

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

ТРУСОВА ВАЛЕРІЯ МИХАЙЛІВНА



УДК 577.352.335.152

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

03.00.02 – біофізика

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України.

Науковий консультант: доктор фізико-математичних наук, професор
Горбенко Галина Петрівна,
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
професор кафедри ядерної та медичної фізики

Офіційні опоненти:

доктор фізико-математичних наук, професор **Довбешко Галина Іванівна,**
Інститут фізики НАН України, виконуючий обов'язки завідувача відділу фізики
біологічних систем (м. Київ);

доктор фізико-математичних наук, професор **Семенов Михайло Олексійович,**
Інститут радіофізики та електроніки імені О.Я. Усикова НАН України, старший
науковий співробітник відділу біологічної фізики (м. Харків);

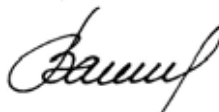
доктор фізико-математичних наук, професор **Лисецький Лонгін
Миколайович,** Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, провідний
науковий співробітник відділу молекулярних та гетеро-структурованих
матеріалів (м. Харків).

Захист відбудеться «12» 05 2016 року о 15⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені
В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського
національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків,
майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий « 8 » 04 2016 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Берест В.П

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Дослідження молекулярних механізмів агрегації біологічних макромолекул, зокрема, білків, є одним із фундаментальних напрямків сучасної біофізики. 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. Ці агрегати являють собою лінійні β -складчасті ансамблі мономерних субодиниць, структура яких стабілізується, головним чином, мережею водневих зв'язків. Актуальність детального аналізу механізмів утворення амілоїдів, а також характеристикації їх фізико-хімічних властивостей обумовлюється, щонайменше, двома факторами. По-перше, акумуляція фібрилярних агрегатів у тканинах організму є ключовим фактором в етіології цілої низки так званих конформаційних захворювань, включаючи хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона, діабет другого типу, ревматоїдний артрит, губчасті енцефалопатії (пріонні хвороби), тощо. 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.

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. З огляду на ключову роль, яку клітинні мембрани здатні відігравати в ініціації утворення амілоїдів та 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. Висловлюється припущення, що аніонні фосфоліпіди є головним мембранним компонентом, відповідальним за посилення фібрилізації, як було продемонстровано, зокрема, для α -синуклеїну, A β пептиду, амуліну, тау білка, лізоциму, транстиретину, цитохрому *c*, інсуліну, міоглобіну. Однак, спостереження, що утворення фібрил *in vitro* може бути індуковане не тільки мембранами, що містять аніонні фосфоліпіди, але і бішарами із сумішей цвіттеріонних фосфоліпідів з гангліозидами, сфінгомієліном та холестерином, 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. 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. Роль мембран у фібрилогенезі може включати також варіювання частки експонованих та занурених у ліпідний бішар ділянок білкової молекули, що впливає на нуклеаційну здатність білка. Важливість такого чинника, як глибина занурення у бішар, була продемонстрована, наприклад, при вивченні ліпід-індукованого фібрилогенезу α -синуклеїну, A β пептиду, пріонного білка та аполіпопротеїну С-III. Більш того, шляхи та кінетичні особливості мембрано-індукованого фібрилогенезу можуть суттєво відрізнитись від механізмів утворення фібрил у розчині внаслідок обмежень, які накладаються розмірністю системи, фізико-хімічними та динамічними характеристиками мембранних компонентів, колективними властивостями ліпідного бішару, тощо. 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, 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 та медичної фізики 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 А-I;

- ідентифікувати різні поліморфні форми амілоїдних фібрил N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-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 фосfolіпідними 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 світлорозсіяння, методи комп'ютерного моделювання та молекулярної динаміки. Для обробки даних використовували нелінійну оптимізацію, чисельні розрахунки та методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів

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

- Вперше методом атомно-силової мікроскопії ідентифіковані дві поліморфні форми амілоїдних фібрил N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-І. 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-І на ліпідній матриці.
- З використанням алгоритму комп'ютерного моделювання CreateFibril вперше побудовані структурні моделі амілоїдних фібрил пептидів лізоциму, аполіпопротеїну А-І та А β -пептиду, що відрізнялись кутом закручування. Проведена оцінка стабільності модельних фібрил та ідентифіковані найбільш енергетично вигідні поліморфи.
- Вперше методом молекулярної динаміки проведено дослідження комплексів лізоциму, N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-І 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 при вивченні структурних особливостей амілоїдних фібрил.

Отримані дані щодо модифікуючого впливу фібрилярних агрегатів на структурно-динамічний стан ліпідних мембран важливі для запобігання цитотоксичній 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 [10-12,26] – постановка задачі, отримання експериментальних

даних, розвиток моделей ІРПЕ, написання статей; у роботі [14] – проведення експерименту, обробка та обговорення результатів вимірювань, написання статті; у роботах [2,5,18,27,28,33,34,37-41,51,54-56,59] – проведення експериментів, аналіз експериментальних даних, написання статей та тез; в роботах [3,6,9,13,15-17, 19,22,23,29,31,43,52] – участь у проведенні експерименту, обговорення та обробка результатів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені та доповідались на Школі-семинарі «Сцинтиляционные 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 potencjal 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); 11th 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 ВРРС – 2011» (Севастополь, 2010); V з'їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк, 2011); 12th 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» (Пушино, 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); 13th Conference on Methods and Applications of Fluorescence (Genoa, 2013); 4th 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); 14th 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність обраної теми, сформульовано мету досліджень та задачі, які необхідно вирішити для її досягнення, визначено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, наведено загальну структуру дисертаційної роботи.

Розділ 1 «Агрегація білків у ліпідному оточенні» присвячений аналізу літературних даних, які відображають сучасні уявлення щодо ролі білок-ліпідних взаємодій в модуляції агрегаційної поведінки білкових молекул. Детально описано молекулярну структуру та механізми утворення агрегатів білків, зокрема, амілоїдних фібрил. Відзначається, що амілоїдні фібрили представляють собою лінійні β -складчасті агрегати, які стабілізуються, головним чином, водневими зв'язками та гідрофобними взаємодіями. Розглянуто молекулярні основи агрегації поліпептидів, а також охарактеризовані фізичні властивості амілоїдних фібрил. Проаналізовано існуючі термодинамічні та кінетичні моделі утворення фібрилярних агрегатів. Ідентифіковані основні молекулярні детермінанти мембрано-опосередкованої фібрилізації білків. Зокрема, показано, що фактори, які контролюють фібрилогенез у мембранних системах, включають: а) структурну трансформацію поліпептидного ланцюга у частково згорнуту конформацію; б) зростання локальної концентрації білка при зв'язуванні з мембраною; в) орієнтуючий ефект мембрани, що забезпечує сприятливе для агрегації розташування молекул зв'язаного білка; г) модуляцію нуклеаційної здатності білка внаслідок варіювання глибини його занурення у ліпідний бішар. Висвітлені основні біомедичні та біотехнологічні застосування амілоїдів. На основі критичного аналізу сучасного стану досліджень фібрилярних білкових агрегатів зроблено висновок, що накопичені на цей час дані не дозволяють побудувати цілісну систему уявлень щодо процесу фібрилізації білків у мембранному оточенні. Окреслене коло невирішених або спірних питань, які стосуються проблеми ліпід-індукованого амілоїдогенезу та обґрунтовано актуальність подальшого більш глибокого вивчення проблем, пов'язаних із розробкою нових методичних підходів до детектування, характеристикації та модуляції процесу утворення амілоїдів на ліпідних матрицях.

У **розділі 2 «Матеріали і методи»** наведена загальна характеристика матеріалів та методів дослідження. Об'єктом дослідження були комплекси модельних ліпідних мембран з білковими ансамблями лізоциму, цитохрому *c* та ряду мутантів N-термінального (залишки 1-83) фрагменту аполіпопротеїну А-I (апоА-I 83) різного ступеню олігомеризації. Модельні мембрани були представлені ліпідними моношарами, бішарами на підложці та ліпосомами. Основними ліпідними складовими модельних мембранних систем були цвіттеріонний ліпід фосфатидилхолін (ФХ), аніонні ліпіди фосфатидилгліцерин (ФГ), фосфатидилсерин (ФС), кардіоліпін (КЛ) та стерол холестерин (Хол). У якості молекул-репортерів використовували широкий спектр флуоресцентних зондів, флуоресцентно-мічені білки та ліпіди. Амілоїдні фібрили лізоциму отримували методами кислотної чи етанольної денатурації, а фібрилярні агрегати апоА-I 83 готували шляхом

інтенсивного перемішування розчину пептиду на орбітальному ротаторі. Амілоїдна природа фібрилярних агрегатів була підтверджена трансмісійною електронною мікроскопією та вимірюваннями спектрів флуоресценції амілоїд-специфічного зонду Тіофлавіну Т. При дослідженні асоціації префібрилярних інтермедіатів лізоциму з модельними ліпідними мембранами використовували білкові олігомери, які утворились протягом лаг-фази реакції фібрилізації (9-10 днів).

Вимірювання стаціонарної 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. Часороздільні вимірювання проводили за допомогою флуориметру FluoTime200 (PicoQuant GmbH, Німеччина), 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 ± 10 пс. Експерименти по вимірюванню ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням проводили на конфокальному флуоресцентному мікроскопі MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Germany). 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). Для отримання електронно-мікроскопічних зображень використовували мікроскоп Теспаі 12 BioTWIN. Експерименти по атомно-силовій мікроскопії проводили за допомогою скануючого мікроскопу NanoScope IIIa, оснащеного п'єзокерамічним сканером. Мікроскопічні зображення аналізували за допомогою програми ImageJ.

Розрахунки молекулярної динаміки (МД) проводили з використанням програмного пакету GROMACS 5.1 у силовому полі CHARMM36. Підготовку вхідних файлів для МД розрахунків здійснювали за допомогою графічного інтерфейсу CHARMM-GUI.

Обробку отриманих результатів, чисельне моделювання та нелінійну оптимізацію проводили у середовищі MathCad 2001 на персональному комп'ютері. 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.

Розділ 3 «Розвиток нових підходів до аналізу агрегаційних властивостей білків у водному та ліпідному оточенні» присвячений розробці нових флуоресцентних підходів до ідентифікації та структурної характеристики білкових асоціатів з різним ступенем агрегації.

Флуоресцентне визначення структурних параметрів амілоїдних фібрил. З використанням новосинтезованих амілоїд-специфічних барвників, представників класів бензантронів (АБМ), скваранів (SQ-1) та поліметинів (V2) була проведена оцінка можливостей флуоресцентних методів при дослідженні структури фібрилярних агрегатів. З цією метою вимірювали ІРПЕ між флуорофорами,

зв'язаними із амілоїдними фібрилами 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 за допомогою експоненційної моделі, що описує перенос енергії у системах з просторовими обмеженнями. У рамках цієї моделі, відносний квантовий вихід донора описується наступним рівнянням:

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

де $\lambda = t/\tau_D$, τ_D – час життя флуоресценції донора у відсутності акцептора, $V_d = \pi^{d/2} R_o^d / \Gamma\left(\frac{d}{2} + 1\right)$ – 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 акцептора.

На рис. 1, А показані набори модельних параметрів $\{V_{PF}, d\}$, що забезпечили найкращу апроксимацію експериментальних даних при ізотропному значенні орієнтаційного фактору ($\kappa^2 = 0.67$)¹. Здогадно, якщо припущення про довільну орієнтацію флуорофорів є вірним, залежності $V_{PF}(d)$, отримані для двох донор-акцепторних пар, повинні перетинатись у певній точці, яка характеризує об'єм молекули білка та розмірність фібрил лізоциму.

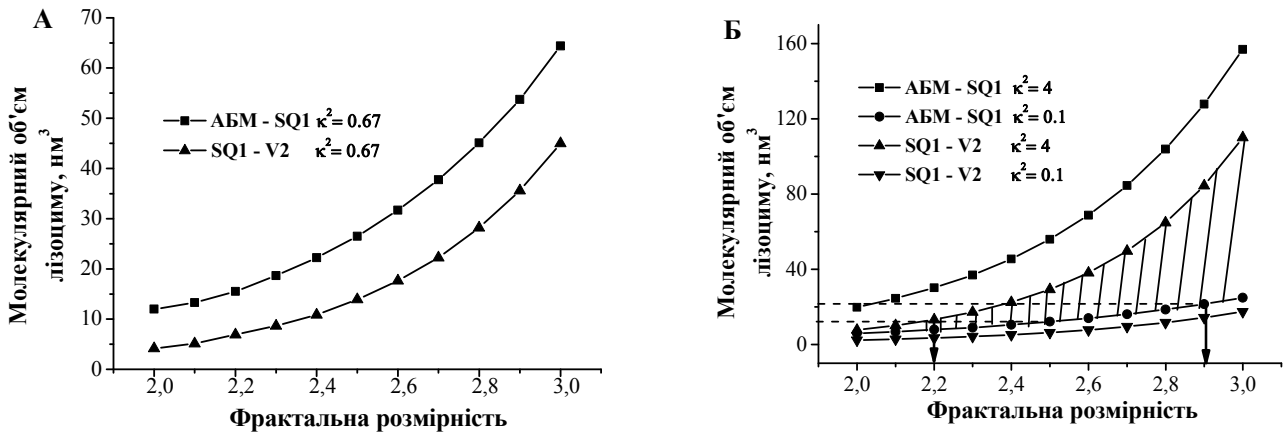


Рисунок 1. Залежність між молекулярним об'ємом мономерної субодиниці лізоциму та фрактальною розмірністю амілоїдних фібрил, отримана шляхом апроксимації даних ІРПЕ рівнянням (1) з ізотропним значенням орієнтаційного фактору (0.67) (А) та при його варіюванні у межах 0.1 – 4 (Б)

Відсутність такого перетину означає неправомірність використання ізотропного значення орієнтаційного фактору та свідчить про обмеження обертальної рухливості донорів та акцепторів у фібрилярному оточенні. Для подолання проблеми невизначеності орієнтаційного фактору, у подальшому аналізі даних ІРПЕ κ^2 варіювали у максимально можливому інтервалі значень, що охоплюють усі взаємні

¹ Примітка. Ізотропне та динамічно усереднене значення орієнтаційного фактору відповідає довільній орієнтації диполів донора та акцептора за час, менший, ніж час переносу енергії

орієнтації диполів донора та акцептора, від перпендикулярної ($\kappa^2 = 0$) до паралельної ($\kappa^2 = 4$). Перекривання між областями, які обмежені значеннями $V_{PF}(d)$, отриманими для АБМ – SQ-1 та SQ-1 – V2 донорно-акцепторних пар, дозволило визначити найбільш вірогідні значення $\{V_{PF}, d\}$ (заштрихована площа на рис. 1, Б). Виявилось, що об'єм мономерної молекули лізоциму у складі фібрили коливається у межах 12-22 нм³, а фрактальна розмірність амілоїдних фібрил білка лежить у діапазоні 2.2-2.9.

Аналіз агрегаційної поведінки лізоциму в ліпідному оточенні за даними міжмолекулярного переносу енергії. На основі методу ІРПЕ була розвинута нова методологія оцінки ступеня олігомеризації білків на мембранній матриці. Ця методологія базується на комбінованому використанні різних модифікацій методу переносу енергії, зокрема стаціонарного, часороздільного ІРПЕ та ІРПЕ з імпульсним затриманим збудженням (ІРПЕ-ІЗЗ). У якості модельного білка було використано лізоцим. Донорно-акцепторні пари були представлені флуоресцентними мітками флуоресцеїном (Fl), SeTau-647-di-NHS (SeTau) та DyLight 549 (DyL), ковалентно приєднаними до мономерів лізоциму (Lz-Fl, Lz-SeTau та Lz-DyL, відповідно). Ліпідні везикули складались із ФХ та його сумішей із 5, 10, 20 чи 40 мол% ФГ (ФГ5, ФГ10, ФГ20 чи ФГ40, відповідно).

Міжмолекулярний перенос енергії між Lz-Fl та Lz-DyL був відсутній у буфері та при зв'язуванні лізоциму із ФХ та ФГ5 ліпідними везикулами, що свідчить про мономерний стан білка у даних системах. Натомість, помітний ІРПЕ спостерігався при асоціації лізоциму із ФГ20 та ФГ40 ліпосомами, що є доказом олігомеризації білка. Кількісний аналіз результатів вимірювання ІРПЕ здійснювали у рамках моделі переносу енергії в білкових агрегатах. Згідно з цією моделлю, затухання флуоресценції донора описується наступним рівнянням:

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

де P_D – молярна фракція донорів, P_A – молярна фракція акцепторів, яка може бути знайдена з урахуванням ступеня мічення, X – молярна фракція донорів, що беруть участь в олігомеризації, k_j – константа переносу енергії з донора на акцептор на субодиниці j , що визначається як:

$$k_j = k_D \left(r_j / R_0 \right)^{-6} \quad (3)$$

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

$$r_j = 2(C_n / R_0) \sin \left[\pi(j-1)/n \right] \quad (4)$$

$C_n = R_a / \left[2 \sin(\pi/n) \right]$ – уявний радіус олігомеру. Варто відзначити, що C_n дорівнює справжньому радіусу олігомеру, коли флуорофор розташований у центрі субодиниці. Аналіз експериментальних даних в рамках описаної моделі дозволив оцінити параметри олігомеризації лізоциму – ступінь агрегації, n , та відстань між мономерними субодиницями в агрегаті, R_a . При цьому, для отримання більш точних

оцінок R_a в окремі серії експериментів вимірювали мономолекулярний перенос енергії з імпульсним затриманим збудженням.

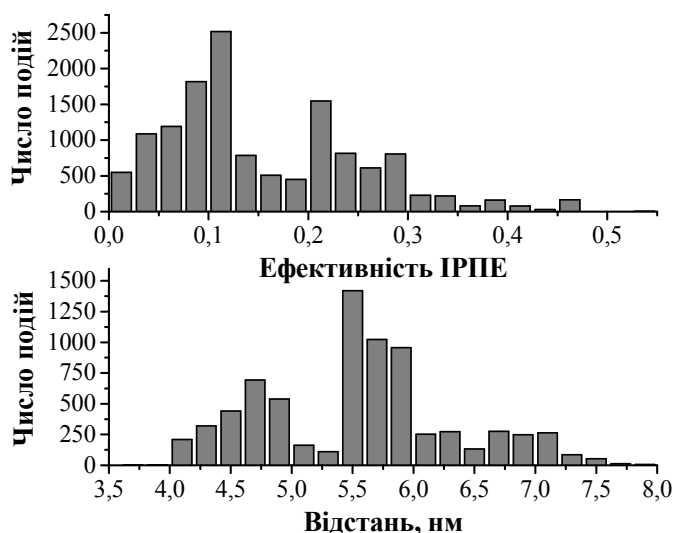


Рисунок 2. Гістограми ІРПЕ-ІЗЗ для ефективності ІРПЕ (верхня панель) та відстані між донором та акцептором (нижня панель) у ФГ40 мембранах. Донорно-акцепторна пара була представлена Lz-FI та Lz-SeTau

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. Розраховані параметри олігомеризації лізоциму представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Параметри ІРПЕ в олігомерах лізоциму

Система	L , мкМ	n	R_a , нм	f^* , $\times 10^{-5}$
ФГ20	25	5.8	6.3	8.5
	50	4.8	6.35	9.3
	75	3.9	6.31	1.8
	100	3.8	6.26	3.3
ФГ40	25	6.3	6.23	1.32
	50	5.6	6.3	9.8
	75	5.3	6.12	1.7
	100	4.9	6.13	7.1

* $f = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (E_e - E_c)^2$, де E_e та E_c - експериментальне та теоретичне значення ефективності переносу енергії, відповідно, N - кількість експериментальних точок

Як видно з таблиці, зростання вмісту аніонного ліпиду призводило до збільшення n та зменшення R_a , що свідчить про підвищення агрегаційного потенціалу лізоциму та більш щільне пакування мономерів в олігомерному кластері.

Ефект посилення агрегації білків при зростанні поверхневого електростатичного потенціалу ліпідного бішару може бути пояснений: і) акумуляцією зв'язаного білка на поверхні мембрани; ii) зниженим значенням

примембранного рН; iii) екрануванням заряду позитивно заряджених груп лізоциму негативно зарядженими групами полярних голівок ФГ.

Дослідження лізоцим-ліпідних систем методом флуоресцентної мікроскопії повного внутрішнього відбиття. З використанням флуоресцентної мікроскопії повного внутрішнього відбиття (ФМПВВ) була встановлена кореляція між характером структурної гетерогенності ліпідного бішару та агрегаційним потенціалом лізоциму. Модельні мембрани були представлені ліпідними бішарами на підложці, що складались із ФХ та КЛ у різних молярних співвідношеннях. Для отримання флуоресцентного сигналу бішари були доповані слідовими кількостями флуоресцентно-мічених ліпідів BODIPY-ФХ та BODIPY-КЛ. Додавання лізоциму до нейтральних мембран не змінювало морфологію ліпідного бішару, про що свідчить інваріантність флуоресценції BODIPY-ФХ. На противагу цьому, асоціація білка із КЛ-вміщуючими мембранами супроводжувалась появою ділянок із підвищеною поверхневою флуоресценцією BODIPY-КЛ, що є результатом сегрегації ліпідних молекул при сорбції білка та утворенням КЛ-збагачених доменів. Особливістю отриманих мікрофотографій є той факт, що при вмісті КЛ 5 мол% області з посиленою флуоресценцією мають відносно чітку форму (рис. 3, ліва панель), тоді як у КЛ25 бішарах ці області представляють собою мережу нерегулярних високофлуоресцентних структур (рис. 3, права панель).

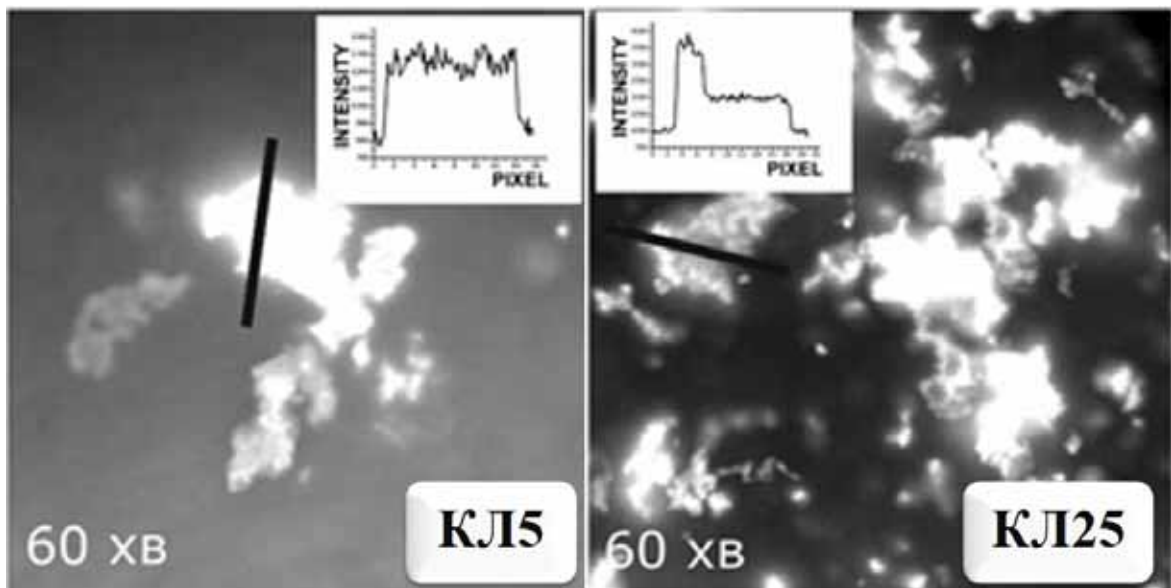


Рисунок 3. Репрезентативні мікрофотографії КЛ5 та КЛ25 ліпідних бішарів, інкубованих з лізоцимом протягом 60 хвилин

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, права панель, 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 флуктували навколо певного середнього значення (рис. 3, ліва панель, вкладка). Отримані дані дозволили запропонувати гіпотезу, згідно з якою лізоцим викликає утворення планарних ліпідних доменів у слабозаряджених бішарах та формування складчастих

мультишарів, відокремлених молекулами білка, у мембранах з більш високим вмістом КЛ. Молекулярним механізмом, який лежить в основі трансформації планарних доменів у мультишарові стопки, є, ймовірно, утворення агрегатів лізоциму при підвищенні молярної фракції КЛ.

У розділі 4 «Вплив фібрилярних інтермедіатів на структурно-динамічні властивості ліпідного бішару» наведені результати досліджень мембранних ефектів префібрилярних олігомерів лізоциму, цитохрому *c* та різних варіантів N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I.

Інформація про характер структурних змін неполярної зони модельних ліпідних мембран, що складалась із ФХ, та його сумішей із ФГ, КЛ чи Хол, була отримана за допомогою класичних мембранних зондів пірену та дифенілгексатрієну (ДФГТ). Аналіз спектральних відгуків цих флуорофорів показав, що зв'язування префібрилярних агрегатів лізоциму з ліпідними мембранами супроводжується зменшенням ступеня ексимеризації пірену, Е/М (рис. 4) та зростанням анізотропії флуоресценції ДФГТ. Це свідчить про збільшення ступеня впорядкованості ацильних ланцюгів ліпідів та зменшення вільного об'єму мембрани, який визначається як різниця між ефективним та ван-дер-ваальсовими об'ємами ліпідних молекул.

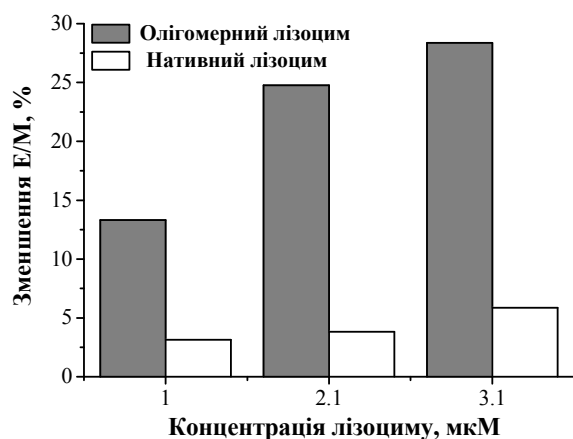


Рисунок 4. Вплив олігомерного та мономерного лізоциму на ступінь ексимеризації пірену у КЛ10 модельних мембранах на дев'ятий день фібрилізації білка

максимумів спектральних компонент Продану та ДМХ та зростання їх інтегральних інтенсивностей, а також збільшення величини трихвильової узагальненої поляризації Продану (табл. 2). Спостережувані ефекти свідчать про дегідратацію полярної області ліпідного бішару при зв'язуванні олігомерів лізоциму.

При дослідженні впливу олігомерного лізоциму на полярну зону мембран використовували зонди Продан та диметиламінохалкон (ДМХ), які чутливі до змін ступеня гідратації ліпідів. Спектр флуоресценції цих зондів у ліпідному бішарі складається з двох компонентів, співвідношення між якими залежить від вмісту води у ліпідній фазі. Аналіз параметрів деконволюції спектрів флуоресценції показав, що префібрилярні агрегати лізоциму викликають довгохвильовий зсув

Таблиця 2

Вплив олігомерного лізоциму на спектральні параметри Продану

Система	λ_{\max}^1	λ_{\max}^2	R_1	$3wGP$
ФХ	змін не було	змін не було	Зростання (9%)	Зростання (30%)
ФГ10	Червоний зсув	Червоний зсув	Зростання (20%)	Зростання (34%)

ФГ20	Червоний зсув	Червоний зсув	Зростання (22%)	Зростання (57%)
Хол30	змін не було	змін не було	змін не було	змін не було

У подальших експериментах, при вивченні переносу енергії з триптофанових залишків на ДМХ та гасіння власної флуоресценції білків іонами цезію була отримана інформація щодо локалізації N-термінального фрагменту нативного та мутантного апоА-I 83 у ФХ та ФХ/Хол модельних мембранах.

Таблиця 3

Локалізація мутантів апоА-I 83 відносно поверхні розділу ліпід/вода

Мутант	Відстань від центру бішару, нм	
	ФХ	Хол30
G26R/W@50	1.9 ^{±0.1}	2.8 ^{±0.2}
апоА-I/W@50	2.0 ^{±0.1}	2.8 ^{±0.3}
G26R/W@8	2.1 ^{±0.2}	3.5 ^{±0.4}
апоА-I/W@8	2.3 ^{±0.2}	3.5 ^{±0.4}

Мутації N-термінального фрагменту апоА-I включали амілоїдогенну мутацію G26R та заміну двох з трьох остатків триптофану на фенілаланін (G26R/W@8 та G26R/W@50, відповідно). Як можна судити з представлених у табл. 3 значень відстані триптофанових залишків від центру мембрани, досліджувані варіанти апоА-I 83 характеризуються поверхневим розташуванням у ліпідному бішарі. При вивченні мембранних ефектів фрагментів апоА-I 83, по аналогії з лізоцимом, використовували флуоресцентні зонди, що відрізняються за своєю локалізацією у мембрані. Аналіз спектральних параметрів пірену (відношення інтенсивності випромінювання першого піку до інтенсивності флуоресценції третього піку, I_1/I_{III} , та ступінь ексімеризації, Е/М) показав, що жоден з пептидів не має впливу на гідрофобну область ліпідного бішару. Однак, судячи зі зростання узагальненої поляризації Лаурдану (GP), варіанти апоА-I 83 викликають дегідратацію полярної області мембрани (табл. 4).

З використанням методу ІРПЕ було проведено дослідження взаємодії цитохрому *c* з ліпідними везикулами, що складались із ФХ та його сумішей з КЛ у різних молярних співвідношеннях. Донорами енергії слугували антрилвінільні флуорофори, ковалентно приєднані до ФХ чи КЛ (АВ-ФХ та АВ-КЛ, відповідно), а акцептором – гемова група білка. Експериментальна стратегія базувалась на отриманні багатовимірних масивів даних шляхом вимірювання відносного квантового виходу донора як функції концентрації акцептора при варіюванні декількох параметрів, а саме: а) вмісту КЛ, б) концентрації ліпиду, в) іонної сили.

Таблиця 4

Відносні зміни спектральних параметрів пірену (I_1/I_{III} , Е/М) та Лаурдану (GP) в ліпідних мембранах різного складу під впливом апоА-I 83 (%)

Мутант	ФХ			Хол30		
	I_1/I_{III}	Е/М	GP	I_1/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	—**	-0.5	-4.6	3.1
апоА-I/W@50	-0.6	1.3	—	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

* негативні значення означають зменшення параметру, а позитивні – збільшення

** змін не було

Були виявлені наступні основні ефекти: і) *відсутність чіткої залежності ІРПЕ від вмісту КЛ*, що свідчить про стабілізацію комплексів цитохрому *c* з ліпідами не тільки електростатичними, але й гідрофобними взаємодіями; ii) *значне посилення переносу енергії з аніонного донору АВ-КЛ*, у порівнянні з цвіттерійонним АВ-ФХ у КЛ2.5 модельних мембранах, найбільш імовірним поясненням якого є акумуляція аніонних ліпідів навколо зв'язаного білка; iii) *посилення переносу енергії при зниженні концентрації ліпиду*, що обумовлено зростанням поверхневої концентрації сорбованого білка; iv) *аномальний характер змін ІРПЕ між АВ-КЛ та цитохромом c при зростанні іонної сили з 20 до 40 та 60 мМ*. Концептуально підвищення іонної сили повинно послаблювати електростатичні білок-ліпідні взаємодії та призводити до загального зниження ефективності переносу енергії. Ця тенденція спостерігалась для ліпосом, що містили АВ-ФХ (рис. 5, А). Однак, коли донором енергії слугував АВ-КЛ, було виявлено неочікуване посилення переносу енергії зі зростанням іонної сили (рис. 5, Б).

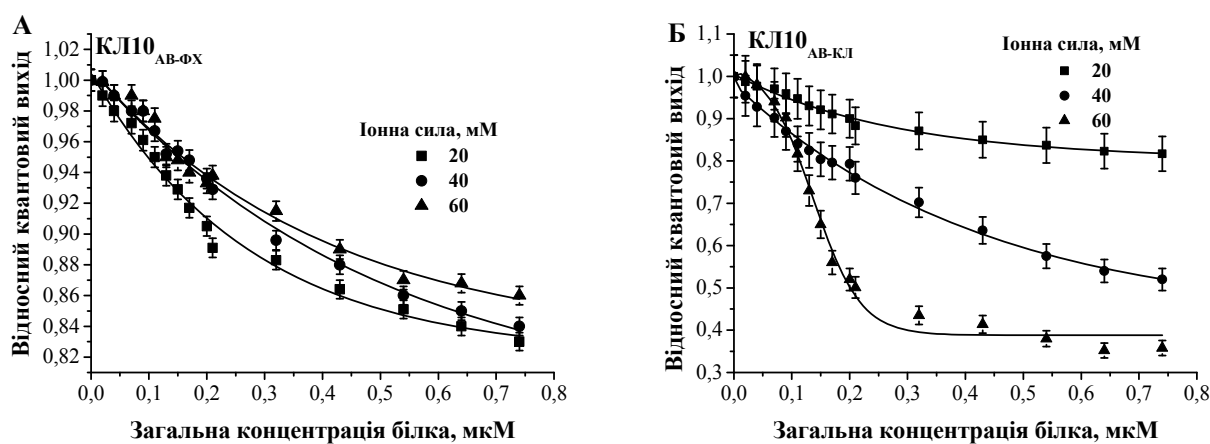


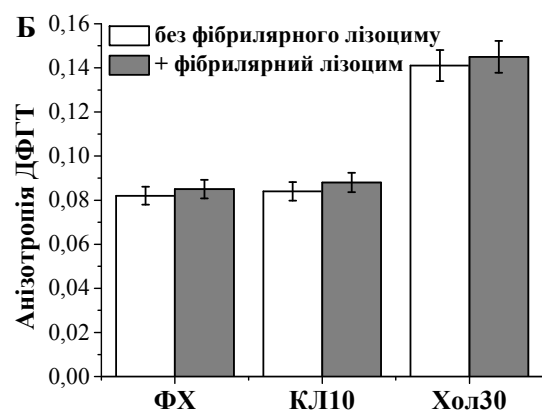
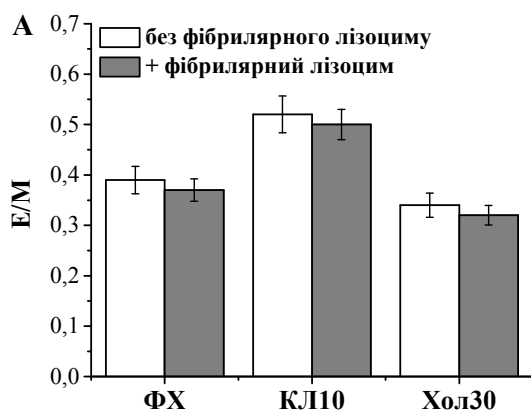
Рисунок 5. Концентраційні залежності гасіння флуоресценції АВ-ФХ (А) чи АВ-КЛ (Б) цитохромом *c* у ФХ/КЛ ліпосомах при варіюванні іонної сили. Концентрація ліпиду була 20 мкМ

Для з'ясування причин аномальної поведінки кривих ІРПЕ, експериментальні дані були кількісно проаналізовані в рамках алгоритму Монте Карло, який показав, що утворення КЛ-збагачених доменів не є кінцевою стадією процесу комплексоутворення цитохрому *c* з ліпідами при підвищеній іонній силі. Виявлено, що у ліпосомах, які містили 10 та 20 мол% КЛ, латеральний перерозподіл ліпідів супроводжується переходом КЛ у витягнуту конформацію, тоді як у мембранах із вмістом КЛ 2.5 та 5 мол% за утворенням сегрегованих ліпідних областей слідує формування гексагональної фази.

Розділ 5 «Амілоїдні фібрили як особливий клас мембранотропних агентів» спрямований на дослідження мембранних ефектів зрілих фібрил лізоциму та різних мутантів N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I.

За допомогою 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. 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.

З використанням ряду 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%). Виявлено, що амілоїдні фібрили лізоциму практично не впливають на спектральні параметри пірену (рис. 6, А) та ДФГТ (рис. 6, Б), однак призводять до зростання анізотропії флуоресценції 3-метоксибензантронну (МБА) (рис. 6, В) та узагальненої поляризації Лаурдану (рис. 6, Г). Отримані дані свідчать на користь того, 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. Асоціація амілоїдних фібрил нативного та мутантного апоА-І 83 з ліпідними везикулами також не призводила до змін спектральних параметрів пірену, однак, на противагу лізоциму, супроводжувалась зростанням величини GR Лаурдану в ФХ мембранах, що вказує на підвищення ступеня гідратації ліпідного бішару під впливом агрегованого білка. Серед можливих причин даного ефекту, найбільш імовірною уявляється виключення частки ліпідів з бішару при сорбції фібрил.



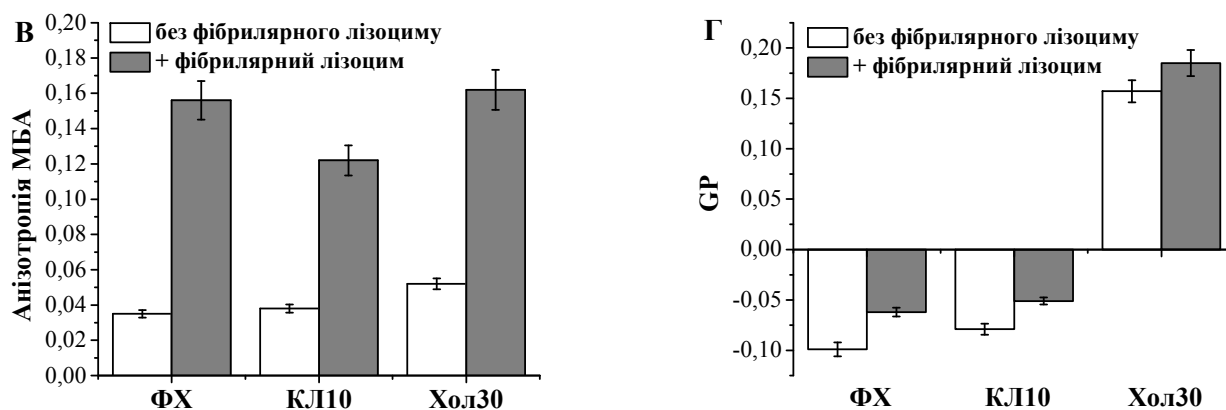


Рисунок 6. Вплив амілоїдних фібрил лізоциму на спектральні параметри пірену (А), ДФГТ (Б), МБА (В) та Лаурдану (Г). Концентрація фібрилярного білка складала 3.1 мкМ (А – В) та 1.3 мкМ (Г)

Для перевірки цієї гіпотези комплекси фібрилярного апоА-І 83 з ліпосомами були досліджені методом трансмісійної електронної мікроскопії (рис. 7). На основі сукупності даних флуоресцентної спектроскопії та електронної мікроскопії була запропонована модель дестабілізації структури мембран під впливом фібрил апоА-І 83.

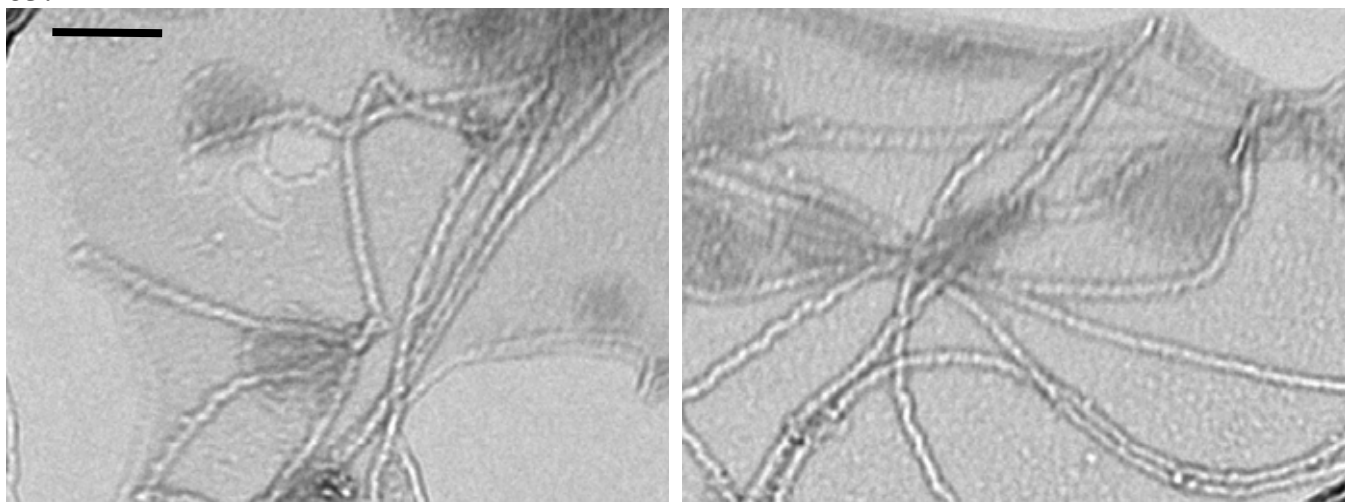


Рисунок 7. Електронномікроскопічні фотографії комплексів G26R/W@8 з ліпосомами. Масштабний відрізок дорівнює 50 нм

У рамках цієї моделі послідовність подій, які лежать в основі модифікуючого впливу амілоїдних фібрил, включає інвагінацію, стоншення та дефрагментацію ліпідного бішару.

Варто відзначити, що ступінь модифікації структурного стану та фізико-хімічних властивостей модельних мембран під впливом амілоїдних фібрил як лізоциму, так і N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-І істотно знижується при додаванні до їх складу холестерину. Це спостереження може бути пояснене конденсацією ліпідного бішару при включенні до його складу стеролу.

З використанням методу ІРПЕ продемонстрована можливість конкурентної взаємодії амілоїдних фібрил і периферичних мембранних білків з ліпідним бішаром. Досліджувані модельні білок-ліпідні системи містили в якості білкових компонентів мономерний чи фібрилярний лізоцим та мономерний цитохром *c*.

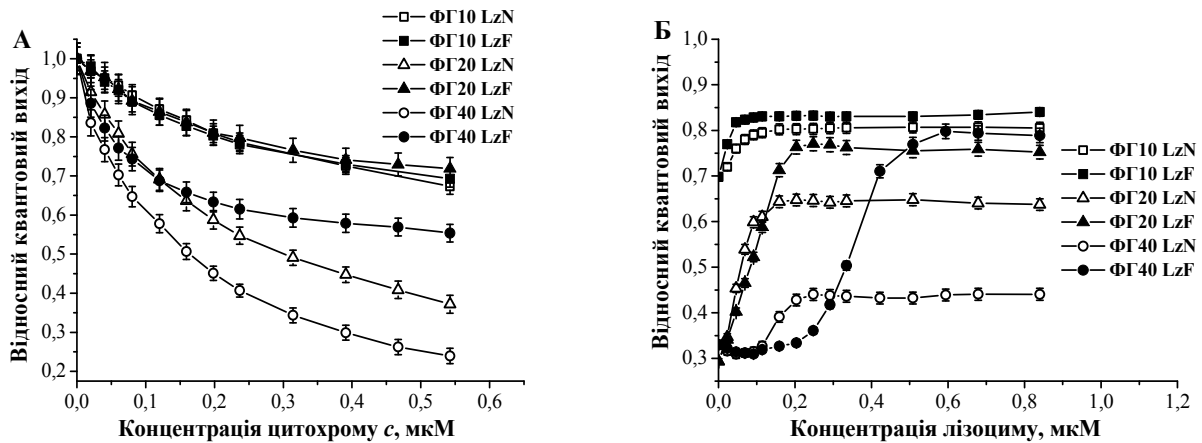


Рисунок 8. Відносний квантовий вихід АВ-ФХ в білок-ліпідних системах як функція концентрації цитохрому *c* (А) чи лізоциму (Б). Концентрація ліпиду була 10 мкМ, лізоциму – 0.5 мкМ (А), цитохрому *c* – 0.08 мкМ. LzN та LzF означають мономерний та фібрилярний лізоцим, відповідно

Ліпідні мембрани були представлені ліпосомами, що складались із ФХ та його сумішей із ФГ, ФС та КЛ у різних молярних пропорціях. Вимірювання переносу енергії між антрілвініл-міченим ФХ у якості донора та гемовою групою у якості акцептора, показало, що додавання лізоциму викликає зростання відносного квантового виходу АВ-ФХ (рис. 8, А), яке пояснюється дисоціацією цитохром *c* – ліпідних комплексів. Встановлено, що фібрилярний лізоцим викликає більш ефективну десорбцію цитохрому *c* у порівнянні з нативним білком. Окрім цього, характер конкурентного зв'язування з мембранами відрізнявся для фібрилярного та мономерного лізоциму при найвищому вмісті аніонних ліпідів – 40 мол%. У цьому випадку криві десорбції мали сигмоїдну форму (рис. 8, Б), причому крутизна кривих була більш вираженою для фібрилярного білка. Спостережуваний ефект може бути проявом кооперативності процесу дисоціації цитохром *c* – ліпідних комплексів, ініційованої лізоцимом. Показано, що конкуренція між фібрилярним та мономерним білками за мембранні центри зв'язування контролюється як електростатичними, так і специфічними нелектростатичними чинниками.

У розділі 6 «Структурна модифікація фібрилярних агрегатів білків на ліпідній матриці» проведено аналіз поліморфної поведінки амілоїдних фібрил аполіпопротеїну А-I (мутант G26R@W8) та досліджено вплив білок-ліпідних взаємодій на топологію фібрилярного пептиду.

З використанням методу атомно-силової мікроскопії (АСМ) отримані зображення амілоїдних фібрил G26R@W8 (рис. 9, ліва панель). 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. 9, права панель).

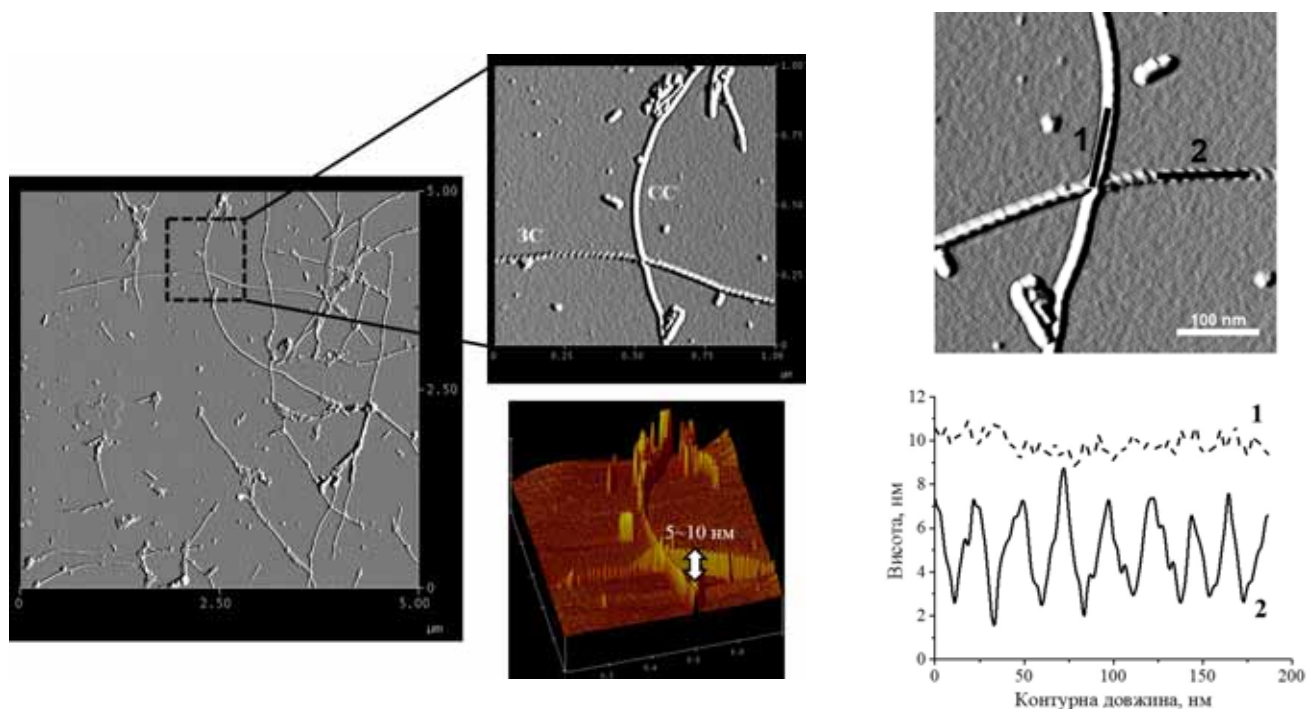


Рисунок 9. АСМ зображення амілоїдних фібрил G26R/W@8 (ліва панель) та профілі висоти амілоїдних фібрил G26R/W@8 вздовж контурної довжини (права панель)

Кількісний аналіз отриманих мікрофотографій дозволив визначити такі механічні параметри, як персистентна довжина, модуль Юнга та другий момент інерції.

Таблиця 5

Механічні параметри двох поліморфних форм амілоїдних фібрил G26R/W@8

Параметр	3C	CC
Персистентна довжина, мкм	2.23 ± 0.24	4.17 ± 0.61
Другий момент інерції, м^4	$(2.91 \pm 0.93) \times 10^{-35}$	$(4.91 \pm 0.93) \times 10^{-34}$
Модуль Юнга, ГПа	3.15 ± 0.72	3.54 ± 0.77

Як видно з отриманих даних, конфігурація «спіральна стрічка» характеризується більшою жорсткістю у порівнянні з конфігурацією «закручена стрічка».

У подальших дослідженнях була проведена оцінка можливості застосування методу ІРПЕ для вивчення структурної трансформації фібрилярних агрегатів білків на ліпідній матриці. Донорно-акцепторна пара була представлена мембранозв'язаним зондом Лаурданом та Тіофлавіном Т, інкорпорованим у фібрили мутанту апоА-І 83 G26R@W8. Модельні ліпідні мембрани склались із ФХ та його сумішей з Хол (30 мол%).

Тіофлавін Т – це класичний амілоїд-специфічний флуоресцентний зонд, зв'язування якого з фібрилами супроводжується суттєвим посиленням флуоресценції. Цей ефект пояснюється обмеженням торсійних осциляцій бензотіазолового та амінобензольного кілець та майже планарною конформацією молекули Тіофлавіну Т, вбудованого у жолобки фібрил. Така локалізація зонду

дозволяє припустити, 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 енергії. Зменшення інтенсивності флуоресценції Лаурдану при зростанні концентрації Тіофлавіну Т свідчить про наявність переносу енергії між двома флуорофорами. При отриманні профілів ІРПЕ зміни флуоресценції Лаурдану реєстрували на довжині хвилі 440 нм, що відповідає максимуму емісії фракції зонду, розташованої на рівні гліцеринових залишків. Кількісний аналіз даних ІРПЕ проводили у рамках алгоритму Монте Карло.

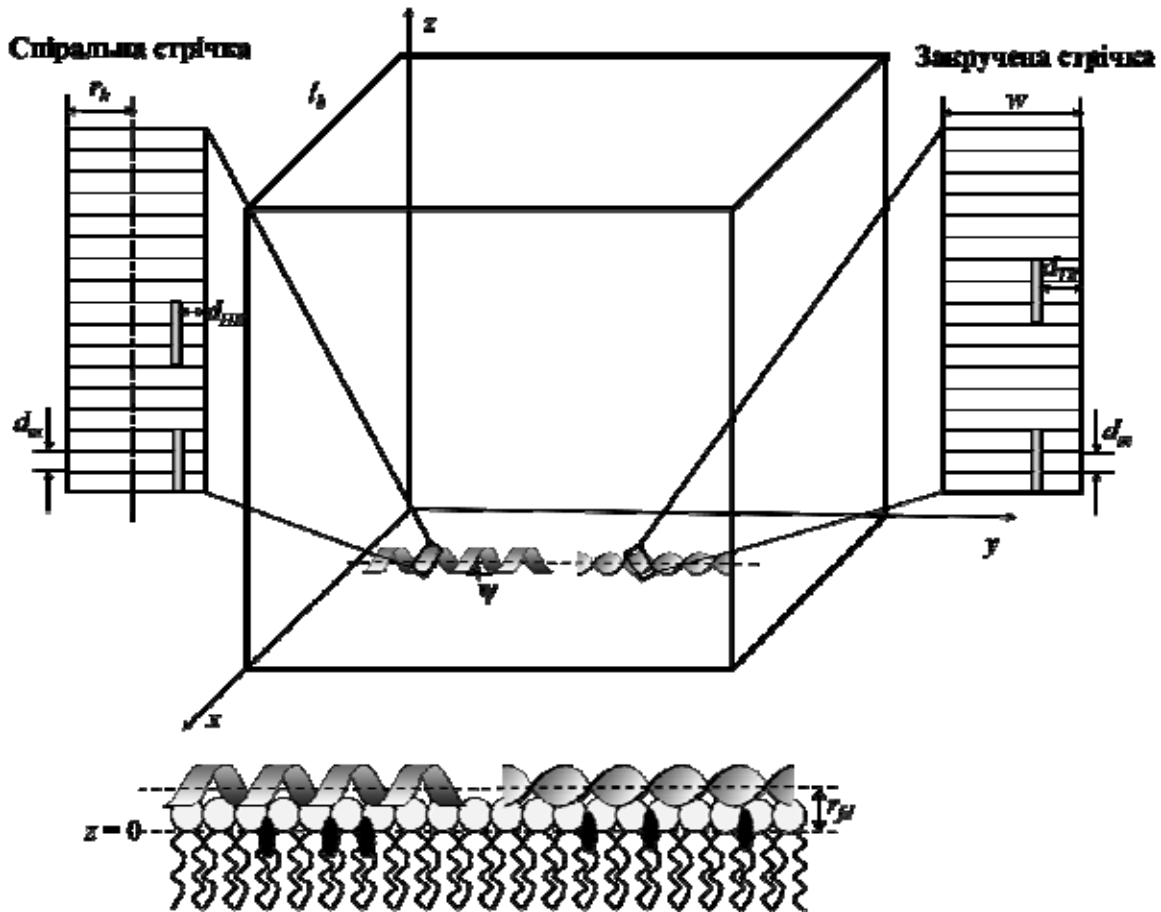


Рисунок 10. Схематичне зображення параметрів, що використовувались при теоретичному аналізі процесу ІРПЕ. Молекули Тіофлавіну Т зображені сірими прямокутниками, а Лаурдану – чорними овалами

При цьому враховували структурний поліморфізм амілоїдних фібрил, тобто гетерогенність центрів зв'язування Тіофлавіну Т, та внесок мембранозв'язаного зонду у загальний сигнал. Відносний квантовий вихід, усереднений по усім донорам розраховували як:

$$Q_r = \frac{1}{N_D} \sum_{j=1}^{N_D} \left[1 + \sum_{i=1}^{N_{AC}} \left(\frac{R_o^r k^2}{r_{ij}} \right)^6 \right]^{-1} \quad (5)$$

де N_D , N_{AC} – число донорів та акцепторів у боксі, відповідно, l_b – сторона квадратного боксу, яка дорівнювала $10 R_0$, R_0 – радіус Фьорстера, r_{ij} – відстань між j -

им донором та i -им акцептором, $R_o^r = 979(n_r^{-4}Q_D J)^{1/6}$, J – це інтеграл перекривання спектра випромінювання донора зі спектром поглинання акцептору, Q_D означає квантовий вихід донору.

Далі 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. 10). За умови, що вісь фібрили спрямована вздовж осі y , координати молекул Тіофлавіну Т, розподіленого у конформері ЗС, визначаються наступним чином:

$$\begin{aligned} X_{A_k} &= (l_b - 0.5w + d_{3C})N_R + (0.5w - d_{3C})\cos\left(\frac{2\pi d_m n_{3C} k}{P_{3C}}\right); & Y_{A_k} &= n_{3C} d_m k; \\ Z_{A_k} &= (0.5w - d_{3C})\sin\left(\frac{2\pi d_m n_{3C} k}{P_{3C}}\right) \end{aligned} \quad (6)$$

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 акцептора, d_{3C} – відстань від Тіофлавіну Т до краю протофіламенту у конфігурації ЗС, 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:

$$\begin{aligned} X_{A_i} &= (l_b - r_h)N_R + r_h \cos\left(\frac{2\pi d_h n_{CC} l}{P_{CC}}\right); & Y_{A_i} &= \frac{d_{CC}}{\cos\psi} + n_{CC} d_h l; & Z_{A_i} &= r_{fd} - r_h + r_h \sin\left(\frac{2\pi d_h n_{CC} l}{P_{CC}}\right); \\ P_{CC} &= 2\pi r_h \tan\psi \end{aligned} \quad (7)$$

де r_h – радіус спіралі, P_{CC} – крок спіральної стрічки, ψ – 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 акцептора, d_{CC} – відстань від Тіофлавіну Т до краю протофіламенту у конфігурації СС.

Однак, спираючись на припущення, що амілоїдні фібрили зберігають свою конформацію закрученої чи спіральної стрічки при асоціації з ліпідним бішаром, не вдалося знайти комбінацію параметрів (ступінь сорбції фібрил в конформації ЗС чи СС та відстань між донором та акцептором), здатну описати експериментальні профілі ІРПЕ.

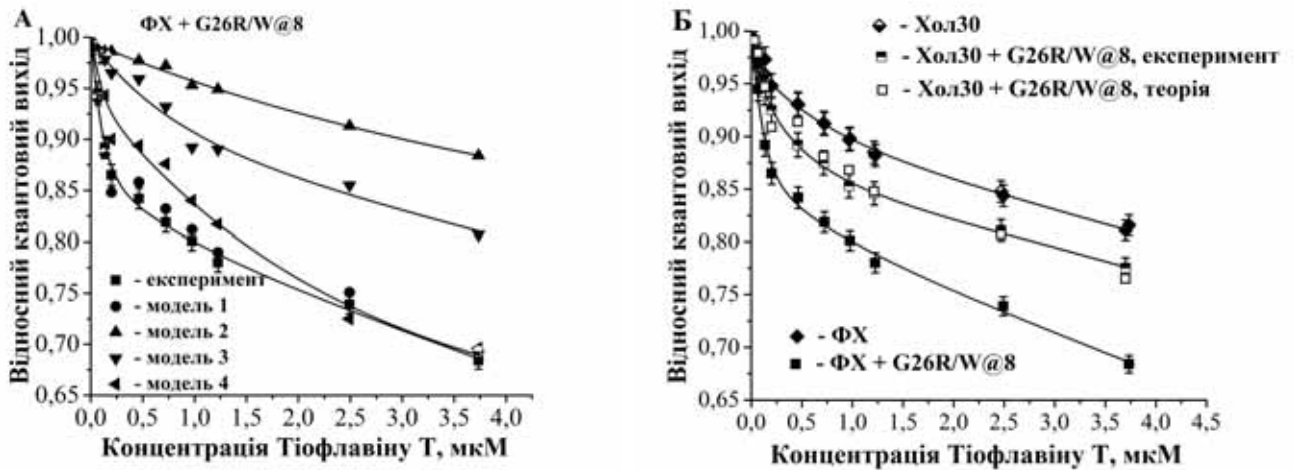


Рисунок 11. Відносний квантовий вихід Лаурдану у ΦX та Хол30 ліпосомах як функція концентрації Тіофлавіну Т у відсутності та присутності G26R/W@8. **А** – незафарбованими символами позначені значення Q_r , розраховані у рамках наступних моделей: *модель 1* – лінійне розташування акцепторів, орієнтаційний 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 ΦX та Хол30 систем. Незафарбованими квадратними символами позначені значення Q_r , розраховані у рамках *моделі 1* для системи Хол30+G26R/W@8

З огляду на це, була запропонована гіпотеза стосовно ліпід-індукованої структурної реорганізації фібрилярного варіанту G26R/W@8, що включає розкручування СС та ЗС. Насправді, як показано на рис. 11, розбіжність між експериментальними та теоретичними кривими істотно зменшується у припущенні, що акцептори, зв'язані з фібрилами, орієнтовані вздовж лінії паралельної поверхні мембрани. Така орієнтація акцептора можлива при локалізації Тіофлавіну Т у жолобках амілоїдних фібрил, розташованих на поверхні фібрили, паралельно її довгій осі. 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 набувають властивостей, проміжних між мембранною та фібрилярною фазами, а орієнтаційні характеристики Тіофлавіну Т як акцептору енергії для Лаурдану схожі з характеристиками мембранозв'язаних флуорофорів.

Розділ 7 «Моделювання процесу агрегації мембранозв'язаних білків» присвячений комп'ютерному аналізу різних аспектів ліпід-опосередкованої агрегації білків.

У рамках континуальних моделей адсорбції, що базуються на теоріях масштабованих частинок та подвійного електричного шару проведено чисельне

моделювання електростатично-контрольованої адсорбції білків на поверхні мембран при варіюванні наступних параметрів: i) концентрація білка та ліпиду; ii) ступінь олігомеризації та заряд білка; iii) вміст аніонного ліпиду; iv) рН та іонна сила. Аналіз теоретично розрахованих кривих показав, що характерною ознакою агрегації білків є зміна форми кривих зв'язування з Ленгмюрівської на сигмоїдну (рис. 12, А) чи асиметричну дзвоноподібну (рис. 12, Б) при зростанні ступеня олігомеризації поліпептиду.

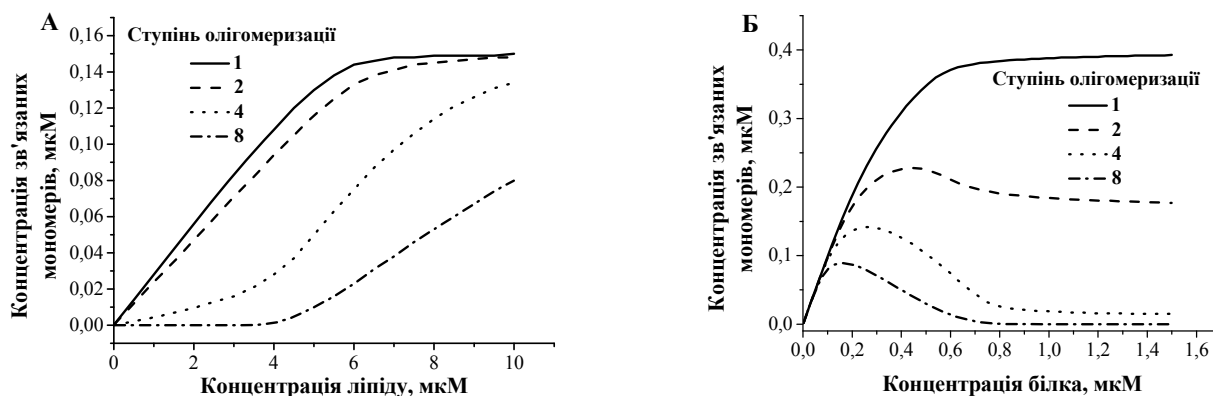


Рисунок 12. Ізотерми адсорбції зв'язаних мономерів при різних ступенях олігомеризації у випадку постійної концентрації білка (А) чи ліпиду (Б)

При цьому, найбільш інформативними виявились криві зв'язування, які віддзеркалюють зміну концентрації мономерів білка. Розроблена нова експериментальна стратегія, спрямована на підвищення інформативності аналізу ізотерм адсорбції при оцінці агрегаційної здатності мембранозв'язаних білків.

Таблиця 6

Структурні та термодинамічні параметри, які характеризують мембранну локалізацію та орієнтацію фібрил Lz та A-I

Кут закручування	ΔG , ккал/моль		Глибина*, Å		Кут нахилу	
	Lz1	A-I	Lz1	A-I	Lz1	A-I
0	-34	-26.8	7	2	89	88
5	-32	-23.4	5.1	2.1	90	88
10	-24	-18.8	4.4	3.6	989	87
15	-16	-14.9	4.2	4.3	87	83
20	-12.5	-11.9	2.5	4.1	89	79
25	-12.3	-9.9	2.1	4.4	90	81
30	-11	-8.5	1.7	5.3	90	74
35	-9.5	-8.3	1.5	2	89	87
40	-10.3	-8.9	1.7	1.4	90	85

* глибина проникнення у гідрофобну область ліпідного бішару

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. Фрагмент

вважався агрегаційним, якщо він був ідентифікований як мінімум чотирма методами прогнозування. Проведено порівняльний аналіз агрегаційних властивостей білків дикого типу та мутантів. Продемонстровано, що амілоїдогенні мутації лізоциму та аполіпопротеїну А-І не змінюють положення агрегаційно-компетентних ділянок, але підвищують їх агрегаційний потенціал.

З використанням серверів молекулярного докінгу PatchDock і FireDock, та програмних пакетів CreateFibril та AQUASOL сконструйовані амілоїдні фібрили пептидів лізоциму, аполіпопротеїну А-І і А β -пептиду, та проведена оцінка їх стабільності в залежності від кута закручування протофіламентів. Виявилось, що найвища стабільність притаманна фібрилам з кутом закручування 15-20°.

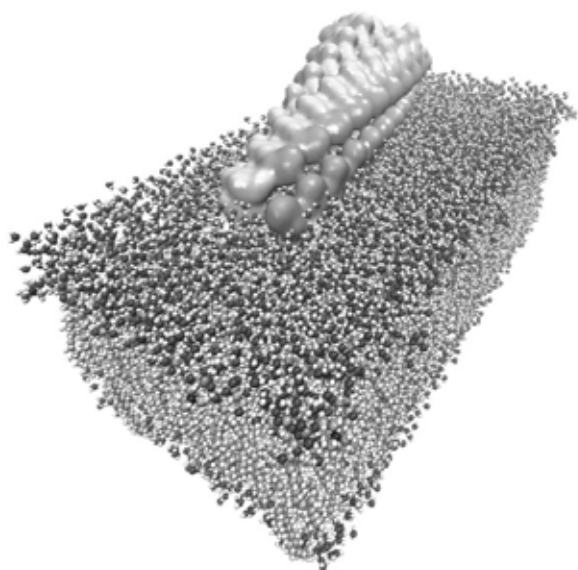


Рисунок 13. Репрезентативне зображення зв'язування амілоїдних фібрил з ліпідним бішаром, отримане за допомогою серверу PPM

Ці дані узгоджуються із загальноприйнятою моделлю структури фібрилярних агрегатів, згідно з якою протофіламенти закручуються таким чином, що періодична структура з 24 β -тяжів складає повний спіральний оберт навколо осі фібрили. При такій конфігурації кут закручування між сусідніми β -тяжами складає 15°.

На базі серверу PPM визначені параметри, що характеризують локалізацію та орієнтацію модельних фібрил відносно поверхні розділу ліпід/вода (табл. 6). Встановлено, що фібрили пептидів лізоциму та аполіпопротеїну А-І переважно орієнтуються паралельно поверхні мембрани (рис. 13). Продемонстровано,

що зростання кута закручування протофіламентів призводить до зменшення глибини занурення фібрилярних агрегатів в ліпідний бішар.

Методом молекулярної динаміки охарактеризована роль ліпідів в утворенні агрегаційно-компетентної конформації лізоциму, цитохрому *c* та N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-І. Аналіз змін вторинної структури лізоциму при його зв'язуванні з ліпідними бішарами, що склалися із ФХ та його сумішей із ФГ (10, 40 та 80 мол%), у часовому інтервалі 100 нс показав, що мембранозв'язаний стан білка характеризується підвищеним вмістом β -структур. Окрім цього, утворення білок-ліпідних комплексів супроводжувалось зростанням радіусу інерції лізоциму та зменшенням величини середньоквадратичних флуктуацій поліпептидного ланцюга. Отримані дані були інтерпретовані у рамках часткового розгортання молекули лізоциму на ліпідній матриці, ступінь якого зростала при підвищенні вмісту аніонного ліпиду ФГ. Продемонстровано, що як електростатичні, так і гідрофобні білок-ліпідні взаємодії є ключовими детермінантами мембрано-опосередкованої агрегації білка. На основі сукупності даних комп'ютерного моделювання вперше запропонована модель нуклеації амілоїдних фібрил лізоциму у мембранному оточенні.

Схожі ефекти були виявлені при дослідженні взаємодії N-термінального фрагменту апоА-I з ліпідним бішаром у часовому інтервалі 200 нс. Показано, що зв'язування апоА-I 83 з ФХ мембранами призводить до підвищення вмісту агрегаційно-компетентних елементів β -структури та зростання ступеня структурної невпорядкованості цього поліпептиду при наявності мутації G26R. Висунута гіпотеза про існування різних механізмів фібрилізації апоА 83 у розчині та на ліпідній матриці.

Амілоїдогенний потенціал цитохрому *c* виявився нижчим, порівняно з лізоцимом та апоА-I. Молекулярно-динамічне моделювання білок-ліпідних систем показало, що асоціація з мембранами супроводжується уширенням гемового карману цитохрому *c*, тоді як радіус інерції та величина середньоквадратичних флуктуацій поліпептидного ланцюга залишались практично незмінними.

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.

1. 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.
2. 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 в 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.
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Вперше охарактеризовані еластичні властивості амілоїдних фібрил N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-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 «спіральної стрічки» характеризується вищою жорсткістю у порівнянні із «закрученою стрічкою».
8. 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 А-I з мутацією G26R із конфігурацій закрученої чи спіральної стрічки до планарної конфігурації.

9. В рамках континуальних моделей адсорбції, що базуються на теорії масштабованих частинок та подвійного електричного шару, проведено 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.
10. Методом молекулярної динаміки вперше проведено дослідження ролі ліпідів в утворенні агрегаційно-компетентної конформації лізоциму, цитохрому *c* та N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I. Виявлено, що мембранозв'язаний стан лізоциму характеризується підвищеним вмістом β -структур. Отримані докази часткового розгортання молекули лізоциму на ліпідній матриці, ступінь якого зростала при підвищенні вмісту аніонного ліпиду. 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 β -структури при зв'язуванні N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I з ліпідними мембранами та зростання ступеня структурної невпорядкованості цього поліпептиду при наявності амілоїдогенної мутації G26R.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Trusova V. Chlorpromazine effect on lysozyme-lipid interactions / **V. Trusova** // Біофізичний Вісник. – 2008. – Т. 21, № 2. – С. 42-44.
2. 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.
3. 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.
4. Trusova V. Intrinsic fluorescence of lysozyme in model protein-lipid systems / **V. Trusova** // Біофізичний Вісник. – 2009. – Т. 22, № 1. – С. 62-67.
5. Trusova V. A novel squarylium dye for monitoring oxidative processes in lipid membranes / **V. Trusova**, G. Gorbenko, T. Deligeorgiev, N. Gadjev, A. Vasilev // J. Fluoresc. – 2009. – 19. – P. 1017-1023.
6. 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, P.K.J. Kinnunen // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1788. – P. 1358-1365.

7. Trusova V. Lipid-mediated lysozyme aggregation: Forster resonance energy transfer study / **V. Trusova** // Біофізичний Вісник. – 2010. – Т. 25, №2. – С. 40-46.
8. Trusova V. Cytochrome *c* – cardiolipin interactions: extended lipid anchorage revisited / **V. Trusova** // Біофізичний Вісник. – 2010. – Т. 24, № 1. – С. 59-63.
9. 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.
10. Trusova V. Forster resonance energy transfer evidence for lysozyme oligomerization in lipid environment / **V. Trusova**, G. Gorbenko, P. Sarkar, R. Luchowski, I. Akopova, L.D. Patsenker, O. Klochko, A. Tatarets, Yu. Kudriavtseva, E. Terpetschnig, I. Gryczynski, Z. Gryczynski // J. Phys. Chem. B. – 2010. – V. 114. – P. 16773-16782.
11. Trusova V. Cytochrome *c* – lipid interactions: new insight from resonance energy transfer / **V. Trusova**, G. Gorbenko, J. Molotkovsky, P.K.J. Kinnunen // Biophys. J. – 2010. – 99. – P. 1754-1763.
12. Trusova V. Morphological changes of supported lipid bilayers induced by lysozyme: planar domain formation vs. multilayer stacking / **V. Trusova**, G. Gorbenko, I. Akopova J.G. Molotkovsky, I. Gryczynski, J. Borejdo, Z. Gryczynski // Colloids Surf. B. – 2010. – V. 80. – P. 219-226.
13. Gorbenko G. New fluorescent probes for detection and characterization of amyloid fibrils / G. Gorbenko, **V. Trusova**, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina, A. Vasilev, S. Kaloyanova, T. Deligeorgiev // Chem. Phys. Lett. – 2010. – V. 495. – P. 275-279.
14. Kaloyanova S. Synthesis and fluorescence characteristics of novel asymmetric cyanine dyes for DNA detection / S. Kaloyanova, **V. Trusova**, G. Gorbenko, T. Deligeorgiev // J. Photochem. Photobiol. A. – 2011. – V. 217. – P. 147-156.
15. 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.
16. Gorbenko G. Protein aggregation in a membrane environment / G. Gorbenko, **V. Trusova** // Adv. Prot. Chem. Struct. Biol. – 2011. – V. 84. – P. 114-152.
17. Gorbenko G. Effect of oligomeric lysozyme on structural state of model membranes / G. Gorbenko, **V. Trusova** // Biophys. Chem. – 2011. – V. 154. – P. 73-81.
18. Trusova V. Novel benzanthrone aminoderivatives for membrane studies / **V. Trusova**, G. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, O. Zhytniakivska, P. Fedorov, G. Gorbenko // J. Fluoresc. – 2012. – V. 22. – P. 953-959.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Gorbenko G. The effect of lysozyme amyloid fibrils on cytochrome *c* – lipid interactions / G. Gorbenko, **V. Trusova**, R. Sood, J. Molotkovsky, P. Kinnunen // Chem. Phys. Lipids. – 2012. – V. 165. – P. 769-776.

23. Yudintseva A. Interaction of lysozyme amyloid fibrils with Langmuir monolayers / A. Yudintseva, **V. Trusova**, G. Gorbenko, R. Volinsky, R. Sood, P. Kinnunen // *J. Biol. Phys. Chem.* – 2013. – V. 13. – P. 77-84.
24. Trusova V. Modeling protein adsorption onto lipid monolayer surface / **V. Trusova** // *Біофізичний Вісник.* – 2013. – Т. 29, № 1. – С. 30-38.
25. 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, G. Gorbenko, T. Deligeorgiev // *J. Fluoresc.* – 2013. – V. 23. – P. 193-202.
26. Trusova V. Structural aspects of cytochrome *c* – cardiolipin interactions: Forster resonance energy transfer study / **V. Trusova**, J. Molotkovsky, P. Kinnunen, G. Gorbenko // *Cytochromes b and c: Biochemical properties, biological functions and electrochemical analysis.* – Nova Science Publishers. – 2014. – P. 173-223.
27. Trusova V. Interaction of europium chelates with lipid monolayers / **V. Trusova**, A. Yudintsev, O. Kutsenko, O. Pakhomova, R. Volinsky, G. Gorbenko, T. Deligeorgiev, P. Kinnunen // *East European J. Phys.* – 2014. – V. 1. – P. 100-105.
28. Trusova V. Membrane effects of N-terminal fragment of apolipoprotein A-I: a fluorescent probe study / **V. Trusova**, G. Gorbenko, M. Girych, E. Adachi, C. Mizuguchi, R. Sood, P. Kinnunen, H. Saito // *J. Fluoresc.* – 2015. – V. 25. – P. 253-261.
29. Gorbenko G. Interactions of lipid membranes with fibrillar protein aggregates / G. Gorbenko, **V. Trusova**, M. Girych, E. Adachi, C. Mizuguchi, H. Saito // *Springer Subcellular Biochemistry Series: Lipids in Protein Misfolding.* – 2015. – V. 855. – P. 135-155.
30. Trusova V. Modeling of amyloid fibril binding to the lipid bilayer / **V. Trusova** // *East European J. Phys.* – 2015. – V. 2. – P. 51-58.
31. Gorbenko G. FRET evidence for untwisting of amyloid fibrils on the surface of model membranes / G. Gorbenko, **V. Trusova**, M. Girych, E. Adachi, C. Mizuguchi, K. Akaji, H. Saito // *Soft Matter.* – 2015. – V. 11. – P. 6223-6234.
32. Trusova V. Protein fibrillar nanoparticles: molecular-level insights into their structural, physical and mechanical properties / **V. Trusova** // *Biophys. Rev. Lett.* – 2015. – V. 10. – P. 135-156.
33. 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.
34. Пат. 58045 Україна. МПК G01N 21/64 (2011.01). Спосіб детектування та характеризування 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.
35. **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.

36. **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.
37. **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 potencjal świata – 2008”*. – September 12-20, 2008. – Przemysł. – 2008. – P. 75-77.
38. **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.
39. **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.
40. **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.
41. **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.
42. **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.
43. 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.
44. **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.
45. **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.
46. **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.
47. **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.

48. **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.
49. **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.
50. **Trusova V.M.** Lipid bilayer-modifying effects of aggregated lysozyme // Матеріали докладов IV съезда биофизиков России. – 20-26 августа 2012 г. – Нижний Новгород. – 2012. – С. 335.
51. **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.
52. **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.
53. 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.
54. **Trusova V.M.**, Simulation-based analysis of protein adsorption onto nanoscale lipid monolayer // Proc. International Conference “Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects”. – 2013. – October 7-10, 2013. – Kharkov. – P. 103.
55. **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.
56. **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.
57. **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.
58. **Trusova V.** Lipid-assisted protein fibrillization: insights from fluorescence spectroscopy // Abstracts of 4th International Scientific and Technical Conference for Young Scientists “Luminescent processes in condensed state of matter”. – 2015. – October 7-9, 2015. – Kharkiv. – P. 21.
59. **Trusova V.**, Gorbenko G., Girych 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.

Трусова В.М. Білок-ліпідні взаємодії як модулятор агрегаційної поведінки білків. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2016.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі білок-ліпідних взаємодій у процесі патологічної агрегації білків. 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. Охарактеризовані структурні особливості фібрилярного лізоциму у розчині. Розроблено нову методологію визначення ступеня олігомеризації білків на мембранній матриці, що базується на комплексній інтерпретації даних стаціонарного і часороздільного міжмолекулярного переносу енергії. Розраховані параметри олігомеризації лізоциму у ліпідному оточенні – ступінь агрегації та відстань між мономерами в агрегаті. З використанням ряду флуоресцентних зондів охарактеризовано вплив префібрилярних та фібрилярних агрегатів лізоциму та N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I на структурно-динамічний стан та фізико-хімічні властивості модельних ліпідних мембран різного складу. 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 докази на користь структурної трансформації амілоїдних фібрил аполіпопротеїну А-I при асоціації з ліпідами. Методом молекулярної динаміки вперше проведено дослідження ролі мембран в утворенні агрегаційно-компетентної конформації лізоциму, цитохрому *c* та N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I.

Ключові слова: агрегація білків, амілоїдні фібрили, ліпідний бішар, індуктивно-резонансний перенос енергії, флуоресцентні зонди, мікроскопія, молекулярна динаміка

АННОТАЦІЯ

Трусова В.М. Белок-липидные взаимодействия как модулятор агрегационного поведения белков. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, 2016.

Диссертационная работа посвящена исследованию роли белок-липидных взаимодействий в процессе патологической агрегации белков. Предложен новый подход, который позволяет оценить структурные параметры амилоидных фибрилл, такие как молекулярный объем мономерной субъединицы и фрактальная размерность агрегатов, на основе измерений эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии между амилоид-специфичными флуорофорами. Охарактеризованы структурные особенности фибриллярного лизоцима в растворе. Разработана новая методология определения степени олигомеризации белков на мембранной матрице, которая основывается на комплексной интерпретации данных

стационарного и время-разрешенного межмолекулярного переноса энергии. Определены параметры олигомеризации лизоцима в липидном окружении – степень агрегации и расстояние между мономерами в агрегате. С использованием ряда флуоресцентных зондов охарактеризовано влияние префибриллярных и фибриллярных агрегатов лизоцима и N-терминального фрагмента аполипопротеина А-I на структурно-динамическое состояние и физико-химические свойства модельных липидных мембран различного состава. Разработана новая стратегия исследования топологических модификаций фибриллярных агрегатов, основанная на анализе результатов измерений ИРПЭ между мембраносвязанным флуорофором и амилоид-специфичным зондом методом Монте-Карло. Получены доказательства в пользу структурной трансформации амилоидных фибрилл аполипопротеина А-I при ассоциации с липидами. Методом молекулярной динамики впервые проведено исследование роли мембран в образовании агрегационно-компетентной конформации лизоцима, цитохрома *c* и N-терминального фрагмента аполипопротеина А-I.

Ключевые слова: агрегация белков, амилоидные фибриллы, липидный бислои, индуктивно-резонансный перенос энергии, флуоресцентные зонды, микроскопия, молекулярная динамика.

SUMMARY

Trusova V.M. Protein-lipid interactions as a modulator of protein aggregation behavior. – Manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Sciences in Physics and Mathematics by speciality 03.00.02 – Biophysics. – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2016.

Among a plethora of unique structural properties of polypeptide chain, its inherent propensity for self-assembly is currently in a focus of especially intense research efforts, representing a new frontier in unraveling the enigmas of protein molecules. Along with naturally occurring protein self-association, there exists so called pathological aggregation leading to the formation of amyloid fibrils. These are highly ordered assemblies with a core cross- β -sheet structure. During the past decade this type of protein aggregates attracts enormous interest due to its implication in pathogenesis of numerous disorders, including neurological diseases, type II diabetes, spongiform encephalopathies, *etc.* Accumulating evidence suggests that in biological environment protein self-associating tendency can be enhanced by cell membranes. A wealth of recent data corroborates the hypothesis that protein oligomers formed on a membrane template, serve as nuclei for amyloid fibril growth on the one hand, while on the other hand they represent toxic species producing membrane destabilization and subsequent cell death. Despite the great progress achieved in the field of lipid-assisted fibrillogenesis, the molecular details of this process still remain unclear. To this end, the present study was focused on elucidating the role of protein-lipid interactions in the process of pathological aggregation of protein molecules. The applicability of the novel fluorescent probes, aminoderivative of benzanthrone ABM, squaraine dye SQ-1 and polymethine dye V2 to identification and structural analysis of amyloid fibrils has been evaluated using the lysozyme (Lz) model system in which fibrillar aggregates have been formed in concentrated ethanol solution. The association constant, binding stoichiometry and molar fluorescence of the bound dye have been determined.

Resonance energy transfer measurements involving ABM–SQ-1 and SQ-1–V2 donor–acceptor pairs yielded the limits for fractal-like dimension of lysozyme fibrils. Intermolecular time-resolved and single-molecule Förster resonance energy transfer (FRET) have been employed to detect quantitatively the aggregation of lysozyme in the presence of lipid vesicles composed of phosphatidylcholine and its mixture with 5, 10, 20 or 40 mol% of phosphatidylglycerol. Upon the binding to PC, PG5 or PG10 liposomes Lz retained its native monomeric conformation, while increasing content of anionic lipid up to 20 or 40 mol% resulted in the formation of Lz aggregates. The structural parameters of protein self-assemblies (the degree of oligomerization, the distance between the monomers in protein aggregate) have been determined. Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) has been utilized to explore the Lz effect on the morphology of solid-supported lipid bilayers formed from PC and its mixture with anionic lipid cardiolipin. Kinetic TIRFM imaging of different systems revealed subtle interplay between lipid lateral segregation accompanied by the exchange of neutral and acidic lipids in the protein-lipid interaction zone, and the formation of lipid multilayer stacks. Using a wide range of fluorescent probes, the effect of prefibrillar and fibrillar Lz and N-terminal fragment of apolipoprotein A-I (apoA 83) on the structural state and physicochemical properties of model lipid membranes has been studied. The observed changes in the fluorescence characteristics of polarity-sensitive probes Prodan and DMC were interpreted in terms of partial dehydration of glycerol backbone under the influence of oligomeric and fibrillar Lz. In contrast, amyloid fibrils of apoA 83 induced the increase in hydration degree of lipid bilayer. The simulation-based analysis of FRET between the membrane fluorescent probe Laurdan as a donor and amyloid-specific dye Thioflavin T as an acceptor revealed untwisting of fibrillar assemblies on the membrane template. Evidence for face-on orientation and superficial bilayer location of the membrane-bound fragments of apoA 83 fibrils was obtained. Using adsorption models based on scaled particle and double layer theories the electrostatically-controlled protein adsorption onto membrane surface has been simulated for non-associating and self-associating ligands. The binding isotherms of monomeric and oligomeric protein species have been calculated over a range of variable parameters. Adsorption behavior of monomers appeared to be the most sensitive to the changes in the protein aggregation state. The hallmarks of the protein oligomerization are identified. Molecular dynamics simulation of different protein-lipid systems revealed that association of Lz and apoA 83 with lipid bilayers is followed by partial unfolding of the polypeptide chain and increase in the content of aggregation-prone β -structures.

Keywords: protein aggregation, amyloid fibrils, lipid bilayer, resonance energy transfer, fluorescent probes, microscopy, molecular dynamics.

Наукове видання

Трусова Валерія Михайлівна

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

Підписано до друку 28.03.2016 р. Формат 60×84/16
Друк офсетн. Ум. др. арк. 1,0. Зам. 095-16. Тираж 100 прим.

Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.
61022, м. Харків, вул. Трінклера, 2, корп. 1, к. 19, т. (057) 758-01-08, (066) 822-71-30
Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру видавців та виготовників
продукції серія ДК 3587 від 23.09.09 р.
