

На правах рукописи

Украинцев Егор Владиславович

**Исследование структурных свойств
полимеров амилоид β пептида и
лизоцима методами силовой
спектроскопии и атомно-силовой
микроскопии**

Специальность 02.00.06 - Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2007

Работа выполнена на кафедре физики полимеров и кристаллов физического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель:

Доктор физико-математических наук, профессор

Яминский Игорь Владимирович

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук, профессор

Шайтан Константин Вольдемарович

Кандидат физико-математических наук

Дюжев Николай Алексеевич

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита состоится 16 мая 2007 г. в 15 час. на заседании диссертационного совета Д 501.002.01 в Московском Государственном Университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, Физический факультет МГУ, д.1, строение 35, Конференц-зал ЦКП физического факультета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ.

Автореферат разослан 11 апреля 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Д 501.002.01

кандидат физико-математических наук

Т.В. Лаптинская

1 Общая характеристика работы

Актуальность темы

Одна из актуальных на сегодняшний день проблем, стоящая перед физиками, заключается в том, что нужно изучить влияние температуры, рН, типа поверхности и вида сорбции на конформацию молекул полимеров, а также механизм взаимодействия молекул, находящихся в нативном состоянии или в конформации с неправильной укладкой. Известно, что больше половины нейродегенеративных заболеваний связано с неправильным складыванием белковых молекул. Поэтому очень важно изучить влияние температуры, рН, типа поверхности и вида сорбции на конформацию молекул полимеров.

Физическая и химическая сорбция молекул к поверхности является важным фактором, определяющим конформацию молекул. Поэтому нужно исследовать, как будут меняться свойства макромолекулярного полимерного комплекса при его закреплении на поверхности. Изменение свойств полимеров при физической и химической сорбции пока еще не достаточно изучено. Большинство процессов в организме человека происходят на различных поверхностях, например мембранах клеток, поэтому очень важно знать, как различаются свойства молекул в объеме и на поверхности.

Цели работы

1. Изучить причины (изменение температуры, рН, вида поверхности и типа сорбции) и следствия (возникновение сильного межмолекулярного взаимодействия между одинаковыми молекулами, образование фибрилл и других типов агрегатов) конформационного перехода молекул биополимеров из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой.

2. Изучить конформационные переходы в биомакромолекулах с помощью атомно-силовой микроскопии и силовой спектроскопии.
3. На атомно-силовом микроскопе и на Атомных весах изучить межмолекулярное взаимодействие полимеров, находящихся в нативном состоянии и состоянии с неправильной укладкой на примере амилоид β пептида и лизоцима.
4. Определить факторы (температура, рН, вид поверхности и тип сорбции), которые влияют на конформацию молекул.
5. Изучить последствия изменения молекулами конформации на взаимодействие молекул между собой на примере амилоид β пептида и лизоцима.
6. Исследовать агрегацию молекул лизоцима на различных поверхностях (слюда, золото, графит) и при различных типах сорбции (физическая или химическая).
7. Исследовать влияние вида поверхности и типа сорбции на температуру конформационного перехода в лизоциме.

Научная новизна работы

1. Методами силовой спектроскопии и атомно-силовой микроскопии определены условия, при которых происходит переход молекул полимеров амилоид β пептида и лизоцима из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой.
2. Впервые при помощи силовой спектроскопии и атомно-силовой микроскопии изучено межмолекулярное взаимодействие полимеров амилоид β пептида и лизоцима, находящихся в состоянии с неправильной укладкой.

3. Впервые исследовано влияние температуры, рН, вида поверхности и типа сорбции на конформацию молекул амилоид β пептида и лизоцима.
4. Впервые обнаружено, что все эти факторы могут приводить к изменению конформации молекул и к последующей агрегации полимеров с образованием фибрилл.
5. Впервые обнаружено, что молекулы полимеров, привитые к поверхности, могут агрегировать и образовывать фибриллы.
6. Впервые обнаружено, что химическая сорбция может способствовать агрегации полимеров.
7. Обнаружено, что химическая сорбция молекул лизоцима к поверхности золота и физическая сорбция молекул лизоцима на поверхность графита приводит к **понижению температуры конформационного перехода из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой** по крайней мере до комнатной температуры (20 °С).
8. Обнаружено, что физическая сорбция молекул лизоцима на поверхность слюды и слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана приводит к **понижению температуры конформационного перехода из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой** по крайней мере до 50 °С.

На защиту выносятся следующие результаты и положения

1. Определены условия (температура, рН, вид поверхности и тип сорбции), при которых амилоид β пептид и лизоцим переходят из нативной конформации (неамилоидогенной конформации) в состояние с неправильной укладкой (амилоидогенную конформация).
2. Обнаружено, что амилоид β пептид ($pI = 5.5$), химически сорбированный на поверхность слюды, изменяет свою конформацию при повышении кислотности среды с рН5.6 до рН3.7 при комнатной температуре.
3. Обнаружено, что лизоцим ($pI = 11$), физически сорбированный на графит, химически сорбированный на слюду или золото, изменяет свою конформацию при повышении кислотности среды с рН4.5 до рН3.0 при комнатной температуре.
4. Обнаружено, что лизоцим, физически сорбированный на слюду и слюду, обработанную 3-аминопропилсилатраном, изменяет свою конформацию (при рН3.0) при повышении температуры до 50 °С.
5. Этот конформационный переход происходит под действием различных факторов, таких как понижение рН, повышение температуры, близость поверхности из-за физической или химической сорбции.
6. Вследствии этого конформационного перехода происходит значительное увеличение вероятности взаимодействия двух молекул между собой по сравнению с нативной конформацией (в которой молекулы между собой почти не взаимодействуют),

например, сила взаимодействия двух молекул равна ~ 40 пН для амилоид β пептида и ~ 110 пН для лизоцима.

7. Это межмолекулярное взаимодействие приводит к агрегации амилоид β пептида и лизоцима. При этом могут образовываться линейные фибриллы и порообразные агрегаты.
8. Обнаружено формирование фибрилл лизоцима на твердой подложке в условиях, при которых они не образуются в растворе.
9. Обнаружено формирование фибрилл лизоцима, химически сорбированного на поверхность золота и отсутствие агрегации лизоцима, физически сорбированного на поверхность золота.
10. Обнаружено, что химическая сорбция молекул лизоцима к поверхности золота и физическая сорбция молекул лизоцима на поверхность графита приводит к понижению температуры конформационного перехода из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой по крайней мере до комнатной температуры.
11. Обнаружено, что физическая сорбция молекул лизоцима на поверхность слюды и слюды со слоем АПС приводит к понижению температуры конформационного перехода из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой по крайней мере до 50 °С.

Научная и практическая ценность

Впервые измерено взаимодействие двух молекул амилоид β пептида и лизоцима, находящихся в состоянии с неправильной укладкой.

Впервые обнаружено, что физическая и химическая сорбция молекул к поверхности может приводить к изменению конформации этой молекулы.

Впервые исследовано влияние вида поверхности и типа сорбции на температуру конформационного перехода в лизоциме.

Впервые изучена агрегация лизоцима на поверхности в условиях, когда она не происходит в растворе.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы докладывались на следующих конференциях:

1. 19th Annual Gibbs Conference on Biothermodynamics (США, 2005). Conformation-dependent interprotein interaction studied by AFM force spectroscopy. E.V. Ukraintsev, T.O. Zaikova, J.F.W. Keana and Y.L.Lyubchenko;
2. 19th Annual Gibbs Conference on Biothermodynamics (США, 2005). Study of DNA-Sfi I complex stability using AFM force spectroscopy. A.V. Krasnoslobodtsev, L.S. Shlyakhtenko, E.V. Ukraintsev and Y.L. Lyubchenko;
3. International Conference on Nanoscience and Technology (Швейцария, 2006). Atomic balance observation of protein aggregation on a cantilever surface. G. Kiselev, A.Kudrinskii, E.Ukraintsev, I. Yaminsky, G.Lisichkin;
4. Третья Всероссийская конференция (с международным участием), Химия поверхности и нанотехнология (Россия, 2006). Изучение агрегации лизоцима, иммобилизованного на поверхности золота и слюды, с помощью кантилевера для атомно-силовой микроскопии. Е.В. Украинцев, Г.А. Киселев, А.А. Кудринский, Г.В. Лисичкин, И.В. Яминский.

Публикации

Основные результаты работы доложены на 3 конференциях и опубликованы в 3 статьях и 4 тезисах докладов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, двух глав, заключения и списка литературы. Общий объем — 127 страниц, в том числе 45 рисунков и 1 таблица. Список литературы содержит 82 наименования.

2 Содержание диссертации

Во **введении** обосновывается актуальность темы, формулируются цели и задачи диссертационной работы и изложено ее краткое содержание.

В **первой** главе содержится обзор работ, связанных с исследованием межмолекулярных взаимодействий и агрегации белков. Сформулированы нерешенные задачи и обоснована постановка задачи диссертационной работы.

В первом параграфе главы 1 рассматриваются основные методы исследования межмолекулярных взаимодействий. Описаны основы и некоторые экспериментальные данные, полученные при помощи атомно-силовой микроскопии и силовой спектроскопии.

Во втором параграфе главы 1 рассмотрены общие свойства белков, исследованных в этой работе. Описаны проведенные ранее эксперименты по определению свойств амилоид β пептида и лизоцима.

В третьем параграфе главы 1 описано влияние поверхности на конформацию молекулы и влияние химической сорбции на конформацию молекулы. Сформулирована нерешенная ранее задача о вли-

янии химической сорбции на конформацию молекулы.

В четвертом параграфе главы 1 описано исследование взаимодействия двух молекул, находящихся в состоянии с неправильной укладкой. Сформулирована нерешенная ранее задача об исследовании взаимодействия двух одинаковых молекул, находящихся в состоянии с неправильной укладкой.

Во **второй главе** описаны экспериментальные результаты по исследованию межмолекулярного взаимодействия и агрегации полимеров.

В первом параграфе главы 2 описаны эксперименты по изучению межмолекулярного взаимодействия на примере амилоид β пептида, проведенные мной в лаборатории Юрия Львовича Любченко в UNMC (University of Nebraska Medical Center, USA, Nebraska) в 2004 - 2005 году.

Известно, что процесс агрегации амилоид β пептида связан с возникновением болезни Альцгеймера. При определенных условиях молекулы амилоид β пептида **теряют свою нативную конформацию (точнее, неамилоидогенную) и переходят в конформацию с неправильной укладкой (амилоидогенную)**. Молекулы, находящиеся в этом состоянии, взаимодействуют между собой, что приводит к образованию фибрилл. Возможно, что образование этих фибрилл каким-либо образом связано с развитием болезни Альцгеймера.

Эта работа является первой работой по исследованию взаимодействия двух одинаковых молекул, находящихся в конформации с неправильной укладкой. Эти эксперименты направлены на то, чтобы решить следующие задачи:

1. Определить, при каких условиях происходит **конформаци-**

онный переход в молекулах амилоид β пептида из-за понижения рН при комнатной температуре и физиологической ионной силе раствора (150 мМ).

2. Исследовать **взаимодействие молекул** амилоид β пептида, находящихся в нативной конформации и в конформации с неправильной укладкой.

3. Определить **силу взаимодействия двух** молекул амилоид β пептида, находящихся в конформации с неправильной укладкой.

Для решения этих задач был предложен **новый способ закрепления молекул** амилоид β пептида на поверхности. Он заключается в том, что каждая молекула пептида химически сорбируется (ковалентно пришивается) через SH группу цистеина, находящегося на N-конце молекулы, к малеимидной группе, закрепленной на поверхности слюды или Si_3N_4 кантилевера, см. рис. 1.

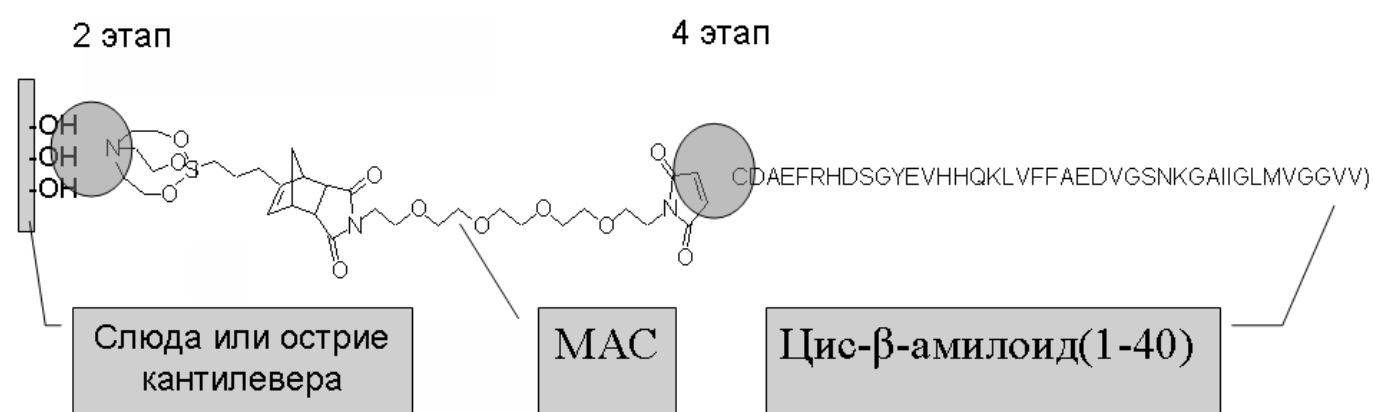


Рис. 1. Способ закрепления амилоид β пептида на поверхностях слюды и острия кантилевера, использованный в моей работе.

Было установлено, что **конформационный переход** из нативного состояния в конформацию с неправильной укладкой в молекулах амилоид β пептида происходит в диапазоне рН 5.6 — рН 3.7 при комнатной температуре и физиологической ионной силе раствора (150 мМ), см. рис. 2.

Силовые кривые приведены в координатах „Сила“ — „Расстояние между острием и образцом“. Сила F определяется из закона Гука

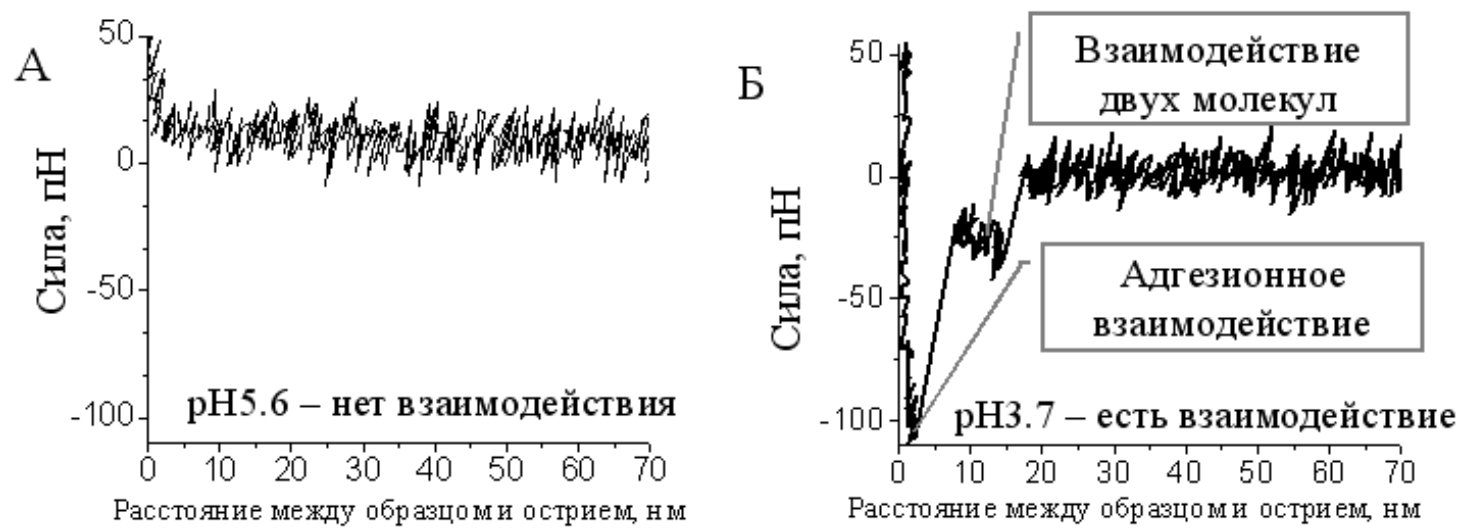


Рис. 2. Типичные силовые кривые, получаемая на АСМ Nanoscope IIIa при значениях рН5.6 (А) и рН3.7 (Б) при исследовании межмолекулярного взаимодействия.

$F = kd$, где k — жесткость кантилевера, d — отклонения кантилевера, измеряемое при помощи лазерного луча. Расстояние s между образцом и кантилевером полагается равным $s = d - Z$, где Z — положение пьезосканера. В этих координатах шумовой сигнал имеет специфический (наклонный) вид [1].

Из литературных данных известно, что исследованный конформационный переход сопровождается изменением вторичной структуры молекулы. Этот результат подтвержден данными экспериментов по компьютерному моделированию [2] и измерению циркулярного дихроизма раствора амилоид β пептида [3].

Было установлено, что молекулы амилоид β пептида находящиеся в нативном состоянии, между собой практически **не взаимодействуют**. Однако, молекулы амилоид β пептида находящиеся конформации с неправильной укладкой **взаимодействуют между собой**.

На двух разных приборах была определена **сила взаимодействия двух** молекул амилоид β пептида, находящихся в конформации с неправильной укладкой. Она оказалась равной ~ 40 пН,

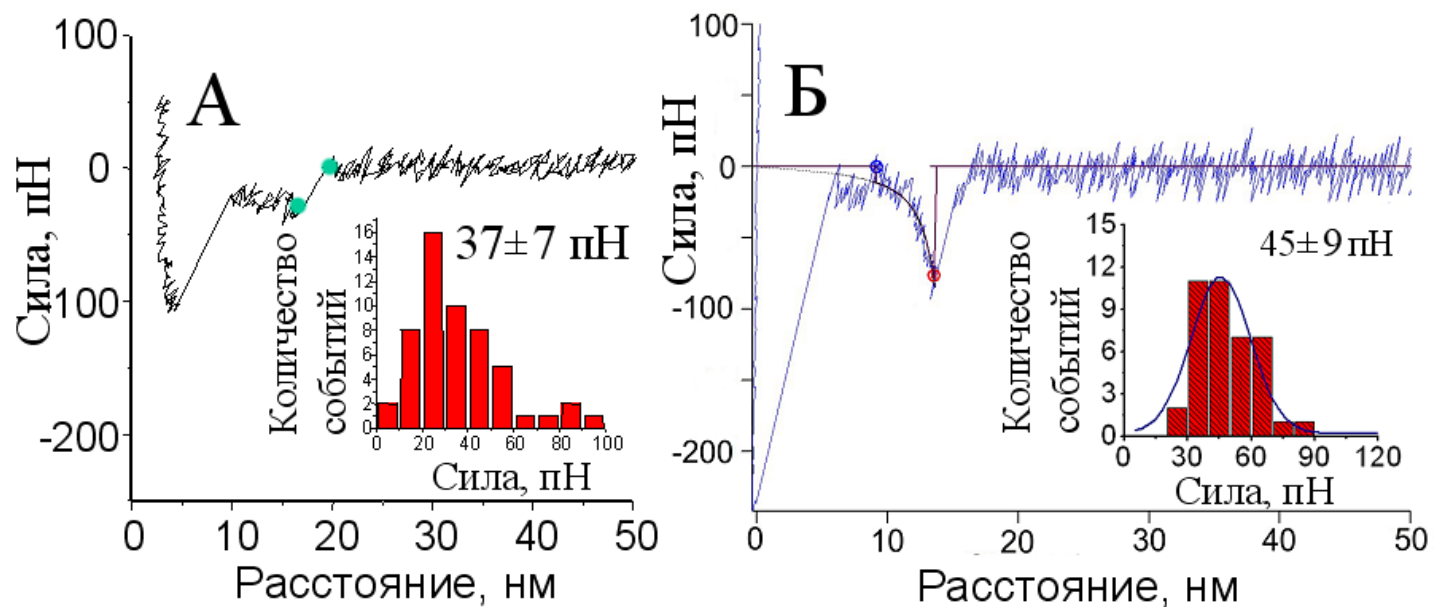


Рис. 3. Типичные силовые кривые, получаемая на АСМ Nanoscope IIIa (А) и АСМ Molecular Force Probe 3D (Б) при исследовании межмолекулярного взаимодействия. На гистограммах приведено распределение сил которые потребовалось приложить с острию, чтобы разорвать связь между двумя молекулами амилоид β пептида, закрепленными на слюде и острие соответственно.

см. рис. 3.

Результаты, изображенные на рисунке 3 А, получены в результате 10 одинаковых экспериментов, проведенных в течение одного месяца. Было получено около 5000 силовых кривых, но только на нескольких десятках из них содержался пик, соответствующий взаимодействию двух молекул.

Также были проведены **контрольные эксперименты**, подтвердившие справедливость этих результатов.

Кроме того, были предложены **модели взаимодействия** двух молекул амилоид β пептида, которые подтверждаются экспериментальными данными, см. рис. 4. В эксперименте для величины L получено значение $L=17 \pm 1$ нм. Теоретические модели дают значения 13 и 17 нм соответственно для параллельного и антипараллельного взаимодействия β листов амилоид β пептида.

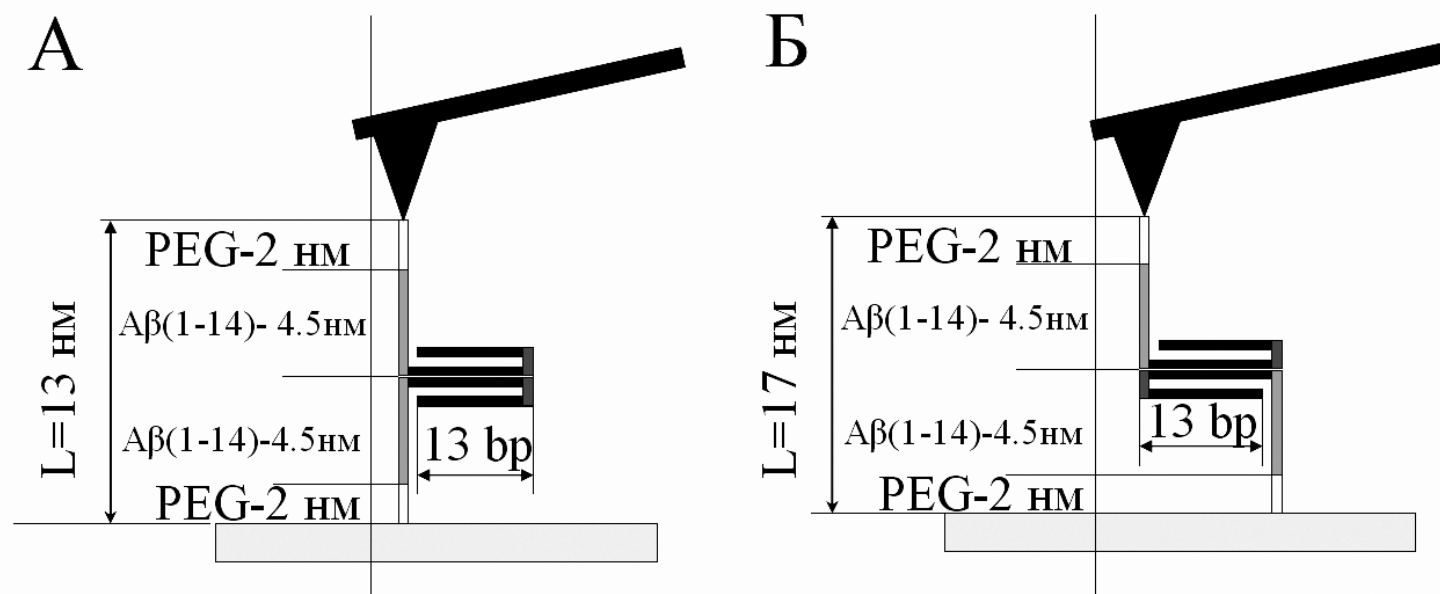


Рис. 4. Возможные механизмы взаимодействия двух молекул амилоид β пептида: (А) с параллельным и (Б) с антипараллельным взаимодействием β листов амилоид β пептида.

Таким образом первая поставленная задача по исследованию условий, при которых происходит конформационный переход, и межмолекулярных взаимодействий, возникающих между двумя молекулами амилоид β пептида, **полностью решена**.

Во втором параграфе главы 2 рассмотрены эксперименты, проведенные мной на кафедре физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ в лаборатории зондовой микроскопии под руководством Игоря Владимировича Яминского в 2005 — 2006 годах.

После того, как было обнаружено взаимодействие молекул амилоид β пептида, находящихся в конформации с неправильной укладкой, было принято решение более подробно изучить физические последствия этого взаимодействия. Из литературных данных известно, что взаимодействие молекул амилоид β пептида, находящихся в конформации с неправильной укладкой, приводит агрегации белка [4]. В качестве модельной системы был выбран лизоцим из белка куриных яиц (hen egg white lysozyme), который обладает похожими

свойствами: молекулы лизоцима, находящиеся в растворе, при понижении рН и повышенной температуре (рН2, 57 °С) организуются в фибриллы [5].

Эта работа является первой работой по исследованию влияния физической и химической сорбции молекул лизоцима к поверхностям слюды, золота и графита на конформацию этой молекулы. Эти эксперименты направлены на то, чтобы решить следующие задачи:

1. Определить, при каких условиях происходит конформационный переход в лизоциме.

2. Определить силу взаимодействия молекул лизоцима, находящихся в конформации с неправильной укладкой.

3. Определить, как влияют на конформацию молекулы, находящейся в нативной конформации следующие факторы: близость этой молекулы к гидрофобной и гидрофильной поверхности, физическая и химическая сорбция лизоцима на поверхности слюды, золота и графита.

4. Исследовать агрегацию лизоцима на различных поверхностях при тех условиях, при которых не происходит агрегация лизоцима в растворе.

Для решения этих задач было использовано **несколько способов закрепления лизоцима на поверхности**: физическая сорбция из раствора, химическая сорбция (ковалентная пришивка) через NH_2 группы к глутаровому альдегиду, который прикреплялся либо к NH_2 группам 4-аминотиофенола, закрепленного на золоте, либо к NH_2 группам 3-аминопропилсилатрана, закрепленного на слюде или Si_3N_4 кантилере, см. рис. 5 и 6.

Из литературных данных известно, что в растворе при низких рН лизоцим изменяет конформацию только **при повышенной температуре** [5]. При этом физическая сорбция белка на различно заряженные кремниевые частички приводит к **понижению этой температуры** [6].

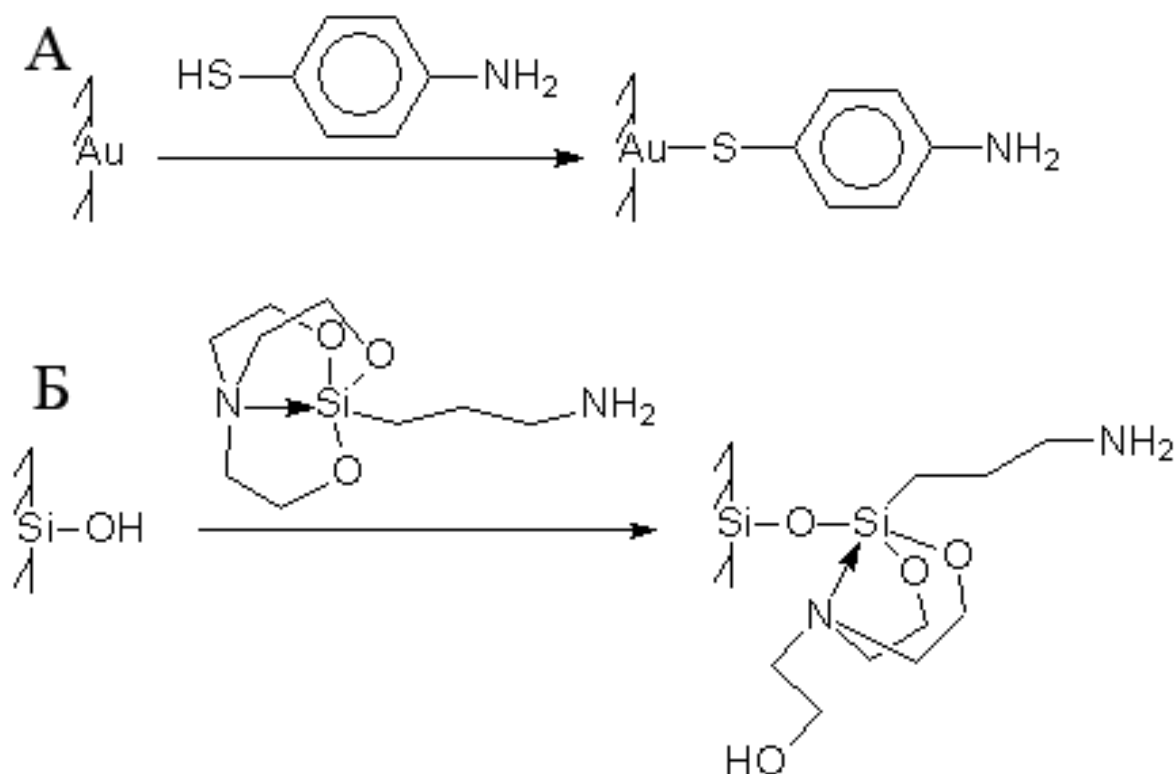


Рис. 5. Схема второго этапа иммобилизации лизоцима. (А) Механизм создания аминогрупп на поверхности золота. (Б) Механизм создания аминогрупп на поверхности кремния и слюды.

При помощи атомно-силового микроскопа ФемтоСкан [8] было определено, что при физической сорбции лизоцима на поверхность графита и химической сорбции на поверхность золота образование фибрилл происходит при комнатной температуре, см. рис. 7.

Таким образом впервые обнаружено, что химическая сорбция молекул лизоцима к поверхности золота и физическая сорбция молекул лизоцима на поверхность графита приводит к **понижению температуры конформационного перехода из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой** по крайней мере до комнатной температуры (при рН 3 буферного раствора, в котором находится белок), в то время как физическая сорбция при рН 4.8 на кремниевые частички приводит к понижению этой температуры на 12 – 20 °С [6].

Для изучения влияния температуры раствора на конформацию

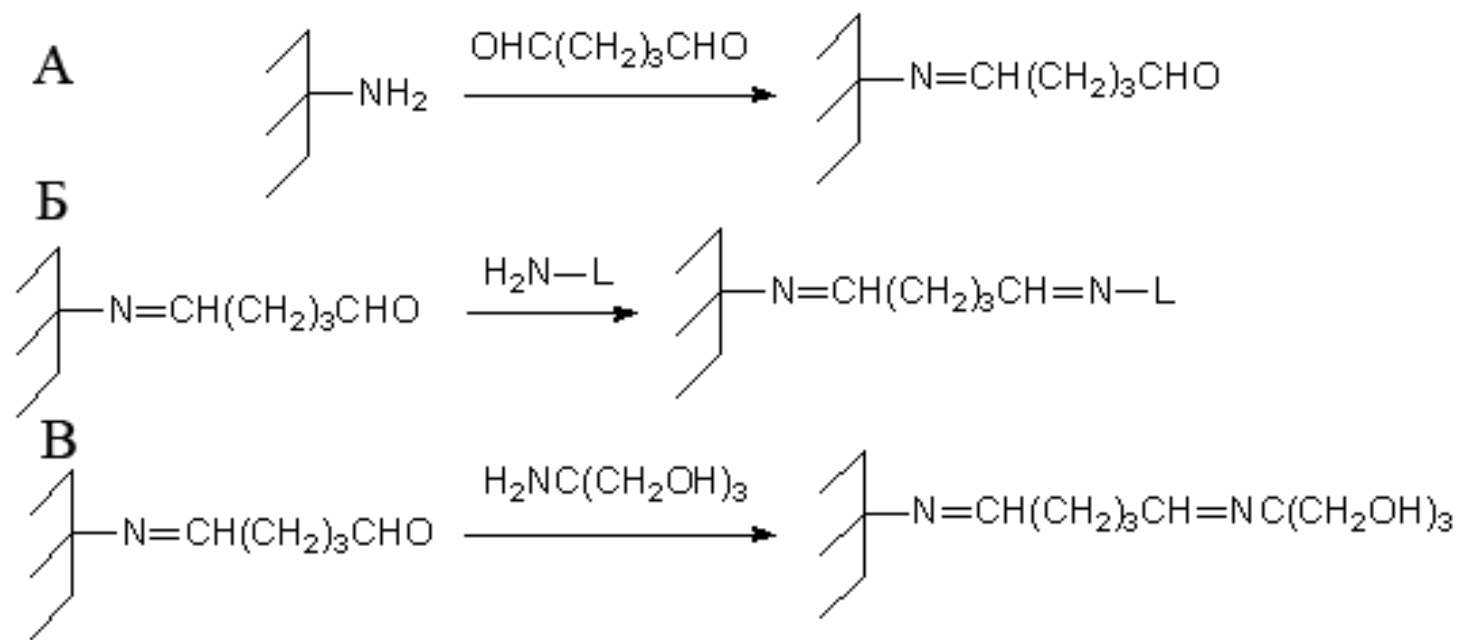


Рис. 6. Схема 3-5 этапов иммобилизации лизоцима. (А) Третий этап — химическая сорбция глутарового альдегида к NH_2 группам, закрепленным на поверхности. (Б) Четвертый этап — химическая сорбция лизоцима (L) к глутаровому альдегиду. (В) Пятый этап — блокировка непрореагировавших альдегидных групп.

молекул, физически сорбированных на различных подложках, и для определения температуры конформационного перехода в молекулах лизоцима была проведена серия экспериментов по агрегации лизоцима на свежесколотой поверхности слюды, слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана и золота при температуре $50\text{ }^\circ\text{C}$.

На образце слюды, находящемся в буферном растворе в течение 11 дней, были обнаружены порообразные агрегаты, которые уже были обнаружены ранее [7], см. рис. 8 А. В некоторых участках поверхности также были обнаружены линейные фибриллы.

А на образце, находящемся в буферном растворе в течение 22 дней при температуре $50\text{ }^\circ\text{C}$, были обнаружены только линейные фибриллы, см. рис. 8 Б. Из этих результатов можно сделать вывод, что, возможно, в некоторых случаях порообразование предшествует образованию фибрилл. Аналогичные предположения были сделаны

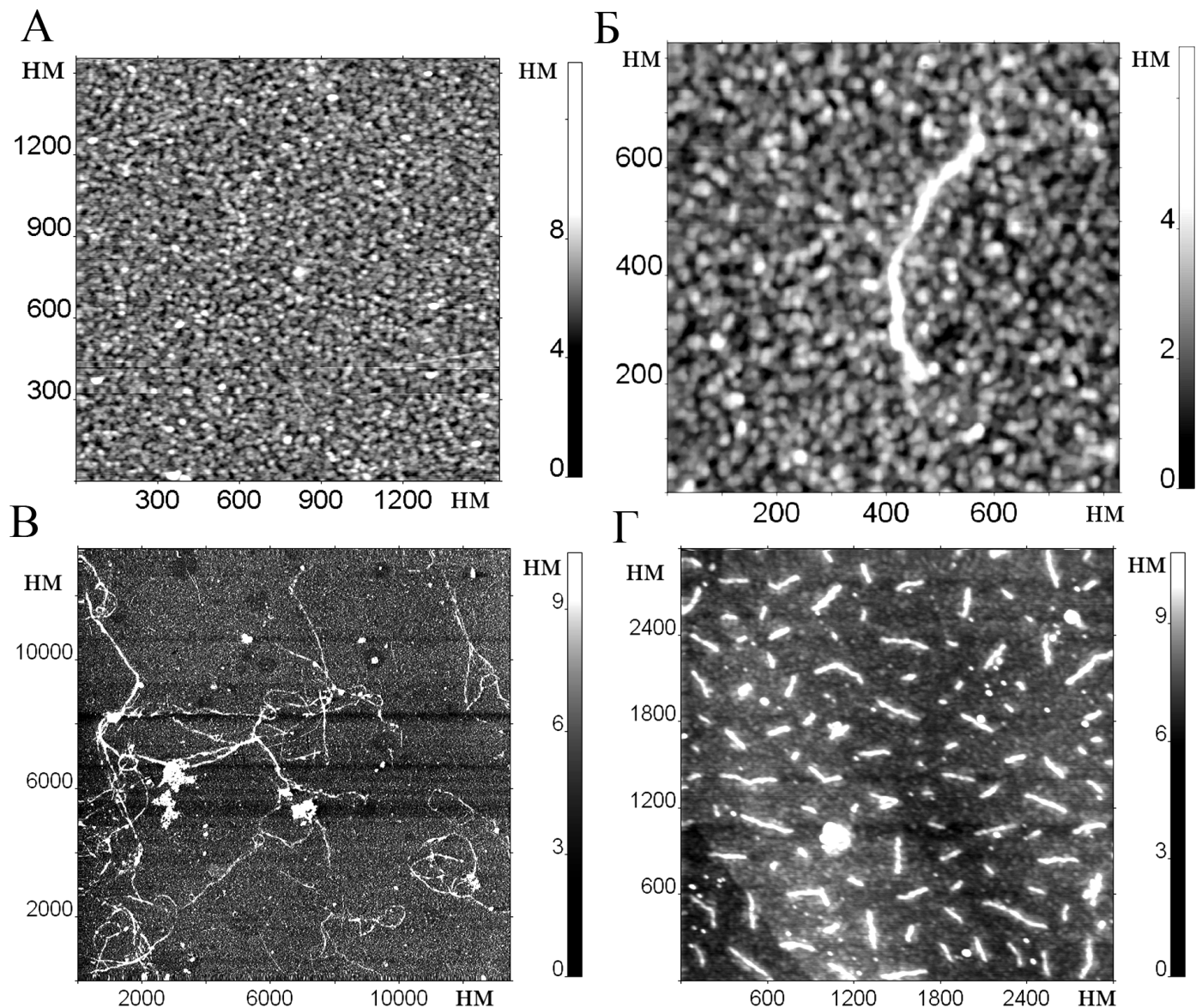


Рис. 7. Изображения поверхности золота со слоем лизоцима. Они демонстрируют изменение формы агрегатов лизоцима, химически сорбированного на поверхность золота, в течение 1 мин (А), 4.5 (Б) и 19 ч (В). (Г) Изображение фибрилл лизоцима на поверхности графита, образовавшиеся в течение 7 дней вследствие физической адсорбции белка на поверхность.

в работе [7].

Результаты этих экспериментов говорят о том, что близость поверхности приводит к понижению температуры конформационного перехода, но не до комнатной, как в случае графита, а до температуры в диапазоне 20 — 50 °С.

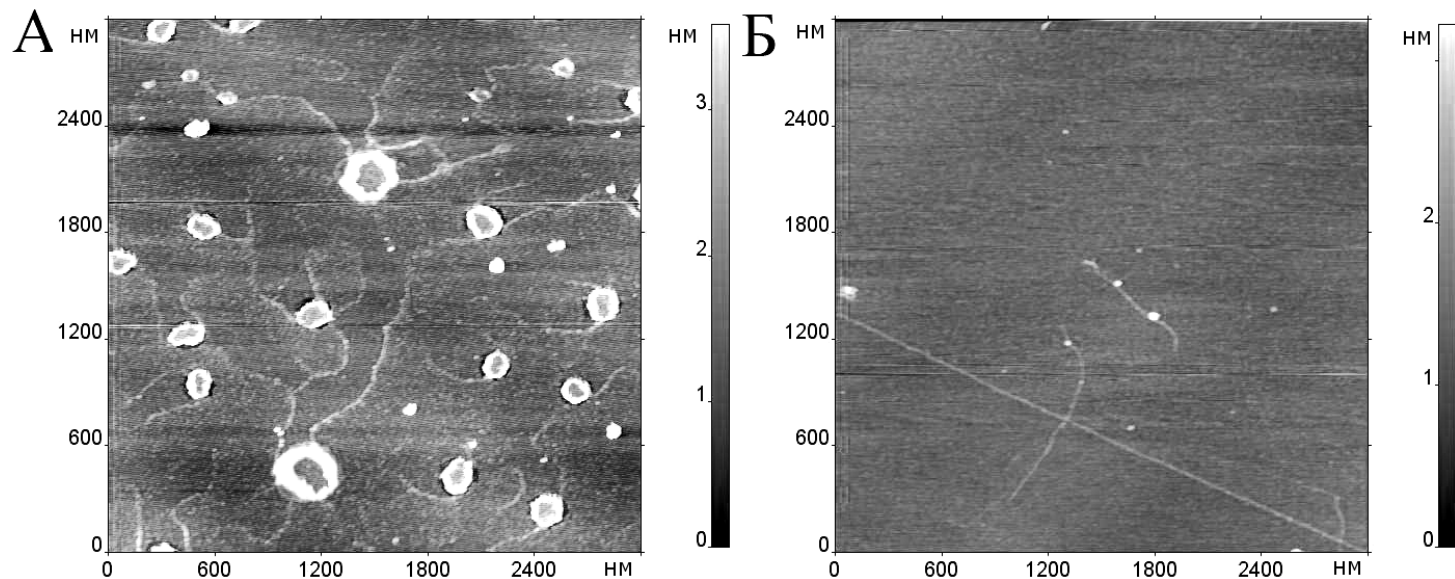


Рис. 8. (А) Изображение поверхности слюды со слоем лизоцима, физически сорбированного на поверхность в течение 11 дней при температуре 50 °С. (Б) Изображение поверхности слюды со слоем лизоцима, физически сорбированного на поверхность в течение 22 дней при температуре 50 °С.

На образцах слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана, находящихся в буферном растворе в течение 11 и 22 дней при температуре 50 °С, были обнаружены только линейные фибриллы, см. рис. 9 Б. Это также свидетельствует о понижении температуры конформационного перехода до 20 — 50 °С, потому что таких фибрилл не было на образце, находящемся в буферном растворе в течение 7 дней при температуре 20 °С, см. рис. 9 А.

На образцах золота находящихся в буферном растворе в течение 11 и 22 дней при температуре 50 °С не было обнаружено никаких агрегатов (как и на образце, находящемся в буферном растворе в течение 7 дней при температуре 20 °С), см. рис. 10. Эти результаты говорят о том, что при сорбции лизоцима на золото не происходит значительного понижения температуры конформационного перехода.

Контрольные эксперименты показывают, что за 22 дня в буфер-

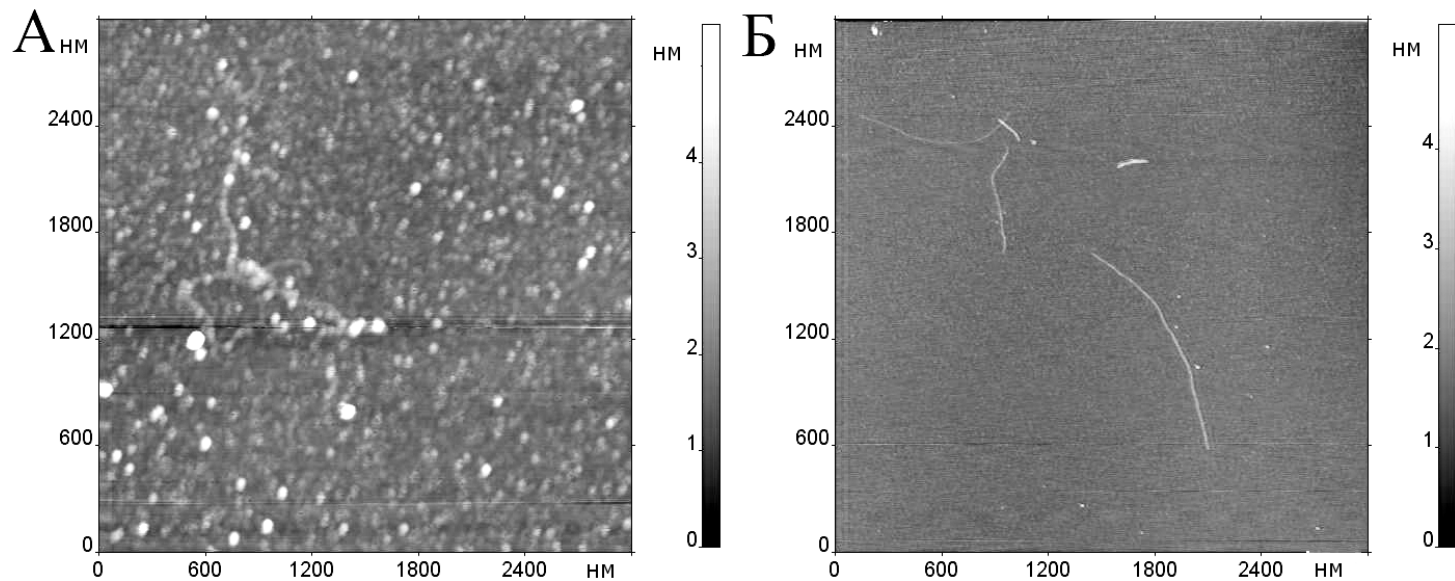


Рис. 9. (А) Изображение поверхности слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана и слоем лизоцима, физически сорбированного на поверхность в течение 7 дней при температуре 20 °С. (Б) Изображение поверхности слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана и слоем лизоцима, физически сорбированного на поверхность в течение 22 дней при температуре 50 °С.

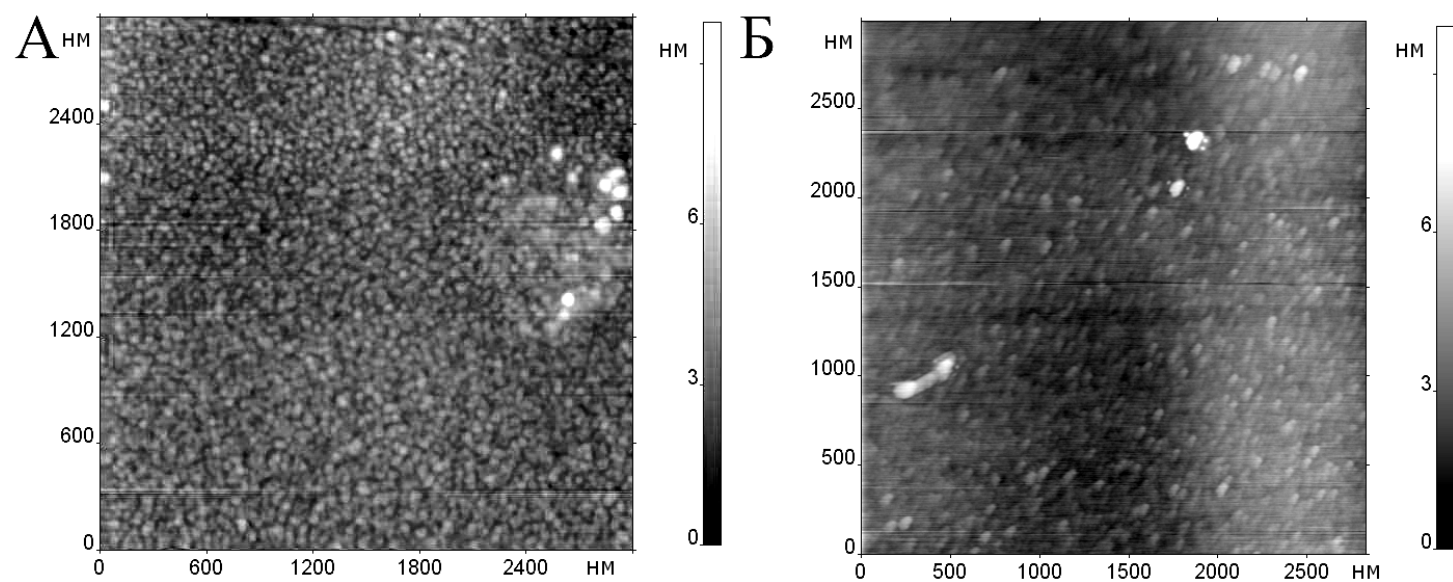


Рис. 10. (А) Изображение поверхности золота со слоем лизоцима, физически сорбированного на поверхность в течение 7 дней при температуре 20 °С. (Б) Изображение поверхности золота со слоем лизоцима, физически сорбированного на поверхность в течение 11 дней при температуре 50 °С.

Поверхность Тип сорбции	Золото	Слюда (ОН группы)	Слюда+ АПС _(NH₂)	Графит	Кремний
Физическая сорбция	>50 °С	20-50 °С	20-50 °С	<20 °С	При pH 4.8: В растворе 71°C, на отрицательно заряженных кремниевых частицах - 59°C, на незаряженных кремниевых частицах - 51°C.
Химическая прививка	<20 °С	~20 °С	~20 °С	-	Czeslik and R. Winter, Effect of temperature on the conformation of lysozyme adsorbed to silica particles, Phys. Chem. Chem. Phys., 2001, v. 3, pp.235-239.

Таблица 1. Температуры конформационного перехода в лизоциме при буферного раствора pH3 на различных поверхностях. В растворе даже при более низком pH2 (еще более способствующем конформационному переходу) конформационный переход происходит только при 57 °С [5].

ном растворе фибрилл или пор не появляется, т.е. все агрегаты - это следствие комплексообразования на поверхности.

Таким образом было исследована агрегация лизоцима на поверхностях графита, слюды, слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана и золота при температурах 20 °С и 50 °С, и при физическом и химическом типе сорбции. Эти данные сведены в таблицу 1.

Кроме этого при помощи **нового метода исследования межмолекулярного взаимодействия** на Атомных весах [9] была определена **сила взаимодействия двух молекул лизоцима**, находящихся в состоянии с неправильной укладкой, которая оказалась равной 113 ± 24 пН. Этот метод заключается в измерении изгиба кантилевера, на одну из сторон которого нанесен лизоцим, см. рис. 11.

В этой работе при помощи атомно-силового микроскопа

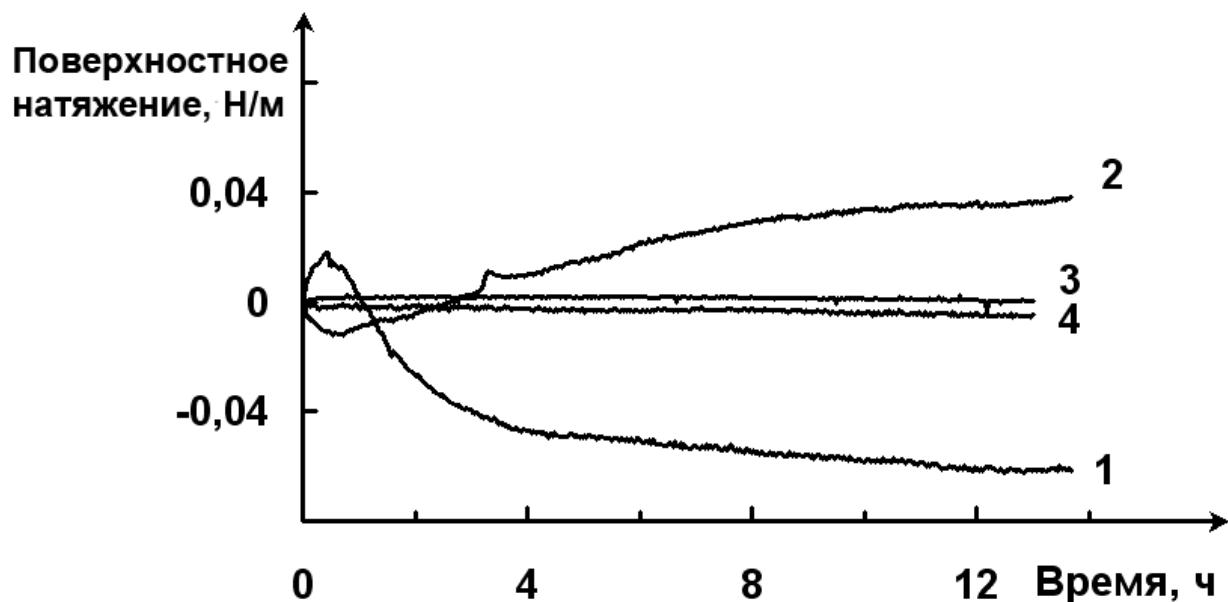


Рис. 11. Временная зависимость поверхностного натяжения пленки лизоцима, находящейся на золотой (1) и кремниевой (2) поверхности кантилевера; 3, 4 - результаты соответствующих контрольных экспериментов, в которых кантилевер не обрабатывали лизоцимом.

ФемтоСкан исследовано формирование фибрилл лизоцима на твердой подложке. Обнаружено, что при комнатной температуре и рН 3 буферного раствора, т.е. в условиях, при которых агрегация в растворе не происходит, на поверхности может наблюдаться образование фибрилл. Установлено, что близость молекул лизоцима к поверхности графита способствует их агрегации. Обнаружено, что физическая сорбция лизоцима на поверхность золота не приводит к его агрегации, а химическая сорбция лизоцима к поверхности золота способствует образованию фибрилл. На Атомных весах измерена сила взаимодействия молекул лизоцима.

В главе 3 описаны полученные результаты и проведен анализ этих результатов.

3 Основные результаты и выводы

1. Обнаружено, что изменение структурных свойств амилоид β пептида и лизоцима (конформационный переход молекул из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой) происходит из-за изменения температуры, рН, вида поверхности и типа сорбции и приводит к изменению межмолекулярного взаимодействия и к образованию фибрилл и других типов агрегатов.
2. Определены условия (повышение кислотности среды с рН6 до рН3, повышение температуры с 20 °С до 50 °С, близость поверхности и тип сорбции), при которых амилоид β пептид и лизоцим переходят из нативной конформации в состояние с неправильной укладкой.
3. Вследствии конформационного перехода из нативной конформации в состояние с неправильной укладкой происходит резкое увеличение вероятности взаимодействия двух молекул между собой по сравнению с нативной конформацией, в которой молекулы почти не взаимодействуют между собой, например, сила взаимодействия двух молекул в состоянии с неправильной укладкой равна $F \sim 40$ пН для амилоид β пептида и $F \sim 110$ пН для лизоцима.
4. В экспериментах наблюдалось формирование фибрилл и поробразных агрегатов лизоцима на твердой подложке в условиях, при которых они не образуются в растворе. Агрегация лизоцима связана с различием в межмолекулярном взаимодействии молекул, находящихся на поверхности (в состоянии с неправильной укладкой) и в растворе (в нативной конформации) при одинаковых параметрах среды (рН3, 20 °С).

5. Обнаружено, что химическая сорбция молекул лизоцима к поверхности золота и физическая сорбция молекул лизоцима на поверхность графита приводит к понижению температуры конформационного перехода из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой по крайней мере до комнатной температуры.
6. Обнаружено, что физическая сорбция молекул лизоцима на поверхность слюды и слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана приводит к понижению температуры конформационного перехода из нативного состояния в состояние с неправильной укладкой по крайней мере до 50 °С.

4 Цитируемая литература

1. C. Ray, J.R. Brown, B.B. Akhremitchev, Single-molecule Force Spectroscopy Measurements of "Hydrophobic Bond" between Tethered Hexadecane Molecules // *J. Phys. Chem. B* — 2006, — 110(35), — pp.17578-17583.
2. A. Rubinstein, L. Kinarsky, Y. Lyubchenko and S. Sherman, High Temperature Molecular Dynamics Simulations of the Amyloid β (1-40) Peptide // *The First Annual Nebraska EPSCoR Research Expo* April 20, 2005, p.20.
3. C. McAllister, M. Karymov, Y. Kawano, A.Y. Lushnikov, A. Mikheikin, V.N. Uversky and Y.L. Lyubchenko, Protein Interactions and Misfolding Analyzed by AFM Force Spectroscopy // *Journal of Molecular Biology*, — 2005, — v.354, — N.5, — pp.1028 — 1043.
4. W.B. Stine, Jr., K.N. Dahlgren, G.A. Krafft, and M.Jo LaDu, In Vitro Characterization of Conditions for Amyloid- β Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis // *The journal of biological chemistry*, — 2003, — v.278, — N.13,— pp.11612 — 11622.
5. L.N. Arnaudov, Renko de Vries, Thermally Induced Fibrillar Aggregation of Hen Egg White Lysozyme // *Biophys J.*, — 2005, — v.88, — p.515-526.

6. C. Czeslik and R. Winter, Effect of temperature on the conformation of lysozyme adsorbed to silica particles, // *Phys. Chem. Chem. Phys.*, — 2001, — v.3, — pp.235-239.
7. M. Stefani, Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world // *Biochimica et Biophysica Acta*, — 2004, — v.1739, — pp.5-25.
8. Филонов А.С., Гаврилко Д.Ю., Яминский И.В. Программное обеспечение для обработки трехмерных изображений "ФемтоСкан Онлайн". М.: Центр перспективных технологий, 2005. 89 с. (<http://www.nanoscopy.net>). Filonov A.S., Gavrilko D.Yu., Yaminsky I.V., FemtoScan Online SPM Image Processing Software Manual, Moscow, Advanced Technologies Center, 2005 - 89 p. (<http://www.nanoscopy.net>).
9. Киселев Г.А., Багров Д.В., Горелкин П.В., Яминский И.В. Сенсор на основе атомно-силового микроскопа // *Сенсор*, — 2005, — N.4, — с.22.

5 Публикации

1. Е.В. Украинцев, Г.А. Киселев, А.А. Кудринский, Г.В. Лисичкин, И.В. Яминский, Формирование фибрилл лизоцима на твердой подложке в условиях, при которых они не образуются в растворе // *Высокомолекулярные соединения*, серия Б, — 2007, — том 49, — N.1, — с.125-129. Принята к печати 24.08.2006 г.
2. Украинцев Е.В., Киселев Г.А., Багров Д.В., Горелкин П.В., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В., Яминский И.В, Атомные весы: новые возможности исследования взаимодействия молекул // *Датчики и системы*, — 2007, — N.1, — с.18-21. Номер подписан в печать 22.10.2006 г.
3. Y.L. Lyubchenko, A. Kransnoslobodtsev, L.S. Shlyakhtenko, E. Ukraintsev, T.O. Zaikova and J.F.W. Keana, Nanomedicine and

protein misfolding diseases // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, — 2005, — v.1, — pp.300-305.

Тезисы докладов

1. 19th Annual Gibbs Conference on Biothermodynamics (США, 2005). Conformation-dependent interprotein interaction studied by AFM force spectroscopy. E.V. Ukraintsev, T.O. Zaikova, J.F.W. Keana and Y.L.Lyubchenko;
2. 19th Annual Gibbs Conference on Biothermodynamics (США, 2005). Study of DNA-Sfi I complex stability using AFM force spectroscopy. A.V. Krasnoslobodtsev, L.S. Shlyakhtenko, E.V. Ukraintsev and Y.L. Lyubchenko;
3. International Conference on Nanoscience and Technology (Швейцария, 2006). Atomic balance observation of protein aggregation on a cantilever surface. G. Kiselev, A.Kudrinskii, E.Ukraintsev, I. Yaminsky, G.Lisichkin;
4. Третья Всероссийская конференция (с международным участием), Химия поверхности и нанотехнология (Россия, 2006). Изучение агрегации лизоцима, иммобилизованного на поверхности золота и слюды, с помощью кантилевера для атомно-силовой микроскопии. Е.В. Украинцев, Г.А. Киселев, А.А. Кудринский, Г.В. Лисичкин, И.В. Яминский.