

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Ці примірники дисертації ідентичні
за змістом

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Голова спеціалізованої вченої ради ДФ 64.051.018

Баранник Євген 

Тарабара Уляна Костянтинівна

УДК 577.352.335.152

ДИСЕРТАЦІЯ

«СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ФІБРИЛЯРНИХ АГРЕГАТІВ БІЛКІВ»

Спеціальність 105 – «Прикладна фізика та наноматеріали»
(Галузь знань 10 – Природничі науки)

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.



У.К. Тарабара

Науковий керівник: Трусова Валерія Михайлівна, доктор
фізико-математичних наук, доцент

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Тарабара У. К. **Спектроскопічне та молекулярно-динамічне дослідження фібрилярних агрегатів білків.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 105 – Прикладна фізика та наноматеріали (Галузь знань 10 – Природничі науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вирішенню однієї з важливих проблем сучасної фізики біополімерів, пов'язаної із встановленням молекулярних механізмів структурного переходу білків із нативної конформації в агрегований фібрилярний стан. Мета роботи полягала у з'ясуванні закономірностей взаємодії нових флуорохромів з фібрилярними агрегатами білків та визначенні молекулярних детермінантів процесу фібрилізації. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Дослідити фотофізичні властивості та агрегаційну поведінку новосинтезованих гептаметинових та триметинових ціанінових барвників у розчині та у комплексі з білками методом абсорбційної спектроскопії.
2. Розвинути модель зсуву рівноваги між різними формами барвників у присутності мономерних та фібрилізованих білків.
3. Оцінити можливість диференціації між нативним і фібрилярним станами лізоциму та інсуліну за допомогою гепта- та триметинів методом флуоресцентної спектроскопії.
4. Здійснити дизайн донорно-акцепторних систем на основі класичного амілоїдного маркера Тіофлавіну Т, бензантронових і скварайнових хромофорів для каскадного переносу енергії на молекулярному скаффолді фібрил інсуліну та виявити найбільш ефективні медіатори кФРПЕ.

5. Визначити найбільш вірогідні сайти зв'язування ціанінових, бензантронових та сквараїнових барвників з амілоїдними фібрилами лізоциму та інсуліну методом молекулярного докінгу.
6. З використанням методу молекулярної динаміки виявити мутації, які сприяють переходу лізоциму та інсуліну в агрегаційно-компетентну конформацію.

Об'єкт досліджень – мономерні і фібрилізовані білки та їх комплекси з ціановими, бензантроновими та сквараїновими барвниками.

Предмет досліджень – зміни спектральних параметрів флуорохромів при їх взаємодії з амілоїдними фібрилами та агрегаційно-компетентні конформації білків.

Методи дослідження: абсорбційна спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, Фьорстерівський резонансний перенос енергії, флуоресцентна та електронна мікроскопія, методи комп'ютерного моделювання, молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, квантово-хімічні розрахунки. При обробці експериментальних даних застосовували чисельні методи, нелінійний регресійний аналіз та методи математичної статистики.

Проведено дослідження взаємодії нових гептаметинових (AK7-5 та AK7-6) та триметинових (AK3-1, AK3-3, AK3-5, AK3-7, AK3-8, AK3-11) ціанінових барвників з мономерною і фібрилярною формами лізоциму та інсуліну. Виявлені закономірності впливу різних форм білків на агрегаційну поведінку ціанінів у водній фазі. Було продемонстровано, що всі досліджувані барвники здатні розрізняти нативний та фібрилярний стани білкових молекул. Встановлено, що нативний лізоцим сприяє руйнуванню Н-агрегатів гептаметинів у розчині та утворенню модифікованих, здатних до флуоресценції асоціатів на поверхні білка, в той час як триметинові барвники, як правило, агрегували у присутності нефібрилізованого інсуліну, утворюючи нефлуоресцентні Н-агрегати. Зв'язування гептаметинових барвників з фібрилярним лізоцимом супроводжувалось зростанням поглинання мономерної смуги та зменшенням смуги Н-агрегатів. Було

запропоновано модель білок-індукованого зсуву рівноваги між мономерами, Н-димерами та Н-агрегатами гептаметинів при комплексоутворенні мономерів та димерів АК7-5 та АК7-6 з амілоїдними фібрилами, визначені термодинамічні константи процесу самоасоціації барвників та порядок агрегації. Показано, що мономери та Н-димери є домінуючими формами зв'язаних з фібрилами ціанінів.

Вперше охарактеризовані зміни флуоресцентних спектральних параметрів гептаметинових і триметинових ціанінових барвників при їх взаємодії з білками. Виявлено амілоїд-специфічне зростання квантового виходу триметинів порівняно з нативним білком і буферним розчином та батохромний зсув максимуму флуоресценції, який для фібрилярного інсуліну становив 9–22 нм. На основі порівняльного аналізу спектральних властивостей триметинових ціанінових барвників показано, що наявність ОН-груп аліфатичних замісників на атомі азоту в бензотіазоловій частині хромофору (АК3-7, АК3-8) суттєво зменшує амілоїдну чутливість. Виявлено, що триметин АК3-11 має найвищу специфічність до амілоїдів завдяки перетворенню нефлуоресцентних агрегатів у водному розчині та нефібрилізованому інсуліні у високофлуоресцентну мономерну форму в присутності фібрилярного інсуліну. Завдяки здатності до диференціації між мономерним та фібрилярним станами білкових молекул, нові ціанінові барвники можна рекомендувати як доповнення до існуючих амілоїдних маркерів. Продемонстровано, що значне зниження ступеня Н-агрегації ціанінів може слугувати одним із критеріїв наявності амілоїдних фібрил.

Вперше метод каскадного Фьорстерівського резонансного переносу енергії був застосований для ідентифікації фібрилярного стану білків та виявлення відмінностей у морфології амілоїдних агрегатів. Був здійснений дизайн чотирьоххромофornoї системи, що складалась з класичного амілоїдного маркера Тіофлавіну Т як головного донора, першого медіатора (диметиламінохалкону чи одного із серії бензантронів), другого медіатора (сквараїнового барвника SQ4) та сквараїнового барвника SQ1 як

термінального акцептора. Виявлено, що ефективність трьохетапного переносу енергії, а також ступінь підсилення флуоресценції термінального акцептора SQ1 були набагато вищими у фібрилах інсуліну, ніж у нефібрилізованому білку. Показано, що головний донор енергії, Тіофлавін Т, у поєднанні з досліджуваними медіаторами виступають ефективними ампліфікаторами спектрального відгуку SQ1. У чотирихромофорній системі спостерігався зсув максимуму випромінювання флуоресценції на ~ 200 нм (від 480 до 680 нм) в область оптичного вікна біологічних тканин, що створює передумови для підвищення точності і чутливості детектування амілоїдів внаслідок значного послаблення ефектів релеєвського і раманівського розсіювання та аутофлуоресценції біологічних зразків. Виявлені відмінності у величині ампліфікації флуоресценції кінцевого акцептора, та у значеннях ефективності переносу енергії в каскаді $\text{ThT} \rightarrow \text{ABM} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$ для інсулінових фібрил різної морфології, отриманих двома способами: а) шляхом інкубації білка за денатуруючих умов (рН 2.0, температура 65 °C); та б) за допомогою перемішування розчину білка на орбітальному ротаторі при температурі 37 °C. Ці дані вказують на можливість використання багатоетапного Фьорстерівського переносу енергії для виявлення структурних відмінностей фібрилярних агрегатів білків. При оптимізації хромофорного складу каскаду ФРПЕ встановлено, що бензантронові барвники з піперидиновим та морфоліновим циклами, а саме А6 та АВМ, є найбільш ефективними медіаторами переносу енергії. Отримані результати створюють підґрунтя для розвитку нових методів детектування та структурного аналізу амілоїдів на основі ФРПЕ, а також відкривають шлях для використання мультихромофорних ансамблів на амілоїдній матриці для розробки нанофотонних пристроїв.

Методом молекулярного докінгу показано, що, подібно до типових амілоїдних маркерів, досліджувані ціанінові, бензантронові та скварайнові барвники характеризуються здатністю зв'язуватись зі специфічними структурними елементами фібрилярних агрегатів – поверхневими жолобками

β -листів. Продemonстровано, що жолобок Gln15–Glu17 є найбільш енергетично вигідним сайтом зв'язування для досліджуваних барвників.

Встановлено, що амілоїдогенні мутації лізоциму та інсуліну можуть призводити як до глобальної структурної дестабілізації білків, так і до локальних модифікацій конформації та динаміки окремих областей поліпептидного ланцюга. На основі аналізу змін параметрів, таких як середньоквадратичне відхилення остову ланцюга, радіус інерції, площа поверхні, що доступна для розчинника, середньоквадратичні флуктуації та вміст вторинної структури, а також застосовуючи різні критерії, що характеризують втрату як третинної так і вторинної структур білка під час теплового розгортання, було виявлено, що залежно від часової еволюції інтегральних характеристик досліджувані амілоїдогенні мутанти лізоциму можна умовно розділити на три групи, в яких середньоквадратичне відхилення остову ланцюга, радіус інерції та площа поверхні, що доступна для розчинника, зростають швидше (Y54N та F57I/T70N), подібно (D67H та I56T) та повільніше (W64, F57I та T70N/W112R) у порівнянні з білком дикого типу.

Для більшості мутантів лізоциму виявлена вища гнучкість C- і D-спіралей порівняно з диким типом, за винятком W64R та Y54N, які призводили до помітного зменшення (W64R), або зростання (Y54N) рухливості майже всіх амінокислотних залишків. Аналіз еволюції вторинної структури показав, що α -домен лізоциму, як правило, є більш стабільним, ніж β -домен, хоча характер розгортання окремих α -спіралей залежить від мутації. Отримано докази на користь того, що мутації Y54N та F57I/T70N лізоциму та мутації Ser^{A13}+Glu^{B27} та Gln^{B18} інсуліну мають найбільш дестабілізуючий вплив на структуру білків.

У сукупності отримані результати підтверджують думку про те, що глобальна структурна дестабілізація амілоїдогенних мутантів не є єдиним детермінантом місфолдингу білків, а локальні зміни конформації та динаміки

поліпептидного ланцюга також можуть відігравати важливу роль у формуванні амілоїдних фібрил.

З практичної точки зору досліджені у роботі нові гепта- та триметинові ціанінові барвники можуть бути застосовані при розробці мультихромофорних та мультипараметричних тест-систем для диференціації між нативним та фібрилізованим станами білкових молекул. Запропонований метод ідентифікації амілоїдних фібрил, що базується на вимірюванні ефективності каскадного переносу енергії між амілоїд-специфічними хромофорами, важливий для розробки високочутливих методів медичної діагностики амілоїдних патологій *in vivo*, причому висока точність та інформативність цих методів будуть визначатись поєднанням переваг окремих флуорохромів, серед яких, зокрема, високий квантовий вихід головного донора та значний ефективний Стоксів зсув, що дозволить проводити діагностику в області низької аутофлуоресценції біологічних тканин. Отримані дані відкривають шлях до застосування методу кФРПЕ для структурного аналізу фібрилярних білкових агрегатів. Моделі та методичні підходи, що набули у роботі подальшого вдосконалення, можуть бути використані при тестуванні амілоїдної специфічності та чутливості новосинтезованих барвників.

Ключові слова: абсорбційна спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, ціанінові барвники, амілоїдні фібрили, лізоцим, інсулін, Фьорстерівський резонансний перенос енергії, молекулярна динаміка.

ABSTRACT

Tarabara U. K. Spectroscopic and molecular dynamic study of fibrillar aggregates of proteins. Qualification scholarly paper: a manuscript.

Thesis submitted for obtaining the Doctor of Philosophy degree in Natural Sciences, Speciality 105 – Applied physics and nanomaterials. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation addresses an important problem of modern physics of biopolymers concerning the elucidation of molecular mechanisms behind the protein structural transition from native conformation into aggregated fibrillar state. The goal of the study was to characterize the interaction of the novel fluorochromes with fibrillar protein aggregates and to uncover the molecular determinants of fibrillization process. To achieve this goal, the following tasks have been performed:

1. To investigate the photophysical properties and aggregation behavior of the newly synthesized heptamethine and trimethine cyanine dyes in solution and in complex with proteins using the absorption spectroscopy technique.
2. To develop the model describing the shift of equilibria between the different dye species in the presence of monomeric and fibrillized proteins.
3. To evaluate the possibility of differentiating between the native and fibrillar states of lysozyme and insulin based on the fluorescence measurements of the hepta- and trimethines.
4. To design the donor-acceptor systems consisting of the classical amyloid marker Thioflavin T, benzanthrone and squaraine chromophores for cascade energy transfer on the molecular scaffold of the insulin fibrils and to find the most effective mediators of cFRET.
5. Based on the molecular docking results, to define the most probable binding sites for the cyanine, benzanthrone and squaraine dyes on the amyloid fibrils of lysozyme and insulin.
6. Using the molecular dynamics simulation to ascertain the mutations favoring the transition of lysozyme and insulin into aggregation-competent conformation.

The object of the study – monomeric and fibrillized proteins and their complexes with cyanine, benzanthrone and squaraine dyes. The subject of the study – the changes in spectral parameters of fluorochromes upon their complexation with amyloid fibrils and aggregation-competent protein conformations. The methods of the study included absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, Förster resonance energy transfer, fluorescence and

electron microscopy, computer modeling, molecular docking and molecular dynamics, quantum-chemical calculations. The numerical methods, nonlinear regression analysis and mathematical statistics tools were employed to treat the experimental data. The interactions of the novel heptamethine (AK7-5, AK7-6) and trimethine (AK3-1, AK3-3, AK3-5, AK3-7, AK3-8, AK3-11) cyanine dyes with monomeric and fibrillar forms of lysozyme and insulin have been investigated. The effects of different protein forms on the cyanine aggregation behavior in aqueous phase have been ascertained. All examined dyes have been demonstrated to be capable of differentiating between the native and fibrillar states of protein molecules. It has been shown that native lysozyme favors the disruption of heptamethine H-aggregates in solution and formation of modified fluorescing associates on the protein surface, while the trimethine dyes usually form the non-fluorescing H-aggregates in the presence of non-fibrillized insulin. The binding of heptamethines to fibrillar lysozyme was followed by the increase of monomeric band coupled with the decrease of H-aggregates band. The model describing the shift of equilibria between the monomers, H-dimers and H-aggregates of heptamethines upon the complexation of monomers and dimers of AK7-5 and AK7-6 with amyloid fibrils has been proposed, the thermodynamic constants of the dye self-association and the order of aggregation have been determined. The monomers and H-dimers have been shown to be the predominant forms of fibril-bound cyanines. For the first time, the changes in the fluorescent spectral parameters of the heptamethine and trimethine cyanine dyes upon their interactions with proteins. The amyloid-specific increase of the quantum yield of trimethines compared to that of the native protein and buffer solution and bathochromic shift of the fluorescence maximum 9–22 nm in the presence of fibrillar insulin have been observed. The comparative analysis of the spectral properties of the trimethine dyes showed that the OH-groups of aliphatic substitutes on the nitrogen atom of benzothiazole part (AK3-7, AK3-8) give rise to the decrease of amyloid sensitivity. The trimethine AK3-11 has been shown to display the highest specificity to amyloids due to conversion of non-fluorescent

aggregates in aqueous phase and non-fibrillized insulin into highly fluorescent monomeric form in the presence of fibrillar insulin. Due to ability to differentiate between the monomeric and fibrillar states of protein molecules the novel cyanine dyes can be recommended as a complement to the existing amyloid markers. It has been demonstrated that the marked decrease of the extent of cyanine H-aggregation may serve as one of the criteria of amyloid formation.

For the first time the Förster resonance energy transfer has been employed to identify the fibrillar protein state and to bring out the morphological differences of amyloid aggregates. The four-chromophore systems consisting of the classical amyloid marker Thioflavin T as the principal donor, the first mediator (dimethylaminochalcone or one from the series of benzantrones), the second mediator (squaraine dye SQ4) and squaraine dye SQ1 as a terminal acceptor have been designed. The efficiency of three-step energy transfer and the fluorescence enhancement of the terminal acceptor SQ1 have been found to be much higher in the insulin fibrils than in the non-fibrillized protein. It has been shown that the main energy donor, Thioflavin T, in combination with the examined mediators can serve as effective amplifiers of SQ1 spectral response. In the four-chromophore system the shift of emission maximum (~ 200 nm, from 480 to 680 nm) towards the optical window of biological tissues has been observed, creating the prerequisites for increase of the accuracy and sensitivity of amyloid detection due to considerable attenuation of the Rayleigh and Raman scattering and autofluorescence of biological samples. The differences in the fluorescence amplification of the terminal acceptor and the energy transfer efficiencies in the cascade $\text{ThT} \rightarrow \text{ABM} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$ have been observed for the insulin fibrils of distinct morphology obtained by two ways: a) the protein incubation under denaturing conditions (pH 2.0, temperature 65 °C); and b) agitation of the protein solution on an orbital rotator at 37 °C. These findings point to the possibility of using the multistep Förster energy transfer for exploring the structural differences of fibrillar protein aggregates. While optimizing the chromophore composition of the FRET cascade it has been found that the benzanthrone dyes with piperidine and

morpholine cycles, viz. A6 and ABM serve as the most effective mediators of energy transfer. The results obtained provide a background for the development of new FRET-based approaches to detection and structural analysis of amyloids and open the way for applications of multichromophoric ensembles on amyloid matrix in nanophotonic devices.

Using the molecular docking technique it has been shown that, similar to the typical amyloid markers, the examined cyanine, benzanthrone and squaraine dyes tend to associate with specific structural elements of fibrillar aggregates – surface grooves of β -sheets. The groove Gln15–Glu17 has been demonstrated to be the most energetically favorable binding site for the dyes under study.

It has been found that the amyloidogenic mutations of lysozyme and insulin can bring about both the global structural destabilization of proteins and local modifications in conformation and dynamics of some fragments of polypeptide chain. Based on analyzing the changes in parameters, such as mean root square deviation, gyration radius, solvent accessible surface area, mean root square fluctuations and secondary structure content, and using different criteria characterizing the loss of tertiary and secondary protein structure upon thermal unfolding it has been shown that, depending on the time evolution of integral characteristics the examined amyloidogenic mutants of lysozyme can be tentatively divided into three groups, where the mean root square deviation, gyration radius and solvent accessible surface area grow faster (Y54N and F57I/T70N), similar (D67H and I56T) and slower (W64, F57I and T70N/W112R) compared to the wild type protein. Most lysozyme mutants displayed a higher flexibility of the C- and D-helices relative to WT protein, except W64R and Y54N that led to the noticeable decrease (W64R) or increase (Y54N) in mobility of almost all amino acid residues. The analysis of secondary structure evolution has shown that the α -domain of lysozyme is generally more stable than β -domain, although the ways of unfolding of α -helices depend on mutation. The evidence for the most pronounced destabilizing effect of the lysozyme mutations Y54N and F57I/T70N and the insulin mutations Ser^{A13}+Glu^{B27} and Gln^{B18} on the protein structure.

Overall, these results support the idea that the global structural destabilization of amyloidogenic mutants is not the only determinant of protein misfolding, the local alterations in conformation and dynamics of polypeptide chain may also play significant role in amyloid formation.

From the practical viewpoint, the examined hepta- and trimethine cyanine dyes can be used in the development of multichromophoric and multiparametric assays for differentiation between the native and fibrillar states of protein molecules. The proposed approach to identification of amyloid fibrils through measuring the efficiency of cascade energy transfer between the amyloid-specific chromophores is important for elaboration of highly sensitive methods of medical diagnostics in vivo, the high accuracy and informativeness of which will arise from the combination of advantages of individual fluorochromes, such as, in particular, high quantum yield of the main donor and significant effective Stokes shift, allowing to perform diagnostics in the region of low autofluorescence of biological tissues. The results obtained open the avenue for the applications of cFRET in the structural analysis of fibrillar protein aggregates. The models and methodological approaches developed in this study can be used in probing the amyloid specificity and sensitivity of newly synthesized dyes.

Key words: absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, cyanine dyes, amyloid fibrils, lysozyme, insulin, Forster resonance energy transfer, molecular dynamics.

Список публікацій здобувача за темою дисертації
Публікації, які відображають основні наукові результати дисертації

Публікації у фахових виданнях України

1. Tarabara U., Vus K., Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel cyanine dyes as potential amyloid probes: a fluorescence study // East. Eur. J. Phys. 2018. Vol. 5, No. 1. P. 41–46.
 URL: <https://periodicals.karazin.ua/eejp/article/view/10462>
(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).
2. Tarabara U., Trusova V., Vus K., Ryzhova O., Gorbenko G. Molecular dynamics study of amyloidogenic mutants of human lysozyme // East. Eur. J. Phys. 2018. Vol. 5, No. 4. P. 30–39.
 URL: <https://periodicals.karazin.ua/eejp/article/view/12203>
(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні статті).
3. Tarabara U., Shchuka M., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Three-step resonance energy transfer in insulin amyloid fibrils // East Eur. J. Phys. 2019. No. 4. P. 58–69.
 URL: <https://doi.org/10.26565/2312-4334-2019-4-06>
(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).

***Публікація у фаховому виданні України, що індексується в
наукометричній базі SCOPUS***

4. Tarabara U., Vus K., Shchuka M., Kirilova E., Kirilov G., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G., Deligeorgiev T. Cascade energy transfer in insulin amyloid fibrils doped by Thioflavin T, benzanthrone and squaraine dyes // East Eur. J. Phys. 2020. No. 1. P. 103–110.

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85088950557&origin=resultslist>

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, проведенні флуоресцентних вимірювань, інтерпретації результатів, написанні статті).

***Публікації у періодичних наукових виданнях країн, які входять до
Організації економічного співробітництва та розвитку, що входять до
міжнародної наукометричної бази SCOPUS***

5. Vus K., Tarabara U., Kurutos A., Ryzhova O., Gorbenko G., Trusova V., Gadjev N., Deligeorgiev T. Aggregation behavior of novel heptamethine cyanine dyes upon their binding to native and fibrillar lysozyme // Mol. Biosyst. 2017. Vol. 13. P. 970–980.

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85021741832&origin=resultslist>

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, підготовці зразків, проведенні експериментів, деконволюції спектрів поглинання барвників, інтерпретації результатів, написанні статті).

6. Zhytniakivska O., Kurutos A., Tarabara U., Vus K., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Probing the amyloid protein aggregates with unsymmetrical monocationic trimethine cyanine dyes // J. Mol. Liq. 2020. Vol. 311. Article number 113287.

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85084409710&origin=resultslist>

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні статті).

7. Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Benzanthrone dyes as mediators of cascade energy transfer in insulin amyloid fibrils // J. Mol. Liq. 2021. Vol. 324. Article number 115102.

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85098117856&origin=resultslist>

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

8. Tarabara U., Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Modulating effect of biomolecules on aggregation behavior of novel heptamethine dyes // Luminescent processes in condensed state of matter : 4th International Scientific and Technical Conference for Young Scientists, 07–09 October, 2015. : abstr. Kharkiv, 2015. P. 64. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірюванні та деконволюції спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*

9. Тарабара У. К. Фотофізичні властивості пентаметинових флуорофорів // Актуальні проблеми сучасної фізики : Студентська наукова конференція з прикладної фізики до 90-річчя Д. В. Волкова, 13 листопада 2015 р. : тези доп. Харків, 2015. С. 58–60. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірюванні та деконволюції спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*
10. Tarabara U., Ryzhova O., Trusova V., Kurutos A. The possibility of differentiating between native and amyloid-aggregated states of lysozyme with a novel heptamethine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : X International young scientists' conference, 2–4 December, 2015. : abstr. Kharkiv, 2015. P. 29. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірюванні та деконволюції спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*
11. Tarabara U. K., Vus K. O. Detection of lysozyme amyloid fibrils by the new heptamethine cyanine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : XI International young scientists' conference, 29 November – 2 December, 2016. : abstr. Kharkiv, 2016. P. 23–24. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірювання та деконволюція спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*
12. Tarabara U., Vus K., Trusova V., Gorbenko G. Quantitative description of lysozyme-modulated aggregation of heptamethine cyanine dye // II International Young Scientists Forum on Applied Physics and Engineering, 10–14 October, 2016.: abstr. Kharkiv, 2016, BMP 6. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірюванні та деконволюції спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*

13. Tarabara U. K., Vus K. O., Ryzhova O. A. Novel heptamethine cyanine dyes as potential amyloid markers // Biology: from a molecule up to the biosphere : XII International young scientists' conference, 29 November – 1 December, 2017. : abstr. Kharkiv, 2017. P. 20–21. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі результатів, написанні тез).*
14. Tarabara U. K. Fluorescence and molecular dynamic study of lysozyme amyloid fibrils // Актуальні проблеми сучасної фізики : Студентська наукова конференція з прикладної фізики до 55-річчя Фізико-технічного факультету, 24 листопада 2017 р. : тези доп. Харків, 2017. С. 62–64. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні молекулярно-динамічного моделювання білків, аналізі результатів, написанні тез).*
15. Tarabara U., Trusova V., Vus K. Molecular dynamic simulations of human lysozyme and its amyloidogenic mutants // Youth and progress of biology : The XIII International scientific conference for students and PhD students, 25–27 April, 2017. : abstr. Lviv, 2017. P. 20–21. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні молекулярно-динамічного моделювання білків, аналізі результатів, написанні тез).*
16. Tarabara U., Vus K., Ryzhova O., Gorbenko G., Trusova V. The mechanism of cyanine dye binding to lysozyme amyloid fibrils // Current chemical problems : X Ukrainian scientific conference for students and young scientists with international participation, 27–29 March, 2017. : abstr. Vinnytsia, 2017. P. 72. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі результатів, написанні тез).*
17. Tarabara U. K., Ryzhova O. A., Vus K. O. Spectroscopic detection of insulin amyloid fibrils by the new trimethine cyanine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : XIII International young scientists'

- conference, 28–30 November, 2018. : abstr. Kharkiv, 2018. P. 37–38.
(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).
18. Shchuka M., Tarabara U., Vus K., Zhytniakivska O., Kirilova E., Kirilov G., Trusova V., Gorbenko G., Deligeorgiev T. Multi-step energy transfer in insulin amyloid fibrils // VIII з'їзд Українського біофізичного товариства, 12–15 листопада 2019 р. : матер. чергового з'їзду. Київ – Луцьк, 2020. С. 26. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
19. Tarabara U. K., Vus K. O., Zhytniakivska O. A., Trusova V. M. H-aggregation of the novel trimethine cyanine dye as an indicator of the insulin amyloid transformation // Low temperature physics : X International conference for professionals and young scientists in memory of B. Verkin for his 100th birthday anniversary, 3–7 June, 2019. : abstr. Kharkiv, 2019. P. 128. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
20. Tarabara U. K., Kirilova E., Kirilov G., Vus K. O., Zhytniakivska O. A., Trusova V. M., Gorbenko G. P. Amyloid fibrils as a scaffold for cascade energy transfer // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Международная научная конференция, 17–19 июня 2020 г. : тезисы докл. Минск, 2020. С. 25. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
21. Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Shchuka M., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Benzanthrone dyes as mediators in three-step Förster energy transfer scaffolded by insulin amyloid fibrils //

- 62 International scientific conference of Daugavpils, 28–29 May, 2020. : abstr. Daugavpils, 2020. P. 37. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
- 22.Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V. Novel benzanthrone dye AZM as mediator of cascade energy transfer in insulin fibrils // Problems and achievements of the modern chemistry : XXI Scientific Youth Conference, 7–8 May, 2020. : abstr. Odessa, 2020. P. 51. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
- 23.Tarabara U., Shchuka M., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Cascade energy transfer between benzothiazole, benzanthrone and squaraine dyes in beta-structured protein aggregates // Current chemical problems : III International scientific conference for students and young scientists, 25–27 March, 2020. : abstr. Vinnytsya, 2020. P. 27. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації

- 24.Tarabara U., Ryzhova O., Vus K., Kurutos A., Trusova V., Gorbenko G., Gadjiev N., Deligeorgiev T. Novel trimethine cyanine dye as potential amyloid marker // East. Eur. J. Phys. 2018. Vol. 5, No. 4. P. 22–29.
URL: <https://periodicals.karazin.ua/eejp/article/view/12201>
(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні статті).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	23
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1 ОСОБЛИВОСТІ САМООРГАНІЗАЦІЇ БІЛКІВ У ФІБРИЛЯРНІ АГРЕГАТИ.....	31
1.1 Процеси фолдингу та місфолдингу поліпептидного ланцюга.....	31
1.1.1 Загальні механізми фолдингу	31
1.1.2 Фолдинг білка в клітині	34
1.1.3 Агрегація білка як наслідок процесів місфолдингу.....	36
1.2 Структурні особливості фібрилярних агрегатів білків.....	41
1.3 Амілоїдні фібрили як новий клас біосумісних наноматеріалів	45
1.3.1 Нанорозмірні системи доставки лікарських засобів на основі амілоїдів	46
1.3.2 Дизайн нанорозмірних біомолекулярних проводів.....	47
1.3.3 Амілоїдні фібрили як функціональні матриці	48
1.4 Детектування амілоїдних фібрил за допомогою специфічних флуорохромів	49
1.5 Особливості амілоїдної трансформації лізоциму та інсуліну.....	53
1.5.1 Амілоїдогенні мутації лізоциму	53
1.5.2 Особливості фібрилогенезу інсуліну	55
Висновки до розділу 1	60
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	61
2.1 Матеріали	61
2.2 Об'єкти дослідження.....	61
2.2.1 Амілоїдні фібрили лізоциму	61
2.2.2 Амілоїдні фібрили інсуліну.....	63
2.2.3 Флуоресцентні зонди	65
2.3 Вимірювання спектрів абсорбції та флуоресценції. Методи обробки спектральних даних.....	68
2.3.1 Вимірювання спектрів абсорбції	68

	21
2.3.2 Вимірювання флуоресценції	69
2.3.3 Деконволюція спектрів поглинання та флуоресценції	70
2.3.4 Метод Фьорстерівського резонансного переносу енергії	71
2.4 Методи комп'ютерного моделювання та обробки даних	75
2.4.1 Метод молекулярного докінгу	76
2.4.2 Квантово-хімічні розрахунки	79
2.4.3 Молекулярно-динамічне моделювання	79
Висновки до розділу 2	80
РОЗДІЛ 3 АМІЛОЇДНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ НОВИХ ЦІАНІНОВИХ БАРВНИКІВ ЗА ДАНИМИ МЕТОДІВ АБСОРБЦІЙНОЇ ТА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ.....	82
3.1 Особливості зв'язування нових гептаметинових ціанінових барвників з нативним та фібрилярним лізоцимом	82
3.1.1 Аналіз спектрів поглинання гептаметинових барвників у присутності нативного білка	87
3.1.2 Аналіз спектрів поглинання гептаметинових барвників у присутності амілоїдних фібрил лізоциму	92
3.1.3 Особливості спектрів флуоресценції гептаметинів при взаємодії барвників з нативним та фібрилярним лізоцимом	97
3.1.4 Можливі сайти зв'язування нативного та фібрилярного лізоциму для гептаметинових барвників.....	100
3.2 Дослідження взаємодії нових триметинових ціанінових барвників з амілоїдними фібрилами інсуліну та лізоциму	104
3.2.1 Зміни спектральних властивостей триметинових ціанінових барвників при зв'язуванні з різними конформерами лізоциму та інсуліну	104
3.2.2 Деконволюція спектрів поглинання триметинів	115
3.2.3 Можливі сайти зв'язування триметинових ціанінових зондів з інсуліном та лізоцимом	130
Висновки до розділу 3	135

РОЗДІЛ 4 БЕНЗАНТРОНОВІ БАРВНИКИ ТА ДМХ ЯК МЕДІАТОРИ В БАГАТОЕТАПНОМУ ПЕРЕНОСІ ЕНЕРГІЇ В АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛАХ ІНСУЛІНУ	137
4.1 Класичний зонд ДМХ як медіатор в каскадному переносі енергії ...	138
4.2 Оцінка специфічності хромофорів кФРПЕ до морфології фібрил....	148
4.3 Каскадний перенос енергії в амілоїдних фібрилах інсуліну, допованих тіофлавіном Т, бензантроновими та скварайновими барвниками	154
4.3.1 Спектральна поведінка досліджуваних хромофорів.....	155
4.3.2 Характеристики донорно-акцепторних пар трьохетапного ФРПЕ	157
4.3.3 Ампліфікація флуоресценції акцептора шляхом послідовного додавання донорів	160
4.3.4 Визначення ефективності переносу енергії за даними гасіння флуоресценції донора в присутності акцептора	164
4.3.5 Відстані між хромофорами та можливі сайти зв'язування на фібрилах інсуліну	171
Висновки до розділу 4	176
РОЗДІЛ 5 МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АМІЛОЇДОГЕННИХ МУТАНТІВ ЛІЗОЦИМУ ТА ІНСУЛІНУ	178
5.1 Результати МД моделювання амілоїдогенних мутантів лізоциму	178
5.2 МД симуляція мутантів інсуліну	187
Висновки до розділу 5	201
ВИСНОВКИ.....	204
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	206
ДОДАТОК А Список публікацій здобувача за темою дисертації	256

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ФРПЕ	Фьорстерівський резонансний перенос енергії
кФРПЕ	Каскадний Фьорстерівський резонансний перенос енергії
ЯМР	ядерний магнітний резонанс
АСМ	атомно-силова мікроскопія
ТЕМ	трансмісійна електронна мікроскопія
ThT	Тіофлавін Т
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМХ	4-диметиламінохалкон
ІнсФ1	Амілоїдні фібрили інсуліну, отримані при рН 2
ІнсФ2	Амілоїдні фібрили інсуліну, отримані при нейтральному рН
ББ	Бензантроновий барвник
МД	Молекулярна динаміка
ДТ	Дикий тип білка
СКВ	Середньоквадратичне відхилення остову поліпептидного ланцюга від рівноважних значень
СКФ	Середньоквадратичні флуктуації C_{α} -атомів
РІ	Радіус інерції
ППДР	Площа поверхні, що доступна для розчинника
ФЧА	Фактор чутливості до амілоїдів
ПШПМ	Повна ширина на половині максимуму

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Однією із актуальних проблем сучасної фізики біополімерів є визначення загальних та специфічних детермінантів процесу нуклеаційно-залежної самоасоціації поліпептидних ланцюгів, що супроводжується утворенням особливого класу білкових агрегатів, амілоїдних фібрил. На атомному рівні, характерною ознакою таких агрегатів є наявність β -складчатого остову, а на мезоскопічному рівні їх топологія варіює від одновірних структур із трансляційною симетрією до трьохвірних скаффолдів [25, 26]. Процес фібрилізації білків наразі знаходиться у фокусі інтенсивних досліджень, що обумовлено двома головними чинниками: а) встановленням кореляції між утворенням амілоїдів та розвитком цілої низки патологій, включаючи нейродегенеративні захворювання, діабет другого типу, системний амілоїдоз, тощо; та б) унікальними фізичними властивостями амілоїдних фібрил, що відкриває широкі перспективи їх застосування у біомедицині, наноелектроніці та нанофотоніці як нового класу наноматеріалів [27]. Один із основних методів детектування фібрилярних білкових агрегатів базується на використанні флуорохромів, яким притаманні амілоїд-специфічні зміни спектральних параметрів. Незважаючи на велику кількість амілоїдних маркерів, нагальним залишається питання удосконалення існуючих тест-систем. У цьому контексті особливу увагу привертають довгохвильові органічні барвники, нечутливі до інтерферуючого впливу релеївського та раманівського розсіювання світла та аутофлуоресценції біологічних зразків. Іншим важливим аспектом проблеми ідентифікації та структурного аналізу амілоїдних фібрил є розвиток нових флуоресцентних методів, придатних для застосування як *in vitro* так і *in vivo*. До числа таких методів відноситься, зокрема, Фьорстерівський резонансний перенос енергії (ФРПЕ).

Дослідження фібрилярних білкових агрегатів до цього часу обмежувались використанням тільки одноетапного ФРПЕ [28]. Водночас, остов амілоїдних фібрил з бета-складчатою структурою є ефективним

скаффолдом для хостингу донорів та акцепторів, здатних утворювати ланцюг переносу енергії. З огляду на це, перспективним напрямом досліджень є оцінка можливості використання каскадного ФРПЕ для детектування та характеристики фібрилізованих білків.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась на кафедрі ядерної і медичної фізики (з 2019 року – кафедри медичної фізики та біомедичних нанотехнологій) Науково-навчального інституту «Фізико-технічний факультет» Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна у відповідності з планом науково-дослідних робіт кафедри за темами НДР: номер держреєстрації 0120U101064 «Новітні наноматеріали на основі ліофільних самоасоційованих систем: теоретичне прогнозування, експериментальне дослідження та біомедичні застосування» (здобувач – виконавець); номер держреєстрації 0117U004966 «Нано- та мікророзмірні ліофільні та ліофілізовані самоасоційовані системи: використання у сучасних технологіях та біомедицині» (здобувач – виконавець); номер держреєстрації 0116U000937 «Розробка нових методів флуоресцентної діагностики амілоїдних патологій» (здобувач – виконавець).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у з'ясуванні механізмів взаємодії нових флуорохромів з фібрилярними агрегатами білків та визначенні молекулярних детермінантів процесу фібрилізації. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- Дослідити фотофізичні властивості та агрегаційну поведінку новосинтезованих гепта- та триметинових ціанінових барвників у розчині та у комплексі з білками методом абсорбційної спектроскопії.
- Розвинути модель зсуву рівноваги між різними формами барвників у присутності мономерних та фібрилізованих білків.
- Оцінити можливість диференціації між нативним і фібрилярним станами лізоциму та інсуліну за допомогою гепта- та триметинів методом флуоресцентної спектроскопії.

- Здійснити дизайн донорно-акцепторних систем на основі класичного амілоїдного маркера Тіофлавіну Т, бензантронових і сквараїнових хромофорів для каскадного переносу енергії на молекулярному скаффолді фібрил інсуліну та виявити найбільш ефективні медіатори кФРПЕ.
- Визначити найбільш вірогідні сайти зв'язування ціанінових, бензантронових та сквараїнових барвників з амілоїдними фібрилами лізоциму та інсуліну методом молекулярного докінгу.
- З використанням методу молекулярної динаміки виявити мутації, які сприяють переходу лізоциму та інсуліну в агрегаційно-компетентну конформацію.

Об'єкт досліджень – мономерні й фібрилізовані білки та їх комплекси з ціановими, бензантроновими та сквараїновими барвниками.

Предмет досліджень – зміни спектральних параметрів флуорохромів при їх взаємодії з амілоїдними фібрилами та агрегаційно-компетентні конформації білків.

Методи дослідження: абсорбційна та флуоресцентна спектроскопія (охарактеризовано зміни спектральних параметрів гептаметинових та триметинових ціанінових барвників при їх взаємодії з білками), Фьорстерівський резонансний перенос енергії (ФРПЕ, застосований для ідентифікації фібрилярного стану білків в розробленій тест-системі, що складалась із чотирьох хромофорів, та виявлення відмінностей у морфології амілоїдних агрегатів), флуоресцентна та електронна мікроскопія (підтверджувалась наявність амілоїдних фібрил), методи комп'ютерного моделювання (використовували для чисельного моделювання та оптимізації теоретичних значень параметрів), молекулярного докінгу (використовувався для ідентифікації можливих сайтів зв'язування барвників з нативним та фібрилярним білком), та молекулярної динаміки (визначали вплив амілоїдогенних мутантів на структурно-динамічні властивості та стабільність

людського лізоциму та інсуліну), квантово-хімічні розрахунки (проводились для оптимізації геометрії конформацій барвників та отримання квантово-хімічних характеристик). При обробці експериментальних даних застосовували чисельні методи, нелінійний регресійний аналіз та методи математичної статистики.

Наукова новизна результатів роботи:

- Вперше охарактеризована агрегаційна поведінка нових гепта- та триметинових ціанінових барвників у комплексі з мономерними та фібрилізованими білками, отримані докази зменшення ступеня Н-агрегації гептаметинів у присутності фібрилярного лізоциму та запропонована модель зсуву рівноваги між різними формами барвника.
- Вперше охарактеризовані зміни флуоресцентних спектральних параметрів гепта- та триметинів при їх взаємодії з білками та виявлено амілоїд-специфічне зростання квантового виходу та батохромний зсув максимуму флуоресценції триметинів.
- Вперше на основі порівняльного аналізу спектральних властивостей триметинів показано, що наявність ОН-груп аліфатичних замісників на атомі азоту бензотіазолового кільця призводить до зниження амілоїдної чутливості цих барвників.
- Вперше метод каскадного Фьорстерівського переносу енергії застосовано для ідентифікації фібрилярного стану білків та виявлення відмінностей у морфології амілоїдних фібрил.
- Вперше продемонстровано, що амілоїдогенні мутації лізоциму та інсуліну можуть спричиняти зміни структурних параметрів білкових молекул як на глобальному, так і на локальному рівнях.

Практичне значення отриманих результатів. Досліджені у роботі нові гепта- та триметинові ціанінові барвники можуть бути застосовані при розробці мультихромофорних та мультипараметричних тест-систем для диференціації між нативним та фібрилізованим станами білкових молекул.

Запропонований метод ідентифікації амілоїдних фібрил, що базується на вимірюванні ефективності каскадного переносу енергії між амілоїд-специфічними хромофорами, важливий для розробки високочутливих методів медичної діагностики амілоїдних патологій *in vivo*, причому висока точність та інформативність цих методів будуть визначатись поєднанням переваг окремих флуорохромів, серед яких, зокрема, високий квантовий вихід головного донора та значний ефективний Стоксів зсув, що дозволить проводити діагностику в області низької аутофлуоресценції біологічних тканин. Отримані дані відкривають шлях до застосування методу кФРПЕ для структурного аналізу фібрилярних білкових агрегатів. Розвинуті у роботі моделі та методичні підходи можуть бути використані при тестуванні амілоїдної специфічності та чутливості новосинтезованих барвників.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою самостійно проведені всі серії експериментів, молекулярне-динамічне моделювання, молекулярний докінг, проаналізовані експериментальні та теоретичні результати і сформульовано висновки. Визначення мети та завдань дослідження, дизайн експериментів, обговорення та інтерпретація отриманих даних здійснювались спільно з науковим керівником та співавторами наукових публікацій. В опублікованих зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає: у роботах [4, 7, 17–23] – робота з джерелами наукової літератури, приготування зразків, проведення флуоресцентних вимірювань, обробка спектроскопічних даних, участь у обговоренні результатів, написання статей та тез; у роботах [1–3, 5, 6, 13, 16, 24] – приготування зразків, отримання та обробка спектроскопічних даних, участь у написанні статей та тез; у роботах [8–12] – вимірювання та деконволюція спектрів поглинання барвників, написання тез; у роботах [14, 15] – проведення молекулярно-динамічного моделювання, аналіз та обговорення результатів, участь у підготовці тез.

Апробація матеріалів дисертації. Основні результати досліджень були представлені, обговорені і опубліковані в тезах доповідей вітчизняних та міжнародних наукових конференцій: Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, Беларусь, 2020); The 62-th International scientific conference of Daugavpils (Daugavpils, Latvia, 2020); The XXI Scientific Youth Conference “Problems and achievements of the modern chemistry” (Odessa, Ukraine, 2020); III International (XIII Ukrainian) scientific conference for students and young scientists “Current Chemical Problems” (Vinnytsia, Ukraine, 2020); VIII з’їзді Українського біофізичного товариства (Київ – Луцьк, Україна, 2019); X International conference for professionals and young scientists “Low temperature physics” in memory of B.Verkin for his 100th birthday anniversary (Kharkiv, Ukraine, 2019); XIII, XII, XI, X Міжнародних конференціях молодих науковців «Біологія від молекули до біосфери» (Харків, Україна, 2018; Харків, Україна, 2017; Харків, Україна, 2016; Харків, Україна, 2015); The X Ukrainian scientific conference for students and young scientists with international participation “Current chemical problems” (Vinnytsia, Ukraine, 2017); Студентській науковій конференції з прикладної фізики «Актуальні проблеми сучасної фізики» до 55-річчя Фізико-технічного факультету (Харків, Україна, 2017); The XIII International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology” (Львів, Україна, 2017); The II International Young Scientists Forum on Applied Physics and Engineering (Kharkiv, Ukraine, 2016); 4-th International Scientific and Technical Conference for Young Scientists “Luminescent processes in condensed state of matter” (Kharkiv, Ukraine, 2015); Студентській науковій конференції з прикладної фізики «Актуальні проблеми сучасної фізики» до 90-річчя Д. В. Волкова (Харків, Україна, 2015).

Публікації. Основні результати дисертаційної роботи опубліковано в 24 наукових працях, з них 3 статті в фахових виданнях України [1–3], 1 стаття в фаховому виданні України, що індексується в наукометричній базі

SCOPUS [4], 3 статті у періодичних наукових виданнях країн, які входять до Організації економічного співробітництва та розвитку, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS [5–7], 16 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях [8–23] та одна стаття, яка додатково відображає наукові результати дисертації [24].

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел та 1 додатку. Загальний обсяг дисертації складає 262 сторінки. Дисертація містить 67 рисунків, 17 таблиць. Список використаних джерел містить 468 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОСОБЛИВОСТІ САМООРГАНІЗАЦІЇ БІЛКІВ У ФІБРИЛЯРНІ АГРЕГАТИ

1.1 Процеси фолдингу та місфолдингу поліпептидного ланцюга

1.1.1 Загальні механізми фолдингу

Процес утворення функціонально активних білків в живій клітині поділяється на два етапи: синтез та згортання (фолдинг). Наразі, перший етап, що являє собою послідовне копіювання одномірної генетичної інформації, хоч і є складним по своїй суті, але досить добре охарактеризований. Однак, молекулярні механізми білкового фолдингу, незважаючи на численні дослідження, все ж залишаються недостатньо вивченими [29]. Фолдинг білка є фізичним процесом, в ході якого макромолекула із безлічі можливих конформацій, що забезпечуються поворотами навколо зв'язків $N-C_{\alpha}$ та $C_{\alpha}-C$, вибирає за «біологічно розумний» час одну стабільну конформацію, ідентичну (з точністю до теплових флуктуацій) для всіх молекул даного білка, відому як нативний стан («парадокс Левенталя») [30]. Лише при досягненні цього стану білкова молекула набуває здатності виконувати свою функцію [31]. Відомо, що дана унікальна просторова структура закодована в амінокислотній послідовності [32–34], однак виявилось, що неможливо знайти прості послідовності гідрофобних, полярних, заряджених чи ароматичних амінокислот, що могли б передбачати просторові структури та стабільність білків [35]. Твердження, що подібні амінокислотні послідовності мають схожу нативну структуру, сприяло інтенсивному розвитку комп'ютерного моделювання фолдингу білка та дизайну нових структур [35, 36].

Однією з перших моделей, яка описує процес формування нативної білкової структури, була модель згортання білка шляхом утворення інтермедіатних станів, запропонована у 1973 році О. Птіциним [37]. Він

припустив, що згортання білка незворотнім чином проходить кілька етапів: спочатку утворюються елементи вторинної структури, потім вони компактизуються в нативноподібну глобулу, після чого відбувається фінальна кристалізація структури. Таким чином, білок при досягненні своєї «суперстабільної» нативної конформації проходить через кілька стабільних інтермедіатних станів, один з яких широковідомий як стан розпавленої глобули [38]. Наразі дана теорія дещо видозмінилась, оскільки було встановлено, що процес фолдингу білка є зворотнім [32, 39, 40], а також виявилось, що саме стабільних інтермедіатних станів, особливо для невеликих глобулярних білків, може взагалі не спостерігатись на шляху досягнення білком свого нативного стану [39, 40]. Експериментальне підтвердження існування інтермедіатних станів було отримано при дослідженні фолдингу таких білків, як людський сироватковий альбумін [41], рибонуклеаза [42], α - та β -лактальбумін [43–45], апоміоглобін [43, 46, 47], убіквітин [48] та інші [49].

З термодинамічної точки зору фолдинг білка є фазовим переходом першого роду, який відбувається за принципом «все або нічого», тобто макромолекула може існувати у двох станах: денатурованому або нативному, що розділені енергетичним бар'єром [50]. На сьогоднішній день, найбільш розповсюдженою моделлю, що добре ілюструє процес згортання білка є модель енергетичної воронки (Рис. 1.1) [51–53]. Згідно з даною моделлю, залежність вільної енергії від конформації поліпептидного ланцюга утворює енергетичну поверхню фолдингу білка, на вигляд якої впливають різноманітні рушійні сили та стеричні обмеження [54–55]. Виділяють наступні фактори впливу: 1) водневі зв'язки, що забезпечують стабільність таких вторинних структур, як α -спіралі та β -листи; 2) ван-дер-ваальсові взаємодії, що впливають на взаємне розташування атомів в білковій глобулі; 3) електростатичні взаємодії між негативно та позитивно зарядженими амінокислотними залишками; 4) гідрофобні взаємодії, що обумовлюють локалізацію гідрофобних залишків ближче до ядра макромолекули, а

полярних – на поверхні білка; 5) переважання деяких значень торсійних кутів та 6) протидіючий вплив значного зменшення ентропії поліпептидного ланцюга, що виникає внаслідок колапсу безлічі можливих конфігурацій білка в денатурованому стані в єдину нативну конформацію [35, 56]. При дослідженні ентропії поліпептидного ланцюга під час згортання модельних полімерів, було виявлено, що станам з більш компактною та низькоенергетичною структурою відповідає менша кількість конформацій [54, 35], що вказує на звуження енергетичної поверхні при досягненні нативного стану, тобто енергетичний ландшафт нагадує багатовимірну воронку, внизу якої знаходиться нативна структура [53, 57]. Таким чином, незважаючи на існування локальних мінімумів та бар'єрів, глобальний енергетичний нахил сприяє ефективному згортанню [40, 54, 55].

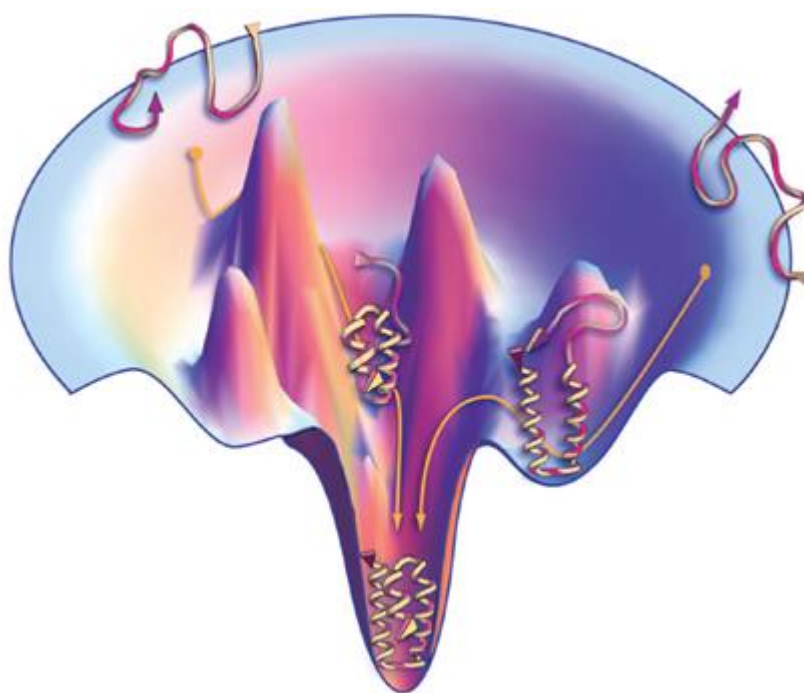


Рис. 1.1 Схематичне зображення енергетичного ландшафту поліпептидного ланцюга [35]

Однак, ні модель енергетичної воронки, ні модель поступового згортання через інтермедіатні стани не можуть пояснити основних особливостей процесу фолдингу, а саме невеликий час (у порівнянні з часом,

необхідним для перебору всіх можливих конформацій) та одночасне існування нативної та денатурованої форм при згортанні [40]. З огляду на це, Фінкельштейн із колегами запропонували принципове рішення «парадоксу Левенталя», розглядаючи процес фолдингу білка поблизу точки рівноваги, де немає стабільних інтермедіатів та опис процесу згортання найбільш простий [40, 58]. На основі класичного виразу для часу, необхідного для подолання енергетичного бар'єру та оцінки його висоти, отриманої у припущенні, що вся надлишкова енергія перехідного стану пов'язана тільки з поверхнею розділу впорядкованої (глобулярної) та денатурованої (клубкової) фаз, була отримана оцінка часу підйому на високоенергетичний бар'єр, що лімітує весь процес згортання поліпептидного ланцюга в нативну структуру:

$$T \sim \tau \cdot \exp \left[(1 \pm 0.5) L^{2/3} \right] \quad (1.1)$$

де $\tau \approx 10$ нс [59] – характеристичний час одного кроку процесу, емпіричний параметр; L – число зв'язків в поліпептидному ланцюгу. З отриманої оцінки був зроблений висновок, що якщо поліпептидний ланцюг досить короткий $L \sim 80 \div 90$, то процес фолдингу знаходиться під термодинамічним контролем та завершиться протягом хвилини, навіть за несприятливих умов [40]. Розмір білкових доменів, здатних до самоорганізації, обмежений ~ 500 амінокислотними залишками. Також автори висловили припущення, що білки, які складаються із більш ніж 90 залишків, знаходяться під додатковим «структурним» контролем, що сприяє згортанню білка в нативну структуру за «біологічно розумний» час, виключаючи появу складних, хоч і термодинамічно стабільних, структур в глобулах, на згортання яких знадобилося б від кількох днів до тижнів [60], а також несферичність та мультидоменність ланцюгів, що містять понад 400 амінокислотних залишків [40].

1.1.2 Фолдинг білка в клітині

Особливу увагу привертає процес фолдингу в живих клітинах, де перенасичене макромолекулами середовище створює передумови для

білкової агрегації [61]. Відомо, що згортання білка в нативну структуру в клітині розпочинається ще в процесі синтезу на рибосомі, так званий «котрансляційний фолдинг» [62, 63]. Цікавим спостереженням було те, що білок не знаходить свій нативний стан в процесі синтезу, доки відсутні останні амінокислотні залишки С-кінця [64]. Також було виявлено, що існує певна асиметрія в структурі білка, а саме ближче до N-кінця поліпептидного ланцюга переважає вміст β -структур, що потребують більшого часу для згортання, таким чином, формування їх в першу чергу прискорює швидкість утворення нативної структури [65]. Нещодавні дослідження показали, що інтермедіати формуються як на рибосомі, так і за її межами, вказуючи на те, що взаємодії між рибосомою та синтезованим білком мало впливають на шляхи згортання рибонуклеази [66]. Було висловлено припущення, що процес фолдингу *in vivo*, незважаючи на всю складність та додаткові механізми регуляції, мало відрізняється від процесу згортання білка *in vitro* [40]. У живій клітині існує добре злагоджена машинерія, що сприяє згортанню білка правильним чином, перешкоджаючи як потраплянню у кінетичні пастки, так і агрегації. Такими системами є шаперони як, наприклад, HSP0 і GroEL в клітинах прокаріотів та TriC і HSP90 в клітинах еукаріотів [31, 67, 68]. Було встановлено, що шаперони можуть як руйнувати неправильно згорнуті інтермедіати, даючи їм шанс згорнутись ще раз правильним чином, так і ізолювати білки на останніх етапах фолдингу, включаючи їх в порожнину олігомерних комплексів – шаперонінів [29, 52, 69]. Вважається, що шаперони прискорюють фолдинг білка, як, наприклад, було продемонстровано при дослідженні системи GroEL/ES, для якої механізми прискорення згортання поліпептидного ланцюга були пов'язані з особливостями структури шапероніна [29]. Однак, в той же час висловлюється припущення, що дані системи не підвищують швидкість згортання, а діють як тимчасові «пастки», які не дозволяють інтермедіатам білка накопичуватись в цитозолі клітини з подальшою агрегацією [49, 52].

1.1.3 Агрегація білка як наслідок процесів місфолдингу

Існування в клітинах еукаріотів значної частки білків, що позбавлені будь-якої третинної структури [70, 71] внаслідок порушення процесів репарації під час старіння організму [72, 73], місфолдингу за умов окислювального чи теплового стресу, дестабілізуючих мутацій чи локальних змін рН в мембранах [74, 75], створює передумови для концентраційно-залежної самоасоціації частково згорнутих або неправильно згорнутих білків [31]. Варто відмітити, що в перенасиченому білковому розчині в результаті міжмолекулярних фазових переходів відбувається утворення аморфних агрегатів, фібрилізація, кристалізація, гелеутворення, а також фазовий перехід типу рідина-рідина [76].

З процесом місфолдингу пов'язані лише утворення аморфних агрегатів та фібрилізація, в той час як інші процеси обумовлені метастабільністю перенасиченого стану системи впорядкованих, тобто нормально згорнутих білків, (до останніх процесів належить і агрегація нативних білкових структур) [38]. Як фібрилізація, так і утворення аморфних агрегатів розпочинаються із взаємодії інтермедіатних станів, до яких відносять частково згорнуті або частково розгорнуті інтермедіати та стан розплавленої глобули, оскільки експоновані гідрофобні залишки виявляють високу схильність до агрегації [74, 77, 78]. Взаємозв'язок перехідних станів та різних типів білкових агрегатів, а також схематичний вигляд енергетичної воронки для процесів місфолдингу, в порівнянні з узагальненим виглядом енергетичного ландшафту при досягненні білком свого нативного стану, наведено на Рис. 1.2. В обох випадках, аморфної та фібрилярної агрегації, утворюються великі нерозчинні агрегати з високим ступенем структурної стабільності, тому часто ці процеси розглядають як конкуруючі [79].

Незважаючи на те, що дані агрегати утворюються за подібних умов, між ними є значні відмінності: фібрилярні агрегати характеризуються високовпорядкованою структурою з великим вмістом β -листів [81], в той час як аморфні агрегати не мають жодної специфічної високовпорядкованої

структури. Також є значні відмінності в кінетиці формування фібрил та аморфних агрегатів. На противагу описаній нижче фібрилізації, процес утворення аморфних агрегатів є спонтанним, миттєвим та не прискорюється додаванням ядер нуклеації [82].

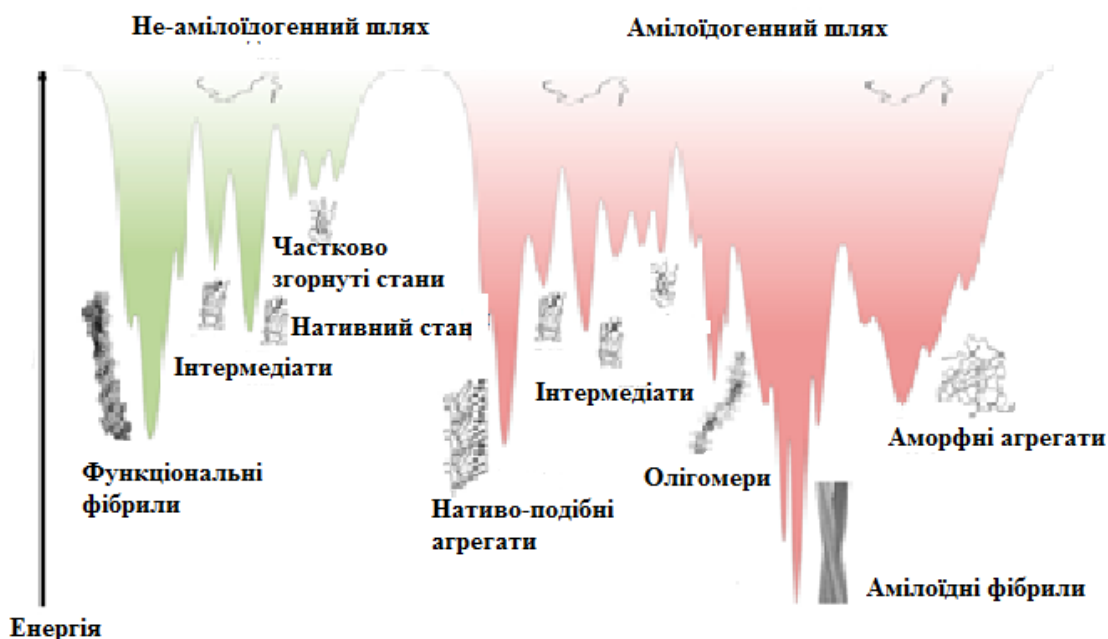


Рис. 1.2 Енергетичні воронки процесів фолдингу та місфолдингу білка
Адаптовано із роботи [80]

Фібрилярні агрегати також широко відомі як амілоїдні фібрили. Термін «амілоїд» був вперше застосований німецьким лікарем Р. Вірховим, який вважав, що спостережувані в людських тканинах білуваті утворення, здатні фарбуватись йодом, є подібними до крохмальних включень [83, 84]. Незважаючи на те, що в 1895 році, через 5 років після публікації роботи Вірхова, було доведено білкову природу цих депозитів [85], термін «амілоїд» закріпився в літературі. На розвиток подальших досліджень механізмів формування амілоїдних фібрил суттєво вплинуло спостереження їх утворення *in vitro* за дестабілізуючих умов білками, фібрилярні агрегати яких до цього не спостерігались в живих тканинах [86–88]. Таким чином, стало зрозумілим, що агрегація білків, в тому числі й утворення амілоїдних фібрил, не є особливою рисою певної амінокислотної послідовності, а

фундаментальною властивістю білків [89–91], що спостерігається при дестабілізації білкової структури, індукованій змінами навколишнього середовища (рН, температури, тиску, ступеня молекулярного скупчення, концентрації денатурантів і активних форм кисню, тощо), порушенням в роботі молекулярних шаперонів чи убіквітин-протеасомної системи. При цьому схильні до агрегації амінокислотні послідовності, що зазвичай занурені всередину білкової глобули, стають доступними розчиннику та ініціюють формування нерозчинних амілоїдних фібрил [92, 93]. Також до факторів, що сприяють фібрилізації, відносять внутрішні фактори, такі як сумарний заряд, середнє значення гідрофобності, схильність до утворення α - та β -структур [94–96].

Для процесу фібрилізації характерний сигмоїдальний вигляд кінетичної кривої, що відповідає трьом загальним стадіям фібрилогенезу:

1) нуклеації впорядкованої структури амілоїдних фібрил (інколи до даного етапу відносять також конформаційні зміни білка [97]), що відповідає лаг-фазі кінетичної кривої. Даний процес прискорюється додаванням фрагментів сформованих фібрил [98–101]. Початковий етап є найбільш повільним серед всіх інших, під час якого система долає високий бар'єр вільної енергії, що обумовлений низкою несприятливих рівноваг та переважанням константи швидкості дисоціації над константою асоціації [102]. Сильна залежність даної фази від концентрації білка призводить до існування критичної концентрації, нижче якої утворення самоасоціатів не відбувається [103]. Було також висловлено припущення, що фаза нуклеації – це не тільки період очікування зародження ядер для подальшої фібрилізації, а також період активного утворення фібрилярних агрегатів, що ще не досягли розміру, достатнього для їх детектування [101, 104].

2) Фаза елонгації (подовження) протофібрилярних агрегатів відповідає різкому зростанню кінетичної кривої (як t^2 [105]). Впродовж цієї фази мономери, ядра фібрилізації та олігомери взаємодіють між собою, збираючись в протофібрилярні структури, що швидко ростуть та

перетворюються в упорядковані фібрилярні структури, відомі як протофіламенти (Рис. 1.3). Дана фаза являє собою швидкий та енергетично вигідний процес [80, 99].

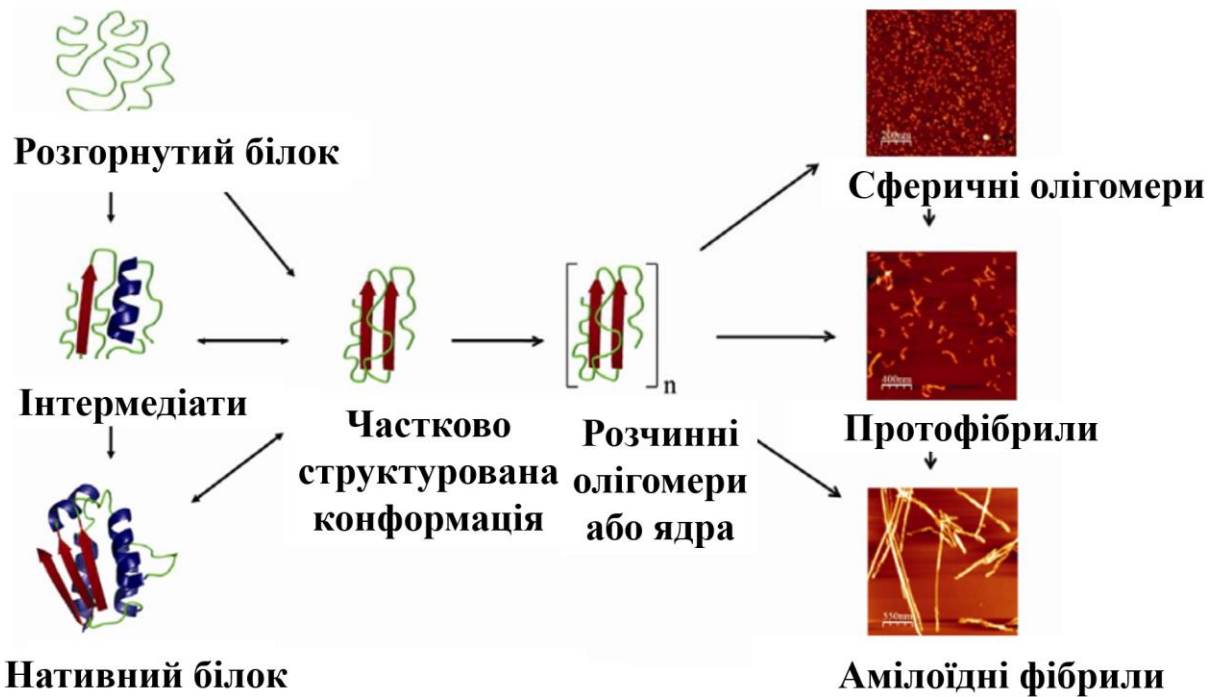


Рис. 1.3 Основні стадії процесу утворення амілоїдних фібрил *Адаптовано із роботи* [105]

Впродовж фази нуклеації та елонгації основну роль у формуванні амілоїдних фібрил відіграють олігомери, тобто структурні одиниці, що складаються з невеликої кількості білкових мономерів, та властивості яких суттєво змінюються при видаленні однієї або кількох молекул [106, 107]. У процесі фібрилізації утворюються як олігомери, що призводять в результаті до утворення амілоїдних фібрил, так і олігомери, що є продуктом побічних реакцій [108–110], хоча строго розділити їх за цим критерієм на дві групи, як продемонстровано в роботі [106], неможливо. Варто зазначити, що в процесі фібрилізації до олігомерів відносяться всі інтермедіати (маються на увазі не конформаційні варіанти мономерного білка, а агреговані стани молекул) та продукти даного процесу, що розташовані між білковими мономерами та макроскопічними фібрилами, тобто, як невеликі агрегати, що ще не утворили

ядро фібрилізації (нефібрилярні олігомери), так і короткі фібрили з колоїдними властивостями (фібрилярні олігомери), що у випадку видалення з них декількох одиниць, розпадаються на мономери, а при додаванні кількох молекул білка збільшують швидкість осідання. Оскільки подовження фібрилярних олігомерів є швидшим процесом, ніж утворення нового ядра фібрилізації, вони перебувають у розчині в значно меншій концентрації, ніж нефібрилярні види олігомерів [106]. Олігомери демонструють вищу цитотоксичність, ніж зрілі фібрили [111–114], в той же час вірогідність еволюції олігомерів в амілоїдні фібрили, ймовірно, не корелює з їх токсичністю [106]. Цитотоксичність олігомерів пов'язують із розташуванням гідрофобних груп на їх поверхні [115, 116], а також високим коефіцієнтом дифузії цих, відносно невеликих, структур [116, 117]. Обидві властивості сприяють безлічі аномальних взаємодій з такими клітинними компонентами, як ліпідні мембрани, розчинні білки та білкові рецептори, РНК, тощо [80].

3) Останньою фазою фібрилізації є насичення, впродовж якої відбувається самозбирання протофіламентів в зрілі фібрили з різною морфологічною структурою та різним рівнем поліморфізму [80, 96, 118]. Описаний вище механізм фібрилізації відомий в літературі як нуклеаційно-залежний [99, 102, 105].

Слід мати на увазі, що не завжди в процесі фібрилізації спостерігаються всі вищезазначені особливості, наприклад, може бути відсутнім чітке розділення фаз нуклеації та елонгації чи бар'єр критичної концентрації, а вигляд кінетичної кривої може мати скоріше експоненційну залежність, ніж t^2 [105]. Дану експоненційну часову залежність можна пояснити вторинними механізмами формування полімерів, до яких відносяться, наприклад, фрагментація, під час якої генеруються нові агрегати зі швидкістю, що залежить тільки від концентрації присутніх в розчині агрегатів, або розгалуження, швидкість якого залежить від кількості як мономерного білка, так і існуючих агрегатів [119–122].

1.2 Структурні особливості фібрилярних агрегатів білків

Як було зазначено вище, здатність до утворення фібрилярних агрегатів не залежить від амінокислотної послідовності, а є фундаментальною особливістю білкових молекул. Поліпептидні ланцюги довжиною від 37–44 (A β пептид) до 691 амінокислотних залишків (лактоферин) формують амілоїдні фібрили [80], причому нативна структура таких білків може варіювати в широких межах, від β -сендвічної структури транстиретину, легких ланцюгів імуноглобулінів та мікроглобуліну b2 до $\alpha + \beta$ структури лізоциму та α -структури сироваткового амілоїду A [123]. Незважаючи на значні відмінності у структурних особливостях нативного стану, типовою ознакою всіх амілоїдних фібрил є наявність крос- β структури, яка проявляється у характерному паттерні дифракції рентгенівських променів, де відстань між β -тяжами складає ~ 0.5 нм, а відстань між β -листами ~ 1 нм (Рис. 1.4).

За допомогою методу твердотілого ядерного магнітного резонансу була розшифрована структура амілоїдних фібрил ряду білків з атомарною роздільною здатністю, серед яких A β 40, A β 42, амулін та α -синуклеїн [125-129]. У подальшому, методами атомно-силової мікроскопії (АСМ),

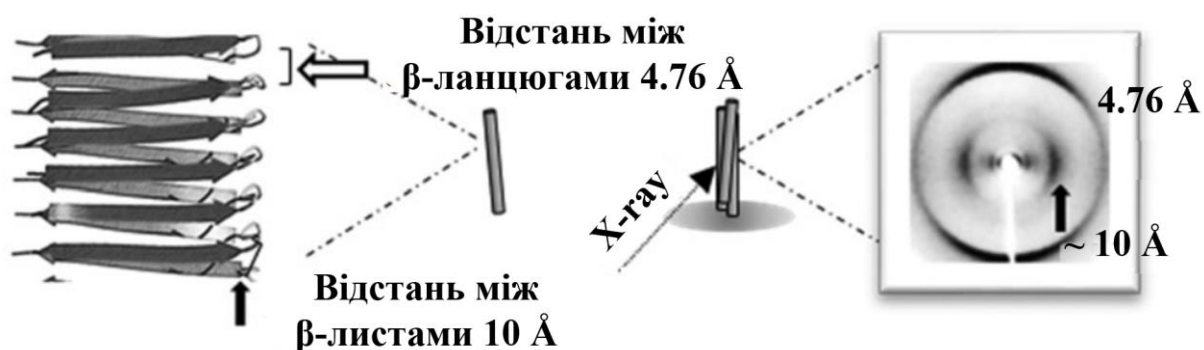


Рис. 1.4 Характеристики крос- β структури, визначені при дослідженні дифракції рентгенівських променів на амілоїдних фібрилах
Адаптовано із роботи [124]

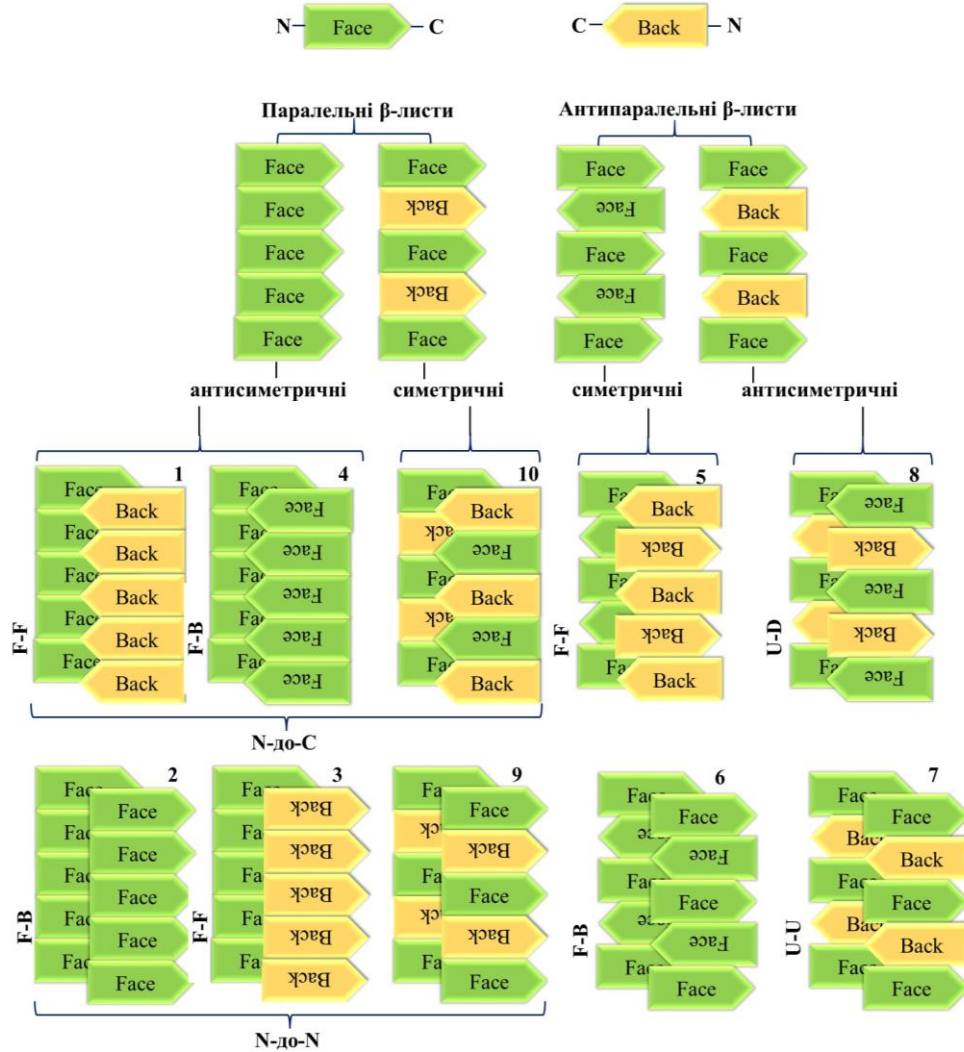


Рис. 1.5 Можливі класи симетрії стеричних гомозіпперів в остові амілоїдних фібрил. Літерами N та C позначено N- та C-кінець поліпептидного ланцюга, відповідно. Літерами F, B, U, D позначено лицьову та зворотну сторони та верхній і нижній край β-тяжа
Адаптовано із роботи [80]

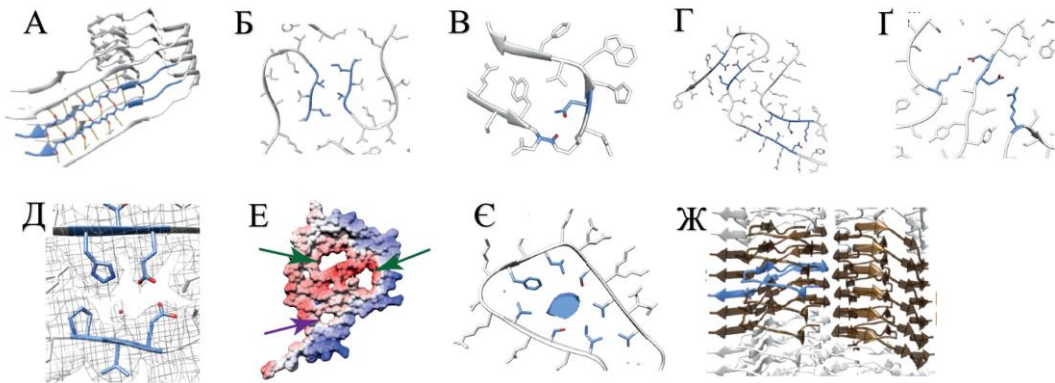


Рис. 1.6 Структурні мотиви амілоїдного остову [144]

трансмисійної електронної мікроскопії (ТЕМ) та кріо-ТЕМ було показано, що амілоїдні фібрили складаються із окремих протофіламентів, кількість яких відрізняється для різних білків [130–133]. На сьогодні в банку даних Protein Data Bank містяться структури більш ніж 40 амілоїдних фібрил різних білків [134–137]. Хоча всім цим структурам притаманний канонічна крос- β структура, топології структурних елементів, які складають остов амілоїдних фібрил, виявились складнішими та більш різноманітними, ніж топології фібрилярних агрегатів коротких пептидних фрагментів [138–141]. Остов амілоїдних фібрил зазвичай містить пару β -листів, взаємодія між якими забезпечується утворенням так званої стеричної блискавки (зіппера) між боковими групами амінокислотних залишків (Рис. 1.5). Встановлено, що стеричні зіппери можуть також утворюватись між окремими протофіламентами при формуванні зрілих фібрил чи різними по амінокислотному складу фрагментами поліпептидного ланцюга (гетерозіппери) [124]. Поряд з мережею водневих зв'язків між β -тяжами (Рис. 1.6А), у стабілізації структури амілоїдних агрегатів важливу роль відіграють такі чинники, як: (1) гідрофобний ефект, зумовлений витісненням молекул води із області між β -листами при утворенні так званого «сухого» зіппера (Рис. 1.6Б); (2) ван-дер-ваальсові взаємодії між боковими залишками амінокислот; (3) стекінг-взаємодії між ароматичними амінокислотами, зокрема, фенольними залишками тирозину; (4) водневі зв'язки між боковими залишками амінокислот в петлях (Рис. 1.6В); (5) полярні зіппери між зарядженими та полярними групами амінокислот (Рис. 1.6Г); (6) занурені сольові містки (Рис. 1.6Г); (7) взаємодії з розчинником (Рис. 1.6Д) [136] та полярними чи неполярними внутрішніми каналами (Рис. 1.6Е) [135, 142]; (8) кофактори (Рис. 1.6Є); (9) взаємодії між різними шарами молекулярних груп (Рис. 1.6Ж) [143].

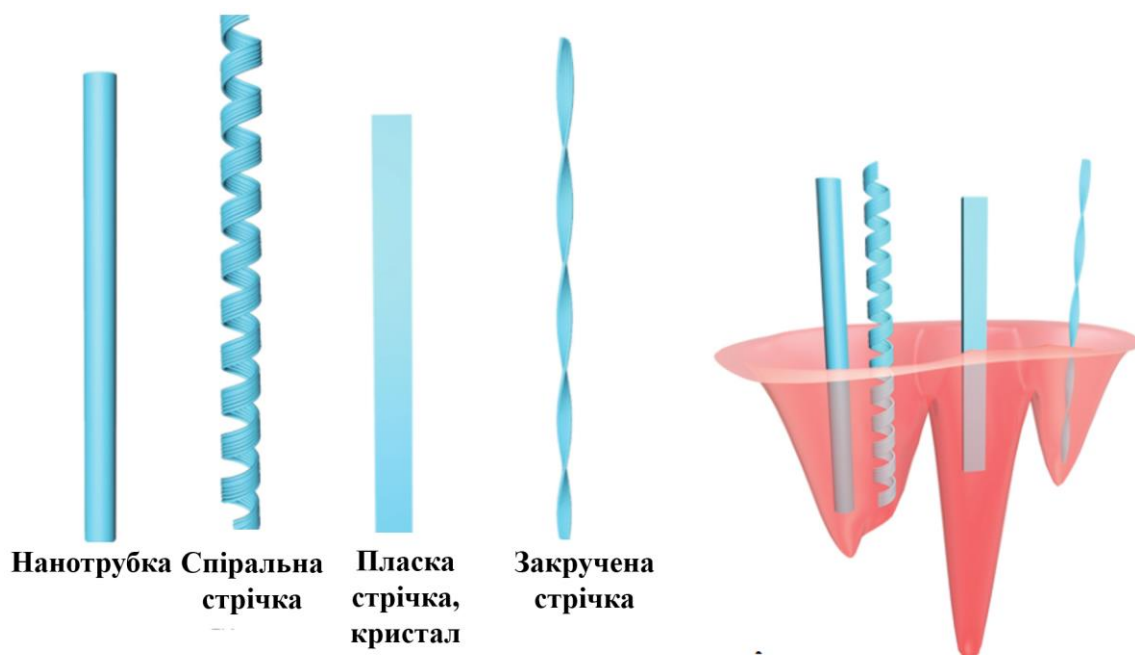


Рис. 1.7 Схематичне зображення основних мезоскопічних поліморфів амілоїдних фібрил та їх середня (Н) і Гауссова (К) кривизна
Адаптовано із роботи [124]

Незважаючи на те, що крос- β структура є характерним структурним мотивом всіх амілоїдних фібрил, їх 3D структура може мати суттєві відмінності в залежності від кількості протофіламентів, характеру їх взаємної укладки, кута закручування, тощо [145–147]. На цей час отримані численні докази поліморфізму фібрилярних агрегатів, що формувались *in vitro* при варіюванні експериментальних умов (рН, температури, іонної сили, інтенсивності гідродинамічного стресу, тощо) [144, 148–150]. Часто амілоїдні фібрили є лівозакрученими, що пояснюється як внутрішніми (розповсюдженням хіральної вторинної структури β -листів на вищій рівні структурної ієрархії), так і зовнішніми чинниками [124]. Наприклад, наявність зарядів одного знаку на поверхні фібрили призводить до певного скручування на одиницю довжини внаслідок взаємного відштовхування заряджених бокових груп амінокислот, яке прямо пропорційне величині сумарного заряду [124]. На прикладі бета-лактоглобуліну та бета-ендорфіну продемонстрована можливість модуляції періоду закручування шляхом варіювання концентрації солі та складу буферу [151–153]. Періодичність

закручування може бути різною навіть для одного зразка амілоїдних фібрил внаслідок так званого мезоскопічного поліморфізму, що пояснюється флуктуаціями локальної концентрації солі, гетерогенністю центрів нуклеації, кінетичними пастками, що виникають у процесі амілоїдної трансформації [135, 154]. Мезоскопічний поліморфізм амілоїдних фібрил проявляється в існуванні структур різних топологій, які відрізняються за середньою та Гауссовою кривизною, таких як нанотрубки, спіральні, закручені чи плоскі стрічки (Рис. 1.7).

Нещодавні дослідження еластичної енергії цих поліморфів дозволили розташувати їх у відносній енергетичній шкалі (Рис. 1.7 права панель) [155].

Таким чином, на енергетичному ландшафті фолдингу білків абсолютний мінімум вільної енергії амілоїдних фібрил (Рис. 1.2) може бути представлений у вигляді кількох відносних мінімумів, що відповідають різним мезоскопічним поліморфам.

1.3 Амілоїдні фібрили як новий клас біосумісних наноматеріалів

Амілоїдні фібрили наразі привертають зростаючу увагу у нанотехнологічному аспекті, як можливі будівельні блоки для інжинірингу наносенсорів та нанопристроїв. Переваги амілоїдних наноагрегатів перед синтетичними полімерами полягають у значно більшій гнучкості, біосумісності, здатності до біодеградації, термо- та хімічній стабільності, унікальних магнітних та механічних властивостях, тощо [156, 157]. Використання амілоїдних фібрил як біоміметичних матеріалів охоплює розробку нанoeлектронних пристроїв, створення скаффолдів для 3D клітинних культур та тканинної інженерії, контрольовану доставку лікарських засобів та ін. (Рис. 1.8).

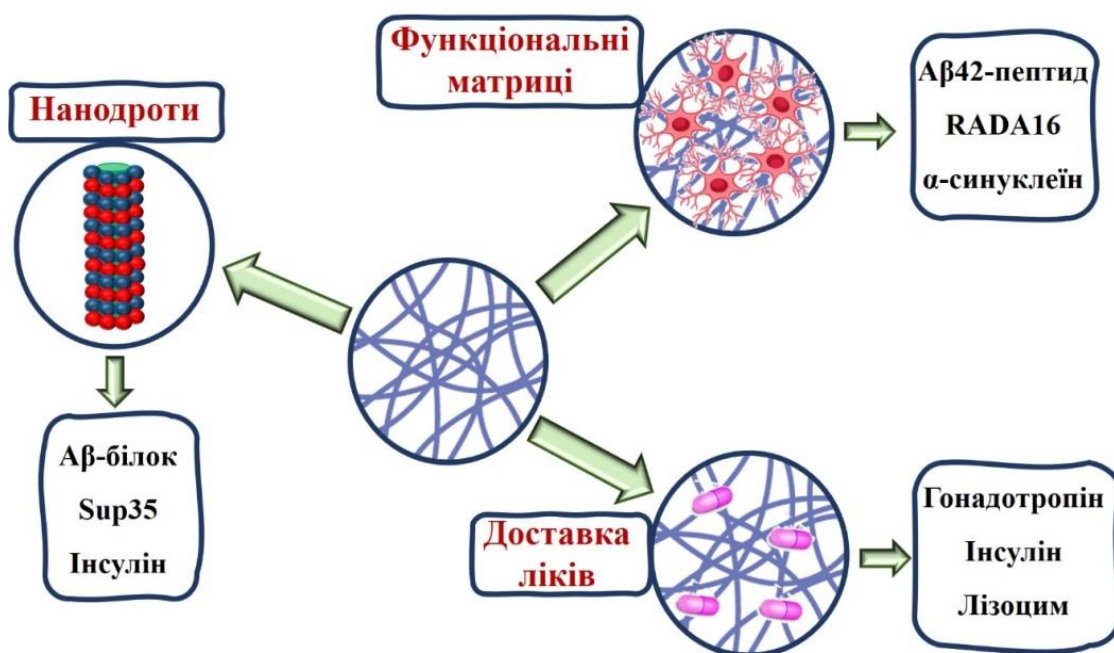


Рис. 1.8 Використання амілоїдних фібрил як перспективних наноматеріалів

1.3.1 Нанорозмірні системи доставки лікарських засобів на основі амілоїдів

Застосування лікарських засобів у вільній формі викликає ряд небажаних побічних ефектів, таких як передчасна ферментативна деградація, низька біодоступність та комплаєнс, недостатня терапевтична ефективність, тощо [157, 158]. Для мінімізації цих ефектів перспективним є використання різноманітних наноконтейнерів, зокрема, гідрогелів із фібрилярних білкових структур. Так, було показано, що завдяки своїм структурним особливостям та наявності великих пор між протофіламентами, амілоїдні фібрили інсуліну мають високу спорідненість до йоду та забезпечують ефективний механізм його вивільнення [159]. Ефективність амілоїдних фібрил як систем доставки ліків була продемонстрована у роботі Маджи та співавторів на прикладі гормону гонадотропіну [160]. В експериментах *in vivo* та *in vitro* автори показали, що амілоїдні фібрили забезпечують контрольоване вивільнення фармакологічних препаратів, при цьому фібрилярні агрегати виявилися нетоксичними для дермальних клітин. У роботі [161] була запропонована методика створення нанорозмірного резервуару для інкапсуляції ліків на

основі кандидацидного пептиду, висока специфічність якого до β -глюканів забезпечує цільову доставку фармакологічних агентів. Автори відзначають, що вбудовування фармпрепарату в стабільну впорядковану β -структуру амілоїдів захищає його від перегріву та деградації протеазами. Інші приклади включають дизайн нанопористої білкової матриці з високою механічною стабільністю на основі фібрилярного β 2-мікроглобуліну [162]; конструювання ін'єкційної форми доксорубіцину, інкапсульованого в амілоїдні гідрогелі лізоциму [163]; створення системи переносу ліків з використанням фібрилярних нанополімерів α -синуклеїну [164].

1.3.2 *Дизайн нанорозмірних біомолекулярних проводів*

Оскільки амілоїдні фібрили характеризуються високовпорядкованою структурою, цей клас білкових агрегатів наразі широко застосовується при дизайні нанопроводів та наноелектронних пристроїв. Речес та Газіт вперше продемонстрували, що структурний мотив діпептиду діфенілаланіну, який зустрічається також у складі $A\beta$ -амілоїдного білка, здатний формувати жорсткі нанотрубки, які після відновлення іонного срібла та протеолізу пептиду, перетворюються на нанопроводи [165, 166]. Окрім цього, Газіту та співавторам вдалося здійснити керування орієнтацією нанотрубок на структурованих масивах субстрату, використовуючи техніку осадження з пари. Декілька інших наукових груп, що досліджували поведінку та властивості нанотрубок, сформованих із β -структур діфенілаланіну, виявили їхню високу жорсткість та надзвичайну стабільність [167, 168]. При вивченні електричних характеристик діфенілаланінових нанотрубок була продемонстрована можливість їх використання як елементу силіконових нанодротів та електродів при розробці біосенсорів [169].

У свою чергу, група Л. Серпел зробила суттєвий внесок у розвиток протоколів створення силіконових нанотрубок, матрицею для яких слугували амілоїдні фібрили пептиду KFFEAAAKKFFE [170, 171]. Встановлено, що такі нанотрубки мають покращені фізико-хімічні властивості та високу

термостабільність. Окрім цього, Серпелл та співавтори проаналізували вплив амінокислотної послідовності пептиду на характеристики кінцевої наноелектронної системи. У роботі [172] для дизайну нанодротів було використано амілоїдні фібрили N-термінального домену поліпептиду Sup35. Отримані структури характеризувались надзвичайною стабільністю – структура цих нанодротів залишалась неушкодженою у широкому діапазоні температур (від $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $90\text{ }^{\circ}\text{C}$) та значень pH (від 2 до 10), а також при дії протеаз, білкових денатурантів, високої іонної сили та органічних розчинників. Робота [173] присвячена інтеграції нанопроводів, виготовлених з амілоїдних фібрил інсуліну, в органічні сонячні елементи. Амілоїдні фібрили декорувалися кон'югованим кополімером поліфлуореном, який виступав у ролі донору електронів, та поєднувались із акцептором електронів [6,6]-феніл-С61-ефіром масляної кислоти. На основі серії абсорбційних та електрохімічних вимірювань авторами було показано, що нанорозмірні структури на основі біомолекулярних нанодротів мали покращені електрокінетичні параметри та підвищену здатність до переносу заряду.

1.3.3 Амілоїдні фібрили як функціональні матриці

Ієрархічна структура амілоїдних фібрил, поряд з їх унікальними поверхневими властивостями, зокрема, чергуванням полярних чи гідрофобних доменів, створює передумови для зв'язування з фібрилярними агрегатами як малих молекул, так і макромолекул [174, 175]. Ці характеристики амілоїдів роблять їх перспективними функціональними матрицями для адгезії клітин та інжинірингу тканин. Суттєвий внесок у дослідження цього питання було зроблено Маджи та співавторами [176], які показали, що незалежно від амінокислотної послідовності, будови та наявності сайтів зв'язування для інтегрину, амілоїдні фібрили цілого ряду білків та пептидів, що включали глюкагоноподібний пептид-1, α -синуклеїн, полі-L-лізин, A β 42-пептид та A β (25-35)-пептид, здатні зчеплювати та розповсюджувати по своїй поверхні клітини завдяки стимуляції експресії

інтегрину. Окрім цього, на прикладі альбуміну продемонстровано, що тільки фібрилярні конформації поліпептидного ланцюга адгезують клітини, тоді як мономерний білок є неактивним. У роботах [177, 178] було ідентифіковано структурний мотив поліпептидного ланцюга з високим адгезійним потенціалом, який включав амінокислотну послідовність Arg-Gly-Asp. Зокрема, було показано, що кон'югація цього мотиву з амілоїдогенними варіантами транстиретину стимулює специфічні взаємодії між клітинами та фібрилами [177]. Аналогічно, було показано, що сорбція клітин на фібрилярному скаффолді лізоциму сприяє генерації сигналів між клітинами та їх активній взаємодії [179]. Амілоїдні фібрили були також успішно використані і для інжинірінгу клітин кісток. Групою Хорі було встановлено, що фібрилярні агрегати пептиду RADA16 ініціюють проліферацію та остеогенну диференціацію клітин мишей культури MC3T3-E1 [180]. Окрім цього, фібрилярні агрегати були застосовані як субстратні матриці для ініціації функціонування, проліферації, мультипотентності та диференціації мезенхімальних стовбурових клітин [181]. В цілому, можливість варіювання хімічного складу, товщини та довжини, оптичних, механічних та електричних властивостей амілоїдних фібрил створює підґрунтя для їх подальшого широкого застосування у біотехнології, медицині та промисловості [182].

1.4 Детектування амілоїдних фібрил за допомогою специфічних флуорохромів

Серед широкого спектру фізичних методів, які наразі використовуються для диференціації між нативним та фібрилярним станами білкових молекул, виключно важлива роль належить методу флуоресцентної спектроскопії [183–185]. При дослідженні білкового амілоїдогенезу флуоресцентні методи є особливо перспективними, що обумовлено: і) можливістю експериментування в діапазоні концентрацій білка, де більшість інших методів виявляються незастосовними; ii) використанням міток з високим

квантовим виходом, які дозволяють прослідкувати за тонкими змінами агрегаційної здатності білків; iii) детектуванням малих концентрацій агрегатів різних типів, що лежать за межами чутливості хроматографічного аналізу; iv) можливістю дослідження лаг-фази білкового фібрилогенезу. Нарешті, дизайн високочутливих флуоресцентних маркерів є виключно важливим для ранньої діагностики хвороб, пов'язаних з неправильним згортанням білків, а також для оцінки ефективності різних терапевтичних стратегій.

Супрамолекулярна архітектура амілоїдних фібрил, з розташуванням β -тяжів перпендикулярно до довгої осі фібрили, та розповсюдженням β -листів у її напрямі, створює унікальний структурний мотив для зв'язування малих молекул, представлений експонованими розчиннику жолобками із бокових груп амінокислотних залишків [186]. Саме цей структурний мотив відіграє домінуючу роль у формуванні спектрального відгуку амілоїд-специфічних флуорохромів, серед яких найбільш відомими є бензотіазоловий барвник Тіофлавін Т (ThT) та азо барвник Конго червоний [187–190]. Зв'язування Тіофлавіну Т з амілоїдними фібрилами супроводжується суттєвим зростанням квантового виходу барвника та батохромним зсувом максимумів поглинання та емісії [191], тоді як для Конго червоного спостерігається характерне подвійне променезаломлення поляризованого світла та батохромний зсув максимуму поглинання [192]. У водному середовищі флуоресценція ThT дуже слабка, оскільки швидке обертання навколо C-C зв'язку, що поєднує диметиланілінове та бензотіазолове кільця призводить до формування стану з переносом заряду при фотозбудженні. Однак, коли молекула ThT утворює комплекс з амінокислотними залишками певного жолобка амілоїдного остову (Рис. 1.9), внутрішньомолекулярна рухливість барвника значно обмежується, що проявляється у зростанні інтенсивності флуоресценції на 1–2 порядки [193]. На цьому явищі і базується найбільш розповсюджений флуоресцентний критерій ідентифікації амілоїдних фібрил. Однак, незважаючи на загальноприйнятність, цей критерій

має ряд недоліків, пов'язаних, зокрема, із і) залежністю спектральних

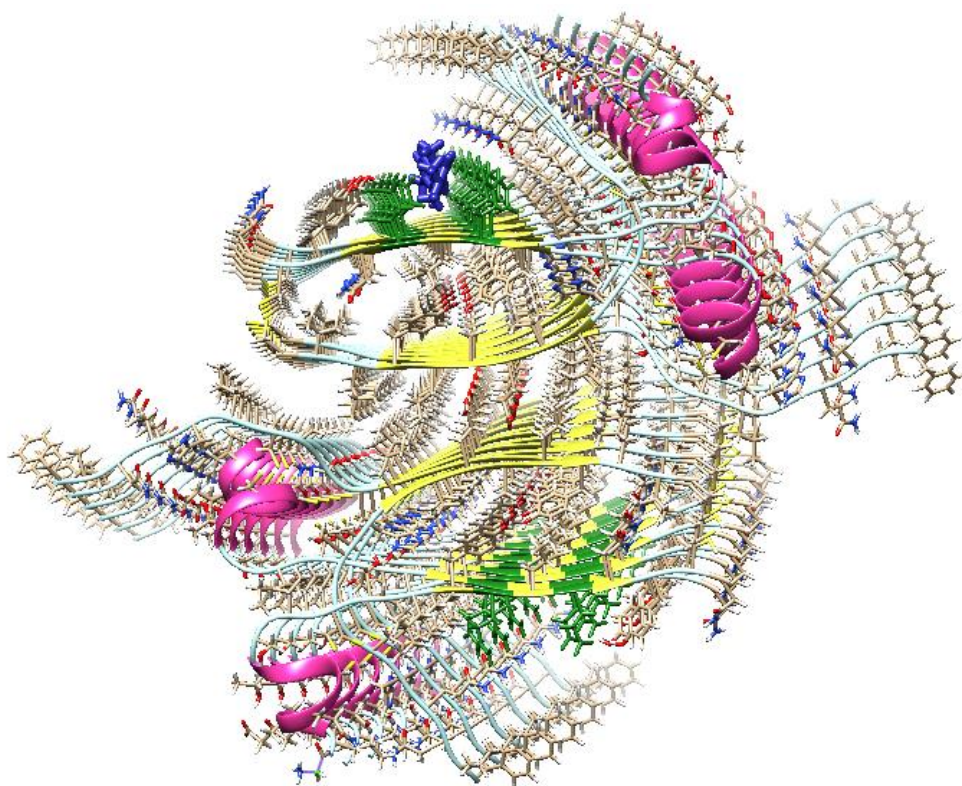


Рис. 1.9 Розташування молекули Тіофлавіну Т у поверхневому жолобку модельних фібрил інсуліну за даними методу молекулярного докінгу

характеристик Тіофлавіну Т від морфології фібрил, рН та іонної сили; ii) малим Стоксовим зсувом; iii) нездатністю ThT до детектування олігомерних інтермедіатів; iv) чутливістю барвника до наявності не тільки β -листів, але і порожнин у фібрилярних структурах; v) впливом на кінетику фібрилізації та стабільність фібрилярних інтермедіатів; vi) залежністю спектрального відгуку ThT від присутності різноманітних екзогенних сполук та бактерій; vii) слабким проникненням цього маркера через гематоенцефалічний бар'єр [188, 194–197]. З початку використання Тіофлавіну Т як амілоїдного маркера [198], був досягнутий значний прогрес у розвитку флуоресцентних методів детектування амілоїдів. Дослідження проводяться у багатьох напрямках і охоплюють, зокрема, і) пошук нових флуорохромів, позбавлених недоліків, притаманних ThT; ii) застосування ThT для візуалізації амілоїдних депозитів

з надвисокою роздільною здатністю за допомогою сучасних модифікацій методу флуоресцентної мікроскопії, таких, зокрема, як мікроскопія з прямою оптичною стохастичною реконструкцією [199]; iii) застосування ThT у комбінації з іншими амілоїд-чутливими флуорофорами, що утворюють з ним донорно-акцепторні пари для Фьорстерівського резонансного переносу енергії [200, 201].

На сьогоднішній день проведена оцінка амілоїдної специфічності великої кількості флуорохромів різних класів [202–204]. Перспективними з точки зору детектування та характеристики фібрилярних білкових агрегатів виявились Тіофлавін S [205], K114 [206], X-34 [207], ресвератрол [208], РТАА [209], Аурамін О [210], DCVJ [211], PicoGreen [212], DMASEBT [213], бензантронові барвники [214], люмінесцентні коньюговані полімери [215], BODIPY флуорофори [216], Thiazole orange [217], тощо.

Існує ряд критеріїв, яким повинен відповідати ефективний амілоїдний маркер: а) висока константа асоціації та квантовий вихід флуоресценції у присутності амілоїдних фібрил; б) високий коефіцієнт екстинкції, значний Стоксів зсув, стабільність *in vitro* та *in vivo*; в) низька спорідненість до нативного білка, бактерій, тощо; г) низький квантовий вихід у буфері; д) низька цитотоксичність; е) низька ліпофільність та невелика молекулярна маса. Окрім цього, важливо, щоб спектральний відгук флуорофору не зазнавав інтерферуючого впливу релеївського та раманівського розсіювання, і власної флуоресценції біологічних зразків. З огляду на це, значні зусилля наразі зосереджені на тестуванні сполук, що флуоресціюють в області так званого «оптичного вікна» біологічних тканин – дальній червоній та ближній інфрачервоній ділянках спектру (600 – 900 нм). Серед досліджених у цьому аспекті флуорохромів – похідні куркуміну CRANAD [218] та оксазину [219], DANIR [220], NIAD [221], стирилові [222] та ціанінові [223] барвники. Стабілізація комплексів флуорофорів з фібрилами забезпечується гідрофобними, електростатичними та π - π стекінг взаємодіями [197]. При дизайні амілоїд-специфічних флуорофорів можливе варіювання таких

параметрів, як природа ароматичних гетероциклів, аліфатичних ланцюгів, кислотних та основних груп, що дозволяє досягти відповідності з певними структурними елементами в архітектурі фібрил. В цілому, зважаючи на значний поліморфізм амілоїдних агрегатів, для раціонального дизайну специфічних маркерів необхідно враховувати як структурні особливості окремих поліморфів даного білка, так і відмінності в молекулярній організації амілоїдних фолдів різних білків.

1.5 Особливості амілоїдної трансформації лізоциму та інсуліну

1.5.1 Амілоїдогенні мутації лізоциму

Одним із найбільш вивчених амілоїдогенних білків є лізоцим – мультифункціональний фермент з антимікробними, імуномодулюючими та протипухлинними функціями, що був знайдений в секретах, таких як піт, слиз, слина, тощо [224–226]. Лізоцим людини складається із 130 амінокислотних залишків, які формують α -домен (залишки 1–42 та 81–130) з чотирма α -спіралями (A–D) та 3_{10} спіралями, а також β -домен (залишки 43–80) сформований в основному з антипаралельних β -листів [227] (Рис. 1.10).

Структура даного білка стабілізується чотирма дисульфідними зв'язками, що розташовані в α -домені (C6–C128 та C30–C116), β -домені (C65–C81) та в активному сайті, між α - і β -доменами (C77–C95) [228]. У 1993 році Пепус та співавтори показали, що два природніх мутанта людського лізоциму, I56T та D67H, пов'язані зі спадковим системним амілоїдозом, захворюванням, при розвитку якого амілоїдні фібрили відкладаються у різних внутрішніх органах [229–231]. Пізніше було виявлено серію інших амілоїдогенних мутантів лізоциму, а саме F57I, W64R, F57I/T70N, Y54N, T70N/W112R [232–235]. Варто відмітити, що більшість мутацій розташовані в β -домені чи в довгій петлі (W64R, D67H, T70N), а також в області інтерфейсу між двома доменами (I56T, F67I and Y54N) [236, 237]. Виняток

становить мутація W112, яка розташована в D-спіралі, а її комбінація з T70N

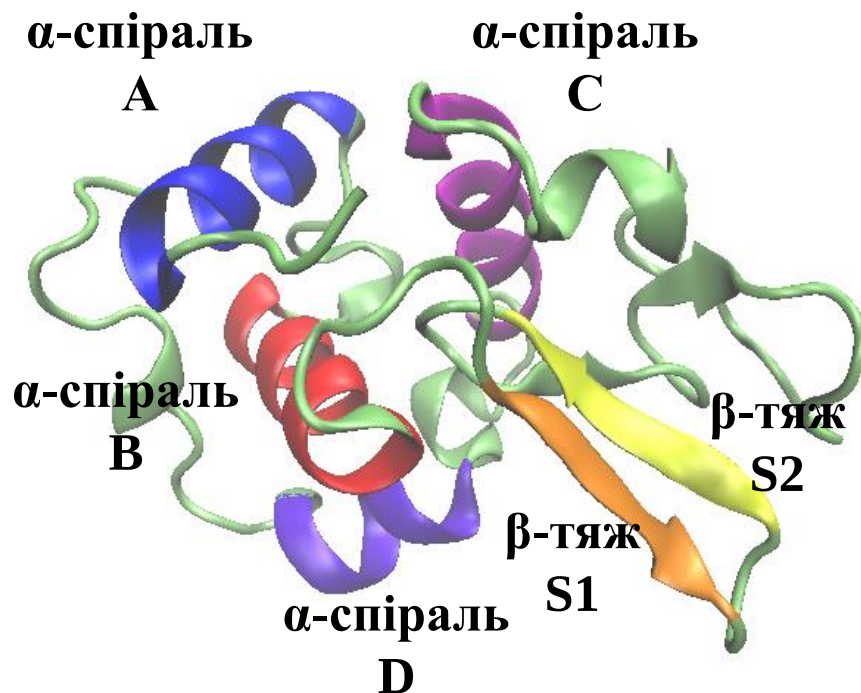


Рис. 1.10 Кристалічна структура лізоциму людини дикого типу (PDB ID 1REX): α -спіраль A містить залишки 5–15 (позначена синім кольором); спіраль B – залишки 25–36 (червоним); спіраль C – залишки 89–100 (пурпуровим); спіраль D – залишки 110–116 (фіолетовим); β -тяж S1 – залишки 43–46 (оранжевим); β -тяж S2 – залишки 51–54 (жовтим)

призводить до патогенної агрегації [238]. Слід зазначити, що точкові мутації T70N та W112R не пов'язані з захворюваннями [235, 239, 240], хоча T70N та ДТ сприяють формуванню інтермедіатних станів, подібних до тих, що виникають в амілоїдогенних мутантах за нефізіологічних умов, таких як підвищена температура, низьке значення рН чи високий гідростатичний тиск [236, 237, 241]. На сьогоднішній день найбільш повно вивчені мутації I56T та D67H. Виявлено, що заміщення D67 на гістидин порушує мережу водневих зв'язків, що стабілізують β -домен, особливо дві його довгих петлі. Ця дестабілізація призводить до масштабного узгодженого руху довгих петель та β -листів, але таке підвищення гнучкості не є характерним для іншого патогенного мутанта I56T і, вочевидь, не відіграє первинної ролі в

амілоїдогенності [242–245]. Заміщення стабілізуючого гідрофобного залишку Ile у положенні 56, на границі між двома доменами, гідрофільним залишком Thr порушує гідрофобні взаємодії та внутрішньомолекулярні водневі зв'язки в інтерфейсі α - β і прискорює процес розгортання білка [237, 242, 244]. Варіант I56T демонструє незначну зміну кристалічної структури у порівнянні з диким типом білка [242, 246] та значне зниження стабільності, як випливає з даних кінетичних, термодинамічних та молекулярно-динамічних досліджень [247]. Було висловлено припущення, що зменшення глобальної кооперативності за фізіологічних та денатуруючих умов [238, 248, 249], нижча термодинамічна стабільність та здатність утворювати специфічні тимчасові інтермедіати є основними молекулярними детермінантами амілоїдогенності мутантів I56T та D67H [241, 250]. Подібно до цих варіантів, точкові мутації F57I і W64R продемонстрували суттєве зниження термостійкості, в той час як мутація T70N виявилась лише трохи дестабілізуючою [236, 241, 251]. Вважається, що неамілоїдогенний характер мутанту T70N є наслідком збереження більшості водневих зв'язків та відсутності збурення поблизу області інтерфейсу [236, 240, 246]. Вважається, що мутації F57I, F57I/T70N, W64R і Y54N руйнують гідрофобні взаємодії між α - та β -доменами, зменшуючи таким чином гідрофобність області інтерфейсу [232, 236, 246]. Залишки триптофану, включені в мутації W64R і W112R/T70N, ймовірно, порушують гідрофобні кластери цих варіантів [246].

1.5.2 Особливості фібрилогенезу інсуліну

Інсулін – невеликий гормон білкової природи (5.8 кДа [252]), що регулює концентрацію глюкози у крові та проліферацію клітин [253]. При фізіологічних значеннях рН цей білок знаходиться у формі гексамеру (зрілий інсулін у вигляді гранул, що містять також 2 іони Zn^{2+} , виділяється з апарату Гольджі клітин підшлункової залози та надходить у кров людини під час їжі, причому іони Zn^{2+} відділяються від молекули інсуліну) [254–256], а при рН 2 – переважно у димерній та у мономерній формах [257, 258]. Біологічно

активна форма інсуліну – мономер, що складається з 21 амінокислотного залишка А-ланцюга та 30 амінокислотних залишків В-ланцюга, поєднаних одним внутрішньоланцюговим (А6 – А11) та двома міжланцюговими (А7 – В7 та А20 – В19) водневими зв'язками [252]. Структура А-ланцюга мономеру інсуліну складається з мотиву спіраль-петля-спіраль, причому області спіралі формують залишки А2 – А8 та А13 – А19 (Рис. 1.11) [259]. В-ланцюг може знаходитись у двох різних станах – R [260] чи Т [259]. У Т-стані (активний стан), В-ланцюг характеризується N-кінцевою β -петлею (залишки В2 – В6), центральною спіральною структурою (залишки В8 – В22, що утворюють дві 3-10 спіралі та одну π -спіраль), та С-кінцевим β -тяжем (залишки В24 – В26) [259]. За високих концентрацій Cl^- , залишки В1-В8 інсуліну приймають спіральну структуру, що називається R-станом, який також має вищу термостабільність [261]. У R-стані В-ланцюг характеризується розширеною α -спіральною структурою (залишки В2 – В12), центральною спіральною структурою (залишки В14 – В22, що утворюють одну α - та одну 3-10 спіраль) та С-кінцевим β -тяжем (залишки В24 – В26) [260]. Мономер інсуліну легко піддається частковій денатурації з експонуванням гідрофобних областей, що схильні до агрегації [262], однак дисульфідні зв'язки залишаються інтактними при формуванні амілоїдних фібрил [263]. Натомість, нативний димер інсуліну не може бути інкорпорований в амілоїдні фібрили, тому димеризація білка сприяє підвищенню його фізичної стабільності [264]. Утворення амілоїдних фібрил білка є основною проблемою для синтезу, довготривалого зберігання та використання фармацевтичних композицій інсуліну при лікуванні діабету. Зокрема, в областях ін'єкції інсуліну у пацієнтів-діабетиків може розвинутиись інсулін-опосередкований локальний амілоїдоз [263, 265], причому відкладання фібрил призводить до низької біодоступності фармпрепарату та слабого глікемічного контролю [118, 266], що може призвести до небезпечних для життя станів, таких як діабетичний кетоацидоз [267].

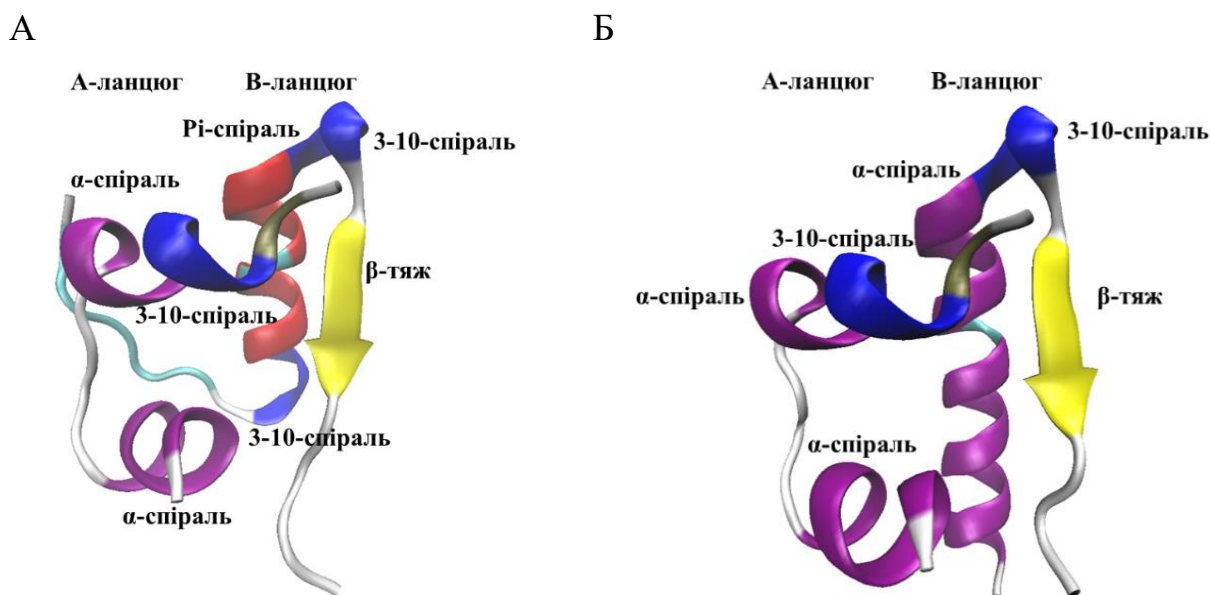


Рис. 1.11 Кристалічна структура Т-форми (А, PDB ID: 1MSO) [259] та R-форми (Б, PDB ID: 1EV6) [260] мономеру інсуліну людини. Структура А-ланцюга інсуліну має області спіралі (залишки А2 – А8 та А13 – А19), В-ланцюг має β -тяж (залишки В24 – В26). Також, В-ланцюг у Т-стані – одну π -спіраль та дві 3-10-спіралі (залишки В8 – В22), а у R-стані має розширену α -спіральну структуру (залишки В2 – В12), одну α - та одну 3-10 спіраль (залишки В14 – В22)

Вперше структуру амілоїдних фібрил інсуліну, сформованих *in vitro*, було описано у роботах Вау та співавторів, у якій зазначено, що розчин білка при рН 1.6 та нагріванні утворює фібрили різних розмірів, діаметр яких досягає 10 нм, а довжина – декількох сотень нм [268]. Крім того, цими авторами показано, що фібрили інсуліну здатні утворювати макроскопічні сферуліти [269]. Таким чином, процес фібрилогенезу інсуліну *in vitro* прискорюється при підвищеній температурі, високих значеннях іонної сили [118, 270, 271], та у кислому середовищі, що часто використовується у промисловому виробництві фармацевтичних композицій білка [272]. Амілоїдні фібрили інсуліну є типовими представниками фібрилярних агрегатів, що характеризуються підвищеним вмістом β -структури [273] та характерною крос- β дифракційною картиною [274].

Джіменец та співавтори на основі результатів кріоелектронної мікроскопії запропонували модель амілоїдної фібрили інсуліну, що складається з 2, 4 або 6 протофіламентів, закручених один відносно

одного [148]. Розмір поперечного перерізу кожного протофіламенту – 3×4 нм, а мономери білка у протофіламенті мають 4 β -тяжі (100 % вміст β -структури), упаковані у паралельний β -лист з кутом закручення β -тяжів $\sim 2^\circ$, що сприяє латеральній асоціації декількох протофіламентів уздовж осі фібрили. За допомогою електронної, атомно-силової мікроскопії, кругового дихроїзму та флуоресцентної спектроскопії продемонстровано, що критично важливими для фібрилізації білка є амінокислотні залишки LVEALYLV (B11 – 18) та FFY (B24 – 26) В-ланцюга інсуліну [275, 276].

Процес фібрилізації інсуліну включає два проміжні етапи: i) утворення частково розгорнутого, «гнучкого» мономеру (або димеру), що характеризується зниженням вмісту α -спіралей та експонованими до розчинника гідрофобними залишками (зокрема, при рН 2, 60°C); ii) формування олігомерів (та інших префібрилярних структур), причому саме на другому етапі утворюється типова для амілоїдних фібрил β -структура [277]. Префібрилярні структури інсуліну мають різні розміри: від малих олігомерів (12.5×20 нм), до великих протофіламентів (довжина ~ 80 -500 нм і товщина ~ 4.4 нм, що відповідає товщині амілоїдної фібрили інсуліну за даними АСМ) [277]. Зокрема, у моделі Гроєнінг, олігомер довжиною ~ 20 нм складається з 18 «мономерних» одиниць, кожна з яких містить 6 мономерів інсуліну. Протофіламент інсуліну – лінійна структурна одиниця мінімального діаметру (~ 3 –4 нм), здатний утворювати латеральні асоціати з іншими протофіламентами, що призводить до формування протофібрил, які, у свою чергу, закручуються одна відносно одної у зрілі фібрили [148]. За даними АСМ, товщина протофіламенту та протофібрили інсуліну складає ~ 1.2 та ~ 1.9 нм, відповідно [278]. Зрілі амілоїдні фібрили інсуліну характеризуються різною морфологією, що залежить від умов їх формування *in vitro*, від мутацій в амінокислотній послідовності білка, а також пов'язана з різною кількістю і типом взаємного упорядкування протофіламентів [277]. Наприклад, за даними TEM та АСМ, було виявлено агрегати зі спіральним або паралельним розташуванням протофіламентів,

закручені стрічкоподібні структури, плоскі стрічки, тощо [277]. Зокрема, при рН 1.6 формувались фібрилярні структури діаметром 15–20 нм із закрученою морфологією, а в оцтовій кислоті у присутності 0.1 М NaCl – суперфібрилярні структури діаметром 60 – 80 нм, що склались із латерально асоційованих фібрил [277]. Зрілі фібрили інсуліну мають β -листи, що складаються з анти-паралельних β -тяжів амілоїдогенних ділянок поліпептидного ланцюга, зокрема: LYQLEN (A13 – A18) та VEALYL (B12 – B17), що попарно формують так звані «стеричні блискавки» [279]. Цікаво, що для зберігання фармацевтичних композицій інсуліну у мономерній формі з метою підвищення швидкості абсорбції білка після ін'єкції, створено низку мутантів інсуліну. Однак, деякі мутації, наприклад B9 (S $\rightarrow$ E), призводять до дестабілізації нативної структури та можуть сприяти формуванню амілоїдних фібрил [280]. Тому важливим напрямом досліджень є пошук мутантів, які мають високий терапевтичний ефект, і, крім того, уповільнюють процес агрегації інсуліну, зокрема, запропоновано мутанти B30 (T $\rightarrow$ R), B29 (K $\rightarrow$ R)/ B30 (T $\rightarrow$ R) [281].

Класична нуклеаційно-полімеризаційна модель формування фібрил часто використовується для пояснення механізмів агрегації інсуліну. Згідно з цією моделлю, під час «лаг-періоду» формується стабільне ядро фібрили, до якого приєднуються частково денатуровані мономерні у процесі елонгації, після чого досягається динамічна рівновага між кількістю утворених зрілих фібрил та кількістю мономерів, що залишилися у розчині [277]. Однак, при високих концентраціях інсуліну спостерігали відсутність залежності швидкості росту агрегатів білка від концентрації, а також – подовжений лаг-період, після якого йде різке зростання швидкості росту фібрил. Останній аспект можна пояснити у рамках моделі «вторинної нуклеації», що зумовлена існуванням декількох механізмів формування ядра фібрили, та залежить від інтенсивності гідродинамічного стресу та наявності зрілих фібрил у розчині білка [277]. Нещодавні дослідження також свідчать, що процес полімеризації інсуліну та морфологія фібрилярних агрегатів залежать

від розміру ядра, яке може бути сформоване амілоїдогенними мономерами, димерами чи олігомерами [282].

Висновки до розділу 1

1. Неправильне згортання (місфолдинг) поліпептидних ланцюгів призводить до утворення особливого класу білкових агрегатів – амілоїдних фібрил, характерною структурною особливістю яких є наявність остова з бета-складчатою структурою, в якій β -тяжі розташовані перпендикулярно до довгої осі фібрили, а β -шари розповсюджуються у її напрямі. Наразі розрізняють три типи таких агрегатів – патологічні амілоїди, пов'язані із розвитком більше 40 захворювань людини, функціональні амілоїди та штучні амілоїди, які знаходять все більше застосувань як новий клас біосумісних наноматеріалів.
2. Складна природа процесу фібрилогенезу білків потребує створення ефективних методик, які б дозволяли не тільки детектувати амілоїдні фібрили, але й слідкувати за конформаційними змінами білка на різних етапах його самоасоціації, що особливо важливо для розробки експрес-методів діагностики та оцінки ефективності різноманітних терапевтичних стратегій. У цьому відношенні, флуоресцентні методики мають суттєві переваги, завдяки своїй надзвичайній чутливості, відносній простоті, високій селективності, гнучкості та експериментальній зручності.
3. Наразі існує нагальна потреба у раціональному дизайні, синтезі та експериментальному тестуванні нових флуорохромів різних класів з метою оцінки можливості їх застосування для ідентифікації та характеристики амілоїдів як *in vitro*, так і *in vivo*. У цьому аспекті особливу увагу привертають довгохвильові барвники, спектральний відгук яких знаходиться в області «оптичного вікна» біологічних тканин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Матеріали

Лізоцим з яєчного білка, інсулін з підшлункової залози бика, Тіофлавін Т (ThT) (Рис. 2.1), фосфорновольфрамова кислота для трансмісійної електронної мікроскопії, диметилсульфоксид (ДМСО) та Tris-HCl буфер були отримані від фірми Sigma (США). 4-диметиламінохалкон (ДМХ) (Рис. 2.1) був отриманий від фірми Signe (Латвія).

Ціанінові триметинові барвники, а саме АК3-1, АК3-3, АК3-5, АК3-7, АК3-8 та АК3-11 (Рис. 2.2А) [6], та гептаметинові барвники АК7-5, АК7-6 (Рис. 2.2Б) [283], а також сквараїнові барвники SQ1 та SQ4 (Рис. 2.3) [284] були синтезовані в Університеті Софії «Св. Клімент Охридський», Софія, Болгарія.

Бензантронові зонди АВМ, А6, А8, АМ1 та АМ2 (Рис. 2.4) були синтезовані в Даугавпілському університеті, м. Даугавпілс, Латвія [285, 286]. Бензантроновий барвник МВА був отриманий від фірми Zonde (Латвія).

2.2 Об'єкти дослідження

2.2.1 Амілоїдні фібрили лізоциму

Амілоїдні фібрили були отримані з лізоциму яєчного білка шляхом інкубування білкового розчину (10мг/1мл) в 10 мМ гліциновому буфері при рН 2 та 60 °С протягом 14 днів [248, 287]. Робочі розчини нативного та фібрилярного лізоциму були приготовані в 10 мМ Tris-HCl буфері (рН 7.4).

Наявність амілоїдних фібрил було підтверджено методом трансмісійної електронної мікроскопії (Рис. 2.5). Зразки для аналізу готували наступним чином: 5 мкл розчину білка наносили на ґрид, покритий карбоном, через 3 хв залишки розчину видаляли за допомогою фільтру. Далі ґрид окунали по черзі

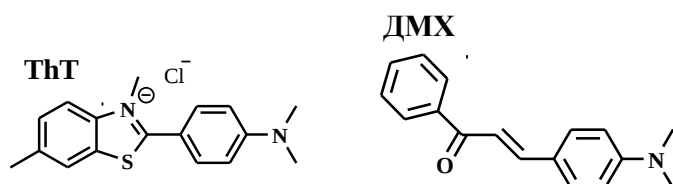


Рис. 2.1 Структурні формули класичних барвників: Тіофлавіну Т та ДМХ

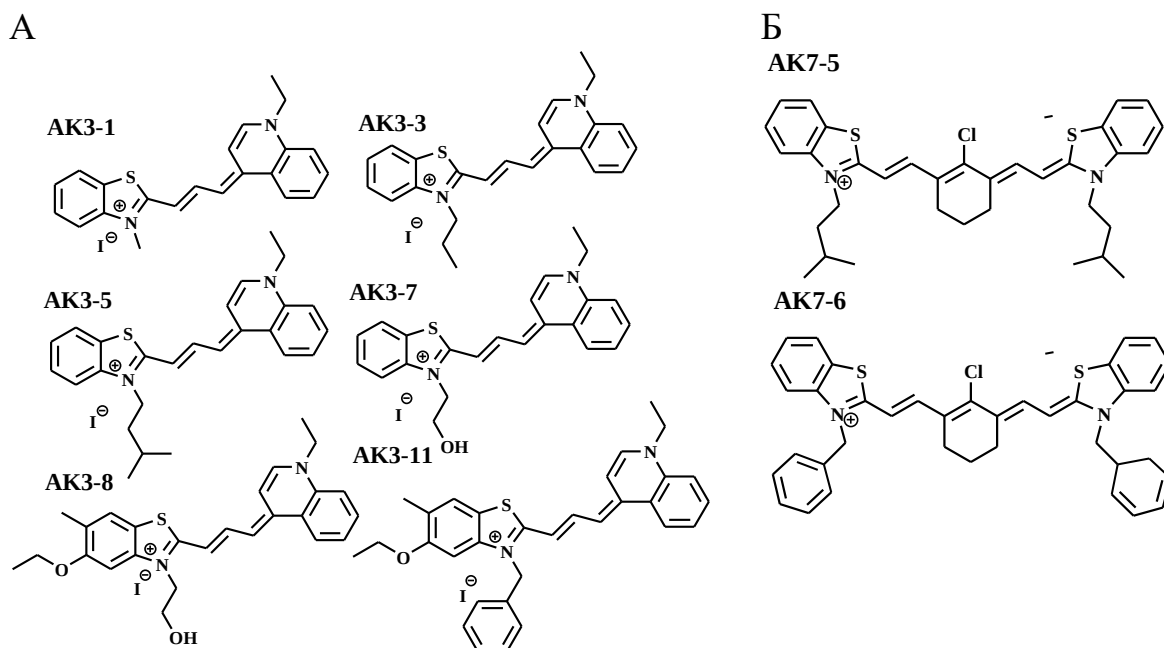


Рис. 2.2 Структурні формули триметинових АК3-1 – АК3-11 (А) та гептаметинових АК7-5, АК7-6 (Б) ціанінових барвників

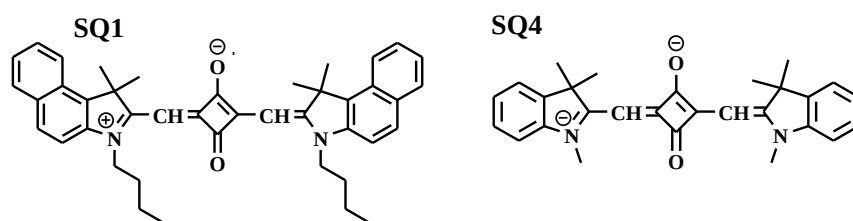


Рис. 2.3 Структурні формули скварайнових барвників

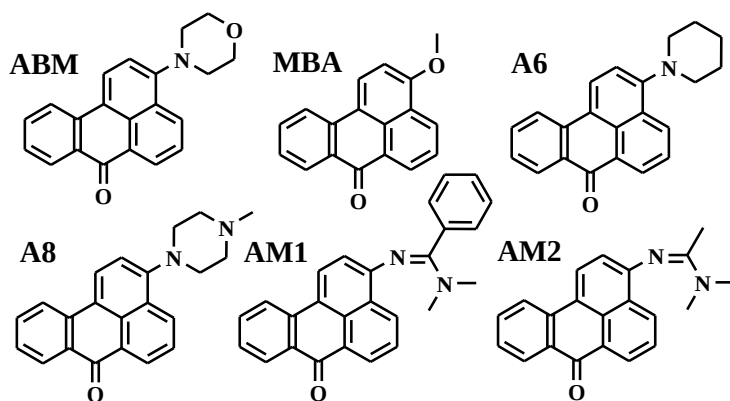


Рис. 2.4 Структурні формули бензантронових барвників

в дві краплі 20 мкл 1.5 % розчину фосфорновольфрамової кислоти, рештки якої видаляли через 5 с та 30 с, відповідно. Промивали отриманий зразок в двох краплях дистильованої води, висушували на повітрі та вивчали за допомогою електронного мікроскопу EM-125 (Selmi, Україна) при 75 кВ.

2.2.2 Амілоїдні фібрили інсуліну

Стокові розчини контрольного та фібрилярного інсуліну отримували наступним чином: 10 мг інсуліну розчиняли в 1 мл 10 мМ гліцинового буфера (рН 2). Далі, половину цього розчину інкубували при 37 °С за постійного перемішування протягом 6 днів на орбітальному шейкері (108 об/хв) для отримання амілоїдних фібрил згідно з добре задокументованою процедурою [288, 289], в той час як інша частина розчину була використана як контрольний (нефібрилізований) білок.

Амілоїдна природа білкових агрегатів підтверджувалась за допомогою аналізу флуоресценції ThT [290] та просвічуючої електронної мікроскопії (Рис. 2.6). Для моніторингу кінетики флуоресценції Тіофлавіну Т, аліквоти розчину інсуліну (10 мкл) вилучали кожні 24 години і додавали до розчину ThT у 10 мМ Tris–HCl буфері (3.72 мкМ) з подальшим записом спектрів флуоресценції барвника.

Отримані вищеописаним способом амілоїдні фібрили інсуліну позначені в Розділі 4.2 як ІнсФ1, в той час як ІнсФ2 були отримані за наступних умов: розчин інсуліну (0.3 мг/мл) у 10 мМ Tris–HCl буфері (0.15 М NaCl, рН 7.4) інкубували при 37 °С протягом 5 днів з наступною інкубацією за температури 55 °С протягом 8 годин. Розчин ІнсФ2 постійно перемішувався на орбітальному шейкері (143 об/хв). Кінетика формування амілоїдних фібрил спостерігалась за допомогою аналізу флуоресценції Тіофлавіну Т, що виявив зростання інтенсивності барвника на 480 нм в ~ 591 разів, та електронної мікроскопії (Рис. 2.7).

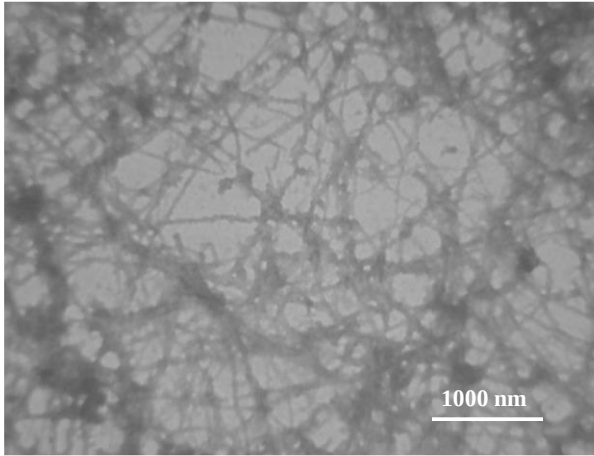
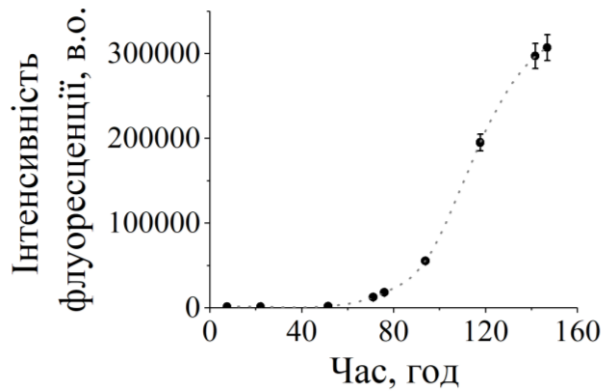


Рис. 2.5 Зображення амілоїдних фібрил лізоциму, отримане методом електронної мікроскопії

А



Б

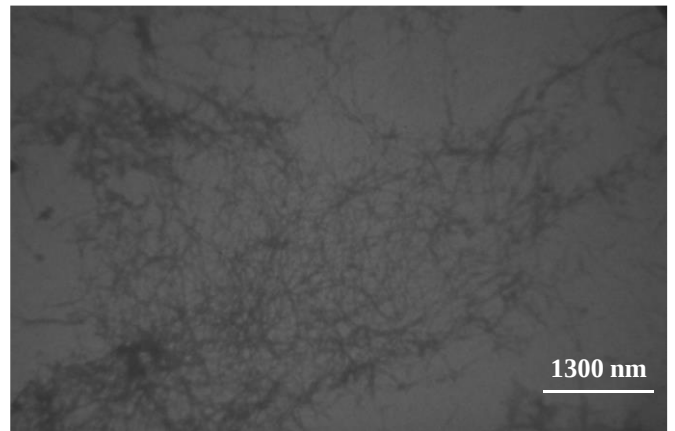
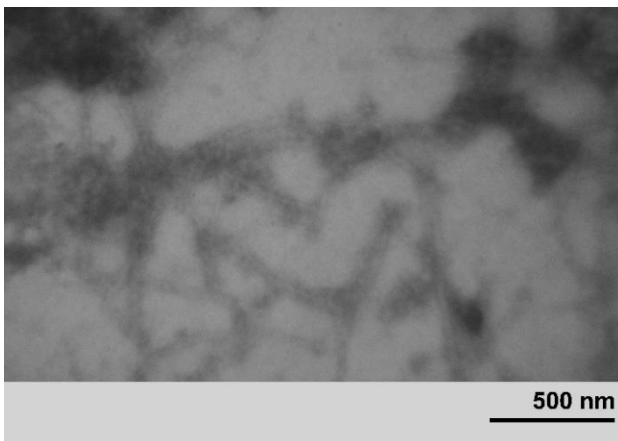


Рис. 2.6 Кінетика фібрилізації інсуліну, що спостерігалась як зростання флуоресцентного відгуку Тіофлавіну Т (А) та електронно-мікроскопічне зображення амілоїдних фібрил інсуліну (Б)

А



Б

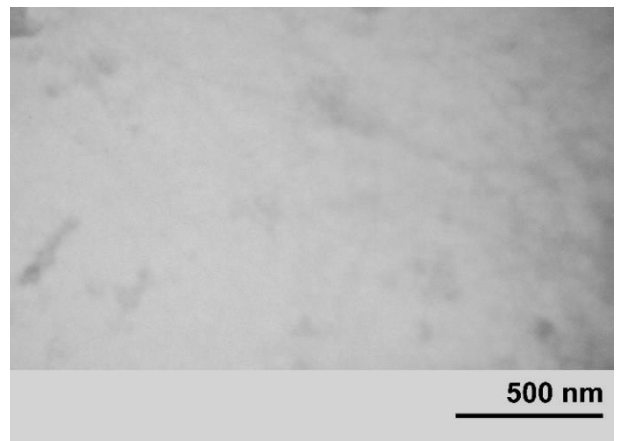


Рис. 2.7 Порівняння загального вигляду фібрилярного інсуліну двох типів ІнсФ1 (А) та ІнсФ2 (Б) за даними електронної мікроскопії

Робочі розчини білка отримували шляхом внесення стокового розчину контрольного чи фібрилярного інсуліну в 5 мМ розчин натрій-фосфатного буферу (pH 7.4, Розділ 3.2) чи в 10 мМ Tris–HCl буфер (pH 7.4, Розділ 4).

2.2.3 Флуоресцентні зонди

Стокові розчини ціанінових та сквараїнових барвників, внаслідок їх поганої розчинності у воді, були приготовані в ДМСО, бензантронові зонди та ДМХ розчиняли в етанолі, Тіофлавін Т – в Tris буфері (10 мМ, pH 7.4). Концентрації барвників у розчині визначали спектрофотометричним методом, як описано у Розділі 2.3.1.

Ціанінові барвники – фоточутливі сполуки, що складаються з двох нітроген-вмісних гетероциклічних структур, які з'єднані між собою поліметиновим ланцюгом [291]. Дані зонди представляють особливий інтерес в хімії барвників та пігментів завдяки їх широкому використанню в різних галузях науки, техніки, фармакології та біомедицини, що пояснюється їх спектральними властивостями, а саме а) високими молярними коефіцієнтами екстинкції, значними квантовими виходами в полярних середовищах, таких як сироватка крові, а також сильним зростанням флуоресценції у присутності конкретних біологічних мішеней; б) довгохвильовими смугами поглинання та флуоресценції, що сягають до ближньої інфрачервоної області спектра; в) високою чутливістю спектральних параметрів до мікрооточення; г) здатністю формувати супрамолекулярні агрегати, тощо [292–294]. Тим не менш, деякі з цих сполук мають недоліки, серед яких малий зсув Стокса [295], погана розчинність в воді [296] та низька фотостабільність у водному розчині, що пов'язана із значною гнучкістю поліметинового ланцюга [297, 298], тому є потреба у синтезі та різнобічній характеристиці нових ціанінових зондів. Ціаніни набули широкого розповсюдження в біомедичних застосуваннях як нековалентні мітки для детектування білків [299–301], нуклеїнових кислот [302–305] та ліпідів [306, 307]. Нековалентне зв'язування ціанінів з біомолекулами зазвичай

супроводжується значним зростанням випромінювання барвників в результаті формування комплексів зонд - біополімер, що стабілізуються як гідрофобними, так і електростатичними взаємодіями [303, 304, 308, 309]. Досліджувані ціанінові гептаметинові барвники АК7-5 та АК7-6 демонстрували виражену зміну спектральних властивостей у присутності ДНК, сироваткового альбуміну бика та фосфоліпідів, що вказує на можливість їх застосування для дослідження біологічних молекул [310].

Останнім часом, поряд з класичними амілоїдними маркерами Тіофлавіном Т та Конго червоним, низка як нових, так і відомих барвників успішно використовувались як амілоїдні сенсори [85, 186]. Було показано, що значні зміни спектрів поглинання та/або флуоресценції спостерігаються для ціанінових барвників при зв'язуванні з β -листовою структурою [299, 309, 311–316]. Серія моно-, три-, пента-, та гептаметинових ціанінових барвників демонструвала значне зростання флуоресценції при зв'язуванні з фібрилярним бета-лактоглобуліном [312], α -синуклеїном [308, 317, 318], інсуліном [319], лізоцимом, А β -фібрилами [314]. Нещодавно було виявлено здатність ціанінів, серед яких досліджувані три- та гептаметини, запобігати фібрилізації інсуліну за фізіологічних умов та низькому співвідношенні барвник-білок [320]. Було продемонстровано, що триметини (АК3-1, АК3-3, АК3-5, АК3-7, АК3-8 та АК3-11) характеризуються найвищою здатністю перешкоджати агрегації білка серед усіх досліджуваних ціанінів [320].

Бензотіазоловий барвник Тіофлавін Т використовується як золотий стандарт для детектування та характеристики морфології амілоїдних фібрил [321]. Висока специфічність ThT до β -листової структури виражається в суттєвому зростанні флуоресценції барвника та характеристичному синьому зсуві його максимуму випромінювання [290, 322], що обумовило його вибір як основного донору чотирихромофорного каскаду. Класичний зонд ДМХ, один із перших флуоресцентних зондів, які використовувались для дослідження білків, модельних та біологічних мембран [323–326], а також

ліпопротеїнів, у даному дослідженні був використаний поряд із серією бензантронових зондів як медіаторів каскаду ФРПЕ.

Бензантронові барвники (ББ) останнім часом привертають до себе увагу як флуоресцентні зонди для біомедичних технологій завдяки таким їх властивостям, як високі коефіцієнти екстинкції, значний зсув Стокса, виражена чутливість до полярності оточення та незначна флуоресценція у водній фазі [327, 328]. 3-метоксибензантрон (МВА), добре відомий бензантронний барвник, вперше був представлений у роботах Добрецова та співавторів близько 50-ти років тому як барвник, чутливий до змін фізико-хімічних властивостей біомембран [329, 330], конформаційних перебудов білкових молекул [331] та різних видів лімфоцитів [332, 333]. Пізніше було показано, що МВА є інтеркалятором ДНК [334]. Також було відмічено його високу цитотоксичність для живих клітин, в той час як заміщення метокси групи, групами, що містять атом нітрогену, зменшувало цитотоксичність бензантронових барвників [335]. Досліджувані бензантронові похідні є гідрофобними та сольватохромними барвниками, що характеризуються високою ліпофільністю (ABM, A6, A8, AM1, AM2 [336]) та здатністю ідентифікувати та характеризувати структуру амілоїдних фібрил (ABM, A6, A8, AM1, AM2 [336–339]). Подібним чином, було показано, що бензантрони розпізнають зміни функціональної активності лімфоцитів (ABM, [340]) та здатні візуалізувати різні види трематод (AM1, AM2, A6 [341]).

У свою чергу, симетричні сквараїнові барвники SQ1 та SQ4 були обрані для каскаду ФРПЕ завдяки довгохвильовому поглинанню та флуоресценції з максимумами в оптичному вікні біологічних тканин, а також високому квантовому виходу в зв'язаному з фібрилами стані. Раніше було показано, що SQ1 є чутливим до білково-ліпідних взаємодій, перекисного окислення ліпідів та структурних змін мембран [284, 342, 343]. Варто також зазначити, що спостережувані раніше одноетапні процеси ФРПЕ у донорно-акцепторних парах $ABM \rightarrow SQ1$ [344], $ThT \rightarrow ABM$, $ThT \rightarrow A6$,

ThT→A8 [338] на матриці амілоїдних фібрил лізоциму, а також двоетапний каскад ThT→TDV→SQ1 на фібрилах, отриманих з N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I [345] лягли в основу дослідження ФРПЕ каскаду ThT→ББ→SQ4→SQ1 у присутності фібрилярного інсуліну.

2.3 Вимірювання спектрів абсорбції та флуоресценції. Методи обробки спектральних даних

2.3.1 Вимірювання спектрів абсорбції

Спектри поглинання досліджуваних барвників, білків та їх сумішей реєстрували за допомогою спектрофотометрів СМ-2203 (SOLAR, Білорусь) та UV-2600 (Shimadzu, Японія) при кімнатній температурі, використовуючи кварцові кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Концентрацію барвників, а також лізоциму та інсуліну визначали спектрофотометричним методом за законом Бугера-Ламберта-Бера [346]:

$$A = \varepsilon Cl \quad (2.1)$$

де A – поглинання (оптична густина) розчину, ε – молярний коефіцієнт екстинкції ($M^{-1}cm^{-1}$), C – молярна концентрація (M), l – оптичний шлях, що залежить від геометрії кювети (cm).

Для розчинів ціанінових та скварайнових барвників в ДМСО використовували такі коефіцієнти екстинкції: $\varepsilon_{808} = 1.97 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (АК7-5, [2]), $\varepsilon_{814} = 2.09 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (АК7-6, [2]), $\varepsilon_{628} = 1.36 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (АК3-1, [320]), $\varepsilon_{630} = 1.59 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (АК3-3, [320]), $\varepsilon_{631} = 1.5 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (АК3-5, [320]), $\varepsilon_{632} = 1.61 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (АК3-7, [320]), $\varepsilon_{652} = 1.46 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (АК3-8, [320]), $\varepsilon_{649} = 1.53 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (АК3-11, [320]), $\varepsilon_{662} = 2.3 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (SQ1, [284]), $\varepsilon_{641} = 4.21 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ (SQ4, [4]). Для етанольних розчинів бензантронів та ДМХ – $\varepsilon_{429} = 9.6 \cdot 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ (МВА, [347]), $\varepsilon_{444} = 2.14 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ (АВМ, [344]), $\varepsilon_{455} = 1.02 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ (А6, [214]), $\varepsilon_{444} = 8.51 \cdot 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ (А8, [214]), $\varepsilon_{470} = 1.86 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ (АМ1, [214]), $\varepsilon_{470} = 1.58 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ (АМ2, [214]) та

$\varepsilon_{418} = 3.46 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ДМХ, [330]). Для визначення концентрації буферних розчинів Тіофлавіну Т та білків були взяті наступні коефіцієнти екстинкції: $\varepsilon_{412} = 3.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ThT, [188]), $\varepsilon_{280} = 3.78 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (лізоцим, [284]), $\varepsilon_{277} = 6.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (тирозинові залишки інсуліну, [348]).

Для того, щоб оцінити константи рівноваги утворення Н-димерів та Н-агрегатів, спектри поглинання гептаметинових ціанінових барвників у 10 мМ Tris буфері (рН 7.4) записували при зростанні концентрації зонду. Для кількісного аналізу зв'язування даних барвників з лізоцимом, розчини АК7-5 та АК7-6 титрувались білком.

Для того, щоб виміряти спектри поглинання триметинових ціанінових барвників у водній фазі чи у комплексі з білком, відповідну кількість стокових розчинів барвників в ДМСО додавали до 5 мМ натрій-фосфатного буферу (рН 7.4) чи до робочих розчинів неагрегованого та фібрилярного інсуліну/лізоциму та інкубували протягом години.

2.3.2 Вимірювання флуоресценції

Спектри флуоресценції записували за допомогою спектрофлуориметру RF-6000 (Shimadzu, Японія) за кімнатної температури, використовуючи кварцові кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

При реєстрації спектрів флуоресценції гептаметинів, робочі розчини барвників були отримані шляхом розбавлення відповідної кількості стокових розчинів АК7-5 та АК7-6 у 5 мМ натрій-фосфатному буфері (рН 7.4). Ширина щілин збудження та емісії становила 5 нм, а довжини хвиль збудження вказані в підписах до рисунків.

Спектри випромінювання триметинових ціанінових барвників в 5 мМ натрій-фосфатному буфері чи в присутності нефібрилизованого або фібрилярного інсуліну записували при довжині хвилі збудження 590 нм. Ширина щілин збудження та випромінювання була встановлена на рівні 10 нм.

При вимірюванні ФРПЕ спектри флуоресценції записувались в діапазоні 460–820 нм при довжині хвилі збудження основного донору, Тіофлавіну Т, на 440 нм. Ширина обох щілин становила 10 нм. Щоб виміряти спектри флуоресценції каскаду хромофорів, відповідну кількість кінцевого акцептору (SQ1) або основного донору (ThT) інкубували з робочими розчинами контрольного та фібрилярного інсуліну (в 10 мМ Tris–HCl буфері) з подальшим додаванням донорів або акцепторів, відповідно.

2.3.3 Деконволюція спектрів поглинання та флуоресценції

Для того, щоб більш детально проаналізувати агрегаційну поведінку триметинових ціанінових зондів, а також розрахувати ефективності переносу енергії в багатоетапному ФРПЕ, виключивши ефект перекривання спектрів флуоресценції різних хромофорів, спектри поглинання та випромінювання, відповідно, були розкладені за допомогою програмного забезпечення Origin 9.4 (OriginLab Corporation, США) з використанням лог-нормальної асиметричної функції [289]:

$$I = I_{\text{макс}} \exp \left[-\frac{\ln 2}{\ln^2(\rho)} \ln^2 \left(\frac{a - \nu}{a - \nu_{\text{ц}}} \right) \right] \quad (2.2)$$

де ν – хвильове число, I – інтенсивність флуоресценції або поглинання в шкалі хвильових чисел $I(\nu) = \lambda^2 I(\lambda)$ [346]; $I_{\text{макс}} = I(\nu_{\text{ц}})$ – максимум інтенсивності флуоресценції або поглинання (амплітуда піку), $\nu_{\text{ц}}$ –

положення піку, $\rho = \frac{\nu_{\text{ц}} - \nu_{\text{мін}}}{\nu_{\text{макс}} - \nu_{\text{ц}}}$ – асиметрія смуги, $\nu_{\text{макс}}$ та $\nu_{\text{мін}}$ – максимальне та

мінімальне значення хвильового числа на половині амплітуди;

$a = \nu_{\text{ц}} + \frac{(\nu_{\text{макс}} - \nu_{\text{мін}}) \cdot \rho}{\rho^2 - 1}$ – граничне хвильове число, після досягнення якого

інтенсивність стає рівною нулю.

2.3.4 Метод Фьорстерівського резонансного переносу енергії

Фьорстерівський резонансний перенос енергії є загальновідомим фізичним процесом, в якому флуорофор у збудженому стані (донор) переносить енергію безвипромінювальним шляхом на інший флуорофор (акцептор) завдяки далекодіючим диполь-дипольним взаємодіям [349]:



Ефективність переносу енергії зручно визначати з гасіння флуоресценції донора у присутності акцептора як [346]:

$$E = 1 - k \frac{I_{D \rightarrow A}}{I_D} \quad (2.4)$$

де I_D , $I_{D \rightarrow A}$ – інтенсивності флуоресценції донора у відсутності та присутності акцептора, відповідно; $k = 10^{(A_a^{\text{збудж}} + A_a^{\text{еміс}})/2}$ – коефіцієнт корекції на ефект внутрішнього фільтру, $A_a^{\text{збудж}}$ та $A_a^{\text{еміс}}$ – поглинання акцептора на довжинах хвиль збудження донора та випромінювання, відповідно.

Радіуси Фьорстера були обраховані для кожної донорно-акцепторної пари за допомогою програмного забезпечення Mathcad 15.0 (PTC) використовуючи наступну формулу:

$$R_0 = 979 \left(\kappa^2 n^{-4} Q_D J \right)^{1/6} \quad (2.5)$$

де κ^2 – орієнтаційний фактор, що залежить від відносної просторової орієнтації дипольних моментів переходу донора та акцептора; n – показник заломлення середовища; Q_D – квантовий вихід донора, що розраховувався як:

$$Q_D = Q_C \frac{(1 - 10^{-A_c}) S_D n_D^2}{(1 - 10^{-A_D}) S_C n_C^2} \quad (2.6)$$

де Q_C – квантовий вихід стандарту, A_D та A_C – поглинання на довжині хвилі збудження донору, S_D та S_C – площі під спектрами флуоресценції, n_D та n_C – показники заломлення розчинів, в яких були записані спектри флуоресценції

донора та стандарта, відповідно. Як стандарти для ThT, ДМХ, бензантронових зондів та SQ4 в амілоїдних фібрилах були взяті наступні розчини: Тіофлавін Т в буфері ($Q_c = 10^{-4}$ [199]), ДМХ в етанолі ($Q_c = 0.2$ [347]), ДСП-6 в етанолі ($Q_c = 0.05$ [347]) та Нільський Блакитний у воді ($Q_c = 0.01$ [350]), відповідно.

Інтеграл перекривання J визначався як:

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_0^{\infty} F_D(\lambda) d\lambda \quad (2.7)$$

де $F_D(\lambda)$ – інтенсивність флуоресценції донора, $\varepsilon_A(\lambda)$ – молярне поглинання акцептора на довжині хвилі λ .

Відстань між хромофорами обраховували з ефективності переносу енергії згідно з рівнянням:

$$r = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6} \quad (2.8)$$

У даному дослідженні розглядалась чотирихромофорна система переносу енергії. Варто зазначити, що загальний вид рівнянь, які описують дану систему залежить від шляхів переносу енергії між хромофорами (Рис. 2.8).

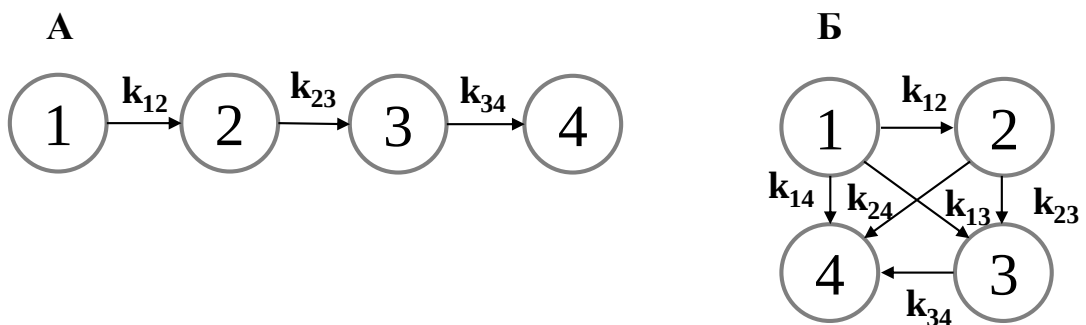


Рис. 2.8 А – послідовний (трьохетапний) Фьорстерівський резонансний перенос енергії, Б – всі можливі шляхи переносу енергії в чотирихромофорній системі

У загальному випадку, гасіння збудженого стану хромофорів описується наступними рівняннями [351]:

$$\frac{d[1^*]}{dt} = -(k_{e1} + k_{oe1} + k_{12} + k_{13} + k_{14})[1^*] \quad (2.9a)$$

$$\frac{d[2^*]}{dt} = -(k_{e2} + k_{oe2} + k_{23} + k_{24})[2^*] + k_{12}[1^*] \quad (2.9б)$$

$$\frac{d[3^*]}{dt} = -(k_{e3} + k_{oe3} + k_{34})[3^*] + k_{23}[2^*] + k_{13}[1^*] \quad (2.9в)$$

$$\frac{d[4^*]}{dt} = -(k_{e4} + k_{oe4})[4^*] + k_{34}[3^*] + k_{24}[2^*] + k_{14}[1^*] \quad (2.9г)$$

де $[i^*]$ – концентрація i -го хромофору в збудженому стані, k_{ei} та k_{oei} – константи швидкості випромінювальної та загальної безвипромінювальної дезактивації i -го донору у відсутності акцептора, k_{ij} – константа швидкості переносу енергії з i -го хромофору на j -ий.

У випадку послідовного переносу енергії (Рис. 2.8А) у каскаді хромофорів $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4$ за граничних умов, коли припускається тільки пряме збудження основного донору 1:

$$\begin{aligned} [1^*]_0 &= [1^*](t=0) = N_0 \\ [2^*]_0 &= [3^*]_0 = [4^*]_0 = 0 \end{aligned} \quad (2.10)$$

можна отримати, що залежність флуоресценції i -го хромофору від часу спадатиме згідно з наступними рівняннями:

$$[1^*](t) = N_0 \exp\{-(k_{e1} + k_{oe1} + k_{12})t\} \quad (2.11a)$$

$$[2^*](t) = \frac{N_0 k_{12} \left[e^{-(k_{e1} + k_{oe1} + k_{12})t} - e^{-(k_{e2} + k_{oe2} + k_{23})t} \right]}{(k_{e2} + k_{oe2} + k_{23}) - (k_{e1} + k_{oe1} + k_{12})} \quad (2.11б)$$

$$[3^*](t) = \frac{N_0 k_{12} k_{23}}{A - B} \left[\frac{e^{-At} - e^{-Dt}}{A - D} + \frac{e^{-Bt} + e^{-Dt}}{D - B} \right] \quad (2.11в)$$

$$[4^*](t) = \frac{N_0 k_{12} k_{23} k_{34}}{A - B} \left[\frac{(E - D)(e^{-At} - e^{-Et}) + (E - A)(e^{-Et} - e^{-Dt})}{(A - D)(E - A)(E - D)} + \frac{(E - D)(e^{-Bt} - e^{-Et}) + (E - B)(e^{-Et} - e^{-Dt})}{(D - B)(E - B)(E - D)} \right] \quad (2.11\Gamma)$$

де константи $A = k_{e1} + k_{oe1} + k_{12}$, $B = k_{e2} + k_{oe2} + k_{23}$, $D = k_{e3} + k_{oe3} + k_{34}$ та $E = k_{e4} + k_{oe4}$ були введені для зручності запису, однак не позбавлені фізичного сенсу та являють собою обернену величину до часу життя i -го хромофору в присутності переносу енергії на j -тий акцептор (окрім останньої константи, що є оберненою до часу життя 4-го барвника в загальноприйнятому вигляді).

В результаті інтегрування $[i^*](t)$ за часом отримують інтенсивність флуоресценції i -го хромофору, що виражається відносно N_0 :

$$I_i = \frac{1}{N_0} \int_0^{\infty} [i^*](t) dt \quad (2.12)$$

Таким чином, інтенсивності флуоресценції кожного хромофору при послідовному переносі енергії описуються наступними рівняннями:

$$I_1 = \frac{1}{A} = \frac{1}{k_{e1} + k_{oe1} + k_{12}} \quad (2.13a)$$

$$I_2 = \frac{k_{12}}{A \cdot B} \quad (2.13б)$$

$$I_3 = \frac{k_{12} \cdot k_{23}}{A \cdot B \cdot D} \quad (2.13в)$$

$$I_4 = \frac{k_{12} \cdot k_{23} \cdot k_{34}}{A \cdot B \cdot D \cdot E} \quad (2.13г)$$

Ефективність переносу енергії від i -го донора до j -го акцептора вводять як відношення швидкості переносу енергії k_{ij} до суми всіх швидкостей дезактивації збудженого стану:

$$E_{ij} = \frac{k_{ij}}{k_{ei} + k_{oei} + k_{ij}} \quad (2.14)$$

Отже, ефективності переносу енергії в донорно-акцепторних парах $1 \rightarrow 2$, $2 \rightarrow 3$ та $3 \rightarrow 4$ можна записати як $E_{12} = \frac{k_{12}}{A}$, $E_{23} = \frac{k_{23}}{B}$ та $E_{34} = \frac{k_{34}}{D}$. У той час,

ефективність переносу енергії повного каскаду зручно визначати за зростанням флуоресценції кінцевого акцептору, тобто як відношення інтенсивності акцептору до його часу життя $\tau_4 = 1/(k_{e4} + k_{oe4})$:

$$E_{1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4} = \frac{I_4}{\tau_4} = \frac{k_{12} \cdot k_{23} \cdot k_{34}}{A \cdot B \cdot D \cdot E} E = E_{12} \cdot E_{23} \cdot E_{34} \quad (2.15)$$

З рівняння (2.15) можна зробити висновок, що загальна ефективність трьохетапного ФРПЕ є добутком значень E для кожного окремого етапу переносу енергії. Подібним чином, тобто шляхом розв'язання диференціальних рівнянь (2.9 а–г) та подальшого інтегрування за формулою (2.12), була отримана інтенсивність останнього акцептора для випадку, що враховує всі можливі шляхи переносу енергії (Рис. 2.8Б):

$$I''_4 = \frac{k_{12}k_{23}k_{34} + k_{13}k_{34}B' + k_{12}k_{24}D + k_{14}B' \cdot D}{A' \cdot B' \cdot D \cdot E} \quad (2.16)$$

де константи $A' = k_{e1} + k_{oe1} + k_{12} + k_{13} + k_{14}$ та $B' = k_{e2} + k_{oe2} + k_{23} + k_{24}$ є обернено пропорційними до часу життя в присутності паралельних шляхів переносу енергії. Подібно до (2.14) вводять ефективності ФРПЕ E'_{ij} для пар $1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$, $2 \rightarrow 3$ та $2 \rightarrow 4$ у присутності додаткових швидкостей переносу енергії k_{ik} (оскільки від 3-го барвника енергія переноситься тільки на 4-й хромофор, то вигляд E_{34} не змінюється). Загальна ефективність трьохетапного переносу енергії в присутності паралельних шляхів ФРПЕ має вигляд:

$$E_{\text{загальн}} = \frac{I''_4}{\tau_4} = E'_{12} \cdot E'_{23} \cdot E_{34} + E'_{13} \cdot E_{34} + E'_{12} \cdot E'_{24} + E'_{14} \quad (2.17)$$

Варто зазначити, що рівняння (2.17) зводиться до (2.15) при відсутності паралельних шляхів ФРПЕ, тобто при $k_{13} \rightarrow 0$, $k_{14} \rightarrow 0$ та $k_{24} \rightarrow 0$.

2.4 Методи комп'ютерного моделювання та обробки даних

Обробку експериментальних даних, а саме визначення констант рівноваги та порядку агрегації гептаметинових барвників, констант асоціації та стехіометрії комплексів барвників з нативним та фібрилярним білком, а також квантових виходів зондів та параметрів Фьорстерівського

резонансного переносу енергії, було проведено в програмному середовищі MathCad 15 (MathSoft Inc., США). Для чисельного моделювання та оптимізації теоретичних значень параметрів використовували вбудовані алгоритми програми MathCad. Для графічного представлення експериментальних даних та результатів чисельного моделювання використовувалось програмне забезпечення Origin 9.4 (OriginLab Corporation, США).

2.4.1 Метод молекулярного докінгу

Структури ціанінових, бензантронових, сквараїнових барвників, а також Тіофлавіна Т були побудовані у програмному середовищі MarvinSketch (версія 18.10.0) [352] та оптимізовані у програмі Avogadro (версія 1.1.0) [353] або за допомогою напівемпіричного методу PM6 (MOPAC2016 версія 18.012L) [354]. Моделі димерів ціанінових гептаметинових та триметинових барвників були отримані за допомогою алгоритму PatchDock [355]. Кристалічні структури нативного лізоциму з яєчного білка (PDB код 3A8Z) та інсуліну бика (PDB код 2ZP6) були отримані з Protein Data Bank.

Модель фібрили лізоциму з яєчного білка була отримана за допомогою програмного забезпечення CreateFibril, що передбачає поступальні та ротаційні афінні перетворення, які дозволяють створювати кілька ідентичних копій фрагменту фібрили та стикувати їх паралельно один одному, подовжуючи, таким чином, фібрилярний агрегат білка [356, 357]. Для створення амілоїдних фібрил лізоциму була обрана послідовність залишків 54–62 дикого типу лізоциму з яєчного білка, GILQINSRW, що утворює кор амілоїдних фібрил та відома під назвою К-пептид [358].

Модель амілоїдних фібрил людського інсуліну була отримана за посиланням <http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/jmol/fibrilmodels/>. Дана модель складається з а) інтерфейсу «стеричної блискавки» (остову фібрили), недоступного для розчинника та сформованого двома антипаралельними сегментами LVEALYL ланцюга Б (залишки 11–17); б) двох зовнішніх

β -листів, сформованих сегментами LYQLENY ланцюга А (залишки 13–19), що додатково стабілізують остов фібрили; в) N-кінців обох ланцюгів, що залишились в нативній конформації [275, 279]. Варто зазначити, що на противагу експерименту, через відсутність моделі фібрили інсуліну з підшлункової залози бика, в дослідженні методом молекулярного докінгу була використана відома і чітко визначена структурна модель амілоїдних фібрил людського інсуліну. Нативна структура людського та бичачого інсуліну складається з двох ланцюгів (ланцюг А містить 21 залишок, ланцюг Б – 30 залишків) з переважним вмістом α -спіральної конформації. Як первинна, так і вторинна структури двох нативних видів інсуліну (людського та бичачого) дуже схожі. Лише два залишки ланцюга А (Thr8/Ala8 та Ile10/Val10) та один залишок ланцюга Б (Thr30/Ala30) відрізняються в людському/бичачому інсуліні, відповідно [359]. Слід зазначити, що вищевказані залишки розташовані на кінцях ланцюгів А та Б, які знаходяться в нативній конформації та не входять до складу кору модельної фібрили людського інсуліну (який формується залишками 13А–19А та 11Б–17Б) [333]. З огляду на це, можна очікувати високий ступінь подібності структур фібрил людського та бичачого інсуліну. Для спрощення розрахунків молекулярного докінгу, з оригінальної моделі було вирізано лише 12 тяжів (тобто ланцюгів А–L моделі з урахуванням того, що один ланцюг моделі складається з двох ланцюгів А та двох ланцюгів Б білка, розташованих по один бік від інтерфейсу «стеричної блискавки»).

Дослідження методом молекулярного докінгу були проведені з метою ідентифікації можливих сайтів зв'язування барвників з нативним та фібрилярним білком. Для пошуку сайтів зв'язування ціанінових барвників з амілоїдними фібрилами лізоциму та інсуліну використовували зручний при користуванні алгоритм PatchDock [355], що дозволяє обрахувати найбільш оптимальні структури комплексів барвника з білком у припущенні, що взаємодіючі молекули є жорсткими та не флуктуючими. Даний алгоритм знаходить максимальну комплементарність поверхонь за мінімальних

стеричних зіткнень. Опісля, 10 найбільш енергетично вигідних конформацій уточнялись за допомогою алгоритму FireDock, що перераховує зміну відносного положення бокових ланцюгів у комплексі барвника з білком за допомогою мінімізації функції зв'язування методом Монте Карло та включає в себе такі компоненти як енергію ван-дер-ваальсових взаємодій ліганда з білком та вільну енергію десольватації [360]. Отримані таким чином комплекси були візуалізовані за допомогою програми Visual Molecular Dynamics (VMD) (версія 1.9.3) [361].

З використанням алгоритмів PatchDock та FireDock також оцінювали сайти зв'язування хромофорів каскаду ФРПЕ ThT→DMX→SQ4→SQ1 з амілоїдними фібрилами інсуліну, що були більш детально проаналізовані при дослідженні чотирьоххромофорних систем з бензантроновими медіаторами використовуючи: а) SwissDock сервер [362], та б) AutoDock (версії 4.2) інкорпорований у програмне забезпечення PyRx (версії 0.8) [363–365]. SwissDock, що базується на силовому полі CHARMM та алгоритмі EADock DDS (dihedral space sampling) [366, 367], застосовували переважно для «сліпого докінгу» (“blind docking”, коли сайти зв'язування білка з лігандом не встановлено). Кожен комплекс барвника з білком завантажували на сервер 5 разів, найбільш енергетично вигідні комплекси були відібрані серед загального числа структур. Слід зазначити, що кількість прогонів (256) для кожного розрахунку є достатньою для надійного прогнозування сайтів зв'язування. AutoDock, програмне забезпечення, що широко використовується для досліджень методом молекулярного докінгу, базується на ламарківському генетичному алгоритмі (Lamarckian genetic algorithm) та емпіричному силовому полі вільної енергії [363, 368]. За допомогою AutoDock знаходили найбільш енергетично вигідні комплекси з жолобками фібрил – унікальними сайтами зв'язування для малих молекул. Доковані комплекси візуалізували за допомогою програми UCSF Chimera (версія 1.14) [369].

2.4.2 Квантово-хімічні розрахунки

За допомогою напівемпіричного методу PM6 та програмного забезпечення MOPAC2016 [354] була проведена оптимізація геометрії конформацій барвників з подальшим розрахунком квантово-хімічних характеристик, а саме площі, що доступна для розчинника (CA), молекулярного об'єму (CV), енергії найвищої зайнятої (E_{HOMO}) та найнижчої незайнятої (E_{LUMO}) молекулярних орбіталей, довжину (L), ширину (W) та висоту (H) молекули, дипольний момент основного стану (μ_g) та молекулярну вагу ($M.wt.$). Ліпофільність сполук (LogP) була отримана за допомогою програми ALOGPS 2.1 (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>) [370].

2.4.3 Молекулярно-динамічне моделювання

Молекулярно-динамічне моделювання було проведене за допомогою програмного пакету GROMACS (версія 5.1) у силовому полі CHARMM36m, з використанням моделі води TIP3P [371]. Кристалічні структури дикого типу лізоциму людини (PDB код 1REX) та людського інсуліну (PDB код 3I3Z) були обрані як початкові структури для моделювання теплової денатурації.

За допомогою графічного інтерфейсу CHARMM-GUI (доступного за посиланням <http://www.charmm-gui.org/>, [372]) були введені всі мутації в структуру дикого типу інсуліну (His^{A8} , Val^{A10} , Asp^{B10} , Gln^{B17} , Ala^{B17} , Gln^{B18} , Asp^{B25} , Thr^{B26} , Glu^{B27} , Asp^{B28} , $\text{Glu}^{\text{A13}}+\text{Glu}^{\text{B10}}$, $\text{Ser}^{\text{A13}}+\text{Glu}^{\text{B27}}$, $\text{Glu}^{\text{B1}}+\text{Glu}^{\text{B27}}$, $\text{Ser}^{\text{B2}}+\text{Asp}^{\text{B10}}$, $\text{Asp}^{\text{B9}}+\text{Glu}^{\text{B27}}$, $\text{Glu}^{\text{B16}}+\text{Glu}^{\text{B27}}$, $\text{Glu}^{\text{A15}}+\text{Asp}^{\text{A18}}+\text{Asp}^{\text{B3}}$) та мутації F57I, Y54N та W64R – у послідовність дикого типу (ДТ) лізоциму, а також подвійні мутації W112R і F57I в структуру мутанту T70N (PDB код 1W08), тоді як інші два мутанти лізоциму, включаючи I56T (1LOZ) та D67H (1LYY) були взяті з банку PDB. Вхідні файли для МД розрахунків були підготовлені за допомогою модуля Solution Builder програми CHARMM-GUI [373].

Білки дикого типу лізоциму та інсуліну, а також їх мутанти були сольватовані у прямокутному боксі, розмір якого був підігнаний до розміру

білка таким чином, щоб мінімальна відстань від стінок боксу становила 10 Å. Для того, щоб отримати нейтральний заряд, у систему білок-вода було добавлено необхідну кількість протиіонів: оскільки білок лізоциму людини заряджений позитивно, то в систему, в залежності від мутації, вносились від 8 до 9 іонів хлору, в той час як для мутантів інсуліну вводилось від 2 (для дикого типу білка) до 5 позитивних іонів. Кількість атомів у сольватованих білкових системах коливалось від 22975 до 29727 для лізоциму та від 14670 до 17573 для мутантів інсуліну. Для урахування далекодіючих електростатичних взаємодій був використаний алгоритм PME (The Particle Mesh Ewald algorithm) [374]. Мінімізацію та врівноваження системи проводили протягом 100 пс та 500 пс, відповідно. Часовий крок інтегрування рівнянь становив 2 фс. Траєкторії та координати зберігались кожні 2 пс для подальшого аналізу. Часовий інтервал МД розрахунків становив 100 нс.

Дикий тип лізоциму моделювався при двох різних температурах, 300 К та 500 К, у той час як МД розрахунки всіх мутантів проводили при температурі 500 К і тиску 1 бар. Дикий тип інсуліну та його 17 мутантів, з огляду на дволанцюгову структуру, що більш схильна до деструкції, розраховувались за більш м'яких умов – 400 К. Для розрахунку середньоквадратичних відхилень (СКВ), середньоквадратичних флуктуацій C_{α} -атомів (СКФ), радіусу інерції (PI) та залежності площі поверхні, що доступна для розчинника (ППДР), від залишку були використані засоби аналізу програмного пакету GROMACS. Еволюція вторинної структури досліджувалась за допомогою інструменту Timeline та скриптів Tcl програми VMD [361].

Висновки до розділу 2

1. У роботі використовувались як загальновідомі барвники (ThT, ДМХ, МВА), так і низка нових ціанінових, скварайнових та бензантронових барвників досліджувались на предмет чутливості до амілоїдних фібрил. Утворення амілоїдних фібрил лізоциму та інсуліну за денатуруючих

умов було підтверджено за допомогою методу просвічуючої електронної мікроскопії та аналізу флуоресценції Тіофлавіну Т.

2. Основним методом дослідження зв'язування гептаметинових та триметинових ціанінових барвників з амілоїдними фібрилами була абсорбційна спектроскопія, що дозволило виявити зміни агрегаційної поведінки ціанінів у присутності фібрилярного та контрольного білка у порівнянні з буфером.
3. Інформацію про амілоїдну чутливість чотирихромофорних систем $\text{ThT} \rightarrow \text{DMX} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$ та $\text{ThT} \rightarrow \text{BB} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$ було отримано за допомогою аналізу спектрів флуоресценції згідно з теорією Фьорстерівського резонансного переносу енергії.
4. Можливі сайти зв'язування досліджуваних барвників з фібрилярним білком оцінювали методом молекулярного докінгу, використовуючи кілька різних алгоритмів.
5. Вплив амілоїдогенних мутантів на структурно-динамічні властивості та стабільність людського лізоциму та інсуліну визначали за допомогою методу молекулярної динаміки.

Основні результати цього розділу викладені в роботах: [1-8].

РОЗДІЛ 3

АМІЛОЇДНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ НОВИХ ЦІАНІНОВИХ БАРВНИКІВ ЗА ДАНИМИ МЕТОДІВ АБСОРБЦІЙНОЇ ТА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

Наразі ціанінові барвники успішно застосовуються як нековалентні мітки для детектування амілоїдних фібрил. Для прикладу можна навести піноціаноловий барвник, що виявився більш чутливим до А β – фібрил, ніж Конго червоний [314], триметинові ціаніни, що демонстрували значне підвищення інтенсивності флуоресценції у присутності фібрилярного бета-лактоглобуліну (Т-49 та SH-516), α -синуклеїну (Т-284 та SH-516), лізоциму (D-33, D-17, 7524, DC-21, D-66, D-51 та D-35) та інсуліну (D-151, D-51) [308, 311, 312], тоді як нові тіакарбоціаніни [315], триметиновий ціаніновий барвник 7519 [375] та ціаніни на основі карбазолу [316] використовувались як антиамілоїдні препарати. Варто відзначити, що здатність барвників інгібувати формування амілоїдних фібрил пов'язана з їх тенденцією до агрегації у розчині завдяки сильним стекінг-взаємодіям ароматичних амінокислот, як було показано для фталоціанінів, Конго червоного та ін. [376–378]. З огляду на це, у даному розділі було розглянуто здатність гептаметинових та триметинових барвників детектувати амілоїдні фібрили лізоциму та інсуліну, а саме, були проаналізовані відмінності в спектральних відгуках та кількісних параметрах комплексоутворення для фібрилярної та не агрегованої форм білків, та ідентифіковано можливі сайти зв'язування барвників з амілоїдними фібрилами.

3.1 Особливості зв'язування нових гептаметинових ціанінових барвників з нативним та фібрилярним лізоцимом

Виявилось, що гептаметинові барвники мають слабку флуоресцентну відповідь у присутності як нативного, так і фібрилярного білка. Тому амілоїдну специфічність даних зондів було протестовано за допомогою

абсорбційної спектроскопії. Спектр поглинання гептаметинових зондів у буфері можна розкласти щонайменше на 4 різні компоненти, які, ймовірно, відповідають мономерам барвника ($M, \lambda_{\text{макс}} \sim 808/815 \text{ нм}$ для АК7-5/АК7-6, відповідно), Н-димерам ($D, \lambda_{\text{макс}} \sim 700/695 \text{ нм}$) та Н-агрегатам більш високого порядку ($H1, \lambda_{\text{макс}} \sim 595 \text{ нм}$ та $H2, \lambda_{\text{макс}} \sim 640/630 \text{ нм}$) (Рис. 3.1). У роботі [379] було відзначено, що біс-гептаметинові ціанінові барвники знаходяться у водному розчині переважно у вигляді Н-димерів. Формування Н-агрегатів у буфері починається з нижчих концентрацій зонда [380], у порівнянні з концентраціями, необхідними для J-агрегації барвника (від $\sim 10^{-5}$ до 10^{-3} M^{-1}) [381]. Розширення мономерної смуги (у порівнянні зі спектром поглинання в органічному розчиннику, Рис. 3.1) може свідчити про появу деякої кількості J-агрегатів [382, 383]. Дійсно, включення позитивно заряджених або об'ємних груп у молекулу барвника спричиняє посилення J-агрегації [384, 385]. Крім того, у відповідності до екситонної теорії, чим більший розмір агрегату, тим більш значний гіпсхромний/батохромний зсув Н/J-смуги у порівнянні з піком мономерів [386, 387].

Для якісного опису процесів агрегації ціанінових барвників у буфері застосовують різні підходи. Наприклад, у роботі [388] була проведена оцінка константи агрегації та кількості аніонних ціанінових барвників з подвійно-логарифмічної залежності поглинання J-агрегатів від поглинання мономерів. На основі аналізу середнього значення коефіцієнту екстинкції нафталоціанінів на певній довжині хвилі було визначено порядок агрегації $n \sim 1.5 - 2.0$ та константу агрегації $K_{\text{агр}} \sim 4.5 \cdot 10^{-3} - 3.1 \cdot 10^{-2} \text{ мкМ}^{-1}$ [385]. Припускаючи найпростіший випадок, тобто рівновагу між мономерною та димерною формами, за допомогою ряду графічних методів були отримані константи димеризації, що становили $\sim (3.8 - 8.5) \cdot 10^{-3} \text{ мкМ}^{-1}$ для бензіндокарбоціанінових барвників [389]; $\sim 2.6 \cdot 10^{-3} \text{ мкМ}^{-1}$ для моноядерних кобальтових фталоціанінів [390]; $\sim (7.4 - 110) \cdot 10^{-3} \text{ мкМ}^{-1}$ та $n \sim 1.2 - 1.7$ для

тіаціанінів [391]; $i \sim 7.4-9.3 \text{ мкМ}^{-1}$ для тетрасульфонованих фталоціанінів [392], тощо. Для рівноваги мономер – n-агрегат у загальному випадку може бути знайдено числове розв’язання рівняння балансу між загальною концентрацією барвника і кількістю мономерів, димерів, ..., n-агрегатів, в результаті чого стануть відомі концентрація мономерів у буфері та загальна константа агрегації $K_n^{\text{загальна}} = K_1 \cdot K_2 \cdot \dots \cdot K_n$, де $K_1, K_2, \dots, K_n$ – константи димеризації, тримеризації, ..., n-меризації, відповідно. Для прикладу, Шутте та його колеги даним методом отримали константу димеризації $K_1 = 1.5 \text{ мкМ}^{-1}$ та добуток констант $K_1 \cdot K_2 = 0.08 \text{ мкМ}^{-2}$ для окталозаміщених фталоціанінів [393].

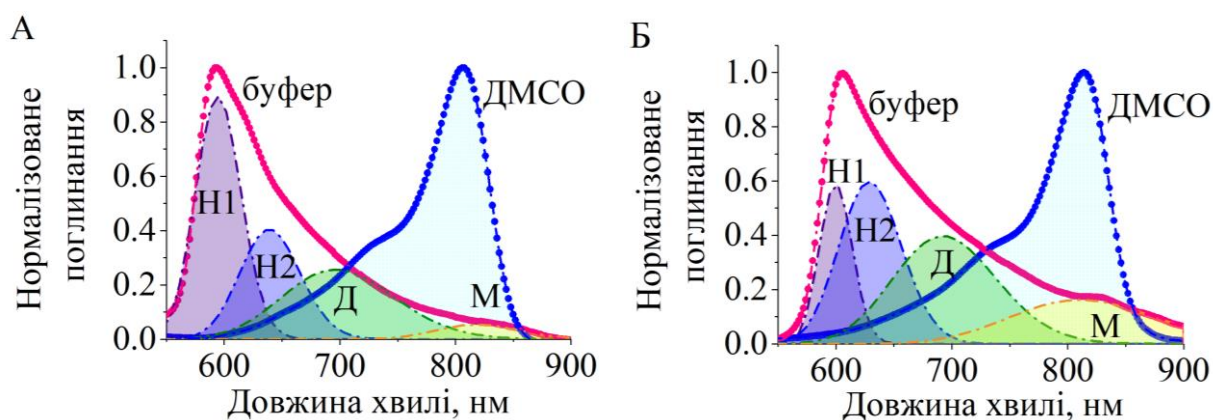


Рис. 3.1 Деконволюція нормованих спектрів поглинання гептаметинів АК7-5 (А) та АК7-6 (Б) у буфері на чотири компоненти (Н-агрегати $H1$ та $H2$, Н-димери D , та мономер M). Темно-синім позначено нормований спектр поглинання в ДМСО. Концентрації барвників становили 12.2 та 13.5 мкМ, відповідно

Залежності спектрів поглинання від концентрації фібрил та нативного білка були проаналізовані за допомогою моделі, яка дозволяє врахувати зсув рівноваги між різними формами зондів, викликаний зв’язуванням мономерів та димерів АК7-5 та АК7-6 з амілоїдними фібрилами. Перш ніж характеризувати систему барвник-білок, було оцінено константи

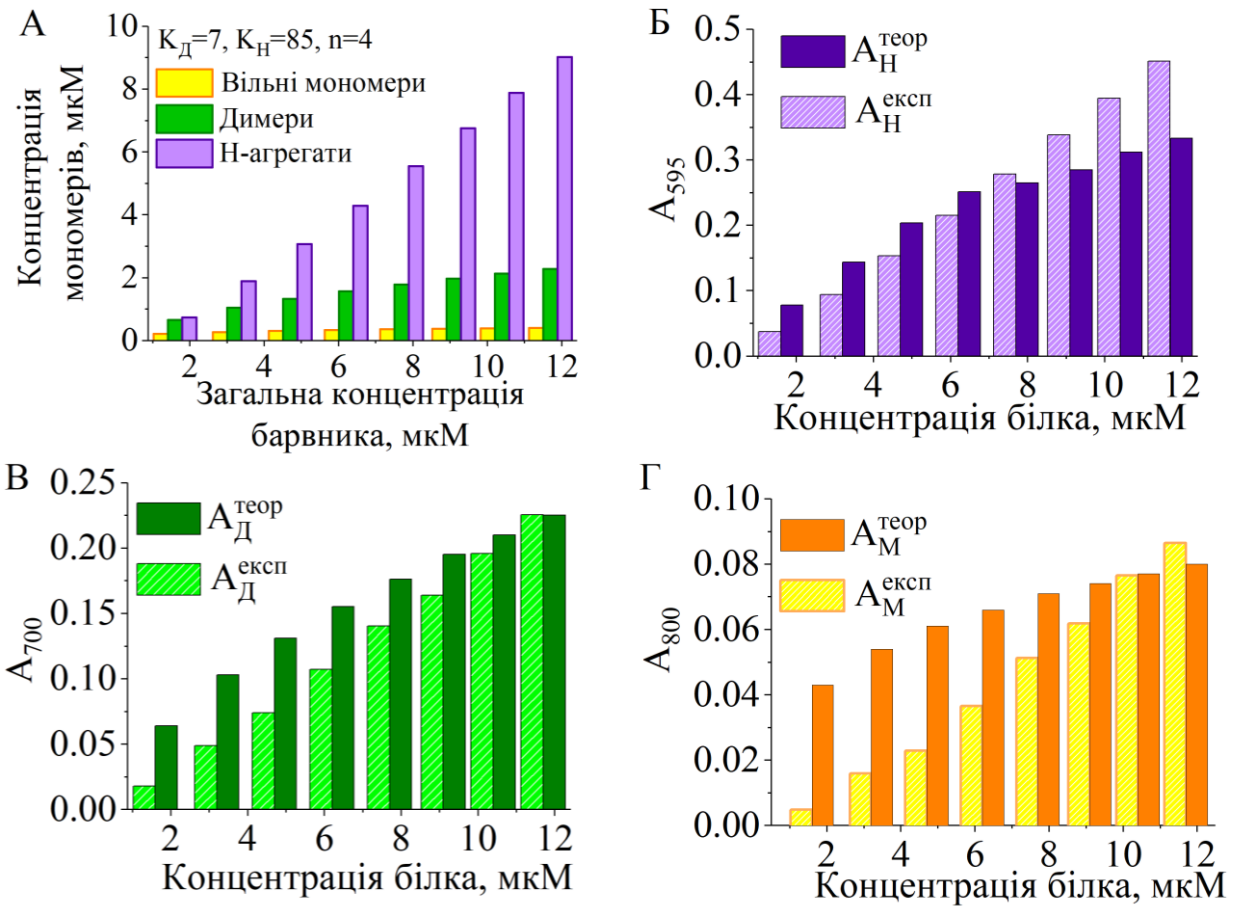


Рис. 3.2 Чисельно розраховані концентрації мономерів, димерів та Н-агрегатів барвника АК7-5 при зростанні концентрації зонду (А), порівняння теоретичних та експериментальних значень поглинання (які були взяті з розкладених спектрів) Н-агрегатів (Б), димерів (В) та мономерів (Г)

димеризації (K_D) та Н-агрегації (K_H), а також усереднене число агрегації барвника (n) у водному розчині в припущенні одночасного існування двох видів рівноваги: мономер – Н-димер та мономер – Н-агрегат [388, 394]:

$$nC_M \xrightleftharpoons{K_H} C_H, \quad K_H = \frac{C_H}{C_M^n} \quad (3.1)$$

$$2C_M \xrightleftharpoons{K_D} C_D, \quad K_D = \frac{C_D}{C_M^2} \quad (3.2)$$

$$C_M + 2K_D C_M^2 + nK_H C_M^n = C_0, \quad (3.3)$$

де C_M , C_D , C_H , C_0 – концентрації мономерів, димерів, Н-агрегатів, а також загальна концентрація барвника, відповідно. Числовий розв'язок рівняння (3.3) був отриманий при одночасному аналізі спектрів поглинання,

вимірювань при варіюванні загальної концентрації C_0 . Для АК7-5 та АК7-6 були отримані досить реалістичні значення констант рівноваги та порядку агрегації, подібні до опублікованих в літературі раніше [385, 388], а саме $\{K_H = 85 \text{ мкМ}^{-1}, K_D = 7 \text{ мкМ}^{-1}, n = 4\}$ та $\{K_H = 120 \text{ мкМ}^{-1}, K_D = 5 \text{ мкМ}^{-1}, n = 4\}$, відповідно. Дані набори параметрів були використані в подальшому для опису взаємодії барвників з нативним та фібрилярним лізоцимом.

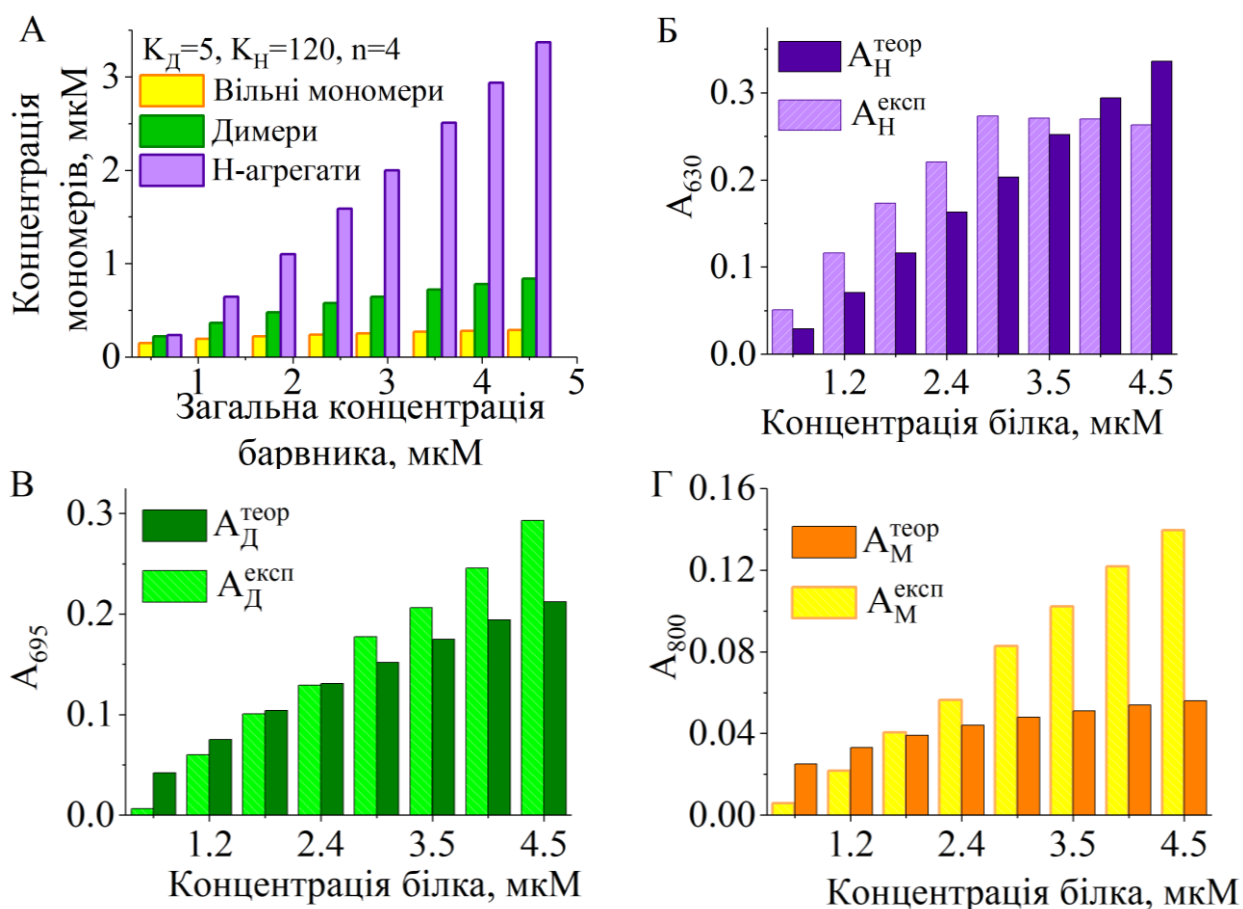


Рис. 3.3 Чисельно розраховані концентрації мономерів, Н-димерів та Н-агрегатів барвника АК7-6 при зростанні концентрації зонду (А), порівняння теоретичних та експериментальних значень поглинання (були взяті з розкладених спектрів) Н-агрегатів (Б), димерів (В) та мономерів (Г)

Знайдені параметри дозволили обрахувати концентрації мономерної, Н-димерної та агрегованої форм барвника як функцію загальної концентрації флуорофора (Рис. 3.2А та Рис. 3.3А). Виявилось, що в межах розглянутого діапазону C_0 найменше мономерів знаходилось у вільній формі, в той час як більшість мономерів барвника перебувала у формі Н-агрегатів. Інтенсивність

поглинання різних форм барвника у буфері при зростанні його концентрації (Рис. 3.2Б–Г та Рис. 3.3Б–Г) добре узгоджується зі спостережуваною тенденцією. Варто відзначити, що розбіжність між теоретичними та експериментальними значеннями поглинання була найменша для Н-димерів, агрегатів та вільних мономерів для наступних значень коефіцієнтів екстинкції мономерів, що знаходились в димерній та агрегованій формах: $\varepsilon_D = 0.1 / 0.197 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ та $\varepsilon_H = 0.05 / 0.1 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для АК7-5/АК7-6, відповідно.

Отримані результати підтверджують факт, що коефіцієнти екстинкції агрегованої форми мономерів нижчі, ніж вільної форми [379, 382]. Ймовірно, більш значні дисперсійні сили між молекулами АК7-6 є причиною вищого значення константи Н-агрегації ($\sim 30\%$), ніж у випадку АК7-5 [395].

3.1.1 Аналіз спектрів поглинання гептаметинових барвників у присутності нативного білка

Додавання білка в нативній конформації до водного розчину флуорофора спричиняло наступні зміни у спектрах поглинання: 1) при зростанні концентрації лізоциму помітно зменшується вклад Н-агрегатів у загальний спектр (Рис. 3.4); 2) у порівнянні зі спектрами в буфері (Рис. 3.1) зростає: а) відносний вклад агрегатів нижчого порядку (H_2), а також б) поглинання смуги на $\sim 840 \text{ нм}$ (55% та 26% для АК7-5 та АК7-6, відповідно).

Оскільки агрегати барвника та комплекс барвник – білок стабілізуються одними і тими ж нековалентними взаємодіями [382, 396], було розглянуто кілька можливих варіантів процесу взаємодії агрегованих та мономерних форм барвника з нативним білком.

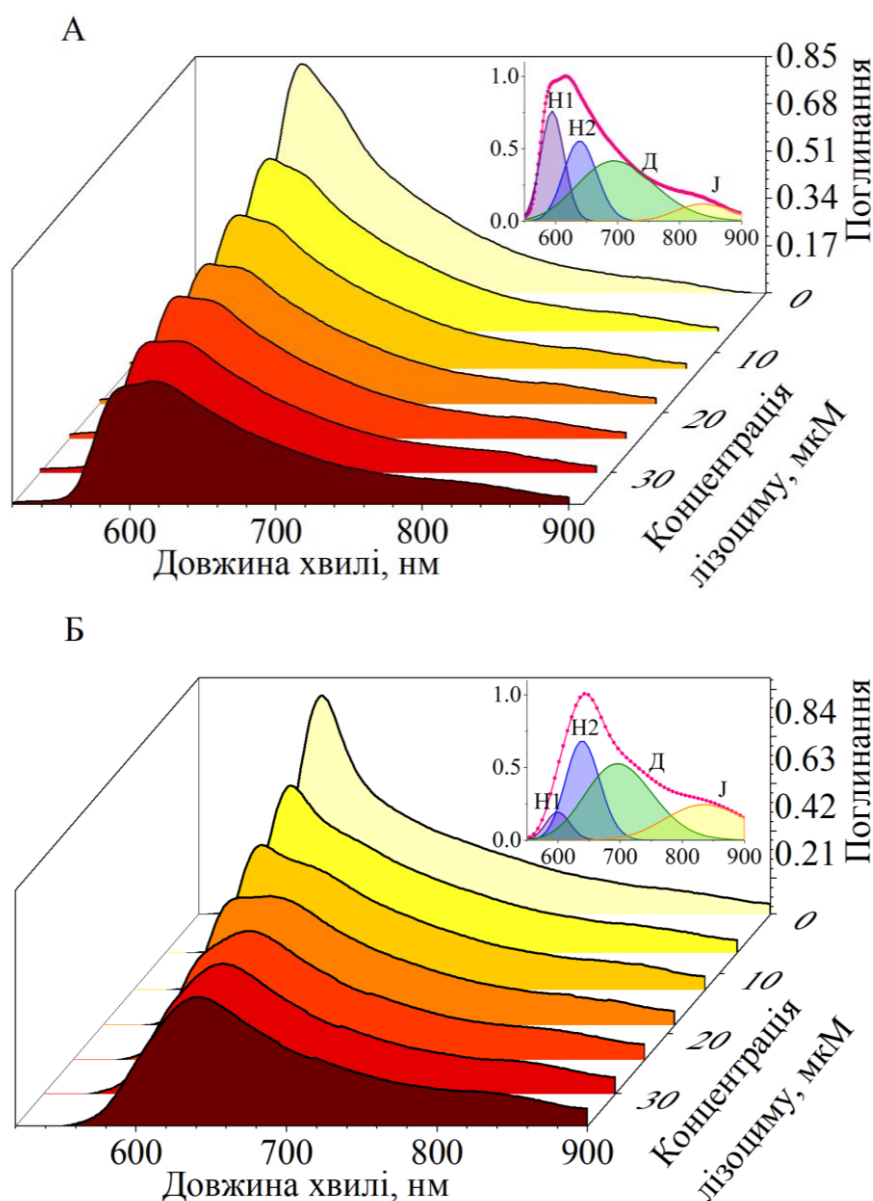


Рис. 3.4 Спектри поглинання гептаметинових барвників АК7-5 (12.2 мкМ) (А) та АК7-6 (13.5 мкМ) (Б) при збільшенні концентрації нативного білка. На вставці: деконволюція нормованих спектрів поглинання при концентрації лізоциму 35.3 та 35.7 мкМ, відповідно

Варіант 1. Було припущено, що внаслідок конкуренції між процесами агрегації барвника та зв'язування його мономерів з нативним лізоцимом, зсувається агрегаційна рівновага та відбувається дезагрегація зонду [292, 381]. У роботах [379, 397] було відзначено руйнування Н-агрегатів ціанінових барвників у присутності пептидів та сироваткового альбуміну людини, що вказує на вищу енергетичну вигідність процесу комплексоутворення, ніж агрегації. Також для мономерної форми

фталоціанінів у роботі [376] було зроблено висновок, що при їх зв'язуванні з нативним інсуліном процес самоагрегації низького порядку не відіграє значної ролі. Щоб перевірити дану гіпотезу до системи рівнянь (3.1)–(3.3) було дописано додаткове співвідношення, яке описує процес зв'язування мономерів барвника з лізоцимом згідно з агрегаційною моделлю Ленгмюра [347, 398]:

$$C_M + P \xrightleftharpoons{K_{MP}} C_{MP}, K_{MP} = \frac{C_{MP}}{C_M (mP - C_{MP})} \quad (3.4)$$

де C_M, C_{MP} – концентрації вільного та зв'язаного хромофора, P – концентрація білка, K_{MP}, m – константа асоціації та стехіометрія комплексу мономер-білок, відповідно. Рівняння (3.3) було доповнене доданком C_{MP} . Пошук відповідного набору параметрів K_{MP} та m , які б теоретично відтворили спостережувані спектральні зміни, проводився шляхом одночасного чисельного розв'язання рівнянь (3.3) та (3.4). Однак отримати такі значення параметрів, що забезпечили б згоду між експериментом та теорією, не вдалося. Наприклад, при концентрації білка 35.3 мкМ для набору параметрів $\{K_{MP} = 0.02 \text{ мкМ}^{-1}, m = 1\}$ між експериментальним та обчисленим значеннями поглинання АК7-5 розбіжність становила приблизно 18% на 640 нм , в той час як $A_{700}^{\text{теор}} / A_{700}^{\text{експ}}$ та $A_{840}^{\text{теор}} / A_{840}^{\text{експ}}$ були ~ 2.5 та ~ 2 , відповідно. Для АК7-6 розбіжність між розрахованим та вимірюваним значеннями поглинання для агрегованої форми була близько 33% при наборі параметрів $\{K_{MP} = 0.04 \text{ мкМ}^{-1}, m = 1\}$, а $A_{700}^{\text{теор}} / A_{700}^{\text{експ}}$ та $A_{840}^{\text{теор}} / A_{840}^{\text{експ}}$ становили ~ 2 та ~ 1.5 , відповідно. Виміряні та теоретично отримані значення поглинання для мономерів, димерів та Н-агрегатів представлені на Рис.3.5.

Зі спостережуваних розбіжностей між експериментом та теорією випливає, що саме по собі припущення про дезагрегацію барвника в результаті зв'язування мономерів зонду з лізоцимом в нативній конформації

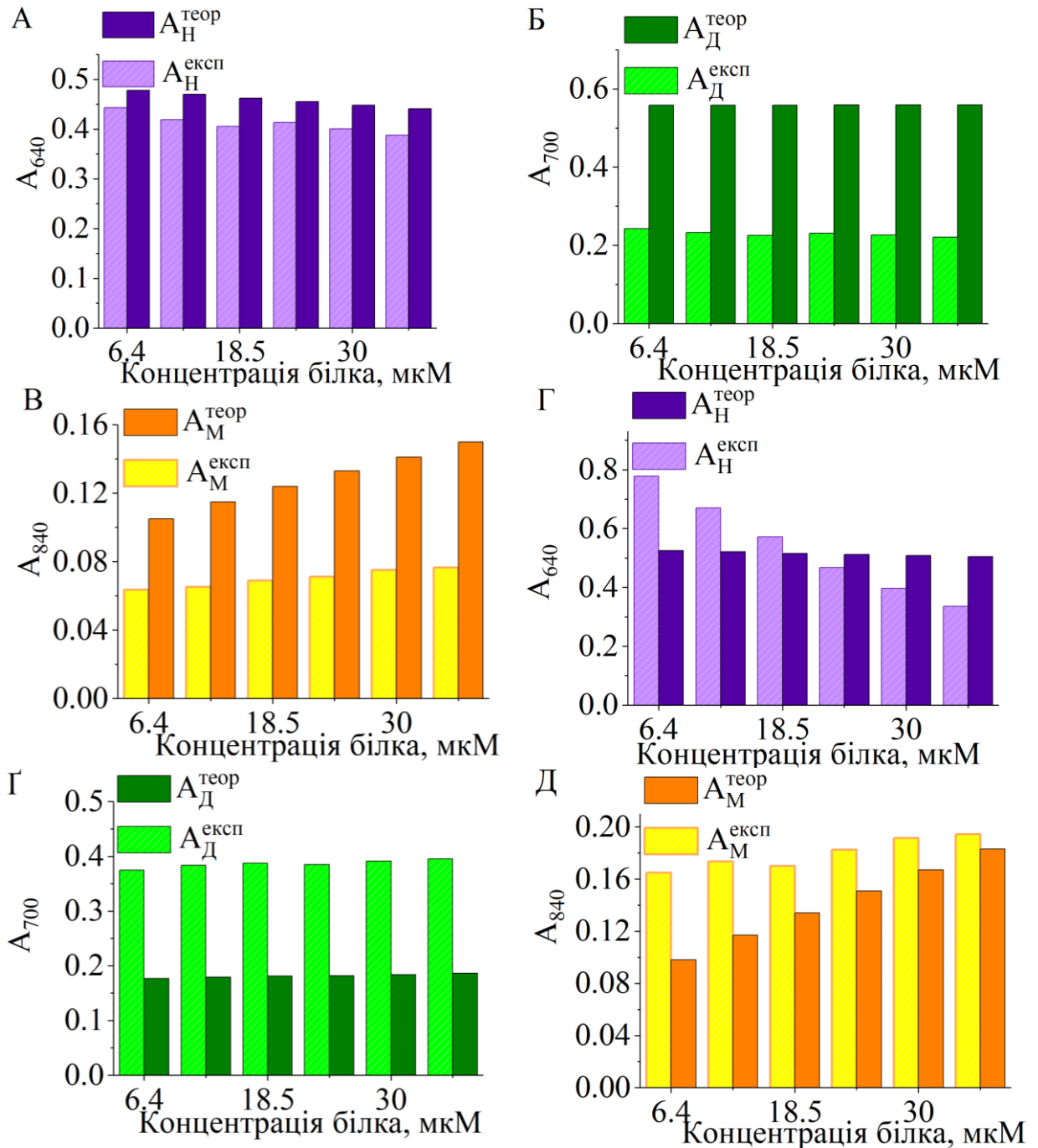


Рис. 3.5 Чисельно розраховані $A^{\text{теор}}$ та експериментальні $A^{\text{експ}}$ значення поглинання Н-агрегатів (А, Г), димерів (Б, Г) та мономерів (В, Д) ціанінових барвників АК7-5, АК7-6 у присутності нативного білка

не може пояснити виявлені спектральні ефекти. Коефіцієнти екстинкції для Н-агрегатів та Н-димерів були взяті рівними $\varepsilon_{\text{H}} = 0.05/0.1 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ та $\varepsilon_{\text{Д}} = 0.1/0.197 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$, у той час як для мономерів барвника було зроблено припущення про подібні значення коефіцієнтів екстинкції у вільній та зв'язаній формі, тобто $\varepsilon_{\text{М}} = 0.197/0.209 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для АК7-5/АК7-6,

відповідно. Наприклад, було продемонстровано близькі значення ε вільного та зв'язаного Тіофлавіну Т та Конго червоного [189, 399].

Варіант 2. Було припущено, що обидві форми зонду: димерна та мономерна можуть зв'язуватись з нативним лізоцимом та зсувати агрегаційну рівновагу. У вищевказану систему рівнянь (3.1) – (3.4) було додано співвідношення, що описувало процес зв'язування димерів з білком:

$$C_D + P \xrightleftharpoons{K_{DP}} C_{DP}, K_{DP} = \frac{C_{DP}}{K_D C_M^2 (m_D P - C_{DP})} \quad (3.5)$$

де C_D, C_{DP} – концентрації вільних та зв'язаних Н-димерів, P – концентрація білка, K_{DP}, m_D – константа асоціації та стехіометрія комплексу димер-білок, $K_D C_M^2$ – концентрація вільних димерів, виражена через співвідношення (3.2), відповідно. Рівняння (3.4) та (3.5) також були написані у припущенні існування різних сайтів зв'язування для мономерів та димерів барвника. У рівняння (3.3) було додатково дописано два доданки: C_{MP} та $2C_{DP}$, де останній означає концентрацію зв'язаних з білком мономерів, що перебувають у вигляді димерів. Однак у межах даної гіпотези не вдалось досягти достатнього вдосконалення теоретичних кривих. Зокрема, для набору параметрів $\{K_{MP} = 0.02 \text{ мкМ}^{-1}, m = 1, K_{DP} = 0.01 \text{ мкМ}^{-1}, m_D = 1\} / \{K_{MP} = 0.04 \text{ мкМ}^{-1}, m = 1, K_{DP} = 0.01 \text{ мкМ}^{-1}, m_D = 1\}$ для АК7-5/АК7-6 розбіжність між теоретично обрахованими $A_{640}^{\text{теор}}$, $A_{700}^{\text{теор}}$, $A_{840}^{\text{теор}}$ та експериментальним значенням була такою ж або більшою, ніж у *Варіанті 1*, вказуючи на незначний вплив зв'язування мономерів та димерів з білком.

Варіант 3. Оскільки отримати такі значення параметрів, які забезпечили б згоду між експериментом та теорією для обох гіпотез, не вдалося, було висловлено *третю гіпотезу*, що зменшення поглинання агрегатів барвника, викликане дезагрегацією зонду у присутності білка, ймовірно, супроводжується збиранням зв'язаних з лізоцимом мономерів зонду в J-агрегати. Дану ідею підтверджує характеристичний батохромний зсув

мономерного піку у присутності лізоциму в порівнянні з піком мономерів у буфері (Рис. 3.2Г, Рис 3.3Г та Рис. 3.5В, Д) [388, 400]. Також, утворення J-агрегатів спостерігалось для ціанінових барвників у присутності сироваткового альбуміну бика [401]. Нарешті, оцінка напівширини поглинання зонду АК7-5/АК7-6 в ДМСО, де барвник існує переважно у мономерній формі, на 808/815 нм та напівширини піку мономерів на 840 нм у присутності лізоциму, отриманих після деконволюції спектру, виявила значну різницю у значеннях, а саме $\Delta\nu_{1/2} \sim 50/60$ нм та $\Delta\nu_{1/2} \sim 125/145$ нм, відповідно, припускаючи появу нових форм барвника при комплексоутворенні барвник – білок [383, 402]. Беручи до уваги той факт, що для J-агрегатів характерною особливістю є вузький пік поглинання, досить широка смуга на 840 нм видається суперпозицією J-агрегатів різного розміру, молекулярного пакування та мономерів. Також можна відмітити, що вища стабільність Н-агрегатів та нижчий рівень утворення J-агрегатів спостерігались для АК7-5, порівняно з АК7-6 (Рис. 3.5А, Г та В, Д), що можна інтерпретувати з точки зору різної полярності сайтів зв'язування [308, 403]. Відповідна теоретична модель, що кількісно описувала б комплексоутворення барвників з нативним лізоцимом, не була розроблена, оскільки поглинання J-агрегатів АК7-5 та АК7-6 характеризуються занадто низькими значеннями з точки зору їх кількісної характеристикації. Крім того, включення нового співвідношення між зв'язаними з білком мономерами та J-агрегатами в систему (3.1)–(3.5) істотно ускладнює рішення отриманої системи рівнянь.

3.1.2 Аналіз спектрів поглинання гептаметинових барвників у присутності амілоїдних фібрил лізоциму

Було виявлено, що зміни у спектрах поглинання барвників, спричинені нативним та фібрилярним лізоцимом мають різний характер. Максимуми поглинання Н-агрегатів були зсунуті на ~ 45 нм у довгохвильову область

(Рис. 3.6). Для АК7-5 даний зсув супроводжувався зменшенням абсорбції, однак ефект був менш вираженим, ніж у нативному білку ($\sim 7\%$). Для АК7-6, навпаки, інтенсивність поглинання Н-агрегатів зросла у ~ 1.4 рази. Для обох барвників спостерігалась поява плеча на 700 нм , що вказує на зростання піку димерів (Рис. 3.6). Також зменшення відносного вкладу Н-агрегатів вищого порядку ($H1$) було більш вираженим для амілоїдних фібрил, ніж для нативного лізоциму (Рис. 3.4). Нарешті, на $820/830\text{ нм}$ було виявлено значне зростання піку поглинання (у $\sim 7/2.5$ разів). Червоний зсув даного максимуму може бути наслідком як зменшення полярності оточення барвника в результаті зв'язування з амілоїдними фібрилами [404], так і утворення J-агрегатів. Наприклад, у роботі [405] для пентаметинових та тіакарбоціанінових барвників при зв'язуванні з сироватковим альбуміном бика та сироватковим альбуміном людини спостерігався червоний зсув мономерної смуги поглинання на $\sim 15\text{--}27\text{ нм}$ відносно буферу. Цікаво також, що напівширина піку поглинання на $820/830\text{ нм}$ становила $\Delta\nu_{1/2} \sim 85/90\text{ нм}$, що є досить близьким за значенням до напівширини мономерної смуги в ДМСО ($\Delta\nu_{1/2} \sim 50/60\text{ нм}$), хоча формування J-агрегатів при зв'язуванні з фібрилярним лізоцимом не можна повністю виключити. Подібним чином, інкорпорація тіакарбоціанінового зонду 7514 в фібрили інсуліну призводила до значного підвищення абсорбції смуги, що відповідає комплексу мономерний барвник-фібрила, а також до незначного посилення інтенсивності J-агрегатної смуги барвника [319]. Також, у присутності фібрил A β (1–42) спостерігалась дезагрегація димерів YOYO-1 [407].

Спектральні ефекти у присутності фібрилярного лізоциму описувались у рамках тих же термінів, що і для нативного білка.

У *Варіанті 1* для амілоїдних фібрил було розглянуто зв'язування виключно мономерів барвника з фібрилярним лізоцимом. Завдяки тому, що

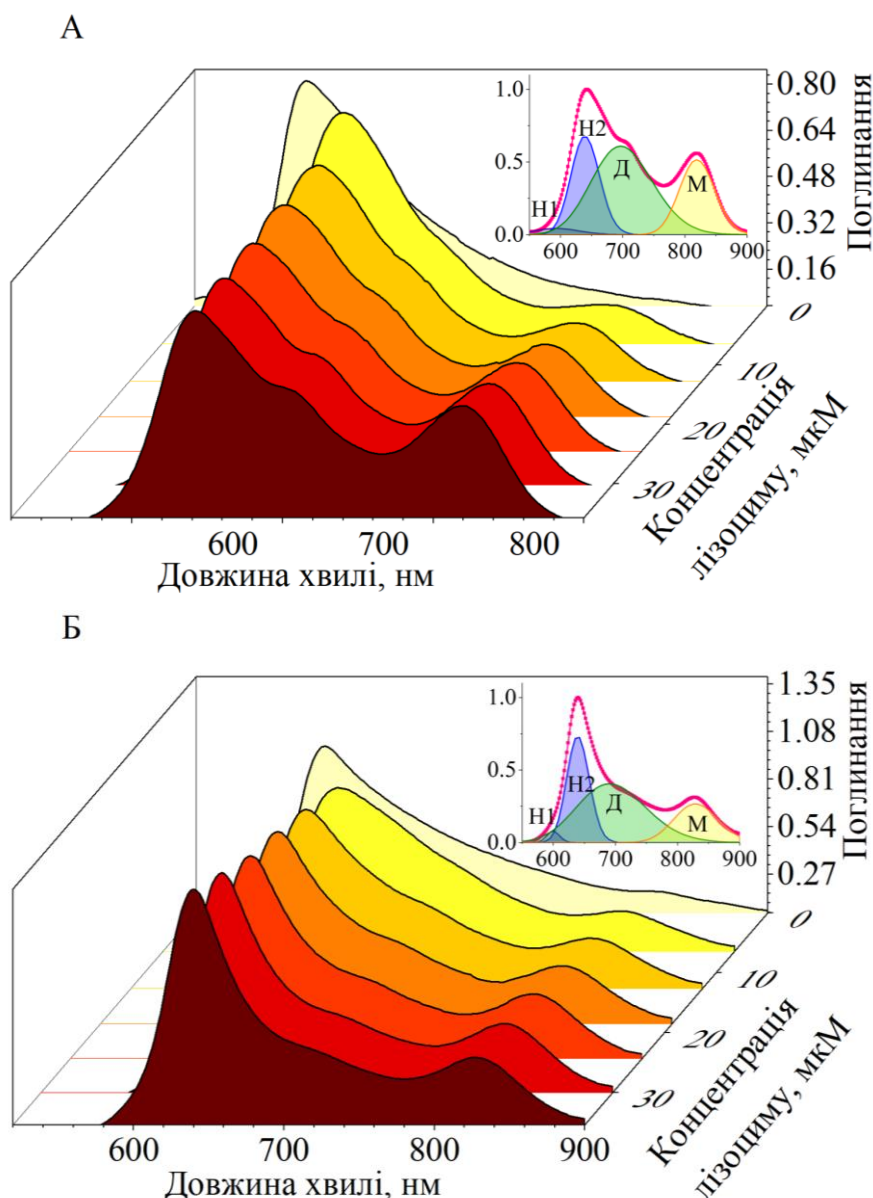


Рис. 3.6 Спектри поглинання гептаметинових барвників АК7-5 (12.2 μM) (А) та АК7-6 (13.5 μM) (Б) при збільшенні концентрації амілоїдних фібрил. На вставці: деконволюція нормованих спектрів поглинання при концентрації фібрилярного лізоциму 35.3 μM та 35.7 μM , відповідно

для АК7-5 найбільш суттєве зростання поглинання спостерігалось на 820 nm , набір параметрів $\{K_{MP} = 0.5 \text{ мкМ}^{-1}, m = 0.3, \varepsilon_{820} = 0.197 \text{ мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}\}$ забезпечував хорошу згоду між $A_{820}^{\text{теор}}$ та $A_{820}^{\text{експ}}$ ($< 4\%$), однак, $A_{640}^{\text{теор}}$ (при $\varepsilon_{640} = 0.05 \text{ мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) та $A_{700}^{\text{теор}}$ (при $\varepsilon_{700} = 0.1 \text{ мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) були менші за відповідні експериментальні значення на 30.5% та 53% за максимальної концентрації білка. Аналогічно, для іншого ціанінового зонду різниця для піку на 830 nm становила $< 16\%$ при

наборі $\{K_{MP} = 0.5 \text{ мкМ}^{-1}, m = 0.03, \varepsilon_{830} = 0.209 \text{ мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}\}$, у той час як розраховані значення для поглинання смуг Н-агрегатів та димерів були менші, ніж виміряні на 17% та 35%, відповідно. Отже, дане припущення не відтворює з достатньою точністю поведінку агрегатів та димерів барвника.

Варіант 2. Під час численного розв'язання системи рівнянь (3.1)–(3.5), що описує зв'язування як мономерів, так і димерів барвника з фібрилами, для АК7-5 (Рис. 3.7А–В) було знайдено набір параметрів $\{K_{MP} = 0.6 \text{ мкМ}^{-1}, m = 0.3, K_{DP} = 0.2 \text{ мкМ}^{-1}, m_D = 0.8\}$, що забезпечували хорошу згоду між експериментальними та теоретичними значеннями поглинання на 820 нм, 700 нм та 640 нм (різниця була менша 3%, 8% та 48%, відповідно). Однак, для АК7-6 різниця в поглинаннях A_{830} , A_{700} та A_{640} при наборі параметрів $\{K_{MP} = 0.8 \text{ мкМ}^{-1}, m = 0.35, K_{DP} = 0.3 \text{ мкМ}^{-1}, m_D = 2\}$ за максимальної концентрації білка становила 9%, 21% та 66%, відповідно (Рис. 3.7Г–Д). З отриманих розбіжностей можна зробити висновок, що в межах даної гіпотези можна адекватно описати спектральний відгук АК7-5 на амілоїдні фібрили, в той час як для Н-агрегатів АК7-6 теоретично передбачений лінійний спад поглинання не спостерігається в експерименті.

Варіант 3. Як уже було згадано вище, розбіжності між $A_{640}^{\text{теор}}$ та $A_{820}^{\text{експ}}$ для обох ціанінових барвників можуть бути викликані формуванням J-агрегатів інкорпорованими в амілоїдні фібрили мономерами. На основі спаду поглинання Н-димерів АК7-6 при зростанні концентрації білка в пробі (Рис. 3.7Г) можна також припустити, що зв'язані з фібрилами димери даного барвника трансформуються в J-агрегати.

Варіант 4. Значні відмінності в теоретичних та вимірних значеннях поглинання Н-агрегатів АК7-6 можуть бути викликані також формуванням Н-агрегатів нижчого порядку при зв'язуванні з фібрилами, ніж у буфері. Таким чином, мономер барвника, зв'язані з фібрилярним лізоцимом,

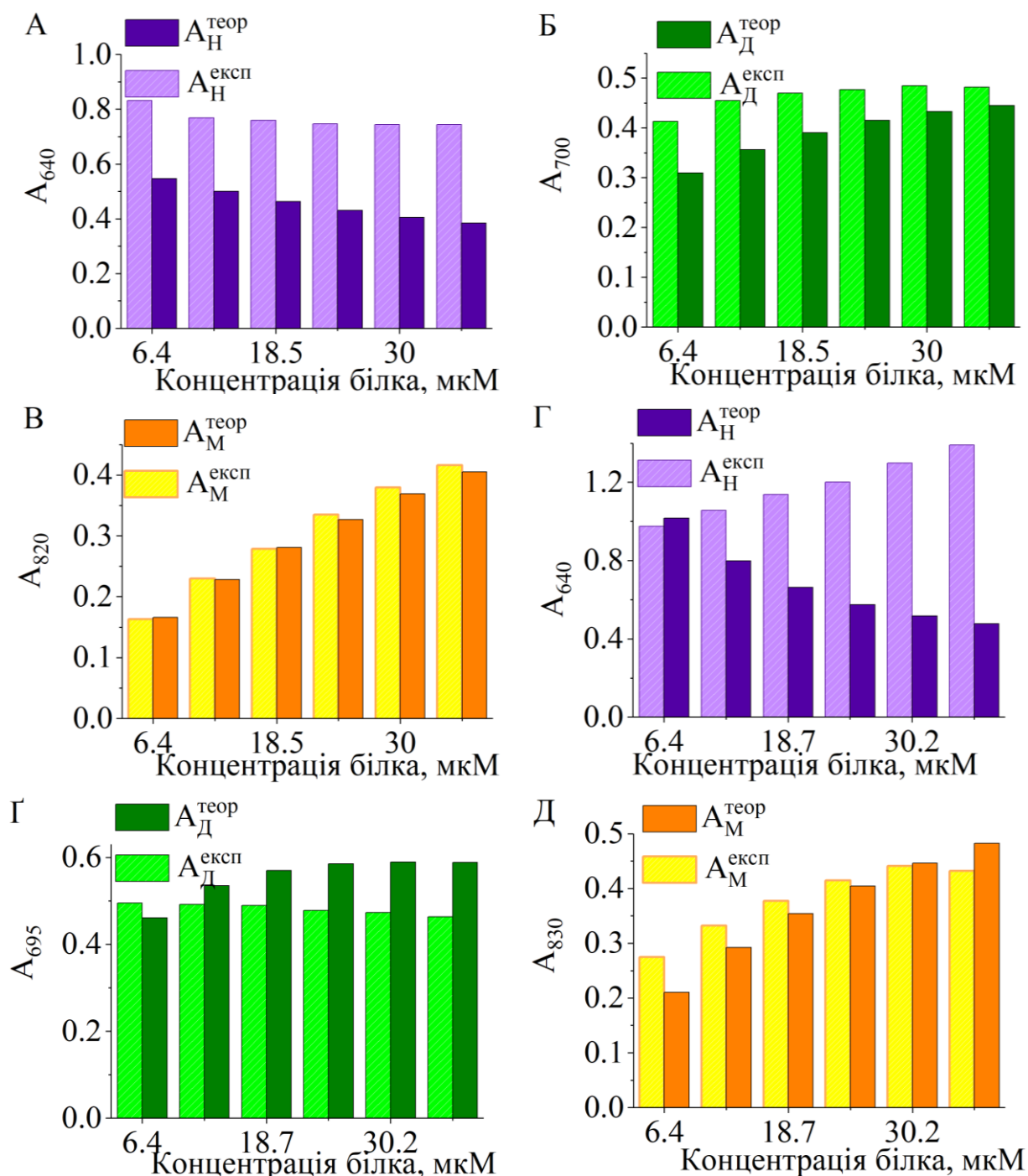


Рис. 3.7 Чисельно розраховані $A^{\text{теор}}$ та експериментальні $A^{\text{експ}}$ значення поглинання Н-агрегатів (А, Г), димерів (Б, Г) та мономерів (В, Д) ціанінових барвників АК7-5, АК7-6 у присутності фібрилярного лізоциму

утворюють, наприклад, Н-тримери. Зважаючи на складність процесу, дана гіпотеза може бути охарактеризована лише якісно. Подібна поведінка спостерігалась для негативно зарядженого пінаціанолу при його асоціації з фібрилами $A\beta$ [314], при зв'язуванні з ДНК ціанінового зонду [407] та при адсорбції Тіазолового Оранжевого на сульфанованій матриці [408]. Цікаво

відмітити, що формування Н-агрегатів відбувається при збільшенні концентрації фібрил або ДНК, але не спостерігалось при зв'язуванні з непорядкованими клубками та α -спіральними конформаціями.

Таким чином, на основі отриманих результатів можна зробити висновок, що в присутності фібрил лізоциму адекватно відтворити спектральну поведінку барвника АК7-5 можна в межах припущень *Варіанта 2*, а АК7-6 – *Варіанта 4*.

3.1.3 Особливості спектрів флуоресценції гептаметинів при взаємодії барвників з нативним та фібрилярним лізоцимом

В органічному розчиннику при довжині хвилі збудження 800 нм максимумами спектрів випромінювання становили 835 і 839 нм для АК7-5 та АК7-6, відповідно (Рис. 3.8). Щоб охарактеризувати спектральну поведінку флуорофорів у максимально широкому діапазоні, спектри флуоресценції барвників у буфері та у присутності двох форм білка були записані при довжинах хвиль збудження 557 та 561 нм для АК7-5 та АК7-6, відповідно. На жаль, такий вибір довжин хвиль збудження унеможливив аналіз спектрального відгуку флуорофорів в області вище 810 нм, оскільки за даних умов спектральна поведінка була спотворена паразитним приборним піком. На момент проведення експерименту дана особливість прибору ще не була виявлена, тому у роботі [3] композиція спектрального відгуку з паразитним піком на 836 та 842 нм для АК7-5 та АК7-6, відповідно, була інтерпретована як мономерний пік барвника.

Із зазначених вище абсорбційних даних (підрозділ 3.1.1) можна зробити висновок, що обидва барвника можуть утворювати нефлуоресцентні Н-агрегати у водному розчині, але мають тенденцію до дезагрегації в присутності білка [5]. Як можна бачити з Рис. 3.9 (нульовий спектр), у буферному розчині за відсутності білка, смуга, що відповідає Н-димерам або Н-агрегатам, відсутня. Це дозволяє припустити, що такі, сформовані у водній

фазі, агрегати не флуоресціюють. Слід зауважити, що дане спостереження узгоджується з літературними даними [409].

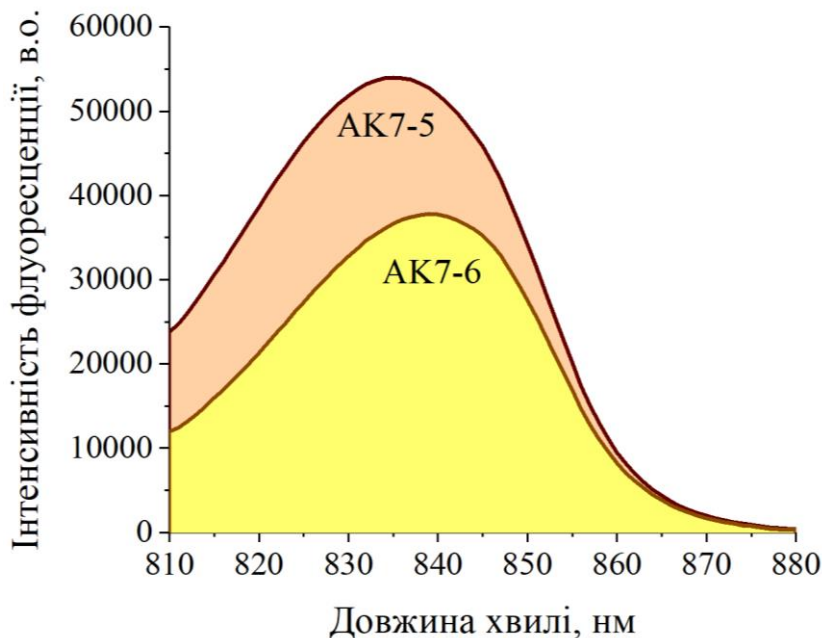


Рис. 3.8 Спектри випромінювання АК7-5 та АК7-6 в ДМСО. Довжина хвилі збудження становила 800 нм. Концентрації флуорофорів складала 7.2 та 9.8 мкМ, відповідно

При титруванні барвника нативним лізоцимом виникає гіпсохромна смуга на 700 нм, інтенсивність якої збільшується зі зростанням концентрації білка (Рис. 3.9). Враховуючи дані абсорбційної спектроскопії можна припустити, що смуга випромінювання 600–800 нм відповідає Н-димерам та Н-агрегатам досліджуваних барвників. Цей висновок особливо цікавий тим, що, як згадувалось вище, у водному середовищі Н-димери та Н-агрегати зазвичай не флуоресціюють. Зважаючи на цей факт, можна припустити, що зв'язування Н-агрегатів з нативним та фібрилярним білком приводить до зміни геометричних характеристик та електронної структури Н-димерів та Н-агрегатів ціанінових барвників, тим самим викликаючи збільшення квантового виходу флуоресценції.

Слід зазначити, що така ж непередбачувана флуоресценція раніше спостерігалась для Н-агрегатів тіазолового оранжевого та мероціанінових барвників [408, 410]. Також заслуговує на увагу той факт, що інтенсивність

гіпсохромної смуги у присутності нативного білка була у 2.1–2.6 разів вище, порівняно з фібрилами лізоциму.

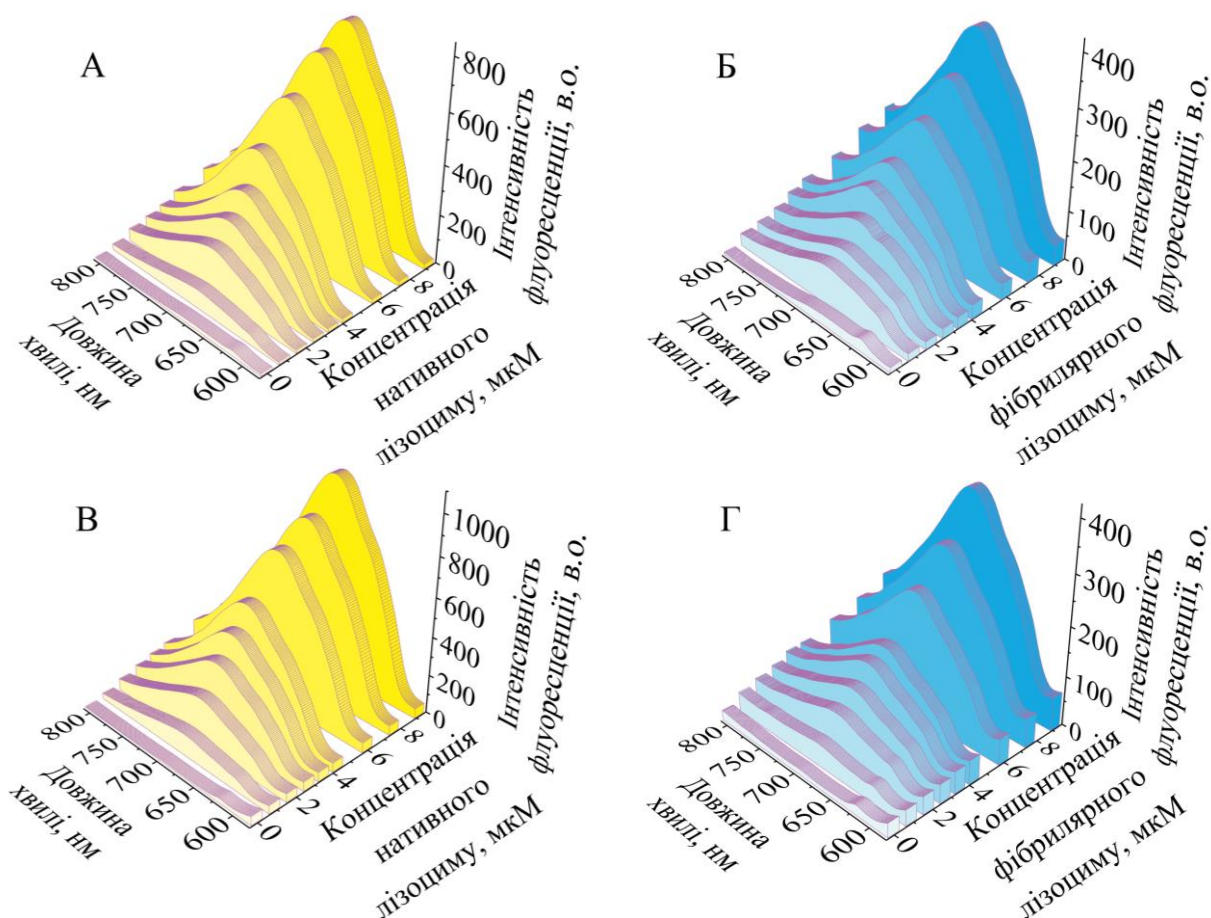


Рис. 3.9 Спектри випромінювання барвників АК7-5 (А, Б) та АК7-6 (В, Г) при зростанні концентрації нативного та фібрилярного лізоциму. Концентрація зондів складала 7.2 та 4.9 мкМ, відповідно. Довжини хвиль збудження становили 557 та 561 нм

Той факт, що для нативного лізоциму було виявлено більш значне зростання гіпсохромної смуги на 600–800 нм дозволяє припустити, що нативний білок має більше сайтів зв'язування для ціанінових агрегатів, ніж фібрилярний лізоцим. Імовірно, що гідрофобні, електростатичні та ван-дер-ваальсові взаємодії між мономерами ціанінів та нативним білком сприяють утворенню димерів та Н-агрегатів барвників. Електростатичні взаємодії між позитивно зарядженими молекулами АК7-5/АК7-6 та негативно зарядженими жолобками лізоциму збільшують афінність молекул барвника до білка. У той же час, зважаючи на те, що фібрили лізоциму мають

більше гідрофобних залишків у порівнянні з нативним, внесок гідрофобних взаємодій у формування комплексів Н-димер-білок і Н-агрегат-білок менше, ніж внесок електростатичних сил.

3.1.4 Можливі сайти зв'язування нативного та фібрилярного лізоциму для гептаметинових барвників

За допомогою доступних онлайн алгоритмів PatchDock та FireDock були визначені потенційні сайти зв'язування гептаметинових ціанінових барвників. Як можна бачити з Рис. 3.10, з нативним лізоцимом обидва зонди зв'язуються у глибокому кармані білка з гідрофобними та негативно зарядженими залишками, геометричні розміри якого дозволяють розміщуватись в ньому як мономерам, так і димерам барвника. Гідрофобні взаємодії барвника з нативним білком, ймовірно, є найбільш вагомими, як і у випадку зв'язування ціанінового барвника з сироватковим альбуміном людини [405]. Зважаючи на той факт, що ціанінові барвники формують J-агрегати на борозенках негативно зарядженої ДНК [411], було припущено, що електростатичні взаємодії між позитивно зарядженими ціанінами та негативно зарядженими амінокислотами Глу53, Глу35, Асп53 та Асп70 нативного лізоциму суттєво стабілізують комплекс барвник-білок.

На основі високої спорідненості мономерів гептаметинових барвників до амілоїдних фібрил (Рис. 3.6) було припущено, що вони вбудовуються у борозенки фібрил – специфічні сайти зв'язування для невеликих молекул [339]. Подібним чином зв'язувались моно-, триметилціаніни та ціаніновий барвник YOYO-1 [308, 408]. Розраховані значення довжини, ширини та висоти оптимізованих структур ціанінів становили ~ 2.1 , 1.3 та 0.6 нм, в той час як ширина борозенки (відстань між двома сусідніми парними чи непарними залишками) складає ~ 0.7 нм, а відстань між β -тяжами

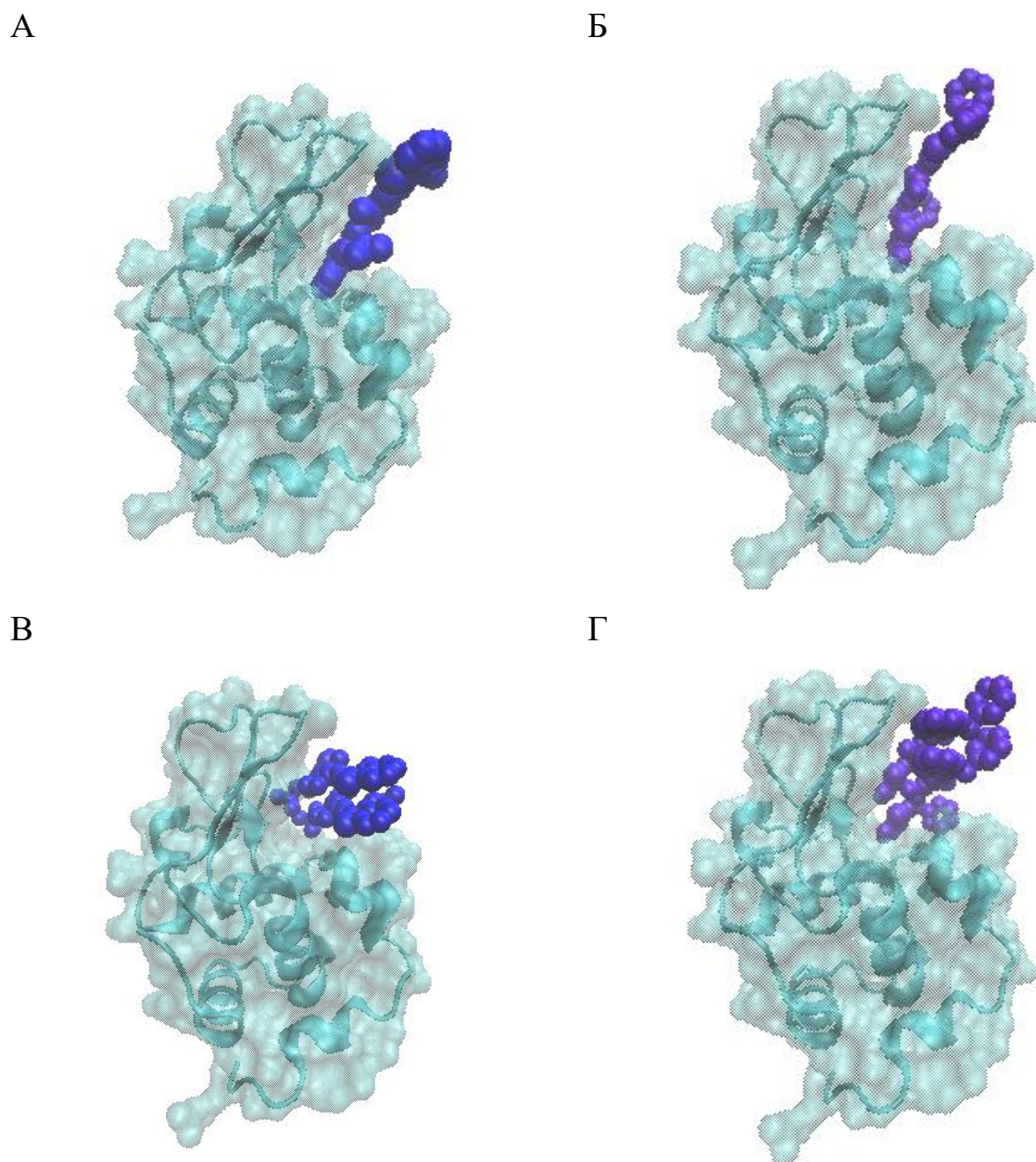
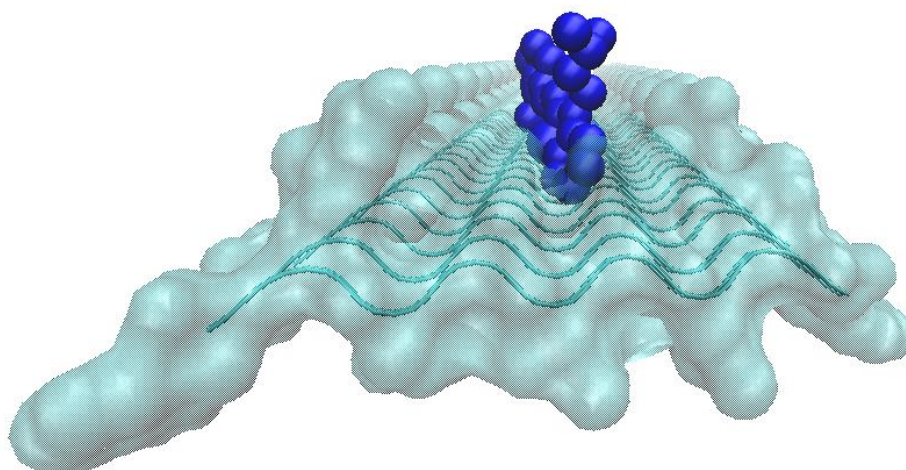


Рис. 3.10 Найбільш енергетично вигідні комплекси мономерних барвників АК7-5, АК7-6 (А, Б) та Н-димерів АК7-5, АК7-6 (В, Г) з нативним білком, отримані за допомогою PatchDock та FireDock серверів

в β -листі – ~ 0.4 нм, відповідно [186]. З огляду на це, мономер гептаметинового барвника повинен зв'язуватись із п'ятьма β -тяжами таким чином, що його коротка вісь буде перпендикулярна осі фібрили. Було виявлено, що найбільш енергетично вигідними сайтами зв'язування для АК7-5/АК7-6 є жолобки Глн57-Асн59 / Сер60-Трп62, Лей54-Глі56, які належать до кору фібрил лізоциму (Рис. 3.11). Вочевидь, ароматичні замісники в молекулі АК7-6, що мають вищу спорідненість до фібрил

лізоциму, ніж АК7-5, взаємодіють із залишками триптофану жолобка Сер60-Трп62 утворюючи найбільш енергетично вигідний комплекс амілоїдних фібрил з барвником. Подібно до цього, в *in silico* дослідженнях було виявлено, що класичний амілоїдний маркер Тіофлавін Т добре зв'язується з жолобками, що містять ароматичні залишки [321].

А



Б

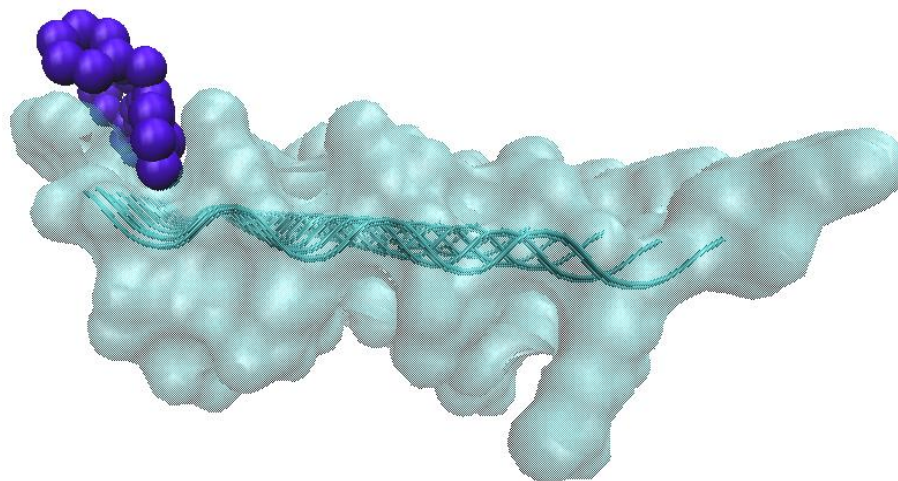


Рис. 3.11 Найбільш енергетично вигідні комплекси мономерних барвників АК7-5 (А) та АК7-6 (Б) з фібрилярним лізоцимом, отримані за допомогою PatchDock та FireDock серверів

У свою чергу, димери ціанінів, згідно з результатами докінгу, вочевидь, займають неспецифічні сайти, що розташовуються перпендикулярно до осі фібрили. Подібним чином, висока афінність мономерів Тіазолового Оранжевого до ДНК була пояснена стекінг-взаємодіями з основами ДНК,

тоді як його димери внаслідок стеричних обмежень, ймовірно, взаємодіють із зовнішньою поверхнею молекули ДНК, орієнтуючись таким чином, щоб запобігти стекінг-взаємодії однієї мономерної субодиниці з основами ДНК [311]. Цікаво відзначити, що вищезазначена оцінка розміру Н-агрегатів АК7-6, що утворюються на поверхні фібрил ($n \approx 3$), була приблизно на порядок нижче, ніж для ціанових агрегатів, спостережуваних в ліпосомальних та ДНК системах, що, вірогідно, пов'язано зі стеричними обмеженнями зв'язування димерів із жолобками фібрил [412].

Згідно з даними молекулярного докінгу, сайти зв'язування амілоїдних фібрил для гептаметинів, на відміну від нативного лізоциму, представлені жолобками, які утворені полярними та неполярними амінокислотними залишками. Ця відмінність може пояснити менш виражене утворення J-агрегатів на фібрилярній матриці, у порівнянні з нативним лізоцимом [412], оскільки значну роль у формуванні агрегатів барвника L-21 на матриці ДНК відіграють електростатичні та гідрофобні взаємодії [413]. Дисоціація Н-агрегатів на мономери та подальше утворення J-агрегатів, ймовірно, контролюється сильними гідрофобними взаємодіями між мономерами барвника та білком, а також електростатичними взаємодіями між молекулами барвника [304]. Часткове занурення громіздкого барвника АК7-6 у жолобок фібрили (Рис. 3.11Б), вочевидь, зміщує рівновагу в напрямку формування Н-агрегатів на поверхні фібрили. Дійсно, сайт зв'язування АК7-6 розташований на неполярній поверхні β -листа лізоциму [357], таким чином латеральна асоціація двох β -листів буде призводити до формування інтерфейсу «стеричної блискавки», що є менш доступним для барвників, ніж полярна сторона фібрили [339].

Цікаво відмітити, що зміни у спектрах поглинання гептаметинів при збільшенні концентрації амілоїдних фібрил лізоциму подібні до тих, що спостерігались при зв'язуванні з сироватковим альбуміном бика [283]. Це свідчить про те, що при руйнуванні Н-агрегатів, зв'язаних з фібрилами, переважну роль відіграють гідрофобні взаємодії між мономерами та білком

та електростатичні взаємодії між молекулами барвника. З огляду на вищевказані обґрунтування, було зроблено висновок, що гептаметинові зонди не виявляють високої афінності до жолобків амілоїдних фібрил, хоча на основі спектрів поглинання можливо досить чутливо розрізняти *in vitro* нативну та фібрилярну форми лізоциму. У сукупності дані результати вказують на те, що досліджувані гептаметинові ціанінові барвники можуть бути використані для виявлення амілоїдних фібрил за допомогою методу абсорбційної спектроскопії.

3.2 Дослідження взаємодії нових триметинових ціанінових барвників з амілоїдними фібрилами інсуліну та лізоциму

3.2.1 Зміни спектральних властивостей триметинових ціанінових барвників при зв'язуванні з різними конформерами лізоциму та інсуліну

Для того, щоб дослідити чутливість флуоресценції триметинів до фібрил інсуліну, були виміряні спектри збудження та випромінювання досліджуваних сполук у вільному стані, а також після додавання контрольного та фібрилярного інсуліну, з метою отримання інформації про зміни інтенсивності емісії та зсуви максимумів спектрів збудження та емісії.

Була виявлена незначна флуоресценція барвників АКЗ-1, АКЗ-3, АКЗ-5 та АКЗ-7 у буферному розчині з максимумами збудження в діапазоні 626-631 нм та максимумами емісії розташованими між 640 та 651 нм, залежно від хімічної структури барвника. Відповідні Стоксові зсуви між максимумами збудження та випромінювання були досить невеликими, що характерно для ціанінових барвників [309, 312, 319]. Триметини АКЗ-8 та АКЗ-11 характеризуються незначною інтенсивністю флуоресценції в буфері та не демонструють чітких максимумів випромінювання і збудження. Додавання контрольного інсуліну призвело до незначного батохромного зсуву(1–4 нм) максимумів збудження та випромінювання триметинів, при цьому їх інтенсивність флуоресценції майже не змінилася.

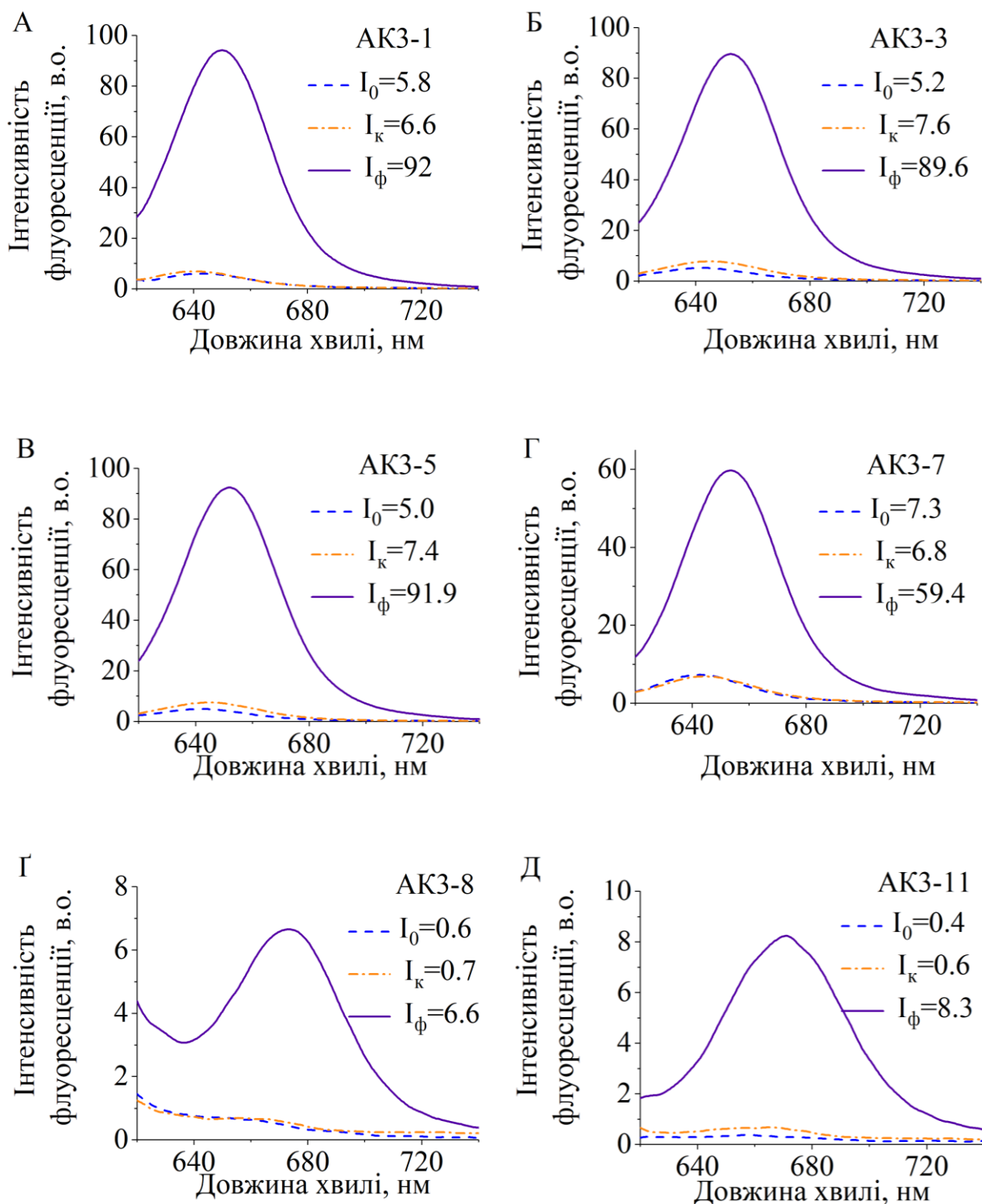


Рис. 3.12 Флуоресцентна відповідь триметинів (А–Д) на контрольний білок та фібрилярний інсулін. Концентрація барвника та білка складала 0.5 та 31.3 мкМ, відповідно

Таблиця 3.1

Спектральні характеристики триметинових ціанінових барвників у буфері та у присутності неагрегованої та фібрилярної форм інсуліну

Барвник	Вільний барвник			Контрольний білок			Фібрилярний білок			ФЧА
	$\lambda_{збудж}$	$\lambda_{еміс}$	I_0	$\lambda_{збудж}$	$\lambda_{еміс}$	I_{κ}	$\lambda_{збудж}$	$\lambda_{еміс}$	I_{ϕ}	
	(нм)	(нм)	(в.о.)	(нм)	(нм)	(в.о.) _c	(нм)	(нм)	(в.о.)	
AK3-1	627	640	5.8	631	643	6.6	640	649	92.0	15.3
AK3-3	626	643	5.2	631	644	7.6	644	652	89.6	15.7
AK3-5	631	642	5.0	632	645	7.4	642	652	91.9	16.7
AK3-7	628	642	7.25	636	645	6.84	646	653	59.4	7.2
AK3-8	н.в.*	651	0.6	н.в.*	655	0.67	663	673	6.6	8.8
AK3-11	н.в.*	658	0.37	н.в.*	643	0.62	662	671	8.3	20.6

$\lambda_{еміс}$ – максимум спектру випромінювання; $\lambda_{збудж}$ – найбільш довгохвильовий максимум спектру збудження; н.в.* - не визначені через незначні значення інтенсивності флуоресценції; I_0 , I_{κ} та I_{ϕ} – інтенсивності флуоресценції барвників у буфері та у присутності контрольного та фібрилярного білка (8 мкМ).

Навпаки, як показано на Рис. 3.12, спектральний відгук ціанінів до фібрилярного інсуліну, на відміну від значень I_0 (інтенсивність у буфері) та I_{κ} (інтенсивність в присутності контрольного білка), включав в себе значне збільшення інтенсивності флуоресценції барвника (I_{ϕ}). Узагальнені спектральні характеристики наведені в Табл. 3.1.

Як показано в Таблиці 3.1, залежно від хімічної структури барвника максимуми флуоресценції триметинів зсунуті приблизно на 9–22 нм у довгохвильову область порівняно з тими, що спостерігаються в неагрегованому інсуліні чи у буферному розчині. Дані, отримані за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії, були проаналізовані в термінах фактору чутливості до амілоїдів (ФЧА), що характеризує здатність

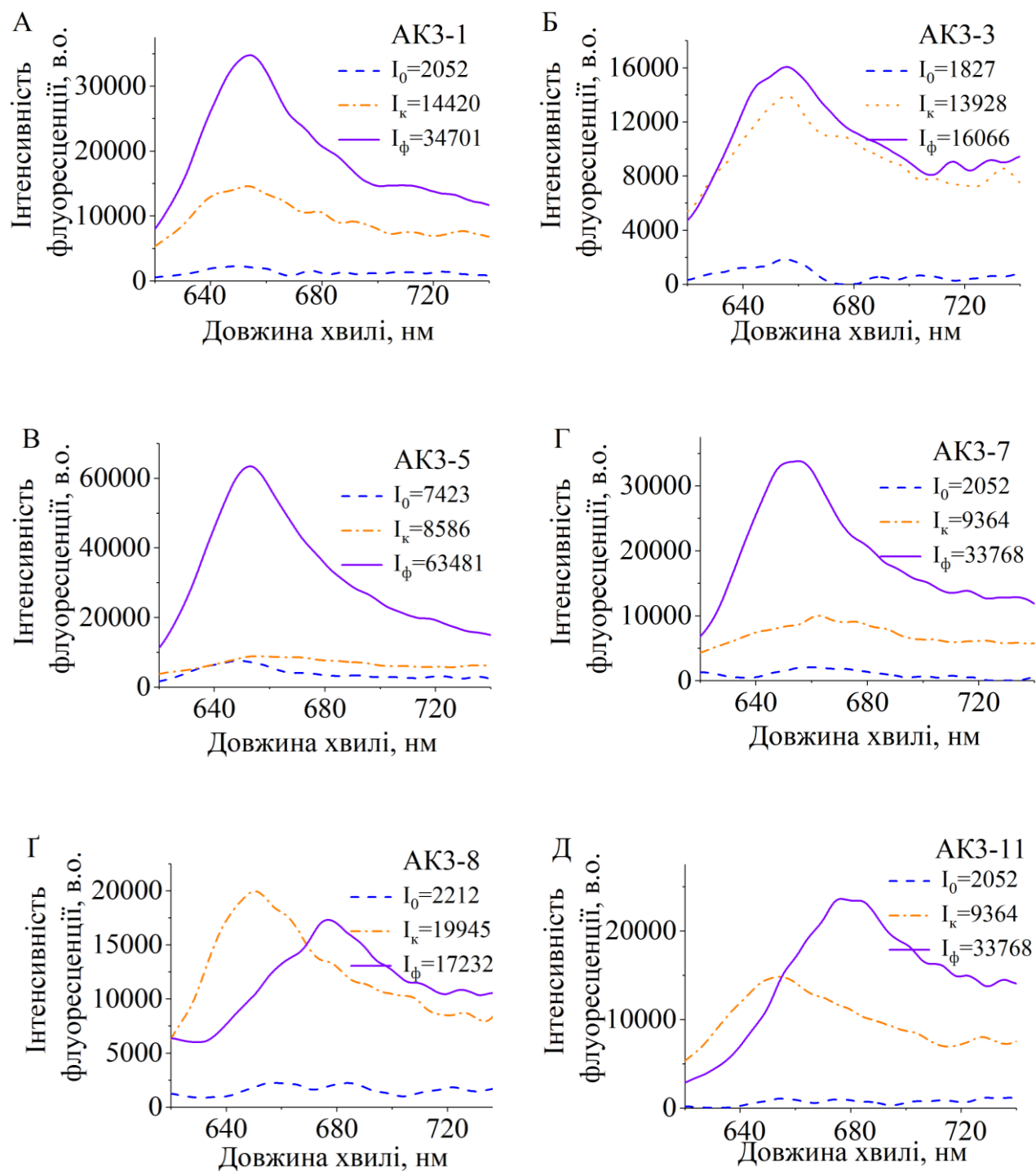


Рис. 3.13 Флуоресцентна відповідь триметинів (А–Д) на контрольний та фібрилярний лізоцим. Концентрація барвника та білка складала 0.5 та 3.4 мкМ, відповідно

Таблиця 3.2

Спектральні характеристики триметинових ціанінових барвників у буфері та у присутності контрольного та фібрилярного лізоциму

Барвник	Вільний барвник			Контрольний білок			Фібрилярний білок			ФЧА
	$\lambda_{збудж}$	$\lambda_{еміс}$	I_0 ,	$\lambda_{збудж}$	$\lambda_{еміс}$	I_{κ} ,	$\lambda_{збудж}$	$\lambda_{еміс}$	I_{ϕ} ,	
	(нм)	(нм)	(в.о.)	(нм)	(нм)	(в.о.) _c	(нм)	(нм)	(в.о.)	
AK3-1	627	644	3470	627	653	14420	640	654	34701	5.84
AK3-3	626	646	1827	634	656	13928	637	656	16066	1.17
AK3-5	631	645	7423	559	661	8586	635	653	63481	7.39
AK3-7	628	642	2052	559	661	9364	634	654	33768	11.90
AK3-8	н.в.*	651	2212	625	650	19945	668	676	17232	-1.22
AK3-11	н.в.*	658	1070	630	656	14832	668	677	23654	8.24

$\lambda_{еміс}$ – максимум спектру випромінювання; $\lambda_{збудж}$ – найбільш довгохвильовий максимум спектру збудження; н.в.* - не визначені через незначні значення інтенсивності флуоресценції; I_0 , I_{κ} та I_{ϕ} – інтенсивності флуоресценції барвників у буфері та у присутності контрольного та фібрилярного білка (8 мкМ).

барвника вибірково виявляти фібрилярний стан понад нативною структурою відносно фонової флуоресценції барвника у буфері [414]:

$$ФЧА = \frac{I_{\phi} - I_{\kappa}}{I_0} \quad (3.6)$$

Всі досліджувані барвники характеризуються позитивними значеннями ФЧА, що свідчить про вищу чутливість триметинів до фібрилярних агрегатів білка порівняно з неагрегованим станом (Табл. 3.1). Барвник AK3-11 з найвищим значенням ФЧА (20.6) виявився найбільш чутливим, селективним сенсором серед усіх протестованих сполук. Відносно високі значення ФЧА (15.3–16.7) спостерігались також для AK3-3, AK3-5 та AK3-1 зондів, що містять чисті аліфатичні алкильні заміщення в N-алкильному фрагменті бензотіазолової частини барвника. На відміну від них, наявність ОН-груп

аліфатичних замісників на атомі нітрогену барвників АК3-7 та АК3-8 суттєво зменшує чутливість триметинів до амілоїду (ФЧА = 7.2–8.8).

У присутності фібрилярного та контрольного лізоциму спектральна відповідь ціанінових барвників значно відрізнялась від їх спектральної відповіді у присутності нефібрилизованого та фібрилярного інсуліну (Рис. 3.13). Зокрема, для барвників АК31, АК33, АК38 та АК3-11 додавання контрольного лізоциму викликало суттєве зростання інтенсивності флуоресценції та незначний батохромний зсув (1–6 нм) максимумів збудження та випромінювання триметинів. Беручи до уваги той факт, що при нейтральному рН лізоцим позитивно заряджений, тоді як інсулін має негативний заряд [415–417], та позитивний заряд досліджуваних триметинових зондів, можна зробити припущення, що електростатичні взаємодії не відіграють домінуючої ролі в комплексоутворенні зонд-білок для даних флуорофорів.

Варто відзначити, що для АК35 та АК37 у присутності контрольного лізоциму спостерігалось лише незначне збільшення інтенсивності флуоресценції у порівнянні з буфером, однак для даних зондів спостерігався ~ 70 нм зсув максимумів збудження. У присутності фібрилярного лізоциму спостерігалось суттєве (у 8–20 разів, в залежності від зонда) зростання інтенсивності флуоресценції для всіх досліджуваних сполук. Більш того, для флуорофорів АК3-8 та АК3-11 спостерігались значні зсуви положень максимумів збудження (23 та 28 нм для АК3-8 та АК3-11, відповідно) та флуоресценції (26 та 21 нм для АК3-8 та АК3-11, відповідно). Узагальнені спектральні характеристики триметинових барвників у присутності контрольного та фібрилярного лізоциму наведені в Табл. 3.2.

Усі досліджувані барвники (за винятком АК3-8) в присутності лізоциму характеризуються позитивними значеннями ФЧА, що свідчить про вищу чутливість триметинів до фібрилярних агрегатів білка (порівняно з неагрегованим станом (Табл. 3.2). Для зонда АК3-8 спостерігалось негативне

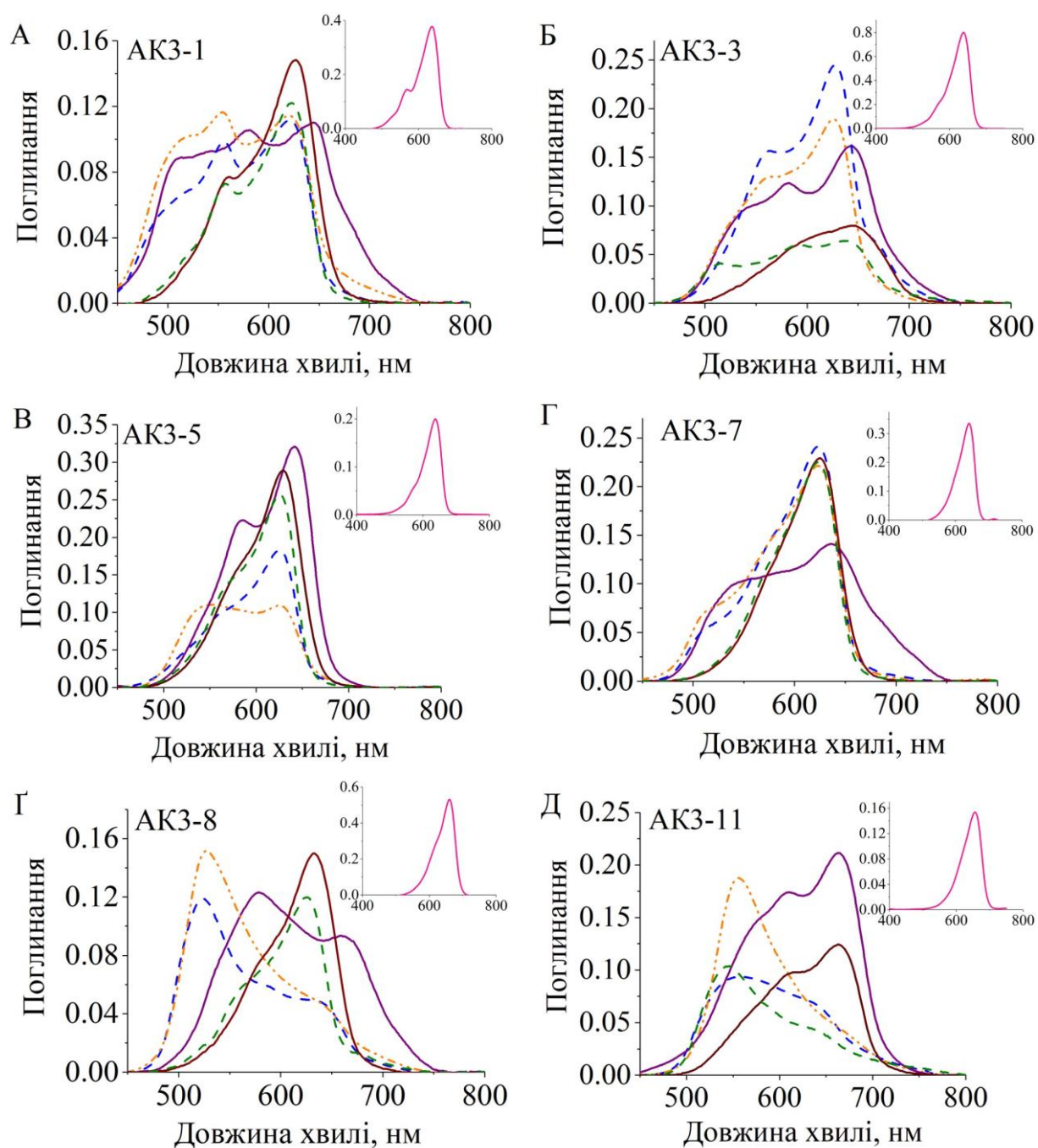


Рис. 3.14 Спектри поглинання триметинових барвників у буфері (блакитна пунктирна лінія), у присутності контрольного інсуліну (жовто-гаряча пунктирна лінія) та лізоциму (темно-зелена пунктирна лінія), а також амілоїдних фібрил інсуліну (фіолетова суцільна лінія) та лізоциму (коричнева суцільна лінія). На вставці зображено спектр поглинання зондів в ДМСО. Концентрація інсуліну, лізоциму та зонду становили 31.3, 26.2 та 8 мкМ, відповідно

значення ФЧА, що свідчить про вищу специфічність даного зонда до контрольного лізоциму. Найвищі значення ФЧА спостерігались для АКЗ-5, АКЗ-7 та АКЗ-11. Варто відзначити, що чутливість триметинових зондів до фібрил лізоциму значно нижча, ніж до фібрил інсуліну, оскільки фактор чутливості до амілоїдів був значно вищим саме для фібрил інсуліну. З огляду на це, було досліджено спектри поглинання флуорофорів у вільному стані та в присутності контрольного та фібрилярного білків. Усі триметини в ДМСО (Рис. 3.14), за винятком АКЗ-1, демонструють один чітко визначений максимум поглинання в діапазоні від 637 до 658 нм. У свою чергу, форма спектру поглинання АКЗ-1 характеризується двома вібронними піками з чітко визначеною смугою поглинання високої інтенсивності, що відповідає переходу 0-0, та менш інтенсивною короткохвильовою смугою переходу 0-1. Однак, при переході від органічного розчинника до водного середовища спектральна поведінка досліджуваних ціанінів зазнає значних змін (Рис. 3.13). Зокрема, широкі спектри поглинання з двома добре визначеними піками спостерігаються у АКЗ-1 та АКЗ-3. Батохромний пік (на 621 нм та 627 нм для АКЗ-1 та АКЗ-3, відповідно) пов'язаний із поглинанням мономерної форми барвників, тоді як гіпсохромний (розташований на 558 нм і 553 нм, відповідно) є ознакою Н-димерів. Встановлено, що відношення інтенсивностей цих піків сильно залежить від хімічної структури барвника, але в усіх випадках мономерний пік переважає над піком, що відповідає агрегатам. Крім того, плече, розташоване близько 510 нм в спектрі поглинання АКЗ-1, можна вважати доказом наявності агрегатів вищого порядку з паралельно орієнтованими дипольними моментами. У той же час, спектри поглинання АКЗ-5 та АКЗ-7 у водній фазі характеризуються однопіковою структурою з максимумами поглинання на 623 нм і 618 нм, відповідно, що погоджується із сольватохромною поведінкою багатьох ціанінових похідних [291, 309, 312]. Це означає, що мономери є домінуючими формами барвника у випадку буферних розчинів АКЗ-5 та АКЗ-7. Однак, спектри поглинання АКЗ-5 та АКЗ-7 в буфері є ширшими,

порівняно зі спектрами в ДМСО, вказуючи на принаймні невелику кількість Н-димерів. У свою чергу, АКЗ-8 та АКЗ-11, що містять етокси та метил замісники в бензотіазоловій частині барвника, демонстрували дещо іншу поведінку. Спектри поглинання цих хромофорів були зсунуті в короткохвильову частину спектра відносно інших барвників з максимумами на 523 нм і 560 нм, відповідно. Піки мономерів даних барвників є розпливчатыми та схожі на субпіки, що вказує на домінуючий вклад Н-агрегатів у буферному розчині.

Для того, щоб перевірити ефективність триметинів для детектування амілоїдних агрегатів білка та охарактеризувати флуоресцентну відповідь зондів, спектри поглинання кожного барвника реєстрували в буфері та після інкубації з контрольним або фібрилярним інсуліном. Було встановлено, що зміни в спектрах поглинання, викликані неагрегованим інсуліном відрізняються від спостережуваних у буферному розчині. Комплексоутворення АКЗ-3 та АКЗ-7 з контрольним білком призвело до послаблення смуги поглинання мономеру, яке супроводжувалось незначним збільшенням поглинання на ~ 522 нм і ~ 510 нм, відповідно (Рис. 3.14Б та Г). Ці незначні спектральні зміни свідчать про слабку взаємодію барвників АКЗ-3 і АКЗ-7 з неагрегованим білком. У свою чергу, зв'язування АКЗ-1 з контрольним інсуліном супроводжувалось гіперхромізмом – 20 % збільшенням максимуму на 550 нм, разом із 3-м зсувом до коротших довжин хвиль (Рис. 3.14А). Більш того, асоціація АКЗ-1 з контрольним інсуліном призвела до появи плеча, зміщеного в синю область спектру з максимумом на 544 нм, що відображає утворення Н-агрегатів вищого порядку. Значний спад мономерних субпіків барвників АКЗ-5, АКЗ-11 і АКЗ-8 спостерігався при утворенні комплексу барвник-білок, і внесок агрегованих видів барвників переважав над внеском мономерів (Рис. 3.14В, Г та Д).

У присутності контрольного лізоциму спостерігався незначний гіперхромізм в смузі мономерів АКЗ-1 та АКЗ-5 та димерів АКЗ-5.

Поглинання піку димерів АКЗ-1 зменшувалось, однак плече з максимумом на 544 нм, що було виявлене у присутності контрольного інсуліну, не спостерігалось. Комплексоутворення АКЗ-3 з контрольним лізоцимом призвело до значного зменшення поглинання мономеру та димеру, яке супроводжувалось ~ 15 нм батохромним зсувом положення обох піків та незначним збільшенням поглинання на ~ 510 нм. Комплексоутворення АКЗ-7 з контрольним лізоцимом також призвело до ослаблення смуги поглинання мономеру та димеру, однак незначного збільшенням поглинання в області агрегатів більш високого порядку, що спостерігалось у присутності нефібрилізованого інсуліну, виявлено не було. Варто відзначити, що зміни в спектрах поглинання АКЗ-11, викликані контрольним лізоцимом аналогічні змінам у присутності контрольного інсуліну: спостерігався значний спад субпіку мономерів, поряд зі зростанням піку Н-агрегатів. На противагу, спектральна відповідь АКЗ-8 у присутності контрольного лізоциму та інсуліну сильно відрізнялась. Зокрема, поглинання на 626 нм, що відповідає мономерам зонду зростало в чотири рази, пік димерів проявлявся плечем на 561 нм, тоді як вклад піку Н-агрегатів більш високого порядку, що становили домінуючу фракцію зонда у буфері та у присутності контрольного інсуліну, був незначним.

При порівнянні спектрів поглинання триметинових ціанінових барвників у присутності неагрегованого та агрегованого інсуліну та лізоциму, стає очевидним, що спектральні зміни, викликані фібрилярним білком є більш різкими, ніж ті, що спостерігаються у випадку нефібрилізованого аналога. Так, у присутності фібрилярного інсуліну максимумами поглинання всіх смуг зміщуються приблизно на 12–24 нм (залежно від хімічної структури барвника) в довгохвильову область спектру, по відношенню до довжин хвиль в контрольному інсуліні або буферному розчині. Спостережувані батохромні зсуви максимумів поглинання барвників є, ймовірно, результатом зниження полярності мікрооточення зондів [210, 291]. Цей ефект супроводжується збільшенням поглинанням мономерів (644 нм), димерів (576 нм) та

Н-агрегатів (506 нм) АКЗ-1, та є більш вираженими, ніж у випадку нефібрилізованого інсуліну. У свою чергу, асоціація АКЗ-3 та АКЗ-7 з агрегованим інсуліном супроводжувалась уширенням спектру поглинання (яке було більш вираженим у випадку АКЗ-7), що відображає утворення Н-агрегатів. Формування комплексів АКЗ-7 з фібрилярним інсуліном призвело до появи довгохвильового плеча, розташованого на 719 нм, що можна пояснити утворенням J-агрегатів на фібрилярній матриці. Зв'язування АКЗ-5, АКЗ-8 та АКЗ-11 з фібрилами інсуліну супроводжувалось ~ 2, 2.8 та 4-кратним збільшенням поглинання мономерів, димерів та Н-агрегатів, відповідно. Після інкубації з фібрилярним білком, мономер АКЗ-5 та АКЗ-11 стали домінуючою фракцією барвника, тоді як Н-агрегати переважали у спектрі поглинання АКЗ-8.

Формування комплексів АКЗ-1, АКЗ-5, АКЗ-8 та АКЗ-11 з фібрилярним лізоцимом супроводжувалось зростанням поглинання мономерів у порівнянні з буфером та контрольним білком. Даний ефект супроводжувався збільшенням поглинання димерів для зондів АКЗ-11, АКЗ-8 та АКЗ-5. У той же час, пік димерів АКЗ-1 зменшувався. Варто зазначити, що після інкубації з фібрилярним білком, мономер АКЗ-8 та АКЗ-11 стали домінуючою фракцією барвника, тоді як Н-агрегати, що переважали в контрольному білку та буфері вносили мінімальний вклад в сумарний спектр. У свою чергу, асоціація АКЗ-3 та АКЗ-7 з агрегованим лізоцимом супроводжувалась зменшенням поглинання мономерів та димерів (більш вираженим у випадку АКЗ-3). Цікаво, що у присутності фібрилярного лізоциму максимуми поглинання всіх смуг зміщуються лише на 3–8 нм (залежно від хімічної структури барвника) в довгохвильову область спектру, щодо довжин хвиль в контрольному лізоцимі або буферному розчині. Зважаючи на те, що у фібрилярному інсуліні батохромні зсуви становили 12-24 нм, можна зробити припущення про вищу полярність центрів зв'язування в фібрилярному лізоцимі. Варто зазначити, що у присутності фібрилярного лізоциму не

спостерігалась ані поява довгохвильового плеча, розташованого на 719 нм для АКЗ-7, ані уширення спектру поглинання АКЗ-3 та АКЗ-7.

3.2.2 Деконволюція спектрів поглинання триметинів

Для більш детального аналізу спектральної поведінки триметинових ціанінів, отримані спектри поглинання барвника були розкладені за допомогою асиметричної лог-нормальної функції (рівняння (2.2)). Вибір даної функції був продиктований, в основному, вкрай асиметричним характером поглинання спектрів досліджуваних барвників. Недавні дослідження вказують, що у випадку асиметрії в спектральній формі, процедура розкладання спектрів є більш точною при використанні лог-нормальної функції [289].

У результаті деконволюції спектрів поглинання отримуємо набір параметрів, а саме: а) амплітуду $A_{\text{макс}}$; б) положення піку ν_c в залежності від полярності оточення [289]; в) повну ширину на половині максимуму смуги (ПШПМ); г) параметр асиметрії піку ρ .

Виявилось, що спектри поглинання АКЗ-3 і АКЗ-5 у буферному розчині можуть бути представлені як сума двох окремих смуг, з короткохвильовою та довгохвильовою спектральними складовими, що, імовірно, відповідають димерним і мономерним формам барвників, відповідно (Рис. 3.15Б, В, Табл. 3.3). Спектри поглинання АКЗ-1, АКЗ-7, АКЗ-8 та АКЗ-11 у водній фазі були розкладені на три смуги, що представляють мономери барвника, димери та агрегати вищого порядку (Рис. 3.15А, Г, І, Д, Табл. 3.3). Виявлено, що в усіх випадках R^2 становив 0.98–0.99. У присутності контрольного інсуліну спостерігались наступні зміни в амплітуді: а) помітне падіння смуги І, що відповідає мономерній формі барвника (всі барвники) (Рис. 3.16); б) зростання відносного внеску смуги ІІ (АКЗ-5, АКЗ-11); в) збільшення поглинання смуги ІІІ (Табл. 3.4) барвників АКЗ-1 (1.4 рази), АКЗ-7 (1.6 рази), АКЗ-8 (1.3 рази) та АКЗ-11 (1.9 рази). Ці ефекти супроводжувались

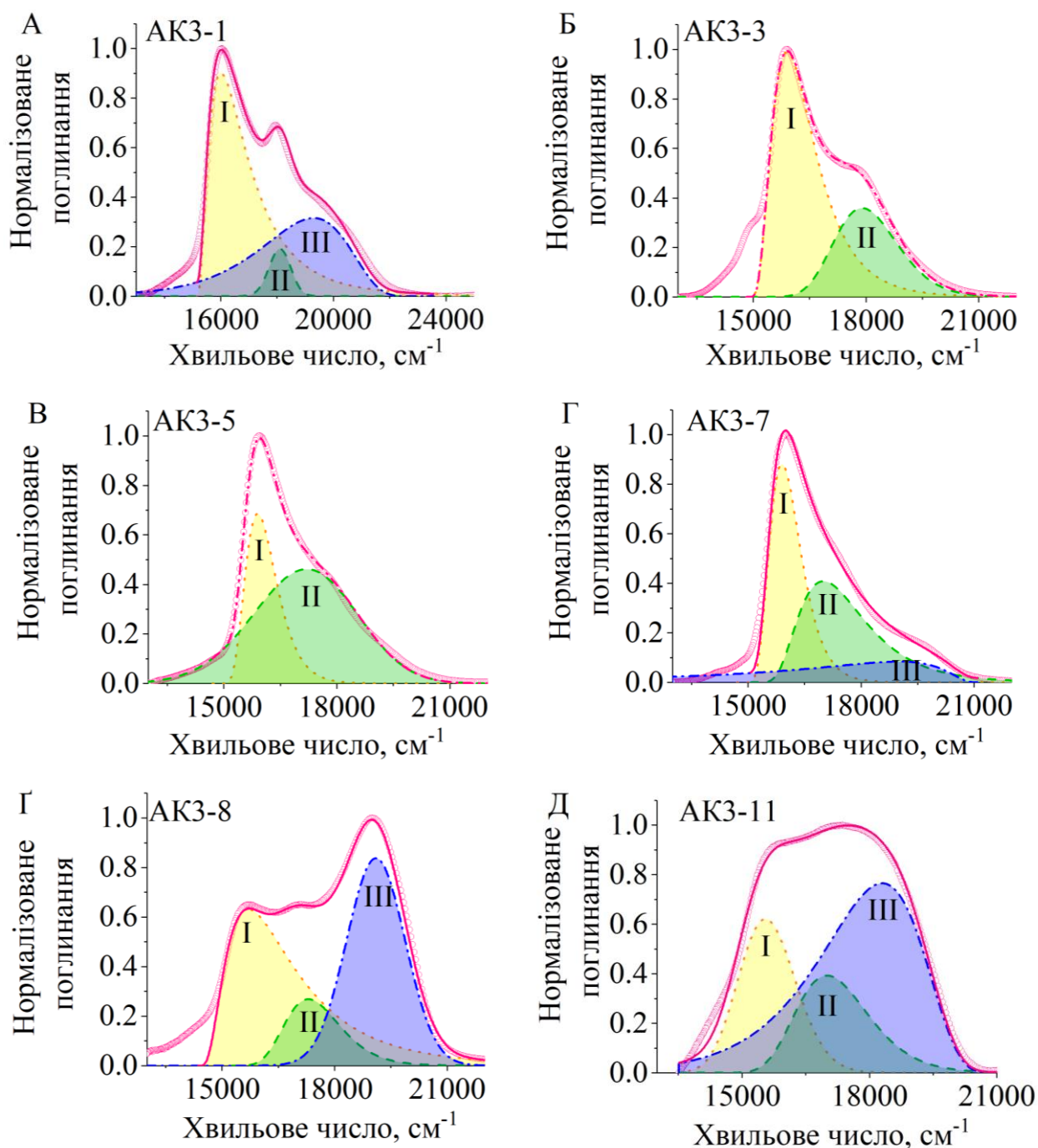


Рис. 3.15 Деконволюція спектрів поглинання триметинів у буфері на дві (Б, В) та три (А, Г, Г, Д) компоненти, відповідно. Експериментальні дані позначені кружечками, компоненти – пунктирними лініями, підгонка експериментальних даних лог-нормальною функцією – рожевою суцільною лінією

Таблиця 3.3

**Спектральні характеристики поглинання триметинових барвників
у водному середовищі**

Барвник	Смуга	$A_{\text{макс}}$	$\nu_c, \text{см}^{-1}$	ПШПМ, см^{-1}	$\rho, \text{см}^{-1}$
AK3-1	I	40000	16007	1767	0.42
	II	8500	18100	910	1.02
	III	14000	19300	3795	1.53
AK3-3	I	97000	15900	1422	0.54
	II	35171	17900	2000	0.81
AK3-5	I	50000	15900	1000	0.67
	II	33680	17200	3251	1.05
AK3-7	I	84168	15900	1000	0.67
	II	39000	17000	2159	0.59
	III	8000	19000	4803	2.66
AK3-8	I	20739	15700	2347	0.45
	II	8816	17300	1750	0.75
	III	27500	19100	1832	1.00
AK3-11	I	15353	15550	1582	0.91
	II	9711	17000	2027	0.76
	III	18934	18300	2935	1.54

збільшенням повної ширини на половині максимуму (ПШПМ) смуги II (AK3-3, AK3-5, AK3-11) та смуги III (AK3-8), разом із зростанням параметра асиметрії смуги II (AK3-3, AK3-5, AK3-7 та AK3-11). Присутність контрольного інсуліну не вплинула на положення піків, за винятком ν_c для смуги II барвника AK3-5 та смуги III барвника AK3-8, де спостерігався невеликий короткохвильовий зсув.

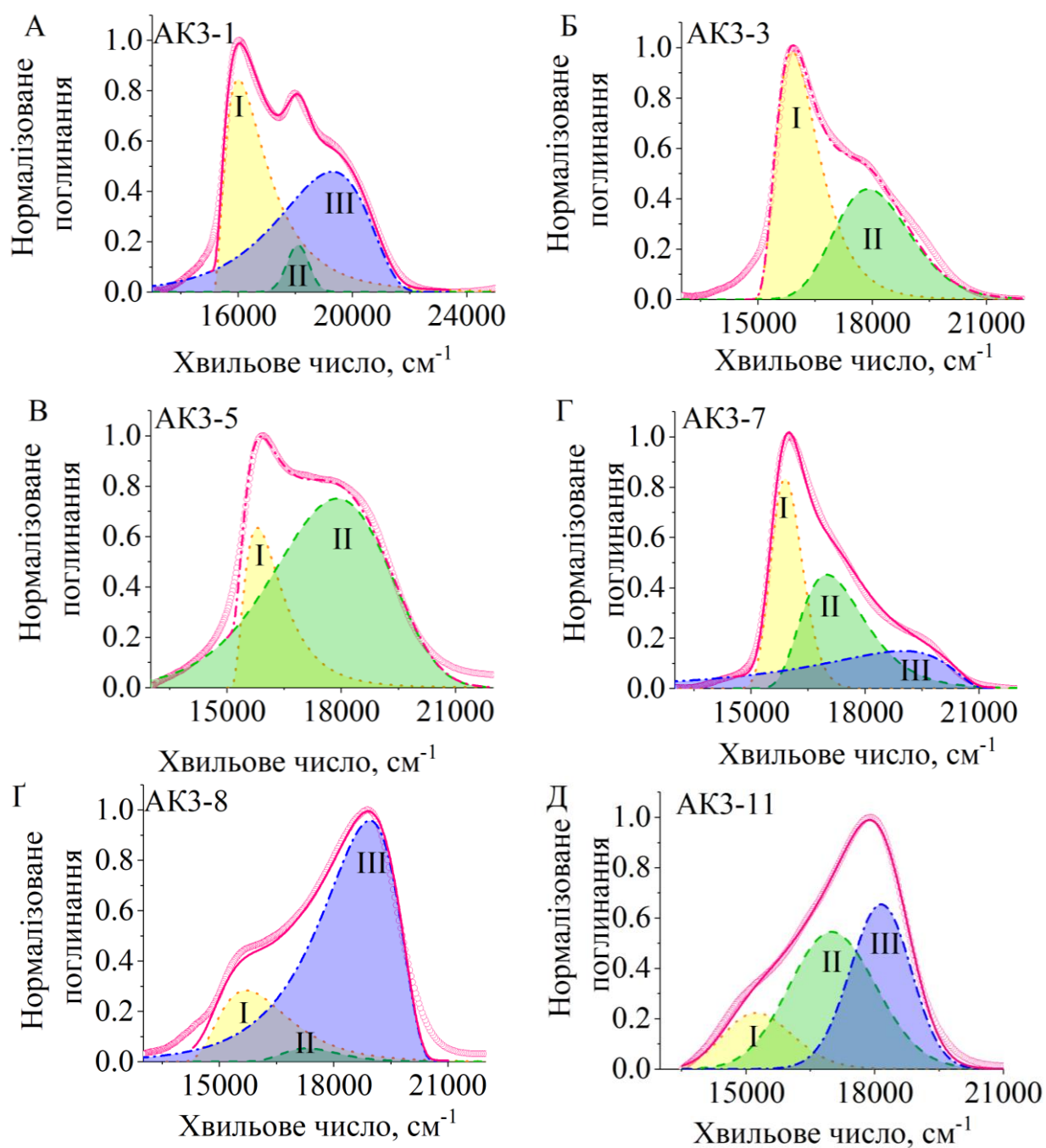


Рис. 3.16 Деконволюція спектрів поглинання триметинів в нативному інсуліні на дві (Б, В) та три (А, Г, І, Д) компоненти, відповідно. Експериментальні дані позначені кружечками, компоненти – пунктирними лініями, підгонка експериментальних даних лог-нормальною функцією – рожевою суцільною лінією

Таблиця 3.4

**Спектральні характеристики поглинання триметинових барвників
у присутності неагрегованого інсуліну**

Барвник	Смуга	$A_{\text{макс}}$	$\nu_c, \text{см}^{-1}$	ПШПМ, см^{-1}	$\rho, \text{см}^{-1}$
AK3-1	I	34000	16007	1784	0.43
	II	7500	18100	910	1.02
	III	19238	19300	3769	1.56
AK3-3	I	77643	15900	1336	0.59
	II	32698	17900	2334	0.92
AK3-5	I	30000	15800	1000	0.50
	II	35497	17900	3619	1.23
AK3-7	I	72000	15900	973	0.84
	II	39000	17000	1984	0.68
	III	12857	19000	4324	2.23
AK3-8	I	10935	15700	2202	0.61
	II	2028	17300	1750	0.75
	III	37000	18950	2435	1.75
AK3-11	I	12286	15234	1904	0.88
	II	30000	17000	2380	0.96
	III	36042	18250	1667	1.03

У сукупності, ці результати вказують на можливість підвищення рівня Н-агрегації триметинових ціанінів під впливом нефібрилізованого інсуліну. Подібні результати раніше були отримані для пентаметинових барвників у присутності сироваткового альбуміну бика [418]. Також, формування самоасоційованих агрегатів спостерігали у присутності рибонуклеази А, лізоциму, трипсину та желатину [419, 420]. Особливості зв'язування

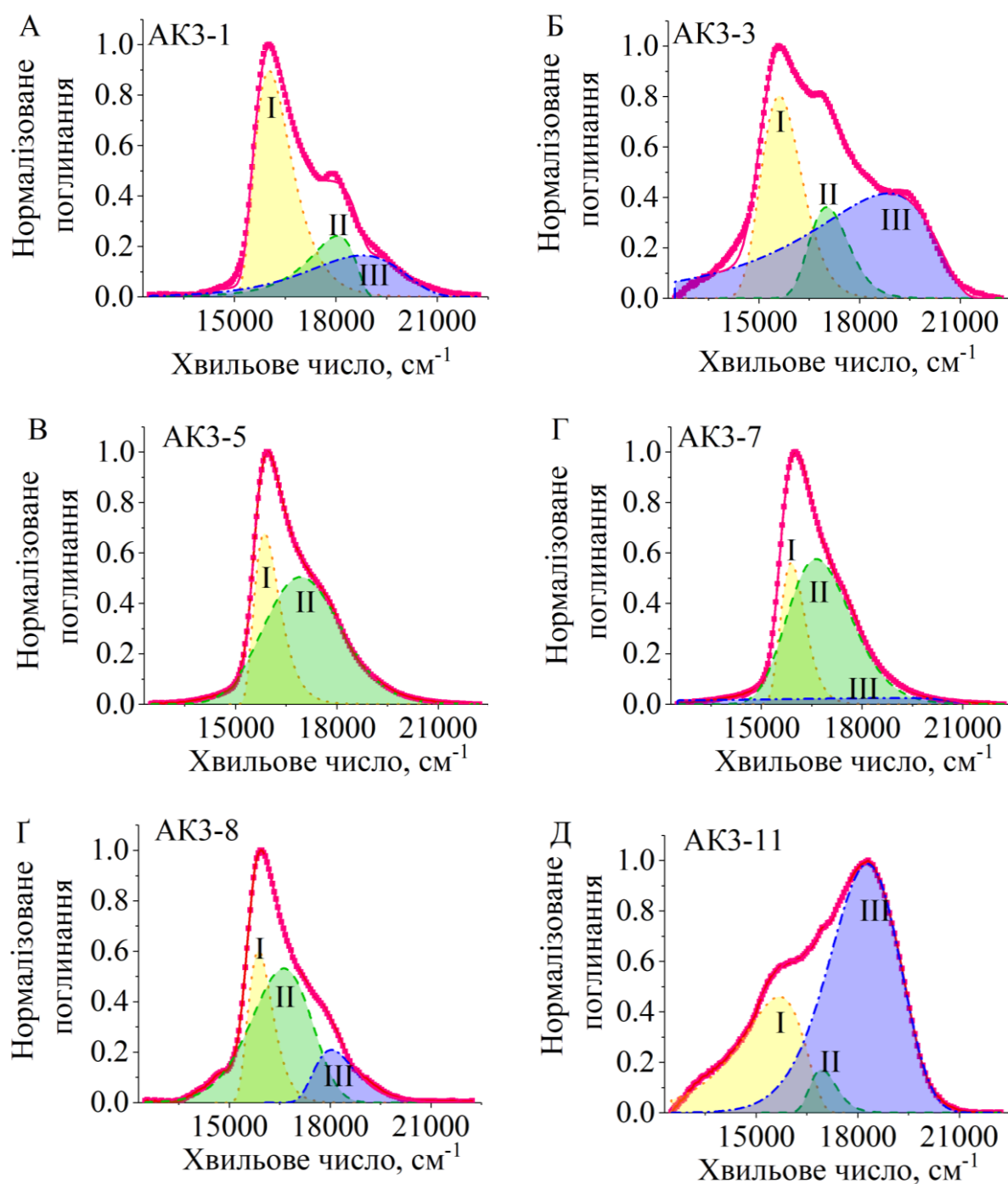


Рис. 3.17 Деконволюція спектрів поглинання триметинів в нативному лізоцимі на дві (В) та три (А, Б, Г, Д) компоненти, відповідно. Експериментальні дані позначені кружечками, компоненти – пунктирними лініями, підгонка експериментальних даних лог-нормальною функцією – рожевою суцільною лінією

Таблиця 3.5

**Спектральні характеристики поглинання триметинових барвників
у присутності неагрегованого лізоциму**

Барвник	Смуга	$A_{\text{макс}}$	$\nu_c, \text{см}^{-1}$	ПШПМ, см^{-1}	$\rho, \text{см}^{-1}$
AK3-1	I	43112	16024	1314	0.62
	II	11652	18056	1647	1.82
	III	7895	18780	3378	1.48
AK3-3	I	22100	15608	1436	0.81
	II	9935	17025	1383	0.81
	III	11434	18858	4544	2.00
AK3-5	I	70503	15858	891	0.66
	II	52474	16930	2696	0.91
AK3-7	I	50720	15888	862	0.75
	II	52102	16636	2243	1.21
	III	2224	18921	10385	4.84
AK3-8	I	27768	15871	863	0.72
	II	24562	16622	2138	1.20
	III	9627	18041	1461	0.70
AK3-11	I	14355	15691	2256	1.69
	II	5360	16934	922	0.77
	III	30784	18289	2475	1.21

тіакарбоціанінів з білком полягають у тому, що агрегація барвників мала кооперативний характер і комплексоутворення залежало як від барвника, так і від білкової структури [419]. Більше того, було припущено, що кулонівські взаємодії відіграють домінуючу роль в агрегації цих барвників при утворенні комплексів барвник-білок [418, 419]. Можливо, за аналогією з пентаметиновими та тіакарбоціаніновими барвниками, електростатичні

взаємодії між негативно зарядженими залишками білка і катіонними молекулами барвника сприяють агрегації триметинів, так само, як гідрофобні взаємодії між барвником та білком у присутності нефібрилізованого інсуліну. В усіх випадках R^2 становив 0.99.

Додавання нефібрилізованого лізоциму до АКЗ-1, АКЗ-5 та АКЗ-8 (Рис. 3.17, Табл. 3.5), порівняно зі спектрами поглинання у буфері спричинило такі спектральні зміни: а) зростання інтенсивностей смуг І (в 1.1, 1.4 та 1.3 рази, відповідно) та ІІ (в 1.4, 1.6 та 2.8 разів), що для АКЗ-1 та АКЗ-7 супроводжувалось розширенням та зростанням асиметрії смуги ІІ; б) спад поглинання смуги ІІІ для АКЗ-1 (1.8 разів) та АКЗ-8 (2.9 разів) та її звуження. В той же час контрольний лізоцим викликав в АКЗ-3, АКЗ-7 та АКЗ-11 звуження та зменшення інтенсивності мономерної смуги в 3.3, 1.7 та 1.1 разів, відповідно, що супроводжувалось зростанням смуги ІІ для АКЗ-7 та смуги ІІІ для АКЗ-11 (1.6 разів для обох барвників). Слід зазначити, що для АКЗ-3 у присутності контрольного лізоциму спостерігалось три чітко визначених піки, де димерна (в 3.5 разів) та мономерна (в 4.4 рази) смуги демонстрували спад поглинання порівняно з буфером, а натомість з'являлась широка смуга Н-агрегатів з вищою інтенсивністю, ніж у смуги ІІ. Крім того, спостерігались зсуви максимумів поглинання у бік зменшення значень ν_c мономерного піку (АКЗ-3), смуг ІІ (для всіх барвників, окрім АКЗ-1) та ІІІ (АКЗ-1, АКЗ-7, АКЗ-8), в той час як мономерна смуга барвників АКЗ-8 та АКЗ-11 зсувалась в область вищих значень хвильових чисел. Підсумовуючи результати, можна зробити висновок, що триметинові барвники АКЗ-1, АКЗ-5, АКЗ-7 та АКЗ-8 зв'язуються з нативним лізоцимом переважно у вигляді мономерів та димерів, в той час як АКЗ-3 та АКЗ-11 проявляють схильність до агрегації у присутності нефібрилізованого лізоциму.

Інкубація ціанінів АКЗ-1 та АКЗ-7 з фібрилярним інсуліном призвела до падіння амплітуди смуги І та одночасного зростання смуги ІІІ (Табл. 3.6, Рис. 3.18А, Г). Цікаво, що для цих барвників зростання відносного внеску

смуги III у загальний спектр було набагато виразнішим для фібрилярного інсуліну порівняно з його неагрегованим аналогом. Враховуючи, що смуги I та III відповідають поглинанню мономерів та Н-агрегатів, відповідно, зменшення амплітуди смуги I разом із зростанням значення $A_{\text{макс}}$ смуги III вказують на те, що фібрилярний інсулін, подібно до контрольного білка, може також служити матрицею для агрегації АКЗ-1 і АКЗ-7.

Однак зростання ПШПМ смуг I і II, разом із зменшення значень ν_c свідчить про те, що, крім Н-агрегатів вищого порядку, існує деяка частина АКЗ-1 та АКЗ-7, зв'язаних із фібрилярним інсуліном у вигляді мономерів та димерів. Подібна поведінка обговорювалась для гептаметинових ціанінових барвників у присутності фібрилярного лізоциму в попередньому підрозділі (Розділ 3.1) [5]. Тенденція до самоорганізації на фібрилярній матриці β -амілоїдного пептиду також спостерігалась для катіонного барвника пінаціанолу [314].

У цьому контексті слід зазначити, що зв'язування тіакарбоціанінового барвника 7514 з амілоїдними фібрилами інсуліну призводило до дещо підвищеної інтенсивності смуг як Н-, так і J-агрегатів [319]. У роботі [421] автори продемонстрували, що подібним чином родамін 6Ж агрегує на амілоїдній матриці, а також те, що фібрили інсуліну сприяють утворенню молекулярних агрегатів барвника.

Варто відмітити, що спектри поглинання АКЗ-3 у буферному розчині та контрольному інсуліні були розкладені на дві окремі смуги з короткохвильовою та довгохвильовою спектральними компонентами, що найбільш імовірно відповідають димерним та мономерним формам барвника, відповідно. Однак, у присутності фібрилярного інсуліну не вдалося розкласти спектр поглинання АКЗ-3 на дві смуги. Натомість виявилось, що даний спектр можна представити як суму трьох окремих смуг (Рис. 3.18Б). Було припущено, що смуги I та II відповідають зв'язаним мономерам та

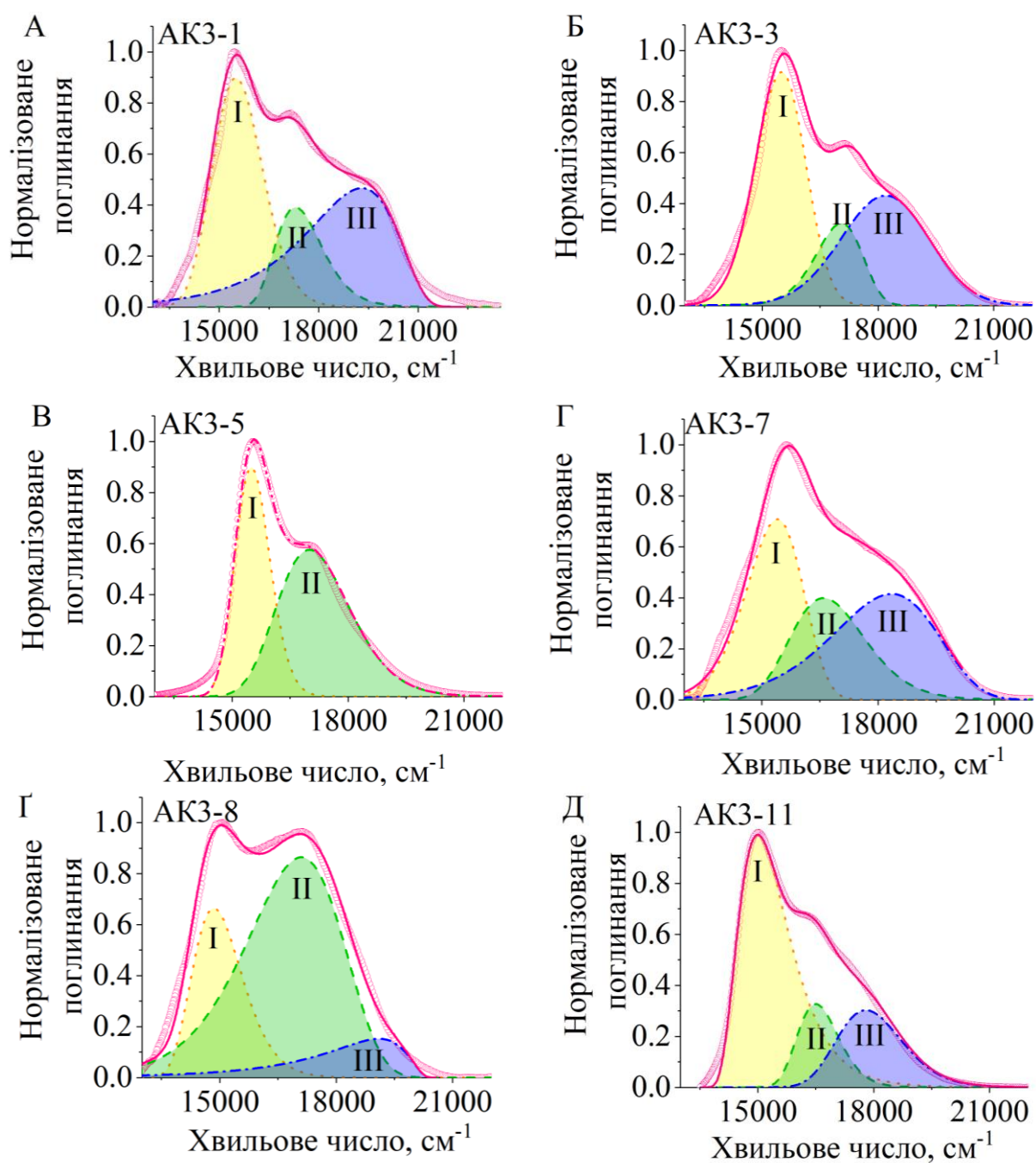


Рис. 3.18 Деконволюція спектрів поглинання триметинів у фібрилярному інсуліні на дві (В) та три (А, Б, Г, І, Д) компоненти, відповідно. Експериментальні дані позначені кружечками, компоненти – пунктирними лініями, підгонка експериментальних даних лог-нормальною функцією – рожевою суцільною лінією

Таблиця 3.6

**Спектральні характеристики поглинання триметинових барвників
у присутності фібрилярного інсуліну**

Барвник	Смуга	$A_{\text{макс}}$	$\nu_c, \text{см}^{-1}$	ПШПМ, см^{-1}	$\rho, \text{см}^{-1}$
AK3-1	I	39000	15500	1984	0.87
	II	16952	17300	1673	0.76
	III	20225	19300	3369	1.67
AK3-3	I	62500	15500	1537	1.07
	II	22000	17050	1446	1.23
	III	29431	18200	2692	1.03
AK3-5	I	124041	15500	1064	0.89
	II	79368	17000	2233	0.81
AK3-7	I	41000	15400	1742	1.19
	II	23100	16600	2269	0.81
	III	24032	18350	3253	1.30
AK3-8	I	28955	14850	1525	0.77
	II	37667	17100	2979	1.33
	III	6622	19100	2619	2.26
AK3-11	I	88500	15000	1594	0.62
	II	29169	16500	1267	0.81
	III	17000	17800	2000	0.82

димерам, відповідно. Зсув положення піку на 24 нм (зменшення значень ν_c) щодо вільних мономерів та димерів є додатковим аргументом на користь вищенаведеного припущення. Зміщення в короткохвильову область смуги III, відсутньої у буфері і контрольному інсуліні, за аналогією з AK3-1 і AK3-7, можна віднести до утворення агрегатів AK3-3 на фібрилярній матриці.

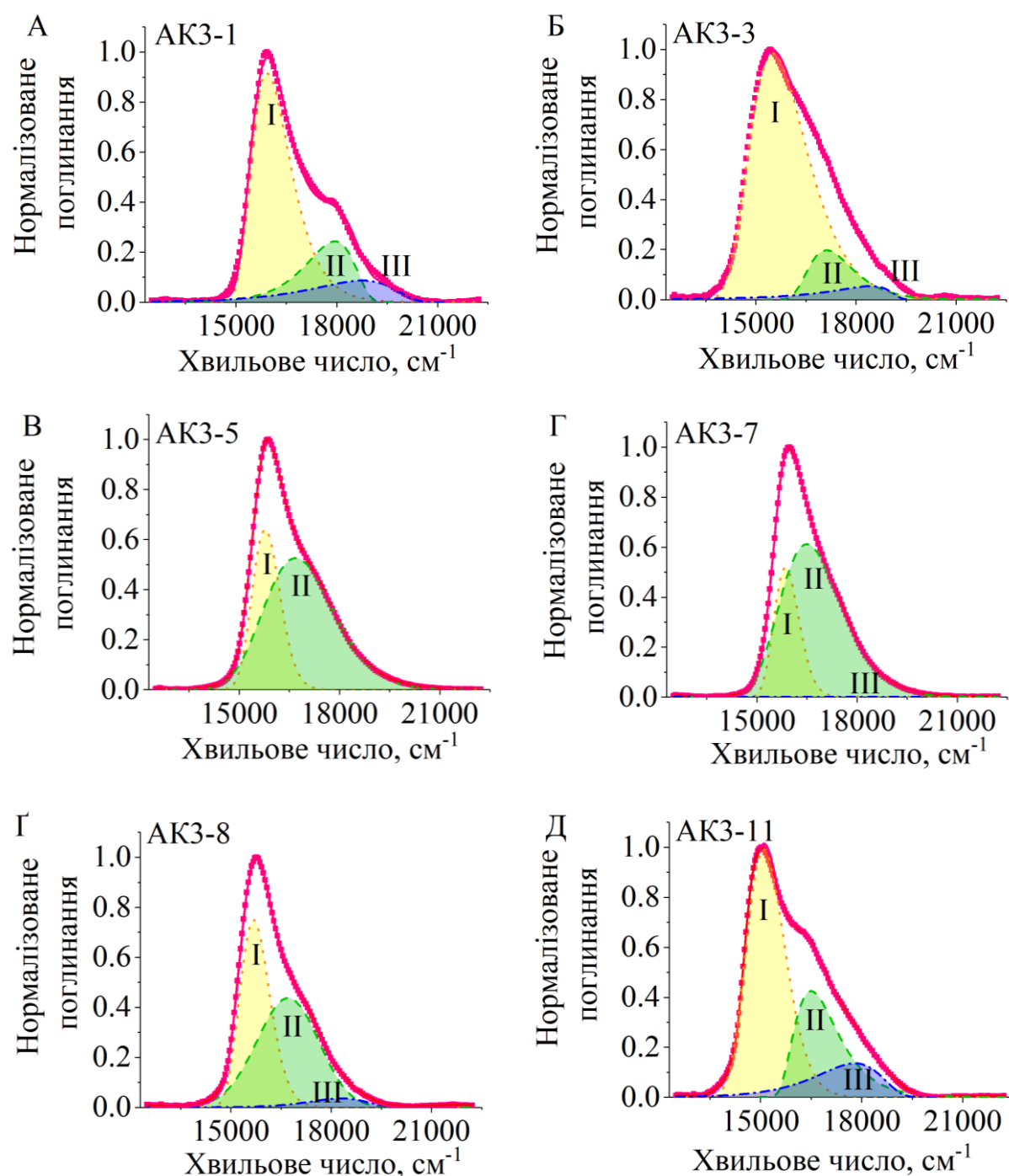


Рис. 3.19 Деконволюція спектрів поглинання триметинів у фібрилярному лізоцимі на дві (В) та три (А, Б, Г, Г, Д) компоненти, відповідно. Експериментальні дані позначені кружечками, компоненти – пунктирними лініями, підгонка експериментальних даних лог-нормальною функцією – рожевою суцільною лінією

Таблиця 3.7

**Спектральні характеристики поглинання триметинових барвників
у присутності фібрилярного лізоциму**

Барвник	Смуга	$A_{\text{макс}}$	$\nu_c, \text{см}^{-1}$	ПШПМ, см^{-1}	$\rho, \text{см}^{-1}$
AK3-1	I	52327	15924	1405	0.66
	II	13891	17943	1747	1.56
	III	4918	18764	2931	1.73
AK3-3	I	32383	15516	2077	1.00
	II	6468	17115	1623	0.66
	III	1757	18434	2183	2.30
AK3-5	I	74203	15778	979	0.88
	II	60928	16692	2471	0.85
AK3-7	I	46437	15854	883	0.85
	II	54887	16494	2185	1.27
	III	39	19000	3448	3.95
AK3-8	I	44261	15681	1052	0.84
	II	25834	16717	2181	1.03
	III	2091	18302	2054	1.35
AK3-11	I	53443	15100	1353	0.83
	II	22866	16500	1568	0.61
	III	7296	17800	2356	1.59

Відносні інтегральні інтенсивності смуг I та II барвників AK3-5, AK3-8 і AK3-11 (Рис. 3.18В, Г, Д) зростали у присутності фібрилярного інсуліну. Більш конкретно, в результаті інкубації цих барвників з фібрилами інсуліну мономерна смуга зростала в 2.5, 1.4 та 5.8 рази, що супроводжувалось 2.1, 4.2 та 3.2-кратним зростанням димерної смуги AK3-5, AK3-8 та AK3-11, відповідно (Табл. 3.6). У той же час, для AK3-8 та AK3-11 у присутності

агрегованого інсуліну спостерігався помітний спад амплітуди смуги III. Цей ефект супроводжувався зниженням значення ν_c смуг I і II барвників АКЗ-5, АКЗ-8 і АКЗ-11, що, імовірно, виникає внаслідок зменшення полярності оточення мономерів та димерів барвника, зв'язаних з фібрилярним інсуліном. З іншого боку, фібрили інсуліну жодним чином не вплинули на положення смуги III барвників АКЗ-8 та АКЗ-11. При порівнянні значень ПШПМ, можна помітити, що фібрили інсуліну спричиняли значне зменшення ПШПМ для барвників АКЗ-5 (смуга II) та АКЗ-11 (смуги II та III), тоді як у випадку АКЗ-8 даний параметр продемонстрував незначне збільшення для смуг II та III. Підсумовуючи результати, стає очевидним, що барвники зв'язуються з контрольним інсуліном переважно у формі Н-агрегатів, в той час як мономери та димери АКЗ-5, АКЗ-8 та АКЗ-11 є домінуючими формами у присутності фібрилярного інсуліну. Крім того, більш значне зростання амплітуди смуги I барвників АКЗ-5 та АКЗ-11 вказує на те, що більш сприятливим для них є зв'язування у вигляді мономерів, тоді як для АКЗ-8 переважним способом зв'язування є димеризація на фібрилярній матриці. Подібним чином, висока спорідненість мономерів тіазолового оранжевого до ДНК була пояснена стекінгом барвника з основами ДНК, тоді як димери з низькою спорідненістю (через стеричні обмеження) повинні були асоціювати із зовнішньою поверхнею молекули ДНК [422].

Розкладення спектрів поглинання триметинових барвників у присутності фібрилярного лізоциму (Рис. 3.19, Табл. 3.7) теж свідчить про переважне зв'язування мономерних та димерних форм над Н-агрегатами. Так, інкубація барвників АКЗ-1, АКЗ-5, АКЗ-8 та АКЗ-11 з фібрилами лізоциму спричинила зростання інтенсивностей мономерної (в 1.3, 1.5, 2.1 та 3.5 раз, відповідно) та димерної (в 1.6, 1.8, 2.9 та 2.4 рази, відповідно) смуг, порівняно зі спектрами вільних барвників, що супроводжувалось значним спадом смуги III для АКЗ-1 (2.8 разів), АКЗ-8 (13 разів) та АКЗ-11 (2.6 рази). Для вказаних барвників спостерігалось звуження мономерного (всі

барвники), а також димерного піків для зондів АКЗ-5 та АКЗ-11, в той час як АКЗ-1 демонстрував розширення смуги II, а АКЗ-8 – смуг II та III.

При більш детальному порівнянні спектрів АКЗ-1, АКЗ-5, АКЗ-8 та АКЗ-11 у присутності фібрилярного білка з нативним лізоцимом виявилось, що інтенсивність мономерної смуги зростала в 1.2, 1.1, 1.6 та 3.7 разів, відповідно, а димерної – в 1.2, 1.2, 1.1 та 4.3 рази порівняно з контролем, в той час як пік Н-агрегатів для АКЗ-1 (1.6 раз), АКЗ-8 (4.6 раз) та АКЗ-11 (4.2 рази) зменшувався. Ці спостереження вказують на те, що дані барвники зв'язуються з фібрилярним лізоцимом та інсуліном подібним чином – у формі димерів та мономерів, у той час як у випадку контрольного білка значним є внесок Н-агрегатів у процес зв'язування.

Спектральний відгук барвника АКЗ-3 на фібрилярний лізоцим, подібно до контрольного білка, демонстрував появу піку Н-агрегатів, з тією різницею, що інтенсивність смуг II та III була в 1.5 та 6.5 разів нижче, ніж для нефібрилізованого білка, в той час як інтенсивність мономерної смуги зросла в 1.5 разів. Крім того, зменшення значень ν_c смуг I та II порівняно з вільним барвником вказує на переважне зв'язування АКЗ-3 з фібрилярним лізоцимом у вигляді мономерів, в той час як зв'язування димерів та Н-агрегатів менш виражене, ніж в контрольному білку.

Барвник АКЗ-7 у присутності фібрил лізоциму демонстрував значний спад інтенсивностей та звуження смуг I та III, порівняно з контролем та буфером (смугу Н-агрегатів можна вважати майже відсутньою), що разом із відсутністю зсуву максимуму даних смуг порівняно з барвником у буфері та значним зростанням інтенсивності смуги II у присутності фібрил, вказує на переважний спосіб зв'язування АКЗ-7 з фібрилярним лізоцимом у вигляді димерів.

Отримані результати пояснюють флуоресцентні відповіді триметинових ціанінових барвників на амілоїдні фібрили інсуліну та лізоциму. Як видно з Табл. 3.1, велике значення ФЧА, характерне для хромофору АКЗ-11 як у

присутності лізоциму, так і інсуліну та АКЗ-5 у присутності лише інсуліну може бути обумовлене кількома факторами: а) контрольні білки викликають утворення нефлуоресцентних Н-агрегатів АКЗ-11 та АКЗ-5; б) з фібрилярним інсуліном та лізоцимом зв'язуються мономери АКЗ-11 та АКЗ-5 (у випадку інсуліну), що призводить до значного посилення флуоресценції барвників, у той час коли агрегати низького порядку відіграють у цьому процесі другорядну роль. Цікаво, що у присутності контрольного та фібрилярного лізоциму для АКЗ-5, де $\Phi\text{ЧА}=7.4$, була характерна взаємодія як мономерів так і димерів зонду, однак вклад мономерів був значно більшим у присутності фібрилярного лізоциму, що свідчить про більшу специфічність даного зонду до фібрилярних білків. Слід зазначити, що для інших барвників утворення агрегатів, за аналогією з АКЗ-11 та АКЗ-5, також є переважним способом зв'язування у присутності контрольного інсуліну. Крім того, менші значення $\Phi\text{ЧА}$ для цих барвників пояснюються тим, що димеризація та агрегація на фібрилярній матриці інсуліну переважала над зв'язуванням мономерних видів. Як комплекси барвник-білок, так і агрегати барвника стабілізуються тими ж самими типами міжмолекулярних взаємодій (ван дер Ваальсовими, водневими, електростатичними та гідрофобними). Отже, наведені вище результати можна розглядати як доказ вищої спорідненості та селективності АКЗ-11 та АКЗ-5 до фібрилярного інсуліну та лізоциму у порівнянні з іншими досліджуваними барвниками.

3.2.3 Можливі сайти зв'язування триметинових ціанінових зондів з інсуліном та лізоцимом

Для того, щоб визначити сайти зв'язування АКЗ з інсуліном та лізоцимом, а також природу взаємодій при комплексоутворенні барвник-білок у випадку нефібрилізованого білка та амілоїдних фібрил, була проведена серія досліджень методом молекулярного докінгу. Як показано на Рис. 3.20А, триметини АКЗ-1, АКЗ-8 та АКЗ-5, подібно до ThT [320], мають

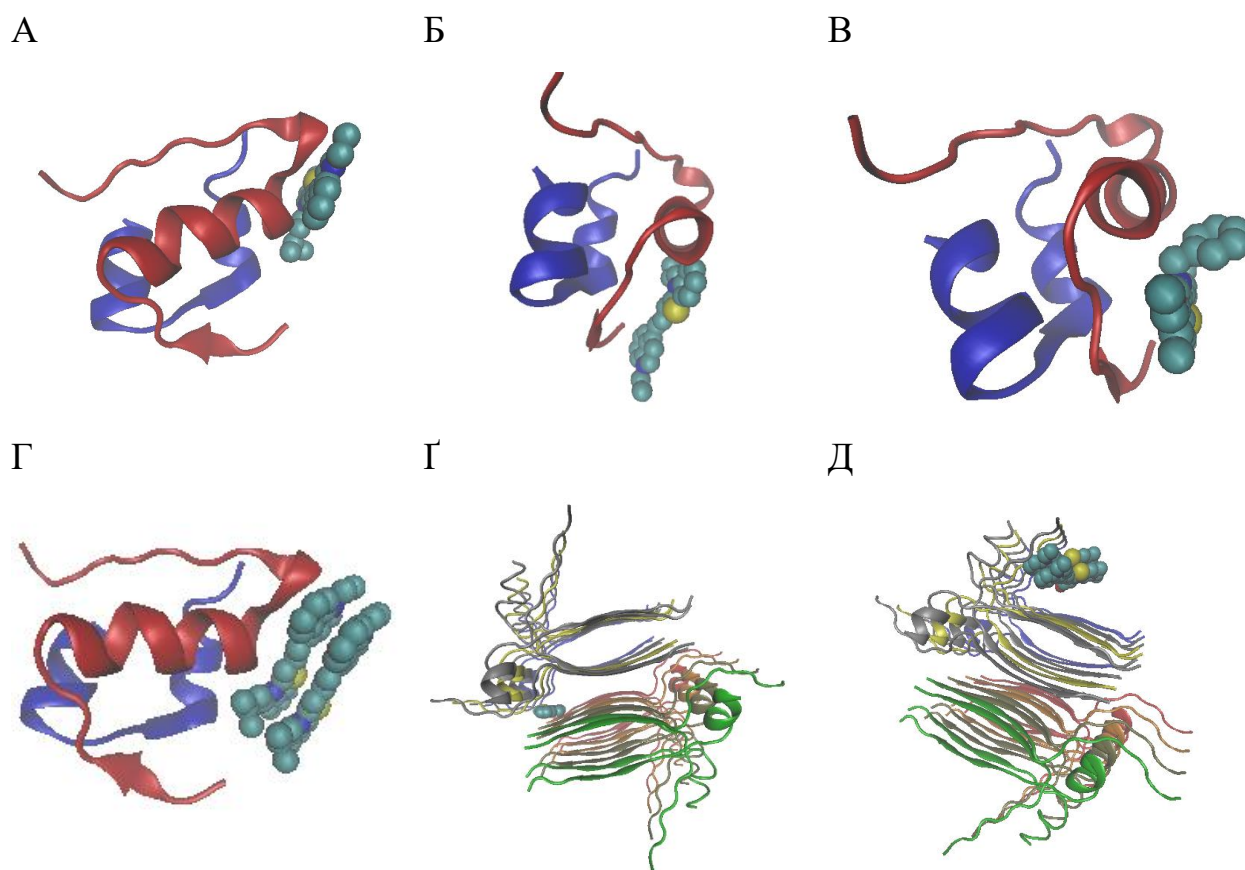


Рис. 3.20 Схематичне представлення найбільш енергетично вигідних комплексів барвників з нефібрилізованим та фібрилярним інсуліном, отриманих за допомогою серверів PatchDock та FireDock. На панелях А–В наведені мономерні АКЗ-5, АКЗ-3 та АКЗ-11, зв'язані з Б-ланцюгом нефібрилізованого білка, відповідно. На панелі Г відображено зв'язування димерів АКЗ-5 із залишками 17 – 22 ланцюга Б та ланцюгом А (залишки Е17 та L13) неагрегованого білка. На панелях Г та Д представлено зв'язування мономерів та димерів АКЗ-8 із фібрилярним інсуліном

тенденцію утворювати найбільш стабільні комплекси із залишками 17 – 22 ланцюга Б (3-10 спіраль включає залишки Б 20 – Б 22) та залишками 1 – 4 (АКЗ-1). Так само, залишки 10 – 13 ланцюга Б мають високу спорідненість до АКЗ-3 (Рис. 3.20Б). Більш того, типовими сайтами зв'язування АКЗ-7 та АКЗ-11 з нефібрилізованим інсуліном є асоціація із залишками 4 – 10 Б-ланцюга. У свою чергу, димери всіх досліджуваних барвників мають тенденцію утворювати комплекси із залишками 17–22 Б-ланцюга (3–10 спіраль включає залишки Б 20 – Б 22) та із ланцюгом А білка (залишки Е17 та L13). Відповідно до результатів молекулярного докінгу, мономерні даніх ціанінів оточені лише полярними (С, Q і Н) та гідрофобними (L, А)

залишками. Можна помітити, що гідрофобні взаємодії відіграють значну роль при зв'язуванні мономерів ціанінових барвників з неагрегованим інсуліном, тоді як заряджений залишок E17 був виявлений в безпосередній близькості від димерів триметинових барвників. Дані спостереження підтверджують припущення, що самозбірці триметинових барвників в присутності нефібрилізованого інсуліну сприяють електростатичні взаємодії між негативно зарядженими залишками білка та катіонними молекулами барвника.

За результатами доступних онлайн алгоритмів PatchDock та FireDock були виявлені наступні закономірності зв'язування триметинових зондів з нативним лізоцимом (Рис. 3.21):

1. Як мономери, так і димери триметинових зондів зв'язуються в області гідрофобного карману лізоциму, тобто в його активному центрі;
2. Мономери триметинових зондів зв'язуються в основному із гідрофобними залишками I98, A107 (всі зонди), W108 (окрім АК3-11), L56, I58 (окрім АК3-11 та АК3-8), W62 (окрім АК3-11 та АК3-3), W63 (окрім АК3-11 та АК3-7), V109 (окрім АК3-7 та АК3-1), рідше зустрічались взаємодії з неполярними залишками L75, A110 та ароматичним F34; також спостерігались електростатичні взаємодії з негативно зарядженими залишками D101 (окрім АК3-11 та АК3-3), E35 (барвники АК3-11 та АК3-3), D52 (барвник АК3-11) та позитивно зарядженим залишком R114 (барвники АК3-11 та АК3-3); були виявлені ван-дер-Ваальсові взаємодії з аспарагіном в позиції 44(АК3-11), 59 (АК3-1, АК3-5, АК3-7) та 113 (АК3-3, АК3-11);
3. Димери всіх барвників утворювали комплекси з ароматичними залишками W63, W108, неполярними ізолейцином та аланіном в позиції 98 та 107, відповідно, також полярним N59 та позитивно зарядженим R112, рідше у комплексоутворенні брали участь гідрофобні залишки L73 (окрім АК3-5), V109 (окрім АК3-7), A110 (окрім АК3-7), A31 (окрім АК3-7, АК3-1), I58 (окрім АК3-8, АК3-1), L75 (окрім

AK3-5, AK3-3), W62 (окрім AK3-5, AK3-3), A95, F34, A42, G54, G49, L56, L88, A96, W111, A131; полярні залишки C76 (окрім AK3-1), N113 (окрім AK3-7), N44 (окрім AK3-7, AK3-1), N46 (окрім AK3-7, AK3-1), C94 (окрім AK3-8, AK3-1), T43, S50, Q57, M105, а також негативно (E35 та D52, окрім AK3-5 та AK3-7, відповідно) та позитивно заряджені (R114 для всіх барвників, окрім AK3-7, R61 для AK3-8, AK3-7 та AK3-1, та K97 для AK3-7).

Таким чином, можна зробити висновок, що основний вклад в утворення комплексу барвник-нативний білок вносять гідрофобні, ароматичні та ван-дер-Ваальсові взаємодії, в той час як електростатика відіграє менш значну роль. Слід зазначити, що мономери AK3-11, AK3-3 та димери всіх барвників мають контакти з α -спіралями В (залишки 25–36), С (залишки 89–100) та D (залишки 110–116), а також для димерів всіх барвників, окрім AK3-1 та AK3-7, спостерігались взаємодії з β -тяжами S1 (залишки 43–46) та/або S2 (залишки 51–54) нативного лізоциму.

Відомо, що жолобки амілоїдних фібрил є специфічними сайтами зв'язування для класичних амілоїдних маркерів ThT та Конго червоного [186]. Зв'язування з жолобками амілоїдних фібрил раніше спостерігалось також як для моно-, три- та гептаметинових ціанінових барвників, так і для відомого ДНК-інтеркалятора YOYO-1 [5, 314, 377]. Оскільки ширина жолобків та відстань між β -тяжами в β -листі складають ~ 7 Å та ~ 4 Å [186], відповідно, а довжина, ширина та висота досліджуваних триметинів не перевищують 17.9 Å, 11.5 Å та 4.8 Å, відповідно, то просторових обмежень для взаємодії ціанінів з жолобками фібрил немає. Тому за аналогією з іншими барвниками можна розраховувати, що мономери AK3 схильні до асоціації, принаймні, з чотирма В-ланцюгами таким чином, що їх коротка вісь перпендикулярна осі фібрили.

Вищевказане припущення добре узгоджується з результатами дослідження методом молекулярного докінгу, що виявило зв'язування

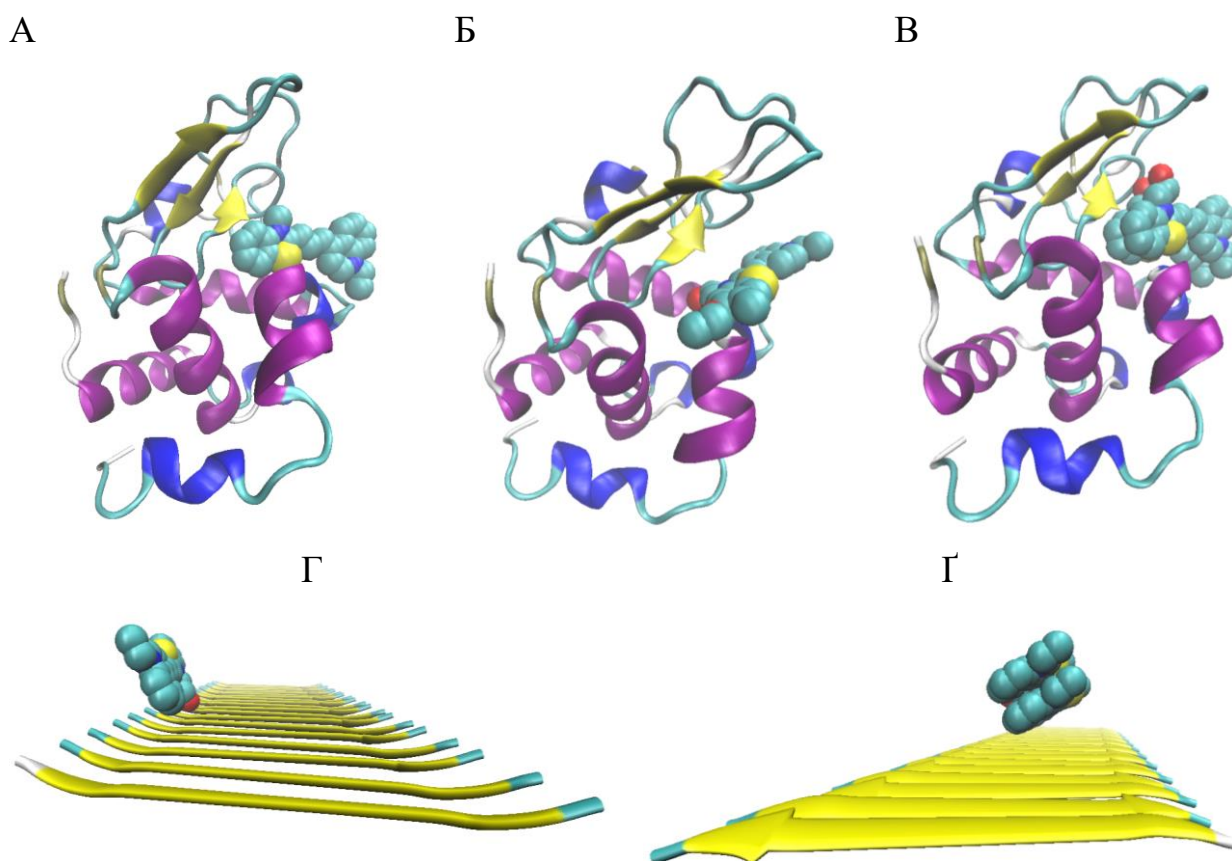


Рис. 3.21 Схематичне представлення найбільш енергетично вигідних комплексів барвників з нативним та фібрилярним лізоцимом, отриманих за допомогою серверів PatchDock та FireDock. На панелях А–В наведені мономери АК3-1 та АК3-8, а також димер АК3-7, зв'язані з активним сайтом нативного лізоциму, відповідно. На панелях Г та Г представлено зв'язування мономерів та димерів АК3-7 з фібрилярним лізоцимом

мономерів барвників з крос-листовими сходинками фібрил (специфічне розташування бічних ланцюгів у β -листі), які утворені залишком L17 (чотирьох β -листів) ланцюга Б та розташовані в інтерфейсі сухої стеричної блискавки, що є неспецифічними білковими сайтами зв'язування. Примітно, що інтерфейс сухої стеричної блискавки є стерично менш доступним для барвників, ніж полярна поверхня фібрили [214]. Тому не дивно, що димери барвників утворюють стійкі комплекси з N-кінцями β -ланцюгів LVEALYL (але не з жолобками утвореними бічними ланцюгами амінокислот), що розташовані на полярній грані фібрил.

Молекулярний докінг триметинових зондів з К-пептидом, що складається із жолобків G54-L56, L56-I58, I58-S60, S60-W62 на більш

гідрофобній поверхні, що, вочевидь, утворює інтерфейс сухої стеричної блискавки в зрілій фібрилі, та жолобків I55-Q57, Q57-N59, N59-R61 на доступній для розчинника поверхні, виявив, що мономери барвників та димери всіх барвників зв'язуються з п'ятьма β -тяжами у жолобку Gln57-Asn59 на вологій поверхні фібрили, однак в результаті неповного занурення у жолобок спостерігається також контакт з позитивним залишком Arg61. Димери зондів, особливо АК3-8 та АК3-11, з огляду на їх більший об'єм, зв'язуються з більшою кількістю β -тяжів (6-7), порівняно з мономерами. У той же час, мономери АК3-1, АК3-7 та АК3-8 повністю занурюються у жолобок Gly54-Leu56/Ser60-Trp62 на гідрофобній поверхні фібрили, що можливо пояснюється їх меншими геометричними розмірами та наявністю ОН-груп аліфатичних замісників на атомі нітрогену для зондів АК3-7 та АК3-8.

Висновки до розділу 3

1. У даному розділі було охарактеризовано зв'язування гептаметинових (АК7-5 та АК7-6) та триметинових (АК3-1, АК3-3, АК3-5, АК3-7, АК3-8, АК3-11) ціанінових зондів з амілоїдними фібрилами лізоциму та інсуліну, беручи до уваги здатність барвників до самоагрегації у водній фазі. Було продемонстровано, що всі досліджувані барвники здатні розрізняти неагрегований та фібрилярний білок.
2. Було виявлено, що нативний лізоцим сприяє руйнуванню Н-агрегатів гептаметинових барвників у розчині та утворенню модифікованих, здатних до флуоресценції асоціатів на поверхні білка, в той час як триметинові барвники, як правило, агрегували у присутності нефібрилізованих білків, утворюючи нефлуоресцентні Н-агрегати.
3. Зв'язування гептаметинових барвників з фібрилярним лізоцимом супроводжувалось зростанням поглинання мономерної смуги та зменшенням смуги Н-агрегатів, кількість флуоресцентних Н-агрегатів уприсутності фібрил лізоциму теж зменшувалась, у порівнянні з

контрольним білком. В той же час, фібрилярний інсулін та лізоцим призводив до суттєвого збільшення флуоресценції триметинів порівняно з контрольним білком та буферним розчином, окрім АК3-8, що демонстрував вищу специфічність до контрольного лізоциму.

4. Було запропоновано адекватну модель агрегаційної поведінки гептаметинів, яка передбачає зміщення рівноваги між різними формами барвників за рахунок зв'язування мономерів та димерів АК7-5 та АК7-6 з амілоїдними фібрилами. Для триметинових зондів було виявлено, що наявність ОН-груп аліфатичних замісників на атомі нітрогену в бензотіазоловій частині хромофору (АК3-7, АК3-8) суттєво зменшує амілоїдну чутливість триметинових ціанінових барвників, в той час як барвник АК3-11 має найвищу чутливість до амілоїдів завдяки перетворенню нефлуоресцентних агрегатів у водному розчині та контрольному білку, у високофлуоресцентні мономерні форми в присутності амілоїдних фібрил інсуліну та лізоциму.
5. Завдяки здатності розрізняти нефібрилізований та фібрилярний стани білків, нові ціанінові барвники можна рекомендувати як доповнення до існуючих амілоїдних маркерів.

Основні результати цього розділу викладені в роботах: [1]; [5]; [6]; [8]; [9]; [10]; [11]; [12]; [13]; [14]; [16]; [17]; [19]; [24].

РОЗДІЛ 4

БЕНЗАНТРОНОВІ БАРВНИКИ ТА ДМХ ЯК МЕДІАТОРИ В БАГАТОЕТАПНОМУ ПЕРЕНОСІ ЕНЕРГІЇ В АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛАХ ІНСУЛІНУ

Протягом останніх десятиліть явище Фьорстерівського резонансного переносу енергії (ФРПЕ) стало надзвичайно корисним інструментом для отримання інформації про структуру та динаміку біологічних макромолекул та їх ансамблів [423–425]. Завдяки сильній залежності ефективності переносу енергії від відстані між донором та акцептором, метод ФРПЕ особливо корисний для визначення внутрішньо- та міжмолекулярних відстаней за нанометровою шкалою [426, 427]. Ефективність ФРПЕ залежить від відстані між хромофорами, що використовуються в якості донора та акцептора енергії, дипольних моментів переходу донора та акцептора, а також квантового виходу донора [346, 428]. Численні дослідження показують, що максимальної ефективності ФРПЕ можна досягти скоріше за допомогою декількох шляхів переносу енергії, що взаємодіють між собою, тобто відбувається перенос енергії з основного донору через проміжні донори/акцептори до кінцевого акцептору, ніж за допомогою незалежних каналів [429, 430]. З огляду на це, каскадний або багатоетапний ФРПЕ, що являє собою перенос енергії в межах системи багатьох хромофорів по каскадному шляху, останнім часом привертає все більшу увагу [431, 432]. Наприклад, даний метод застосовувався для мічення білків [433], одночасного виявлення ферментів у багатокомпонентних біологічних зразках [432], генотипування однонуклеотидного поліморфізму [434], секвенування ДНК [435], оцінки стехіометрії білкових комплексів [436], визначення фактору некрозу пухлин [437], аналізу взаємодій між білками в живих клітинах [438], скринінгу численних інгібіторів ферментів [430], розробки систем збору світла та молекулярних фотонних дротів [429, 430, 439, 440].

Нещодавно було виявлено, що багатоетапний ФРПЕ можна успішно застосовувати для детектування амілоїдних фібрил [345]. Більш конкретно, було продемонстровано, що чутливість до амілоїдних фібрил класичного амілоїдного маркера, Тіофлавіну Т, може бути посилена при використанні його як основного донора в двоетапному процесі переносу енергії. На сьогоднішній день потенціал багатоетапного ФРПЕ при виченні амілоїдних фібрил залишається недостатньо дослідженим. З огляду на це, метою даного розділу було оцінити амілоїдну чутливість трьохетапного Фьорстерівського резонансного переносу енергії за допомогою системи з чотирьох хромофорів, що складалась із бензотіазольного барвника Тіофлавіну Т, певного медіаторного зонду та двох сквараїнових барвників SQ4 та SQ1 (Рис. 4.1).



Рис. 4.1 Система чотирьох хромофорів, сконструйована для Фьорстерівського резонансного переносу енергії на амілоїдних фібрилах. А – трьохетапний ФРПЕ (енергія переноситься з ThT на SQ1 через медіатор (M) та SQ4). Б – всі можливі шляхи переносу енергії, де прямі стрілки відповідають каскадному переносу енергії, а вигнуті стрілки вказують на інші можливі шляхи ФРПЕ

4.1 Класичний зонд ДМХ як медіатор в каскадному переносі енергії

У даному підрозділі розглядається система з чотирьох хромофорів, що включала в себе класичний амілоїдний маркер ThT (основний донор), 4-диметиламінохалкон (ДМХ) та два сквараїнових барвника, SQ4 і SQ1 (кінцевий акцептор), з метою оцінити можливість використання трьохетапного Фьорстерівського резонансного переносу енергії (ФРПЕ) для детектування амілоїдних фібрил інсуліну.

На першому етапі дослідження було розглянуто питання про те, як флуоресценція кінцевого акцептора (SQ1) сенсibiliзується іншими донорами/акцепторами ланцюга переносу енергії. З цією метою були виміряні спектри флуоресценції сумішей білка з SQ1 при довжині хвилі

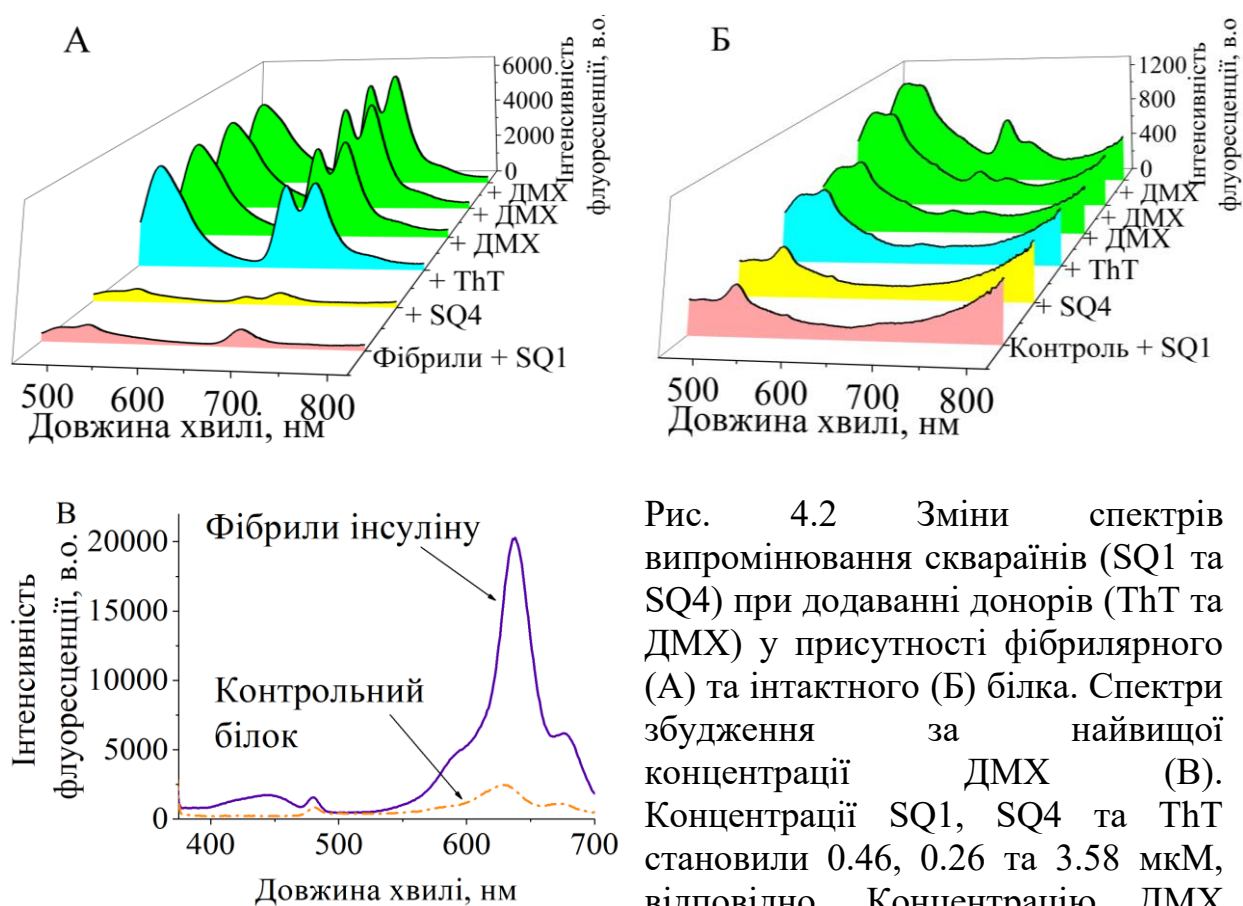


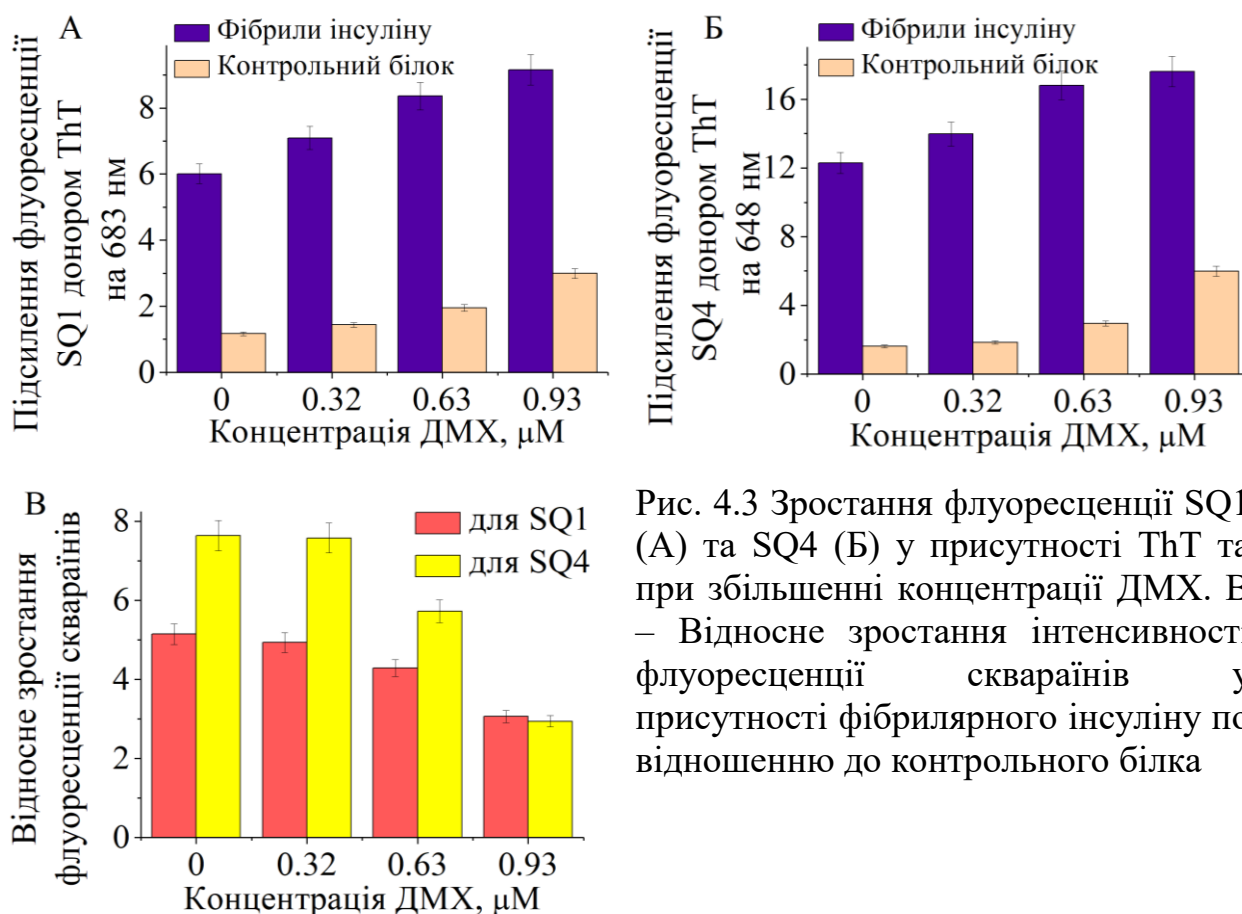
Рис. 4.2 Зміни спектрів випромінювання сквараїнів (SQ1 та SQ4) при додаванні донорів (ThT та DMX) у присутності фібрилярного (А) та інтактного (Б) білка. Спектри збудження за найвищої концентрації DMX (Б). Концентрації SQ1, SQ4 та ThT становили 0.46, 0.26 та 3.58 мкМ, відповідно. Концентрацію DMX збільшували з 0.32 до 0.93 мкМ

збудження 440 нм (Рис. 4.2), яку було обрано на основі спектральних характеристик основного донора, ThT. Інтенсивність флуоресценції SQ1 в максимумі випромінювання (680 нм) не перевищувала 1000 в.о. в присутності фібрилярного інсуліну. Додавання в цю систему SQ4 призвело до деякого зменшення флуоресценції SQ1, а також до появи смуги флуоресценції SQ4. Це означає, що очікуване посилення флуоресценції акцептора на цій стадії не відбувається, імовірно, через відносно низький сигнал флуоресценції SQ4 за даних експериментальних умов. У той же час, у

присутності контрольного білка флуоресценція SQ1 та SQ4 не спостерігалась. Однак подальше додавання ThT призвело до вираженого зростання флуоресценції у фібрилярному інсуліні, вказуючи на перенос енергії з ThT на сквараїни. Варто зазначити, що є два можливих шляхи, якими може проходити такий перенос енергії, паралельний шлях ($\text{ThT} \rightarrow \text{SQ4}$ і $\text{ThT} \rightarrow \text{SQ1}$) і послідовний ($\text{ThT} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$). Коли ланцюг ФРПЕ доповнювався ДМХ, що слугує мостом між ThT і SQ4, спостерігалось подальше посилення флуоресценції сквараїнів, яка зростала із підвищенням концентрації ДМХ (Рис. 4.2А). Цікаво зазначити, що сквараїнові піки, викликані присутністю ДМХ, спостерігались також у випадку нефібрилизованого білка з більш вираженим сигналом SQ4, в той час як флуоресценція SQ4 і SQ1 за відсутності медіатора була нехтовно мала (Рис. 4.2Б). Спектри збудження, виміряні на довжині хвилі випромінювання 720 нм за найвищої концентрації ДМХ, також вказують на помітну різницю між процесами, що відбуваються у присутності фібрилярного та неагрегованого білка (Рис. 4.2В). Піки сквараїнів чітко розрізняються в даних спектрах, де, у присутності фібрилярного інсуліну, пік на 637 нм відповідає барвнику SQ4, а смуга з максимумом на 676 нм – SQ1, тоді як для контрольованого нефібрилизованого білка спостерігались невеликі гіпсохромні зсуви приблизно на 8 і 3 нм для SQ4 та SQ1, відповідно, разом із значно нижчими інтенсивностями флуоресценції.

Щоб кількісно оцінити вищевказані ефекти, зростання інтенсивностей флуоресценції при збільшенні концентрації ДМХ було розраховано як відношення $I_i^{683} / I_{\text{SQ1}}^{683}$ для SQ1 та $I_i^{648} / I_{\text{SQ4}}^{648}$ для SQ4 (Рис. 4.3), де I_i^{683} та I_i^{648} – інтенсивності флуоресценції в i -й точці титрування зразка барвником ДМХ; I_{SQ1}^{683} та I_{SQ4}^{648} – початкові інтенсивності флуоресценції сквараїнів. Як можна бачити з Рис. 4.3, додавання основного донора (ThT) призводить до зростання флуоресценції SQ1/SQ4 у 6/12 разів у присутності фібрилярного інсуліну та у 1.2/1.6 рази у присутності контрольованого білка, відповідно.

Медіатор (ДМХ) викликає подальше посилення флуоресценції сквараїнів як у випадку фібрилярного, так і нефібрилізованого контрольного білка, по відношенню до флуоресценції в системах без медіатору.



Відношення посилення сигналу у присутності фібрилярного білка до посилення сигналу в контролі показало деяке зменшення зі зростанням концентрації ДМХ (Рис. 4.3В). Однак при всіх концентраціях медіатора посилення флуоресценції барвника як для SQ1, так і для SQ4, було більш ніж у 3 рази сильнішим у присутності фібрилярного інсуліну, ніж в контрольному білку.

На наступному етапі дослідження суміші білка з ThT послідовно титрували ДМХ, SQ4 та SQ1. Флуоресценція донора поступово зменшувалась із збільшенням концентрації акцептора для кожного етапу ФРПЕ у присутності як фібрилярного, так і контрольного білка, за винятком

пари ThT→ДМХ в контрольному білку, де флуоресценція донора та акцептора зростає одночасно внаслідок суперпозиції спектрів випромінювання ДМХ та ThT (дані не показані). Ефективності переносу енергії для трьох донорно-акцепторних пар були розраховані з гасіння флуоресценції донора. Як проілюстровано на Рис. 4.4, ефективність ФРПЕ у

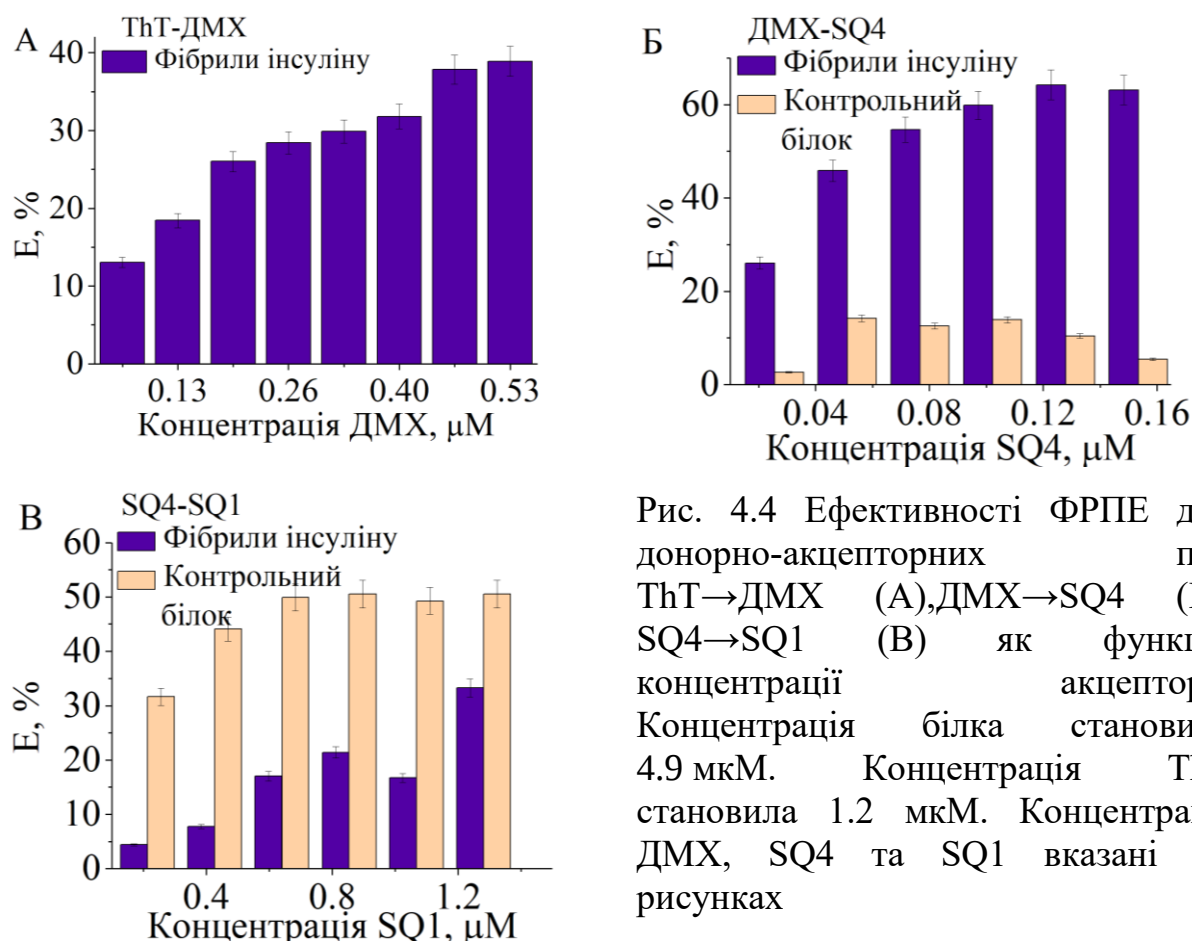


Рис. 4.4 Ефективності ФРПЕ для донорно-акцепторних пар ThT→ДМХ (А), ДМХ→SQ4 (Б), SQ4→SQ1 (В) як функція концентрації акцептора. Концентрація білка становила 4.9 мкМ. Концентрація ThT становила 1.2 мкМ. Концентрації ДМХ, SQ4 та SQ1 вказані на рисунках

присутності фібрилярного інсуліну зростала зі збільшенням концентрації акцепторів у 3, 2.4 та 7.5 разів для пар ThT→ДМХ, ДМХ→SQ4 та SQ4→SQ1, відповідно. Найбільші значення ефективності ФРПЕ спостерігались для пари ДМХ→SQ4 ($E > 60\%$). Варто зазначити, що ефективність переносу енергії у присутності фібрилярного інсуліну була в ~ 12 разів більшою та $\sim$ в 1.5 рази нижчою, ніж ефективність у випадку контрольного білка для пар ДМХ→SQ4 та SQ4→SQ1, відповідно. Більш виражений процес ФРПЕ, який спостерігався в контрольному білку для пари SQ4→SQ1, порівняно з

фібрилами, не мав критичного впливу на результуючу ефективність переносу, оскільки на першому етапі каскадного ФРПЕ, енергія не передавалась у нативному білку, а на другому кроці ефективність була нижчою, ніж у фібрилах.

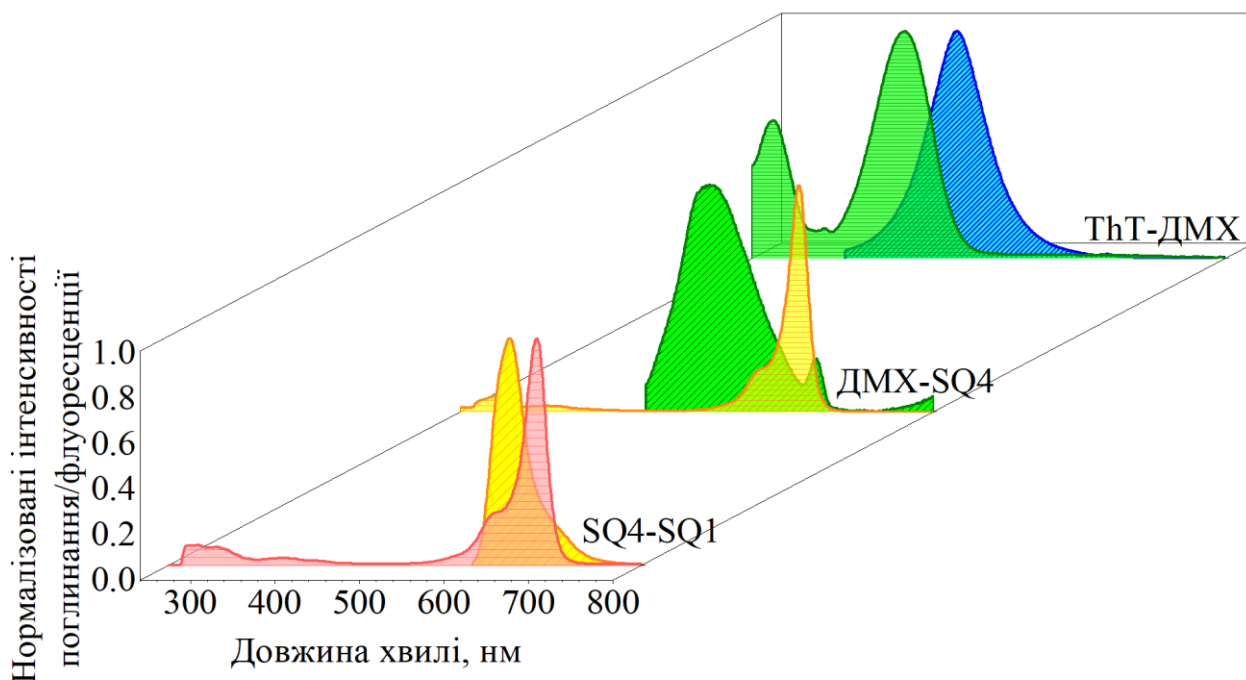


Рис. 4.5 Перекривання нормованих спектрів випромінювання донора (косі лінії) та поглинання акцептора (горизонтальні лінії) донорно-акцепторних пар ThT→DMX ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{флуор}} = 483 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}} = 421 \text{ нм}$), DMX→SQ4 ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{флуор}} = 535 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}} = 641 \text{ нм}$) та SQ4→SQ1 ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{флуор}} = 644 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}} = 676 \text{ нм}$)

Як видно з рівнянь (2.5) та (2.8), ефективність переносу енергії залежить від відстані між донором та акцептором, а також від радіусу Фьорстера, який, у свою чергу, визначається перекриванням спектрів випромінювання донора та поглинання акцептора, квантовим виходом донора, коефіцієнтом екстинкції акцептора, показником заломлення середовища та орієнтаційним фактором. Для донорно-акцепторних пар ThT→DMX, DMX→SQ4 та SQ4→SQ1 інтеграли перекривання, радіуси Фьорстера та відстані між донорами та акцепторами були розраховані при ізотропному значенні орієнтаційного фактора ($\kappa^2 = 2/3$). Квантові виходи донорів були визначені за формулою (2.6) та становили 0.02, 0.18 та 0.014 для ThT, DMX та SQ4,

відповідно. Слід відзначити, що зв'язування ThT з фібрилярним інсуліном призвело до збільшення квантового виходу барвника більш ніж на два порядки, порівняно із квантовим виходом Тіофлавіну Т в буфері ($Q_{ThT} = 10^{-4}$) [191].

Таблиця 4.1

Параметри ФРПЕ, отримані у припущенні ізотропного обертання флуорофорів

Донорно- акцепторна пара	$J, M^{-1}cm^{-1}nm^4$	R_0, nm	r, nm
ThT→ДМХ	$3.73 \cdot 10^{14}$	2.3	2.4
ДМХ→SQ4	$5.32 \cdot 10^{15}$	5.0	4.5
SQ4→SQ1	$1.52 \cdot 10^{16}$	3.9	4.3

Нормовані спектри флуоресценції та поглинання для трьох донорно-акцепторних пар представлені на Рис. 4.5, тоді як інтеграли перекривання (J), розраховані за допомогою чисельного інтегрування, представлені в Табл. 4.1. Найбільше значення J спостерігалось для донорно-акцепторної пари SQ1→SQ4 внаслідок невеликого зсуву ($\sim 32 nm$) між максимумами випромінювання SQ4 та поглинання SQ1, а також високого коефіцієнту екстинкції SQ1.

Радіус Фьорстера (R_0), характеристика кожної окремої донорно-кцепторної пари, розраховувався з рівняння (2.5). Найвище значення R_0 було отримано для пари ДМХ→SQ4 (Табл. 4.1.) внаслідок найвищих значень відносного квантового виходу ДМХ (0.18) та коефіцієнту екстинкції SQ4 ($\varepsilon_{641}^{DMCO} = 4.21 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$). Відстань між донором та акцептором (r) оцінювалась на основі класичного виразу залежності ефективності ФРПЕ від відстані (рівняння (2.8)), використовуючи значення E при максимальній концентрації акцептора.

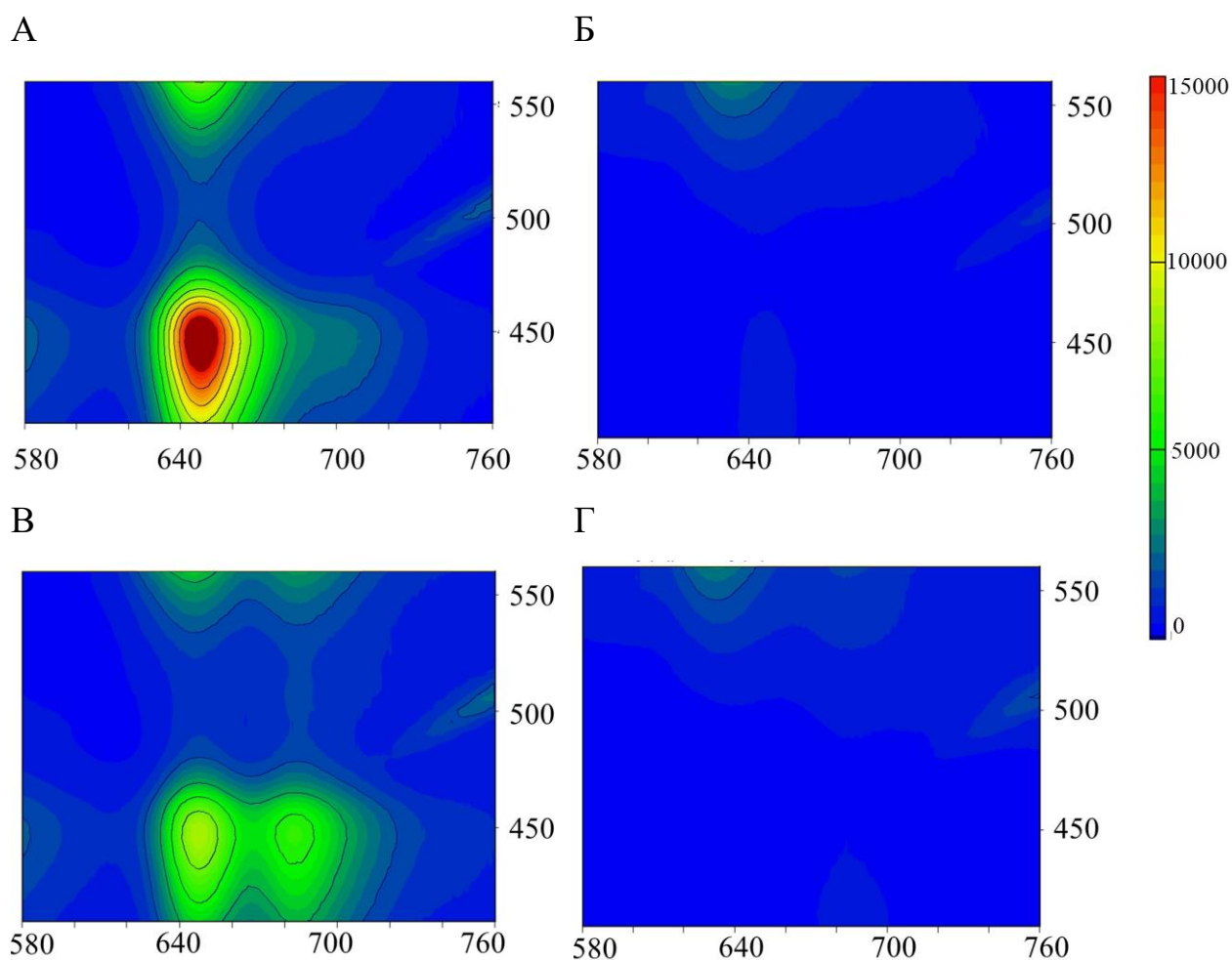


Рис. 4.6 3D спектри флуоресценції, записані в присутності ДМХ (0.53 мкМ) та SQ4 (0.16 мкМ) у сумішах ThT з фібрилярним (А) та контрольним (Б) білком, з подальшим додаванням SQ1 (1.4 мкМ) до фібрилярного (В) та контрольного (Г) інсуліну. Довжини хвиль випромінювання та збудження варіювали в межах 580–760 нм та 410–560 нм, відповідно. Ширина щілин збудження та випромінювання становила 10 нм. Концентрація білка та ThT становила 4.9 та 1.2 мкМ відповідно

Відмінності між фібрилярним та контрольним білком були найбільш виражені у 3D спектрах флуоресценції. Як показано на Рис. 4.6А, у системі, що складалась із зв'язаних з фібрилами барвників ThT, ДМХ та SQ4, найбільш високі значення інтенсивності флуоресценції спостерігались в районі $\lambda_{\text{еміс}} \sim 650 \text{ нм}$, що відповідає флуоресценції SQ4; пляма, розташована над довжиною хвилі збудження 550 нм, пов'язана із прямим збудженням SQ4, тоді як нижня пляма з центром при $\lambda_{\text{збудж}} \sim 440 \text{ нм}$ виникає внаслідок переносу енергії ThT→ДМХ→SQ4. Край від плями флуоресценції ThT

спостерігається на $\lambda_{\text{збудж}} \sim 440 \text{ нм}$ та $\lambda_{\text{еміс}} \sim 580 \text{ нм}$. Додавання SQ1 у вищезазначену потрійну систему призвело до появи нової плями з центром на $\lambda_{\text{еміс}} \sim 685 \text{ нм}$ та $\lambda_{\text{збудж}} \sim 440 \text{ нм}$, а також до зменшення сигналу SQ4 (Рис. 4.6В), вказуючи на те, що відбувається перенос енергії від ThT до SQ1 через SQ4. Як можна бачити з Рис. 4.6Б та Г, інтенсивність аналогічних плям істотно нижча в контрольному білку, порівняно із фібрилярним інсуліном. При $\lambda_{\text{збудж}} \sim 440 \text{ нм}$ спостерігались ледь помітні плями з центром на максимумах випромінювання SQ4 (Рис. 4.6Б) та SQ1 (Рис. 4.6Г), в той час як плями на $\lambda_{\text{збудж}} > 550 \text{ нм}$, пов'язані з прямим збудженням флуорофорів, демонстрували більш високі значення інтенсивності випромінювання.

Для того, щоб отримати додаткову структурну інформацію щодо комплексів барвників з фібрилярним білком, було проведено дослідження методом молекулярного докінгу. Як можна бачити з Рис. 4.7А, барвники ThT, DMC та SQ4, як правило, зв'язуються з 4–5 залишками L17 крос-листових сходинок фібрил, що розташовані в інтерфейсі сухої стеричної блискавки, що свідчить про переважну роль гідрофобних та ван-дер-ваальсових взаємодій між барвником та білком. Подібний сайт зв'язування був раніше запропонований для ThT [320]. У свою чергу, громіздкі замісники скварайнового барвника SQ1, здається, перешкоджають його зв'язуванню з сухою поверхнею амілоїдної фібрили, тому SQ1, найбільш гідрофобний зонд серед досліджуваних барвників (оскільки для нього спостерігається найвище значення LogP , Табл. 4.2.), зв'язується із жолобком Gln15 – Glu17 ланцюга А на вологій поверхні фібрили. У цьому випадку гідрофобні, ароматичні та електростатичні сили можуть стабілізувати комплекс барвник-білок. Цікаво, що відстань між зв'язаними з амілоїдною фібрилою барвниками SQ4 та SQ1 становила близько 3 нм, наближаючись до значення $\sim 3.9 \text{ нм}$, отриманого за ефективністю ФРПЕ (Табл. 4.1).

Однак, точна ідентифікація сайтів зв'язування амілоїдних фібрил є ускладненою, оскільки алгоритми жорсткого докінгу, що були застосовані,

базуються на принципах комплементарності форми (PatchDock) і проводиться лише оптимізація бічного ланцюга білка (FireDock). У свою чергу, структура ліганду залишається фіксованою під час моделювання, що може призвести до появи помилкових сайтів зв'язування білка, якщо оптимізована геометрія барвника, яка використовується для розрахунків, відрізняється від реальної геометрії. Таким чином, розбіжності між відстанями ThT→ДМХ та ДМХ→SQ4, отриманими експериментально (Табл. 4.1.) та за допомогою молекулярного докінгу (Рис. 4.7), можна пояснити недоліками алгоритмів молекулярного докінгу.

Таблиця 4.2

Квантово-хімічні характеристики барвників після оптимізації геометрії

	SQ1	SQ4	ДМХ	ThT
$CA, \text{\AA}^2$	611.0	438.0	304.0	318.0
$CV, \text{\AA}^3$	767.0	519.0	320.0	350.0
E_{HOMO}, eV	-6.9	-6.8	-8.3	-11.0
E_{LUMO}, eV	-2.0	-1.9	-0.7	-4.4
$L, \text{\AA}$	21.1	18.5	14.4	14.3
$W, \text{\AA}$	10.7	6.4	5.7	5.7
$H, \text{\AA}$	8.1	4.5	3.4	3.7
μ_g, D	3.2	5.8	5.7	2.7
$M. wt., \text{g/M}$	608.8	424.5	251.3	188.6
$LogP$	9.8	1.6	3.8	-0.1

Для встановлення кореляції між результатами ФРПЕ та молекулярного докінгу слід припустити, що SQ4 та SQ1 зв'язуються з вологою поверхнею протофіламента інсуліну (оскільки мають подібну структуру), тоді як ДМХ і ThT локалізуються на сухій поверхні амілоїдної фібрили завдяки їх

невеликим розмірам та молекулярній масі (Табл. 4.2). Якщо SQ4 і SQ1 зв'язані з двома протилежними сторонами поверхні фібрили, міжмолекулярна відстань буде становити близько 3 нм. У свою чергу, якщо ThT та ДМХ зв'язуються з крос-листовими сходинками, утвореними залишком L17, наявними на першому та другому β -листі протофіламенту інсуліну, відстань між двома флуорофорами становитиме близько 2.5 нм (Табл. 4.1).

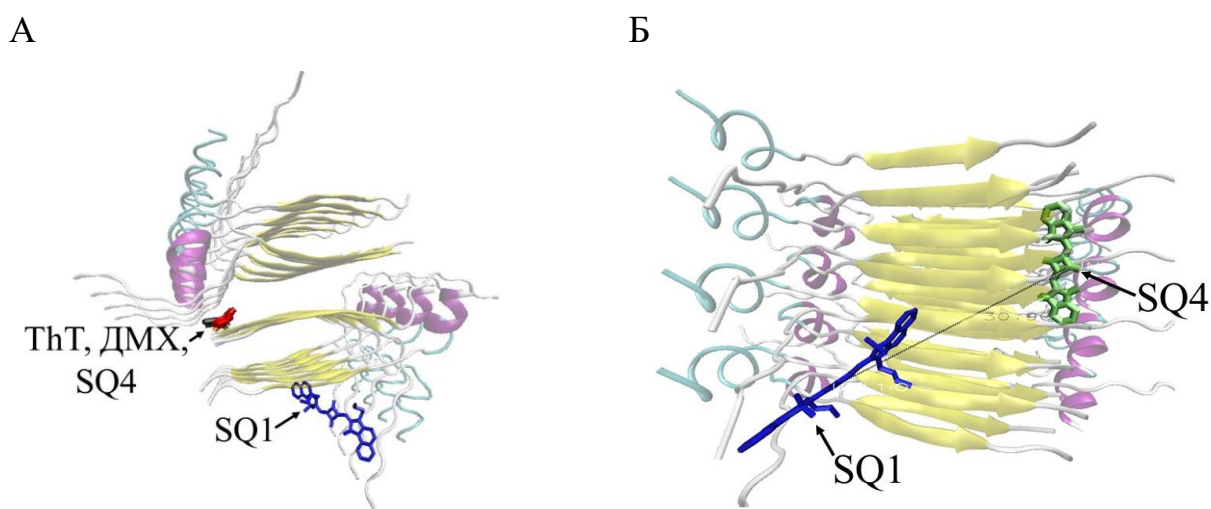


Рис. 4.7 Схематичне зображення найбільш енергетично вигідних комплексів барвників з фібрилярним інсуліном, отриманих за допомогою серверів PatchDock/FireDock та візуалізованих за допомогою програмного забезпечення VMD

4.2 Оцінка специфічності хромофорів кФРПЕ до морфології фібрил

На наступному етапі роботи було досліджено трьохетапний Фьорстерівський резонансний перенос енергії в системі з чотирьох хромофорів, в якій основним медіатором був бензантроновий барвник АВМ ($\text{ThT} \rightarrow \text{ABM} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$), у присутності амілоїдних фібрил інсуліну різної морфології (ІнсФ1 та ІнсФ2) та контрольного нефібрилізованого білка. Послідовне додавання хромофорів до фібрил типу ІнсФ1 та контрольного інсуліну, починаючи з кінцевого акцептора (SQ1) та закінчуючи основним

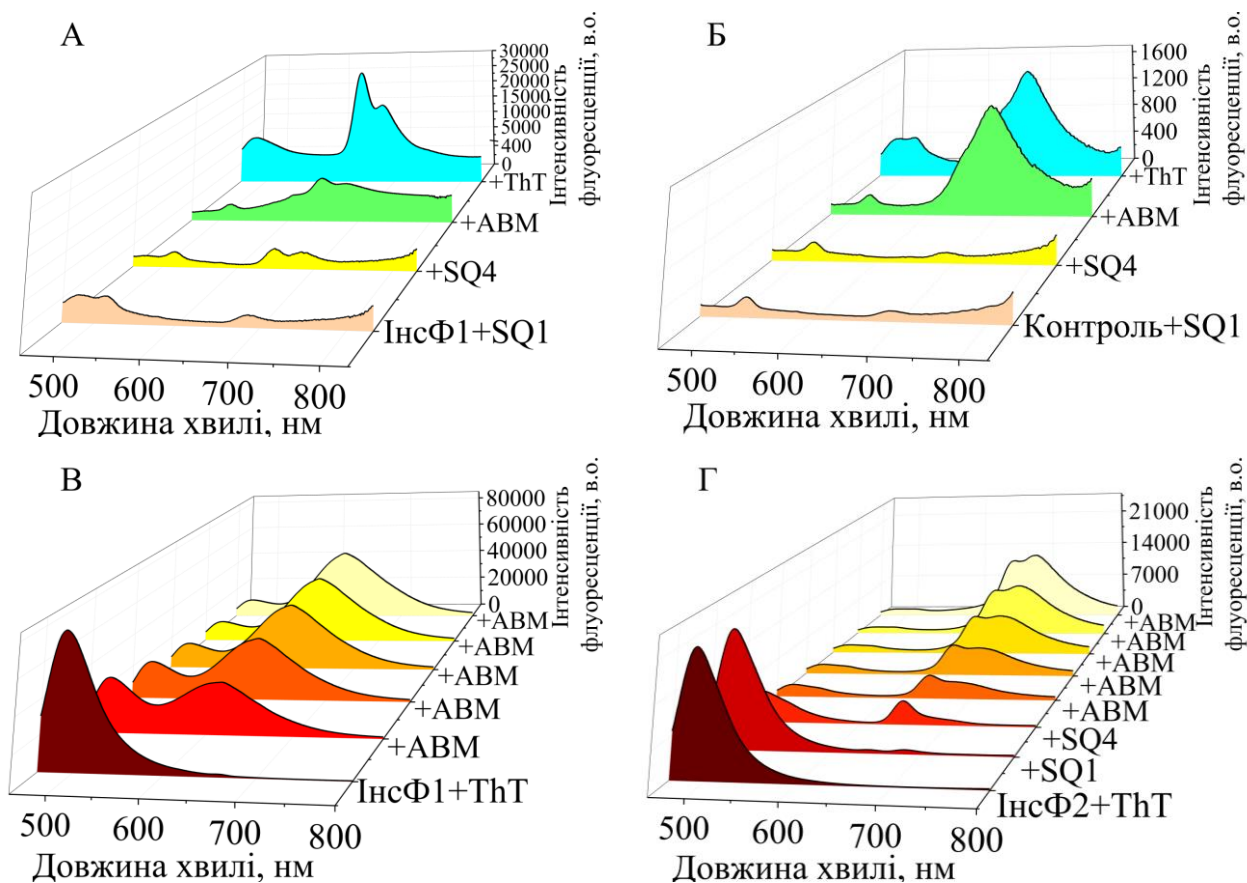


Рис. 4.8 Зміни у спектрах випромінювання сквараїнів (SQ1 та SQ4) при додаванні донорів (ThT та ABM) у присутності фібрилярного інсуліну ІнсФ1 (А) та контрольного білка (Б). Спектри флуоресценції зв'язаного з фібрилами ThT при титруванні основним медіатором ABM (В) або SQ1, SQ4 та ABM (Г). Концентрація білка та ThT становила 5.6 та 3.6 мкМ (А–Б), 1.8 та 0.16 мкМ (Г), відповідно. Концентрації SQ1 та SQ4 становили 0.46 та 0.25 мкМ, відповідно. Концентрація ABM становила 0.3 мкМ (А, Б) і варіювалась від 0.2 до 0.8 мкМ (В) та від 0.3 до 1.6 мкМ (Г). Зразки інкубували протягом 3–16 хвилин після додавання кожної аліквоти основних розчинів барвника до суміші ІнсФ2-ThT (Г)

донором (ThT), призвело до наступного зростання інтенсивності флуоресценції SQ1 на 680 нм: SQ1 + SQ4 (~ 2), + ABM (~ 20), + ThT (~ 100) для ІнсФ1 та SQ1 + SQ4 (~ 1.2), + ABM (~ 14), + ThT (~ 15) для контрольного білка (Рис.4.8А, Б). Варто зазначити, що збільшення інтенсивності флуоресценції кінцевого акцептора SQ1 (~ 100 для ІнсФ1) в даній системі з ABM було вищим, ніж у випадку 4-диметиламінохалкону (ДМХ) (Розділ 4.1, [4]), вказуючи на кращу здатність бензантронового зонду підсилювати флуоресценцію SQ1 в каскаді ФРПЕ, що відбувається в

амілоїдних фібрилах інсуліну. Як показано на Рис. 4.8В, титрування зв'язаного з фібрилами ThT барвником АВМ супроводжується зменшенням інтенсивності флуоресценції ThT на 480 нм, що дозволило розрахувати ефективності ФРПЕ. Далі зразок, що містив ІнсФ1, ThT та АВМ, титрували зондом SQ4, після чого проводили титрування барвником SQ1 (дані не наведені) та визначали ефективність ФРПЕ у парах АВМ→SQ4 та SQ4→SQ1. Подібний підхід застосовувався для визначення ефективності багатоетапного ФРПЕ для донорно-ацепторних пар, зв'язаних з ІнсФ2.

Цікаво, що додавання до системи ІнсФ2 – ThT барвників у порядку: SQ1, SQ4, АВМ (0.3 мкМ) та АВМ (1.6 мкМ), призвело до збільшення флуоресценції SQ1 на 680 нм у ~ 4 , ~ 8 , ~ 18 , ~ 75 разів, відповідно (Рис. 4.8Г). Ці дані вказують на те, що АВМ діє як медіатор між ThT і SQ4, оскільки інтенсивності флуоресценції сквараїнів зростають зі збільшенням концентрації АВМ (Рис. 4.8Г). Слід відмітити, що остаточне збільшення флуоресценції SQ1 на 680 нм становило приблизно 100 (18) разів для ІнсФ1 (ІнсФ2) при концентраціях SQ1, SQ4 та АВМ рівних 0.46, 0.25 та 0.3 мкМ, відповідно.

Відмінності, що спостерігаються між ІнсФ1 та ІнсФ2, свідчать про чутливість багатоетапного ФРПЕ до морфології амілоїдних фібрил (Рис. 4.8А та Г). Квантові виходи донорів у присутності фібрилярного інсуліну (ІнсФ1) були розраховані за формулою (2.6) та становили 0.011, 0.1 та 0.039 для ThT, АВМ та SQ4, відповідно.

В Табл. 4.3. наведені ефективності ФРПЕ (E), визначені для донорно-акцепторних пар ThT→АВМ, АВМ→SQ4 та SQ4→SQ1 за максимальної концентрації акцепторів (ІнсФ1: 0.8 мкМ, 0.4 мкМ та 1.2 мкМ; ІнсФ2: 1.6, 0.3 та 0.4 мкМ для АВМ, SQ4 та SQ1, відповідно). Подібно до результатів попереднього дослідження з ДМХ (Розділ 4.1, [3]), ефективність переносу енергії для всіх донорно-акцепторних пар у каскаді була вищою за наявності фібрилярного інсуліну, порівняно з контрольним нефібрилізованим

білком, що свідчить про специфічність багатоетапного ФРПЕ до амілоїдного стану білка.

Таблиця 4.3

Ефективність ФРПЕ в системі, що містить ThT, ABM, SQ4, SQ1, фібрилярний (ІнсФ1/ІнсФ2) або контрольний інсулін за максимальної концентрації акцептора

Донорно-акцепторна пара	$E_{\text{ІнсФ1}}, \%$	$E_{\text{Контроль}}, \%$	$E_{\text{ІнсФ2}}, \%$
ThT→ABM	86	12	94
ABM→SQ4	48	25	34
SQ4→SQ1	66	4	32

Вочевидь, бензантроновий барвник ABM є ключовим медіатором у багатоетапному ФРПЕ, оскільки ефективність переносу енергії для пари ThT→ABM була найвищою (Табл. 4.3.). Також виявилось, що ABM є кращим медіатором, ніж ДМХ, тому що для пари ThT→ДМХ у присутності амілоїдних фібрил інсуліну спостерігали лише ~ 40 % ефективності ФРПЕ [3].

Варто зазначити, що ефективність ФРПЕ для каскадної пари SQ4→SQ1 була в 2 рази нижчою для ІнсФ2, порівняно з ІнсФ1 (Табл. 4.3.). Крім того, відразу після додавання SQ1 до системи ThT→ABM→SQ4 у фібрилах ІнсФ2 спостерігали лише 4 % ефективності ФРПЕ для цієї донорно-акцепторної пари, і вона досягла значення 32 % лише після 19 годин інкубації зразків при кімнатній температурі (Табл. 4.3), ймовірно, через стеричні обмеження зв'язування громіздкої молекули SQ1 з фібрилами ІнсФ2. Відмінності в ефективностях ФРПЕ у чотирихромофорній системі у присутності ІнсФ1 та ІнсФ2 можна пояснити варіаціями в морфології фібрил, що виникають внаслідок різних рН, концентрації та іонної сили [118]. Як можна бачити на Рис. 2.7А, в умовах кислого рН та за відсутності NaCl [148] утворювались

зрілі фібрили довжиною 1.0 ± 0.2 мкм та діаметром 30 ± 6 нм. Натомість, при інкубації інсуліну за фізіологічних значень рН (7.4) та іонній силі 150 мМ (Рис. 2.7Б) спостерігались більш короткі (0.9 ± 0.7 мкм), тонкі (24 ± 6 нм) та розмиті (невизначні) агрегати. Фібрили ІнсФ2 здаються незрілими, наприклад, зламаними фібрилами або протофіламентами, що призводить до різного вигляду структур ІнсФ1 та ІнсФ2 (Рис. 2.7) [441]. Таким чином, більш виражена втрата третинної структури інсуліну, спричинена кислим рН, забезпечує швидке та повне дозрівання фібрил (ІнсФ1, Рис. 2.7А.), тоді як при рН 7.4 утворюється деяка кількість аморфних агрегатів, імовірно, через екранування електростатичного відштовхування білкових молекул (ІнсФ2, дані не наведені). Останнє припущення добре узгоджується з результатами роботи [441], де було повідомлено авторами про загальні структурні властивості амілоїдних фібрил інсуліну, що утворюються при рН 1.6 та 0.1 М NaCl, а саме високий вміст β -листів та експоновані С- та N-кінцеві частини ланцюга Б. У свою чергу, агрегати, отримані при рН 7.4 та 0.14 М NaCl, характеризувались наявністю неупорядкованих структур та експонованою лише С-кінцевою частиною ланцюга Б. Оскільки як електростатичні, так і гідрофобні міжмолекулярні взаємодії регулюють утворення амілоїдних фібрил інсуліну, то при низькому значенні рН молекули інсуліну існують у вигляді мономерів, які можуть утворювати амілоїдні ядра.

У свою чергу, як рН 7.4, так і 0.15 М NaCl зменшують електростатичне відштовхування, забезпечуючи утворення аморфних агрегатів. Крім того, у цьому випадку, саме димер інсуліну, швидше за все, утворює амілоїдні ядра [118, 441]. Було показано [118], що додавання NaCl призвело до зменшення часу лаг-фази росту амілоїдних фібрил інсуліну при рН 1.6. При рН 7.4 та 0.1 М NaCl спостерігався у 15 разів більший час лаг-фази та у 12 разів повільніший темп росту фібрил інсуліну, порівняно з відповідними значеннями при рН 1.6 та 0.1 М NaCl [118]. Крім того, амілоїдні агрегати інсуліну не утворювались при рН 7.4 без перемішування, що свідчить про

більш повільний процес нуклеації, ніж при рН 1.6 (імовірно, через повільні структурні перетворення димеру інсуліну).

Слід також підкреслити, що афінність ThT до амілоїдних фібрил інсуліну, утворених при рН 1.6, була приблизно в 2–3 рази менша, ніж до білкових агрегатів, отриманих при рН 7.4, хоча стехіометрія зв'язування в обох випадках, як повідомляється, становила ~ 0.1 [442]. Цей факт міг спричинити приблизно 4-кратне збільшення флуоресценції ThT у присутності ІнсФ2, порівняно з інтенсивністю в ІнсФ1 (591 та 142 для ІнсФ2 та ІнсФ1, відповідно), і, як наслідок, різну ефективність ФРПЕ (Табл. 4.3). Цікаво, що дуже висока ефективність ФРПЕ була зафіксована в ІнсФ2 для пари ThT→ABM, хоча її значення для пари SQ4→SQ1 було близьким до значення в контрольному нефібрилізованому інсуліні, що свідчить про низьку спорідненість SQ1 до фібрил інсуліну, утворених при рН 7.4. Виявлений ефект можна пояснити низькою доступністю сайтів зв'язування для барвника SQ1, молекула якого є найдовшою серед чотирьох досліджуваних хромофорів (довжина SQ1 становить ~ 2.1 нм [3]). Таким чином, два типи фібрилярного інсуліну, ІнсФ1 та ІнсФ2, можна чітко розрізнити за допомогою багатоетапного ФРПЕ в межах даного чотирьоххромофорного каскаду, зокрема, шляхом оцінки ефективності ФРПЕ для донорно-акцепторної пари SQ4→SQ1. Варто зазначити, що для ThT спостерігалось два типи сайтів зв'язування у фібрилах інсуліну, утворених при рН 7.4 [442], що, ймовірно, може пояснити трохи більшу ефективність переносу енергії для пари ThT→ABM в ІнсФ2, порівняно зі значенням в ІнсФ1 (Табл. 4.3). На основі вищесказаного, можна зробити висновок, що досліджувану систему з чотирьох хромофорів можна застосовувати не тільки для виявлення фібрилярного інсуліну, а й для розрізнення амілоїдних фібрил різних морфологій.

В Табл. 4.4 представлені значення інтегралу перекривання (J), отримані шляхом чисельного інтегрування, радіуси Фьорстера та відстані між донором та акцептором, розраховані з використанням значень ефективності ФРПЕ при

максимальній концентрації акцептора (0.8 мкМ, 0.4 мкМ та 1.2 мкМ для ABM, SQ4 та SQ1, відповідно).

Таблиця 4.4

Параметри ФРПЕ, отримані у припущенні ізотропного обертання флуорофорів у присутності ІнсФ1

Донорно-акцепторна пара	$J, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$	R_0, nm	r, nm
ThT→ABM	$2.12 \cdot 10^{14}$	1.8	1.3
ABM→SQ4	$1.27 \cdot 10^{16}$	5.2	5.3
SQ4→SQ1	$1.20 \cdot 10^{16}$	4.4	3.9

Для каскадних пар ABM→SQ4 та SQ4→SQ1 спостерігались найбільші значення інтегралу перекривання завдяки невеликим зсувам (~ 22 нм та ~ 14 нм, відповідно) між максимумами флуоресценції ABM (SQ4) та поглинання SQ4 (SQ1), а також високим коефіцієнтам екстинкції SQ4 (SQ1). Найбільше значення радіуса Фьорстера (Табл. 4.4) було отримано для пари ABM→SQ4 внаслідок найвищого значення коефіцієнта екстинкції SQ4. Отримані відстані вказують на різні сайти зв'язування хромофорів з фібрилярною структурою, хоча, найбільш імовірно, барвники, внаслідок своєї високої специфічності до фібрилярних агрегатів, локалізуються в поверхневих жолобках β -листів, що пролягають вздовж головної осі фібрили.

4.3 Каскадний перенос енергії в амілоїдних фібрилах інсуліну, допованих тіофлавіном Т, бензантроновими та скварайновими барвниками

В даному підрозділі були розглянуті системи з чотирьох хромофорів: ThT → бензантроновий барвник (ББ) → SQ4 → SQ1 з ціллю виявити найбільш ефективні медіатори серед серії бензантронів, що включали

3-метоксибензантрон (МВА) та його аміно- (АВМ, А6, А8) та амідіно- (АМ1, АМ2) похідні.

4.3.1 Спектральна поведінка досліджуваних хромофорів

Висока специфічність ThT до амілоїдних фібрил, а також його флуоресценція в синій області обумовила вибір даного барвника як основного донору. Максимум випромінювання ThT [290, 322] у зв'язаному з фібрилами стані спостерігався на 487 нм, при цьому інтенсивність флуоресценції збільшувалась в ~ 150 разів порівняно з інтенсивністю флуоресценції у буфері (концентрації фібрил та ThT становили 4.9 та 1.2 мкМ, відповідно). Досліджувані медіатори (АВМ, МВА, А6, А8, АМ1, АМ2) є поліароматичними гідрофобними сполуками з вираженими сольватохромними властивостями, планарною структурою та високою ліпофільністю [285, 286, 341]. Спектральні характеристики похідних бензантронів безпосередньо визначаються донорною силою їх замісників, що пов'язані з процесом внутрішньомолекулярного переносу заряду на електрон-акцепторну карбонільну групу [335]. Позитивний сольватохромізм досліджуваних барвників пояснюється утворенням міжмолекулярного водневого зв'язку між полярними молекулами розчинника (наприклад, гідроксильною групою етанолу) та карбонільною групою бензантронів. Перенос внутрішньомолекулярного заряду до електрон-акцепторної групи за час життя збудженого стану індукує подальше зміцнення міжмолекулярного водневого зв'язку, зменшуючи тим самим інтенсивність флуоресценції та збільшуючи батохромний зсув [443].

У Табл. 4.5. наведені параметри деконволюції спектрів досліджуваних бензантронів барвників у присутності фібрилярного та неагрегованого інсуліну: а) положення максимуму, б) повна ширина на половині максимуму смуги (ПШПМ), в) параметр асиметрії піку. Різні позиції максимумів, що спостерігаються у присутності неагрегованого та фібрилярного інсуліну,

Таблиця 4.5

Спектральні характеристики Тіофлавіну Т, бензантронових та сквараїнових барвників у присутності фібрилярного та контрольного інсуліну

Барвник		ν_c , cm^{-1}	ПШПМ, cm^{-1}	ρ , cm^{-1}	R^2
ThT	Ф*	20524 ± 3 (487)	2503	1.58	0.999
ABM	К**	14526 ± 11 (688)	2235	1.25	0.987
	Ф	15620 ± 4 (640)	3191	1.10	0.998
MBA	К	17266 ± 5 (579)	3025	1.30	0.995
	Ф	17298 ± 4 (578)	3025	1.42	0.993
A6	К	15861 ± 6 (630)	2899	1.07	0.997
	Ф	15674 ± 3 (638)	2579	1.09	0.999
A8	К	15121 ± 9 (661)	2825	0.96	0.992
	Ф	15606 ± 7 (641)	2980	0.87	0.997
AM1	К	14500 ± 14 (690)	2477	1.03	0.982
	Ф	15452 ± 4 (647)	3137	1.07	0.998
AM2/смуга I	К/Ф	14128 ± 33 (708)	1840	1.11	0.913
AM2/смуга II	К/Ф	18200 (549)	4600	1.56	
SQ4	Ф	15409 ± 10 (649)	596	0.96	0.971
SQ1	Ф	14611 ± 10 (684)	882	1.38	0.957

Ф* – спектральні характеристики барвника у присутності амілоїдних фібрил інсуліну, К** – у присутності контрольного білка.

вочевидь, відображають відмінності в полярності та рухливості молекулярних груп, що оточують бензантронові барвники в амілоїдних фібрилах та в частково розгорнутому контрольному інсуліні.

На відміну від інших досліджуваних бензантронів, AM2 демонстрував дві добре відокремлені смуги випромінювання (з максимумами на 725 та 564 нм, Табл. 4.5). Така спектральна поведінка може бути пов'язана з

унікальною властивістю молекул, що містять електрон-донорні та акцепторні групи, відомою як закручений збуджений стан внутрішньомолекулярного переносу заряду (TICT). TICT бензантронових зондів у збудженому стані характеризується закрученою внутрішньомолекулярною геометрією донорних та акцепторних фрагментів навколо одинарного зв'язку C-N, що призводить до додаткової «аномальної» смуги, зміщеної в червону область [444–446], та низького квантового виходу. Також відомо, що явище TICT посилюється із зростанням полярності розчинника [446–448]. Варто зазначити, що AM2 мав найнижчу інтенсивність флуоресценції, порівняно з іншими досліджуваними бензантронами. Подібним чином, жодних помітних відмінностей у спектральних відповідях AM2 на фібрилярний та неагрегований білок не спостерігалось, що призвело до однакових параметрів деконволюції спектрів (Табл. 4.5.).

SQ1 та SQ4 – це симетричні сквараїнові барвники з невеликими значеннями Стоксових зсувів та вузькими смугами випромінювання у присутності амілоїдних фібрил інсуліну (Табл. 4.5.). Внаслідок низької інтенсивності флуоресценції SQ1 у присутності контрольного білка (приблизно у 8 разів менше, ніж в амілоїдних фібрилах), для даного барвника було важко отримати точні параметри деконволюції. Згідно з попередніми дослідженнями [284], жодних зсувів максимуму випромінювання SQ1 не спостерігалось у ліпідій чи білковій фазах, тому у контрольному білку положення піків та ширина смуг SQ1 та SQ4 приймалися рівними значенням цих параметрів, отриманих у фібрилярному інсуліні.

4.3.2 *Характеристики донорно-акцепторних пар трьохетапного ФРПЕ*

Однією з обов'язкових вимог для протікання процесу ФРПЕ є суттєве перекривання спектрів випромінювання донора та поглинання акцептора, яке кількісно визначається інтегралом перекривання (J). Нормовані спектри флуоресценції та поглинання для донорно-акцепторних пар: ThT→ББ,

ББ→SQ4 та SQ4→SQ1 зображені на Рис. 4.9. Варто зазначити, що інтеграли перекривання для пар ББ→SQ4 мали на два порядки вищі значення, ніж для каскадних пар ThT→ББ (Табл. 4.6.). Спектри випромінювання SQ4 та поглинання SQ1 також суттєво перекриваються (Рис. 4.9, $J = 1.52 \cdot 10^{16} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$).

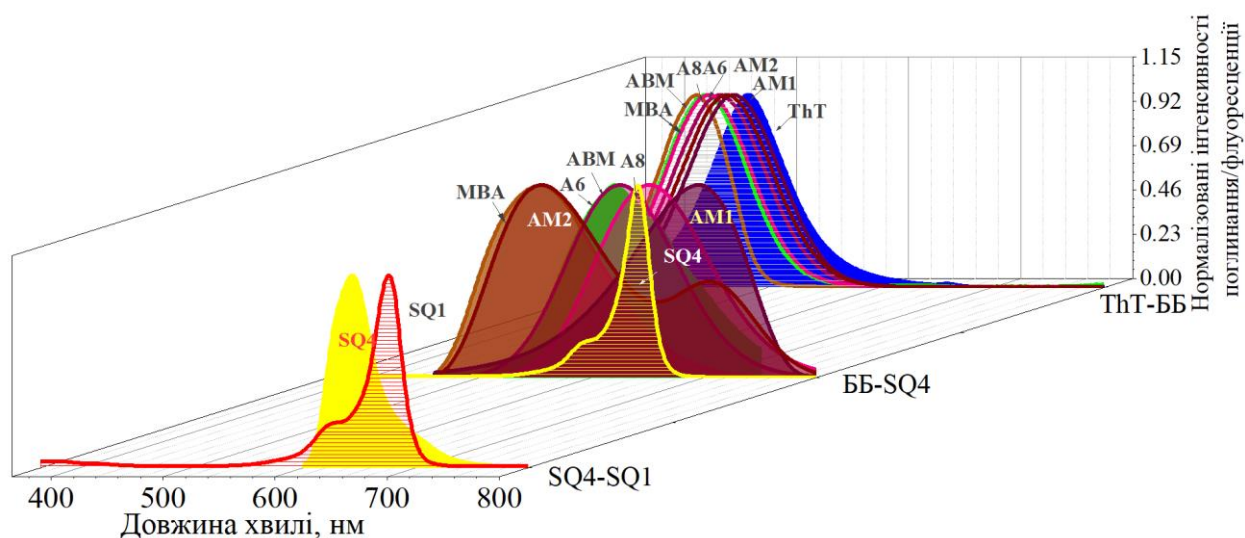


Рис. 4.9 Перекривання нормованих спектрів випромінювання донора (заповнена площа під спектрами) та поглинання акцептора (зона під кривими заповнена горизонтальними лініями) для донорно-акцепторних пар ThT→ББ, ББ→SQ4 та SQ4→SQ1

Також були визначені характеристики інших можливих шляхів ФРПЕ, що включають прямий перенос енергії від ThT до сквараїнів та від бензантронових барвників до SQ1 (вигнуті лінії на Рис. 4.1Б). Інтеграл перекривання для пари ThT→SQ4 становив $\sim 8.54 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$, що істотно нижче, ніж для пар ББ→SQ4 (мінімальне значення інтеграла перекривання $J = 7.8 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$ спостерігалось для AM2), але трохи вище ніж для пар ThT→ББ (Табл. 4.6.). Встановлено, що інтеграл перекривання ThT та барвника SQ1 дорівнює $2.8 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$. Незважаючи на те, що максимуми поглинання SQ4 та SQ1 відносно далекі від максимуму випромінювання ThT,

високі коефіцієнти екстинкції сквараїнів (приблизно $4.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ та $2.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для SQ4 та SQ1, відповідно) призводять до високих значень інтеграла перекривання. Паралельний шлях ФРПЕ ББ→SQ1 демонструє найнижче значення J порівняно з інтегралами перекривання для пар ББ→SQ4 і SQ4→SQ1 ($J = (0.3 \div 1.3) \cdot 10^{16} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$).

З огляду на вищезазначене, можна зробити висновок, що, теоретично, перешкоди для паралельних шляхів переносу енергії відсутні. Однак більші значення інтегралу перекривання для пар ThT→ББ, ББ→SQ4 і SQ4→SQ1, порівняно зі значеннями J для паралельних шляхів ФРПЕ (за винятком донорно-акцепторної пари ThT→SQ4), вказують на те, що для досліджуваних систем найбільш переважним є трьохетапний перенос енергії.

Таблиця 4.6

Квантові виходи та параметри ФРПЕ для донорно-акцепторних пар, що містять бензантронний зонд, у присутності фібрилярного інсуліну

	ThT→ББ			ББ→SQ4	
	Q_D	$J \cdot 10^{-14}, \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$	$R_0, \text{ nm}$	$J \cdot 10^{-16}, \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$	$R_0, \text{ nm}$
ABM	0.093	5.22	2.4	1.47	5.3
MBA	0.714	1.41	1.9	0.79	6.7
A6	0.097	3.19	2.2	1.87	5.5
A8	0.131	2.23	2.1	1.73	5.7
AM1	0.039	6.59	2.5	1.14	4.4
AM2	0.045	5.32	2.4	0.78	4.2

Іншим параметром, що характеризує конкретну донорно-акцепторну пару є радіус Фьорстера (рівняння (2.5)). У Табл. 4.6. наведені радіуси Фьорстера для пар ThT→ББ і ББ→SQ4, а також квантові виходи бензантронів у зв'язаному з фібрилами стані.

Квантовий вихід ThT становив $4.5 \cdot 10^{-4}$ та 0.022 у присутності неагрегованого та фібрилярного інсуліну, відповідно, та перевищував квантовий вихід вільного барвника ($\sim 10^{-4}$) більш ніж у 4 рази та на два порядки, відповідно. Квантовий вихід SQ4 становив 0.014. Для пар ThT→ББ радіуси Фьорстера, отримані у припущенні ізотропного обертання флуорофорів (орієнтаційний фактор був прийнятий рівним 0.67), знаходяться в діапазоні 1.9 – 2.5 нм (Табл. 4.6.). Значення R_0 для паралельних шляхів переносу енергії з основного донора були дуже близькими до цього діапазону (2.6 нм та 2.1 нм для пар ThT→SQ4 та ThT→SQ1, відповідно). Радіуси Фьорстера для пар ББ→SQ4 були в 1.8 – 3.5 рази вищими, ніж у випадку переносу енергії з ThT до похідних бензантрону внаслідок більших значень інтегралів перекривання (Табл. 4.6.). Даний параметр для пар ББ→SQ1 варіювався від 5.8 нм для MBA до 4.0 нм для AM2 та був нижчим, ніж для пар ББ→SQ4. Значення R_0 для пари SQ4→SQ1 дорівнювало 3.9 нм.

4.3.3 Ампліфікація флуоресценції акцептора шляхом послідовного додавання донорів

Для моніторингу зростання флуоресценції акцептора у присутності донора, хромофори послідовно додавали до розчинів фібрилярного і контрольного інсуліну, починаючи з кінцевого акцептора (SQ1) і закінчуючи основним донором (ThT) (Рис. 4.10).

Виявилось, що флуоресценція SQ1 залишається практично незмінною при додаванні SQ4 як в контролі так і в фібрилярному інсуліні (Рис. 4.11А). Це можна пояснити слабким випромінюванням SQ4 на довжині хвилі збудження 440 нм за відсутності ThT.

Як можна бачити на вставках (Рис. 4.10 та Рис. 4.11), величина випромінювання сенсibilізованого акцептора була набагато нижчою у контрольному нефібрилізованому білку, порівняно з флуоресценцією

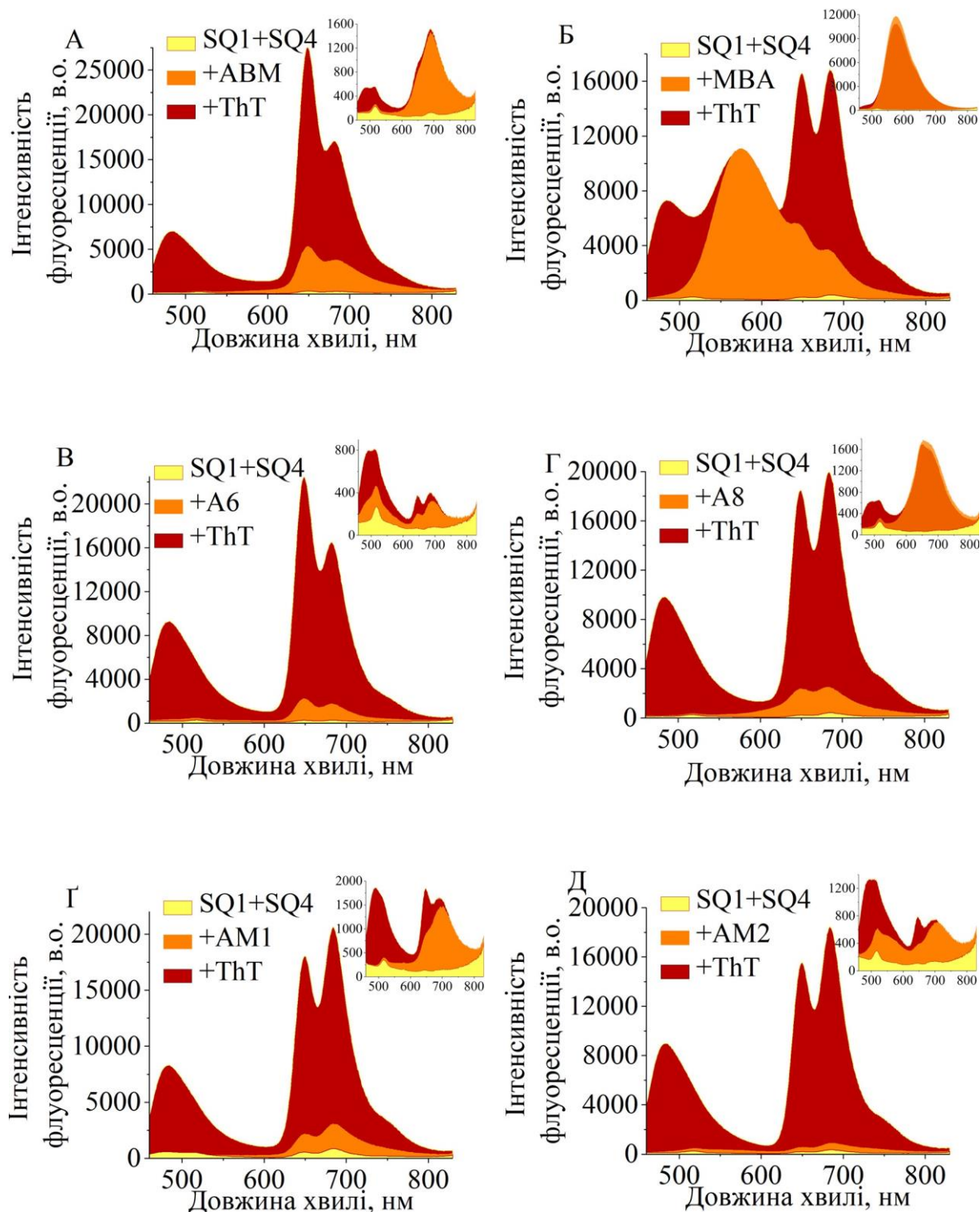


Рис. 4.10 Зміни в спектрах випромінювання сквараїнів при додаванні бензантронових барвників та Тіофлавіну Т у присутності фібрилярного та контрольного (на вставці) інсуліну. Концентрація білка становила 5.6 мкМ. Концентрації SQ1, SQ4, ББ та ThT становили 0.5, 0.3, 0.3 та 3.6 мкМ, відповідно

фібрилярного інсуліну. Для кількісної оцінки ампліфікації сигналу флуоресценції SQ1 були обраховані співвідношення I_{SQ}^0 / I_{SQ}^I , де I_{SQ}^0 – початкова інтенсивність флуоресценції SQ1 (отримана після розкладання спектрів SQ1 + SQ4), I_{SQ}^I – інтенсивність флуоресценції SQ1, що спостерігається після додавання донора (Рис. 4.12).

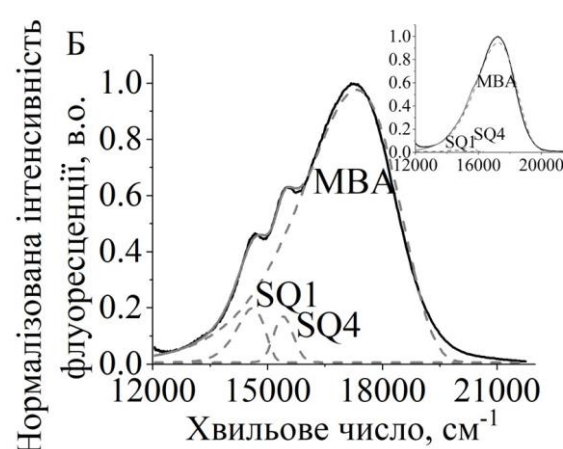
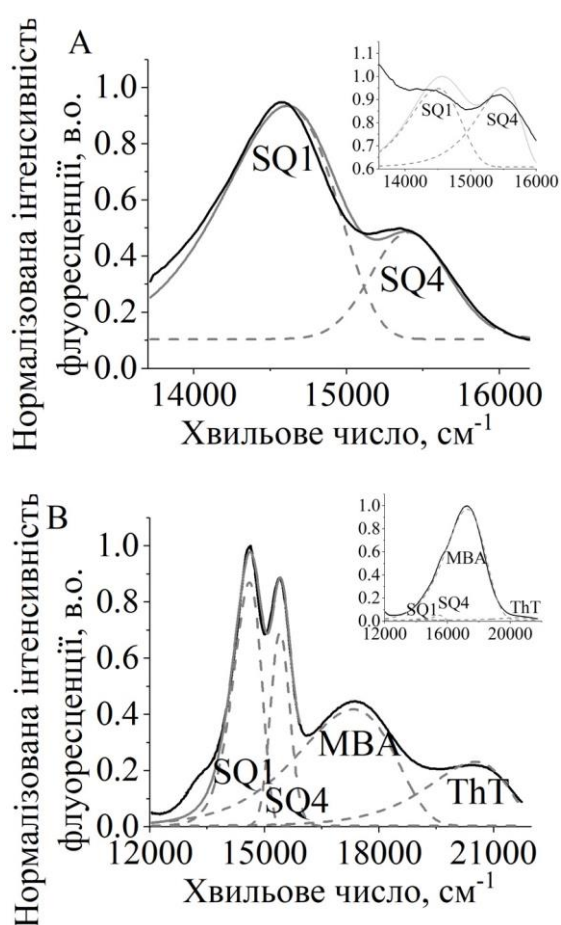


Рис. 4.11 Репрезентативні нормалізовані та розкладені спектри (в шкалі хвильових чисел) систем SQ→SQ1 (А), MBA→SQ4→SQ1 (Б) and ThT→MBA→SQ4→SQ1 (В) в фібрилах інсуліну та контрольному білку (вставка)

У трихромоформній системі (ББ→SQ4→SQ1) бензантрони викликали зростання флуоресценції SQ1 у (4.2–15)/(2.7–9.4) рази у присутності фібрилярного та контрольного інсуліну, відповідно (Рис. 4. 12А). Слід відзначити, що в системах з медіатором AM2 не спостерігалась ампліфікація сигналу SQ1. Як можна бачити з Рис. 4.10 та Рис. 4.11, у фібрилярному інсуліні як ББ, так і ThT суттєво підсилюють флуоресценцію SQ4. Величина

ампліфікації SQ4 в амілоїдних фібрилах, викликана бензантроновими зондами, була трохи більшою, ніж збільшення інтенсивності флуоресценції SQ1, але слідувала тому ж порядку (Рис. 4. 12А): АВМ (19 разів) > А6 (11 разів) > А8 (10.9 разів) > МВА (8.3 рази) > АМ1 (4 рази) > АМ2 (1.8 рази). З цього слідує, що амінопохідні бензантронну є більш ефективними донорами в трихромоформній системі, ніж МВА та амідінопохідні. У контрольному білку спостерігалась ампліфікація флуоресценції SQ4 у 1.4 – 9.7 рази, причому величина цього ефекту була найбільшою у трихромоформних системах, що містили МВА та А6.

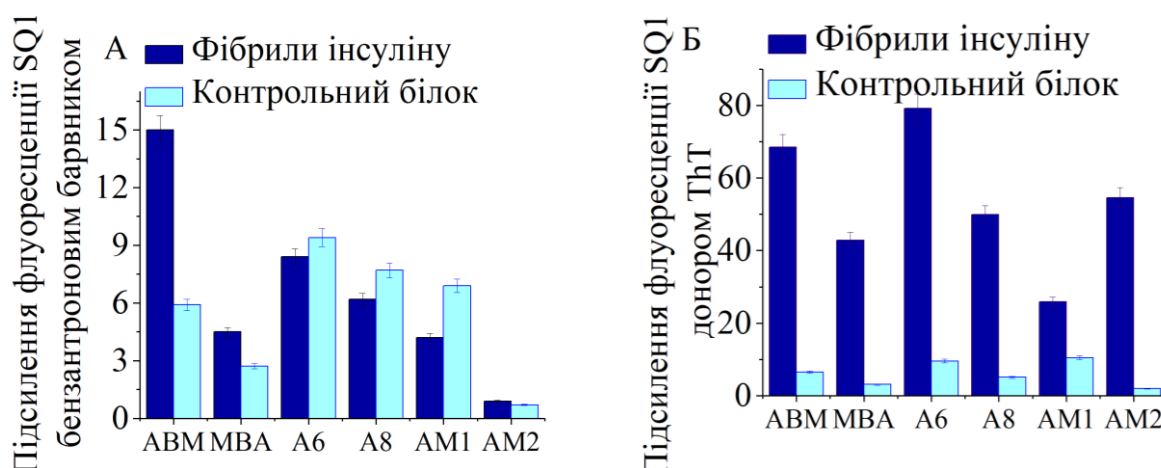


Рис. 4.12 Зростання флуоресценції SQ1 в системах ББ→SQ4→SQ1 (А) та ThT→ББ→SQ4→SQ1 (Б) відносно інтенсивності флуоресценції SQ1 в системах SQ4→SQ1

Коли ланцюг ФРПЕ доповнюється основним донором, ThT (Рис. 4.12Б), величина зростання флуоресценції SQ1 у фібрилярному інсуліні стає суттєво більшою (25.9 – 79.1 рази), залишаючись практично незмінною в контрольному білку (2 – 10.5 рази). Сенсibiliзована акцепторна емісія в амiлоїдних фiбрилах слiдує порядку: А6 > АВМ > АМ2 > А8 > МВА > АМ1. Це означає, що А6 і АВМ є найефективнішими ампліфікаторами флуоресценції сквараїнів в ланцюгах ФРПЕ з і без ThT. Крім того, додавання ThT спричинило значне збільшення початкової емісії SQ4 у 118.4 – 34.7 рази у присутності амiлоїдних фiбрил iнсуліну. Вищі значення ампліфікації SQ4 можуть бути пов'язані з: а) меншим початковим сигналом SQ4 порівняно з

сигналом SQ1; б) більшим внеском прямого переносу енергії пари ThT→SQ4, порівняно з внеском пари ThT→SQ1. Крім того, не можна виключати конкуренцію між SQ4 та SQ1 за сайти зв'язування інсуліну. Піки низької інтенсивності двох форм AM2, імовірно перешкоджають ефективному переносу енергії з бензантронового барвника на акцептори, хоча спостерігалась значна ампліфікація сигналу сквараїнів у повному ланцюгу ThT→AM2→SQ4→SQ1, розміщеному на фібрилах інсуліну. Підсилення флуоресценції бензантронів, викликаного ThT у фібрилярному білку, було незначним (приблизно 7.2 – 2.4 рази), порівняно з інтенсивністю піків ББ в системі ББ→SQ4→SQ1. Максимальні величини збільшення флуоресценції ББ при додаванні ThT спостерігались для A6 (7.2 рази), AM1 (6.9 рази) та АВМ (4.7 рази).

4.3.4 Визначення ефективності переносу енергії за даними гасіння флуоресценції донора в присутності акцептора

На наступному етапі дослідження, акцептори послідовно додавали до сумішей білка з ThT. Значне гасіння флуоресценції донора при різних концентраціях акцепторів спостерігалось виключно у присутності фібрилярного інсуліну (Рис. 4.13 та Рис. 4.14). Ефективності ФРПЕ, розраховані за даними гасіння флуоресценції ThT згідно з рівнянням (2.4) при різних концентраціях похідних бензантронів, наведені на Рис. 4.15А. Для донорно-акцепторних пар ThT→ББ ефективність переносу енергії, що розрахована при максимальній концентрації акцептора у присутності фібрил інсуліну, відповідає порядку: АВМ (85 %) > А6 (83 %) > АМ1 (73 %) > МВА (60 %) > А8 (59 %) > АМ2 (43 %) (Рис. 4.15Б). У той же час, у присутності нефібрилизованого білка перенос енергії з ThT на ББ не спостерігався. Додавання SQ4 до системи ThT→ББ призвело до значного гасіння флуоресценції бензантронів з наступним майже повним зникненням піків ББ (крім МВА) та зростанням флуоресценції SQ4 (Рис. 4.13, 4.14 та 4.15В, Г). АМ1 та амінопохідні бензантронів продемонстрували

максимальний перенос енергії на SQ4 в амілоїдних фібрилах (ефективність становила 85–90 %). Також спостерігався прямий шлях переносу енергії з ThT на SQ4, але ефективність ФРПЕ для цієї пари не перевищувала 48 %. Отримані результати вказують на те, що енергія переноситься більш імовірно послідовними каналами $\text{ThT} \rightarrow \text{ББ} \rightarrow \text{SQ4}$, ніж паралельним шляхом $\text{ThT} \rightarrow \text{SQ4}$, за винятком трихромофорної системи з MBA. В каскаді хромофорів $\text{ThT} \rightarrow \text{A6} \rightarrow \text{SQ4}$ не спостерігалось прямого переносу енергії з ThT на SQ4. У той же час, лише два бензантрони (MBA та A6) переносили енергію на SQ4 у присутності контрольного білка. Ці висновки узгоджуються з тими, що обговорювались у Розділі 4.3.3, де максимальне посилення сигналу SQ4 у нефібрилізованому інсуліні було викликане MBA та A6 (у системі $\text{ББ} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$).

Додавання до потрійної ФРПЕ системи кінцевого акцептора SQ1 (Рис. 4.15Г, Д) призвело до різкого зменшення інтенсивності флуоресценції SQ4, вказуючи на виражений перенос енергії між двома скварайновими зондами. Розраховані ефективності ФРПЕ демонструють, що енергія переважно переноситься багатоетапним послідовним шляхом $\text{ThT} \rightarrow \text{ББ} \rightarrow \text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$. У більшості випадків прямі одноетапні шляхи вносили незначний вклад у процеси ФРПЕ. Перенос енергії з ThT та ББ безпосередньо на SQ1 як у фібрилярному, так і в нативному білку спостерігався лише для A6 та амідінопохідних (за винятком AM2 у нативному інсуліні).

Варто відзначити, що більші ефективності переносу енергії, які спостерігались для пари $\text{SQ4} \rightarrow \text{SQ1}$ в контрольному білку, порівняно з ефективностями в фібрилах, не відіграють суттєвої ролі у повному процесі переносу енергії. На підтвердження цього висновку, на Рис. 4.16 для A6, найсильнішого ампліфікатора флуоресценції скварайнів у контрольному білку, наведені 3D спектри флуоресценції, де відмінності між фібрилярним та контрольним інсуліном виявилися найбільш вираженими.

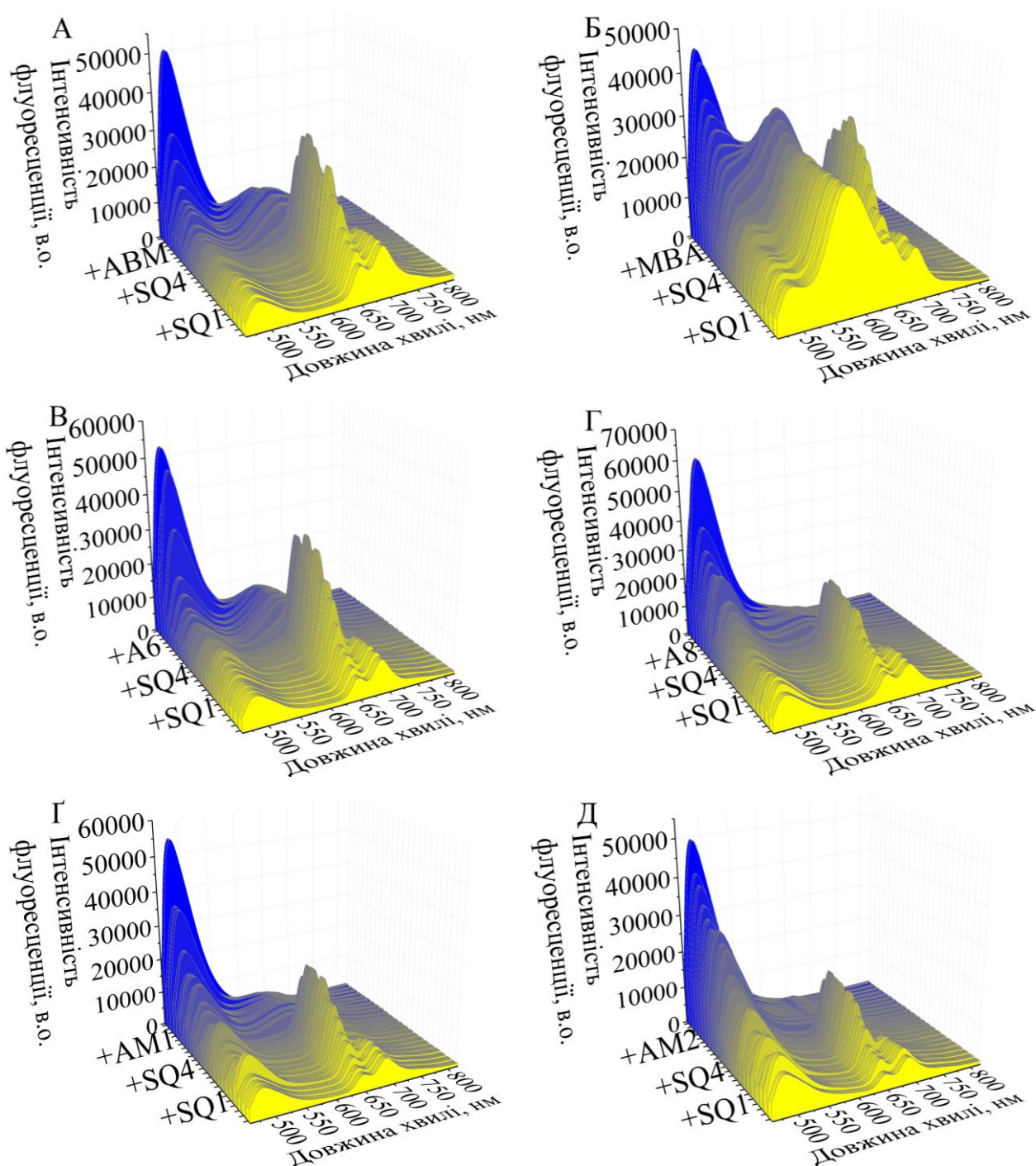


Рис. 4.13 Зміни в спектрах випромінювання ThT, зв'язаного з амілоїдними фібрилами інсуліну при додаванні бензантронових барвників та сквараїнів SQ4 і SQ1. Концентрації білка та ThT становили 4.9 та 1.2 мкМ, відповідно. Концентрації ББ, SQ4 та SQ1 поступово збільшувались до 0.53 мкМ, 0.15 мкМ та 1.28 мкМ, відповідно

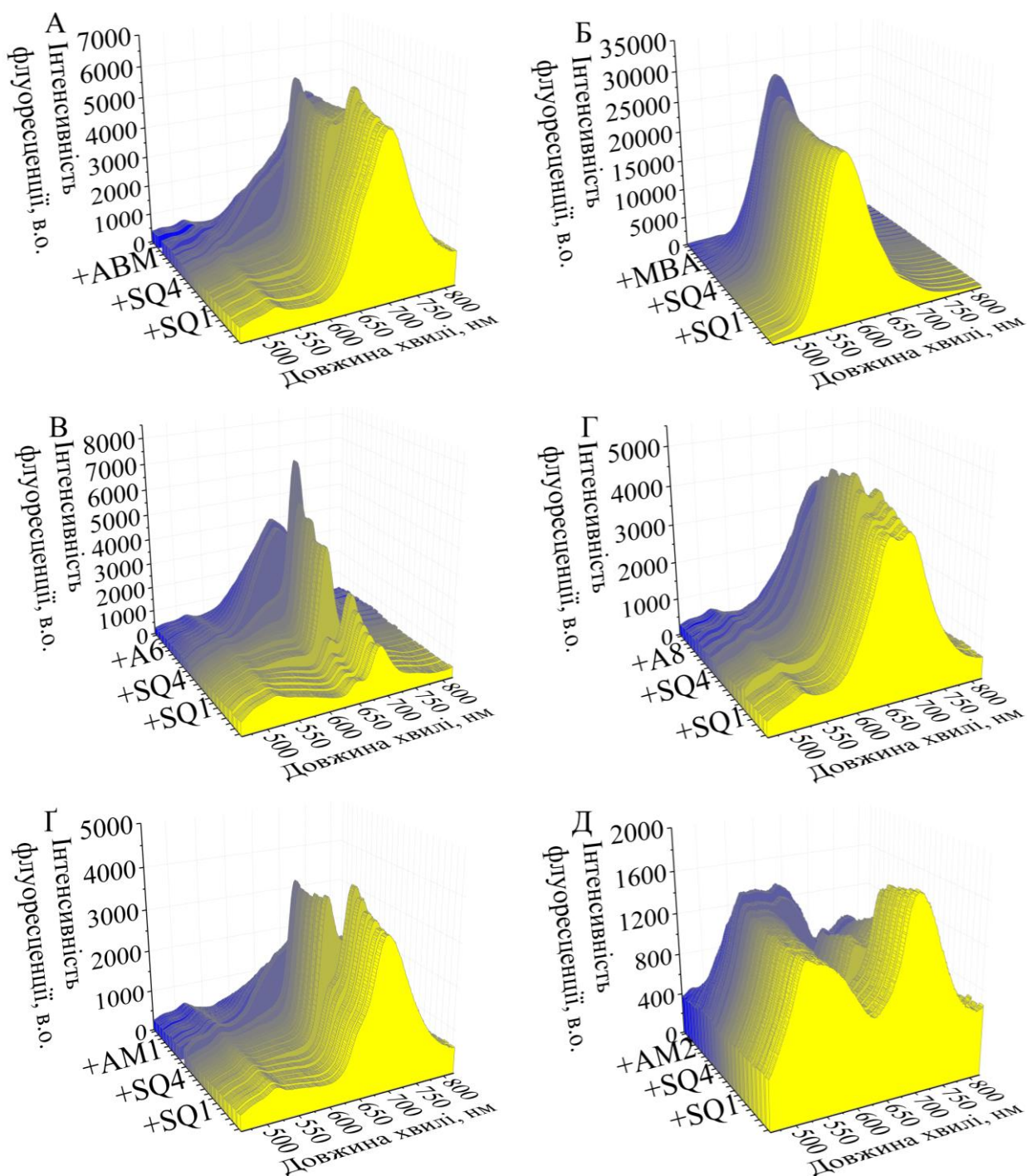


Рис. 4.14 Зміни в спектрах випромінювання ThT, зв'язаного з нефібрилізованим білком при додаванні бензантронових барвників та сквараїнів SQ4 і SQ1. Концентрації білка та ThT становили 4.9 та 1.2 мкМ, відповідно. Концентрації ББ, SQ4 та SQ1 поступово збільшувались до 0.53 мкМ, 0.15 мкМ та 1.28 мкМ, відповідно

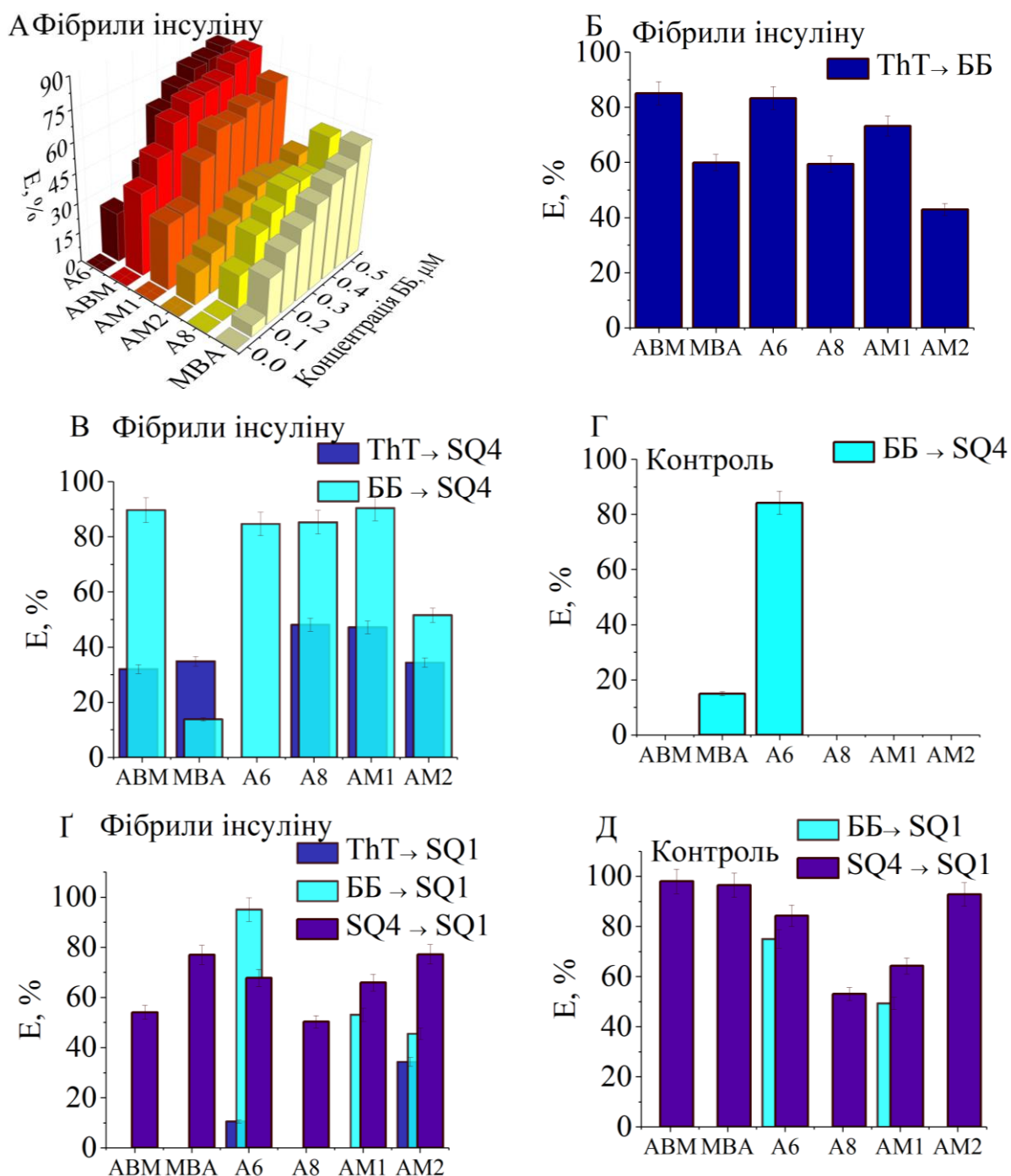


Рис. 4.15 Ефективності ФРПЕ для донорно-акцепторних пар ThT→ББ (А), отримані із загальних (нерозкладених) спектрів, як функція концентрації акцепторів у присутності амілоїдних фібрил інсуліну. Ефективності ФРПЕ, розраховані із розкладених спектрів за максимальної концентрації акцептора, в системах ThT→ББ (Б), ThT→ББ→SQ4 (В,Г) та ThT→ББ→SQ4→SQ1 (Г, Д) у присутності фібрилярної (Б, В, Г) та нефібрилізованої (Г, Д) форм білка

Широка високоінтенсивна пляма (з центром на $\lambda_{\text{еміс}} \sim 630 \text{ нм}$), отримана для системи ThT→ББ (Рис. 4.16, А, Г), відповідає бензантронному барвнику. У присутності різних форм білка чітко спостерігається зсув максимуму ББ (Рис. 4.16А, Г, Табл. 4.5). Оскільки максимуми поглинання досліджуваних похідних бензантронну розташовані на 440–470 нм, дана флуоресцентна пляма відображає два процеси: перенос енергії з ThT на $\lambda_{\text{збудж}} = 440 \text{ нм}$, а також безпосереднє збудження бензантронних барвників. Більш низькі інтенсивності бензантронних зондів у контрольному білку можна пояснити більш слабким ФРПЕ (завдяки високій селективності ThT до фібрилярного інсуліну) і, в той же час, низькою спорідненістю похідних бензантронну до нефібрилізованого інсуліну.

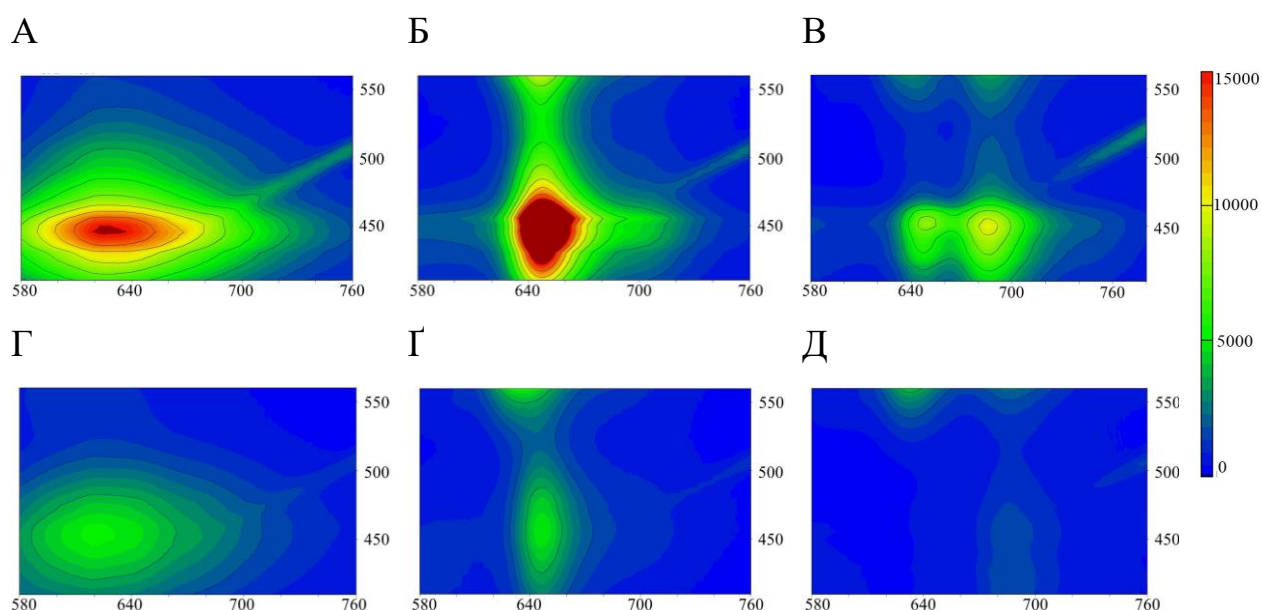


Рис. 4.16 Репрезентативні 3D спектри флуоресценції сумішей ThT з фібрилярним (А–В) та контрольным (Г–Д) інсуліном, зареєстровані у присутності бензантронного барвника А6 (А, Г), з подальшим додаванням SQ4 (Б, Г) та SQ1 (В, Д). Концентрація білка становила 4.9 мкМ. Концентрації ThT, ББ, SQ4 та SQ1 становили 1.2 мкМ, 0.5 мкМ, 0.15 мкМ та 1.3 мкМ, відповідно. Довжини хвиль випромінювання та збудження варіювали в межах 580–760 нм (горизонтальна шкала зліва направо) та 410–560 нм (вертикальна шкала знизу вгору), відповідно. Ширина щілин збудження та випромінювання становила 10 нм. Для позначення інтенсивності флуоресценції використовували несправжню кольорову шкалу від –50 в.о. (синій) до 15000 в.о. (червоний)

У 3D спектрах флуоресценції системи ThT→ББ→SQ4, зв'язаної з фібрилами інсуліну, спостерігається відносно вузька флуоресцентна пляма SQ4 (Рис. 4.16Б) що має у 1.9–2.6 рази більшу інтенсивність, ніж у бензантронів на попередньому етапі (Рис. 4.16А). Пляма з центром на $\lambda_{\text{збудж}} = 440 \text{ нм}$ з'являється завдяки каскаду Фьорстерівського резонансного переносу енергії ThT→ББ→SQ4, тоді як появу плями з центром на $\lambda_{\text{збудж}} > 550 \text{ нм}$ можна пояснити прямим збудженням зонду. У більшості випадків, у контрольному білку спостерігались піки як бензантронів, так і SQ4 (за винятком А6, що демонструє лише пляму SQ4) із суттєво зниженою інтенсивністю (порівняно з інтенсивністю в амілоїдних фібрилах) (Рис. 4.16Г).

У 3D спектрах чотирихромофорної системи, локалізованої на амілоїдних фібрилах, спостерігаються дві чітко визначені плями, пов'язані з піками SQ1 і SQ4, індукованими ФРПЕ (Рис. 4.16В). Цікаво, що пік SQ1 (на $\lambda_{\text{збудж}} = 440 \text{ нм}$) демонстрував в 1.2 – 2 рази вищу інтенсивність, ніж інтенсивність SQ4, за винятком МВА (де пік бензантронів з найвищою інтенсивністю накладався на пляму SQ4) та А8 (де інтенсивності сквараїнових зондів були рівними). Плями, що відповідають прямому збудженню сквараїнів (з центром на $\lambda_{\text{збудж}} > 550 \text{ нм}$), також спостерігались, але флуоресценція плями SQ1 (в найбільш інтенсивній точці) була у 2.1–3.1 рази нижче інтенсивності SQ1, індукованої каскадом ФРПЕ ThT→ББ→SQ4→SQ1. У присутності контрольного білка залежно від системи спостерігалось поєднання піків бензантронів та сквараїнів (на $\lambda_{\text{збудж}} = 440 \text{ нм}$). Незважаючи на наявність плям ББ в обох формах інсуліну, інтенсивність SQ1 в фібрилах була у 1.6–5.5 разів вищою, ніж у поєднаній плями в контрольному білку на $\lambda_{\text{збудж}} = 440 \text{ нм}$.

Загалом, за допомогою методики 3D флуоресценції було встановлено, що процес ФРПЕ значно ефективніше відбувається у фібрилярному інсуліні,

порівняно з контрольним білком, вказуючи на те, що досліджувані чотирихромофорні системи можуть бути використані для детектування амілоїдних фібрил. Розгляд вищезазначених каскадів ФРПЕ у фібрилах інсуліну як молекулярних фотонних дротів виходить за рамки даної роботи, однак дослідження у цьому напрямку можуть дати багатообіцяючі результати.

Порядок додавання барвників до розчину інсуліну, вочевидь, впливає на остаточну флуоресценцію кінцевого акцептора. Можна припустити, що як конкуренція між барвниками за сайти зв'язування білків, так і насичення цих сайтів хромофорами може призвести до різної інтенсивності флуоресценції SQ1, вимірюної у двох форматах ФРПЕ (ампліфікації флуоресценції акцептора додаванням донора та гасіння флуоресценції донора шляхом додавання акцептора). Варто зазначити, що досліджувані бензантронові барвники та ThT, як повідомлялось раніше [214, 344], мають подібні довжину ($\sim 1.2\text{--}1.5$ нм), ширину ($\sim 0.6\text{--}0.8$ нм) та висоту ($\sim 0.4\text{--}0.7$ нм). Таким чином, не можна виключати можливість подібних сайтів на фібрилах для бензантронових барвників та ThT. У сукупності, вищезазначені результати дозволили зробити висновок, що АВМ та А6 є найефективнішими медіаторами у досліджуваному каскаді ФРПЕ в амілоїдних фібрилах інсуліну.

4.3.5 Відстані між хромофорами та можливі сайти зв'язування на фібрилах інсуліну

На наступному етапі дослідження були визначені відстані між хромофорами на основі ефективностей переносу енергії відповідно до рівняння (2.8) [346]. Слід зазначити, що радіус Фьорстера істотно залежить від орієнтації дипольних моментів переходу випромінювання донора та поглинання акцептора, що визначають значення орієнтаційного фактора κ^2 (рівняння 2.5). Невизначеність у значенні κ^2 є одним з основних обмежень методу ФРПЕ. Цей параметр може варіювати від 0 (для перпендикулярної орієнтації диполів переходу) до 4 (для паралельних та однаково спрямованих

дипольних моментів переходу), тоді як для паралельних та протилежно спрямованих диполів переходу або випадкових орієнтацій донора та акцептора орієнтаційний фактор дорівнює 1 або 0.67, відповідно [346]. З огляду на те, що значення κ^2 є невідомим для досліджуваних хромофорів, були визначені верхнє та нижнє можливі значення відстаней між хромофорами шляхом варіювання κ^2 від 0.01 до 4 (Табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Відстані між хромофорами (r_{nm}) в залежності від значень орієнтаційного фактору κ^2

	$\kappa^2 = 0.01$	$\kappa^2 = 0.67$	$\kappa^2 = 1$	$\kappa^2 = 4$
ThT→ABM	0.9	1.8	1.9	2.4
ThT→MBA	0.9	1.8	1.9	2.4
ThT→A6	0.8	1.7	1.8	2.6
ThT→A8	1.0	1.9	2.1	2.6
ThT→AM1	1.0	2.1	2.2	2.8
ThT→AM2	1.2	2.5	2.7	3.4
ABM→SQ4	1.8	3.7	3.9	5.0
MBA→SQ4	4.5	9.1	9.7	12.2
A6→SQ4	2.1	4.2	4.4	5.6
A8→SQ4	2.1	4.3	4.6	5.8
AM1→SQ4	1.5	3.0	3.2	4.1
AM2→SQ4	2.1	4.2	4.5	5.6
ThT→SQ4*	1.4	2.8	3.0	3.8
SQ4→SQ1	1.7	3.4	3.7	4.5
ThT→SQ1*	1.4	2.7	2.9	3.7
A6→SQ1*	1.5	3.1	3.3	4.1
AM1→SQ1*	2.1	4.3	4.6	5.8
AM2→SQ1*	2.0	4.1	4.4	5.5

* Паралельний шлях переносу енергії

Зазвичай, відстань між донором та акцептором оцінюють за умови довільної орієнтації диполів переходу донора та акцептора ($\kappa^2 = 0.67$). Альтернативно, визначають верхню та нижню межі орієнтаційного фактора на основі експериментально вимірених значень анізотропії флуоресценції та фундаментальних значень анізотропії донора та акцептора [346]. Варто зазначити, що значення анізотропії ThT (приблизно 0.35 в амілоїдних фібрилах N-кінцевого фрагмента аполіпопротеїну A-I), SQ1 (приблизно 0.31 у фібрилах лізоциму), бензантронових барвників АВМ та АМ18 (приблизно 0.33 та 0.29 у фібрилах лізоциму, відповідно), зазначені в роботах [344, 449, 450], вказують на обмежений рух диполів барвників у зв'язаному з фібрилами стані.

На наступному кроці, було проведено дослідження методом молекулярного докінгу для того, щоб отримати глибше розуміння процесів зв'язування барвників з фібрилами та визначити можливі сайти зв'язування досліджуваних флуорофорів з амілоїдними фібрилами.

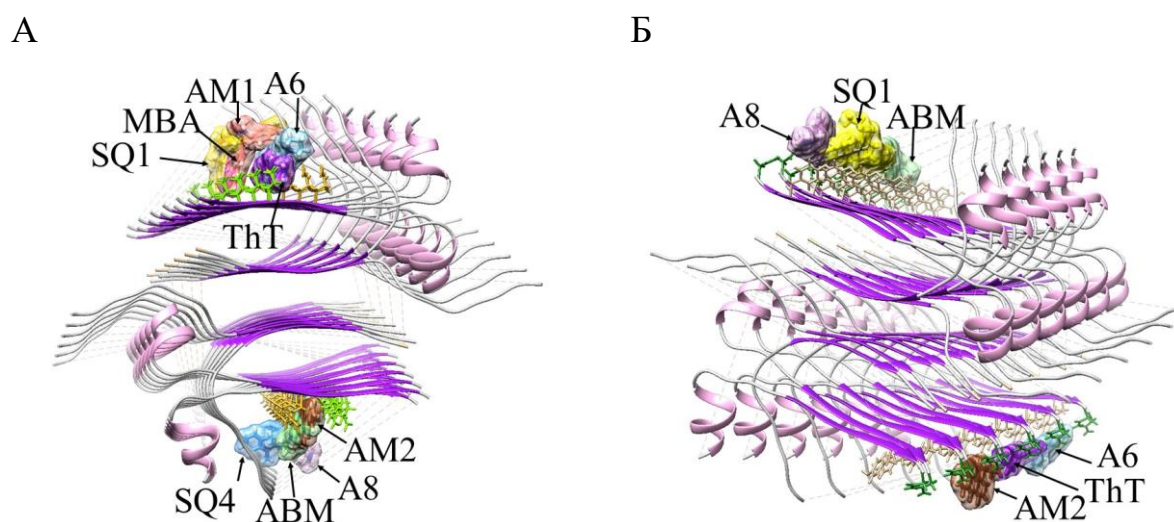


Рис. 4.17 Найбільш енергетично вигідні комплекси барвників із жолобками фібрил Gln15–Glu17 (А) та Tyr19–Asn21 (Б), отримані за допомогою сервера SwissDock та візуалізовані за допомогою програмного забезпечення UCSF Chimera. β -листи та α -спіралі позначені фіолетовим та рожевим, відповідно. Залишки Gln15, Glu17, Tyr19 та Asn21 позначені золотистим, зелено-жовтим, жовто-коричневим та темно-зеленим, відповідно

Жолобки, що пролягають вздовж осі амілоїдної фібрили, на даний час вважаються найбільш переважними сайтами зв'язування для ThT [321, 451]. У застосованій моделі інсулінової фібрили, жолобки Leu13–Gln15, Gln15–Glu17, Glu17–Tyr19 і Tyr19–Asn21 належать ланцюгу А та є доступними розчиннику, тоді як послідовність LVEALYL ланцюга Б (11–17) знаходиться на сухій поверхні фібрили та здається майже недоступною для зв'язування барвників [275]. Дійсно, результати молекулярного докінгу отримані за допомогою як SwissDock, так і AutoDock показали, що досліджувані барвники, як правило, зв'язуються з жолобками Gln15–Glu17 та Tyr19–Asn21 на вологій поверхні фібрили (Рис. 4.17), причому перший сайт зв'язування є більш енергетично вигідним (Табл. 4.8). Асоціації барвників з іншими жолобками, розташованими на вологій поверхні (Leu13–Gln15 та Glu17–Tyr19 ланцюга А), а також в інтерфейсі стеричної блискавки (ланцюг Б) не було виявлено. Інші сайти зв'язування, отримані як за допомогою SwissDock, так і AutoDock, включають периферію фібрили, утворену нативними N-кінцями обох ланцюгів А та Б. Наприклад, за максимального розміру комірки в AutoDock, найбільш енергетично вигідними сайтами зв'язування з барвниками були: а) полярний залишок Gln4 (енергії для АВМ, МВА, А6, АМ2 та SQ4 знаходились у діапазоні від –5.11 до –4.57 ккал/моль); б) неполярний залишок Leu6 (SQ1, –3.7 ккал/моль); та в) залишки Leu6–Gln4 (ThT, –4.32 ккал/моль), Gln4–Val2 (А8, –4.0 ккал/моль), Gln4–Phe1 (АМ1, –4.4 ккал/моль) ланцюга Б. Також було виявлено зв'язування барвників із залишками Thr8 та Cys12 ланцюга А, хоча афінність барвників до периферії фібрили загалом була нижчою, ніж до амілоїдного ядра.

Відомо, що зв'язування ThT з амілоїдними фібрилами контролюється головним чином гідрофобними та ароматичними взаємодіями [321, 452, 453], хоча також було повідомлено [454] про внесок електростатичних взаємодій. Жолобки фібрил, що знаходяться на поверхні фібрили та утворені ароматичними амінокислотними залишками, зокрема, Tyr та Phe, вважаються найбільш переважними сайтами зв'язування для ThT [451–453]. Жолобки

фібрил інсуліну, передбачені в даному дослідженні за допомогою молекулярного докінгу, містять полярні (Gln15, Asn21, Cys20), негативно заряджені (Glu17), ароматичні (Tyr19) та гідрофобні (Leu16) амінокислотні залишки, та знаходяться у відповідності до існуючих гіпотез щодо комплексоутворення ThT з фібрилами.

Таблиця 4.8

Енергії молекулярного докінгу (ккал/моль) комплексів барвників з амілоїдними фібрилами інсуліну

	Gln15–Glu17		Tyr19–Asn21	
	ΔG , SwissDock	Афінність зв'язування, AutoDock	ΔG , SwissDock	Афінність зв'язування, AutoDock
ABM	-5.91	-7.79	-5.80	-5.57
MBA	-6.58	-6.88		-4.93
A6	-6.20	-8.24	-5.60	-5.63
A8	-6.24	-7.86	-5.74	-5.32
AM1	-6.72	-6.95		-5.43
AM2	-7.29	-6.23	-5.95	-4.84
SQ1	-7.97	-8.61	-7.56	-5.53
SQ4	-9.10	-8.40		-6.27
ThT	-8.36	-6.19	-6.81	-4.23

Варто мати на увазі, що дослідження методом молекулярного докінгу не дозволяють точно визначити розташування барвника в структурі фібрили, а лише демонструють принципову можливість зайнятості певних сайтів зв'язування та їх відносну афінність. У разі лінійного розташування хромофорів в одному і тому ж жолобку на поверхні фібрили, відстань між донором та акцептором буде контролюватися лінійною щільністю зв'язаних зондів, що, у свою чергу, є функцією концентрації білка і барвника, та

параметрів зв'язування. Незалежно від місця розташування барвника, в поверхневих жолобках на одній чи на протилежних боках амілоїдного кору інсуліну, або на менш упорядкованій периферії, регулярне розташування поліпептидних ланцюгів створює каркас для ланцюга багатоетапного переносу енергії і дозволяє уявити нанодріт на основі фібрили. У разі фібрил інсуліну (Рис. 4.17), ширина та товщина такого нанодроту становили б приблизно 6.6 нм та 7.8 нм, відповідно. Припускаючи, що відстані між хромофорами дорівнюють радіусам Фьорстера для кожної з трьох донорно--акцепторних пар в каскаді ФРПЕ, можна отримати, що для найбільш ефективних бензантронів, АВМ та А6, енергія може переноситись на відстані до 15 нм.

Висновки до розділу 4

1. У даному розділі було продемонстровано, що створену чотирьоххромофорну систему, яка складається з класичного амілоїдного маркера ThT → медіатора → сквараїнового зонду SQ4 → сквараїнового барвника SQ1, можна використовувати для ідентифікації та характеристики амілоїдних фібрил за допомогою багатоетапного Фьорстерівського резонансного переносу енергії.
2. Виявлено, що ефективність ФРПЕ, а також підсилення флуоресценції кінцевого акцептора SQ1 були набагато вищими у фібрилах інсуліну, ніж у нефібрилізованому білку.
3. Основний донор енергії, ThT, у поєднанні з досліджуваними медіаторами та SQ4 виступають ефективними ампліфікаторами флуоресценції SQ1, що призводить до зсуву максимуму випромінювання флуоресценції на ~ 200 нм (від 480 до 680 нм) в область «оптичного вікна» біологічних тканин, що дає можливість підвищити чутливість детектування амілоїдів.
4. Різниця в ампліфікації флуоресценції кінцевого акцептора, так само як різні значення ефективностей ФРПЕ каскаду ThT→ABM→SQ4→SQ1

відображають відмінності в морфології інсулінових фібрил двох типів (ІнсФ1 та ІнсФ2), що вказує на можливість використання багатоетапного ФРПЕ для розрізнення поліморфів інсуліну.

5. Встановлено, що серед досліджуваних медіаторів каскаду ФРПЕ бензантронові барвники з піперидиновим та морфоліновим циклами, а саме А6 та АВМ, є найефективнішими медіаторами переносу енергії.
6. Зроблено припущення, що жолобок Gln15–Glu17 є найбільш пріоритетним сайтом зв'язування для досліджуваних барвників.
7. Дані результати створюють підґрунтя для розвитку нових методів детектування амілоїдів на основі ФРПЕ, а також відкривають шлях для використання мультихромофорних систем на амілоїдній матриці у нанофотоніці.

Основні результати цього розділу викладені в роботах: [3]; [4]; [7]; [18]; [20]; [21]; [22]; [23].

РОЗДІЛ 5

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АМІЛОЇДОГЕННИХ МУТАНТІВ ЛІЗОЦИМУ ТА ІНСУЛІНУ

5.1 Результати МД моделювання амілоїдогенних мутантів лізоциму

Траєкторії теплової денатурації (500 K) ДТ лізоциму та його мутантів було проаналізовано в термінах параметрів, що відображають зміни як в глобальній, так і в локальній структурі білка, а саме СКВ, РІ, ППДР, СКФ та вміст вторинної структури. Як можна бачити з Рис. 5.1, є три основні тенденції в часовій еволюції СКВ, згідно з якими всі досліджувані мутанти можна розділити на три групи. Перша група містить подвійний мутант F57I/T70N та варіант Y54N, у яких СКВ зростає швидше, ніж в ДТ лізоциму (Рис. 5.1А). Значення СКВ рівне 0.7 нм було обрано як критерій розгортання [455]. З огляду на це, визначено, що ДТ білка розгортається протягом ~ 10 нс, тоді як часи розгортання (t_u) мутантів F57I/T70N та Y54N становлять ~ 3 нс та 7 нс відповідно. До другої групи належать D67H ($t_u \sim 11$ нс) та I56T ($t_u \sim 12$ нс), час розгортання яких співмірний з t_u дикого типу лізоциму (Рис. 5.1Б). Мутанти T70N/W112R ($t_u \sim 17$ нс), F57I ($t_u \sim 21$ нс) та W64R ($t_u \sim 24$ нс), розгортаються повільніше, ніж білок ДТ, та становлять третю групу (Рис. 5.1В). Цікаво зазначити, що мутанти D67H та I56T в попередніх моделюваннях термічної денатурації мали вищі значення СКВ відносно ДТ білка [244, 245]. Невідповідність між даними спостереженнями та нашими результатами можна пояснити набагато коротшими часовими інтервалами, у порівнянні зі 100 нс (1 нс [244] або 5 нс [245]), в межах яких дійсно СКВ вищезазначених мутантів дещо вищі, ніж у ДТ лізоциму (Рис. 5.1В).

Втрата нативних контактів та елементів вторинної структури поряд із вищими значеннями СКВ, РІ та СКФ розглядаються як ознаки зниженої стабільності мутованого білка [456]. Часові еволюції інших інтегральних

характеристик, а саме радіусу інерції та площі поверхні, що доступна

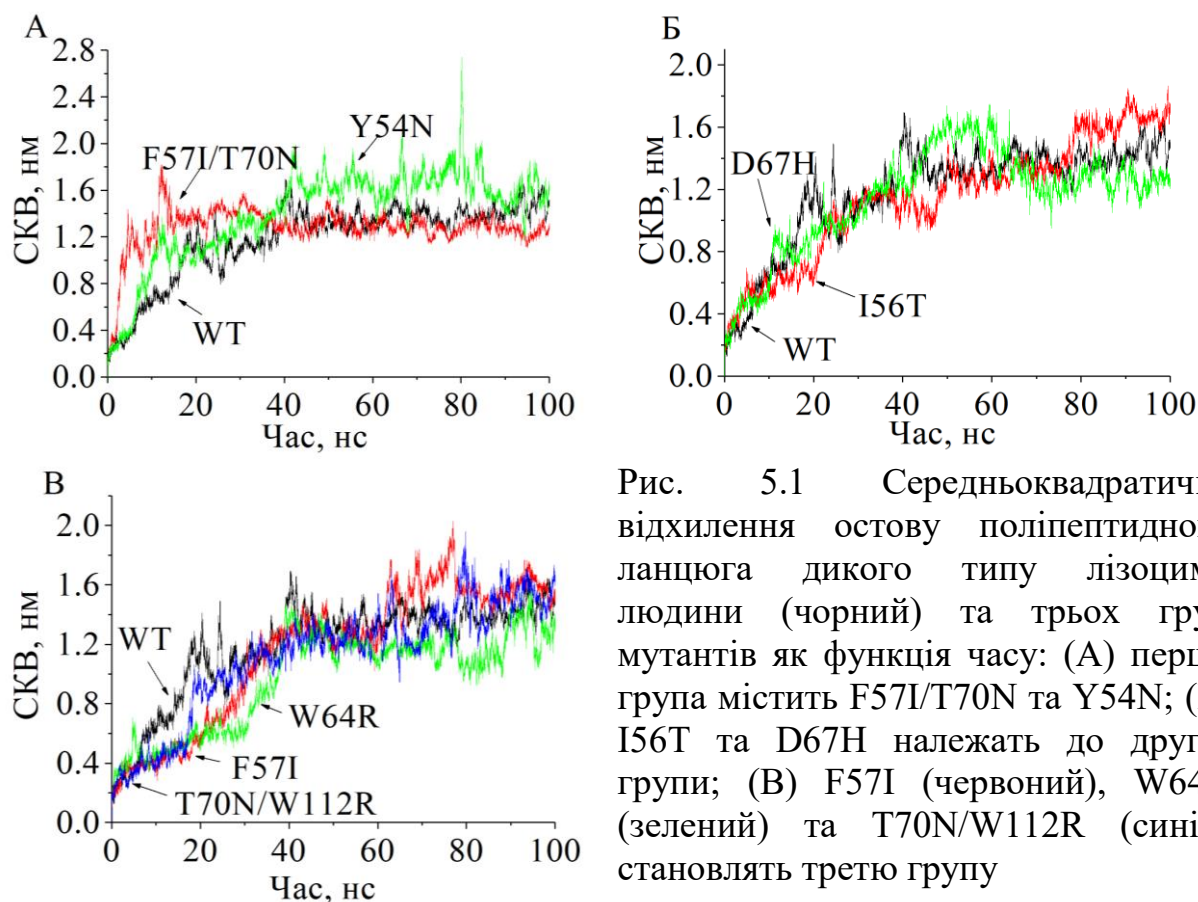


Рис. 5.1 Середньоквадратичне відхилення остову поліпептидного ланцюга дикого типу лізоциму людини (чорний) та трьох груп мутантів як функція часу: (А) перша група містить F57I/T70N та Y54N; (Б) I56T та D67H належать до другої групи; (В) F57I (червоний), W64R (зелений) та T70N/W112R (синій) становлять третю групу

розчиннику, підтримують ідею про наявність трьох груп мутантів лізоциму з різними режимами розгортання, у порівнянні з диким типом. Значення PI зростає з ~ 1.4 до ~ 1.7 нм, тоді як загальний показник ППДР зростає від ~ 80 нм² до ~ 110 – 115 нм², головним чином за рахунок змін гідрофобного компонента, що збільшується у перші 20 нс від ~ 20 нм² до ~ 40 нм² і далі коливається навколо цього значення. Збільшення радіуса інерції позитивно корелює зі змінами ППДР, вказуючи на зростання кількості залишків, доступних для розчинника зі зменшенням компактності білка, викликаним втратою стабілізуючих (packing) взаємодій [244].

Далі, щоб більш детально охарактеризувати вплив мутацій на структуру та динаміку лізоциму, було проаналізовано зміни середньоквадратичних флуктуацій C_{α} -атомів та загальної площі поверхні, що доступна для розчинника, від залишку. Профілі СКФ та ППДР, показані на Рис. 5.2, були

розраховані для МД симуляції дикого типу білка при 500 К. Не беручи до уваги флуктуації N- та C- кінців поліпептидного ланцюга, найбільші відхилення C_{α} -атомів від рівноважного значення спостерігалися в районах поворотів 15-20, 38–48 і 58–62, тоді як більшість залишків з найменшими флуктуаціями (наприклад, 30, 100, 116) належать до α -спіральних областей нативної структури лізоциму. Як і очікувалось, залишки з нижчим значенням СКФ мають менший показник ППДР (Рис. 5.2).

Припускають, що β -домен (залишки 43–80), C-спіраль (залишки 89–100) та гідрофобне ядро, що включає в себе G55, I56 та F57 [457], відіграють головну роль у формуванні амілоїдних фібрил лізоциму [238, 458, 459]. Ось чому при подальшому розгляді ефектів, спричинених мутаціями, особлива увага приділяється областям, пов'язаним із утворенням амілоїдів, та сусіднім

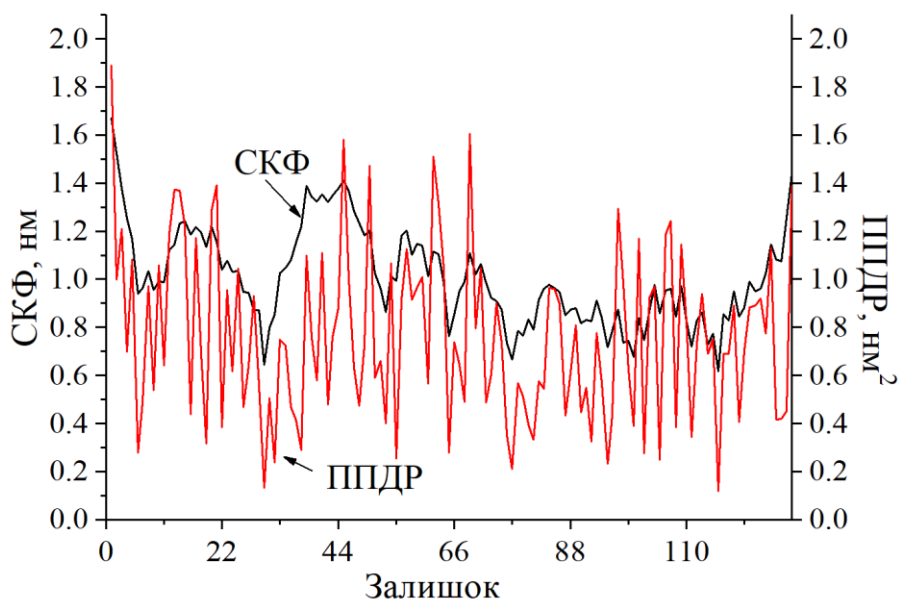
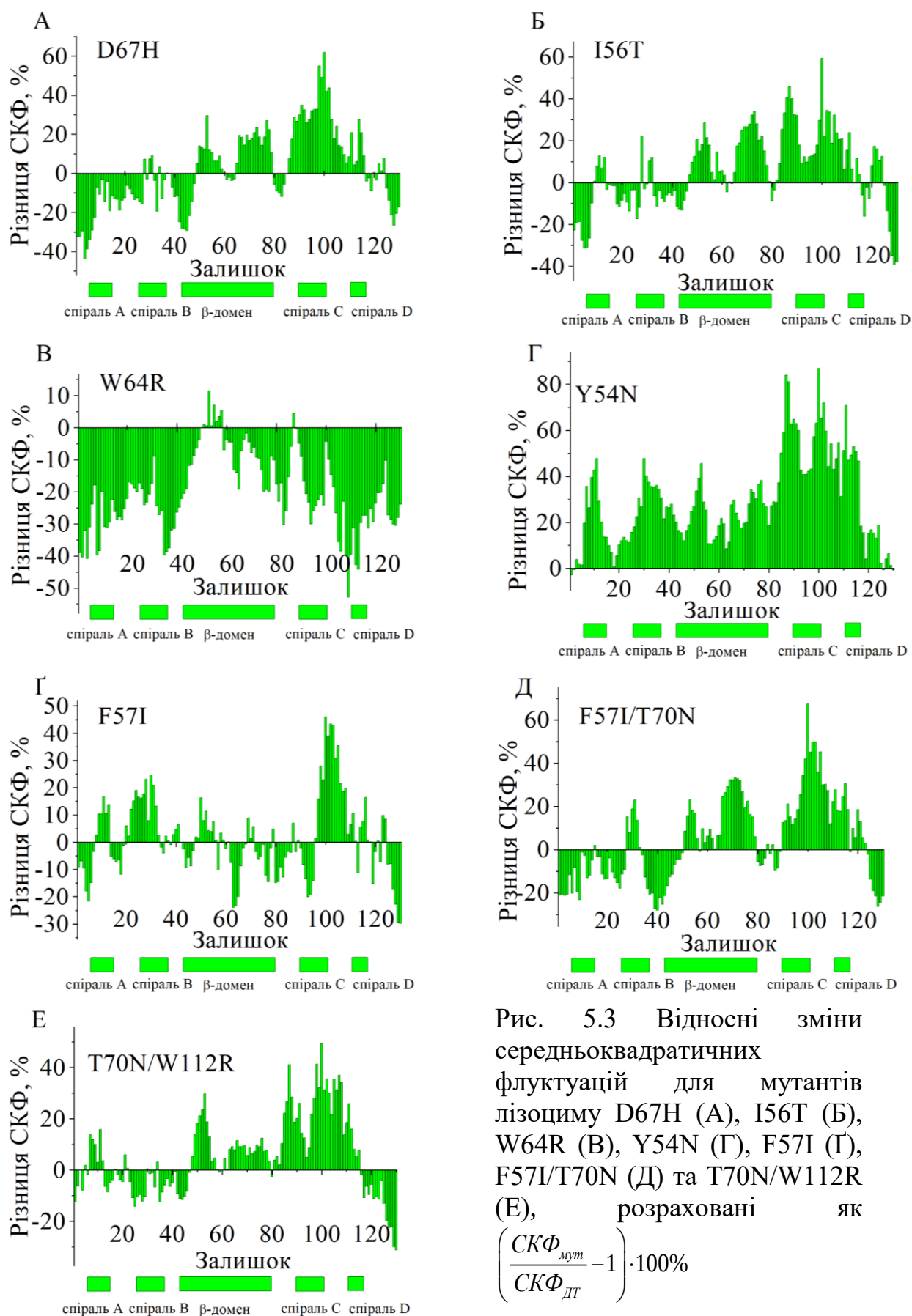


Рис. 5.2 Залежності середньоквадратичних флуктуацій C_{α} -атомів (чорна лінія) та загальної площі поверхні, що доступна для розчинника, (червона лінія) від залишку, розраховані на основі МД траєкторії дикого типу лізоциму людини



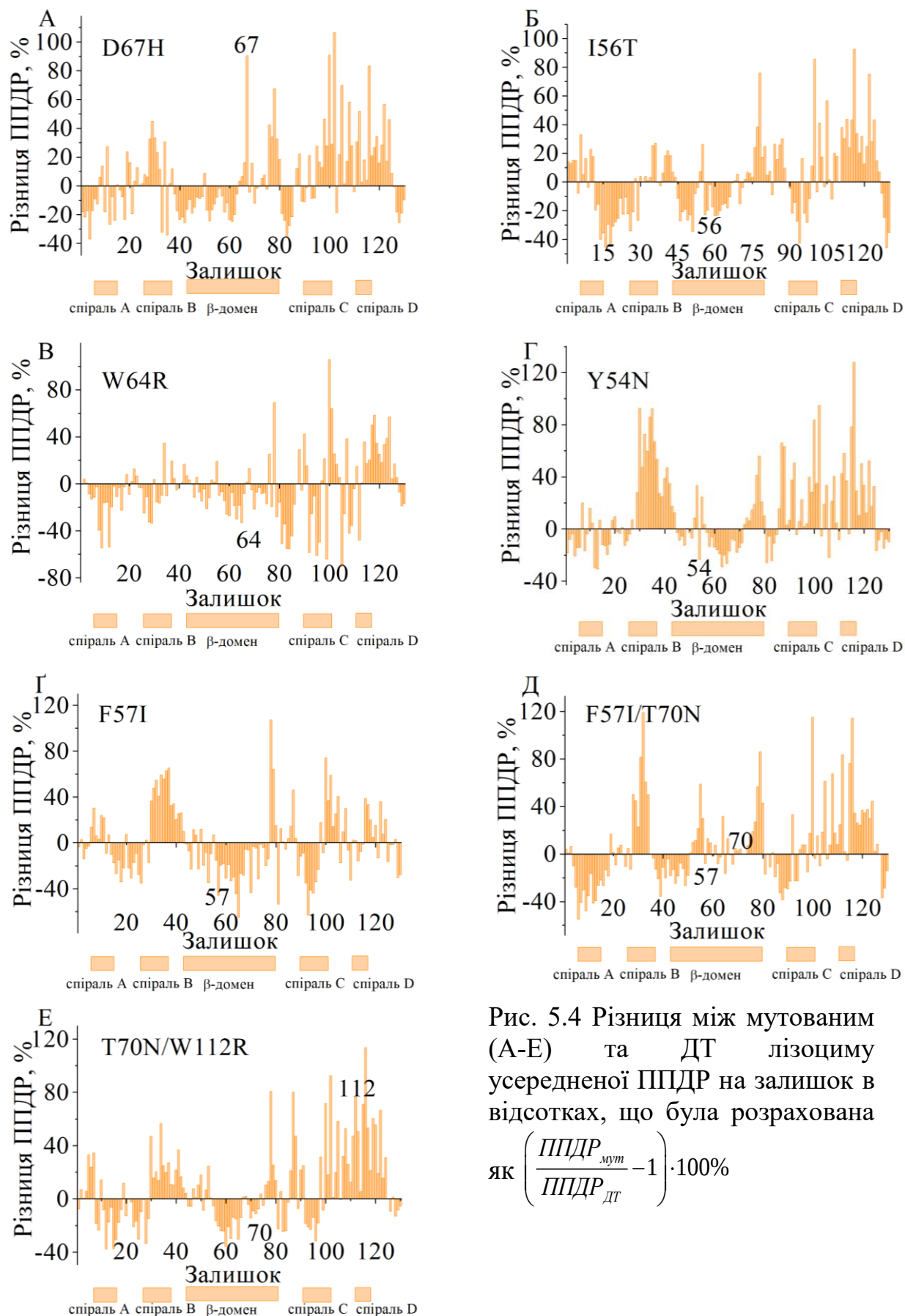


Рис. 5.4 Різниця між мутованим (А-Е) та ДТ лізоциму усередненої ППДР на залишок в відсотках, що була розрахована

$$\text{як } \left(\frac{\text{ППДР}_{\text{мут}}}{\text{ППДР}_{\text{ДТ}}} - 1 \right) \cdot 100\%$$

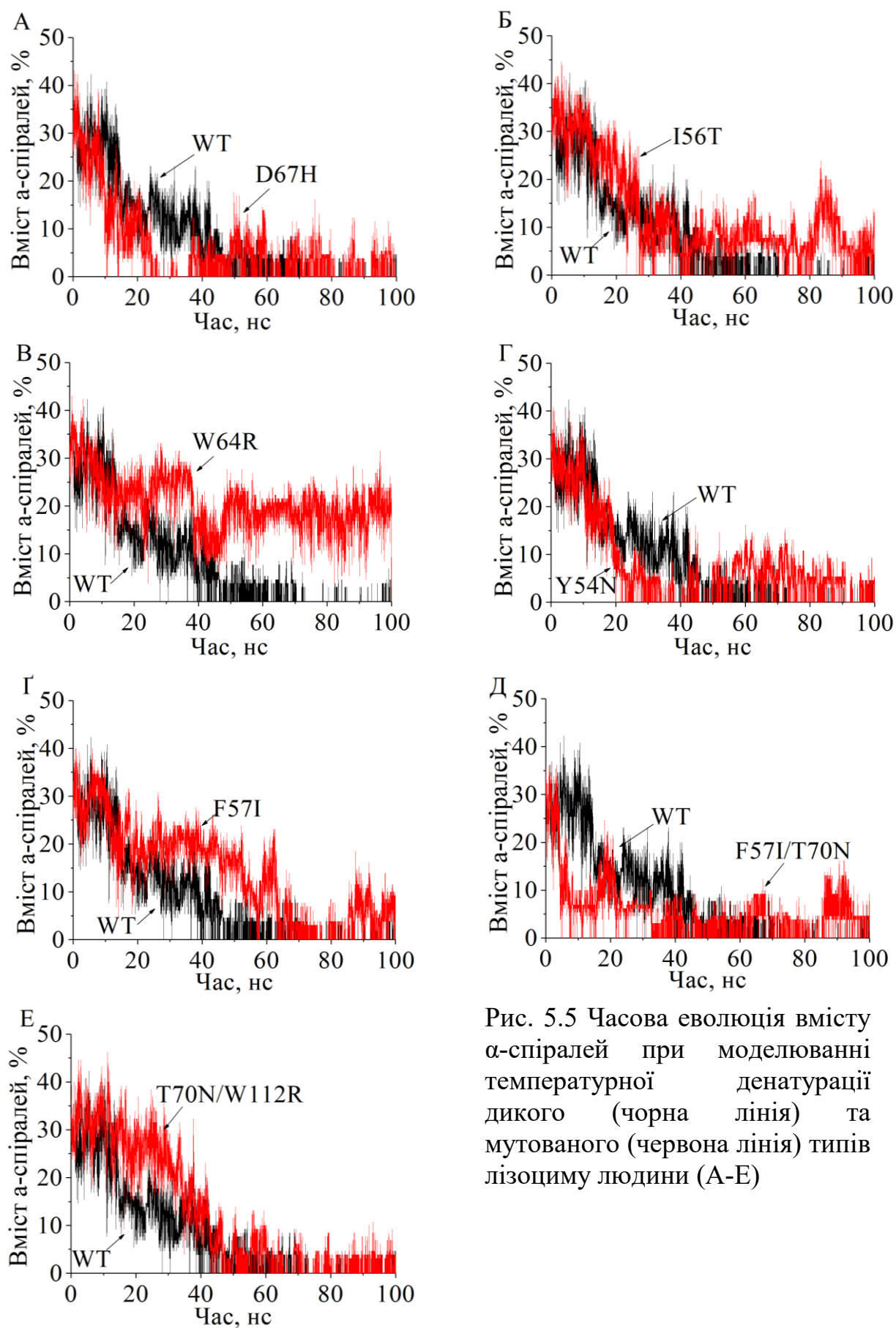


Рис. 5.5 Часова еволюція вмісту α -спіралей при моделюванні температурної денатурації дикого (чорна лінія) та мутованого (червона лінія) типів лізоциму людини (А-Е)

регіонам. Аналіз відносних змін СКФ показав, що в області 50-60, яка охоплює гідрофобне ядро, мутанти сильніше флюктують, ніж дикий тип білка. Найменші флюктуації в даному регіоні спостерігались для W64R ($\leq 11\%$) та F57I ($\leq 16\%$) (Рис. 5.3). Більшість мутантів демонстрували значно більші флюктуації в С- і, частково, D-спіралі, а також підвищену гнучкість в області, що оточує V100, в порівнянні з ДТ лізоциму, причому різниця СКФ сягала від $\sim 50\%$ до $\sim 110\%$. Тільки для мутанту W64R спостерігається обмежений рух майже всіх ділянок поліпептидного ланцюга, окрім β -листів, що охоплюють залишки 50–60 (Рис. 5.3В). У той же час, Y54N, навпаки, демонструє виражене збільшення рухливості практично всіх залишків (Рис. 5.3Г). Також варто відзначити, що значно сильніші флюктуації β -домену, у порівнянні з ДТ, спостерігались для всіх мутантів (за винятком W64R та F57I). Отримані спостереження узгоджуються з результатами роботи [245], в якій показано, що мутація D67N спричиняє підвищення гнучкості β -домену.

На основі аналізу відносних змін середнього показника ППДР на залишок (Рис. 5.4) було виявлено, що для С-термінальних фрагментів β - та α -доменів, а також області 30-36 спіралі В спостерігається найбільше зростання доступності розчиннику для всіх мутантів, у порівнянні з ДТ білка (особливо для F57I та F57I/T70N). Цікаво відмітити, що в попередньому моделюванні D67N [245], авторами було відзначено значне зростання ППДР спіралі С.

Примітно, що мутовані залишки варіантів D67N та T70N/W112R проявляють значне збільшення ППДР ($\sim 90\%$ для залишку 67 та $\sim 80\%$ для залишку 112), в той час як іншим мутованим залишкам, 54, 56, 57 і 64 притаманні протилежні зміни ППДР – зменшення на 25–50 % (Рис. 5.4А–Е).

Важливо, що ефекти, виявлені при МД моделюванні, для деяких досліджуваних мутантів можуть бути обговорені в контексті наявних експериментальних даних. На основі широких досліджень, що включали ЯМР та мас-спектрометрію, було підтверджено зниження стабільності в

нативному стані та глобальної структурної кооперативності амілоїдогенних варіантів I56T та D67H [243, 249]. Внаслідок таких властивостей, ці мутанти виявилися здатними заселити інтермедіатні стани, в яких суттєво розгорнуті β -домен і сусідня С-спіраль, в той час як А-, В- і D-спіралі зберігають свою нативну структуру. Крім того, з експериментів по дослідженню процесів протеолізу було виявлено, що фрагмент лізоциму людини 32–108 є високостійким до перетравлення пепсину. На основі цього було зроблено припущення, що дана область являє собою ядро амілоїдних фібрил [241]. Наші спостереження, а саме вищі флуктуації області β -домену та С-спіралі мутантів D67H та I56T (Рис. 5.3А, Б), разом із вищим значенням ППДР С-спіралі (Рис. 5.4А), у порівнянні з ДТ білка, узгоджуються з вищезазначеними експериментальними висновками.

Наступним кроком було порівняння часового перебігу змін елементів вторинної структури. Як показано на Рис. 5.5 (чорна лінія), відсоток α -спіралей ДТ лізоциму зменшується з $\sim 35\%$ до $\sim 5\%$ протягом ~ 45 нс МД симуляції, причому мутанти демонструють різну поведінку. Більш конкретно, можна виділити три основні тенденції у часовій еволюції вмісту α -спіралей: 1) швидкість втрати спіральності мутантів I56T, F57I та T70N/W112R близька до поведінки ДТ білка (Рис. 5.5Б, Г, Е); 2) D67H, Y54N та F57I/T70N демонструють швидше руйнування α -спіралей, ніж лізоцим ДТ (Рис. 5.5А, Г, Д); 3) повільна, у порівнянні з диким типом, втрата спіральності мутанту W64R, причому вміст α -спіралей зменшується з $\sim 35\%$ до $\sim 20\%$.

Для більш детального розгляду ефекту мутацій на процес розгортання лізоциму, була проведена оцінка часу руйнування (t_d) окремих структурних елементів (а саме руйнування чотирьох α -спіралей, деструкція спіральних елементів в α -домені та β -листів в β -домені), вважаючи, що елемент вторинної структури повністю зруйнований, якщо він не з'являється

Таблиця 5.1

Час руйнування елементів вторинної структури мутантів та дикого типу лізоциму людини

Структурний елемент	ДТ	D67H	F57I	I56T	W64R	Y54N	F57I/ T70N	T70N/ W112R
5-15 Спіраль А	18	15 (Н)	22 (С)	21 (Н)	46 (С)	34 (С)	39 (С)	49 (С)
25-36 Спіраль В	15	24 (С)	64 (С)	41 (С)	15 (Н)	20 (С)	7 (Д)	43 (С)
89-100 Спіраль С	35	11 (Д)	53 (С)	65 (С)	45 (С)	22 (Д)	5 (Д)	34 (Н)
110-116 Спіраль D	46	18 (Д)	13 (Д)	27 (Д)	*	1 (Д)	0.3 (Д)	14 (Д)
1-42 та 81-130 α -домен, вміст α -спіралей	46	26	53	65	*	22	23	34
43-80 β -домен, вміст β - листів	15	38 (С)	26 (С)	23 (С)	13 (Н)	14 (Н)	7 (Д)	2 (С)

С – стабілізуючий, Н – нейтральний, Д – дестабілізуючий ефект мутації на час руйнування, * – відсутність деструкції

протягом принаймні 1 нс. Додаткові відмінності між мутантами лізоциму (Табл. 5.1) були виявлені шляхом введення гіпотетичного поділу ефекту мутації на стабілізуючий (t_d збільшується більш ніж на 20 % відносно ДТ),

нейтральний (t_d лежить у межах $\pm 20\%$) та дестабілізуючий (t_d зменшується більш ніж на 20%).

Основні результати аналізу даних можна узагальнити наступним чином. У порівнянні з диким типом білка: (1) мутація D67H стабілізує В-спіраль та β -домен, дестабілізує С- та D-спіралі і ніяк не впливає на А-спіраль; (2) мутація F57I стабілізує А, В, С-спіралі та β -домен, і дестабілізує D-спіраль; (3) мутація I56T стабілізує В, С-спіралі та β -домен, дестабілізує D-спіраль та не впливає на А-спіраль; (4) мутація W64R стабілізує спіралі А, С, D і не впливає на стабільність В-спіралі та β -домену; (5) мутація Y54N стабілізує спіралі А та В, дестабілізує спіралі С та D та не впливає на β -домен; (6) мутація F57I/T70N дестабілізує β -домен та всі спіралі, за винятком А-спіралі; (7) мутація T70N/W112R стабілізує А, В-спіралі та β -домен, дестабілізує D-спіраль та не впливає на С-спіраль. У сукупності ці висновки свідчать про наступні основні тенденції: і) більшість мутацій стабілізують А- та В-спіралі та дестабілізують D-спіраль; ii) більшість мутацій стабілізує β -листи в β -домені або не впливає на них, і лише одна мутація, F57I/T70N, призводить до більш швидкої конверсії β -листів в β -повороти та невпорядковану структуру; iii) менша стабільність β -домену, у порівнянні з α -доменом загалом зберігається у F57I, I56T, W64R, Y54N, F57I/T70N та T70N/W112R, хоча і скомпрометована сильною дестабілізацією D-спіралі у F57I, Y54N, F57I/T70N та T70N/W112R.

Спостереження, що більшість амілоїдогенних мутацій роблять β -домен здатним підтримувати нативну β -структуру впродовж більш тривалого періоду часу підтверджує гіпотезу, що цей домен становить ядро амілоїдних фібрил лізоциму людини [237, 241].

5.2 МД симуляція мутантів інсуліну

Вважається, що на ранніх етапах фібрилізації гідрофобні взаємодії є основною рушійною силою, тому гідрофобні амінокислотні залишки розглядаються як потенційні сайти нуклеації фібрил [460, 461, 462]. З огляду

на це, на наступному етапі було проаналізовано вплив 10 точкових мутацій, шести подвійних та однієї потрійної мутації (Табл. 5.2), на стабільність та динаміку інсуліну людини, у порівнянні з диким типом білка, траєкторії яких були отримані в результаті 100 нс молекулярно-динамічних симуляцій при температурі 400 К. Вплив даних мутацій на фібрилізацію інсуліну досліджувався експериментально методами кругового дихроїзму, моніторингу кінетики утворення фібрил Тіофлавіном Т, трансмісійної електронної мікроскопії, інфрачервоної спектроскопії з Фур'є перетворенням, тощо [359, 463, 464].

У більшості досліджуваних мутантів поверхневі гідрофобні залишки заміщені на більш гідрофільні, що має призводити до послаблення гідрофобних взаємодій та схильності до утворення фібрил, що і спостерігалось для мутантів His^{A8}, Val^{A10}, Asp^{B10}, Gln^{B17}, Asp^{B25}, Glu^{A13}+Glu^{B10}, Asp^{B9}+Glu^{B27}, Glu^{B16}+Glu^{B27} та Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3}, в той час як Ala^{B17}, Gln^{B18}, Glu^{B27}, Asp^{B28} та Ser^{A13}+Glu^{B27} демонстрували поведінку, подібну до дикого типу інсуліну, а Thr^{B26}, Glu^{B1}+Glu^{B27} та Ser^{B2}+Asp^{B10} сприяли фібрилізації [359, 463, 464]. За даних умов моделювання не відбувалось повної втрати елементів вторинної структури та значного розгортання молекул білка.

Значення СКВ для мутантів та дикого типу, за винятком короточасних флуктуацій у випадку мутантів Asp^{B10}, Gln^{B17} та Ser^{B2}+Asp^{B10}, не перевищують 1 нм. Залежність середньоквадратичного відхилення остову поліпептидного ланцюга дикого типу інсуліну від часу, що наведено на Рис. 5.6, характеризується кількома періодами: 1) коливання навколо значення 0.3 нм зі значними флуктуаціями, що сягали до 0.9 нм, протягом перших 25 нс; 2) поступове (~3 нс) зростання СКВ до значень 0.66–0.78 нм та флуктуації на цьому рівні протягом ~8 нс; 3) з ~36 нс подальший спад значень СКВ до рівня 0.38-0.33 нм; 4) після 50 нс вихід на рівень 0.6–0.8 нм, що зберігався до кінця симуляції. В термінах СКВ більшість досліджуваних мутацій чинили стабілізуючий вплив на білкову молекулу. Криві залежності

СКВ від часу мутантів His^{A8}, Val^{A10}, Ala^{B17}, Asp^{B25}, Thr^{B26}, Glu^{B27}, Asp^{B28},

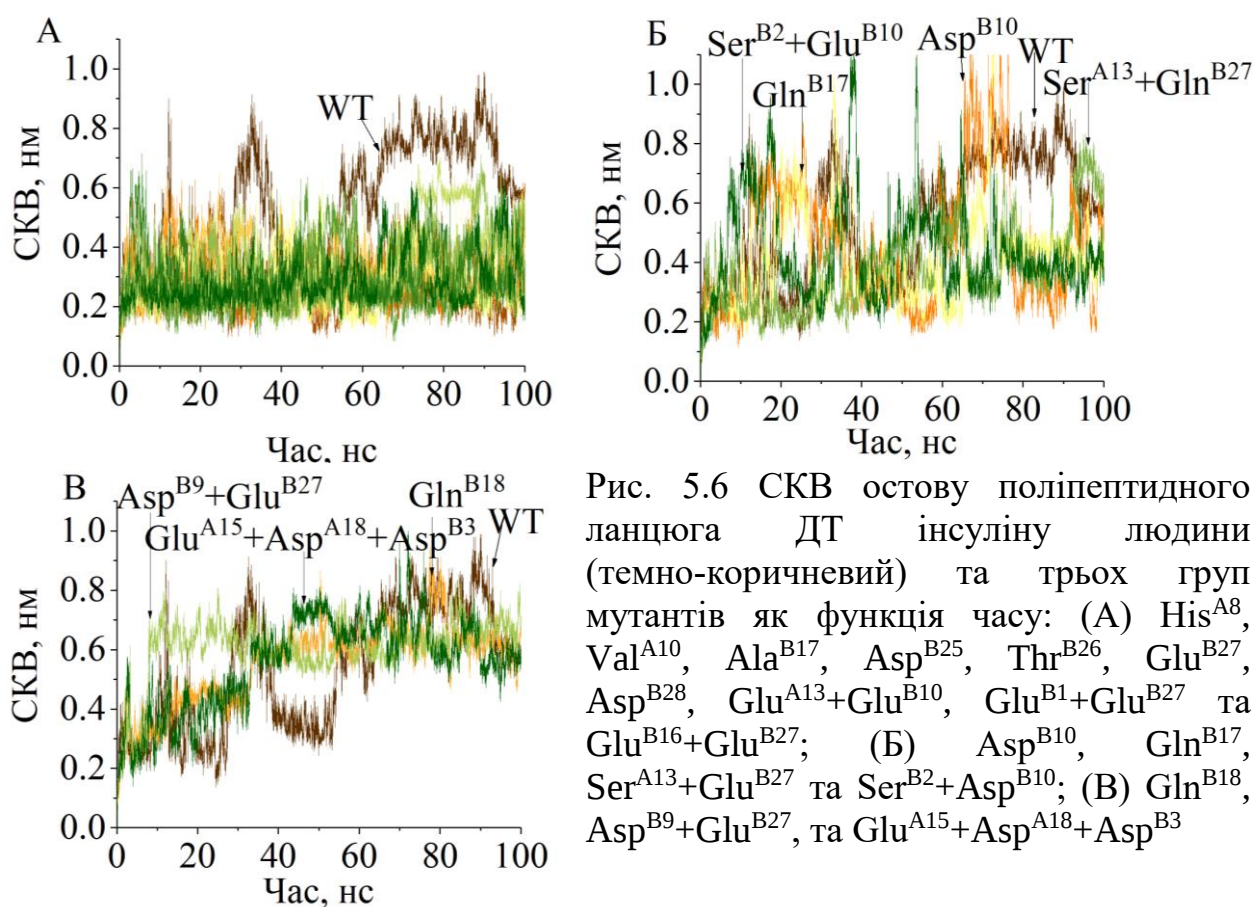


Рис. 5.6 СКВ остову поліпептидного ланцюга ДТ інсуліну людини (темно-коричневий) та трьох груп мутантів як функція часу: (А) His^{A8}, Val^{A10}, Ala^{B17}, Asp^{B25}, Thr^{B26}, Glu^{B27}, Asp^{B28}, Glu^{A13}+Glu^{B10}, Glu^{B1}+Glu^{B27} та Glu^{B16}+Glu^{B27}; (Б) Asp^{B10}, Gln^{B17}, Ser^{A13}+Glu^{B27} та Ser^{B2}+Asp^{B10}; (Б) Gln^{B18}, Asp^{B9}+Glu^{B27}, та Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3}

Glu^{A13}+Glu^{B10}, Glu^{B1}+Glu^{B27} та Glu^{B16}+Glu^{B27} переважну більшість часу симуляції знаходились значно нижче значень СКВ дикого типу білка. Менш стабілізуючими, згідно зі значеннями СКВ, виявились мутації Asp^{B10}, Gln^{B17}, Ser^{A13}+Glu^{B27} та Ser^{B2}+Asp^{B10}, в той час як Gln^{B18}, Asp^{B9}+Glu^{B27}, та Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3} демонстрували вищі значення СКВ протягом перших 60 нс молекулярно-динамічного моделювання та подібні до значень ДТ білка протягом останніх 40 нс. Також середньоквадратичне відхилення остову поліпептидного ланцюга від положення рівноваги було проаналізовано в термінах критерію розгортання – значення СКВ більше або рівне 0.7 нм протягом не менше однієї наносекунди. Було визначено, що ДТ білка досягає даного значення за $t_u \sim 32$ нс, тоді як всі мутанти, окрім п'яти, а саме

Ser^{B2}+Asp^{B10} ($t_u \sim 16$ нс), Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3} ($t_u \sim 50$ нс), Asp^{B10} ($t_u \sim 66$ нс), Gln^{B17} ($t_u \sim 72$ нс) та Gln^{B18} ($t_u \sim 79$ нс), не відповідають критерію розгортання. Варто зазначити, що оскільки при даній температурі не спостерігається повної втрати вторинної структури, білкові системи або повертаються в процесі симуляції до більш компактизованого стабільного стану, близького до рівноважного, як це має місце в ДТ та мутантах Asp^{B10}, Gln^{B17}, Ser^{B2}+Asp^{B10}, або поступово розгортаються протягом часу моделювання, виходячи на рівень значень СКВ ~ 0.6 нм, як це спостерігається для мутантів Gln^{B18}, Asp^{B9}+Glu^{B27}, Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3}, Ser^{A13}+Glu^{B27}. В обох випадках критерій розгортання є не зовсім доречним, однак за даних умов він може додатково демонструвати дестабілізуючий вплив введених мутацій.

Наступним критерієм, що дозволяє охарактеризувати вплив мутацій на стабільність білкової молекули є залежність середньоквадратичних флуктуацій С α -атомів від номеру залишку (Рис. 5.7). Для більшості залишків дикого типу інсуліну значення СКФ протягом усього часу моделювання знаходились в діапазоні 0.2–0.5 нм, окрім залишків з порядковим номером 22–26 (СКФ в межах 1.14–0.68 нм), що відповідають першим п'яти залишкам N-кінця ланцюга Б, та залишків 46–51 (0.52–1.0 нм), тобто останніх п'яти залишків С-кінця даного ланцюга.

Для всіх досліджуваних мутантів флуктуації на N- та С-кінцях ланцюга були найбільш значними, порівняно з іншими залишками, а величина даного ефекту залежить від введеної мутації, так, для мутантів Val^{A10}, Ala^{B17}, Asp^{B28}, Ser^{A13}+Glu^{B27}, Glu^{B1}+Glu^{B27} та Asp^{B9}+Glu^{B27} спостерігались сильні флуктуації з близькою амплітудою на обох кінцях ланцюга Б. Для мутантів Gln^{B18}, Glu^{B27} та Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3}, так само як для дикого типу білка, спостерігались більш значні флуктуації на N-кінці, порівняно з С-кінцем, для всіх інших варіантів білка, а в особливості для Asp^{B10}, Gln^{B17}, Glu^{A13}+Glu^{B10} та Ser^{B2}+Asp^{B10}, була характерна протилежна поведінка. Спостережувані ефекти узгоджуються з даними ЯМР та РСА, що вказували на підвищену

конформаційну гнучкість ланцюга Б, у порівнянні з іншою частиною молекули [465–467]. Однак незважаючи на це, для деяких мутантів

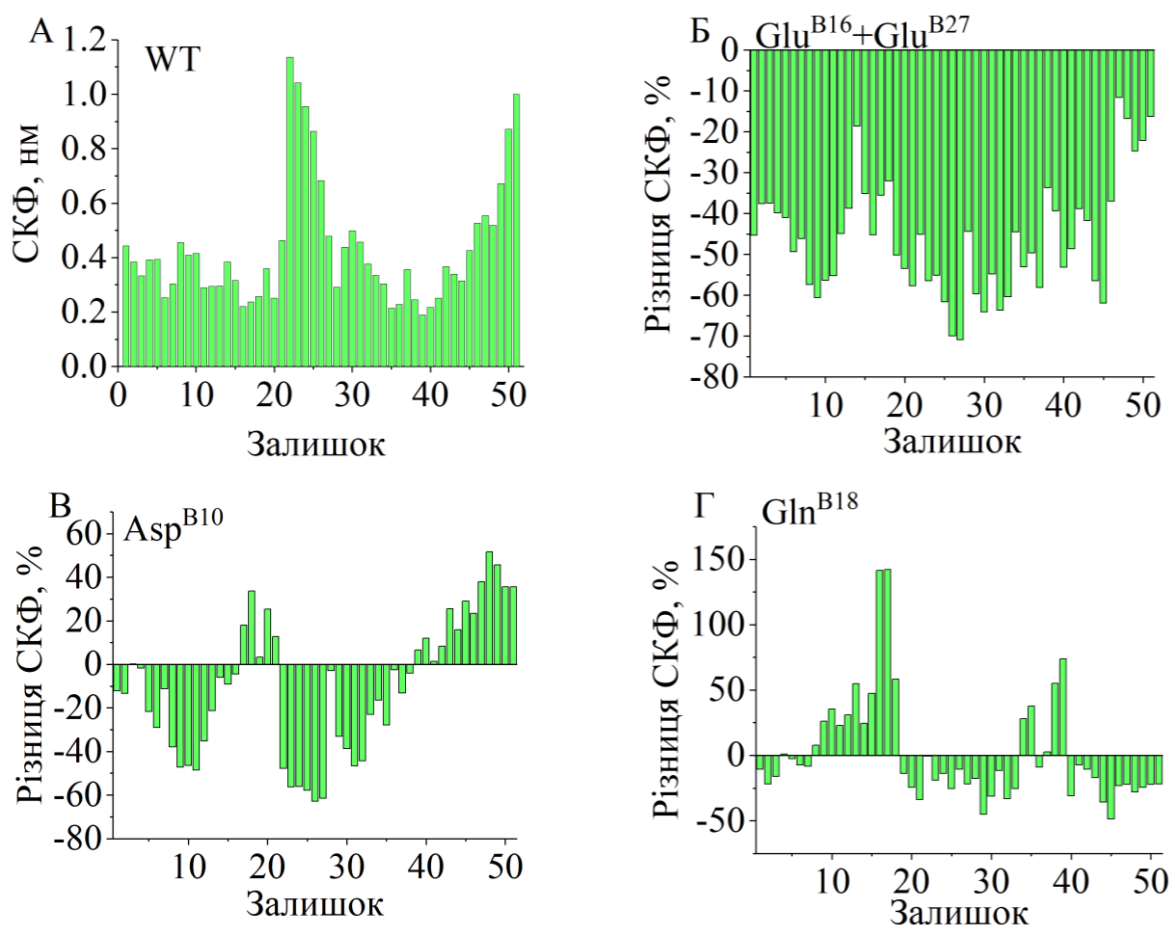


Рис. 5.7 Залежність середньоквадратичних флуктуацій C_{α} -атомів дикого типу інсуліну людини (А) від залишку та відносні зміни СКФ для трьох груп мутантів на прикладі Glu^{B16}+Glu^{B27} (Б), Asp^{B10} (В), Gln^{B18} (Г), розраховані як

$$\left(\frac{СКФ_{мут}}{СКФ_{дт}} - 1 \right) \cdot 100\%$$

спостерігались дещо вищі значення СКФ для залишків ланцюга А, ніж для амінокислотної послідовності середини ланцюга Б (~7–22), а саме Val^{A10} (залишки ланцюга А: 1–5, 13–15, 18–19), Gln^{B18} (8–10, 13–18), Asp^{B25} (1-5,10,12–15), Asp^{B28} (1–5, 12–15), Ser^{A13}+Glu^{B27} (1–5,11–14), Ser^{B2}+Asp^{B10} (1-4, 14), Glu^{A15}+ Asp^{A18}+Asp^{B3} (8–10). Як можна бачити із переліку, до таких залишків належать не тільки N-кінець ланцюга А, а і середні залишки поліпептидного ланцюга з 8-го по 19-й, значна частина яких, як відомо на

сьогодні, відповідає за стабілізацію фібрили людського лізоциму. Також можна помітити відсутність кореляції між введенням мутації та посиленням флуктуацій даного залишку. На основі експериментальних даних було висловлено припущення, що локальне розгортання залишків B11–B17 прискорює швидкість фібрилізації [468], однак для більшості мутантів флуктуації даних залишків були меншими, ніж для дикого типу білка.

При порівнянні мутантів з ДТ за параметром СКФ можна помітити, що мутації His^{A8}, Val^{A10}, Ala^{B17}, Asp^{B25}, Thr^{B26}, Glu^{B27}, Glu^{A13+Glu^{B10}}, Glu^{B1+Glu^{B27}}, Glu^{B16+Glu^{B27}} демонструють стабілізуючий вплив на всі залишки білкової молекули (окрім Asp^{B25}, для якого спостерігались більші на 10 %, ніж в ДТ, флуктуації для двох залишків – A13 та A15), причому різниця між значеннями СКФ мутантів та ДТ сягала до 74 %. Менш стабілізуючий вплив виявляли мутації Asp^{B9+Glu^{B27}} (залишки A17, B6, B7 та B9 демонстрували вищі на 10 % значення флуктуації C α -атомів, ніж ДТ; найбільша від’ємна різниця між мутантом та ДТ становила 51 %), Glu^{A15+Asp^{A18+Asp^{B3}}} (A10, A18, B17, B18, B24, B26 до 10 %; максимальна різниця – 39 %), Asp^{B28} (A2, A3, A12–A15 до 35 %; різниця до 56 %), Gln^{B17} (A18, A20, B17, B18, B21–B30 до 31 %; різниця сягала до 67%), Asp^{B10} (A17–A21 та B18–B30 до 52 %, різниця до 67 %), Ser^{A13+Glu^{B27}} (A1–A4, A11–A15, B18 до 65 %, різниця до 57 %), Ser^{B2+Asp^{B10}} (A1–A4, A18, B17, B18, B21–B30 до 76 %, різниця до 66 %). Найбільш значні флуктуації спостерігались для мутанту Gln^{B18}, для якого значення СКФ для залишків A4, A8–A18 переважало над флуктуаціями даних залишків в дикому типі протягом симуляції до 141 %, а для чотирьох залишків ланцюга Б (B13, B14, B17, B18) – до 73 %, найменше від’ємне значення між даним мутантом та ДТ – 49 %. Таким чином, якщо врахувати три параметри: (1) кількість залишків, що флуктують сильніше, ніж в дикому типі білка, максимальну (2) позитивну та (3) негативну відносну різницю в процентах, отримуємо, що дестабілізуючий вплив мутацій за параметром СКФ зростає у ряді: Asp^{B25} < Asp^{B9+Glu^{B27}} < Glu^{A15+Asp^{A18+Asp^{B3}}} < Gln^{B17} < Asp^{B28} < Asp^{B10} < Ser^{A13+Glu^{B27}} < Ser^{B2+Asp^{B10}} < Gln^{B18}. Цікаво

також відзначити, що сильніші флуктуації в мутантах, порівняно з диким типом інсуліну спостерігались, здебільшого, у ланцюзі Б (мутанти Asp^{B9}+Glu^{B27}, Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3}, Gln^{B17}, Asp^{B10}, Ser^{B2}+Asp^{B10}), особливо в С-кінці даного ланцюга (окрім мутації Asp^{B9}+Glu^{B27}). Мутанти Asp^{B28}, Ser^{A13}+Glu^{B27}, Gln^{B18}, навпаки, демонстрували більш значні флуктуації у ланцюзі А, причому залишки належали до фрагменту А8 – А18, що відіграє значну роль у підтриманні структурної цілісності модельної амілоїдної фібрили інсуліну людини, сформованої з дикого типу білка [275, 279]. Ще однією частиною ланцюга А, в якій спостерігались значні флуктуації у порівнянні з диким типом – є перші чотири залишки А1–А4, що обумовлюється їх більшою рухливістю, порівняно з іншими, більш впорядкованими та зануреними в білкову глобулу залишками.

Радіус інерції дикого типу інсуліну протягом симуляції демонстрував кілька періодів розгортання та компактизації молекули білка, що перші 50 нс позитивно корелює із зростанням та спадом значень СКВ остову білкової молекули (Рис. 5.8), однак після половини симуляції, незважаючи на досить високий рівень значень СКВ, параметр РІ демонструє повернення молекули до компактизованого стану протягом ~ 65–85 нс, що, можливо, вказує на досягнення компактного, але конфігураційно далекого від нативного стану, який втрачається під кінець досліджуваної траєкторії. РІ дикого типу інсуліну протягом симуляції знаходиться у межах від 1 до 1.34 нм, а при апроксимації залежності радіусу інерції від часу лінійною функцією можна помітити, що нахил графіку збільшується з часом від ~ 1.07 нм на початку симуляції до ~ 1.1 нм при 100 нс.

Апроксимація графіків РІ від часу лінійною функцією дозволила розділити мутанти в залежності від впливу на параметр компактності молекули. Таким чином, до мутацій, що чинили стабілізуючий вплив, судячи з параметру РІ (пряма апроксимації значно нижче, ніж лінія апроксимації

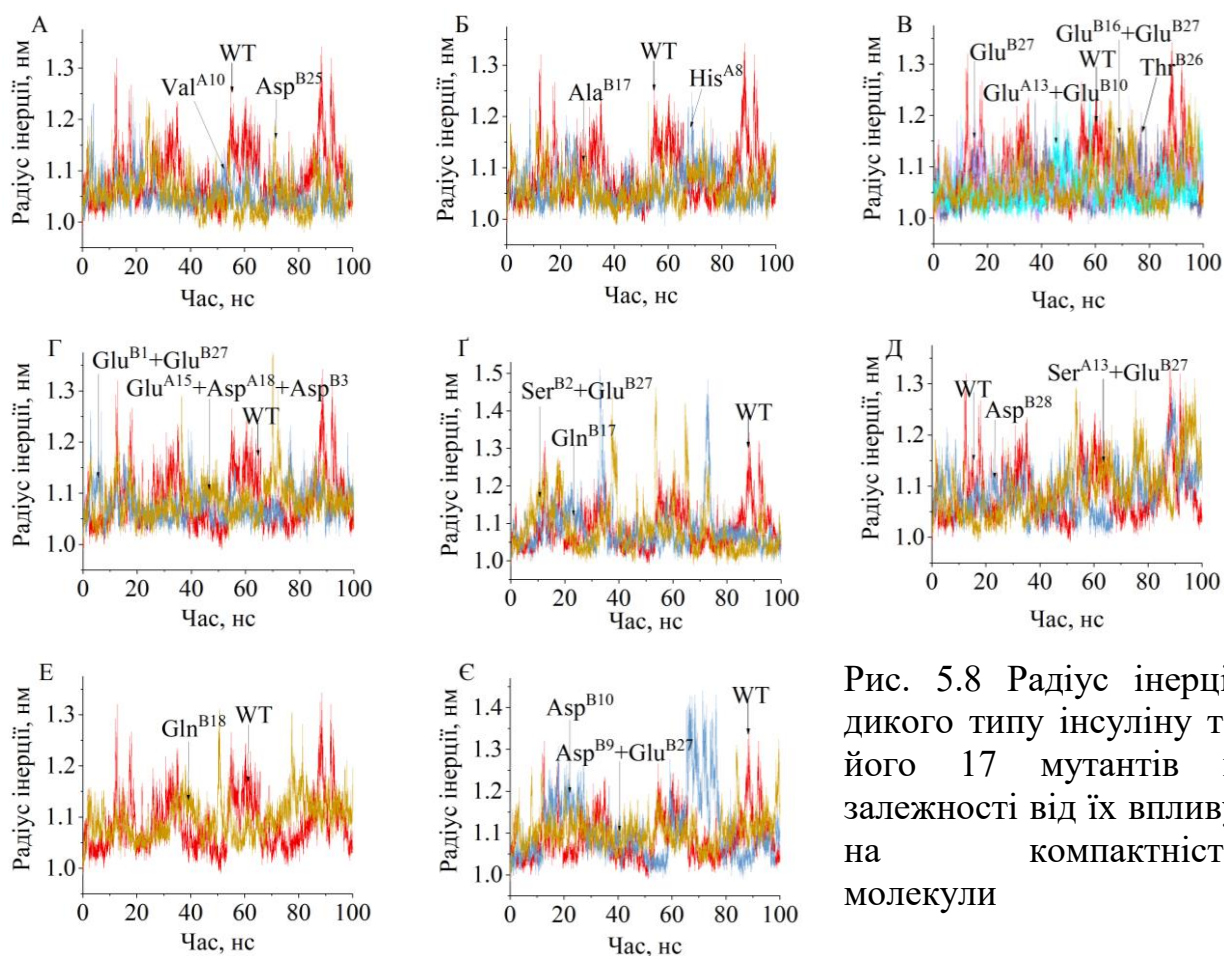


Рис. 5.8 Радіус інерції дикого типу інсуліну та його 17 мутантів в залежності від їх впливу на компактність молекули

дикого типу інсуліну) належать Glu^{A13}+Glu^{B10}, Glu^{B16}+Glu^{B27}, Thr^{B26}, Glu^{B27}, His^{A8}, Ala^{B17}, Val^{A10}, Asp^{B25}, причому нахил даних прямих апроксимації вказує на зростання радіусу інерції з часом (Рис. 5.8В), окрім мутантів His^{A8}, Ala^{B17}, пряма апроксимації яких залишається майже на місці (Рис. 5.8Б), та Val^{A10}, Asp^{B25}, для яких спостерігається спад (Рис. 5.8А). До наступної групи можна віднести мутації Glu^{B1}+Glu^{B27}, Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3}, Ser^{B2}+Asp^{B10}, Gln^{B17}, Asp^{B28}, Ser^{A13}+Glu^{B27} та Gln^{B18}, які знаходяться досить близько від лінії апроксимації дикого типу або перетинають її. Вплив мутацій даної групи на характер залежності РІ від часу досить різноманітний, так, для мутантів Glu^{B1}+Glu^{B27} та Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3} лінія апроксимації проходить трохи нижче прямої для дикого типу та вказує на зростання РІ (Рис. 5.8Г), для мутантів Ser^{B2}+Asp^{B10} та Gln^{B17} (Рис. 5.8Г) характерним є значне розгортання молекули на початку симуляції, та перехід у більш компактний стан після половини траєкторії (лінії апроксимації спадають, перетинаючи пряму ДТ

після 40 нс). Для білків з мутаціями Asp^{B28} та Ser^{A13}+Glu^{B27} (Рис. 5.8Д) спостерігається зростання радіусу інерції та більш розгорнутий стан у другій половині симуляції, ніж в ДТ (лінії апроксимації зростають, перетинаючи пряму ДТ після 40 нс), радіус інерції мутанту Gln^{B18} теж збільшується та апроксимована пряма знаходиться дещо вище лінії ДТ протягом всієї симуляції (Рис. 5.8Е). Два мутанти Asp^{B10} та Asp^{B9}+Glu^{B27} (Рис. 5.8Є), апроксимовані лінії яких знаходились значно вище ДТ, хоч і зростали в процесі симуляції менш стрімко, ніж апроксимація дикого типу, були віднесені в останню групу, як більш розгорнуті протягом всього часу моделювання, порівняно з ДТ білка.

ППДР є важливим параметром, що вказує на розгортання молекули протягом симуляції та зміни в оточенні гідрофобних залишків, що зазвичай, в нативному стані, занурені вглиб білкової молекули. Аналіз залежності площі поверхні, яка доступна для розчинника, від залишку виявив, що для дикого типу білка параметр ППДР не перевищує 1.8 нм², та найбільш доступними (значення ППДР більше 1 нм²) для розчинника за даних умов симуляції виявились полярні залишки в позиціях А5, А8, А21, Б4, позитивно (Б5, Б10, Б22, Б29) та негативно (А4, Б13, Б21) заряджені, ряд ароматичних (А14, Б1, Б16, Б25, Б26) та три неполярних амінокислотних залишки в позиціях А10, Б17 та Б30 (Рис. 5.9).

Варто зазначити, що для всіх введених в білкову молекулу мутацій розподіл ППДР на залишок був схожим з типовими, як і для дикого типу інсуліну, найбільш доступними для розчинника залишками А14, Б1, Б21 та Б29 (окрім мутації Ser^{A13}+Glu^{B27}, для якої А14 не відрізнявся з-поміж інших залишків). При більш детальному порівнянні мутантів з диким типом виявилось, що по кількості залишків, значення ППДР яких знаходяться вище значень даного параметру для дикого типу, мутанти можуть бути розташовані за зростанням кількості залишків (від 17 до 28) наступним

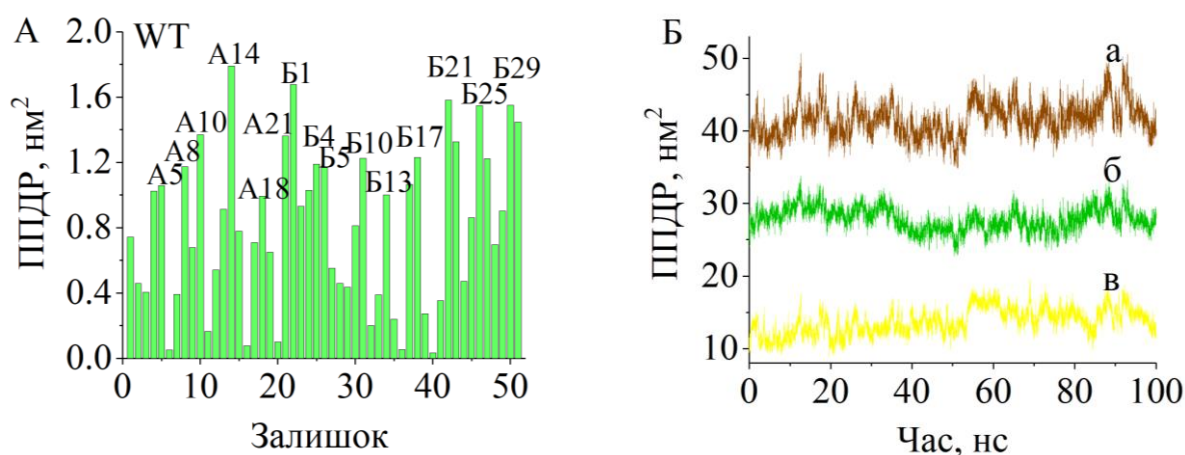


Рис. 5.9. Залежність площі поверхні, що доступна для розчинника, від номера залишку (А) та зміни від часу загальної (а), гідрофобної (б) та гідрофільної (в) ППДР для дикого типу інсуліну (Б).

чином: $\text{Ala}^{\text{B17}} = \text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Glu}^{\text{B16}} + \text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Val}^{\text{A10}}, \text{Glu}^{\text{A13}} + \text{Glu}^{\text{B10}} = \text{Thr}^{\text{B26}} = \text{His}^{\text{A8}}, \text{Gln}^{\text{B18}} < \text{Glu}^{\text{B1}} + \text{Glu}^{\text{B27}} = \text{Asp}^{\text{B25}} < \text{Gln}^{\text{B17}} < \text{Ser}^{\text{A13}} + \text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Asp}^{\text{B28}}, \text{Ser}^{\text{B2}} + \text{Asp}^{\text{B10}} = \text{Glu}^{\text{A15}} + \text{Asp}^{\text{A18}} + \text{Asp}^{\text{B3}} < \text{Asp}^{\text{B9}} + \text{Glu}^{\text{B27}} = \text{Asp}^{\text{B10}}$. Варто зазначити, що даний ряд корелює із трьома групами мутантів, сформованими відповідно до впливу на радіус інерції. Таким чином, мутанти, що протягом симуляції зберігали більш компактний нативноподібний стан, ніж дикий тип, знаходяться на початку ряду, в той час, як $\text{Asp}^{\text{B9}} + \text{Glu}^{\text{B27}}$ та Asp^{B10} характеризуються збільшенням кількості залишків з підвищеним значенням параметру ППДР, що вказує на більш сильне розгортання даних молекул, порівняно з ДТ. Цікаво зазначити, що, практично незалежно від характеру введеної мутації, всі залишки можна розділити на дві групи, залежно від збільшення або зменшення параметру ППДР під впливом мутації, порівняно з ДТ. Для переважної більшості мутантів (більш ніж половини) спостерігалось зростання значення параметру ППДР для залишків А4, А7, А17, А20, В1, В7, В9, В12, В13, В16–В22, В47 та В29, в той час як для другої групи (А1–А3, А5, А6, А8–А14, А16, А19, А21, В2–В6, В8, В10, В11, В14, В15, В23–В25, В28, В30) спостерігався спад значень ППДР порівняно з ДТ. Слід зазначити, що частка гідрофобних залишків у першій групі становила $\sim 32\%$, в той як в другій – 63% , тобто для більшості мутованих білків переважно

спостерігалось зменшення доступності розчиннику гідрофобних (неполярних та ароматичних) залишків порівняно з ДТ.

Для того, щоб більш детально дослідити вклад гідрофобних та гідрофільних залишків в загальне значення площі поверхні, що доступна розчиннику, було проаналізовано зміни ППДР в часі для трьох груп залишків. Апроксимація лінійною функцією часової еволюції площі поверхні, що доступна розчиннику, розрахованої для всіх залишків (загальна площа) та окремо для гідрофобних та гідрофільних залишків, дозволила виявити наступні тенденції:

- 1) Для мутантів Asp^{B10}, Ala^{B17}, Gln^{B18}, Thr^{B26}, Asp^{B28}, Glu^{A13}+Glu^{B10}, Ser^{A13}+Glu^{B27} та Glu^{B16}+Glu^{B27} спостерігалось зростання з часом загальної площі поверхні, що доступна розчиннику, разом із площами гідрофобних та гідрофільних залишків;
- 2) для дикого типу інсуліну та мутантів Glu^{B27}, Glu^{A15}+Asp^{A18}+Asp^{B3}, Asp^{B9}+Glu^{B27} загальна ППДР зростає в часі за рахунок збільшення доступності розчиннику гідрофобних залишків, в той час як площа гідрофільних амінокислотних залишків падає;
- 3) незначний ріст загальної ППДР мутантів His^{A8} та Glu^{B1}+Glu^{B27} завдяки збільшенню в часі площі поверхні, що доступна для розчинника гідрофільних залишків, а ППДР гідрофобних залишків, навпаки, падає з часом;
- 4) незважаючи на ріст площі гідрофобних частин молекули з часом симуляції мутанту Gln^{B17}, загальна ППДР зменшується за рахунок спаду ППДР гідрофільних залишків;
- 5) Зменшення ППДР для обох типів залишків було виявлене для мутантів Val^{A10}, Asp^{B25}, Ser^{B2}+Asp^{B10}.

Цікаво також зазначити, що молекули інсуліну з мутаціями Gln^{B18}, Asp^{B28}, Ser^{A13}+Glu^{B27} та Asp^{B9}+Glu^{B27} наприкінці симуляції демонстрували дещо вище значення загальної ППДР порівняно з ДТ, в той час як для всіх інших мутантів лінії апроксимації не перевищували пряму дикого типу.

Вочевидь, дане спостереження корелює із значним масивом залишків (30 із 51), що для більшості мутантів знаходяться нижче значень площі поверхні, що доступна розчиннику, відповідних залишків дикого типу білка.

Таблиця 5.2

Процентне співвідношення залишків, що перебували в α -спіральної, β -листовій конформації та в конформації 3_{10} –спіралі до залишків в інших конформаціях, усереднене за часом симуляції

Варіант білка	β -лист	α -спіраль	3_{10} –спіраль
WT	0.04	46.0	3.1
His ^{A8}	0.18	45.0	1.7
Val ^{A10}	0.02	44.5	2.7
Asp ^{B10}	0.16	47.0	1.7
Gln ^{B17}	1.73	50.0	1.2
Ala ^{B17}	0.08	44.9	2.4
Gln ^{B18}	0.04	36.1	4.6
Asp ^{B25}	0.15	43.7	2.1
Thr ^{B26}	0.08	44.7	3.1
Glu ^{B27}	0.24	45.7	2.5
Asp ^{B28}	0.72	38.6	3.7
Glu ^{A13} +Glu ^{B10}	0.87	45.8	1.5
Ser ^{A13} +Glu ^{B27}	0.30	37.0	3.7
Glu ^{B1} +Glu ^{B27}	2.08	44.5	2.9
Ser ^{B2} +Asp ^{B10}	0.08	47.5	1.3
Asp ^{B9} +Glu ^{B27}	0	34.7	5.0
Glu ^{B16} +Glu ^{B27}	0.30	44.3	2.6
Glu ^{A15} + Asp ^{A18} +Asp ^{B3}	0	46.7	4.3

На наступному кроці було проаналізовано зміни, викликані мутаціями в часовій еволюції елементів вторинної структури. Було визначено, яка

частина білка знаходилась в α -спіральной, β -листовій конформації та в конформації 3_{10} -спіралі в процентах за весь час симуляції (Табл 5.2). Виявилось, що в залежності від мутації, процент α -спіральної конформації, розрахований для всієї молекули білка, зростав від 35 % до 50 % у ряду: $\text{Asp}^{\text{B9}}+\text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Gln}^{\text{B18}} < \text{Ser}^{\text{A13}}+\text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Asp}^{\text{B28}} < \text{Asp}^{\text{B25}} < \text{Glu}^{\text{B16}}+\text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Glu}^{\text{B1}}+\text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Val}^{\text{A10}} < \text{Thr}^{\text{B26}} < \text{Ala}^{\text{B17}} < \text{His}^{\text{A8}} < \text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Glu}^{\text{A13}}+\text{Glu}^{\text{B10}} < \text{WT} < \text{Glu}^{\text{A15}}+\text{Asp}^{\text{A18}}+\text{Asp}^{\text{B3}} < \text{Ser}^{\text{B2}}+\text{Asp}^{\text{B10}} < \text{Asp}^{\text{B10}} < \text{Gln}^{\text{B17}}$. Оскільки початково в молекулі інсуліну присутні 3 α -спіралі з процентним вмістом 47 %, то даний ряд більш ймовірно свідчить як про ступінь руйнування нативних спіралей протягом симуляції, так і про появу додаткової спіральної конформації, порівняно з нативним станом. У той же час, процент утворюваних β -листів (в нативній структурі дані елементи вторинної структури відсутні) знаходився в діапазоні від 0 до 2 % у такій послідовності мутантів: $\text{Asp}^{\text{B9}}+\text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Glu}^{\text{A15}} < \text{Asp}^{\text{A18}}+\text{Asp}^{\text{B3}} < \text{Val}^{\text{A10}} < \text{WT} < \text{Gln}^{\text{B18}} < \text{Ser}^{\text{B2}}+\text{Asp}^{\text{B10}} < \text{Thr}^{\text{B26}} < \text{Ala}^{\text{B17}} < \text{Asp}^{\text{B25}} < \text{Asp}^{\text{B10}} < \text{His}^{\text{A8}} < \text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Glu}^{\text{B16}}+\text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Ser}^{\text{A13}}+\text{Glu}^{\text{B27}} < \text{Asp}^{\text{B28}} < \text{Glu}^{\text{A13}}+\text{Glu}^{\text{B10}} < \text{Gln}^{\text{B17}} < \text{Glu}^{\text{B1}}+\text{Glu}^{\text{B27}}$.

Варто зазначити, що такі усереднені параметри демонструють загальні тенденції, але потребують більш детального аналізу, тому на наступному кроці було проаналізовано еволюцію вмісту α -спіралей з часом (Рис. 5.10). Для дикого типу інсуліну було виявлено такі зміни спіральності протягом часу моделювання: перші 25 нс симуляції спостерігались флуктуації на рівні ~ 42 % (33 – 51 %), потім з 25 нс до ~ 40 нс відбувалось зростання процентного вмісту α -спіралей (діапазон 39–60 %), весь наступний час спостерігалась загальна тенденція до зменшення вмісту спіральних конформацій з досягненням первісного рівня флуктуацій наприкінці симуляції. Крива залежності вмісту α -спіралей від часу для мутанту $\text{Glu}^{\text{A15}}+\text{Asp}^{\text{A18}}+\text{Asp}^{\text{B3}}$ майже повністю повторила часові зміни, спостережувані для дикого типу, в той час як флуктуації спіральності половини мутантних білків знаходились в межах від ~ 33 % до ~ 51 % протягом всього часу

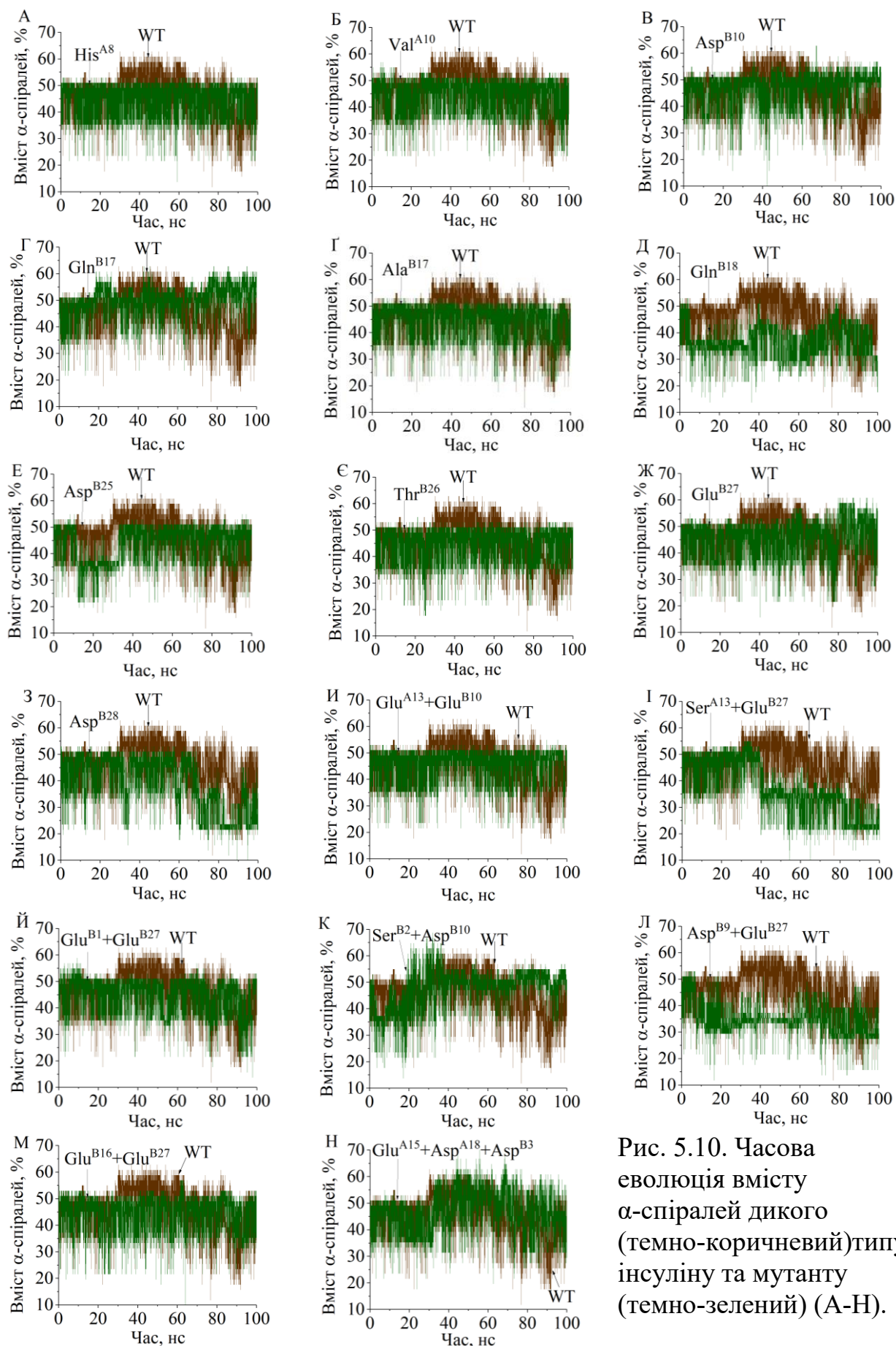


Рис. 5.10. Часова еволюція вмісту α -спіралей дикого (темно-коричневий) типу інсуліну та мутанту (темно-зелений) (А-Н).

симуляції (мутанти Glu^{B1}+Glu^{B27}, Glu^{B16}+Glu^{B27}, His^{A8}, Val^{A10}, Ala^{B17}, Thr^{B26}, Glu^{B27}, Glu^{A13}+Glu^{B10}), що вказує на досить значну стабільність вторинної структури за даних умов симуляції. Спіральність білкової молекули з подвійною мутацією Ser^{B2}+Asp^{B10} спадала до 22–37 % за перші 5 нс, далі слідувало зростання вмісту спіральності до досягнення діапазону 33–61%, а після 40 нс симуляції значення даного параметру знаходились в межах 36–54 %. Для мутантів Asp^{B10} та Gln^{B17} спостерігалось незначне збільшення вмісту спіральної конформації протягом всього часу симуляції з досягненням діапазону ~ 47–54 % та ~ 46–61 %, відповідно. Досить значний спад вмісту α -спіралей слід відмітити для 5 мутантів: Asp^{B25} (~ 25–38 % протягом 11–33 нс), Asp^{B28} (~ 22–36 % після 70 нс), Ser^{A13}+Glu^{B27} (~ 22–36 після 38 нс), Gln^{B18} (~ 29–46 % після 5 нс) та Asp^{B9}+Glu^{B27} (~ 28–44 % після 7 нс).

Отже, за даних умов симуляції досліджувані мутантні варіанти не демонстрували різких відмінностей від дикого типу за молекулярно-динамічними параметрами, що узгоджується із експериментальними даними [359].

Висновки до розділу 5

Підводячи підсумок, результати даного розділу вказують на те, що мутації можуть мати різний вплив на структурно-динамічні властивості лізоциму та інсуліну людини. На основі моніторингу змін параметрів, що характеризують як глобальну так і локальну структуру білка, таких як середньоквадратичне відхилення остову ланцюга, радіус інерції, площа поверхні, що доступна для розчинника, середньоквадратичні флуктуації та вміст вторинної структури, а також застосовуючи різні критерії, що характеризують втрату як третинної, так і вторинної структур білка під час теплового розгортання було показано, що:

1. Залежно від часової еволюції інтегральних характеристик досліджувані мутанти лізоциму людини можна умовно розділити на три групи, в яких СКВ, PI, ППДР зростають швидше (Y54N та F57I/T70N), подібно (D67H

та I56T) та повільніше (W64, F57I та T70N/W112R) щодо дикого типу білка.

2. За характером впливу мутацій на структурну стабільність молекули інсуліну можна виділити три групи мутантів: (а) Вісім досліджуваних мутантів із 17 чинили стабілізуючий вплив на молекулу інсуліну, судячи з поведінки більшості молекулярно-динамічних параметрів: HisA8, ValA10, AlaB17, AspB25, ThrB26, GluB27, GluA13+GluB10, GluB1+GluB27, GluB16+GluB27; (б) менш стабілізуючий вплив демонстрували мутанти GlnB17, AspB28, AspB10, SerB2+AspB10, GluA15+AspA18+AspB3; (в) AspB9+GluB27, SerA13+GluB27 та GlnB18 виявились найбільш дестабілізуючими порівняно з диким типом.
3. Більшість мутантів лізоциму демонструють вищу гнучкість C- і D-спіралей, у порівнянні з ДТ лізоциму людини, за винятком W64R та Y54N, які демонструють помітне зменшення (W64R) або збільшення (Y54N) рухливості майже всіх залишків. Аналіз еволюції вторинної структури показав, що α -домен, як правило, є більш стабільним ніж β -домен, хоча характер розгортання окремих α -спіралей залежить від мутації.
4. Досліджені мутантні варіанти інсуліну людини не демонстрували різких відмінностей від дикого типу за молекулярно-динамічними параметрами, що узгоджується із експериментальними даними. Найбільший вміст утворюваних β -листів протягом симуляції спостерігався для мутантів GlnB17 та GluB1+GluB27, в той час як для мутантів SerB2+AspB10, AspB10 та GlnB17 виявлено утворення додаткової спіральної конформації, порівняно з нативним станом.
5. У сукупності, результати молекулярно-динамічного моделювання лізоциму людини підтверджують думку те, що глобальна структурна дестабілізація амілоїдогенних мутантів не є єдиним детермінантом місфолдингу білка, а, локальні зміни конформації та динаміки

поліпептидного ланцюга також можуть відігравати важливу роль у формуванні амілоїдних фібрил.

6. Результати молекулярно-динамічного моделювання інсуліну людини свідчать про загальні тенденції зростання стабільності мутантів при заміні неполярних залишків більш гідрофільними, що в експериментальних умовах призводило до руйнування необхідних для процесу фібрилізації міжмолекулярних гідрофобних контактів, а в умовах моделювання вказує на утрудненість формування амілоїдних фібрил за рахунок довшого часу, необхідного для переходу в агрегаційно-компетентну конформацію. Зменшення структурної стабільності, виявлене для мутантів AspB28, SerB2+AspB10, SerA13+GluB27 та GlnB18, можливо, також вносить вклад в пришвидшення нуклеації в процесі фібрилогенезу даних мутантів, порівняно з іншими варіантами.

Основні результати цього розділу викладені в роботах: [2]; [14]; [15].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі зроблено внесок у вирішення однієї з важливих проблем сучасної фізики біополімерів – встановлення молекулярних механізмів структурного переходу білків із нативної конформації в агрегований фібрилярний стан.

1. Проведено дослідження взаємодії нових гептаметинових та триметинових ціанінових барвників з мономерною і фібрилярною формами лізоциму та інсуліну. Виявлені закономірності впливу різних форм білків на агрегаційну поведінку ціанінів у водній фазі. Продемонстровано, що значне зниження ступеня Н-агрегації може слугувати одним із критеріїв наявності амілоїдних фібрил.
2. Запропонована модель білок-індукованого зсуву рівноваги між мономерами, Н-димерами та Н-агрегатами гептаметинів, визначені термодинамічні константи процесу самоасоціації барвників та порядок агрегації. Показано, що мономери та Н-димери є домінуючими формами зв'язаних з фібрилами ціанінів.
3. Встановлено, що амілоїд-специфічні зміни флуоресцентних параметрів триметинів включають значне зростання квантового виходу барвників та батохромний зсув максимуму спектрів флуоресценції.
4. На основі аналізу залежності спектральних ефектів від хімічної структури барвників показано, що наявність ОН-груп аліфатичних замісників на атомі азоту в бензотіазоловій частині хромофору призводить до істотного зниження амілоїдної чутливості триметинів.
5. Запропоновано нову методику детектування та структурного аналізу амілоїдних фібрил, що базується на вимірюванні ефективності каскадного Фьорстерівського резонансного переносу енергії у донорно-акцепторному ланцюгу, що включав класичний амілоїдний маркер Тіофлавін Т як головний донор, сквараїн SQ1 як термінальний акцептор та два медіатори. Показано, що бензантронові барвники з

піперидиновим та морфоліновим циклами є найбільш ефективними медіаторами переносу енергії.

6. Методом молекулярного докінгу показано, що, подібно до типових амілоїдних маркерів, досліджувані ціанінові, бензантронові та сквараїнові барвники характеризуються здатністю зв'язуватись зі специфічними структурними елементами фібрилярних агрегатів – поверхневими жолобками β -листів.
7. Встановлено, що амілоїдогенні мутації лізоциму та інсуліну можуть призводити як до глобальної структурної дестабілізації білків, так і до локальних модифікацій конформації та динаміки окремих областей поліпептидного ланцюга. Отримано докази на користь того, що мутації Y54N та F57I/T70N лізоциму та мутації Ser^{A13}+Glu^{B27} та Gln^{B18} інсуліну мають найбільш дестабілізуючий вплив на структуру білків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tarabara U., Vus K., Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel trimethine cyanine dye as potential amyloid marker // *East. Eur. J. Phys.* 2018. Vol. 5. No. 4. P. 22–29.
2. Tarabara U., Trusova V., Vus K., Ryzhova O., Gorbenko G. Molecular dynamics study of amyloidogenic mutants of human lysozyme // *East. Eur. J. Phys.* 2018. Vol. 5. P. 30–39.
3. Tarabara U., Vus K., Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel cyanine dyes as potential amyloid probes: a fluorescence study // *East. Eur. J. Phys.* 2018. Vol. 5. P. 41–46.
4. Tarabara U., Shchuka M., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Three-step resonance energy transfer in insulin amyloid fibrils // *East Eur. J. Phys.* 2019. Vol. 4. P. 58–69.
5. Vus K., Tarabara U., Kurutos A., Ryzhova O., Gorbenko G., Trusova V., Gadjev N., Deligeorgiev T. Aggregation behavior of novel heptamethine cyanine dyes upon their binding to native and fibrillar lysozyme // *Mol. Biosyst.* 2017. Vol. 13. P. 970–980.
6. Zhytniakivska O., Kurutos A., Tarabara U., Vus K., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Probing the amyloid protein aggregates with unsymmetrical monocationic trimethine cyanine dyes // *J. Mol. Liq.* 2020. Vol. 311. Article number 113287.
7. Tarabara U., Vus K., Shchuka M., Kirilova E., Kirilov G., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G., Deligeorgiev T. Cascade energy transfer in insulin amyloid fibrils doped by Thioflavin T, benzanthrone and squaraine dyes // *East Eur. J. Phys.* 2020. Vol. 1. P. 103–110.
8. Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Benzanthrone dyes as mediators of cascade energy transfer in insulin amyloid fibrils // *J. Mol. Liq.* 2021. Vol. 324. Article number 115102.

9. Tarabara U., Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Modulating effect of biomolecules on aggregation behavior of novel heptamethine dyes // Luminescent processes in condensed state of matter : 4th International Scientific and Technical Conference for Young Scientists, 07-09 October, 2015. : abstr. Kharkiv, 2015. P. 64.
10. Тарабара У. К. Фотофізичні властивості пентаметинових флуорофорів // Актуальні проблеми сучасної фізики : Студентська наукова конференція з прикладної фізики до 90-річчя Д. В. Волкова, 13 листопада 2015 р. : тези доп. Харків, 2015. С. 58–60.
11. Tarabara U., Ryzhova O., Trusova V., Kurutos A. The possibility of differentiating between native and amyloid-aggregated states of lysozyme with a novel heptamethine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : X International young scientists' conference, 2–4 December, 2015. : abstr. Kharkiv, 2015. P. 29.
12. Tarabara U. K., Vus K. O. Detection of lysozyme amyloid fibrils by the new heptamethine cyanine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : XI International young scientists' conference, 29 November – 2 December, 2016. : abstr. Kharkiv, 2016. P. 23–24.
13. Tarabara U., Vus K., Trusova V., Gorbenko G. Quantitative description of lysozyme-modulated aggregation of heptamethine cyanine dye // II International Young Scientists Forum on Applied Physics and Engineering, 10–14 October, 2016. : abstr. Kharkiv, 2016, BMP 6.
14. Tarabara U. K., Vus K. O., Ryzhova O. A. Novel heptamethine cyanine dyes as potential amyloid markers // Biology: from a molecule up to the biosphere : XII International young scientists' conference, 29 November – 1 December, 2017. : abstr. Kharkiv, 2017. P. 20–21.
15. Tarabara U. K. Fluorescence and molecular dynamic study of lysozyme amyloid fibrils // Актуальні проблеми сучасної фізики : Студентська наукова конференція з прикладної фізики до 55-річчя Фізико-технічного факультету, 24 листопада 2017 р. : тези доп. Харків, 2017. С. 62–64.

16. Tarabara U., Trusova V., Vus K. Molecular dynamic simulations of human lysozyme and its amyloidogenic mutants // Youth and progress of biology : The XIII International scientific conference for students and PhD students, 25-27 April, 2017. : abstr. Lviv, 2017. P. 20–21.
17. Tarabara U., Vus K., Ryzhova O., Gorbenko G., Trusova V. The mechanism of cyanine dye binding to lysozyme amyloid fibrils // Current chemical problems : X Ukrainian scientific conference for students and young scientists with international participation, 27–29 March, 2017. : abstr. Vinnytsia, 2017. P. 72.
18. Tarabara U. K., Ryzhova O. A., Vus K. O. Spectroscopic detection of insulin amyloid fibrils by the new trimethine cyanine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : XIII International young scientists' conference, 28-30 November, 2018. : abstr. Kharkiv, 2018. P. 37–38.
19. Shchuka M., Tarabara U., Vus K., Zhytniakivska O., Kirilova E., Kirilov G., Trusova V., Gorbenko G., Deligeorgiev T. Multi-step energy transfer in insulin amyloid fibrils // VIII з'їзд Українського біофізичного товариства, 12-15 листопада 2019 р. : матер. чергового з'їзду. Київ – Луцьк, 2020. С. 26.
20. Tarabara U. K., Vus K. O., Zhytniakivska O. A., Trusova V. M. H-aggregation of the novel trimethine cyanine dye as an indicator of the insulin amyloid transformation // Low temperature physics : X International conference for professionals and young scientists in memory of B. Verkin for his 100th birthday anniversary, 3–7 June, 2019. : abstr. Kharkiv, 2019. P. 128.
21. Tarabara U. K., Kirilova E., Kirilov G., Vus K. O., Zhytniakivska O. A., Trusova V. M., Gorbenko G. P. Amyloid fibrils as a scaffold for cascade energy transfer // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Международная научная конференция, 17-19 июня 2020 г. : тезисы докл. Минск, 2020. С. 25.
22. Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Shchuka M., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Benzanthrone dyes as mediators in three-step Förster energy transfer scaffolded by insulin amyloid fibrils // 62 International scientific conference of Daugavpils, 28–29 May, 2020. : abstr. Daugavpils, 2020. P. 37.

23. Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V. Novel benzanthrone dye AZM as mediator of cascade energy transfer in insulin fibrils // Problems and achievements of the modern chemistry : XXI Scientific Youth Conference, 7–8 May, 2020. : abstr. Odessa, 2020. P. 51.
24. Tarabara U., Shchuka M., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Cascade energy transfer between benzothiazole, benzanthrone and squaraine dyes in beta-structured protein aggregates // Current chemical problems : III International scientific conference for students and young scientists, 25–27 March, 2020. : abstr. Vinnytsya, 2020. P. 27.
25. Ke P. C., Zhou R., Serpell L. C., Riek R., Knowles T. P. J., Lashuel H. A., Gazit E., Hamley I. W., Davis T. P., Fändrich M., Otzen D. E., Chapman M. R., Dobson C. M., Eisenberg D. S., Mezzenga R. Half a century of amyloids: past, present and future // Chem. Soc. Rev. 2020. Vol. 49. P. 5473–5509.
26. Wei G., Su Z., Reynolds N. P., Arosio P., Hamley I. W., Gazit E., Mezzenga R. Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology // Chem. Soc. Rev. 2017. Vol. 46. P. 4661–4708.
27. Knowles T. P. J., Mezzenga R. Amyloid fibrils as building blocks for natural and artificial functional materials // Adv. Mater. 2016. Vol. 28. P. 6546–6561.
28. Lee H. J., Lee Y. G., Kang J., Yang S. H., Kim J. H., Ghisaidoobe A. B. T., Kang H. J., Lee S.-R., Lim M. H., Chung S. J. Monitoring metal–amyloid- β complexation by a FRET-based probe: design, detection, and inhibitor screening // Chem. Sci. 2019. Vol. 10. P. 1000–1007.
29. Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F. U. Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones // FEBS Letters. 2020. Vol. 594. P. 2770–2781.
30. Levinthal C. Are there pathways for protein folding? // J. Chim. Phys. 1968. Vol. 65. P. 44–45.
31. Hartl F., Bracher A., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis // Nature. 2011. Vol. 475. P. 324–332.

32. Anfinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains // *Science*. 1973. Vol. 181. P. 223—230.
33. Branden C., Tooze J. Introduction to protein structure. Garland Publishing Science, 1999. 424 p.
34. Radford S. Protein folding: progress made and promises ahead // *Trends Biochem. Sci.* 2000. Vol. 25. P. 611—618.
35. Dill K. A. MacCallum J. L. The protein-folding problem, 50 years on // *Science*. 2012. Vol. 338. P. 1042—1046.
36. AlQuraishi M. End-to-end differentiable learning of protein structure. // *Cell Systems*. 2019. Vol. 8. P. 292—301.
37. Ptitsyn O. B. Stepwise mechanism of organization of protein molecules // *Dokl. Acad. Nauk SSSR*. 1973. Vol. 210. P. 1213—1215.
38. Uversky V. N., Finkelstein A. V. Life in phases: intra- and inter- molecular phase transitions in protein solutions // *Biomolecules*. 2019. Vol. 9. Article number 842.
39. Fersht A.R. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding, 1st ed., New York: W.H.Freeman & Co, 1999. 631 p.
40. Finkelstein A. V. 50+ years of protein folding // *Biochemistry*. 2018. Vol. 83. P. S3—S18.
41. Acharya N., Mishra P., Jha S. K. Evidence for dry molten globule-like domains in the pH-induced equilibrium folding intermediate of a multidomain protein // *J. Phys. Chem. Lett.* 2016. Vol. 7. P. 173—179.
42. Kiefhaber T., Labhardt A. M., Baldwin R. L. Direct NMR evidence for an intermediate preceding the rate-limiting step in the unfolding of ribonuclease A // *Nature*. 1995. Vol. 375. P. 513—515.
43. Arai M., Kuwajima K. Role of the molten globule state in protein folding // *Adv. Prot. Chem.* 2000. Vol. 53. P. 209—282.
44. Konuma T., Sakurai K., Yagi M., Goto Y., Fujisawa T., Takahashi S. Highly collapsed conformation of the initial folding intermediates of beta-lactoglobulin with non-native α -helix // *J. Mol. Biol.* 2015. Vol. 427. P. 3158—3165.

45. Sakurai K., Fujioka S., Konuma T., Yagi M., Goto Y. A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of beta-lactoglobulin // *Biochemistry*. 2011. Vol. 50. P. 6498–6507.
46. Meinhold D. W., Wright P. E. Measurements of protein unfolding/refolding kinetics and structural characterization of hidden intermediates by NMR relaxation dispersion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 108. P. 9078–9083.
47. Armstrong B. D., Choi J., Lopez C., Wesener D. A., Hubbell W., Cavagnero S., Han S. Site-specific hydration dynamics in the nonpolar core of a molten globule by dynamic nuclear polarization of water // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133. P. 5987–5995.
48. Kitazawa S., Kameda T., Yagi-Utsumi M., Sugase K., Baxter N. J., Kato K., Williamson M. P., Kitahara R. Solution structure of the Q41N variant of ubiquitin as a model for alternatively folded N2 state of ubiquitin // *Biochemistry*. 2013. Vol. 52. P. 1874–1885.
49. Bychkova V.E., Semisotnov G.V., Balobanov V.A., Finkelstein A. V. The molten globule concept: 45 years later. *Biochemistry*. 2018. Vol. 83. P. S33–S47.
50. Privalov P.L. Stability of proteins: Small globular proteins // *Adv. Protein Chem.* 1979. Vol. 33. P. 167–241.
51. Bicout D. J., Szabo A. Entropic barriers, transition states, funnels, and exponential protein folding kinetics: a simple model // *Protein Sci.* 2000. Vol. 9. P. 452–465.
52. Dobson C. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003. Vol. 426. P. 884–890.
53. Kim T. W., Lee S. J., Jo J., Kim J. G., Ki H., Kim C. W., Cho K. H., Choi J., Lee J. H., Wulff M., Rhee Y. M., Ihse H. Protein folding from heterogeneous unfolded state revealed by time-resolved X-ray solution scattering // *PNAS*. 2020. Vol. 117. P. 14996–15005.
54. Dill K., Chan H. From Levinthal to pathways to funnels // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1997. Vol. 4. P. 10–19.

55. Gershenson A., Gosavi S., Faccioli P., Wintrode P. L. Successes and challenges in simulating the folding of large proteins // *Journal of Biological Chemistry*. 2019. Vol. 295. P. 15–33.
56. Kamtekar S., Schiffer J. M., Xiong H., Babik J. M., Hecht M. H. Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science*. 1993. Vol. 262. P. 1680–1685.
57. Plotkin S. S., Onuchic J. N. Investigation of routes and funnels in protein folding by free energy functional methods // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. Vol. 97. P. 6509–6514.
58. Ivankov D. N., Finkelstein A. V. Solution of Levinthal's paradox and a physical theory of protein folding times // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. Article number 250.
59. Zana R. On the rate determining step for helix propagation in the helix–coil transition of polypeptides in solution // *Biopolymers*. 1975. Vol. 14. P. 2425–2428.
60. Garbuzynskiy S. O., Ivankov D. N., Bogatyreva N. S., Finkelstein, A. V. Golden triangle for folding rates of globular proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. Vol. 110. P. 147–150.
61. Ellis R. J., Minton A. P. Protein aggregation in crowded environments // *Biol. Chem*. 2006. Vol. 387. P. 485–497.
62. Bitran A., Jacobs W. M., Zhai X., Shakhnovich E. Cotranslational folding allows misfolding-prone proteins to circumvent deep kinetic traps // *PNAS*. 2020. Vol. 117. P. 1485–1495.
63. Liutkute M., Samatova E., Rodnina M. V. Cotranslational folding of proteins on the ribosome // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. Article number 97.
64. Holtkamp W., Kokic G., Jager M., Mittelstaet J., Komar A. A., Rodnina M. V. Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time // *Science*. 2015. Vol. 350. P. 1104–1107.
65. McBride J. M., Tlustý T. Structural asymmetry along protein sequences and co-translational folding // *bioRxiv*. 2020. 09.26.314609, <https://doi.org/10.1101/2020.09.26.314609>

66. Schleich J. P. A protein folding intermediate pulls its weight // *J. Biol. Chem.* 2020. Vol. 295. P. 11418–11419.
67. Weaver J., Jiang M., Roth A., Puchalla J., Zhang J., Rye H. S. GroEL actively stimulates folding of the endogenous substrate protein PepQ // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. Article number 15934.
68. Taipale M., Krykbaeva I., Koeva M., Kayatekin C., Westover K. D., Karras G. I., Lindquist S. Quantitative analysis of Hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition // *Cell.* 2012. Vol. 150. P. 987–1001.
69. Ma F.H., Li C., Liu Y., Shi L. Mimicking molecular chaperones to regulate protein folding // *Adv. Mater.* 2020. Vol. 32. Article number e1805945.
70. Uversky V.N., Dunker A.K. Understanding protein non-folding // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. Vol. 1804. P. 1231–1264.
71. Dunker A.K., Silman I., Uversky V.N., Sussman J.L. Function and structure of inherently disordered proteins // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. Vol. 18. P. 75-764.
72. Chiti F., Dobson C. M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade // *Annual Review of Biochemistry.* 2017. Vol. 86. P. 27–68.
73. Koga H., Kaushik S., Cuervo A. M. Protein homeostasis and aging: the importance of exquisite quality control // *Ageing Res. Rev.* 2011. Vol. 10. P. 205-215.
74. Eva Ž. Amyloid-fibril formation: Proposed mechanisms and relevance to conformational disease // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269. P. 3362–3371.
75. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Evidence for a partially folded intermediate in α -synuclein fibril formation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 10737–10744.
76. Dumetz A. C., Chockla A. M., Kaler E. W., Lenhoff A. M. Protein phase behavior in aqueous solutions: Crystallization, liquid-liquid phase separation, gels, and aggregates // *Biophys. J.* 2008. Vol. 94. P. 570–583.
77. Fink A.L. Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid // *Fold. Des.* 1998. Vol. 3. P. R9–R23.

78. Rochet J. C., Lansbury P.T. J. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. Vol. 10. P. 60–68.
79. Hirota N., Edskes H., Hall D. Unified theoretical description of the kinetics of protein aggregation // *Biophys. Rev.* 2019. Vol. 11. P. 191–208.
80. Almeida Z. L., Brito R. M. M. Structure and aggregation mechanisms in amyloids // *Molecules.* 2020. Vol. 25. Article number 1195.
81. Soto C. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 498. P. 204–207.
82. Yoshimura Y., Lin Y.X., Yagi H., Lee Y.H., Kitayama H., Sakurai K., So M., Ogi H., Naiki H., Goto Y. Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109. P. 14446–14451.
83. Virchow R. Zur cellulose-frage // *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 1854. Vol. 6. P. 416–426.
84. Virchow R. Ueber den Gang der amyloiden degeneration // *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 1855. Vol. 8. P. 364–368.
85. Sipe J. D., Cohen A. S. Review: History of the Amyloid Fibril // *J. Struct. Biol.* 2000. Vol. 130. P. 88–98.
86. Gujjarro J. I., Sunde M., Jones J.A., Campbell I.D., Dobson C.M. Amyloid fibril formation by an SH3 domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. Vol. 95. P. 4224–4228.
87. Litvinovich S. V., Brew S. A., Aota S., Akiyama S. K., Haudenschield C., Ingham K. C. Formation of amyloid-like fibrils by selfassociation of a partially unfolded fibronectin type III module // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 280. P. 245–258.
88. Stefani M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004. Vol. 1739. P. 5 – 25.
89. Guijarro J. I., Sunde M., Jones J. A., Campbell I. D., Dobson C. M. Amyloid fibril formation by an SH3 domain // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 4224–4228.

90. Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin // *Nature*. 2001. Vol. 410. P. 165–166.
91. Greenwald J., Kwiatkowski W., Riek R. Peptide amyloids in the origin of life // *J. Mol. Biol.* 2018. Vol. 430. P. 3735–3750.
92. Li D., Liu C. Structural diversity of amyloid fibrils and advances in their structure determination // *Biochemistry*. 2020. Vol. 59. P. 639–646.
93. Goldschmidt L., Teng P. K., Riek R., Eisenberg D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloidlike fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107. P. 3487–3492.
94. Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C. M. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates // *Nature*. 2003. Vol. 424. P. 805–808.
95. Calamai M., Chiti F., Dobson C.M. Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein // *Biophys. J.* 2005. Vol. 89. P. 4201–4210.
96. Chiti F., Dobson C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2006. Vol. 75. P. 333–366.
97. McBride A., Tilger C. F., Sanford S. P., Tessier P. M., Hirs A. H. Comparison of human and bovine insulin amyloidogenesis under uniform shear // *J. Phys. Chem. B*. 2015. Vol. 119. P. 10426–10433.
98. Platt G. W., Routledge K. E., Homans S. W., Radford S. E. Fibril growth kinetics reveal a region of β 2-microglobulin important for nucleation and elongation of aggregation // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 378. P. 251–263.
99. Morris A. M., Watzky M. A., Finke R. G. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Proteins Proteomics*. 2009. Vol. 1794. P. 375–397.
100. Gillam J., MacPhee C. Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth // *J. Phys. Condens. Matter*. 2013. Vol. 25. Article number 373101.

101. Arosio P., Knowles T.P.J., Linse S. On the lag phase in amyloid fibril formation // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. Vol. 17. P. 7606–7618.
102. Ferrone F. Analysis of protein aggregation kinetics // *Meth. Enzymol.* 1999. Vol. 309. P. 256–274.
103. Harper J. D., Lansbury J. P. T. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1997. Vol 66. P. 385–407.
104. Yu Y., Grazioli G., Unhelkar M.H., Martin R. W., Butts C. T. Network Hamiltonian models reveal pathways to amyloid fibril formation // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. Article number 15668.
105. Kumar S., Udgaonkar J. B. Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins // *Current Science.* 2010. Vol. 98. P. 639–656.
106. Dear A. J., Meisl G., Šarić A., Michaels T. C. T., Kjaergaard M., Linse S., Knowles T. P. J. Identification of on- and off-pathway oligomers in amyloid fibril formation // *Chem. Sci.* 2020. Vol. 11. Article number 6236.
107. Mcnaught A. D., Wilkinson A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (the “Gold Book”), 2nd ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. 464 p.
108. Bemporad F., Chiti F. Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships // *Chem. Biol.* 2012. Vol. 19. P. 315–327.
109. Andreasen M., Lorenzen N., Otzen D. Interactions between misfolded protein oligomers and membranes: A central topic in neurodegenerative diseases? // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2015. Vol. 1848. P. 1897–1907.
110. Lee M.-C., Yu W.-C., Shih Y.-H., Chen C.-Y., Guo Z.-H., Huang S.-J., Chan J. C. C., Chen Y.-R. Zinc ion rapidly induces toxic, off-pathway amyloid- β oligomers distinct from amyloid- β derived diffusible ligands in Alzheimer's disease // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. Article number 4772.

111. Cremades N., Cohen S. I. A., Deas E., Abramov A. Y., Chen A. Y., Orte A., Sandal M., Clarke R. W., Dunne P., Aprile F. A., Bertoncini C. W., Wood N. W., Knowles T. P. J., Dobson C. M., Klenerman D. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein // *Cell*. 2012. Vol. 149. P. 1048–1059.
112. Kjaergaard M., Dear A. J., Kundel F., Qamar S., Meisl G., Knowles T. P. J., Klenerman D. Oligomer diversity during the aggregation of the repeat region of tau // *ACS Chem. Neurosci*. 2018. Vol. 9. P. 3060–3071.
113. Törnquist M. Ultrastructural evidence for self-replication of Alzheimer-associated A β 42 amyloid along the sides of fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117. P. 11265–11273.
114. Lee J.-E., Sang J. C., Rodrigues M., Carr A. R., Horrocks M. H., De S., Bongiovanni M. N., Flagmeier P., Dobson C. M., Wales D. J., Lee S. F., Klenerman D. Mapping surface hydrophobicity of α -synuclein oligomers at the nanoscale // *Nano Lett*. 2018. Vol. 18. P. 7494–7501.
115. Olzscha H., Schermann S.M., Woerner A.C., Pinkert S., Hecht M.H., Tartaglia G.G., Vendruscolo M., Hayer-Hartl M., Hartl F.U., Vabulas R.M. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions // *Cell*. 2011. Vol. 144. P. 67–78.
116. Mannini B., Mulvihill E., Sgromo C., Cascella R., Khodarahmi R., Ramazzotti M., Dobson C.M., Cecchi C., Chiti F. Toxicity of protein oligomers is rationalized by a function combining size and surface hydrophobicity // *ACS Chem. Biol*. 2014. Vol. 9. P. 2309–2317.
117. Mannini B., Cascella R., Zampagni M., Waarde-Verhagen M., Meehan S., Roodveldt C., Campioni S., Boninsegna M., Penco A., Relini A.; Kampinga H. H., Dobson C. M., Wilson M. R., Cecchi C., Chiti F. Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. Vol. 109. P. 12479–12484.
118. Nielsen L., Khurana R., Coats A., Frokjaer S., Brange J., Vyas S., Uversky V. N., Fink A. L. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril

formation: elucidation of the molecular mechanism // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40. P. 6036–6046.

119. Wegner A. Spontaneous fragmentation of actin filaments in physiological conditions // *Nature*. 1982. Vol. 296. P. 266–267.

120. Dobson C. M. The amyloid phenomenon and its links with human disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2017. Vol. 9. Article number a023648.

121. Dovidchenko N. V., Finkelstein A.V., Galzitskaya O.V. How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. I. Modeling the amyloid protofibril formation // *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 118. P. 1189–1197.

122. Finkelstein A. V., Dovidchenko N. V., Galzitskaya O. V. What is responsible for atypical dependence of the rate of amyloid formation on protein concentration: fibril-catalyzed initiation of new fibrils or competition with oligomers? // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. Vol. 9. P. 1002–1006.

123. Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M. J., Westermarck P. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis // *Amyloid*. 2014. Vol. 21. P. 221–224.

124. Ke P. C., Zhou R., Serpell L. C., Riek R., Knowles T. P. J., Lashuel H. A., Gazit E., Hamley I. W., Davis T. P., Fandrich M., Otzen D. E., Chapman M. R., Dobson C. M., Eisenberg D. S., Mezzenga R. A half a century of amyloids: past, present and future // *Chem. Soc. Rev.* 2020. Vol. 49. P. 5473–5509.

125. Luca S., Yau W. M., Leapman R., Tycko R. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46. P.13505–13522.

126. Paravastu A. K., Leapman R. D., Yau W. M., Tycko R. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105. P.18349–18354.

127. Tuttle M. D., Comellas G., Nieuwkoop A. J., Covell D. J., Berthold D. A., Kloepper K. D., Courtney J. M., Kim J. K., Barclay A. M., Kendall A., Wan W., Stubbs G., Schwieters C. D., Lee V. M. Y., George J. M., Rienstra C. M. Solid-state

NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human alpha-synuclein // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. P. 409–415.

128. Walti M. A., Ravotti F., Arai H., Glabe C. G., Wall J. S., Bockmann A., Guntert P., Meier B. H., Riek R. Atomic-resolution structure of a disease-relevant Abeta(1-42) amyloid fibril // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. Vol. 113. P. E4976–4984.

129. Colvin M. T., Silvers R., Frohm B., Su Y., Linse S., Griffin R. G. High resolution structural characterization of Abeta42 amyloid fibrils by magic angle spinning NMR // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137. P. 7509–7518.

130. Serpell L. C., Sunde M., Fraser P. E., Luther P. K., Morris E. P., Sangren O., Lundgren E., Blake C. C. Examination of the structure of the transthyretin amyloid fibril by image reconstruction from electron micrographs // *J. Mol. Biol.* 1995. Vol. 254. P. 113–118.

131. Serpell L., Sunde M., Benson M., Tennent G., Pepys M., Fraser P. The protofilament substructure of amyloid fibrils // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 300. P. 1033–1039.

132. Goldsbury C., Goldie K., Pellaud J., Seelig J., Frey P., Muller S. A., Kistler J., Cooper G. J., Aepli U. Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin // *J. Struct. Biol.* 2000. Vol. 130. P. 352–362.

133. Jimenez J. L., Guijarro J. I., Orlova E., Zurdo J., Dobson C. M., Sunde M., Saibil H. R. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing // *EMBO J.* 1999. Vol. 18. P. 815–821.

134. Colvin M. T., Silvers R., Ni Q. Z., Can T. V., Sergeyev I., Rosay M., Donovan K. J., Michael B., Wall J., Linse S., Griffin R. G. Atomic resolution structure of monomorphic Aβ42 amyloid fibrils // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. Vol. 138. P. 9663–9674.

135. Guerrero-Ferreira R., Taylor N. M., Mona D., Ringler P., Lauer M. E., Riek R., Britschgi M., Stahlberg H. Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils // *eLife*. 2018. Vol. 7. Article number e36402.

136. Falcon B., Zivanov J., Zhang W., Murzin A. G., Garringer H. J., Vidal R., Crowther R. A., Newell K. L., Ghetti B., Goedert M., Scheres S. H. W. Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules // *Nature*. 2019. Vol. 568. P. 420–423.
137. Cao Q., Boyer D. R., Sawaya M. R., Ge P., Eisenberg D. S. Cryo-EM structures of four polymorphic TDP-43 amyloid cores // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019. Vol. 26. P. 619–627.
138. Balbach J. J., Ishii Y., Antzutkin O. N., Leapman R. D., Rizzo N. W., Dyda F., Reed J., Tycko R. Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39. P.13748–13759.
139. Nelson R., Sawaya M. R., Balbirnie M., Madsen A. O., Riekel C., Grothe R., Eisenberg D. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils // *Nature*. 2005. Vol. 435. P. 773–778.
140. Antzutkin O. N., Leapman R. D., Balbach J. J., Tycko R. Supramolecular structural constraints on Alzheimer's beta-amyloid fibrils from electron microscopy and solid-state nuclear magnetic resonance // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41. P. 15436-15450.
141. Fitzpatrick A. W., Debelouchina G. T., Bayro M. J., Clare D. K., Caporini M. A., Bajaj V. S., Jaroniec C. P., Wang L., Ladizhansky V., Muller S. A., MacPhee C. E., Waudby C. A., Mott H. R., Simone A., Knowles T. P. J., Saibil H. R., Vendruscolo M., Orlova E. V., Griffin R. G., Dobson C. M. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-beta amyloid fibril // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110. P. 5468–5473.
142. Radamaker L., Lin Y. H., Annamalai K., Huhn S., Hegenbart U., Schonland S. O., Fritz G., Schmidt M., Fandrich M. Cryo-EM structure of a light chain-derived amyloid fibril from a patient with systemic AL amyloidosis // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10. Article number 1103.
143. Liberta F., Loerch S., Rennegarbe M., Schierhorn A., Westermark P., Westermark G. T., Hazenberg B. P. C., Grigorieff N., Fandrich M., Schmidt M.

Cryo-EM fibril structures from systemic AA amyloidosis reveal the species complementarity of pathological amyloids // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10. Article number 1104.

144. Gallardo B. R., Ranson N. A., Radford S. E. Amyloid structures: much more than just a cross- β fold // *Current Opinion in Structural Biology.* 2020. Vol. 60. P. 7–16.

145. Close W., Neumann M., Schmidt A., Hora M., Annamalai K., Schmidt M., Reif B., Schmidt V., Grigorieff N., Fändrich M. Physical basis of amyloid fibril polymorphism. // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9. Article number 699.

146. Fändrich M., Meinhardt J., Grigorieff N. Structural polymorphism of Alzheimer A β and other amyloid fibrils // *Prion.* 2009. Vol. 3. P. 89–93.

147. Meinhardt J., Sachse C., Hortschansky P., Grigorieff N., Fändrich M. A β (1-40) Fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 386. P. 869–877.

148. Jimenez J. L., Nettleton E. J., Bouchard M., Robinson C. V., Dobson C. M., Saibil H. R. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99. P. 9196–9201.

149. Miller Y., Ma B., Nussinov R. Polymorphism in Alzheimer A β amyloid organization reflects conformational selection in a rugged energy landscape // *Chem. Rev.* 2010. Vol. 110. P. 4820–4838.

150. Zapadka K. L., Becher F. J., Gomes dos Santos A. L., Jackson S. E. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics // *Interface Focus.* 2017. Vol. 7. Article number 20170030.

151. Adamcik J., Mezzenga R., Adjustable twisting periodic pitch of amyloid fibrils // *Soft Matter.* 2011. Vol. 7. P. 5437–5443.

152. Assenza S., Adamcik J., Mezzenga R., De Los Rios P. Universal behavior in the mesoscale properties of amyloid fibrils // *Phys. Rev. Lett.* 2014. Vol. 113. Article number 268103.

153. Seuring C., Verasdonck J., Ringler P., Cadalbert R., Stahlberg H., Böckmann A., Meier B. H., Riek R. Amyloid fibril polymorphism: almost identical

on the atomic level, mesoscopically very different // *J. Phys. Chem. B*. 2017. Vol. 121. P. 1783–1792.

154. Verel R., Tomka I. T., Bertozzi C., Cadalbert R., Kammerer R. A., Steinmetz M. O., Meier B. H. Polymorphism in an amyloid-like fibril-forming model peptide // *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008. Vol. 47. P. 5842–5845.

155. Adamcik J., Mezzenga R. Amyloid polymorphism in the protein folding and aggregation energy landscape // *Angew. Chem., Int. Ed.* 2018. Vol. 57. P. 8370–8382.

156. Levin A., Hakala T., Schnaider L., Bernardes G., Gazit E., Knowles T. Biomimetic peptide self-assembly for functional materials // *Nature Rev. Chem.* 2020. Vol. 4. P. 615–634.

157. Mason T., Shimanovich U. Fibrous protein self-assembly in biomimetic nanomaterials // *Adv. Mater.* 2018. Vol. 6. P. 1706462–1706472.

158. He B., Sui X., Yu B., Wang S., Shen Y., Cong H. Recent advances in drug delivery systems for enhancing drug penetration into tumors // *Drug Deliv.* 2020. Vol. 27. P. 1474–1490.

159. Dzwolak W. Insulin amyloid fibrils form an inclusion complex with molecular iodine: a misfolded protein as a nanoscale scaffold // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46. P. 1568–1572.

160. Maji S., Schubert D., Rivier C., Lee S., Rivier J., Riek R. Amyloid as a depot for the formulation of long-acting drugs // *PLoS Biology*. 2008. Vol. 6. P. e17–e29.

161. Pertinhez T., Conti S., Ferrari E., Magliani W., Spisni A., Polonelli L. Reversible self-assembly: a key feature for a new class of autodelivering therapeutic peptides // *Mol. Pharmaceut.* 2009. Vol. 6. P. 1036–1039.

162. Ahn M., Kang S., Koo H. J., Lee J.-H., Lee Y.-S., Paik S. Nanoporous protein matrix made of amyloid fibrils of β 2-microglobulin // *Biotechnol. Prog.* 2010. Vol. 26. P. 1759–1764.

163. Yang L., Li H., Yao L., Yu Y., Ma G. Amyloid-based injectable hydrogel derived from hydrolyzed hen egg white lysozyme // *ACS Omega*. 2019. Vol. 4. P. 8071–8080.
164. Bhak G., Lee S., Park J., Cho S., Paik S. Amyloid hydrogel derived from curly protein fibrils of α -synuclein // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31. P. 5986–5995.
165. Reches M., Gazit E. Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes // *Nature Nanotech.* 2006. Vol. 1. P. 195–200.
166. Gazit E. Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires // *FEBS J.* 2007. Vol. 274. P. 317–322.
167. Huang R., Wang Y., Qi W., Su R., He Z. Temperature-induced reversible self-assembly of diphenylalanine peptide and the structural transition from organogel to crystalline nanowires // *Nanoscale Res. Lett.* 2014. Vol. 9. P. 653–661.
168. Andersen K., Christiansen N., Castillo-Leon J., Rozlosnik N., Svendsen W. Fabrication and characterization of PEDOT nanowires based on self-assembled peptide nanotube lithography // *Organic Electronics*. 2013. Vol. 14. P. 1370–1375.
169. Larsen M., Andersen K., Svendsen W., Castillo-Leon J. Self-assembled peptide nanotubes as an etching material for the rapid fabrication of silicon wires // *BioNanoSci.* 2011. Vol. 1. P. 31–37.
170. Al-Garawi Z., Thorpe J., Serpell L. Silica nanowires templated by amyloid-like fibrils // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Vol. 54. P. 13327–13331.
171. Al-Garawi Z., Kostakis G., Serpell L. Chemically and thermally stable silica nanowires with a β -sheet peptide core for bionanotechnology // *J. Nanobiotechnol.* 2016. Vol. 14. P. 79–88.
172. Scheibel T., Parthasarathy R., Sawicki G., Lin X., Jaeger H., Lindquist S. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. Vol. 100. P. 4527–4532.
173. Barrau S., Zhang F., Herland A., Mammo W., Andersson M., Inganas O. Integration of amyloid nanowires in organic solar cells // *Appl. Phys. Lett.* 2008. Vol. 93. P. 023307–023310.

174. Gallardo R., Ranson N., Redford S. Amyloid structures: much more than just a cross- β fold // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2020. Vol. 60. P. 7–16.
175. Das S., Jacob R., Patel K., Singh N., Maji S. Amyloid fibrils: Versatile biomaterials for cell adhesion and tissue engineering applications // *Biomacromolecules*. 2018. Vol. 19. P. 1826–1839.
176. Jacob R., George E., Singh P., Salot S., Anoop A., Jha N., Sen S., Maji S. Cell adhesion on amyloid fibrils lacking integrin recognition motif // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291. P. 5278–5298.
177. Gras S., Tickler A., Squires A., Devlin G., Horton M., Dobson C., MacPhee C. Functionalised amyloid fibrils for roles in cell adhesion // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29. P. 1553–1562.
178. Deidda G., Jonnalagadda S., Spies J., Ranella A., Mossou E., Forsyth V., Mitchell E., Bowler M., Tamamis P., Mitraki A. Self-assembled amyloid peptides with Arg-Gly-Asp (RGD) motifs as scaffolds for tissue engineering // *Biomater. Sci. Eng.* 2017. Vol. 3. P. 1404–1416.
179. Reynolds N., Charnley M., Mezzenga R., Hartley P. Engineered lysozyme amyloid fibril networks support cellular growth and spreading // *Biomacromolecules*. 2014. Vol. 15. P. 599–608.
180. Horii A., Wang X., Gelain F., Zhang S. Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration // *PLoS One*. 2007. Vol. 2. P. e190–e199.
181. Gilbert J., Reynolds N., Russell S., Haylock D., McArthur S., Charnley M., Jones O. Chitosan-coated amyloid fibrils increase adipogenesis of mesenchymal stem cells // *Materials Sci. Eng. C*. 2017. Vol. 79. P. 363–371.
182. Hauser C., Maurer-Stroh S., Martins I. Amyloid-based nanosensors and nanodevices // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43. P. 5326–5345.
183. Jun Y. W., Cho S. W., Jung J., Huh Y., Kim Y., Kim D., Ahn K. H. Frontiers in probing Alzheimer's disease biomarkers with fluorescent small molecules // *ACS Cent. Sci.* 2019. Vol. 5. P. 209–217.

184. Bhasikuttana A. C., Mohantya J. Detection, inhibition and disintegration of amyloid fibrils: Role of optical probes and macrocyclic receptors // *Chem. Commun.* 2017. Vol. 53. P. 2789–2809.
185. Pradhan N., Jana D., Ghorai B. K., Jana N. R. Detection and monitoring of amyloid fibrillation using a fluorescence “switch-on” probe // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. Vol. 7. P. 25813–25820.
186. Krebs M. R., Bromley E. H., Donald A. M. The binding of thioflavin T to amyloid fibrils: Localization and implications // *J. Struct. Biol.* 2005. Vol. 149. P. 30–37.
187. LeVine III H. Thioflavin T Interaction with synthetic Alzheimer's disease A β - amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution // *Protein Sci.* 1993. Vol. 2. P. 404–410.
188. Groenning M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status // *J. Chem. Biol.* 2010. Vol. 3. P. 1–18.
189. Klunk W. E., Pettegrew J. W., Abraham D. J. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation // *J. Histochem. Cytochem.* 1989. Vol. 37. P. 1273–1281.
190. Schutz A. K., Soragni A., Hornemann S., Aguzzi A., Ernst M., Bockmann A., Meier B. The amyloid-Congo Red interface at atomic resolution // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. Vol. 50. P. 5956–5960.
191. Sulatskaya A. I., Maskevich A. A., Kuznetsova I. M., Uversky V. N., Turoverov K. K. Fluorescence quantum yield of Thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils // *Plos One.* 2010. Vol. 5. Article number e15385.
192. Howie A. J., Brewer D. B. Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms // *Micron.* 2009. Vol. 40. P. 285–301.
193. Amdursky N., Erez Y., Huppert D. Molecular Rotors: What Lies Behind the High Sensitivity of the Thioflavin-T Fluorescent Marker // *Acc. Chem. Res.* 2012. Vol. 45. P. 1548–1557.

194. Lindgren M., Sörgjerd K., Hammarström P. Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. P. 4200–4212.
195. Hudson S. A., Ecroyd H., Kee T. W., Carver J. A. The Thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds // *FEBS J.* 2009. Vol. 276. P. 5960–5972.
196. Young L. M., Ashcroft A. E., Radford S. E. Small molecule probes of protein aggregation // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017. Vol. 39. P. 90–99.
197. Kaur A., New E. J., Sunde M. Strategies for the molecular imaging of amyloid and the value of a multimodal approach // *ACS Sens.* 2020. Vol. 5. P. 2268–2282.
198. Vassar P.S., Culling C.F. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues // *Arch. Pathol.* 1959. Vol. 68. P. 487–498.
199. Shaban H. A., Valades-Cruz C. A., Savatier J., Brasselet S. Polarized super-resolution structural imaging inside amyloid fibrils using Thioflavine T // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. Article number 12482.
200. Lee J. H., Lee I. H., Choe Y. J., Kang S., Kim H. Y., Gai W. P., Hahn J.S., Paik S.R. Real-time analysis of amyloid fibril formation of α -synuclein using a fibrillation-state-specific fluorescent probe of JC-1 // *Biochem. J.* 2009. Vol. 418. P. 311–323.
201. Mishra R., Sjölander D., Hammarström P. Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile Red // *Mol. BioSyst.* 2011. Vol. 7. P. 1232–1240.
202. Mahía A., Conde-Giménez M., Salillas S., Pallarés I., Galano-Frutos J. J., Lasa Í., Ventura S., Díaz-de-Villegas M. D., Gálvez J. A., Sancho J. A pyrene-inhibitor fluorescent probe with large Stokes shift for the staining of A β 1-42, α -synuclein, and amylin amyloid fibrils as well as amyloid-containing *Staphylococcus aureus* biofilms // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. Vol. 411. P. 251-265.

203. Lee M., Kim M., Tikum A. F., Lee H. J., Thamilarasan V., Lim M. H., Kim J. A near-infrared fluorescent probe for amyloid- β aggregates // *Dyes and Pigments*. 2019. Vol. 162. P. 97–103.
204. Gao G. Q., Xu A. W. A new fluorescent probe for monitoring amyloid fibrillation with high sensitivity and reliability // *RSC Adv.* 2013. Vol. 3. P. 21092-21098.
205. Kowa H., Sakakura T., Matsuura Y., Wakabayashi T., Mann D. M. A., Duff K., Tsuji S., Hashimoto T., Iwatsubo T. Mostly separate distributions of CLAC-versus A β 40- or Thioflavin S-reactivities in senile plaques reveal two distinct subpopulations of β -Amyloid deposits // *Am. J. Pathol.* 2004. Vol. 165. P. 273–281.
206. Crystal A. S., Giasson B. I., Crowe A., Kung M. P., Zhuang Z. S., Trojanowski J. Q., Lee V. M. A comparison of amyloid fibrillogenesis using the novel fluorescent compound K114 // *J. Neurochem.* 2003. Vol. 86. P. 1359–1368.
207. Styren S. D., Hamilton R. L., Styren G. C., Klunk W. E. X-34, a fluorescent derivative of Congo Red: A novel histochemical stain for Alzheimer's Disease pathology // *J. Histochem. Cytochem.* 2000. Vol. 48. P. 1223–1232.
208. Ahn J. S., Lee J. H., Kim J. H., Paik S. R. Novel method for quantitative determination of amyloid fibrils of α -synuclein and amyloid β /A4 protein by using resveratrol // *Anal. Biochem.* 2007, Vol. 367. P. 259–265.
209. Herland A., Björk P., Hania P. R., Scheblykin I. G., Inganäs O. Alignment of a conjugated polymer onto amyloid-like protein fibrils // *Small*. 2007. Vol. 3. P. 318–325.
210. Mudliar N. H., Pettiwala A. M., Awasthi A. A., Singh P. K. On the molecular form of amyloid marker, auramine O, in human insulin fibrils // *J. Phys. Chem. B*. 2016. Vol. 120. P. 12474–12485.
211. Lindgren M., Sorgjerd K., Hammarstrom P. Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. P. 4200–4212.

212. Mora A. K., Singh P. K., Patro B. S., Nath S. PicoGreen: a better amyloid probe than Thioflavin-T // *Chem. Commun.* 2016. Vol. 52. P. 12163–12166.
213. Sulatskaya A. I., Sulatsky M. I., Povarova O. I., Rodina N. P., Kuznetsova I. M., Lugovskii A. A., Voropay E. S., Lavysh A. V., Maskevich A. A., Turoverov K. K. Trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate - New fluorescent dye for testing of amyloid fibrils and study of their structure // *Dyes and Pigments*. 2018. Vol. 157. P. 385–395.
214. Ryzhova O., Vus K., Trusova V., Kirilova E., Kirilov G., Gorbenko G., Kinnunen P. Novel benzanthrone probes for membrane and protein studies // *Methods Appl. Fluoresc.* 2016. Vol. 4. Article number 034007.
215. Sigurdson C. J., Nilsson K. P., Hornemann S., Manco G., Polymenidou M., Schwarz P., Leclerc M., Hammarstrom P., Wuthrich K., Aguzzi A. Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers // *Nat. Methods*. 2007. Vol. 4. P. 1023–1030.
216. Smith N. W., Alonso A., Brown S. M., Dzyuba S. V. Triazole-containing BODIPY dyes as novel fluorescent probes for soluble oligomers of amyloid A β 1-42 peptide // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 391. P. 1455–1458.
217. Gao G.-Q., Xu A.-W. A new fluorescent probe for monitoring amyloid fibrillation with high sensitivity and reliability // *RSC Adv.* 2013. Vol. 3. P. 21092-21098.
218. Zhang X., Tian Y., Li Z., Tian X., Sun H., Liu H., Moore A., Ran C. Design and synthesis of curcumin analogues for in vivo fluorescence imaging and inhibiting copper-induced crosslinking of amyloid beta species in Alzheimer's disease // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135. P. 16397–16409.
219. Hintersteiner M., Enz A., Frey P., Jaton A. L., Kinzy W., Kneuer R., Neumann U., Rudin M., Staufenbiel M., Stoeckli M., Wiederhold K.-H., Gremlich H.-U. In vivo detection of amyloid- β deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe // *Nat. Biotechnol.* 2005. Vol. 23. P. 577–583.

220. Cui M., Ono M., Watanabe H., Kimura H., Liu B., Saji H. Smart near-infrared fluorescence probes with donor-acceptor structure for in vivo detection of beta-amyloid deposits // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136. P. 3388–3394.
221. Nesterov E. E., Skoch J., Hyman B. T., Klunk W. E., Bacskai B. J., Swager T. M. In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. Vol. 44. P. 5452–5456.
222. Mudliar N. H., Singh P. K. A molecular rotor based turn-on sensor probe for amyloid fibril in the extreme near-infrared region // *Chem. Commun.* 2019. Vol. 55. P. 3907–3910.
223. Wang X., Wang C., Chan H.-N., Ashok I., Krishnamoorthi S. K., Li M., Li H.-W., Wong M. S. Amyloid- β oligomer targeted theranostic probes for in vivo NIR imaging and inhibition of self-aggregation and amyloid- β induced ROS generation // *Talanta*. 2021. Vol. 224. Article number 121830.
224. Artymiuk P. J., Blake C. C. F. Refinement of human lysozyme at 1.5 Å^o resolution. Analysis of non-bonded and hydrogen-bond interactions // *Journal of Molecular Biology*. 1981. Vol. 152. P. 737–762.
225. Reitamo S., Klockars M., Adinolfi M., Osserman E. F. Human lysozyme (origin and distribution in health and disease) // *La Ricerca in Clinica E in Laboratorio*. 1978. Vol. 8. P. 211–231.
226. Chipman D. M., Sharon N. Mechanism of lysozyme action // *Science*. 1969. Vol. 165. P. 454–465.
227. Merlini B. G., Bellotti V. Lysozyme: A paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding // *Clinica Chimica Acta*. 2005. Vol. 357. P. 168–172.
228. Durek T., Torbeev V. Y., Kent S. B. H. Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Vol. 104. P. 4846 – 4851.
229. Pepys M. B., Hawkins P. N., Booth D. R., Vigushin D. M., Tennent G. A., Soutar A. K., Totty N. F., Nguyen O. F., Blake C. C. F., Terry C., Feast T. G., Zalin

A. M., Hsuan J. J. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis // *Nature*. 1993. Vol. 362. P. 553–557.

230. Picken M. M. Amyloidosis—where are we now and where are we heading? // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2010. Vol. 134. P. 545–551.

231. Granel B., Valleix S., Serratrice J., Chérin P., Texeira A., Disdier P., Weiller P. J., Grateau G. O. Lysozyme amyloidosis: report of 4 cases and a review of the literature // *Medicine*. 2006. Vol. 85. P. 66–73.

232. Yazaki M., Farrell S. A., Benson M. D. A novel lysozyme mutation Phe57Ile associated with hereditary renal amyloidosis // *Kidney International*. 2003. Vol. 63. P. 1652–1657.

233. Valleix S., Drunat S., Philit J. B., Adoue D., Piette J. C., Droz D., MacGregor B., Canet D., Delpech M., Grateau G. Hereditary renal amyloidosis caused by a new variant lysozyme W64R in a French family // *Kidney International*. 2002. Vol. 61. P. 907–912.

234. Girnius S., Skinner M., Spencer B., Prokaeva T., Bartholomew C., O'Hara C., Seldin D. C., Connors L. H. A new lysozyme tyr54asn mutation causing amyloidosis in a family of Swedish ancestry with gastrointestinal symptoms // *Amyloid*. 2012. Vol. 19. P. 182–185.

235. Rocken C., Becker K., Fandrich M., Schroeckh V., Stix B., Rath T., Kähne T., Dierkes J., Roessner A., Albert F. W. ALys amyloidosis caused by compound heterozygosity in exon 2 (Thr70Asn) and exon 4 (Trp112Arg) of the lysozyme gene // *Human Mutation*. 2006. Vol. 27. P. 119–120.

236. Johnson J. R. K., Christodoulou J., Dumoulin M., Caddy G., Alcocer M. J., Murtagh G. J., Kumita J. R., Larsson G., Robinson C. V., Archer D. B., Luisi B., Dobson C.M. Rationalising lysozyme amyloidosis: Insight from the structure and solution dynamics of T70N lysozyme // *Journal of Molecular Biology*. 2005. Vol. 352. P. 823–836.

237. Ahn M., Hagan C. L., Bernardo-Gancedo A., De Genst E., Newby F. N., Christodoulou J., Dhulesia A., Dumoulin M., Robinson C. V., Dobson C. M.,

Kumita J. R. The significance of the location of mutations for the native-state dynamics of human lysozyme // *Biophysical Journal*. 2016. Vol. 111. P. 2358–2367.

238. Dumoulin M., Kumita J. R., Dobson C. M. Normal and aberrant biological self-assembly: insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants // *Accounts of Chemical Research*. 2006. Vol. 39. P. 603–610.

239. Booth D. R., Pepys M. B., Hawkins P. N. A novel variant of human lysozyme (T70N) is common in the normal population // *Human Mutation*. 2000. Vol. 16. Article number 180.

240. Esposito G., Garcia J., Mangione P., Giorgetti S., Corazza A., Viglino P., Chiti F., Andreola A., Dumy P., Booth D., Hawkins P. N., Bellotti V. Structural and folding dynamics properties of T70N variant of human lysozyme // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278. P. 25910–25918.

241. Frare E., Mossuto M., Polverino de Laureto P., Dumoulin M., Dobson C., Fontana A. Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis // *Journal of Molecular Biology*. 2006. Vol. 361. P. 551–561.

242. Booth D. R., Sunde M., Bellotti V., Robinson C. V., Hutchinson W. L., Fraser P. E., Hawkins P. N., Dobson C. M., Radford S. E., Blake C. C., Pepys M. B. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis // *Nature*. 1997. Vol. 385. P. 787–793.

243. Dumoulin M., Canet D., Last A. M., Pardon E., Archer D. B., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A., Robinson C. V., Redfield C., Dobson C. M. Reduced global cooperativity is a common feature underlying the amyloidogenicity of pathogenic lysozyme mutations // *Journal of Molecular Biology*. 2005. Vol. 346. P. 773–788.

244. Liu H. L., Wu Y. C., Zhao J. H., Liu Y. F., Huang C. H., Fang H. W., Ho Y. Insights into the conformational changes of several human lysozyme variants associated with hereditary systemic amyloidosis // *Biotechnology Progress*. 2007. Vol. 23. P. 246–254.

245. Moraitakis G., Goodfellow J. M. Simulations of human lysozyme: probing the conformations triggering amyloidosis // *Biophysical Journal*. 2003. Vol. 84. P. 2149–2158.
246. Trexler A. J., Nilsson M. R. The formation of amyloid fibrils from proteins in the lysozyme family current protein and peptide // *Science*. 2007. Vol. 8. P. 537-557.
247. Ohnishia S., Takano K. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004. Vol. 61. P. 511–524.
248. Morozova-Roche L. A., Zurdo J., Spencer A., Noppe W., Receveur V., Archer D. B., Joniau M., Dobson C.M. Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants // *Journal of Structural Biology*. 2000. Vol. 130. P. 339–351.
249. Canet D., Last A. M., Tito P., Sunde M., Spencer A., Archer D. B., Redfield C., Robinson C. V., Dobson C. M. Local cooperativity in the unfolding of an amyloidogenic variant of human lysozyme // *Nature Structural Biology*. 2002. Vol. 9. P. 308–315.
250. Funahashi J., Takano K., Ogasahara K., Yamagata Y., Yutani K. The structure, stability, and folding process of amyloidogenic mutant human lysozyme // *Journal of Biochemistry*. 1996. Vol. 120. P. 1216–1223.
251. Kumita J. R., Johnson J. R. K., Alcocer M. J., Dumoulin M., Holinquist F., McCammon M. G., Robinson C. V., Archer D. B., Dobson C.M. Expression of the amyloidogenic human lysozyme variants F57I and W64R in *Pichia pastoris*: Impact of native state stability on protein secretion levels // *The FEBS Journal*. 2006. Vol. 273. P. 711–720.
252. Olsen H. B., Ludvigsen S., Kaarsholm N. C. Solution structure of an engineered insulin monomer at neutral pH // *Biochemistry*. 1996. Vol. 35. P. 8836-8845.
253. Nijhout H. F. *The Control of Growth. Development*. 2003. Vol. 130. P. 5863–5867.

254. Andersson T., Betgreen P., Flatt P. Subcellular distribution of zinc in islets B-cells fractions // *Hormones and Metabolism res.* 1980. Vol. 12. P. 275–276.
255. Joshi S. R., Parikh R. M., Das A. K. Insulin – History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology // *J Assoc Phys India.* 2007. Vol. 55. P. 19–25.
256. Chang X., Jorgensen A. M., Bardrum P., Led. J. J. Solution structures of the R6 human insulin hexamer // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 9409–9422.
257. Dodson G., Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. Vol. 8. P. 189–194.
258. Whittingham J. L., Scott D. J., Chance K., Wilson A., Finch J., Brange J., Dodson G. G. Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 318. P. 479–490.
259. Smith G. D., Pangborn W. A., Blessing R. H. The structure of T6 human insulin at 1.0 Å resolution // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2003. Vol. 59. P. 474–482.
260. Smith G. D., Ciszak E., Magrum L. A., Pangborn W. A., Blessing R. H. R6 Hexameric Insulin Complexed with m-Cresol or Resorcinol // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 56. P. 1541–1548.
261. Ciszak E., Beals J. M., Frank B. H., Baker J. C., Carter N. D., Smith G. D. Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin // *Structure.* 1995. Vol. 3. P. 615–622.
262. Li S., Leblanc R. M. Aggregation of insulin at the interface // *J. Phys. Chem. B.* 2014. Vol. 118. P. 1181–1188.
263. Dische F. E., Wernstedt C., Westermarck G. T., Westermarck P., Pepys M. B., Rennie J. A., Gilbey S. G., Watkins P. J. Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient // *Diabetologia.* 1988. Vol. 31. P. 158–161.
264. Nilsson M. R., Dobson C. M. Chemical modification of insulin in amyloid fibrils // *Protein Sci.* 2003. Vol. 12. P. 2637–2641.

265. Shikama Y., Kitazawa J., Yagihashi N., Uehara O., Murata Y., Yajima N., Wada R., Yagihashi S. Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a diabetic patient // *Intern. Med.* 2010. Vol. 49. P. 397–401.
266. Woods R. J., Alarcón J., McVey E., Pettis R. J. Intrinsic fibrillation of fast-acting insulin analogs // *J. Diabetes Sci. Technol.* 2012. Vol. 6. P. 265–276.
267. Guilhem I., Leguerrier A. M., Lecordier F., Poirier J. Y., Maugendre D. Technical Risks with Subcutaneous Insulin Infusion // *Diabetes. Metab.* 2006. Vol. 32. P. 279–284.
268. Waugh D. F., Wilhelmson D. F., Commerford S. L., Sackler M. L. Studies of the nucleation and growth reactions of selected types of insulin fibrils // *J. Am. Chem. Soc.* 1953. Vol. 75. P. 2592–2600.
269. Waugh D. F. A fibrous modification of insulin. I. The heat precipitate of insulin // *J. Am. Chem. Soc.* 1946. Vol. 68. P. 247–250.
270. Wang F., Hull R. L., Vidal J., Cnop M., Kahn S. E. Islet amyloid develops diffusely throughout the pancreas before becoming severe and replacing endocrine cells // *Diabetes.* 2001. Vol. 50. P. 2514–2520.
271. Brange J., Havelund S., Hougaard P. Chemical stability of insulin. 2. Formation of higher molecular weight transformation products during storage of pharmaceutical preparations // *Pharm. Res.* 1992. Vol. 9. P. 727–734.
272. Brange J. *Galenics of insulin: The physico-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations.* Berlin: Springer Science & Business Media, 2012. 130 p.
273. Bouchard M., Zurdo J., Nettleton E. J., Dobson C. M., Robinson C. V. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy // *Protein Sci.* 2000. Vol. 9. P. 1960–1967.
274. Burke M. J., Rougvie M. A. Cross-beta protein structures. I. Insulin fibrils // *Biochemistry.* 1972. Vol. 11. P. 2435–2439.
275. Ivanova M. I., Sievers S. A., Sawaya M. R., Wall J. S., Eisenberg D. Molecular basis for insulin fibril assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106. P. 18990–18995.

276. Mishra N. K., Joshi K. B., Verma S. Inhibition of human and bovine insulin fibril formation by designed peptide conjugates // *Mol. Pharm.* 2013. Vol. 10. P. 3903–3912.
277. Groenning M., Frokjaer S., Vestergaard B. Formation mechanism of insulin fibrils and structural aspects of the insulin fibrillation process // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2009. Vol. 10. P. 509–528.
278. Ritu K., Ionescu-Zanetti C., Pope M., Li J., Nielson L., Ramirez-Alvarado M., Regan L., Fink A. L., Cartery S. A., A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy // *Biophysical Journal*. 2003. Vol. 85. P. 1135–1144.
279. Sawaya M. R., Sambashivan S., Nelson R., Ivanova M. I.; Sievers S. A., Apostol M. I., Thompson M. J., Balbirnie M., Wiltzius J. J., McFarlane H. T., Madsen A. O., Riekel C., Eisenberg D. Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers // *Nature*. 2007. Vol. 447. P. 453–457.
280. Yao Z. P., Zeng Z. H., Li H. M., Zhang Y., Feng Y. M., Wang D. C. Structure of an insulin dimer in an orthorhombic crystal: the structure analysis of a human insulin mutant (B9 Ser > Glu) // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1999. Vol. 55. P. 1524–1532.
281. Akbarian M., Yousefi R., Moosavi-Movahedi A. A., Ahmad A., Uversky V. N. Modulating insulin fibrillation using engineered B-chains with mutated C-termini // *Biophysical Journal*. 2019. Vol. 117. P. 1626–1641.
282. Selivanova O. M., Galzitskaya O. V. Structural polymorphism and possible pathways of amyloid fibril formation on the example of insulin protein // *Biochemistry*. 2012. Vol. 77. P. 1237–1247.
283. Kurutos A., Ryzhova O., Tarabara U., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel synthetic approach to near-infrared heptamethine cyanine dyes and spectroscopic characterization in presence of biological molecules // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*. 2016. Vol. 328. P. 87–96.

284. Ioffe V. M., Gorbenko G. P., Deligeorgiev T., Gadjev N., Vasilev A. Fluorescence study of protein–lipid complexes with a new symmetric squarylium probe // *Biophysical Chemistry*. 2007. Vol. 128. P. 75–86.
285. Kirilova E.M., Kalnina I., Kirilov G.K., Meirovics I. Spectroscopic study of benzanthrone 3-N-derivatives as new hydrophobic fluorescent probes for biomolecules // *J. Fluoresc.* 2008. Vol. 18. P. 645–648.
286. Gonta S., Utinans M., Kirilov G., Belyakov S., Ivanova I., Fleisher M., Savenkov V., Kirilova E. Fluorescent substituted amidines of benzanthrone: synthesis, spectroscopy and quantum chemical calculations // *Spectrochim. Acta Part A*. 2013. Vol. 101. Article number 325.
287. Arnaudov L.N., de Vries R. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme // *Biophys J*. 2005. Vol. 88. P. 515 – 526.
288. Iannuzzi C., Borriello M., Portaccio M., Irace G., Sirangelo I. Insights into insulin fibril assembly at physiological and acidic pH and related amyloid intrinsic fluorescence // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. Article number E2551.
289. Bacalum M., Zorila B., Radu M. Fluorescence spectra decomposition by asymmetric functions: Laurdan spectrum revisited // *Anal. Biochem.* 2013. Vol. 440. P. 123–129.
290. Malmos K. G., Blancas-Mejia L. M., Weber B., Buchner J., Ramirez-Alvarado M., Naiki H., Otzen D. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation // *Amyloid*. 2017. Vol. 24. P. 1–16.
291. Mishra A., Behera R., Behera P., Mishra B., Behera G. Cyanines during the 1990s: A review // *Chem. Rev.* 2000. Vol. 100. P. 1973–2011.
292. Patonay G., Kim J.S., Kodagahally R., Strekowski L. Spectroscopic study of a novel bis(heptamethine cyanine) dye and its interaction with human serum albumin // *Appl. Spectrosc.* 2005. Vol. 59. P. 682–690.
293. Vus K., Tarabara U., Zhytniakivska O., Trusova V., Girysh M., Gorbenko G., Kurutos A., Vasilev A., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel cyanine dyes as inhibitors of insulin fibrillization. *Cyanine Dyes: Structure, Uses and Performance* : monograph. New York, 2019. P. 1–52.

294. Zhytniakivska O., Vus K., Trusova V., Tarabara U., Gorbenko G., Kurutos A., Gadjev N., Deligeorgiev T. Interactions between the novel cyanine dyes and biological macromolecules // *Cyanine Dyes: Structure, Uses and Performance* : monograph. New York, 2019. P. 53–122.
295. Zhang Z., Achilefu S. Synthesis and evaluation of polyhydroxylated near-infrared carbocyanine molecular probes // *Org. Lett.* 2004. Vol. 6. P. 2067–2070.
296. Pauli J., Vag T., Haag R., Spieles M., Wenzel M., Kaiser W. A., Resch-Genger U., Hilger I. An in vitro characterization study of new near infrared dyes for molecular imaging // *Eur. J. Med. Chem.* 2009. Vol. 44. P. 3496–3503.
297. Geddes C. D., Cao H., Lakowicz J. R. Enhanced photostability of ICG in close proximity to gold colloids // *Spectrochim. Acta, Part A.* 2003. Vol. 59. P. 2611–2617.
298. Sanchez-Galvez A., Hunt P., Robb M. A., Olivucci M., Vreven T., Schlegel H. B. Ultrafast radiationless deactivation of organic dyes: evidence for a two-state two-mode pathway in polymethine cyanines // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. Vol. 122. P. 2911–2924.
299. Patonay G., Salon J., Sowell J., Strekowski L. Noncovalent labeling of biomolecules with red and near-infrared dyes // *Molecules.* 2004. Vol. 9. P. 40–49.
300. Tatikolov A. S., Costa S. M. B. Complexation of polymethine dyes with human serum albumin: a spectroscopic study // *Biophys. Chem.* 2004. Vol. 107. P. 33–49.
301. Patlolla P. R., Desai N., Gupta S., Datta B. Interaction of a dimeric carbocyanine dye aggregate with bovine serum albumin in non-aggregated and aggregated forms // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019. Vol. 209. P. 256–263.
302. Mahmood T., Paul A., Ladame S. Synthesis, spectroscopic and DNA-binding properties of fluorogenic acridine-containing cyanine dyes // *J. Org. Chem.* 2010. Vol. 75. P. 204–207.

303. Kaloyanova S., Trusova V. M., Gorbenko G. P., Deligeorgiev T. Synthesis and fluorescence characteristics of novel asymmetric cyanine dyes for DNA detection // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2011. Vol. 217. P. 147–156.
304. Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Tarabara U., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel asymmetric monomethine cyanine dyes derived from sulfobetaine benzothiazolium moiety as potential fluorescent dyes for noncovalent labeling of DNA // *Dyes Pigm.* 2016. Vol. 130. P. 122–128.
305. Hilal H., Taylor J. A. Determination of the stoichiometry of DNA-dye interaction and application to the study of a bis-cyanine dye-DNA complex // *Dyes Pigm.* 2007. Vol. 75. P. 483–490.
306. Sidorowicz A., Mora C., Jablonka S., Pola A., Modrzycka T., Mosiadz D., Michalak K. Spectral properties of two betaine-type cyanine dyes in surfactant micelles and in the presence of phospholipids // *J. Mol. Struct.* 2005. Vol. 744–747. P. 711–716.
307. Krieg M., Srichai M. B., Redmond R.W. Photophysical properties of 3,3'-dialkylthiacarbocyanine dyes in organized media: unilamellar liposomes and thin polymer films // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1993. Vol. 1151. P. 168–174.
308. Volkova K. D., Kovalska V. B., Balanda A. O., Losytsky M. Y., Golub A. G., Vermeij R. J., Subramaniam V., Tolmachev O. I., Yarmoluk S. M. Specific fluorescent detection of fibrillar α -synuclein using mono- and trimethine cyanine dyes // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16. P. 1452–1459.
309. Kovalska V. B., Losytsky M. Y., Tolmachev O. I., Slominskii Y. L., Segers-Nolten G. M., Subramaniam V., Yarmoluk S.M. Tri- and pentamethine cyanine dyes for fluorescent detection of α -synuclein oligomeric aggregates // *J. Fluoresc.* 2012. Vol. 22. P. 1441–1448.
310. Nizomov N., Kurtaliev E. N., Nizamov S. N., Khodjayev G. Spectral-luminescent study of the interaction of some styrylcyanine dyes with bovine serum albumin and DNA in aqueous solutions // *J. Mol. Struct.* 2009. Vol. 936. P. 199–205.

311. Kuperman M. V., Chernii S. V., Losytskyy M. Y., Kryvorotenko D. V., Derevyanko N. O., Slominskii Y. L., Kovalska V. B., Yarmoluk S. M. Trimethine cyanine dyes as fluorescent probes for amyloid fibrils: The effect of N,N'-substituents // *Anal. Biochem.* 2015. Vol. 484. P. 9–17.
312. Volkova K. D., Kovalska V. B., Balanda A. O., Vermeij R. J., Subramaniam V., Slominskii Y., Yarmoluk S. M. Cyanine dye-protein interactions: looking for fluorescent probes for amyloid structures // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2007. Vol. 70. P. 727–733.
313. Yan J., Zhu J.-Y., Zhou K.-X., Wang J.-S., Tan H.-Y., Xu Z.-Y., Chen S.-B., Lu Y.-T., Cui M.-C., Zhang L. Neutralmerocyanine dyes: for in vivo NIR fluorescence imaging of amyloid β -plaques // *Chem. Commun.* 2017. Vol. 53. P. 9910–9917.
314. Sabate R., Estelrich J. Pinacyanol as effective probe of fibrillar β -amyloid peptide: comparative study with Congo Red // *Biopolymers.* 2003. Vol. 72. P. 455–463.
315. Chegaev K., Federico A., Marini E., Rolando B., Frutter R., Morbin M., Rossi G., Fugnanesi V., Bastone A., Salmona M., Badiola N. B., Gasparini L., Cocco S., Ripoli C., Grassi C., Gascoa A. NO-donor thiacyanines as multifunctional agents for Alzheimer's disease // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. Vol. 23. P. 4688–4698.
316. Yang W., Wong Y., Ng O. T. W., Bai L. P., Kwong D. W. J., Ke Y., Jiang Z.-H., Li H.-W., Yung K. K. L., Wong M. S. Inhibition of betaamyloid peptide aggregation by multifunctional carbazole-based fluorophores // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012. Vol. 51. P. 1804–1810.
317. Volkova K. D., Kovalska V. B., Segers-Nolten G. M., Veldhuis G., Subramaniam V., Yarmoluk S. M. Explorations of the application of cyanine dyes for quantitative α -synuclein detection // *Biotech. & Histochem.* 2009. Vol. 84. P. 55–61.
318. Volkova K. D., Kovalska V. B., Losytskyy M. Y., Veldhuis G., Segers-Nolten G. M., Tolmachev O. I., Subramaniam V., Yarmoluk S. M. Studies

of interaction between cyanine dye T-284 and fibrillar alpha-synuclein. // J. Fluoresc. 2010. Vol. 20. P. 1267–1274.

319. Volkova K. D., Kovalska V. B., Losytskyi M. Y., Fal K. O., Derevyanko N. O., Slominskii Y. L., Tolmachov O. I., Yarmoluk S. M. Hydroxy and methoxy substituted thiacyanines for fluorescent detection of amyloid formations // J. Fluoresc. 2011. Vol. 21. P. 775–784.

320. Vus K., Giryh M., Trusova V., Gorbenko G., Kurutos A., Vasilev A. Cyanine dyes derived inhibition of insulin fibrillization // J. Mol. Liq. 2019. Vol. 276. P. 541–552.

321. Biancalana M., Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1804. P. 1405–1412.

322. Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T // Anal. Biochem. 1989. Vol. 177. P. 244–249.

323. Sorokovoi V. I., Dobretsov G. E., Petrov V. A., Nikitina A. N., Vladimirov Y. A. Dimethylaminochalcone as a luminescent dye sensitive to conformational changes in proteins // Proc. Acad. Sci. Soviet Union. 1972. Vol. 205. P. 500–502.

324. Gularyan S. K., Svetlichny V. Y., Dobretsov G. E. Difference between blood cells as measured by flow cytofluorometry with a lipophilic fluorescent probe 4-dimethylaminochalcone // Membr. Cell Biol. 1997. Vol. 11. P. 401–410.

325. Dobretsov G. E., Petrov V. A., Mishijev V. E., Klebanov G. I., Vladimirov Y. A. 4-Dimethylaminochalcone and 3-methoxybenzanthrone as fluorescent probes to study biomembranes. I. Spectral characteristics // Studia Biophys. 1977. Vol. 65. P. 91–98.

326. Dobretsov G. E., Kurek N. K., Machov V. N., Syreishchikova T. I., Yakimenko M. N. Determination of fluorescent probes localization in membranes by nonradiative energy transfer // J. Biochem. Biophys. Methods. 1989. Vol. 19. P. 259–274.

327. Refat M., Aqeel S., Grabchev I. Spectroscopic and physicochemical studies of charge-transfer complexes of some benzanthrone derivatives "Luminophore Dyes" with iodine as σ – acceptor // Can. J. Anal. Sci. Spectrosc. 2004. Vol. 49. Article number 258.

328. Konstantinova T., Konstantinov H., Kaneva T. On the synthesis and properties of copolymers of some benzanthrone dye derivatives with methylmethacrylate // A. Spirieva, Polym. Degrad. Stab. 1998. Vol. 62. Article number 323.

329. Dobretsov G., Dmitriev V., Pirogova L., Petrov V., Vladimirov Y. Dimethylaminochalcone and 3-methoxybenzanthrone as fluorescent probes to study biomembranes. III Relationship between state of hydration shell of membrane and state of phospholipids // Stud. Biophys. 1978. Vol. 71. P. 189–196.

330. Dobretsov G. E. Fluorescent probes in investigation of cells, membranes and lipoproteins. Nauka : Moscow, 1989. 277 p. (in Russian).

331. Sorokovoi V. I., Dobretsov G. E., Mishnev V. V., Klebanov G. I., Vladimirov Y. A. 3-Methoxybenzanthrone as fluorescent probe sensitive to conformational changes of proteins // Biophysics. 1974. Vol. 19. P. 30–33.

332. Baglaev T. N., Kalinin N. N., Dobretsov G. E., Kosankova S. T., Vladimirov Y. A. Differences in leukocyte membranes detectable by a fluorescent probe in chronic leukemias // Biull. Eksp. Biol. Med. 1982. Vol. 93. P. 35–37.

333. Korkina L. G., Dobretsov G. E., Val'tsel' G., Kogan E. M., Vladimirov Y. A. Identification of T- and B-lymphocytes using a 3-methoxybenzanthrone fluorescent probe // Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 1978. Vol. 238. P. 999–1002.

334. Yang X., Liu W. H., Jin W. J., Shen G. L., Yu R. Q. DNA binding studies of a solvatochromic fluorescence probe 3-methoxybenzanthrone // Spectrochim. Acta A. 1999. Vol. 55. P. 2719–2727.

335. Kirilova E., Ivanova I. Novel benzanthrone dyes: synthesis and comparison of luminescent properties // Materials Sciences and Applied Chemistry. 2011. Vol. 23. P. 29–33.

336. Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G., Kirilova E., Kalnina I., Kirilov G., Molotkovsky J., Tulkki J., Kinnunen P. Location of novel benzanthrone dyes in model membranes as revealed by resonance energy transfer // *J. Fluoresc.* 2014. Vol. 24. P. 899–907.
337. Vus K., Trusova V., Gorbenko G., Kirilova E., Kirilov G., Kalnina I., Kinnunen P. Novel aminobenzanthrone dyes for amyloid fibril detection // *Chem. Phys. Lett.* 2012. Vol. 532. P. 110–115.
338. Vus K., Girysh M., Gorbenko G., Kinnunen P., Kirilova E., Kirilov G., Adachi E., Saito H. Association of novel benzanthrone dyes with amyloid fibrils: A resonance energy transfer study // *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* 2014. Vol. 68. P. 189–196.
339. Vus K., Trusova V., Gorbenko G., Sood R., Kirilova E., Kirilov G., Kalnina I., Kinnunen P. Fluorescence investigation of interactions between novel benzanthrone dyes and lysozyme amyloid fibrils // *J. Fluoresc.* 2014. Vol. 24. P. 493–504.
340. Kalnina I., Klimkane L., Kirilova E., Toma M. M., Kizane G., Meirovics I. Fluorescent probe ABM for screening gastrointestinal patient's immune state // *J. Fluoresc.* 2007. Vol. 17. P. 619–625.
341. Kirilova E., Kecko S., Mežaraupe L., Gavarāne I., Pučkīns A., Mickeviča I., Rubeniņa I., Osipovs S., Bulanovs A., Pupiņš M., Kirjušina M. Novel luminescent dyes for confocal laser scanning microscopy used in Trematoda parasite diagnostics // *Acta Biochim. Pol.* 2018. Vol. 65. P. 449–454.
342. Trusova V. M., Gorbenko G. P., Deligeorgiev T., Gadjev N., Vasilev A. A novel squarylium dye for monitoring oxidative processes in lipid membranes // *J. Fluoresc.* 2009. Vol. 19. P. 1017–1023.
343. Kutsenko O. K., Trusova V. M., Gorbenko G. P., Lipovaya A. S., Slobozhanina E. I., Lukyanenko L. M., Deligeorgiev T., Vasilev A. Fluorescence study of the membrane effects of aggregated lysozyme // *J. Fluoresc.* 2013. Vol. 23. P. 1229–1237.

344. Gorbenko G., Trusova V., Kirilova E., Kirilov G., Kalnina I., Vasilev A., Kaloyanova S., Deligeorgiev T. New fluorescent probes for detection and characterization of amyloid fibrils // *Chem. Phys. Lett.* 2010. Vol. 495. P. 275–279.
345. Gorbenko G., Trusova V., Deligeorgiev T., Gadjev N., Mizuguchi C., Saito H. Two-step FRET as a tool for probing the amyloid state of proteins // *J. Mol. Liq.* 2019. Vol. 294. Article number 111675.
346. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York : Springer, 2006. 954 p.
347. Vladimirov J.A., Dobretsov G.E. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран [Fluorescent probes in study of biological membranes]. Moscow : Nauka, 1980. 320 p. (in Russian).
348. Brandts J.F., Kaplan L.J. Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor // *Biochemistry.* 1973. Vol. 12. P. 2011–2024.
349. Kuscü M., Akan O.B. A physical channel model and analysis for nanoscale molecular communications with Förster resonance energy transfer (FRET) // *IEEE Transactions on nanotechnology.* 2012. Vol. 11. P. 200–207.
350. Oliveira H.P., Camargo A.J., Macedo L.G., Gehlen M.H., da Silva A.B. Synthesis, structure, electronic and vibrational spectra of 9-(Diethylamino)-benzo(a)phenoxazin-7-ium-5-N-methacrylamide // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2002. Vol. 58. P. 3103–3111.
351. Watrob H.M., Pan C.P., Barkley M.D. Two-step FRET as a structural tool // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125. P. 7336–7343.
352. Csizmadia P. MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the World Wide Web // The third international electronic conference on synthetic organic chemistry. Proceedings of ECSOC-3, 1999. P. 367–369.
353. Hanwell M. D., Curtis D. E., Lonie D. C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G. R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform // *Journal of Cheminformatics.* 2012. Vol. 4. Article number 17.

354. Stewart J. J. MOPAC: A semiempirical molecular orbital program // J. Comput. Aided. Mol. Des. 1990. Vol. 4. P. 1–105.
355. Duhovny D., Nussinov R., Wolfson H. J. Efficient unbound docking of rigid molecules // Lect. Notes. Comput. Sci. Eng. 2002. Vol. 2452. P. 185–200.
356. Trusova V. Modeling of amyloid fibril binding to the lipid bilayer // East European Journal of Physics. 2015. Vol. 2. P. 51–58.
357. Smaoui M. Computational assembly of polymorphic amyloid fibrils reveals stable aggregates // Biophys. J. 2013. Vol. 104. P. 683–693.
358. Tokunaga Y., Sakakibara Y., Kamada Y., Watanabe K., Sugimoto Y. Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils // International Journal of Biological Sciences. 2013. Vol. 9. P. 219 – 227.
359. Nielsen L., Frokjaer S., Brange J., Uversky V. N., Fink A. L. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants // Biochemistry. 2001. Vol. 40. P. 8397–8409.
360. Mashiach E., Schneidman-Duhovny D., Andrusier N., Nussinov R., Wolfson H. J. Fire Dock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking // Nucleic Acids Res. 2008. Vol. 36. P. 229–232.
361. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // J. Mol. Graph. 1996. Vol. 14. P. 33–38.
362. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock // DSS Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39. P. W270–W277.
363. Forli S., Huey R., Pique M. E., Sanner M., Goodsell D. S., Olson A. J. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite // Nat. Protoc. 2016. Vol. 11. P. 905–919.
364. Goodsell D. S., Olson A. J. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing // Proteins: Struct. Funct. Genet. 1990. Vol. 8. P. 195–202.
365. Dallakyan S., Olson A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. Chemical Biology. Methods in Molecular Biology. New York : Humana Press. 2015. Vol. 1263. P. 243–250.

366. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. EADock: Docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization // *Proteins*. 2007. Vol. 67. Article number 1010.
367. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. Blind docking of 260 protein-ligand complexes with EADock 2.0 // *J. Comput. Chem.* 2009. Vol. 13. P. 2021–2030.
368. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // *J. Comp. Chem.* 1998. Vol. 19. P. 1639–1662.
369. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* 2004. Vol. 25. P. 1605–1612.
370. Tetko I. V., Tanchuk V. Y. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2002. Vol. 42. P. 1136–1145.
371. Huang J., MacKerell A. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data // *Journal of Computational Chemistry*. 2013. Vol. 34. P. 2135–2145.
372. Jo S., Kim T., Iyer V. G., Im W. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM // *J. Comput. Chem.* 2008. Vol. 29. P. 1859–1865.
373. Lee J., Cheng X., Swails J. M., Yeom M. S., Eastman P. K., Lemkul J. A., Wei S., Buckner J., Jeong J. C., Qi Y., Jo S., Pande V. S., Case D. A., Brooks III C. L., MacKerell A. D. J., Klauda J. B., Im W. CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field // *J. Chem. Theory Comput.* 2016. Vol. 12. P. 405–413.
374. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems // *Journal of Chemical Physics*. 1993. Vol. 98. P. 10089–10092.

375. Volkova K. D., Kovalska V. B., Inshin D., Slominskii Y. L., Tolmachev O. I., Yarmoluk S. M. Novel fluorescent trimethine cyanine dye 7519 for amyloid fibril inhibition assay // *Biotech. Histochem.* 2011. Vol. 86. P. 188–191.
376. Kovalska V. B., Losytskyy M. Y., Chernii S. V., Chernii V. Y., Tretyakova I. M., Yarmoluk S. M., Volkov S. V. Towards the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines with out-of-plane ligands: correlation with self-association proneness // *Biopolym. Cell.* 2013. Vol. 29. P. 473–479.
377. Kovalska V., Losytskyy M., Chernii V., Volkova K., Tretyakova I., Cherepanov V., Yarmoluk S., Volkov S. Studies of anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines of zirconium containing out-of-plane ligands // *Bioorg. Med. Chem.* 2012. Vol. 20. P. 330–334.
378. Kuret J., Chirita C. N., Congdon E. E., Kannanayakal T., Li G., Necula M., Yin H., Zhohg Q., Pathways of tau fibrillization // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1739. P. 167–178.
379. Kim J. S., Kodagahally R., Strekowski L., Patonay G. A study of intramolecular H-complexes of novel bis(heptamethine cyanine) dyes // *Talanta.* 2005. Vol. 67. P. 947–954.
380. Vieira Ferreira L. F., Oliveira A. S., Wilkinsonb F., Worrallb D. Photophysics of cyanine dyes on surfaces. A new emission from aggregates of 2,2'-cyanines adsorbed onto microcrystalline cellulose // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1996. Vol. 92. P. 1217–1225.
381. Kim O. K., Je J., Jernigan G., Buckley L., Whitten D. Super-helix formation induced by cyanine J-aggregates onto random-coil carboxymethyl amylose as template // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. P. 510–516.
382. Khairutdinov R. F., Serpone N. Photophysics of cyanine dyes: subnanosecond relaxation dynamics in monomers, dimers, and H- and J-aggregates in solution // *J. Phys. Chem. B.* 1997. Vol. 101. P. 2602–2610.
383. Wang M., Silva G. L., Armitage B. A. DNA-templated formation of a helical cyanine dye J-aggregate // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. Vol. 122. P. 9977–9986.

384. Garoff R. A., Litzinger E. A., Connor R. E., Fishman I., Armitage B. A. Helical aggregation of cyanine dyes on DNA templates: effect of dye structure on formation of homo- and heteroaggregates // *Langmuir*. 2002. Vol. 18. P. 6330–6337.
385. Tai S., Hayashi N. Strong aggregation properties of novel naphthalocyanines // *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1991. Vol. 2. P. 1275–1279.
386. Kasha M., Rawls H. R., Ashraf El-Bayoumi M. The exciton model in molecular spectroscopy // *Pure Appl. Chem.* 1965. Vol. 11. P. 371–392.
387. Pasternack R. F., Fleming C., Herring S., Collings P. J., dePaula J., DeCastro G., Gibbs E. J. Aggregation kinetics of extended porphyrin and cyanine dye assemblies // *Biophys. J.* 2000. Vol. 79. P. 550–560.
388. Tatikolov A. S., Costa S. M. B. Effects of normal and reverse micellar environment on the spectral properties, isomerization and aggregation of a hydrophilic cyanine dye // *Chem. Phys. Lett.* 2001. Vol. 346. P. 233–240.
389. Huang W., Wang L.-Y., Fu Y.-L., Liu J.-Q., Tao Y.-N., Fan F.-L., Zhai G.-H., Wen Z.-Y. Study on thermodynamics of three kinds of benzindocarbocyanine dyes in aqueous methanol solution // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2009. Vol. 30. P. 556–560.
390. Nevin W. A., Liu W., Lever A. B. P. Dimerisation of mononuclear and binuclear cobalt phthalocyanines // *Canadian Journal of Chemistry*. 1987. Vol. 65. P. 855–858.
391. Peyratouta C., Daehne L. Aggregation of thiacyanine derivatives on polyelectrolytes // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002. Vol. 4. P. 3032–3039.
392. Yang Y. C., Ward J. R., Seiders R. P. Dimerization of cobalt(II) tetrasulfonated phthalocyanine in water and aqueous alcoholic solutions // *Inorganic Chemistry*. 1985. Vol. 24. P. 1765–1769.
393. Schutte W. J., Sluyters-Rehbach M., Sluyters J. H. Aggregation of an octasubstituted phthalocyanine in dodecane solution // *J. Phys. Chem.* 1993. Vol. 97. P. 6069–6073.

394. Gadde S., Batchelor E. K., Kaifer A. E. Controlling the formation of cyanine dye H- and J-aggregates with cucurbituril hosts in the presence of anionic polyelectrolytes // *Chemistry*. 2009. Vol. 15. P. 6025–6031.
395. Chang E., Congdon E. E., Honson N. S., Duff K. E., Kuret J. Structure–activity relationship of cyanine tau aggregation inhibitors // *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52. P. 3539–3547.
396. Johansson M. K., Fidler H., Dick D., Cook R. M. Intramolecular dimers: a new strategy to fluorescence quenching in dual-labeled oligonucleotide probes // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124. P. 6950–6956.
397. Berlepsch H., Brandenburg E., Koksche B., Böttcher C. Peptide adsorption to cyanine dye aggregates revealed by cryo-transmission electron microscopy // *Langmuir*. 2010. Vol. 26. P. 11452–11460.
398. Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids // *J. Am. Chem. Soc.* 1916. Vol. 38. P. 2221–2295.
399. Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. Interaction of Thioflavin T with amyloid fibrils: stoichiometry and affinity of dye binding, absorption spectra of bound dye // *J. Phys. Chem. B*. 2011. Vol. 115. P. 11519–11524.
400. Kemnitz K., Yoshihara K., Tani T. Short and excitation-independent fluorescence lifetimes of J-aggregates adsorbed on silver (I) bromide and silica // *J. Phys. Chem.* 1990. Vol. 94. P. 3099–3104.
401. Pisoni D. S., Todeschini L., Borges A. C. A., Petzhold C. L., Rodembusch F. S., Campo L. F. Symmetrical and asymmetrical cyanine dyes. Synthesis, spectral properties, and BSA association study // *J. Org. Chem.* 2014. Vol. 79. P. 5511–5520.
402. Eisfeld A., Briggs K. J. S. The J- and H-bands of organic dye aggregates // *Chem. Phys.* 2006. Vol. 324. P. 376–384.
403. Ishchenko A. A. Structure and spectral-luminescent properties of polymethine dyes // *Russ. Chem. Rev.* 1991. Vol. 60. P. 865–884.

404. Seifert J. L., Connor R. E., Kushon S. A., Wang M., Armitage B. A. Spontaneous assembly of helical cyanine dye aggregates on DNA nanotemplates // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. Vol. 121. P. 2987–2995.
405. Zhang Y.-Z., Yang Q.-F., Du H.-Y., Tang Y.-L., Xu G.-Z., Yan W.-P. Spectroscopic investigation on the interaction of a cyanine dye with serum albumins // *Chin. J. Chem.* 2008. Vol. 26. P. 397–401.
406. Lindberg D. J., Esbjörner E. K. Detection of amyloid- β fibrils using the DNA-intercalating dye YOYO-1: Binding mode and fibril formation kinetics // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. Vol. 469. P. 313–318.
407. Hannah K. C., Armitage B. A. DNA-templated assembly of helical cyanine dye aggregates: a supramolecular chain polymerization // *Acc. Chem. Res.* 2004. Vol. 37. P. 845–853.
408. Lau V., Heyne B. Calix[4]arene sulfonate as a template for forming fluorescent thiazole orange H-aggregates // *Chem. Commun.* 2010. Vol. 46. P. 3595–3597.
409. Beckford G., Owens E. A., Henary M. M., Patonay G. The solvatochromic effects of side chain substitution on the binding interaction of novel tricarbocyanine dyes with human serum albumin // *Talanta*. 2012. Vol. 92. P. 45–52.
410. Rosch U., Yao S., Wortmann R., Wurthner F. Fluorescent H-aggregates of merocyanine dyes // *Ange. Chem. Int. Ed.* 2006. Vol. 45. P. 7026–7030.
411. Godjayev N. M., Akyüz S., Ismailova L. The conformational properties of Glu 35 and Asp 52 of lysozyme active center // *Int. J. Phys. Eng. Sci.* 1998. Vol. 51. P. 56–60.
412. Ogulchansky T. Y., Losytskyy M. Y., Kovalska V. B., Lukashov S. S., Yashchuk V. M., Yarmoluk S. M. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XVIII. Formation of the carbocyanine dye J-aggregates in nucleic acid grooves // *Spectrochim. Acta, Part A*. 2001. Vol. 57. P. 2705–2715.
413. Guralchuk G. Y., Sorokin A. V., Katrunov I. K., Yefimova S. L., Lebedenko A. N., Malyukin Y. V., Yarmoluk S. M. Specificity of cyanine dye L-21 aggregation in solutions with nucleic acids // *J. Fluoresc.* 2007. Vol. 17. P. 370–376.

414. Donabedian P. L., Evanoff M., Monge F. A., Whitten D. G., Chi E. Y. Substituent, charge, size effects on the fluorogenic performance of amyloid ligands: a small-library screening study // *ACS Omega*. 2017. Vol. 2. P. 3192–3200.
415. Seeber S. J., White J. L., Hem S. L. Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants // *Vaccine*. 1991. Vol. 9. P. 201–203.
416. Cui F., Shi K., Zhang L., Kawashima Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin–phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation // *J. Control. Release*. 2006. Vol. 114. P. 242–250.
417. Scott D. A. Crystalline insulin // *Biochem J*. 1934. Vol. 28. P. 1592–1602.
418. Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Synthesis of meso-chloro-substituted pentamethine cyanine dyes containing benzothiazolyl/benzoselenazolyl chromophores novel synthetic approach and studies on photophysical properties upon interaction with bio-objects // *J Fluor* 2016. Vol. 26. P. 177–187.
419. Slavnova T. D., Görner H., Chibisov A. K. J-aggregation of anionic ethyl mesothiacarbocyanine dyes induced by binding to proteins // *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111. P. 10023–10031.
420. Slavnova T. D., Görner H., Chibisov A. K. Cyanine-based J-aggregates as a chiralitysensing supramolecular // *J. Phys. Chem. B*. 2011. Vol. 115. P. 3379–3384.
421. Hanczyc P., Sznitko L., Zhong C., Heeger A. J. Stimulated emission from rhodamine 6G aggregates self-assembled on amyloid protein fibrils // *ACS Photonics*. 2015. Vol. 2. P. 1755–1762.
422. Nygren J., Svanvik N., Kubitsa M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA // *Biopolymers*. 1998. Vol. 46. P. 39–51.
423. Wu P., Brand L. Resonance energy transfer: methods and applications // *Anal. Biochem*. 1994. Vol. 218. P. 1–13.
424. Selvin P. R. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer // *Nature Struct. Biol*. 2000. Vol. 7. P. 730–734.

425. Loura L. M., Prieto M. FRET in membrane biophysics: an overview // *Front. Physiol.* 2011. Vol. 2. Article number 82.
426. Ramanoudjame G., Du M., Mankiewicz K. A., Jayaraman V. Allosteric mechanism in AMPA receptors: A FRET-based investigation of conformational changes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103. P. 10473–10478.
427. Coskun A., Akkaya E. U. Signal ratio amplification via modulation of resonance energy transfer: proof of principle in an emission ratiometric Hg(II) sensor // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. P. 14474–14475.
428. Domanov Y., Gorbenko G. P. Analysis of resonance energy transfer in model membranes: role of orientational effects // *Biophys. Chem.* 2002. Vol. 99. P. 143–154.
429. Buckhout-White S., Spillmann C., Algar W. R., Khachatrian A., Melinger J. S., Goldman E. R., Ancona M. G., Medintz I. L. Assembling programmable FRET-based photonic networks using designer DNA scaffolds // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5. Article number 5615.
430. Hu J., Liu M., Zhang C. Construction of tetrahedral DNA-quantum dot nanostructure with the integration of multistep Förster resonance energy transfer for multiplex enzymes assay // *ASC Nano.* 2019. Vol. 13. P. 7191–7201.
431. Hu X., Li Y., Liu T., Zhang G., Liu S. Intracellular cascade FRET for temperature imaging of living cells with polymeric ratiometric fluorescent thermometers // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. Vol. 7. P. 15551–15560.
432. Navarathne D., Ner Y., Grote J. G., Sotzing G. A. Three dye energy transfer cascade within DNA thin films // *Chem. Commun. (Camb).* 2011. Vol. 47. P. 12125–12127.
433. Ulrich G., Goze C., Guardigli M., Rodda A., Ziessel R. Pyrromethene dialkynyl borane complexes for “cascatelle” energy transfer and protein labeling // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. Vol. 44. P. 3694–3698.
434. Duan X., Wang S., Li Z. Conjugated polyelectrolyte–DNA complexes for multi-color and one-tube SNP genotyping assays // *Chem. Commun.* 2008. Vol. 11. P. 1302–1304.

435. Aneja A., Mathur N., Bhatnagar P. K., Mathur P. C. Triple-FRET technique for energy transfer between conjugated polymer and TAMRA dye with possible applications in medical diagnostics // *J. Biol. Phys.* 2008. Vol. 34. P. 487–493.
436. Raicu V. Efficiency of resonance energy transfer in homo-oligomeric complexes of proteins // *J. Biol. Phys.* 2007. Vol. 33. P. 109–127.
437. He L., Wu X., Simone J., Hewgill D., Lipski P. E. Determination of tumor necrosis factor receptor-associated factor trimerization in living cells by CFP→YFP→mRFP FRET detected by flow cytometry // *Nucleic Acid Res.* 2005. Vol. 33. P. 61–73.
438. Galperin E., Verkhusha V. V., Sorkin A. Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells // *Nature Methods.* 2004. Vol. 1. P. 209–217.
439. Tinnefeld P., Heilemann M., Sauer M. Design of molecular photonic wires based on multistep electronic excitation transfer // *Chem. Phys. Chem.* 2005. Vol. 6. P. 217–222.
440. Albinsson B., Hannestad J. K., Borjesson K. Functionalized DNA nanostructures for light harvesting and charge separation // *Coordination Chemistry Reviews.* 2012. Vol. 256. P. 2399–2413.
441. Yoshihara H., Saito J., Tanabe A., Amada T., Asakura T., Kitagawa K., Asada S. Characterization of novel insulin fibrils that show strong cytotoxicity under physiological pH // *J. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 105. P. 1419–1426.
442. Groenning M., Norrman M., Flink J. M., van de Weert M., Bukrinsky J. T., Schluckebier G., Frokjaer S. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils // *J. Struct Biol.* 2007. Vol. 159. P. 483–497.
443. Khrolova O. R., Kunavin N. I., Komlev I. V., Tavrizova M. A., Trofimova S. I., Madii V. A., Petukhov V. A. Spectral and luminescence properties of phosphorylmethyl derivatives of 3-aminobenzathrone // *J. Appl. Spectrosc.* 1984. Vol. 41. P. 771–775.
444. Rettig W. Charge separation in excited states of decoupled systems-TICT compounds and implications regarding the development new laser dyes and the

primary processes of vision and photosynthesis // *Anyrw. Chem. Int. Ed. Engl.* 1986. Vol. 25. P. 971–988.

445. Haberhauer G., Gleiter R., Burkhart C. Planarized intramolecular charge transfer: a concept for fluorophores with both large stokes shifts and high fluorescence quantum yields // *Chem. Eur. J.* 2016. Vol. 22. P. 971–978.

446. Sasaki S., Drummen G. P. C., Konishi G. Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry // *J. Mater. Chem. C.* 2016. Vol. 4. P. 2731–2743.

447. Chang T. L., Cheung H. C. A model for molecules with twisted intramolecular charge transfer characteristics: solvent polarity effect on the nonradiative rates of dyes in a series of water-ethanol mixed solvents // *Chem. Phys. Lett.* 1990. Vol. 173. P. 343–348.

448. Catalán J., Reichardt C. Is the LE→TICT process in the S1 excited state of 9,9'-bisanthracenyl influenced by the viscosity or the dipolarity of the solvent? // *Journal of Luminescence.* 2013. Vol. 143. P. 635–663.

449. Grych M., Gorbenko G., Trusova V., Adachi E., Mizuguchi C., Nagao K., Kawashima H., Akaji K., Lund-Katz S., Phillips M. C., Saito H. Interaction of Thioflavin T with amyloid fibrils of apolipoprotein A-I N-terminal fragment: resonance energy transfer study // *J. Struct. Biol.* 2014. Vol. 185. P. 116–124.

450. Vus K., Trusova V., Gorbenko G., Zhytniakivska O., Kirilova E., Kirilov G., Kalnina I. Interaction of novel benzanthrone derivative with amyloid lysozyme // *Biophys. Bull.* 2011. Vol. 26. P. 73–82.

451. Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to the surface of beta-rich peptide self-assemblies // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 385. P. 1052–1063.

452. Wu C., Wang Z., Lei H., Duan Y., Bowers M. T., Shea J. E. The binding of thioflavin T and its neutral analog BTA-1 to protofibrils of the Alzheimer's disease Abeta(16-22) peptide probed by molecular dynamics simulations // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 384. P. 718–729.

453. Wu C., Biancalana M., Koide S., Shea J. E. Binding modes of Thioflavin-T to the single-layer beta-sheet of the peptide self-assembly mimics // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 394. P. 627–633.
454. Arad E., Green H., Jelinek R., Rapaport H. Revisiting thioflavin T (ThT) fluorescence as a marker of protein fibrillation – The prominent role of electrostatic interactions // *Journal of Colloid and Interface Science.* 2020. Vol. 573. P. 87–95.
455. Gsponer J., Caflisch A. Molecular dynamics simulations of protein folding from the transition state // *PNAS.* 2002. Vol. 99 P. 6719– 6724.
456. Zhou R., Eleftheriou M., Hon C. C., Germain R. S., Royyuru A. K., Berne B. J. Massively parallel molecular dynamics simulations of lysozyme unfolding // *IBM Journal of Research and Development.* 2008. Vol. 52. P. 19–30.
457. Liu H. L., Wu Y. C., Zhao J. H., Fang H. W., Ho Y. Structural analysis of human lysozyme using molecular dynamics simulations // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2006. Vol. 24. P. 229–238.
458. Dhulesia A., Cremades N., Kumita J. R., Hsu S. T. D., Mossuto M. F., Dumoulin M., Nietlispach D., Akke M., Salvatella X., Dobson C.M. Local cooperativity in an amyloidogenic state of human lysozyme observed at atomic resolution // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132. P. 15580–15588.
459. Buell A. K., Dhulesia A., Mossuto M. F., Cremades N., Kumita J. R., Dumoulin M., Welland M. E., Knowles T. P. J., Salvatella X., Dobson C. M. Population of nonnative states of lysozyme variants drives amyloid fibril formation // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133. P. 7737–7743.
460. Ahmad A., Uversky V. N., Hong D., Fink A. L. Early events in the fibrillation of monomeric insulin // *Journal of Biological Chemistry.* 2005. Vol. 280. P. 42669–42675.
461. Akbarian M., Yousefi R., Farjadian F., Uversky V. N. Insulin fibrillation: toward the strategies for attenuating the process // *Chem. Commun.* 2020. Vol. 56. P. 11354–11373.

462. Brange J., Dodson G. G., Edwards D. J., Holden P. H., Whittingham J. L. A model of insulin fibrils derived from the x-ray crystal structure of a monomeric insulin (despentapeptide insulin) // *Proteins*. 1997. Vol. 27. P. 507–516.
463. Garriques L. N., Frokjaer S., Carpenter J. F., Brange J. The effect of mutations on the structure of insulin fibrils studied by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002. Vol. 91. P. 2473–2480.
464. Pandeyarajan V., Phillips N. B., Rege N., Lawrence M. C., Whittaker J., Weiss M. A. Insulin fibrillation: toward strategies for attenuating the process // *Journal of Biological Chemistry*. 2016. Vol. 291. P. 12978–12990.
465. Babenko V., Dzwolak W. Amino acid sequence determinants in self-assembly of insulin chiral amyloid superstructures: Role of C-terminus of B-chain in association of fibrils // *FEBS letters*. 2013. Vol. 587. P. 625–630.
466. Derewenda U., Derewenda Z., Dodson E., Dodson G., Reynolds C., Smith G., Sparks C., Swenson D. Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer // *Nature*. 1989. Vol. 338. P. 594–596.
467. Hua Q., Weiss M. A. Comparative 2D NMR studies of human insulin and despentapeptide insulin: sequential resonance assignment and implications for protein dynamics and receptor recognition // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30. P. 5505–5515.
468. Choi T. S., Lee J. W., Jin K. S., Kim H. I. Insulin fibrillation: toward strategies for attenuating the process // *Biophysical Journal*. 2014. Vol. 107. P. 1939–1949.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Публікації, які відображають основні наукові результати дисертації

Публікації у фахових виданнях України

1. Tarabara U., Vus K., Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel cyanine dyes as potential amyloid probes: a fluorescence study // East. Eur. J. Phys. 2018. Vol. 5, No. 1. P. 41–46.
URL: <https://periodicals.karazin.ua/eejp/article/view/10462>
(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).
2. Tarabara U., Trusova V., Vus K., Ryzhova O., Gorbenko G. Molecular dynamics study of amyloidogenic mutants of human lysozyme // East. Eur. J. Phys. 2018. Vol. 5, No. 4. P. 30–39.
URL: <https://periodicals.karazin.ua/eejp/article/view/12203>
(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні статті).
3. Tarabara U., Shchuka M., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Three-step resonance energy transfer in insulin amyloid fibrils // East Eur. J. Phys. 2019. No. 4. P. 58–69.
URL: <https://doi.org/10.26565/2312-4334-2019-4-06>
(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).

***Публікація у фаховому виданні України, що індексується в
наукометричній базі SCOPUS***

4. Tarabara U., Vus K., Shchuka M., Kirilova E., Kirilov G., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G., Deligeorgiev T. Cascade energy transfer in insulin amyloid fibrils doped by Thioflavin T, benzanthrone and squaraine dyes // East Eur. J. Phys. 2020. No. 1. P. 103–110.

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85088950557&origin=resultslist>

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, проведенні флуоресцентних вимірювань, інтерпретації результатів, написанні статті).

***Публікації у періодичних наукових виданнях країн, які входять до
Організації економічного співробітництва та розвитку, що входять до
міжнародної наукометричної бази SCOPUS***

5. Vus K., Tarabara U., Kurutos A., Ryzhova O., Gorbenko G., Trusova V., Gadjev N., Deligeorgiev T. Aggregation behavior of novel heptamethine cyanine dyes upon their binding to native and fibrillar lysozyme // Mol. Biosyst. 2017. Vol. 13. P. 970–980.

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85021741832&origin=resultslist>

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, підготовці зразків, проведенні експериментів, деконволюції спектрів поглинання барвників, інтерпретації результатів, написанні статті).

6. Zhytniakivska O., Kurutos A., Tarabara U., Vus K., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Probing the amyloid protein aggregates with unsymmetrical monocationic trimethine cyanine dyes // J. Mol. Liq. 2020. Vol. 311. Article number 113287.

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85084409710&origin=resultslist>

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні статті).

7. Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Benzanthrone dyes as mediators of cascade energy transfer in insulin amyloid fibrils // J. Mol. Liq. 2021. Vol. 324. Article number 115102.

URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85098117856&origin=resultslist>

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

8. Tarabara U., Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Modulating effect of biomolecules on aggregation behavior of novel heptamethine dyes // Luminescent processes in condensed state of matter : 4th International Scientific and Technical Conference for Young Scientists, 07–09 October, 2015. : abstr. Kharkiv, 2015. P. 64. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірюванні та деконволюції спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*

9. Тарабара У. К. Фотофізичні властивості пентаметинових флуорофорів // Актуальні проблеми сучасної фізики : Студентська наукова конференція з прикладної фізики до 90-річчя Д. В. Волкова, 13 листопада 2015 р. : тези доп. Харків, 2015. С. 58–60. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірюванні та деконволюції спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*
10. Tarabara U., Ryzhova O., Trusova V., Kurutos A. The possibility of differentiating between native and amyloid-aggregated states of lysozyme with a novel heptamethine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : X International young scientists' conference, 2–4 December, 2015. : abstr. Kharkiv, 2015. P. 29. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірюванні та деконволюції спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*
11. Tarabara U. K., Vus K. O. Detection of lysozyme amyloid fibrils by the new heptamethine cyanine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : XI International young scientists' conference, 29 November – 2 December, 2016. : abstr. Kharkiv, 2016. P. 23–24. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірювання та деконволюція спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*
12. Tarabara U., Vus K., Trusova V., Gorbenko G. Quantitative description of lysozyme-modulated aggregation of heptamethine cyanine dye // II International Young Scientists Forum on Applied Physics and Engineering, 10–14 October, 2016.: abstr. Kharkiv, 2016, BMP 6. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, вимірюванні та деконволюції спектрів поглинання барвників, аналізі результатів, написанні тез).*

13. Tarabara U. K., Vus K. O., Ryzhova O. A. Novel heptamethine cyanine dyes as potential amyloid markers // Biology: from a molecule up to the biosphere : XII International young scientists' conference, 29 November – 1 December, 2017. : abstr. Kharkiv, 2017. P. 20–21. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі результатів, написанні тез).*
14. Tarabara U. K. Fluorescence and molecular dynamic study of lysozyme amyloid fibrils // Актуальні проблеми сучасної фізики : Студентська наукова конференція з прикладної фізики до 55-річчя Фізико-технічного факультету, 24 листопада 2017 р. : тези доп. Харків, 2017. С. 62–64. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні молекулярно-динамічного моделювання білків, аналізі результатів, написанні тез).*
15. Tarabara U., Trusova V., Vus K. Molecular dynamic simulations of human lysozyme and its amyloidogenic mutants // Youth and progress of biology : The XIII International scientific conference for students and PhD students, 25–27 April, 2017. : abstr. Lviv, 2017. P. 20–21. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні молекулярно-динамічного моделювання білків, аналізі результатів, написанні тез).*
16. Tarabara U., Vus K., Ryzhova O., Gorbenko G., Trusova V. The mechanism of cyanine dye binding to lysozyme amyloid fibrils // Current chemical problems : X Ukrainian scientific conference for students and young scientists with international participation, 27–29 March, 2017. : abstr. Vinnytsia, 2017. P. 72. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі результатів, написанні тез).*
17. Tarabara U. K., Ryzhova O. A., Vus K. O. Spectroscopic detection of insulin amyloid fibrils by the new trimethine cyanine dye // Biology: from a molecule up to the biosphere : XIII International young scientists'

- conference, 28–30 November, 2018. : abstr. Kharkiv, 2018. P. 37–38. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
18. Shchuka M., Tarabara U., Vus K., Zhytniakivska O., Kirilova E., Kirilov G., Trusova V., Gorbenko G., Deligeorgiev T. Multi-step energy transfer in insulin amyloid fibrils // VIII з'їзд Українського біофізичного товариства, 12–15 листопада 2019 р. : матер. чергового з'їзду. Київ – Луцьк, 2020. С. 26. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
19. Tarabara U. K., Vus K. O., Zhytniakivska O. A., Trusova V. M. H-aggregation of the novel trimethine cyanine dye as an indicator of the insulin amyloid transformation // Low temperature physics : X International conference for professionals and young scientists in memory of B. Verkin for his 100th birthday anniversary, 3–7 June, 2019. : abstr. Kharkiv, 2019. P. 128. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
20. Tarabara U. K., Kirilova E., Kirilov G., Vus K. O., Zhytniakivska O. A., Trusova V. M., Gorbenko G. P. Amyloid fibrils as a scaffold for cascade energy transfer // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Международная научная конференция, 17–19 июня 2020 г. : тезисы докл. Минск, 2020. С. 25. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
21. Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Shchuka M., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Benzanthrone dyes as mediators in three-step Förster energy transfer scaffolded by insulin amyloid fibrils //

- 62 International scientific conference of Daugavpils, 28–29 May, 2020. : abstr. Daugavpils, 2020. P. 37. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
- 22.Tarabara U., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V. Novel benzanthrone dye AZM as mediator of cascade energy transfer in insulin fibrils // Problems and achievements of the modern chemistry : XXI Scientific Youth Conference, 7–8 May, 2020. : abstr. Odessa, 2020. P. 51. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*
- 23.Tarabara U., Shchuka M., Kirilova E., Kirilov G., Vus K., Zhytniakivska O., Trusova V., Gorbenko G. Cascade energy transfer between benzothiazole, benzanthrone and squaraine dyes in beta-structured protein aggregates // Current chemical problems : III International scientific conference for students and young scientists, 25–27 March, 2020. : abstr. Vinnytsya, 2020. P. 27. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці задач дослідження, підготовці зразків, проведенні флуоресцентних вимірювань, аналізі результатів, написанні тез).*

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації

- 24.Tarabara U., Ryzhova O., Vus K., Kurutos A., Trusova V., Gorbenko G., Gadjiev N., Deligeorgiev T. Novel trimethine cyanine dye as potential amyloid marker // East. Eur. J. Phys. 2018. Vol. 5, No. 4. P. 22–29.
URL: <https://periodicals.karazin.ua/eejp/article/view/12201>
(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі даних наукової літератури, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні статті).