. Hebda, A. Miranker // *Annu. Rev. Biophys.* – 2009. – V. 38. – P. 125-152.
159. Cevc G. Membrane electrostatics / G. Cevc // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1990. – V. 1031. – P. 311-382.
160. Zhdanov V. Protein adsorption and desorption on lipid bilayers / V. Zhdanov, B. Kasemo // *Biophys. Chem.* – 2010. – V. 146. – P. 60-64.
161. Aisenbrey C. How is protein aggregation in amyloidogenic diseases modulated by biological membranes? / C. Aisenbrey, T. Borowik, R. Bystrom et al. // *Eur. Biophys. J.* – 2008. – V. 37. – P. 247-255.
162. Munishkina L. The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation / L. Munishkina, E. Cooper, V. Uversky et al. // *J. Mol. Recognit.* – 2004. – V. 17. – P. 1-9.

163. Mulgrew-Nesbitt A. The role of electrostatics in protein-membrane interactions / A. Mulgrew-Nesbitt, K. Diraviyam, J. Wang et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1761. – P. 812-826.
164. Gorbenko G. Binding of lysozyme to phospholipid bilayers: evidence for protein aggregation upon membrane association / G. Gorbenko, V. Ioffe, P. Kinnunen // *Biophys. J.* – 2007. – V. 93. – P. 140-153.
165. Muga A. Membrane binding induces destabilization of cytochrome c structure / A. Muga, H. Mantsch, W. Surewicz // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30. – P. 7219-7224.
166. Shin I. Membrane-promoted unfolding of acetylcholinesterase: a possible mechanism for insertion into the lipid bilayer / I. Shin, D. Kreimer, I. Silman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1997. – V. 94. – P. 2848-2852.
167. Butko P. Interaction of the  $\delta$ -endotoxin cytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with lipid membranes / P. Butko, F. Huang, M. Pusztai-Carey et al. // *Biochemistry.* – 1997. – V. 36. – P. 12862-12868.
168. Tatulian S. Structural changes in a secretory phospholipase A2 induced by membrane binding: a clue to interfacial activation? / S. Tatulian, R. Hiltonen, L. Tamm // *J. Mol. Biol.* – 1997. – V. 268. – P. 809-815.
169. Morillas M. Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein / M. Morillas, W. Swietnicki, P. Gambetti et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 36859-36865.
170. Kaye R. Conformational transitions of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro / R. Kaye, J. Bernhagen, N. Greenfield et al. // *J. Mol. Biol.* – 1999. – V. 287. – P. 781-795.
171. Pavlov N. Amyloid fibrils from the mammalian protein prothymosin / N. Pavlov, D. Cherny, G. Heim // *FEBS Lett.* – 2002. – V. 517. – P. 37-40.
172. Koppaka V. Accelerated accumulation of amyloid  $\beta$  proteins on oxidatively damaged lipid membranes / V. Koppaka, P. Axelsen // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – P. 10011-10016.

173. Knight J. Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide / J. Knight, J. Hebda, A. Miranker // *Biochemistry*. – 2006. – V. 45. – P. 9496-9508.
174. Terzi E. Self-association of beta-amyloid peptide (1-40) in solution and binding to lipid membranes / E. Terzi, G. Holzemann, J. Seelig // *J. Mol. Biol.* – 1995. – V. 252. – P. 633-642.
175. van Klompenburg W. Amyloid phospholipids are determinants of membrane protein topology / W. van Klompenburg, I. Nilsson, G. Heijne et al. // *EMBO J.* – 1997. – V. 16. – P. 4261-4266.
176. Gorbenko G. Structure of cytochrome c complexes with phospholipids as revealed by resonance energy transfer / G. Gorbenko // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1420. – P. 1-13.
177. Alakoskela J. Characteristics of fibers formed by cytochrome c and induced by anionic phospholipids / J. Alakoskela, A. Jutila, A. Simonsen et al. // *Biochemistry*. – 2006. – V. 45. – P. 13447-13453.
178. Aisenbrey C. Disordered proteins: biological membranes as two-dimensional aggregation matrices / C. Aisenbrey, T. Borowik, M. Bokvist et al. // *Cell Biochem. Biophys.* – 2008. – V. 52. – P. 175-189.
180. Bogdanov M. Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes: implications for lipid-linked disorders / M. Bogdanov, E. Mileykovskaya, W. Dowhan // *Subcell. Biochem.* – 2008. – V. 49. – P. 197-239.
181. Seelig J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions / J. Seelig // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1666. – P. 40-50.
182. Kamp F. Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles / F. Kamp, K. Beyer // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 9251-9259.
183. Wimley W. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces / W. Wimley, S. White // *Nat. Struct. Biol.* – 1996. – V. 3. – P. 842-848.



184. Khare S. Molecular mechanisms of polypeptide aggregation in human diseases / S. Khare, N. Dokholyan // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2007. – V. 8. – P. 573-579.
185. Giacomelli G. Conformational changes of the amyloid beta-peptide (1-40) adsorbed on solid surfaces / *Macromol. Biosci.* – 2005. – V. 5. – P. 401-407.
186. Adams S. Surface-mediated folding and misfolding of proteins at lipid/water interfaces / S. Adams, A. Higgins, R. Jones // *Langmuir*. – 2002. – V. 18. – P. 4854-4861.
187. Meyer F. Molecular simulations of lipid-mediated protein-protein interactions / F. Meyer, M. Venturoli, B. Smit // *Biophys. J.* – 2008. – V. 95. – P. 1851-1865.
188. Lee A. How lipids affect the activities of integral membrane proteins / A. Lee // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1666. – P. 62-87.
189. Ding F. Molecular dynamic simulation of the SH3 domain aggregation suggests a generic amyloidogenesis mechanism / F. Ding, N. Dokholyan, S. Buldyrev et al. // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 324. – P. 851-857.
190. Dima R. Exploring the propensities of helices in PrP<sup>c</sup> to form  $\beta$ -sheet using NMR structures and sequence alignments / R. Dima, D. Thirumalai // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – P. 1268-1280.
191. Fernandez A. Proteins with H-bond packing defects are highly interactive with lipid bilayers: implications for amyloidogenesis / A. Fernandez, R. Berry // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – P. 2475-2481.
192. Fernandez A. Dehydron: a structurally encoded signal for protein interaction / A. Fernandez, R. Scott // *Biophys. J.* – 2003. – V. 85. – P. 1914-1928.
193. Gras S. Functionalised amyloid fibrils for roles in cell adhesion / S. Gras, A. Tickler, A. Squires et al. // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29. – P. 1553-1162.
194. Scheibel T. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition / T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – P. 4527-4532.

195. Herland B. Electroactive luminescent self-assembled bio-organic nanowires: integration of semiconducting oligoelectrolytes within amyloidogenic proteins / B. Herland, P. Bjork, K. Nilsson et al. // *Adv. Materials.* – 2005. – V. 17. – P. 1466-1471.
196. Tanaka H. Enhanced current efficiency from bio-organic light-emitting diodes using decorated amyloid fibrils with conjugated polymer / H. Tanaka, A. Herland, L. Lindgren et al. // *Nano Lett.* – 2008. – V. 8. – P. 2858-2861.
197. Knowles T. Nanostructured films from hierarchical self-assembly of amyloidogenic proteins/ T. Knowles, T. Oppenheim, A. Buell et al. // *Nat. Nanotechnol.* – 2010. – V. 5. – P. 204-207.
198. Ahn M. Nanoporous protein matrix made of amyloid fibrils of beta2-microglobulin / M. Ahn, S. Kang, H. Koo et al. // *Biotechnol. Prog.* – 2010. – V. 26. – P. 1759-1764.
199. Maji S. Amyloid as a depot for the formulation of long-acting drugs / S. Maji, D. Schubert, C. Rivier et al. // *PLOS Biology.* – 2008. – V. 6. – P. e17.
200. Holmes T. Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering / T. Holmes // *Trends Biotechnol.* – 2002. – V. 20. – P. 16-21.
201. Kisiday J. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair / J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 9996-10001.
203. Zhang S. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures / S. Zhang, F. Gelain, X. Zhao // *Semin. Cancer Biol.* – 2005. – V. 14. – P. 413-420.
204. Genove E. The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function / E. Genove, C. Shen, S. Zhang et al. // *Biomaterials.* – 2005. – V. 26. – P. 3341-3351.

205. Horii A. Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration / A. Horii, X. Wang, F. Gelain et al. // PLoS One. – 2007. – V. 2. – P. e190.
206. Davis M. Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells / M. Davis, J. Motion, D. Narmoneva et al. // Circulation. – 2005. – V. 111. – P. 442-450.
207. Maji S. Amyloid: a natural nanomaterial / S. Maji // Int. J. Nanosci. – 2011. – V. 4. – P. 909-917.
208. Yim E. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage / E. Yim, S. Pang, K. Leong // Exp. Cell Res. – 2007. – V. 313. – P. 1820-1829.
209. Langer R. Drug delivery. Drugs on target / R. Langer // Science. – 2001. – V. 293. – P. 58-59.
210. Jen A. Transforming growth factor  $\beta$ -3 crystals as reservoirs for slow release of active TGF- $\beta$ 3 / A. Jen, K. Madorin, K. Vosbeck et al. // J. Control Release. – 2002. – V. 78. – P. 25-34.
211. Nagai Y. Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold / Y. Nagai, L. Unsworth, S. Koutsopoulos et al. // J. Control Release. – 2006. – V. 115. – P. 18-25.
212. Caches M. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes / M. Caches, E. Gazit // Science. – 2003. – V. 300. – P. 625-627.
213. Gazit E. Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires / E. Gazit // FEBS J. – 2007. – V. 274. – P. 317-322.
214. Yemini M. Peptide nanotube-modified electrodes for enzyme-biosensor applications / M. Yemini, M. Reches, E. Gazit et al. // Anal Chem. – 2005. – V. 77. – P. 5155-5159.
215. Hamedi M. Electrochemical devices made from conducting nanowire networks self-assembled from amyloid fibrils and alkoxysulfonate PEDOT / M. Hamedi, A. Herland, R. Karlsson et al. // Nano Lett. – 2008. – V. 8. – P. 1736-1740.

216. Raynes J. Immobilization of organophosphate hydrolase on an amyloid fibril nanoscaffold: Towards bioremediation and chemical detoxification / J. Raynes, F. Pearce, S. Meade et al. // *Biotechnol. Prog.* – 2010. – V. 27. – P. 360-367.
217. Boldyrev I. New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes / I. Boldyrev, X. Zhai, M. Momsen et al. // *J. Lipid Res.* – 2007. – V. 48. – P. 1518-1532.
218. Bergelson L. Lipid-specific fluorescent probes in studies of biological membranes / L. Bergelson, J. Molotkovsky, Y. Manevich // *Chem. Phys. Lipids.* – 1985. – V. 37. – P. 165-195.
219. Kirilova E. Preparation and properties of benzanthrone derivatives with heterocyclic fragments / E. Kirilova, I. Meirovics, S. Belyakov // *Chem. Heterocycl. Comp.* – 2002. – V. 7. – P. 896-899.
220. Ioffe V. Fluorescence study of protein-lipid complexes with a new symmetric squarylium probe / V. Ioffe, G. Gorbenko, T. Deligeorgiev, N. Gadjev et al. // *Biophys. Chem.* – 2007. – V. 128. – P. 75-86.
221. Adachi E. Dual role of an N-terminal amyloidogenic mutation in apolipoprotein A-I: destabilization of helix bundle and enhancement of fibril formation / E. Adachi, H. Nakajima, C. Mizuguchi et al. // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – P. 2848-2856.
222. Richter R. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study / R. Richter, A. Mukhopadhyay, A. Brisson // *Biophys. J.* – 2003. – V. 85. – P. 3035-3047.
223. Mui B. Extrusion technique to generate liposomes of defined size / B. Mui, L. Chow, M. Hope // *Meth. Enzymol.* – 2003. – V. 367. – P. 3-14.
224. Bartlett G. Phosphorus assay in column chromatography / G. Bartlett // *J. Biol. Chem.* – 1959. – V. 234. – P. 466-468.
225. Holley M. Characterization of amyloidogenesis of hen egg lysozyme in concentrated ethanol solution / M. Holley, C. Eginton, D. Schaefer et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V. 373. – P. 165-168.
226. Groenning M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils – current status / M. Groenning // *J. Chem. Biol.* – 2010. – V. 3. – P. 1-18.

227. Fung B. Surface density determination in membranes by fluorescence energy transfer, B. Fung, L. Stryer // *Biochemistry*. – 1978. – V. 17. – P. 5241-5248.
228. Lee N. Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation / N. Lee, A. Kapanidis, Y. Wand et al. // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88. – P. 2939-2953.
229. Santos N. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods / N. Santos, M. Prieto, M. Castanho // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – V. 1612. – P. 123-135.
230. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. – М.: Наука, 1981. – 296 с.
231. Krasnowska E. Prodan as a membrane surface fluorescence probe: partitioning between water and phospholipid phases / E. Krasnowska, E. Gratton, T. Parasassi // *Biophys. J.* – 1998. – V. 74. – P. 1984-1993.
232. Lakowicz J.R. Principles of fluorescent spectroscopy. – Plenum Press: New York, 1999. – 954 p.
233. Dale R. The orientational freedom of molecular probes / R. Dale, J. Eisinger, W. Blumberg // *Biophys. J.* – 1979. – V. 26. – P. 161-194.
234. Spoel D. Gromacs: fast, flexible and free / D. Spoel, E. Lindahl, B. Hess et al. // *J. Comp. Chem.* – 2005. – V. 26. – P. 1701-1718.
235. Huang J. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data / J. Huang, A. MacKerell // *J. Comput. Chem.* – 2013. – V. 34. – P. 2135-2145.
236. Котельников Р.Б. Анализ результатов наблюдений – М.: Энергоатомиздат, 1986. – 143 с.
237. Benjwal S. Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments / S. Benjwal, S. Verma, K. Röhm, O. Gursky // *Protein Sci.* – 2006. – V. 15. – P. 635-639.
238. McAllister C. Protein interactions and misfolding analyzed by AFM force spectroscopy / C. McAllister, M. Karymov, Y. Kawano et al. // *J. Mol. Biol.* – 2005. – V. 354. – P. 1028-1042.

239. Wang S. Amyloid fibrillation of hen egg-white lysozyme is inhibited by TCEP / S. Wang, K. Liu, Y. Lu // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V. 381. – P. 639-642.
240. Kirilova E. Spectroscopic study of benzanthrone 3-N-derivatives as new hydrophobic fluorescent probes for biomolecules / E. Kirilova, I. Kalnina, G. Kirilov et al. // *J. Fluoresc.* – 2008. – V. 18. – P. 645-648.
241. Kalnina I. Immune state of patients with different pathologies monitored by fluorescent probe 3-aminobenzanthrone derivative / I. Kalnina, R. Bruvere, T. Zvagule et al. // *Proc. Latv. Acad. Sci.* – 2006. – V. 60. – P. 113-120.
242. Kirilova E. 3-Isopropoxy-6-morpholino-2-phenylphenalen-1-one as lipophilic fluorescent probe for lymphocyte investigations / E. Kirilova, I. Kalnina // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – V. 160. – P. 1744-1751.
243. Kirilova E. Preparation and properties of benzanthrone derivatives with heterocyclic fragments // E. Kirilova, I. Meirovics, S. Belyakov // *Chem. Heterocycl. Comp.* – 2002. – V. 7. – P. 896-899.
244. Chattopadhyay A. Red edge excitation shift of deeply embedded membrane probe / A. Chattopadhyay, S. Mukherjee // *J. Phys. Chem. B.* – 1999. – V. 103. – P. 8180-8185.
245. Drake J. Chemical and biological microstructures as probed by dynamical processes / J. Drake, J. Klafter, P. Levitz // *Science.* – 1991. – V. 251. – P. 1574-1579.
246. Gekko K. Compressibility of globular proteins in water at 25 degree / K. Gekko, H. Noguchi // *J. Phys. Chem.* – 1979. – V. 83. – P. 2706-2714.
247. Lee Y. A comprehensive model for packing and hydration for amyloid fibrils of  $\beta$ 2-microglobulin / Y. Lee, E. Chatani, K. Sasahara et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – P. 2169-2175.
248. Foguel D. Dissociation of amyloid fibrils of  $\alpha$ -synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities / D. Foguel, M. Suarez, A. Ferrao-Gonzales et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – P. 9831-9836.

249. Smirnovas V. Protein amyloidogenesis in the context of volume fluctuations: an insulin case study / Smirnovas V., Winter R., Funck T. et al. // *Chem. Phys. Chem.* – V. 2006. – V. 7. – P. 1046-1049.
250. Akasaka K. Amyloid protofibril is highly voluminous and compressible / K. Akasaka, A.R.A. Latif, A. Nakamura et al. // *Biochemistry.* – 2007. – V. 46. – P. 10444-10450.
251. Schleicher J. Determination of fractal dimensions of xerogels via Forster energy transfer / J. Schleicher, M. Hof, F. Schneider // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* – 1993. – V. 97. – P. 172-176.
252. Enright M. Mass fractal dimension and the compactness of proteins / M. Enright, D. Leitner // *Phys. Rev. E.* – 2005. – V. 71. – P. 011912.
253. Lushnikov S. Fractal properties of lysozyme / S. Lushnikov, A. Svanidze, S. Gvasaliya et al. // *Phys. Rev. E.* – 2009. – V. 79. – P. 031913.
254. Podesta A. Early events in insulin fibrillization studied by time-lapse atomic force microscopy / A. Podesta, G. Tiana, P. Milani et al. // *Biophys. J.* – 2006. – V. 90. – P. 589-597.
255. Chen S. Structure and fractal dimension of protein-detergent complexes / S. Chen, J. Teixeira // *Phys. Rev. Lett.* – 1986. – V. 57. – P. 2583.
256. Buell A. Electrostatic effects in filamentous protein aggregation / A. Buell, P. Hung, X. Salvatella et al. // *Biophys. J.* – 2013. – V. 104. – P. 1116-1126.
257. Fodera V. Electrostatics controls the formation of amyloid superstructures in protein aggregation / V. Fodera, A. Zaccone, M. Lattuada et al. // *Phys. Rev. Lett.* – 2013. – V. 111. – P. 108105.
258. Burnett L. A lysozyme concentration, pH, and time-dependent isothermal transformation diagram reveals fibrous amyloid and non-fibrous, amorphous aggregate species / L. Burnett, B. Burnett, B. Li et al. // *Open J. Biophys.* – 2004. – V. 4. – P. 39-50.
259. Hermetter A. The aggregation state of mellitin in lipid bilayers. An energy transfer study / A. Hermetter, J. Lakowicz // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261. – P. 8243-8248.

260. Li M. A fluorescence energy transfer method for analyzing protein oligomeric structure: application to phospholamban / M. Li, L. Reddy, R. Bennett et al. // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76. – P. 2587-2599.
261. Fagan M. Resonance energy transfer study of membrane-bound aggregates of the sarcoplasmic reticulum calcium ATP / M. Fagan, T. Dewey // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261. – P. 3651-3660.
262. Woehler A. Specific oligomerization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the plasma membrane / A. Woehler, J. Wlodarczyk, E. Pomimashkin // *Glycoconj. J.* – 2009. – V. 26. – P. 749-756.
263. Adair B. Helical transmembrane domains dimerize in phospholipid bilayers: a resonance energy transfer study / A. Adair, D. Engelman // *Biochemistry.* – 1994. – V. 33. – P. 5539-5544.
264. Fung J. Ligand-regulated oligomerization of  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenoceptors in a model lipid bilayer / J. Fung, X. Deup, L. Prado et al. // *EMBO J.* – 2009. – V. 28. – P. 3315-3328.
265. Lehrer S. Intramolecular pyrene excimer fluorescence: a probe of proximity and protein conformational change / S. Lehrer // *Meth. Enzymol.* – 1997. – V. 278. – P. 286-295.
266. Wolber P. An analytical solution to the Förster energy transfer problem in two dimensions / P. Wolber, B. Hudson // *Biophys. J.* – 1979. – V. 28. – P. 197-210.
267. John E. Aggregation state of melittin in lipid vesicle membranes / E. John, F. Jahnig // *Biophys. J.* – 1991. – V. 60. – P. 319-328.
268. Kapanidis A. Fluorescence-aided molecule sorting: analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules / A. Kapanidis, N. Lee, T. Laurence et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – P. 8936-8941.
269. Polverino de Laureto, P. Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: a comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis / *Protein Sci.* – 2002. – V. 11. – P. 2932-2946.
270. Oellerich S. Peripheral and integral binding of cytochrome *c* to phospholipids vesicles / S. Oellerich, S. Lecomte, M. Paternostre et al. // *J. Phys. Chem.* – 2004. V. 108. – P. 3871-3878.



271. Lagüe P. Lipid-mediated interactions between intrinsic membrane proteins: a theoretical study based on integral equations / P. Lagüe, M. Zuckermann, B. Roux // *Biophys. J.* – 2000. – V.79. – P. 2867-2879.
272. Zemel A. Membrane perturbation induced by interfacially adsorbed peptides / A. Zemel, A. Ben-Shaul, S. May // *Biophys. J.* – 2004. – V. 86. – P. 3607-3619.
273. Harroun T. Experimental evidence for hydrophobic matching and membrane-mediated interactions in lipid bilayers containing gramicidin / T. Harroun, W. Heller, T. Weiss et al. // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76. – P. 937-945.
274. Denisov G. Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: an electrostatic model and experimental results / G. Denisov, S. Wanaski, P. Luan et al. // *Biophys. J.* – 1998. – V. 74. – P. 731-744.
275. Lagüe P. Protein inclusion in lipid membranes / P. Lagüe, M. Zuckermann, B. Roux // *Faraday Discuss.* – 1998. – V. 111. – P. 165-172.
276. Ermakova E. Lysozyme dimerization: Brownian dynamics simulation / E. Ermakova // *J. Mol. Model.* – 2005. – V. 12. – P. 34-41.
277. Suckau D. Protein surface topology-probing by selective chemical modification and mass spectrometric peptide mapping / D. Suckau, M. Mak, M. Przybylski // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1992. – V. 89. – P. 5630-5634.
278. Mouritsen O. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes / O. Mouritsen, M. Bloom // *Biophys. J.* – 1984. – V. 46. – P. 141-153.
279. Reynwar B. Membrane composition-mediated protein-protein interactions / B. Reynwar, M. Deserno // *Biointerphases.* – 2009. – V. 3. – P. FA117-FA124.
280. May S. Lipid demixing and protein-protein interactions in the adsorption of charged proteins in mixed membranes / S. May, D. Harries, A. Ben-Shaul // *Biophys. J.* – 2000. – V. 79. – P. 1747-1760.
281. Simons K. Model systems, lipid rafts, and cell membranes / K. Simons, W. Vaz // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2004. – V. 33. – P. 269-295.

282. Krol S. Formation of three-dimensional protein-lipid aggregates in monolayer films induced by surfactant protein B / S. Krol, M. Ross, M. Sieber et al. // *Biophys. J.* – 2000. – V. 79. – P. 904-918.
283. von Nahmen A. The phase behavior of lipid monolayers containing pulmonary surfactant protein C studied by fluorescence light microscopy / A. von Nahmen, A. Post, H.J. Galla et al. // *Eur. Biophys. J.* – 1997. – V. 26. – P. 359-369.
284. Mbamala E. Domain formation induced by the adsorption of charged proteins on mixed lipid membranes / E.C. Mbamala, A. Ben-Shaul, S. May // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88. – P. 1702-1714.
285. Haverstick D. Influence of proteins on the reorganization of phospholipid bilayers into large domains / D. Haverstick, M. Glaser // *Biophys. J.* – 1989. – V. 55. – P. 677-682.
286. Hinderliter A. Lipid modulation of protein-induced membrane domains as a mechanism for controlling signal transduction / A. Hinderliter, R.L. Biltonen, P.F. Almeida // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – P. 7102-7110.
287. Ibrahim H. Enhanced bactericidal action of lysozyme to *Escherichia coli* by inserting a hydrophobic pentapeptide into its C-terminus / H.R. Ibrahim, M. Yamada, K. Matsushita et al. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 5053-5063.
288. Ibrahim H. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action / H.R. Ibrahim, U. Thomas, A. Pellegrini // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 43767-43774.
289. Saburova E. Calculation of protein electrostatic field upon choosing the enzymes for microencapsulation / E.A. Saburova, Yu.N. Dybovskaya, N.V. Avseenko et al. // *Proc. XII Int. Conf. "Mathematics. Computer. Education", Izhevsk.* – 2005. – V. 3. – P. 923-933.
290. Hunter H. The interactions of antimicrobial peptides derived from lysozyme with model membrane systems / H.N. Hunter, W. Jing, D.J. Schibli et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1668. – P. 175-189.

291. Yeman M. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance / Pharmacol. Rev. – 2003. – V. 55. – P. 27-55.
292. Mukherjee S. Membrane domains / S. Mukherjee // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2004. – V. 20. – P. 839-866.
293. Coutinho A. Pinched multilamellar structure of aggregates of lysozyme and phosphatidylserine-containing membranes revealed by FRET / A. Coutinho, L.M.S. Loura, A. Fedorov et al. // Biophys. J. – 2008. – V. 95. – P. 4726-4736.
294. Arispe N. Alzheimer's disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminium / N. Arispe, E. Rojas, H. Pollard // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 89. – P. 10940-10944.
295. Squier T. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging / T. Squier // Exp. Gerontol. – 2001. – V. 36. – P. 1539-1550.
296. Tabner B. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A $\beta$  and  $\alpha$ -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease / B. Tabner, S. Turnbull, O. El-Agnaf et al. // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – V. 32. – P. 1076-1083.
297. Pinheiro T. Direct evidence for the cooperative unfolding of cytochrome *c* in lipid membranes from H-<sup>2</sup>H exchange kinetics / T. Pinheiro, H. Cheng, S. Seeholzer et al. // J. Mol. Biol. – 2000. – V. 303. – P. 617-626.
298. Lee J. Phospholipases A<sub>2</sub> and neutral membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease / J. Lee, A. Simonyi, A. Sun et al. // J. Neurochem. – 2011. – V. 116. – P. 813-819.
299. London E. How bacterial protein toxins enter cells: the role of partial unfolding in membrane translocation / E. London // Mol. Microbiol. – 1992. – V. 6. – P. 3277-3282.
300. Shin I. Membrane-promoted unfolding of acetylcholinesterase: a possible mechanism for insertion into the lipid bilayer / I. Shin, D. Kreimer, I. Siltan et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – P. 2848-2852.
301. Wojtasek H. Conformational change in pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes / H. Wojtasek, W. Leal // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 30950-30956.

302. Morillas M. Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein / M. Morillas, W. Swietnicki, P. Gambetti et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 36859-36865.
303. Ioffe V. Lysozyme effect on structural state of model membranes as revealed by pyrene excimerization / V. Ioffe, G. Gorbenko // *Biohys. Chem.* – 2005. – V. 114. – P. 199-204.
304. Kinnunen P. Lipid dynamics peripheral interactions of proteins with membrane surfaces / P. Kinnunen, A. Koiv, J. Lehtonen et al. // *Chem. Phys. Lipids.* – 1994. – V. 73. – P. 181-207.
305. Nakajima A. Solvent effect on the vibrational structure of the fluorescence and absorption spectra of pyrene / A. Nakajima // *Bull. Chem. Soc. Japan.* – 1971. – V. 44. – P. 3272-3277.
306. Barenholz Y. Lateral organization of pyrene-labeled lipids in bilayers as determined from the deviation from equilibrium between pyrene monomers and excimers / Y. Barenholz, T. Cohen, E. Haas et al. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – P. 3085-3090.
307. Marrink S. Free volume properties of a simulated lipid membrane / S. Marrink, R. Sok, H. Beresden et al. // *J. Phys. Chem.* – 1996. – V. 104. – P. 9090-9099.
308. Jin B. Characterization of lipid membrane dynamics by simulation: 3. Probing molecular transport across the phospholipid bilayer / B. Jin, A. Hopfinger // *Pharmaceut. Res.* – 1996. – V. 13. – P. 1786-1794.
309. Kupianen M. Free volume properties of sphingomyelin, DMPC, DPPC, and PLPC bilayers / M. Kupianen, E. Falck, S. Ollila et al. // *J. Comput. Theor. Nanosci.* – 2005. – V. 2. – P. 401-413.
310. Potts R. Lipid biophysics of water loss through the skin / R. Potts, M. Francoeur // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V. 87. – P. 3871-3873.
311. Kremer J. Correlation of  $\beta$ -amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes / J. Kremer, M. Pallitto, D. Sklansky et al. // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – P. 10309-10318.

312. Sokolov Y. Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure / Y. Sokolov, J. Kozak, R. Kayed et al. // *J. Gen. Physiol.* – 2006. – V. 128. – P. 637-647.
313. Pottel H. Correlation between the order parameter and the steady-state fluorescence anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and an evaluation of membrane fluidity / H. Pottel, B. van der Meer, W. Herreman // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – V. 730. – P. 181-186.
314. Hutterer R. Binding and relaxation behaviour of Prodan and Patman in phospholipid vesicles: a fluorescence and  $^1\text{H}$ -NMR study / R. Hutterer, F. Schneider, H. Sprinz et al. // *Biophys. Chem.* – 1996. – V. 61. – P. 151-160.
315. Bondar O. Preferential interactions of fluorescent probe Prodan with cholesterol / O. Bondar, E. Rowe // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76. – P. 956-962.
316. Alakoskela J. Dipole potential and head-group spacing are determinants for the membrane partitioning of pregnanolone / J. Alakoskela, T. Soderlund, J. Holopainen et al. // *Mol Pharmacol.* – 2004. – V. 66. – P. 161-168.
317. Rottenberg H. Probing the interactions of alcohols with biological membranes with the fluorescent probe Prodan / H. Rottenberg // *Biochemistry.* – 1992. – V. 31. – P. 9473-9481.
318. Catalan J. Analysis of the solvent effect on the photophysics properties of 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene (PRODAN) / J. Catalan, P. Perez, J. Laynez et al. // *J. Fluoresc.* – 1991. – V. 1. – P. 215-223.
319. Kusube M. Effect of pressure on the Prodan fluorescence in bilayer membranes of phospholipids with varying acyl chain lengths / M. Kusube, H. Matsuki, S. Kaneshina // *Coll. Surf. B.* – 2005. – V. 42. – P. 79-88.
320. Dobretsov G. 4-dimethylaminochalcone and 3-methoxybenzanthrone as fluorescent probes to study biomembranes. I. Spectral characteristics / G. Dobretsov, V. Petrov, V. Mishiev et al. // *Stud. Biophys.* – 1977. – V. 65. – P. 91-98.
321. Gularyan S. Lipophilic fluorescent probe 4-dimethylaminochalcone: factors responsible for the fluorescence yield / S. Gularyan, G. Dobretsov, O. Sarkisov et al. // *Biophysics.* – 2005. – V. 50. – P. 685-690.

322. Dobretsov G. 4-dimethylaminochalcone and 3-methoxybenzanthrone as fluorescent probes to study biomembranes. II. Sensitivity of 4-dimethylaminochalcone to water molecules in the surface layer of a membrane / G. Dobretsov, V. Petrov, Y. Vladimirov // *Stud. Biophys.* – 1997. – V. 65. – P. 91-98.
323. Pasenkiewicz-Gierula M. Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: a molecular simulation study / M. Pasenkiewicz-Gierula, T. Rog, K. Kitamura et al. // *Biophys. J.* – 2000. – V. 78. – P. 1376-1389.
324. Bach D. Hydration of phospholipid bilayers in the presence and absence of cholesterol / D. Bach, I. Miller // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – V. 1368. – P. 216-224.
325. Rog T. Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer nonpolar region: a molecular simulation study / T. Rog, M. Pasenkiewicz-Gierula // *Biophys. J.* – 2001. – V. 81. – P. 2190-2202.
326. Demel R.A. The function of sterols in membranes / R. Demel, B. de Kruijff // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1976. – V. 457. – P. 109-132.
327. Ho C. Hydration and order in lipid bilayers / C. Ho, S. Slater, C. Stubbs // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – P. 6188-6195.
328. Sponne I. Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-  $\beta$  peptide / I. Sponne, A. Fifre, V. Koziel et al. // *FASEB J.* – 2004. – V. 838. – P. 836-838.
329. Phillips M. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism / M. Phillips // *J. Lipid Res.* – 2013. – V. 54. – P. 2034-2048.
330. Rosenson R. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport / R. Rosenson, H. Brewer, W. Davidson et al. // *Circulation.* – 2012. – V. 125. – P. 1905-1919.
331. Obici L. Structure, function and amyloidogenic propensity of apolipoprotein A-I / L. Obici, G. Franceschini, L. Calabresi // *Amyloid.* – 2006. – V. 13. – P. 191-205.

332. Segrest J. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function / J. Segrest, M. Jones, H. de Loof et al. // *J. Lipid Res.* – 1992. – V. 33. – P. 141-166.
333. Saito H. Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model / H. Saito, P. Dhanasekaran, D. Nguyen et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 23227-23232.
334. Chetty P. Effects of the Iowa and Milano mutations on apolipoprotein A-I structure and dynamics determined by hydrogen exchange and mass spectrometry / P. Chetty, M. Ohshiro, H. Saito et al. // *Biochemistry.* – 2012. – V. 51. – P. 8993-9001.
335. Sean Davidson W. Structural organization of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I: studies of tryptophan mutants / W. Sean Davidson, K. Arnvig-McGuire, A. Kennedy et al. // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38. – P. 14387-14395.
336. Caviogilio G. Exchange of apolipoprotein A-I between lipid-associated and lipid-free states: a potential target for oxidative generation of dysfunctional high-density lipoproteins / G. Caviogilio, E. Geier, S. Shao et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 18847-18857.
337. Burstein E. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules / E. Burstein, N. Vedenkina, M. Ivkova // *Photochem Photobiol.* – 1973. – V. 18. – P. 263–279.
338. Nolte R. Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism / R. Nolte, D. Atkinson // *Biophys. J.* – 1992. – V. 63. – P. 1221-1239.
339. Roberts L. Structural analysis of apolipoprotein A-I: limited proteolysis of methionine-reduced and –oxidized lipid-free and lipid-bound human apo A-I / L. Roberts, M. Ray, T. Shih et al. // *Biochemistry.* – 1997. – V. 36. – P. 7615-7624.
340. Saito H. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins / H. Saito, S. Lund-Katz, M. Phillips // *Progress Lipid Res.* – 2004. – V. 43. – P. 350-380.

341. Domanov Ye. Coverage-dependent changes of cytochrome *c* transverse location in phospholipid membranes revealed by FRET / Ye. Domanov, G. Gorbenko, J. Molotkovsky // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1716. – P. 49-58.
342. Stankowski S. Surface charging by large multivalent molecules. Extending the standard Gouy-Chapman treatment / S. Stankowski // *Biophys. J.* – 1991. – V. 60. – P. 341-351.
343. Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия: В 3 т. – М.: Мир, 1984.
344. Gautier R. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties / R. Gautier, D. Douguet, B. Antonny et al. // *Bioinformatics.* – 2008. – V. 24. – P. 2101-2102.
345. Palgunachari M. Only the two end helixes of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity / M. Palgunachari, V. Mishra, S. Lund-Katz et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis Vasc. Biol.* – 1996. – V. 16. – P. 328-338.
346. Parasassi T. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence / T. Parasassi, G. de Stasio, G. Ravagnan et al. // *Biophys. J.* – 1991. – V. 60. – P. 179-189.
347. Parasassi T. Influence of cholesterol on phospholipid bilayer phase domains as detected by Laurdan fluorescence / T. Parasassi, M. Stefano, M. Loiero et al. // *Biophys. J.* – 1994. – V. 66. – P. 120-132.
348. McConnell H. Condensed complexes of cholesterol and phospholipids / H. McConnell, A. Radhakrishnan // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – V. 1610. – P. 159-173.
349. Huang J. Exploration of molecular interactions in cholesterol superlattices: effect of multibody interactions / J. Huang // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – P. 1014-1025.
350. Dai J. Instability of cholesterol clusters in lipid bilayers and the cholesterol's umbrella effect / J. Dai, M. Alwarawrah, J. Huang // *J. Phys. Chem. B.* – 2010. – V. 114. – P. 840-859.
351. Daly T. The origin of cholesterol's condensing effect / T. Daly, M. Wang, S. Regen // *Langmuir.* – 2011. – V. 27. – P. 2159-2161.



352. Schug Z. Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis / Z. Schug, E. Gottlieb // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1788. – P. 2022-2031.
353. Ostrander D. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome *c* release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis / D. Ostrander, G. C. Sparagna, A. A. Amoscato et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 38061-38067.
354. Stepanov G. Evaluation of cytochrome *c* affinity to anionic phospholipids by means of surface plasmon resonance / G. Stepanov, O. Gnedenko, A. Mol'nar et al. // *FEBS Lett.* – 2009. – V.583. – P. 97-100.
355. Bacalum M. Insertion of proteins in the lipid bilayer of liposomes revealed by FRET / M. Bacalum, M. Radu // *Romanian J. Biophys.* – 2007. – V. 17. – P. 129-138.
356. Hanske J. Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome *c* / J. Hanske, J. Toffey, A. Morenz et al. // *Proc. Natl. Acad. USA.* – 2012. – V. 109. – P. 125-130.
357. Heimburg T. Protein surface-distribution and protein-protein interactions in the binding of peripheral proteins to charged lipid membranes / T. Heimburg, D. Marsh // *Biophys. J.* – 1995. – V. 68. – P. 536-546.
358. Conchillo-Sole O. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides / O. Conchillo-Sole, N. de Groot, F. Aviles et al. // *BMC Bioinformatics.* – 2007. – V. 8. – P. 65-81.
359. Rytömaa M. Evidence for two distinct acidic phospholipids-binding sites in cytochrome *c* / M. Rytömaa, P. Kinnunen // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 1770-1774.
360. Kalanxhi E. Cytochrome *c* impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models / E. Kalanxhi, C. Wallace // *Biochem. J.* – 2007. – V. 407. – P. 179-187.
361. Akiyama S. Conformational landscape of cytochrome *c* folding studied by microsecond-resolved small-angle X-ray scattering / S. Akiyama, S. Takahashi, T. Kimura et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 1329-1334.

362. de Kruijff B. Cytochrome *c* specifically induces non-bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes / B. de Kruijff, P. Cullis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – V. 602. – P. 477-490.
363. Vladimirov Y. Molecular mechanisms of apoptosis. Structure of cytochrome *c* – cardiolipin complex / Y. Vladimirov, E. Proskurnina, A. Alekseev // *Biochemistry (Moscow) (Engl. Transl.)*. – 2013. – V. 78. – P. 1391-1404.
364. Miyamoto S. Cytochrome *c* – promoted cardiolipin oxidation generates singlet molecular oxygen / S. Miyamoto, I. Nantes, P. Faria et al. // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2012. – V. 11. – P. 1536-1546.
365. Abe M. Molecular mechanisms for the induction of peroxidase activity of the cytochrome *c* – cardiolipin complex / M. Abe, R. Niibayashi, S. Koubori et al. // *Biochemistry*. – 2011. – V. 50. – P. 8383-8391.
366. Cullis P. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes / P. Cullis, B. de Kruijff // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – V. 559. – P. 399-420.
367. Beales P. Single vesicle observations of the cardiolipin – cytochrome *c* interaction: induction of membrane morphology changes / P. Beales, C. Bergstrom, N. Geerts et al. // *Langmuir*. – 2011. – V. 27. – P. 6107-6115.
368. Vladimirov Y. Protein-lipid nanoparticles that determine whether cells will live or die / Y. Vladimirov, Y. Nol', V. Volkov // *Crystallograph. Rep.* – 2011. – V. 56. – P. 553-559.
369. Claypool S. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function / S. Claypool // *Biochim. Biophys. Acta.*, – 2009. – V. 1788. – P. 2059-2068.
370. Gonzalez F. Cardiolipin: setting the beat of apoptosis / F. Gonzalez, E. Gottlieb // *Apoptosis*. – 2007. – V. 12. – P. 877-885.
371. Renner L. Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes / L. Renner, D. Weibel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108. – P. 6264-6269.

372. Girych M. Interaction of Thioflavin T with amyloid fibrils of apolipoprotein A-I N-terminal fragment: resonance energy transfer study / M. Girych, G. Gorbenko, V. Trusova et al. // *J. Struct. Biol.* – 2014. – V. 185. – P. 116-124.
373. Cao A. Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme / A. Cao, D. Hu, L. Lai // *Protein Sci.* – 2004. – V. 13. – P. 319-324.
374. Frare E. Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis / E. Frare, M. Mossuto, P. Polverino de Laureto et al. // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V. 361. – P. 551-561.
375. Mossuto M. The non-core regions of human lysozyme amyloid fibrils influence cytotoxicity / M. Mossuto, A. Dhulesia, G. Devlin et al. // *J. Mol. Biol.* – 2010. – V. 402. – P. 783-796.
376. Lara C. Sub-persistence-length complex scaling behavior in lysozyme / C. Lara, I. Usov, R. Mezzenga // *Phys. Rev. Lett.* - 20–1. – V. 107. – P. 238101.
377. Biancalana M. Molecular mechanism of Thioflavin T binding to amyloid fibrils / M. Biancalana, S. Koide // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – V. 1804. – P. 1405-1412.
378. Stsiapura V. Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity // V. Stsiapura, A. Maskevich, V. Kuzmitsky et al. // *J. Phys. Chem. B.* – 2008. – V. 112. – P. 15893-15902.
379. Cecchini P. The role of tryptophan in protein fibrillogenesis: relevance of Trp7 and Trp14 to the amyloidogenic properties of myoglobin / P. Cecchini, G. de Franceschi, E. Frare et al. // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2012. – V. 24. – P. 199-203.
380. de Felice F. Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure / F. de Felice, M. Vieira, M. Meirelles et al. // *FASEB J.* – 2004. – V. 18. – P. 1099-10101.
381. Glasmästar K. Protein adsorption on supported phospholipid bilayers / K. Glasmästar, C. Larsson, F. Höök et al. // *J. Colloid Interface Sci.* – 2002. – V. 246. – P. 40-47.
382. Salafsky J. Protein adsorption at interfaces detected by second harmonic generation / J.S. Salafsky, K.B. Eisenthal // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – V. 104. – P. 7752-7755.

383. Fainerman V. Dynamics of  $\beta$ -lactoglobulin penetration into Langmuir monolayers of 2D condensating phospholipid / V. Fainerman, J. Zhao, D. Vollhardt et al. // *J. Phys. Chem. B.* – 1999. – V. 103. – P. 8998-9007.
384. Peng J. The structure of Langmuir-Blodgett films of fatty acids and their salts / J. Peng, G.T Barnes, I.R Gentle // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2001. – V. 91. – P. 163-219.
385. Roux M. Deuterium NMR study of head-group deuterated phosphatidylserine in pure and binary phospholipid bilayers / M. Roux, J. Neumann // *FEBS Lett.* – 1986. – V. 199. – P. 33-38.
386. Zhang W. Binding of peptides with basic and aromatic residues to bilayer membranes / W. Zhang, E. Crocker, S. McLaughlin et al. – 2003. – V. 278. – P. 21459-21466.
387. Dyck M. Interaction of the neurotransmitter, neuropeptide Y (NPY), with phospholipid membranes: film balance and fluorescence microscopy studies / M. Dyck, M. Lösche // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – V. 110. – P. 22143-22151.
388. Dorosz J. Phospholipid-induced fibrillation of a prion amyloidogenic determinant at the air/water interface / J. Dorosz, R. Volinsky, E. Bazar et al. // *Langmuir.* – 2009. – V. 25. – P. 12501-12506.
389. Demel R. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers / R. Demel, W. van Kessel, R. Zwaal et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – V. 406. – P. 97-107.
390. Engel M. Islet amyloid polypeptide inserts into phospholipid monolayers as monomer / M. Engel, H. Yigittop, R. Elgersma et al. // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V. 356. – P. 783-789.
391. Zhang Y. Intra-membrane oligomerization and extra-membrane oligomerization of amyloid- $\beta$  peptide are competing processes as a result of distinct patterns of motif interplay / Y. Zhang, J. Shi, C. Bai et al. – *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – P. 748-756.

392. Hirano A. Adsorption and disruption of lipid bilayers by nanoscale protein aggregates / A. Hirano, H. Yoshikawa, S. Matsushita et al. // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – P. 3887-3895.
393. Maget-Dana R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membranelytic peptides and their interactions with lipid membranes / R. Maget-Dana // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1999. – V. 1462. – P. 109-140.
394. Pethica B. The thermodynamics of monolayer penetration at constant area. Part 1. *Trans. Faraday Soc.* – 1955. – V. 51. – P. 1402-1411.
395. Alexander D. Use of the Gibbs equation to calculate adsorption into monolayer-covered surfaces / D. Alexander, G. Barnes // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* – 1980. – V. 176. – P. 118-125.
396. Motomura K. Thermodynamics of multicomponent monolayers: IV. Monolayer penetration / K. Motomura, Y. Hayami, M. Aratono et al. // *J. Colloid Interface Sci.* – 1982. – V. 87. – P. 333-338.
397. Sundaram S. Equations for the equilibrium surface pressure increase on the penetration of an insoluble monolayer by soluble surfactant / S. Sundaram, K. Stebe // *Langmuir*. – 1996. – V. 12. – P. 2028-2034.
398. Datwani S. Monolayer penetration by a charged amphiphile: equilibrium and dynamics / S. Daywani, K. Stebe // *Colloids Surf. A*. – 2001. – V. 192. – P. 109-129.
399. Calvez P. Analysis of the contribution of saturated and polyunsaturated phospholipid monolayers to the binding of proteins / P. Calvez, E. Demers, E. Boisselier et al. // *Langmuir*. – 2011. – V. 27. – P. 1373-1379.
400. Benga G. Interactions between components in biological membranes and their implication for membrane function / G. Benga, R. Holmes // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* – 1984. – V. 43. – P. 195-257.
401. Jahnig F. Thermodynamics and kinetics of protein incorporation into membranes / F. Jahnig // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1983. – V. 80. – P. 3691-3695.

402. Zuckermann M. Insertion and pore formation driven by adsorption of protein onto lipid bilayer membrane-water interface / M. Zuckermann, T. Heimburg // *Biophys. J.* – 2001. – V. 81. – P. 2458-2472.
403. Burger K. Interaction of influenza virus hemagglutinin with a lipid monolayer. A comparison of the surface activities of intact virions, isolated hemagglutinins, and a synthetic fusion peptide / K. Burger, S. Wharton, R. Demel et al. // *Biochemistry.* – V. 30. – P. 11173-11180.
404. Kirat K. *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D interaction with lipidic activators at the air-water interface / K. Kirat, J. Chauvet, B. Roux et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1661. – P. 144-153.
405. Zhao H. Interactions of adriamycin, cytochrome *c*, and serum albumin with lipid monolayers containing poly(ethyleneglycol)-ceramide / H. Zhao, P. Dubielecka, T. Soderlund et al. // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – P. 954-967.
406. Thakur G. Surface chemistry of Alzheimer's disease: a Langmuir monolayer approach // *Colloids Surf. B.* – 3009. – V. 74. – P. 436-456.
407. Blackwell M. Evidence that pyrene excimer formation in membranes is not diffusion-controlled / M. Blackwell, K. Gounaris, J. Barber // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – V. 858. – P. 221-234.
408. Galla H. On two-dimensional random walk in lipid bilayers and fluid pathways in biomembranes / H. Galla, W. Hartmann, U. Theilen et al. // *J. Membr. Biol.* – 1979. – V. 48. – P. 215-236.
409. Montroll E. Random walks on lattices / E. Montroll // *J. Math. Phys.* – 1969. – V. 10. – P. 753-765.
410. Muller W. Membrane-disordering effects of  $\beta$ -amyloid peptides / W. Muller, C. Kirsch, G. Eckert // *Biochem. Soc. Trans.* – 2001. – V. 29. – P. 617-624.
411. Ma X. The effect of fibrillar A $\beta$ 1-40 on membrane fluidity and permeability / X. Ma, Y. Sha, K. Lin // *Protein Pept. Lett.* – 2000. – V. 9. – P. 173-178.
412. Stefani M. / Biochemical and biophysical features of both oligomer/fibril and cell membrane in amyloid cytotoxicity // M. Stefani // *FEBS J.* – 2010. – V. 277. – P. 4602-4613.

413. Cecchi C. Insights into the molecular basis of the differing susceptibility of varying cell types to the toxicity of amyloid aggregates / C. Cecchi, S. Baglioni, C. Fiorillo // *Cell Sci.* – 2005. – V. 118. – P. 3459-3470.
414. Kinnunen P. Amyloid formation on lipid membrane surfaces / P. Kinnunen // *Open Biol. J.* – 2009. – V. 2. – P. 163-175.
415. Campioni S. The causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their ability to cause cell dysfunction / S. Campioni, B. Mannini, A. Pensalfini et al. // *Nat. Chem. Biol.* – 2010. – V. 6. – P. 140-147.
416. Benek O. A direct interaction between mitochondrial proteins and amyloid- $\beta$  peptide and its significance for the progression and treatment of Alzheimer's disease / O. Benek, L. Aitken, L. Hroch et al. // *Curr. Med. Chem.* – 2015. – V. 22. – P. 1056-1085.
417. Swerdlow R. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis / R. Swerdlow, J. Burns, S. Khan et al. // *J. Alzheimers Dis.* – 2010. – V. 20. – P. 265-279.
418. Molotkovsky J. Differential study of phosphatidylcholine and sphingomyelin in human high-density lipoproteins with lipid-specific fluorescent probes / J. Molotkovsky, E. Manevich, E. Gerasimova // *Eur. J. Biochem.* – 1982. – V. 122. – P. 573-579.
419. Nishimoto E. Internal motion of lysozyme studied by time-resolved fluorescence depolarization of tryptophan residues / E. Nishimoto, S. Yamashita, A. Szabo et al. // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37. – P. 5599-5607.
420. Li S.  $\text{Ni}^{2+}$  binds to active site of hen egg-white lysozyme and quenches fluorescence of Trp62 and Trp108 / S. Li, A. Nakagawa, T. Tsukihara // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 324. – P. 529-533.
421. Fang F. Competitive adsorption in model charged protein mixtures: equilibrium isotherms and kinetics behavior / F. Fang, I. Szleifer // *J. Chem. Phys.* – 2003. – V. 119. – P. 1053-1065.
422. Hill S. Spatial extent of charge repulsion regulates assembly pathways for lysozyme amyloid fibrils / S. Hill, T. Miti, T. Richmond et al. // *PLoS ONE.* – 2011. – V. 6. – P. e18171.

423. Yoshiike Y. Surface structure of amyloid- $\beta$  fibrils contributes to cytotoxicity / Y. Yoshiike, T. Akagi, A. Takashima // *Biochemistry*. – 2007. – V. 46. – P. 9805-9812.
424. Chatelier R. Adsorption of globular proteins on locally planar surfaces: models for the effect of excluded surface area and aggregation of adsorbed protein on adsorption equilibria / R. Chatelier, A. Minton // *Biophys. J.* – 1996. – V. 71. – P. 2367-2374.
425. Monti D. Effects of a lipid environment on the fibrillogenic pathway of the N-terminal polypeptide of human apolipoprotein a-I, responsible for in vivo amyloid fibril formation / D. Monti, F. Guglielmi, M. Monti et al. // *Eur. Biophys. J.* – 2010. – V. 39. – P. 1289-1299.
426. Adachi E. The extreme N-terminal region of human apolipoprotein A-I has a strong propensity to form amyloid fibrils / E. Adachi, A. Kosaka, K. Tsuji et al. // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 588. – P. 389-394.
427. Das M. Amyloidogenic mutations in human apolipoprotein A-I are not necessarily destabilizing – a common mechanism of apolipoprotein A-I misfolding in familial amyloidosis and atherosclerosis / M. Das, X. Mei, S. Jayaraman // *FEBS J.* – 2014. – V. 281. – P. 2525-2542.
428. Domanov Y. Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers / Y. Domanov, P. Kinnunen // *J. Mol. Biol.* – 2008. – V. 376. – P. 42-54.
429. Michikawa M. A novel action of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ): oligomeric  $A\beta$  promoted lipid release / M. Michikawa, J. Gong, Q. Fan et al. // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – P. 7226-7235.
430. Boucrot E. Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains / E. Boucrot, A. Pick, G. Camdere // *Cell*. – 2012. – V. 149. – P. 124-136.
431. Milanesi L. Direct three-dimensional visualization of membrane disruption by amyloid fibrils / L. Milanesi, T. Sheynis, W. Xue // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – V. 109. – P. 20455-20460.



432. Dean R. A carpet-based mechanism for direct antimicrobial peptide activity against vaccinia membranes / R. Dean, L. O'Brien, J. Thwaite et al. // *Peptides*. – 2010. – V. 31. – P. 1966-1972.
433. Gharibyan A. Lysozyme amyloid oligomers and fibrils induce cellular death via different apoptotic/necrotic pathways / A. Gharibyan, V. Zamotin, K. Yanamandra et al. // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 365. – P. 1337-1349.
434. Huang B. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved inter molecular disulfide cross-linking / B. Huang, J. He, J. Ren et al. // *Biochemistry*. – 2009. – V.48. – P. 5794-5800.
435. Petkova A. Self-propagating molecular-level polymorphism in Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils / A. Petkova, R. Leapman, Z. Guo et al. // *Science*. – 2005. – V. 307. – P. 262-265.
436. Miller Y. Polymorphism in Alzheimer A $\beta$  amyloid organization reflects conformational selection in a rugged energy landscape / Y. Miller, B. Ma, R. Nussinov // *Chem. Rev.* – 2010. – V. 110. – P. 4820-4838.
437. Anderson M. Polymorphism and ultrastructural organization of prion protein amyloid fibrils: an insight from high resolution atomic force microscopy / M. Anderson, O. Bocharova, N. Makarava et al. // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V. 358. – P. 580-596.
438. Heise H. Molecular-level secondary structure, polymorphism and dynamics of full-length  $\alpha$ -synuclein fibrils studied by solid-state NMR / H. Heise, W. Hoyer, S. Becker et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – V. 102. – P. 15871-15876.
439. Kurouski D. Spontaneous inter-conversion of insulin fibril chirality / D. Kurouski, R. Dukor, X. Lu et al. // *Chem. Commun.* – 2012. – V. 48. – P. 2837-2839.
440. Lara C. General self-assembly mechanism converting hydrolyzed globular proteins into giant multistranded amyloid ribbons / C. Lara, J. Adamcik, S. Jordens et al. // *Biomacromolecules*. – 2011. – V. 12. – P. 1868-1875.
441. Adamcik J. Direct observation of time-resolved polymorphic states in the self-assembly of end-capped heptapeptides / J. Adamcik, V. Castelletto, S. Bolisetty et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2011. – V. 50. – P. 5496-5498.

442. Teresi L. Modeling helicoid to spiral-ribbon transitions of twist-nematic elastomers / L. Teresi, V. Varano // *Soft Matter*. – 2013. – V. 9. – P. 3081-3088.
443. Sawa Y. Shape selection of twist-nematic-elastomer ribbons / Y. Sawa, F. Ye, K. Urayama et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – V. 108. – P. 6364-6368.
444. Chen Z. Tunable helical ribbons / Z. Chen, C. Majidi, D. Srolovitz // *Appl. Phys. Lett.* – 2011. – V. 98. – P. 011906-011908.
445. Ghafouri R. Helicoid to spiral ribbon transition / R. Ghafouri, R. Bruinsma // *Phys. Rev. Lett.* – 2005. – V. 94. – P. 138101-138104.
446. Seth Childers W. Phase networks of cross- $\beta$  peptide assemblies / W. Seth Childers, N. Anthony, A. Mehta et al. // *Langmuir*. – 22. – V. 28. – P. 6386-6395.
447. Gerhardt-Bourke A. Comment on “Equilibrium conformation of polymer chains with noncircular cross section” / A. Gerhardt-Bourke, N. Thamwattana // *Phys. Rev. E*. – 2. – V. 7. – P. 046601-046603.
448. Wiltzius J. Alternative packing models leading to amyloid polymorphism in five fragments studied with molecular dynamics / J. Wiltzius, M. Landau, R. Nelson // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – V. 16. – P. 973-979.
449. Stroud J. The zipper groups of the amyloid state of proteins / J. Stroud // *Acta Cryst.* – 2013. – V. D69. – P. 540-545.
450. Berhanu W. Alternative packing models leading to amyloid polymorphism in five fragments studied with molecular dynamics / W. Berhanu, A. Masunov // *Peptide Sci.* – 2011. – V. 98. – P. 131-144.
451. Lamour G. Easyworm: an open-source software tool to determine the mechanical properties of worm-like chains / G. Lamour, J. Kirkegaard, H. Li et al. // *Source Code Biol. Med.* – 2014. – V. 9. – P. 16-21.
452. Krebs M. The binding of Thioflavin T to amyloid fibrils: localization and implications / M. Krebs, E. Bromley, A. Donald // *J. Struct. Biol.* – 2005. – V. 149. – P. 30-37.
453. Lulevich V. Single-cell mechanics provides a sensitive and quantitative means for probing amyloid-beta peptide and neuronal cell interactions / V. Lulevich, C. Zimmer, H. Hong et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – V. 107. – P. 13872-13877.

454. Fitzpatrick A. Exceptional rigidity and biomechanics of amyloid revealed by 4D electron microscopy / A. Fitzpatrick, S. Park, A. Zewail // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – P. 10976-10981.
455. Kremer J. Profile changes in lipid bilayer structure caused by  $\beta$ -amyloid peptide / J. Kremer, D. Sklansky, R. Murphy // *Biochemistry.* – 2001. – V. 40. – P. 8563-8571.
456. Quint D. Conformational collapse of surface-bound helical filaments / D. Quint, A. Gopinathan, G. Grason // *Soft Matter.* – 2012. – V. 8. – P. 9460-9468.
456. Devaux P. Specificity of lipid-protein interactions as determined by spectroscopic techniques / P. Devaux, M. Seigneuret // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 822. – P. 63-125.
457. Lindgren M. Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy / M. Lindgren, K. Sorgjerd, P. Hammarstrom // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88. – P. 4200-4212.
458. Calamai M. Reversal of protein aggregation provides evidence for multiple aggregated states / M. Calamai, C. Canale, A. Relini // *J. Mol. Biol.* – 2005. – V. 346. – P. 603-616.
459. Mouritsen O. Theoretical models of phospholipid phase transitions / O. Mouritsen // *Chem. Phys. Lipids.* – 1991. – V. 57. – P. 179-194.
460. Lehtonen J. Evidence for the formation of microdomains in liquid crystalline large unilamellar vesicles caused by hydrophobic mismatch of the constituent phospholipids / J. Lehtonen, J.M. Holopainen, P.K.J. Kinnunen // *Biophys. J.* – 1996. – V. 70. – P. 1753-1760.
461. Rytomaa M. Dissociation of cytochrome *c* from liposomes by histone H1. Comparison with basic peptides, M. Rytomaa, P.K.J. Kinnunen // *Biochemistry.* – 1996. – V. 35. – P. 4529-4539.
462. Soderlund T. Binding of adriamycin to liposomes as a probe for membrane lateral organization / T. Soderlund, A. Jutila, P.K.J. Kinnunen // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76. – P. 896-907.

463. Tocanne J. Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems / J. Tocanne, J. Teissie // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1990. – V. 1031. – P. 111-142.
464. Kates M. pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 29-deoxy analogue / M. Kates, J. Syz, D. Gosser et al. // *Lipids.* – 1993. – V. 28. – P. 877-882.
465. Hinderliter A. Cooperative adsorption of proteins onto lipid membranes / A. Hinderliter, S. May // *J. Phys. Condens. Matter.* – 2006. – V. 18. – P. S1257-S1270.
466. Stella L. Aggregation and water-membrane partition as major determinants of the activity of the antibiotic peptide trichogin GA IV / L. Stella, C. Mazzuca, M. Venanzi // *Biophys. J.* – 2004. – V. 86. – P. 936-945.
467. Chen F. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study of alamethicin / F. Chen, M.T. Lee, H.W. Huang et al. // *Biophys. J.* – 2002. – V. 82. – P. 908-914.
468. Ludtke S. Cooperative membrane insertion of magainin correlated with its cytolytic activity / S. Ludtke, K. He, Y. Wu et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1190. – P. 181-184.
469. Tanford C. The electrostatic free energy of globular protein ions in aqueous solution / C. Tanford // *J. Phys. Chem.* – 1955. – V. 59. – P. 788-793.
470. Tanford C. Theory of protein titration curves. I. General equations for impenetrable sphere / C. Tanford, J.G. Kirkwood // *J. Am. Chem. Soc.* – 1957. – V. 79. – P. 5333-5339.
471. Imoto T. Electrostatic free energy of lysozyme / T. Imoto // *Biophys. J.* – 1983. – V. 44. – P. 293-298.
472. Hylton D. Direct correlation between adsorption-induced changes in protein structure and platelet adhesion / D. Hylton, S.W. Shalaby, R.A. Latour // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2005. – V. 73. – P. 349-358.
473. Marchin K. Conformational changes in the plasma protein fibrinogen upon adsorption to graphite and mica investigated by atomic force microscopy / K. Marchin, C.L. Berrie // *Langmuir.* – 2003. – V. 19. – P. 9883-9888.

474. Kondo A. Circular dichroism studies on conformational changes in protein molecules upon adsorption on ultrafine polystyrene particles / A. Kondo, F. Murakami, K. Higashitani // *Biotechnol. Bioeng.* – 2004. – V. 40. – P. 889-894.
475. Engel M. Kinetic and structural characterisation of adsorption induced unfolding of bovine  $\alpha$ -lactalbumin / M. Engel, C.P.M. van Mierlo, A.J.W.G. Visser // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 10922-10930.
476. Fernandez A. On adsorption-induced denaturation of folded proteins / A. Fernandez, J. Ramsden // *J. Biol. Phys. Chem.* – 2001. – V. 1. – P. 81-84.
477. Minton A. Adsorption of globular proteins on locally planar surfaces. II. Models for the effect of multiple adsorbate conformations on adsorption equilibria and kinetics / A. Minton // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76. – P. 176-187.
478. Van Tassel P. Enhanced saturation coverages in adsorption–desorption processes / P. Van Tassel, P. Viot, G. Tarjus et al. // *J. Chem. Phys.* – 2000. – V. 112. – P. 1483-1488.
479. Wagoner V. impact of sequence on the molecular assembly of short amyloid peptides / V. Wagoner, M. Cheon, I. Chang et al. // *Proteins.* – 2014. – V. 82. – P. 1469-1483.
480. Garbuzynskiy S. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence / S. Garbuzhynskiy, M. Lobanov, O. Galzitskaya // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 26. – P. 326-332.
481. Fernandez-Escamilla A. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins / A. Fernandez-Escamilla, F. Rousseau, J. Schymkowitz et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – P. 1302-1306.
482. Maurer-Stroh S. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices / S. Maurer-Stroh, M. Debulpaep, N. Kuemmerer et al. // *Nat. Methods.* – 2010. – V. 7. – P. 237-242.
483. Tsolis A. A consensus method for the prediction of “aggregation-prone” peptides in globular proteins / A. Tsolis, N. Papandreou, V. Iconomidou et al. // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – P. e54175.

484. Emily M. MetAmyl: a META-prediction of AMYloid proteins / M. Emily, A. Talvas, C. Delamarche // PLoS One. – 2013. – V. 8. – P. e79722.
485. Walsh I. PASTA2: an improved server for protein aggregation prediction / I. Walsh, F. Seno, S. Tosatto et al. // Nucl. Acids Res. – 2014. – V. 42. – P. W301-307.
486. Bryan A. BETASCAN: probable beta-amyloids identified by pairwise probabilistic analysis / A. Bryan, M. Menke, L. Cowen et al. // PLoS Comput. Biol. – 2009. – V. 5. – P. 1000333.
487. Conchillo-Sole O. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides // O. Conchillo-Sole, N. de Groot, F. Aviles et al. // BMC Bioinformatics. – 2007. – V. 8. – P. 65.
488. Das M. Amyloid-forming properties of human apolipoproteins: sequence analysis and structural insights / M. Das, O. Gursky // Springer Subcellular Biochemistry Series: Lipids in Protein Misfolding – 2015. – V. 855. – P. 175-211.
489. Calamai M. Relative influence of hydrophobicity and net charge in the aggregation of two homologous proteins / M. Calamai, N. Taddei, M. Stefani et al. // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – P. 15078-15083.
490. Tu L. Role of aromatic interactions in amyloid formation by islet amyloid polypeptide / L. Tu, D. Raleigh // Biochemistry. – 2013. – V. 52. – P. 333-342.
491. Marek P. Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology / P. Marek, A. Abedini, B. Song et al. // Biochemistry. – 2007. – V. 46. – P. 3255-3261.
492. Gazit E. Self-assembly of short aromatic peptides into amyloid fibrils and related nanostructures / E. Gazit // Prion. – 2007. – V. 1. – P. 32-35.
493. Periole X. Factors that affect the degree of twist in  $\beta$ -sheet structures: a molecular dynamics simulation study of cross-  $\beta$  filament of the GNNQQNY peptide / X. Periole, A. Rampioni, M. Vendruscolo et al. // J. Phys. Chem. B. – 2009. – V. 113. – P. 1728-1737.

494. Schneidman-Duhovny D. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking / D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar, R. Nussinov et al. // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – V. 33. – P. W363-W367.
495. Andrusier N. FireDock: fast interaction refinement in molecular docking / N. Andrusier, R. Nussimov, H. Wolfson // *Proteins.* – 2007. – V. 69. – P. 139-159.
496. Koehl P. AQUASOL: an efficient solver for the dipolar Poisson-Boltzmann-Langevin equation / P. Koehl, M. Delarue // *J. Chem. Phys.* – 2010. – V. 132. – P. 064101-064117.
497. Lomize M. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes / M. Lomize, I. Pogozheva, H. Joo et al. // *Nucl. Acids Res.* – 2012. – V. 40. – P. D370-D376.
498. Lomize A. Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes / A. Lomize, I. Pogozheva, H. Mosberg et al. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2011. – V. 51. – P. 930-946.
499. White S. Membrane protein folding and stability: physical principles / S. White, W. Wimley // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1999. – V. 28. – P. 319-365.
500. Wu C. Coarse-grained models for protein aggregation / C. Wu, J. Shea // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2011. – V. 21. – P. 209-220.
501. Morriss-Andrews A. Simulations of protein aggregation: insights from atomistic and coarse-grained models / A. Morriss-Andrews, J. Shea // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2014. – V. 5. – P. 1899-1908.
502. Wei G. Computational simulations of early steps of protein aggregation / G. Wei, N. Mousseau, P. Derreumaux // *Prion.* – 2007. – V. 1. – P. 3-8.
503. Urbanc B. Ab initio discrete molecular dynamics approach to protein folding and aggregation / B. Urbanc, J. Borrequero, L. Cruz et al. // *Methods Enzymol.* – 2006. – V. 4. – P. 312-338.
504. Avila C. Multiscale molecular dynamics of protein aggregation / C. Avila, N. Drechsel, R. Alcantara et al. // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2011. – V. 12. – P. 221-234.
505. Adcock S. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins / S. Adcock, J. McCammon // *Chem Rev.* – 2006. – V. 106. – P. 1589-1615.

506. McCammon J. Computer-aided drug discovery: physics-based simulations from the molecular to the cellular level. In *Physical Biology: From Atoms to Medicine*. Edited by Zewail A.H. London, England: Imperial College Press. – 2008. – P. 401-410.
507. Urbanc B. Molecular simulations of amyloid  $\beta$  dimer formation / B. Urbanc, L. Cruz, F. Ding et al. // *Biophys. J.* – 2004. – V. 87. – P. 2310-2321.
508. Kubiak-Ossowska K. Multiprotein interactions during surface adsorption: a molecular dynamics study of lysozyme aggregation at a charged solid surface / K. Kubiak-Ossowska, P. Mulheran // *J. Phys. Chem. B.* – 2011. – V. 115. – P. 8891-8900.
509. Paci E. Molecular dynamics studies of the process of amyloid aggregation of peptide fragments of transthyretin / E. Paci, J. Gsponer, X. Salvatella et al. // *J. Mol. Biol.* – 2004. – V. 340. – P. 555-569.
510. Hong L. Scaling law for the radius of gyration of proteins and its dependence on hydrophobicity / L. Hong, J. Lei // *J. Polymer Sci.* – 2009. – V. 47. – P. 207-214.
511. Довидченко Н. Механизмы образования амилоидных фибрилл / Н. Довидченко, Е. Леонова, О. Галзитская // *Успехи биол. химии.* – 2014. – Т. 54. – С. 203-220.
512. Dong A. Entrapping intermediates of thermal aggregation in  $\alpha$ -helical properties with low concentration of guanidine hydrochloride / A. Dong, T. Randolph, J. Carpenter // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 27689-27693.
513. Tokunaga Y. Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils / Y. Tokunaga, Y. Sakakibara, Y. Kamada et al. // *Int. J. Biol. Sci.* – 2013. – V. 9. – P. 219-227.
514. Krebs M. Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain / M. Krebs, D. Wilkins, E. Chung et al. // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V. 300. – P. 541-549.
515. Pertinhez T. Amyloid formation by a helical cytochrome / T. Pertinhez, M. Bouchard, E. Tomlinson et al. // *FES Lett.* – 2001. – V. 495. – P. 184-186.
516. de Groot N. Amyloid fibril formation by bovine cytochrome *c* / N. de Groot, S. Ventura // *Spectroscopy.* – 2005. – V. 19. – P. 199-205.



517. Bonincontro A. Dielectric behavior of lysozyme and ferricytochrome c in water/ethylene-glycol solutions / A. Bonincontro, S. Cinelli, G. Onori et al. // *Biophys. J.* – 2004. – V. 86. – P. 1118-1123.
518. Mizuguchi C. Amyloidogenic mutation promotes fibril formation of the N-terminal apolipoprotein A-I on lipid membranes / C. Mizuguchi, F. Ogata, S. Mikawa et al. // *J. Biol. Chem.* – 2015. – DOI 10.1074/jbc.M115.664227.
519. Louros N. Chameleon “aggregation-prone” segments of apoA-I: a model of amyloid fibrils formed in apoA-I amyloidosis / N. Louros, P. Tsiolaki, M. Griffin et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – V. 79. – P. 711-718.

## ДОДАТОК А

### Моделі адсорбції білків на поверхні ліпідного бішару

Одним з найважливіших факторів, який обумовлює адекватний термодинамічний опис білок-ліпідного комплексоутворення, є коректний вибір теоретичної моделі, в рамках якої аналізуються ізотерми адсорбції. Традиційним підходом, який отримав найбільше поширення, є модель Ленгмюра. Її ключові положення можуть бути сформульовані наступним чином: а) адсорбовані молекули утворюють тільки один шар на поверхні, б) адсорбуюча поверхня складається з дискретних, ідентичних, невзаємодіючих центрів зв'язування, в) здатність молекули до адсорбції на певній ділянці не залежить від ступеню зайнятості сусідніх ділянок поверхні. В рамках цієї моделі ізотерми зв'язування описуються рівнянням:

$$K_a F = \frac{\Phi}{1 - \Phi} \quad (\text{A.1})$$

де  $K_a$  – константа асоціації,  $F$  – концентрація вільного ліганду,  $\Phi$  – частка площі поверхні, зайнятої лігандом.

Однак застосування такого підходу призводить до некоректної оцінки параметрів зв'язування, внаслідок того, що модель не враховує статистичні особливості білок-ліпідної системи. Ці особливості обумовлені нелокалізованим характером адсорбції, зокрема, а) здатністю білка контактувати водночас з декількома структурними елементами поверхні, б) залежністю процесу зв'язування від форми ліганду, в) ефектом виключеної площі. В основі останнього лежать геометричні обмеження при адсорбції ліганду, які накладаються стеричним відштовхуванням між його молекулами [424]. Так, наприклад, мінімальна відстань між центрами двох молекул білка, представлених сферами радіусом  $R$ , складає  $2R$ , а площа навколо першої сфери, виключена для знаходження центру другої, становить  $\pi(2R)^2 - \pi R^2 = 3\pi R^2 = \alpha\pi R^2$ .

У найбільшій мірі означені особливості враховуються в континуальних моделях адсорбції, котрі базуються на теорії масштабованих частинок (ТМЧ) (scaled particle theory, SPT) [424,477]. ТМЧ основана на застосуванні теорії

двомірних газів і рідин для обчислення хімічного потенціалу ліганду (білка), сорбованого на енергетично однорідній неперервній поверхні (поверхні ліпідного бішару).

Наразі континуальні моделі отримали свій розвиток для випадків адсорбції лігандів різної форми, кооперативного зв'язування, вбудовування молекули адсорбату в мембрану, конкурентного зв'язування, самоасоціації зв'язаного білка, численних конформацій ліганду [164]. Зважаючи на те, що ТМЧ дозволяє отримати найбільш коректну оцінку параметрів зв'язування, в даній роботі при аналізі термодинамічних характеристик лізоцим-ліпідного комплексоутворення було використано розвинутий Мінтоном формалізм цих моделей, математичний опис яких подано нижче [424,477].

**Модель мономодальної адсорбції з урахуванням електростатичних ефектів.** У найпростішому випадку мономодальної адсорбції, яка характеризується незмінним конформаційним<sup>8</sup> та агрегаційним станом білка при його зв'язування з бішаром, ізотерма адсорбції в рамках ТМЧ описується наступними рівняннями [424]:

$$K_a F = \Phi \gamma(\Phi) \quad (\text{A.2})$$

$$\ln \gamma = -\ln(1 - \Phi) - \varepsilon_{sh} - 1 + \frac{1}{1 - \Phi} + \frac{\varepsilon_{sh}}{(1 - \Phi)^2} \quad (\text{A.3})$$

де  $\gamma$  – коефіцієнт активності,  $\varepsilon_{sh}$  – параметр, що залежить від форми ліганду (для диску  $\varepsilon_{sh}=1$ ),  $\Phi = nB/L_a$ ,  $n$  – кількість ліпідних молекул, що утворюють одну ділянку сорбції білка,  $L_a$  – концентрація ліпиду, доступного для зв'язування білка, яка співвідноситься з загальною концентрацією ліпиду  $L$  як  $L_a = 0.5L$ .

При дослідженні адсорбції лізоциму на поверхні аніонних везикул окрім ефектів виключеної площі необхідно враховувати електростатичні ефекти, оскільки у фізіологічному діапазоні значень рН білок має сумарний позитивний заряд, і електростатичні взаємодії відіграють домінуючу роль при асоціації білка з

<sup>8</sup> Примітка. В даному контексті під незмінною конформацією мається на увазі збереження нативної глобулярної форми білка без зміни площі його «відбитку».

негативно зарядженими ліпідними бішарами. У цьому випадку рівноважна константа зв'язування може бути представлена як добуток електростатичної ( $K_{el}$ ) та неелектростатичної ( $K_0$ ) складових:  $K_a = K_{el}K_0$ . Електростатична складова константи зв'язування, яка залежить від поверхневого потенціалу мембрани, рН, іонної сили та ступеня покриття поверхні білком, визначається співвідношенням [357]:

$$K_{el} = \exp\left(-\frac{d}{dN_p}\left[\frac{\Delta F_{el}(N_p)}{k_B T}\right]\right) \quad (\text{A.4})$$

де  $T$  – температура,  $k_B$  – константа Больцмана,  $\Delta F_{el}$  – зміна електростатичної компоненти вільної енергії при сорбції білка, що залежить від  $N_p$ , числа сорбованих білкових молекул ( $N_p = BN_A$ ):

$$\Delta F_{el}(N_p) = F_{el}^S(N_p) - F_{el}^S(0) - N_p F_{el}^P \quad (\text{A.5})$$

де  $F_{el}^S(0)$ ,  $F_{el}^S(N_p)$  – електростатична вільна енергія поверхні бішару у відсутності білка та при зв'язуванні  $N_p$  молекул білка, відповідно,  $F_{el}^P$  – електростатична складова вільної енергії білка. Електростатична вільна енергія сферичної білкової молекули з ефективним зарядом  $+ze$  та рівномірним розподілом заряду описується співвідношенням [164]:

$$F_{el}^P = \frac{z^2 e^2}{2\varepsilon_r r_{Lz}(1 + \kappa_d r_{Lz})} \quad (\text{A.6})$$

де  $r_{Lz} = 1.5$  нм – радіус лізоциму,  $\kappa_d$  – обернена довжина Дебая:

$$\kappa_d = \sqrt{\frac{8\pi e^2 N_A c}{\varepsilon_r k_B T}} \quad (\text{A.7})$$

$e$  – елементарний заряд,  $N_A$  – число Авогадро,  $\varepsilon_r$  – діелектрична стала,  $c$  – молярна концентрація моновалентних іонів (іонна сила).

В рамках теорії подвійного електростатичного шару Гуї-Чепмена електростатична вільна енергія мембрани площею  $S_m = S_L L_a$  описується наступним рівнянням [164]:

$$F_{el}^S = \frac{2k_B T S_m}{e} \left( \sigma \sinh^{-1} \left( \frac{\sigma}{a} \right) - \sqrt{a_c^2 + \sigma^2} + a \right), \quad a_c = \sqrt{2\pi^{-1} \varepsilon c N_A k_B T} \quad (A.8)$$

де  $S_L$  – середня площа на ліпідну молекулу,  $S_L = (f_{\Phi X} S_{\Phi X} + f_A S_A)$ , де  $f_{\Phi X}$  та  $f_A$  – мольні частки ФХ та аніонного фосфоліпіду (ФГ, ФС чи КЛ), відповідно,  $S_{\Phi X}$  та  $S_A$  – середня площа голівок ФХ та аніонного фосфоліпіду (0.65 нм<sup>2</sup> для ФХ, ФГ і ФС, та 1.2 нм<sup>2</sup> для КЛ [230]),  $\sigma$  – поверхнева густина заряду мембрани, яка визначається мольною фракцією аніонного ліпіду, ступенем його іонізації ( $\alpha$ ) та концентрацією зв'язаного білка:

$$\sigma = \frac{-e(\alpha f_A L_a - zB)}{S_m} \quad (A.9)$$

У випадку одноступінчастого депротонування  $\alpha$  може бути представлена як [463]:

$$\alpha = \frac{K_1}{K_1 + [H^+]_b \exp \left( \frac{-e\psi_s}{k_B T} \right)} \quad (A.10)$$

де  $K_1$  – константа іонізації,  $[H^+]_b$  – концентрація протонів у розчині,  $\psi_s$  – поверхневий електростатичний потенціал мембрани, який залежить від поверхневої густини заряду наступним чином:

$$\psi_s = \frac{2k_B T}{e} \sinh^{-1} \left( \frac{\sigma}{a} \right) \quad (A.11)$$

Теоретична ізотерма адсорбції розраховується шляхом чисельного розв'язання системи рівнянь (A.2-A.11).

**Модель мультимодальної адсорбції.** Модель мультимодальної адсорбції враховує можливість переходів між різними конформаційними станами адсорбованого ліганду чи адсорбції ліганду на гетерогенній поверхні, що містить центри зв'язування, які відрізняються за розміром та вільною енергією адсорбції. Іншими словами, якщо білок адсорбується на поверхні ліпідного бішару, що містить центри зв'язування двох типів (тобто, існує дві популяції адсорбованого білка), то коефіцієнт активності ліганду, представленого сферою та адсорбованого

у певній конформації  $i$  чи асоційованого з центрами  $i$ -го типу, в рамках ТМЧ визначається наступним рівнянням:

$$\gamma_i = \frac{1}{1 - \langle \rho a \rangle} \exp \left( \frac{a_i \langle \rho \rangle + s_i \langle \rho s \rangle / 2\pi}{1 - \langle \rho a \rangle} + \frac{a_i}{4\pi} \left[ \frac{\langle \rho s \rangle}{1 - \langle \rho a \rangle} \right]^2 \right) \quad (\text{A.12})$$

$$a_{1,2} = n_{1,2} S_L, \quad \rho_{1,2} = \frac{B_{1,2}}{L_a S_L}, \quad s_{1,2} = 2\sqrt{\pi n_{1,2} S_L} \quad (\text{A.13})$$

$$\langle \rho \rangle = \frac{B_1 + B_2}{L_a S_L}, \quad \langle \rho a \rangle = \frac{n_1 B_1 + n_2 B_2}{L_a}, \quad \langle \rho s \rangle = \frac{2\sqrt{\pi} (B_1 \sqrt{n_1} + B_2 \sqrt{n_2})}{L_a \sqrt{S_L}} \quad (\text{A.14})$$

де  $\rho_{1,2}$ ,  $a_{1,2}$ ,  $s_{1,2}$  – число молекул на одиницю площі поверхні, площа та периметр «відбитку» білка, зв'язаного з центрами 1-го та 2-го типів, відповідно,  $B_{1,2}$  – концентрація білка, адсорбованого на ділянках 1-го та 2-го типів, відповідно,  $n_{1,2}$  – число ліпідних молекул, що складають ділянки зв'язування 1-го та 2-го типів. У цьому випадку ізотерма адсорбції описується наступною системою рівнянь:

$$K_{a1}(P - B_1 - B_2) = \rho_1 \gamma_1, \quad K_{a2}(P - B_1 - B_2) = \rho_2 \gamma_2 \quad (\text{A.15})$$

$$\rho_{1,2} \gamma_{1,2} = \frac{B_{1,2}}{L_a - n_1 B_1 - n_2 B_2} \times \exp \left( \frac{n_{1,2} (B_1 + B_2) + 2\sqrt{n_{1,2}} (B_1 \sqrt{n_1} + B_2 \sqrt{n_2})}{L_a - n_1 B_1 - n_2 B_2} + n_{1,2} \left[ \frac{B_1 \sqrt{n_1} + B_2 \sqrt{n_2}}{L_a - n_1 B_1 - n_2 B_2} \right]^2 \right) \quad (\text{A.16})$$

де  $K_{a1,2}$  – константи асоціації білка з центрами 1-го та 2-го типів, відповідно. Варто відзначити, що аналогічний формалізм може бути застосований для опису конкурентного зв'язування макромолекул з поверхнею.

**Моделі адсорбції ліганду, що самоасоціює на поверхні.** Для описання процесу самоасоціації білка, сорбованого на поверхні ліпідного бішару було запропоновано дві моделі – модель двох станів та кластерна модель [164,424].

#### а) Модель двох станів

Ця модель базується на припущенні, що адсорбований білок може знаходитись тільки в двох станах – мономера та  $z_a$ -мера. Ізотерми адсорбції описуються наступними рівняннями [424]:

$$K_a F = \Phi_1 \gamma_1(\Phi_1, \Phi_z) \quad (\text{A.17})$$

$$\Phi_z = z_a K_{1z} \frac{\gamma_1(\Phi_1, \Phi_z)^{z_a}}{\gamma_z(\Phi_1, \Phi_z)} \Phi_1^{z_a} \quad (\text{A.18})$$

$$\ln \gamma_1 = -\ln(1 - \Phi) + \frac{3\Phi_1 + \left[ \frac{2}{q} + \frac{1}{q^2} \right] \Phi_z}{1 - \Phi} + \frac{\left( \Phi_1 + \frac{1}{q} \Phi_z \right)^2}{(1 - \Phi)^2} \quad (\text{A.19})$$

$$\ln \gamma_z = -\ln(1 - \Phi) + \frac{3\Phi_z + (2q + q^2)\Phi_1}{1 - \Phi} + \frac{(\Phi_z + q\Phi_1)^2}{(1 - \Phi)^2} \quad (\text{A.20})$$

де  $\Phi_1, \Phi_z$  – частки площі поверхні, зайнятої мономерами чи  $z_a$ -мерами, відповідно,  $\Phi = \Phi_1 + \Phi_z$ ,  $q = R_z / R_1$ ,  $R_1$  та  $R_z$  – радіуси дисків, якими апроксимується мономер чи  $z_a$ -мер,  $K_{1z}$  – константа рівноваги процесу утворення  $z_a$ -мера. У припущенні, що площа, яку займає мономер, не змінюється при самоасоціації, маємо  $q = z_a^{1/2}$ .

#### б) Кластерна модель

На відміну від моделі двох станів, у кластерній моделі розглядається високогетерогенна популяція агрегованого білка (кластери білка довільної форми та розміру). У цьому випадку коефіцієнти активності для різних форм адсорбату визначаються рівнянням (A.12), а рівняння (A.13) та (A.14) мають вигляд:

$$\rho_i = \frac{\Phi_i}{a_i}, \quad \langle \rho \rangle = \sum \rho_i, \quad \langle \rho a \rangle = \sum \rho_i a_i, \quad \langle \rho s \rangle = \sum \rho_i s_i \quad (\text{A.21})$$

Константи рівноваги для процесів асоціації мономеру з поверхнею ( $K_1$ ) та утворення форми  $i$  ( $K_{ci}$ ) визначаються як:

$$K_1 F = \rho_1 \gamma_1, \quad K_{ci} = \frac{\rho_i \gamma_i}{(\rho_1 \gamma_1)^{m_i}} \quad (\text{A.22})$$

де  $m_i$  – ступінь олігомеризації форми  $i$ . Константа  $K_{ci}$  може бути представлена як експоненційна функція числа міжмолекулярних контактів в кластері  $i$  ( $N_{ci}$ ). Зокрема, якщо відбитки всіх кластерів апроксимуються дисками та  $m_i = i$  для форми  $i$ , справедливе наступне емпіричне співвідношення [164]:

$$N_{ci} = 3.78 \{ \exp[-(i-1)/2.51] - 1 \} + 2.5(i-1) \quad (\text{A.23})$$

