

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.476>

<https://orcid.org/0000-0002-4717-0029>

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

Edvinas Navakauskas

Biomimetinių sistemų tyrimas suminio dažnio generacijos spektroskopijos metodu

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Chemija (N 003)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2018–2022 metais Fizinių ir technologijos mokslų centre. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė – dr. Simona Strazdaitė (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. habil. dr. Rimantas Ramanauskas (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003).

Nariai:

prof. dr. Virginijus Barzda (Toronto universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011),

dr. Rima Budvytytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

prof. dr. Justinas Čeponkus (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, fizika – N 002),

dr. Jurga Juodkazytė (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. birželio mėn. 16 d. 15 val. Fizinių ir technologijos mokslų centre D401 posėdžių auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 3, Vilnius, Lietuva, tel. +370 52649211; el. paštas: office@ftmc.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.476>

<https://orcid.org/0000-0002-4717-0029>

VILNIUS UNIVERSITY

CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGIES

Edvinas Navakauskas

The Application of Sum-Frequency Generation Spectroscopy in Studies of Biomimetic Systems

DOCTORAL DISSERTATION

Natural science,
Chemistry (N 003)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2018 and 2022 at the Center for Physical Sciences and Technology. The research was supported by the Research Council of Lithuania.

Academic supervisor – Dr. Simona Strazdaitė (Center for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry, N – 003).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Habil. Dr. Rimantas Ramanauskas (Center for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry – N 003).

Members:

Prof. Dr. Virginijus Barzda (University of Toronto, Natural Sciences, Biophysics – N 011),

Dr. Rima Buivytytė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Prof. Dr. Justinas Čeponkus (Vilnius University, Natural Sciences, Physics – N 002),

Dr. Jurga Juodkazytė (Center for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry – N 003).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 15 h on the 16th of June 2023 in meeting room D401 of the Center for Physical Sciences and Technology. Address: Saulėtekio av. 3, Vilnius, Lithuania, tel. +370 52649211; e-mail: office@ftmc.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University and Center for Physical Sciences and Technology, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

PADĖKA	7
SANTRUMPOS	8
ĮVADAS	10
I. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. Amiloidai	15
1.1.1. Amiloidinių baltymų sukelti sutrikimai	16
1.1.2. Peptidų/baltymų struktūros	18
1.1.3. Peptidų/baltymų agregacija į amiloidines fibriles	19
1.1.4. Amiloidinių fibrilių struktūra	22
1.1.5. Vištos kiaušinio baltymas lizocimas ir jo agregacija	24
1.1.6. Lizocimo sąveika su lipidinėmis membranomis	25
1.2. Biologinė membrana ir jos sandara	26
1.2.1. Modelinės membranų sistemos	29
1.2.2. Langmuir lipidiniai monosluoksniai	31
1.3. Įvadas į suminio dažnio generacijos spektroskopiją	32
1.3.1. Netiesinis poliarizuojamumas ir jo prigimtis	33
1.3.2. Suminio dažnio generacija	34
1.3.3. Netiesinis optinis jautris	36
1.3.4. Poliarizaciniai matavimai nustatant baltymų antrines struktūras	40
II. EKSPERIMENTINIAI TYRIMŲ METODAI BEI MEDŽIAGOS	43
2.1. Tyrimų metodai	43
2.1.1. FTIR spektroskopija	43
2.1.2. Atominės jėgos mikroskopija	43
2.1.3. Virpesinė suminio dažnio generacijos eksperimentinė sistema	44
2.1.4. Spektrinių juostų išskyrimas iš virpesinės suminio dažnio generacijos spektrų	45
2.1.5. Fosfolipidinių monosluoksnių formavimas bei baltymų įvedimas į tirpalą	46
2.1.6. Kvantinės chemijos skaičiavimai DPPC hidrofiliinės fosfato grupės fragmentui	47
2.2. Tyrimuose naudotos medžiagos	48
III. VIŠTOS KIAUŠINIO BALTymo LIZOCIMO AGREGATŲ, ADSORBUOTŲ ORAS/VANDUO BEI LIPIDAS/VANDUO FAZINĖSE RIBOSE, STRUKTŪRŲ NUSTATYMAS	49
3.1. Lizocimo agregavimas ir adsorbicija	50
3.2. Rezultatai ir jų aptarimas	51
3.3. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS	65
PRIEDAS	66

IV. FOSFATIDILCHOLINO DEUTERINIMO POVEIKIS MONOSLUOKSNIO STRUKTŪRINAI.....	69
4.1. Fosfolipidai ir jų pritaikymas biomimetinių sistemų tyrimams.....	70
4.2. Rezultatai ir jų aptarimas	71
4.3. Rezultatų apibendrinimas	84
PRIEDAS.....	86
IŠVADOS	90
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	91
SUMMARY	119
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR AUTORIAUS INDĖLIS	132
PRANEŠIMAI MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE.....	132
TRUMPOS ŽINIOS APIE AUTORIŲ	134

PADĖKA

Norėčiau padėkoti disertacijos darbo vadovei **dr. Simonai Strazdaitei** už suteiktas metodines žinias, mentorystę bei supažindinimą su VSFG metodo subtilybėmis.

Dėkoju spektroelektrochemijos laboratorijos vadovui **prof. habil. dr. Gediminui Niaurai** už žinių perdavimą spektroskopijos srityje, reikšmingus patarimus, konsultacijas beviltiškoje situacijoje ir, svarbiausia – už suteiktą galimybę atlikti mokslinį disertacijos darbą Fizinių ir technologijos mokslų centre.

Ypatingai dėkoju **dr. Martynui Talaikiui** už pagalbą atliekant kvantinės chemijos skaičiavimus, protingas mintis bei hipotetines diskusijas. Taip pat reiškiu padėką **dr. Tomui Šneideriui** už atliktus atominės jėgos mikroskopijos matavimus ir **dr. Johannes Kirschner** už vertingą indėlį dirbant su lizocimo VSFG spektrinių smailių išskyrimu.

Tariu padėkos žodžius draugėms **dr. Tatjanai Charkovai** ir **dr. Agnei Zdaniauskienei** už palaikymą, motyvaciją, jaukią darbinę aplinką ir patarimus į viską žiūrėti paprasčiau.

Dėkoju visiems kolegoms iš Organinės chemijos skyriaus už aktyvų dalyvavimą mano moksliniame kelyje, ypatingai už kantrybę klausant ketverių metų atestacijas.

Esu širdingai dėkingas savo šeimai už tikėjimą manimi, išskirtinai, sesei **Sandrai** už vertingą anglų kalbos žinių bagažą. Didžiausią padėką reiškiu sužadėtinei **Augustei**, be kurios pagalbos šis darbas nebūtų užbaigtas.

SANTRUMPOS

- A β – Amiloido- β peptidas (*angl. Amyloid- β peptide*);
- HEWL – Vištos kiaušinio baltymas lizocimas (*angl. Hen-Egg White Lysozyme*);
- CNS – Centrinė nervų sistema (*angl. Central Nerve System*)
- D₂O – Sunkus vanduo (*angl. Heavy water*);
- QCM-D – Kvarco kristalo mikrogravimetrija su šviesos sklaidos registravimu (*angl. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring*);
- AFM – Atominės jėgos mikroskopija (*angl. Atomic Force Microscopy*);
- EIS – Elektrocheminio impedanso spektroskopija (*angl. Electrochemical Impedance Spectroscopy*);
- EPR – Elektronų paramagnetinio rezonanso spektroskopija (*angl. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy*);
- BAM – Briusterio kampo mikroskopija (*angl. Brewster Angle Microscopy*);
- SHG – Antros harmonikos generacija (*angl. Second Harmonic Generation*);
- SFG – Suminio dažnio generacija (*angl. Sum-Frequency Generation*);
- DFG – Skirtuminio dažnio generacija (*angl. Difference-Frequency Generation*);
- VIS – Regimoji sritis (*angl. Visible*);
- IR – Infraraudonoji sritis (*angl. Infrared*);
- Nd:YAG – Neodimiu legiruotas itrio aliuminio granatas (*angl. Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet*);
- VSFG – Virpesinė suminio dažnio generacijos spektroskopija (*angl. Vibrational Sum-Frequency Generations Spectroscopy*);
- MTC – Gyvsidabrio-kadmio-telirido detektorius (*angl. Mercury-Cadmium-Telluride detector*);
- FTIR – Furje atvaizdo infraraudonoji spektroskopija (*angl. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*);
- ATR-FTIR – Pažeistojo vidaus atspindžio Furje atvaizdo infraraudonoji spektroskopija (*angl. Attenuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared spectroscopy*);
- DFT – Funkcinė tankio teorija (*angl. Density Functional Theory*)
- PED – Potencinės energijos pasiskirstymo analizė (*angl. Potential Energy Distribution analyses*);
- sBLM – Palaikoma dvisluoksnė membrana (*angl. Supported Bilayer Lipid Membrane*);

- hBLM – Hibridinė dvisluoksnė lipidinė membrana (*angl. Hybrid Bilayer Lipid Membrane*);
- tBLM – Pakabintoji dvisluoksnė lipidinė membrana (*angl. Tethered Bilayer Lipid Membrane*);
- PC – Fosfatidilcholinas (*angl. Phosphatidylcholine*);
- PE – Fosfatidiletanolaminas (*angl. Phosphatidyletanolamin*);
- PS – Fosfatidilserinas (*angl. Phosphatidylserine*);
- PG – Fosfatidilglicerolis (*angl. Phosphatidylglycerol*);
- PI – Fosfatidilinozitolis (*angl. Phosphatidylinositol*);
- PA – Fosfatido rūgštis (*angl. Phosphatidic acid*);
- Cer – Keramidas (*angl. Ceramide*);
- SM – Sfingomielinas (*angl. Sphingomyelin*);
- GM – Gangliozidas (*angl. Ganglioside*);
- DOPG – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerolis) (*angl. 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phospho-(1'-rac-glycerol)*);
- DPPG – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerolis (*angl. 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphorylglycerol*);
- DOPC – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-cholinas) (*angl. 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine*);
- DPPC-d0 – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocholinas (*angl. 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine*);
- DPPC-d13 – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocholino-1,1,2,2-d4-N,N,N-trimetil-d9 (*angl. 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine-1,1,2,2-d4-N,N,N-trimethyl-d9*);
- DPPC-d62 – 1,2-dipalmitoil-d62-sn-glicero-3-fosfocholinas (*angl. 1,2-dipalmitoyl-d62-sn-glycerol-3-phosphocholine*);
- DPPC-d75 – 1,2-dipalmitoil-d62-sn-glicero-3-fosfocholino-1,1,2,2-d4-N,N,N-trimetil-d9 (*angl. 1,2-dipalmitoyl-d62-sn-glycerol-3-phosphocholine-1,1,2,2-d4-N,N,N-trimethyl-d9*).

ĮVADAS

Šių dienų moksle amiloidozės išlieka viena paslaptiniausių ligų grupių sietinų su gyviems organizmams natūralių baltymų nenatūraliu tarpusavio jungimusi, taip formuojant citotoksiškas struktūras, kurios gali sutrikdyti daugelio organų veiklą. Iki šiol yra išskiriama apie 40 skirtingų, tačiau žmogaus organizmui įprastų baltymų, galinčių sukelti amiloidinius susirgimus.¹ 2020 metų duomenimis, daugiau nei 55 milijonai žmonių visame pasaulyje kenčia nuo ligų sąlygojančių smegenų kognityvinę disfunkciją (demenciją), jų tarpe Alzheimerio liga yra viena iš dažniausių.² Pastaraisiais metais buvo pastebėta, jog amiloidiniai susirgimai vis dažniau nustatomi senstančioje visuomenėje ir prognozuojama, kad 2030 metais pasieks bendrą 78 milijonų atvejų skaičių. Nepaisant daugybės nuolatinių tyrimų ligų etiologijos, patogenezės bei mechanizmų supratime, iki šiol nėra efektyvaus vaisto gydymui.³ Pagrindinė to priežastis yra sudėtinga ir ne pilnai suprasta peptidų/baltymų agregacija molekuliniam lygmenyje bei šių agregatų sąveika su ląstele ir jos membrana.^{4,5}

Molekuliniam lygmenyje tiriant baltymų sąveiką su ląstelėmis labai svarbu identifikuoti kintančią baltymo struktūrą. Spektroskopiniai tyrimai puikiai tam tinka, tačiau *in situ* labai retai naudojami dėl ypatingo ląstelės membranos kompleksškumo bei bendro sistemos sudėtingumo. Tuo tikslu, norint supaprastinti sistemą yra naudojamos biomimetinės membranos, apribotos iki vieno ar kelių elementų. Membranų charakteristikoms tirti, dažnai pasirenkamos monosluoksnės ar dvisluoksnės lipidinės struktūros, suformuotos iš ląstelių membranose aptinkamų fosfolipidų, paskleidžiant juos ant skysto ar kieto paviršiaus. Pasinaudojant skirtingais spektroskopiniais metodais gali būti tiriami konformaciniai⁶⁻¹⁸, orientaciniai^{6,8,13,19} bei hidrataciniai^{8,16,19-24} biomimetinių membranų pokyčiai. Taip pat, galimi ir kiek sudėtingesnių sistemų tyrimai, kuriuose analizuojama baltymų agregacija^{25,26} ar jų sąveika su lipidinėmis membranomis^{25,27}.

Atliekant spektroskopinius tyrimus svarbu, jog bent vienas iš tiriamos sistemos elementų būtų pažymimas izotopu. Žymėjimas padeda išvengti stipraus virpesinių juostų persiklojimo. Tiriant biomimetinių membranų sąveiką su baltymais, izotopu yra pažymimi membranas formuojantys fosfolipidai. Pažymėjimas vyksta lipidą sudarančius vandenilius (H) pakeičiant deuteriais (D), todėl dar kitaip šis metodas vadinamas deuterinimu. Deuterinamos gali būti skirtingos fosfolipido dalys, t.y. alkilinės grandinės (angl. alkyl chains), hidrofilinė (fosfato) galvutė (angl. headgroup) arba abi.^{28,29} Šis metodas plačiai taikomas spektroskopijoje neatsižvelgiant į tai,

jog deuterinimas gali pakeisti formuojamų biomimetinių membranų savybes, kaip buvo pastebėta keleto mokslinių tyrimų.²⁸⁻³⁰

Analizuojant kiek sudėtingesnę baltymo ir/ar jo agregatų sąveikos su lipidine membrana sistemą, įvertinti trys pagrindiniai žalingi faktoriai. Pirmasis yra susijęs su baltymo natyvios struktūros destabilizacija, kuri sukeliama jo adsorbcijos lipidiniame paviršiuje. Struktūriškai destabilizuotas baltymas gali inicijuoti pirminę jo agregaciją.³¹ Antrasis procesas sąlygotas paviršiuje išaugusios adsorbuoto baltymo koncentracijos, kuri padidina agregacijos spartą.³² Tyrimais buvo pademonstruota, jog amiloido- β ($A\beta$) peptidas, sietinas su Alzheimerio liga, esant mažoms koncentracijoms iš pradžių adsorbuojasi lipidas/vanduo fazinėje riboje ir tik vėliau pradeda formuoti fibrilinius agregatus.³³⁻³⁵ Analogiški pastebėjimai buvo padaryti α -sinukleiniui,³⁶ insulinui,^{37,38} amilinui (hIAPP),^{39,40} lizocimui^{41,42} bei kitiems baltymams. Trečiasis žalingas šiai sistemai procesas yra sietinas su baltymų agregatais, kurie adsorbuojasi ir net įsiterpia į lipidinę membraną, taip sutrikdymį jos veiklą.⁴³ Ilgai buvo manoma, jog būtent didelės, brandžios fibrilinės struktūros sukelia negrįžtamas ląstelių pažaidas, tačiau naujausi tyrimai rodo priešingai: fibrilių fragmentai ar maži oligomerai, sąlygoja biologinių membranų perforacijas.⁴⁴ Literatūroje nurodoma, jog mažos masės $A\beta$ oligomerai yra citotoksiški, kai tuo tarpu stambiamolekulinės fibrilinės struktūros pažaidų ląstelėms nesukelia.⁴⁵ Taip pat buvo pademonstruota, jog mažesni $A\beta$ agregatai adsorbuojasi greičiau, nei daugiamolekulinės oligomerinės ar fibrilinės struktūros.⁴⁶ Amiloidiniai α -sinukleino agregatai geba įsiskverbti į neigiamai įkrautą lipidinį dvisluoksnį bei formuoti didelius baltymo ir lipido koagregatus, lemiančius negrįžtamą membranos destrukciją.⁴⁷

Daugybė metodų yra naudojami baltymų agregatų adsorbcijos tyrimuose, neidentifikuojant jų molekulinės struktūros, pavyzdžiui, kvarco kristalo mikrogravimetrija su šviesos sklaidos registravimu (QCM-D),⁴⁶ atominės jėgos mikroskopija (AFM),⁴⁸ elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS)⁴⁹ bei kitos. Taikant šiuos metodus gaunama informacija yra pakankamai ribota molekuliniam lygmenyje, todėl kyla iššūkis interpretuojant rezultatus. Pažymėtina ir tai, jog yra mažesnis pasirinkimas metodų, leidžiančių vienu metu tirti baltymo adsorbcijos prie lipidinių monosluoksnių kinetiką bei adsorbato struktūrinius pokyčius molekuliniam lygmenyje.⁵⁰⁻⁵³

Vystantis paviršių spektroskopijos tyrimams, virpesinė suminio dažnio generacijos (VSFG) spektroskopija, dėl išskirtinai didelio paviršiaus specifškumo ir submonosluoksninio jautrumo, greitai tapo idealiu optiniu zonu, skirtu fazinių ribų analizei. Sujungus VSFG kartu su Langmuir

monosluoksnių formavimo metodika, atsirado galimybė protiuotų/deuterintų fosfolipidų membranas analizuoti *in situ*, gaunant informaciją apie alkilo grandinių konformaciją, monosluoksnių susipakavimą^{8,10,13–17,54–58}, fosfato^{8,10,11,16,19,24,59} ir karbonilo²⁰ grupės hidrataciją bei įvairių biomolekulių sąveiką su lipidais^{60,61}. Didžiausias šio spektroskopinio metodo išskirtinumas – galimybė identifikuoti paviršiuose adsorbuotų baltymų antrinę struktūrą. Pasinaudojant tuo nustatyta, jog prie membranų adsorbuoti įvairūs amiloidiniai baltymai gali formuoti skirtingus fibrilinius variantus.^{40,41} Nors VSFG yra puiki metodika leidžianti tirti baltymų ir jų agregatų adsorbciją skirtingose fazinėse ribose bei jos sąlygotus struktūrinius adsorbato pokyčius, iki šiol išlieka nemažai svarbių neatsakytų klausimų susijusių su baltymo struktūrų adsorbciją lipidiniuose paviršiuose lemiančiais ir ribojančiais veiksniais.

Tyrime buvo naudotos virpesinė suminio dažnio generacijos (VSFG) spektroskopija, Furje atvaizdo infraraudonoji (FTIR) spektroskopija, atominės jėgos mikroskopija (AFM), Langmuir monosluoksnių formavimo, kvantinės chemijos skaičiavimų bei VSFG spektrinių juostų išskyrimo **metodikos**.

Disertacijos **tikslas** – pritaikyti virpesinę suminio dažnio generacijos spektroskopiją biomimetinių membranų ir baltymų agregatų adsorbcijos ties oras/vanduo ir lipidas/vanduo fazinėmis ribomis tyrimuose.

Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti **uždaviniai**:

1. Suformuoti bei charakterizuoti skirtingą antrinę struktūrą turinčius vištos kiaušinio baltymo lizocimo (HEWL) agregatus;
2. Identifikuoti HEWL skirtingų struktūrų, adsorbuotų oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėse ribose, VSFG spektrinius žymenis;
3. Ištirti skirtingų HEWL struktūrų adsorbcijos ypatumus oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėse ribose;
4. Suformuoti Langmuir monosluoksnius, sudarytus iš skirtingą deuterinimo lygį turinčių DPPC fosfolipidų, ir priskirti charakteringas virpesines juostas;
5. Įvertinti deuterinimo poveikį DPPC Langmuir monosluoksnių tvarkai bei hidratacijai.

Mokslinis naujumas ir aktualumas

Šiuo metu nustatyta apie 40 skirtingų baltymų galinčių formuoti citotoksiškas struktūras, dalis jų siejamos su nepagydomais degeneraciniais nervų sistemos sutrikimais. Platus amiloidinių struktūrų spektras ir klinikinių fenotipų persidengimas išlieka didele problema kuriant terapinius vaistus, klasifikuojant, laiku diagnozuojant ar netgi prognozuojant neurosutrikimus. Nepaisant daugybės pastaraisiais metais atliktų mokslinių tyrimų, nėra galutinai ištirtas ir aprašytas šių ligų mechanizmas molekuliniam lygmenyje. *In situ* amiloidinių sutrikimų analizę apsunkina polimorfiška amiloidinės fibrilės struktūra ir ją palaikančių-rišančių jėgų įvairovė. Nėra aišku, kokios antrinės struktūros amiloidiniai dariniai sąveikauja su fosfolipidine membrana, kas sąlygoja ir nuo ko priklauso amiloidinių darinių adsorbcija įvairiuose paviršiuose.

Siekiant nustatyti baltymų agregaciją bei baltymų ir/ar agregatų sąveiką su kompleksinėmis savitvarkėmis ląstelių membranomis, pravartu taikyti supaprastintus biomimetinių membranų modelius, paremtus vieno tipo lipidų monosluoksniais. Gaunama informacija apie baltymų antrinių struktūrų molekulinis vyksmus medžiagų fazių ribose yra didelis privalumas. Tačiau neigiamą įtaką biomimetinių sistemų analizei daro ribotas *in situ* eksperimentinių metodų pasirinkimas bei pritaikymas tiriant neimobilizuotus, laisvai vandens paviršiuje paskleistus, modelius. Atsižvelgiant į tai, neseniai pradėta taikyti virpesinė suminio dažnio generacijos spektroskopija, kombinuota su Langmuir lipidinių monosluoksnių formavimo metodika yra puiki alternatyva. Metodas pasižymi dideliu paviršiaus jautrumu ir specifiskumu, o gaunama informacija yra išskirtinai išsami įtraukiant adsorbuotų baltymų antrinių struktūrų, sudėties, sandaros ar atskirų molekulinų grupių orientacijos bei tarpusavio sąveikos parametrus. Visgi, dėl žinių trūkumo kaip tinkamai pasiruošti eksperimentui ir interpretuoti gautus duomenis, VSFG nėra plačiai taikoma mokslinėje amiloidų tematikoje.

Didžiausias dėmesys disertacijoje buvo skirtas baltymų ir biomimetinių membranų sąveikos analizei ir charakterizavimui pasitelkiant iš anksto suformuotus baltymo agregatus. Tai yra vienas iš pirmųjų mums žinomų VSFG darbų, kuriais pademonstravome, kad oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėse ribose gali adsorbuotis denatūravęs, aiškios struktūros neturintis baltymas ir/ar jo fragmentai tiek maži bei dideli agregatai su jiemis būdinga paraleliai ir antiparaleliai β-klostyta struktūra. Svarbūs pastebėjimai pagrįsti hidrofobine sąveika, kuri lemia baltymo adsorbciją oras/D₂O fazinėje riboje ir elektrostatine sąveika, kuri DOPG/D₂O fazėje įvertinta kaip pagrindinė adsorbcijos varomoji jėga su ją papildančiu hidrofobinės sąveikos indėliu.

Svarbiausia baltymo ir lipidinio monosluoksniu VSGF spektrų analizės problema yra stiprus metilo (CH_3) virpesinių juostų persiklojimas. Vienas iš problemos sprendimo būdų – spektroskopijoje plačiai taikomas izotopinis žymėjimas, lipidą sudarančius vandenilius (H) pakeičiant deuteriais (D). Nepaisant plačiai žinomos fosfolipidų izotopinio žymėjimo metodikos, kyla klausimas, kaip tiriamą sistemą veikia biomimetinių membranų fazinio virsmo temperatūros pokyčiai tarp skirtingai deuterintų lipidų. Tuo tikslu siekėme užregistruoti ir įvertinti skirtingą deuterinimo lygį turinčių fosfolipidinių monosluoksnių VSGF spektrus keliuose virpesių regionuose: hidrofilinės fosfato grupės, metilo/metileno ir karbonilo grupių. Tiriamajame darbe pastebėta, jog cholino grupėje deuterinti DPPC lipidiniai monosluoksniai išlaiko gerai hidratuotą fosfato grupę netgi po šių suspaudimo ar CaCl_2 įterpimo į sistemą, tačiau šia grupėje protiuoti lipidiniai monosluoksniai demonstruoja įprastą dehidrataciją. Remiantis gautais rezultatais galime teigti, jog cholino grupės deuterinimas gali turėti įtakos lipido hidrofilinės fosfato grupės struktūrai, kuri monosluoksnių atveju suformuoja Ca^{2+} jonus blokuojančią, tačiau vandeniui laisvai pralaidžią struktūrą.

Disertacijos darbas apima platų spektrą taikomų tarpdisciplininių metodų, kurių panaudojimas užtikrina pagrindinio darbo tikslo įgyvendinimą.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Agregacijos metu vištos kiaušinio baltymo lizocimo (HEWL) struktūrų hidrofobiškumas didėja, o krūvį turinčių bei paviršiuje lokalizuotų grupių kiekis mažėja. Darinių hidrofobiškumas lemia adsorbciją oras/vanduo fazinėje riboje.
2. Elektrostatinė sąveika tarp lipido ir krūvį turinčių baltymo grupių nulemia adsorbciją DOPG/ D_2O paviršiuje su ją papildančiu hidrofobinės sąveikos indėliu, kai agregatų krūvis neutralizuojamas keičiant sistemos pD.
3. Adsorbciją lemiančių jėgų pasikeitimas iš elektrostatinės į hidrofobinę DOPG/ D_2O fazinėje riboje veikia adsorbuotų struktūrų orientaciją.
4. Cholino grupės deuterinimas DPPC monosluoksniuose sąlygoja struktūrinius hidrofilinės galvutės pokyčius.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Amiloidai

Terminas „*amiloidas*“ [lot. *amylym*, gr. *amylon* – krakmolas] mokslinėje literatūroje, pirmą kartą buvo paminėtas dar 1838 metais vokiečių botaniko Matthias Jakob Schileiden⁶². Pavadinimas buvo skirtas apibūdinti labiau specifines, augaluose sutinkamas ir į krakmolą panašias struktūras, kurios reaguodamos su jodo-sieros rūgštimi nusidažydavo mėlynai violetine spalva. Kiek vėliau šis terminas buvo pradėtas vartoti ir su medicina susijusioje literatūroje. Pirmasis buvo vokiečių patologas Rudolf Virchow, jis 1854 metais savo darbuose terminą *amiloidas* pavartojo apibūdinant mažas ovalios formos nuosėdas aptiktas smegenų autopsijos mėginiuose.⁶² Terminas įgavo sąsają dėl stebimos nuosėdų spalvinės reakcijos su jodo-sieros rūgštimi, kai šių spalva iš rudos pasikeisdavo į mėlynai violetinę. Tuo metu toks spalvinis pokytis buvo tipiškas krakmolui ir tik vėliau 1859 metais Friedreich ir Kekule pademonstravo, jog šie smegenyse aptinkami dariniai pasižymi didele azoto koncentracija ir negali būti sietini su įprastais angliavandeniais, kaip buvo galvota anksčiau.⁶³ Atsižvelgiant į tai buvo priimta išvada, jog smegenyse aptinkami amiloidai yra baltyminės struktūros.

XX a. viduryje vystantis technologijoms bei atsirandant naujoms tyrimų sritims buvo pastebėta, jog visi amiloidiniai ir į amiloidus panašūs baltymai pasižymi trimis bendrais bruožais:

- **Sąveikauja su Kongo raudonuoju dažu.** Kongo raudonuoju dažu įvairiuose audiniuose nudažytos amiloidinės sankaupos poliarizuotoje šviesoje švyti žaliai gelsva spalva.^{63,64}
- **Pasižymi specifine struktūra.** Elektronine mikroskopija vizualizuoti amiloidai ir į juos panašios struktūros sudaro ilgus, tiesius, standžius bei siūliškus darinius – fibriles (lot. *fibrilla* – skaidulėlė). Bendras fibrilių diametras siekia 70 – 140 Å bei yra sudarytas iš kelių smulkesnių 20 – 35 Å protofilamentų, tuo tarpu ilgis varijuoja tarp 1000 – 16000 Å.^{63,65}
- **Fibriliniai dariniai pasižymi β-klostyta struktūra.** Rentgeno spindulių difrakcijos eksperimentai atskleidė, jog fibrilės yra sudarytos iš atskirų β-klostytų polipeptidinių grandinėlių, išsidėsčiusių statmenai fibrilės ašiai ~4,7 Å atstumu. Pačios β-klostės išsidėsto lygiagrečiai fibrilės ašiai paliekant ~10 Å tarpą. Priklausomai nuo peptido ar baltymo β-klosčių grandinės gali būti išsidėsčiusios paraleliai, antiparaleliai arba mišriai.^{65–68}

Šiais laikais terminas *amiloidas* apibūdina baltymų grupę galinčią formuoti netaisyklingos formos, vandenyje netirpias bei iš fibrilinių darinių suformuotas sankaupas, kurios privalo būti sietinos su ligų sukėlimu. Būtent dėl pastarosios sąlygos atsirado terminas *funkciniai amiloidai* – grupė baltymų pasižyminčių amiloidinių baltymų savybėmis, tačiau sietini su tam tikra funkcija, o ne liga. Pavyzdžiui, β -klostytos fibrilinės struktūros yra tvirtos ir gali būti panaudojamos formuojant šilko gijas.¹ Yra daugybė savo dydžiu, aminorūgščių seka bei antrine struktūra besiskiriančių baltymų/peptidų, kurie esant atitinkamoms sąlygoms formuoja morfologiškai labai panašias amiloidines fibriles, tačiau tik mažas jų kiekis siejamas su amiloidų sukeliomomis ligomis.^{1,4,69–73}

1.1.1. Amiloidinių baltymų sukeliami sutrikimai

Terminas tapo sietinas su ligomis tik XIX a. viduryje, pirmieji žinomi ligų atvejai aprašyti 1639 metais. Tais metais Nicolaus Fontanus pranešė autopsijos metu aptikęs pūlingus darinius ant kepenų bei padidėjusią blužnį pripildytą baltų į akmenis panašių darinių.⁷² Manoma, jog tai buvo vienas iš pirmųjų apibūdintų amiloidinių baltymų sukeltų ligų – amiloidozės atvejų. Iki pat XIX a. pabaigos buvo pastebėta, jog pažeisti gali būti beveik visi vidaus organai įskaitant širdį, plaučius, žarnyną, inkstus, blužnį ar kepenis.⁷² XX a. pradžioje tokių organų sąrašą papildė ir smegenys, po to kai Aloisas Alzheimeris aprašė savo pacientės smegenų autopsijos mėginiuose rastus darinius.⁷⁴

Iki šiol yra išskiriama arti 40 žmogui pavojingų amiloidinių, netirpias fibriles formuojančių ir kauptis linkusių baltymų, galinčių sutrikdyti tam tikrų organų funkcijas.¹ Bendru atveju amiloidozės pagal pažeidžiamas sritis yra skirstomos į tris grupes^{74,75}:

- Neurodegeneracinės – sietinas su centrinės nervų sistemos (CNS) pažeidimais;
- Lokalizotos ne neuropatinės amiloidozės – sietinas su vieno tam tikro tipo audinių pažeidimais, išskyrus CNS;
- Sisteminės ne neuropatinės amiloidozės – sietinos su kelių skirtingo tipo audinių pažeidimais.

Dalis žmogui pavojingų amiloidinių baltymų su jų sukeliomomis ligomis pateikti 1.1. lentelėje.

1.1. lentelė. Su ligomis siejami amiloidiniai baltymai/peptidai bei jų paveikiami organai. Adaptuota pagal [1,3,4,75].

Agreguojantis baltymas/peptidas	Paveikiami organai	Liga
Neurodegeneracinės ligos		
Amiloido β peptidas (angl. Amyloid- β peptide)	CNS	Alzheimerio liga
α -Sinukleinas (angl. α -Synuclein)	CNS	Parkinsono liga, Levi kūnelių sukeliama demencija
Tau baltymas (angl. Tau protein)	CNS	Frontotemporalinė demencija su Parkinsoniniu sindromu
Priono baltymas ar jo fragmentai (angl. Prion protein)	CNS	Spongiforminė encefalopatija
Lokaluotos ne neuropatinės amiloidozės		
Amilinas (angl. Islet amyloid polypeptide)	Kasa (Langerhanso salelės)	II tipo diabetas
Insulinas (angl. Insulin)	Lokaluota injekcijos vieta	Injekcijos lokalizuota amiloidozė
Plaučių paviršinio aktyvumo baltymas C (angl. Lung surfactant protein C)	Plaučiai	Plaučių alveolinė proteinozė
Sisteminės ne neuropatinės amiloidozės		
Imunoglobulino lengvosios grandinės (angl. Immunoglobulin light chains)	Visi išskyrus CNS	AL amiloidozė
Laukinio tipo transtiretinis (angl. Wild-type transthyretin)	PNS, ANS, širdis, akys	Senatvinė sisteminė amiloidozė
Lizocimo mutantai (angl. Mutants of lysozyme)	Kepenys	Lizocimo amiloidozė
β 2-mikroglobulinas (angl. β 2-microglobulin)	Raumenų ir kaulų sistema, ANS	Su dialize sietina amiloidozė, Paveldima visceralinė amiloidozė

CNS – centrinė nervų sistema; PNS – periferinė nervų sistema; ANS – autoniminė nervų sistema.

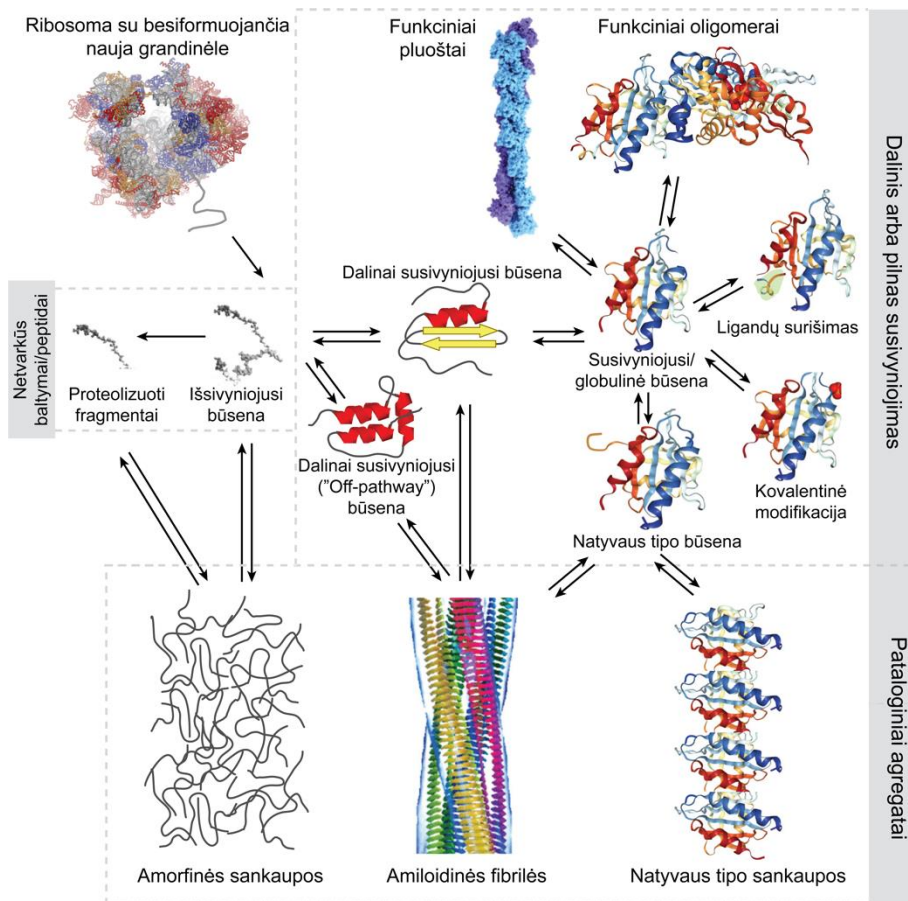
Visais amiloidinių sutrikimų atvejais pagrindine patogeniškumo priežastimi tampa baltymų struktūriniai pakitimai, kurie kaupiasi viduląstelinėje ar užląstelinėje terpėje. Pastaruoju atveju sankaupos lokalizuojasi ant specifiskai paveikiamų audinių.⁷³ Rečiau aptinkami viduląsteliniai baltymų inkluzai. Iki šiol yra žinomi tik 4 citozoliniai (į

viduląstelinio skysčio sudėtį įeinantys) polipeptidai galintys formuoti ląstelės veiklą trikdančius užpildus.⁴ Priežastys, dėl kurių įvyksta žalingas baltymų struktūros pakitimas viduląstelinėje ar užląstelinėje terpėje iki šiol nėra aiškios.⁷⁶ Tyrimai rodo didelį kiekį lemiančių veiksnių: baltymo mutacijos^{75,77}, *de novo* arba paveldimos epigenetinės modifikacijos⁷⁸, gamybos ir/ar šalinimo procesų sutrikimai^{79,80}, organizmo druskų disbalansas⁸¹, aplinkos faktoriai⁸² (pH, temperatūra, oksidacinis stresas).

1.1.2. Peptidų/baltymų struktūros

Egzistuoja daugybė savo struktūra, amino rūgščių seka bei funkcija besiskiriančių peptidų/baltymų, be kurių gyvybė būtų neįsivaizduojama. Biomolekulių funkcionalumas priklauso nuo įgytos struktūros, kuri gyvoje sistemoje nuo jos sintezės ribosomoje iki galutinio skilimo proteazių pagalba įgauna daug įvairių formų.⁴ 1.1. paveiksle schematiškai apibendrintas polipeptidinių grandinių konformacijų pasiskirstymas. Pastebima, jog baltymai prieš pilnai pasiekdami funkcinę ar globulinę formą palaipsniui įgauna tam tikras tarpines konformacijas.⁸³

Didelė dalis su amiloidiniais susirgimais sietinų peptidų/baltymų, pavyzdžiui, amiloidas- β , α -sinukleinas, tau baltymas ar amilinas apibūdinami kaip natyviai išsivynioję netvarkingos struktūros baltymai.^{3,4} Nevienalytes, gerai apibrėžtas struktūras gali įgauti tik sąveikaudami su tam tikromis biomolekulėmis.⁸⁴ Pastebima, jog netvarkingų organizmo baltymų sintezė gali vykti transliacijos metu ribosomose, kuomet jungiasi aminorūgštys sudarydamos polipeptidus arba veikiant proteolitiniams fermentams, atskeliant peptidinius fragmentus nuo didesnių baltymų.⁴ Nepaisant atitinkamo peptido/baltymo gamybos proceso, visada yra tikimybė tam tikromis sąlygomis įvykti funkcinės konformacijos klaidai. Paprasčiausias atvejis – baltymų molekulėse atsirandantys dinaminiai svyravimai paskatinantys lokalų molekulės išsivyniojimą.⁸⁵ Dalinai išsivynioję peptidai/baltymai yra linkę į netinkamą pakartotinį susivyniojimą ir tuo pačiu – agregaciją, todėl atsiranda rizika suformuoti nefunkcionalius ir žalingus agregatus.⁸⁶ Šis procesas, skirtingai nuo kitų baltymų veiklos reguliavimo būdų, dažnu atveju yra negrįžtamas. Tyrimais parodyta, jog su patologijomis sietina baltymų agregacija gali būti sąlygota netvarkingų α -sinukleino⁸⁷ ar amiloidas- β ⁸⁸, bet ir globulinių β 2-mikroglobulino⁸⁹ ar transtiretino⁹⁰ baltymų.

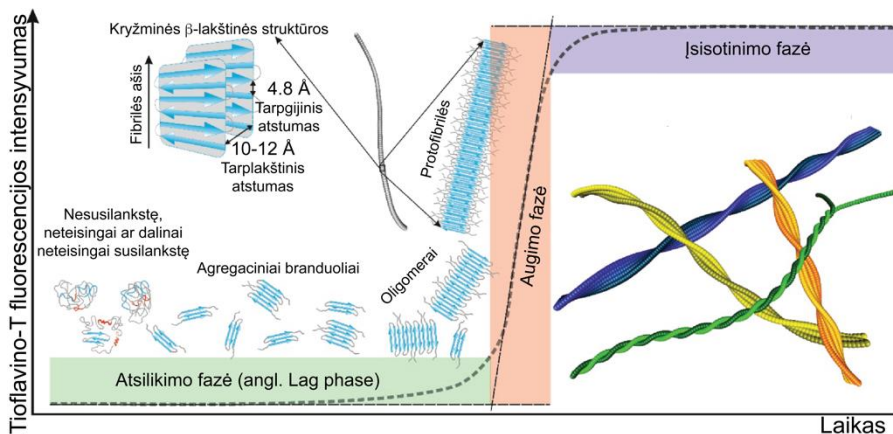


1.1. paveikslas. Biosintetintos polipeptidinės grandinės konformacinių būsenų bei galimų jų perėjimų schematinis atvaizdavimas. Baltymų konformacinių pokyčių nukrypimų atvejais galimi patologiniai agregatai: amiloidinės fibrilės, amofrinės ar natyvaus tipo sankaupos. Nekontroliuojamas jų susidarymas sietinas su patologijomis. Adaptuota pagal [4].

1.1.3. Peptidų/baltymų agregacija į amiloidines fibriles

Vienas iš svarbesnių pasiekimų, leidusių geriau suprasti amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmą, buvo patikimų eksperimentinių ir matematinių metodų sukūrimas, analizuojant fibrilių susidarymo kinetiką.^{91–93} Tyrimai parodė, jog įprastai tirpaus baltymo konversija į agreguotą būseną apima du pagrindinius etapus, užuomazgų (agregacinių branduolių) susidarymą bei tolimesnį jų augimą.^{92,94} Tioflavino-T fluorescencijos intensyvumo, šviesos sklaidos bei sigmoidinės kinetikos eksperimentinės

metodikos, leidžiančios registruoti fibrilių susidarymo procesą, išskiria tris pagrindines fazes (žr. 1.2. paveiksle):^{91–95}

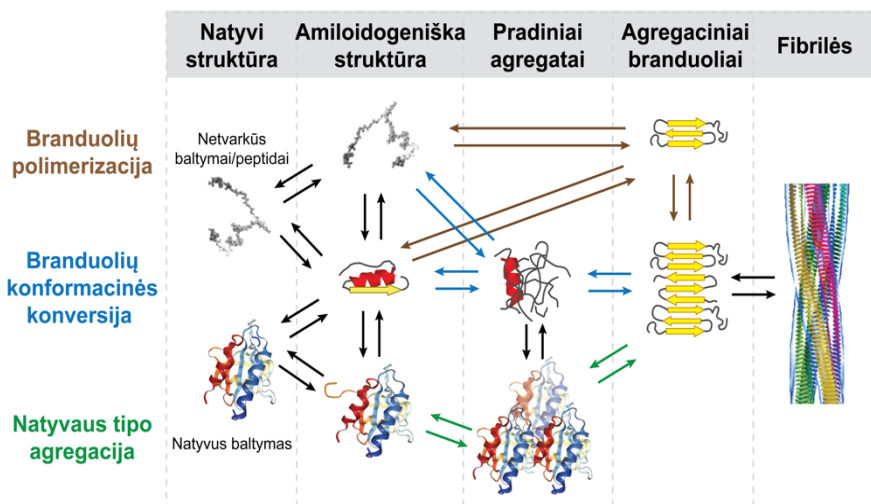


1.2. paveikslas. Amiloidų agregacijos tyrimuose naudojamos tioflavino-T fluorescencijos intensyvumo kinetikos schematinis atvaizdavimas. Pirmoji (atsilikimo/inertiškumo) fazė atspindi peptidų/baltymų jungimąsi į mažus agregacinius branduolius bei didesnes, β-klostėmis praturtintas, oligomerines struktūras. Antroji (augimo) fazė atspindi agregacinių branduolių ir oligomerų jungimąsi į protofibriles. Trečioji (įsisotinimo) fazė atspindi protofibrilinių darinių jungimąsi į brandžias, daugiagijas amiloidines fibriles. Adaptuota pagal [95].

- **Atsilikimo/inertiškumo** (angl. lag phase). Šioje fazėje stebimas lėtas nesusilanksčiusių, neteisingai ar dalinai neteisingai susilanksčiusių baltymų jungimasis į agregacinius branduolius, kurie toliau veikiami tarpmolekulinių sąveikos jėgų formuoja didesnes, β-klostėmis praturtintas oligomerines struktūras.
- **Ekspontinė augimo** (angl. exponential growth) taip pat žinoma kaip išilginio augimo, polimerizacijos ar fibrilizacijos fazė. Šioje fazėje stebimas spartus, tarpusavio sąveika sąlygotas, agregacinių branduolių bei oligomerų jungimasis į priešfibrilines struktūras ir vėliau į tvarkingas protofibriles.
- **Įsisotinimo** (angl. saturation) taip pat žinoma kaip plato ar pusiausvyroji fazė. Šioje fazėje stebimas protofibrilių jungimasis į daugiagijas amiloidines fibriles, kurios pasižymi aukštu polimorfizmo lygiu.

Pastebima, jog atsilikimo/inertiškumo fazėje agregaciniai branduoliai (užomazgos) yra itin svarbūs amiloidinių fibrilių formavimuisi ir gali susidaryti trimis būdais (žr. 1.3. paveiksle). Branduolių polimerizacijos mechanizmo atveju (angl. nucleated polymerization mechanism) betvarkiai ar dalinai betvarkiai baltymo monomerai jungdamiesi formuoja agregacinius

branduolius.⁹¹ Tai yra termodinamiškai nepalankus procesas vykstantis pačioje atsilikimo/inertiškumo fazės pradžioje (žr. 1.2. paveiksle). Šiuo atveju agregaciniai branduoliai laikomi mažiausiomis fibrilės augimą inicijuoti galinčiomis struktūromis. Amiloidinės fibrilės augimas yra apsprendžiamas branduolių ir monomerinių struktūrų tarpusavio sąveikos.⁹¹ Literatūroje yra siūloma agregacinius branduolius priskirti vienai iš monomerų rūšių, kuri pasižymi aiškiai apibrėžta konformacija bei polinkiu sparčiai agreguotis.⁹⁶ Branduolių polimerizacijos modelio pagalba buvo nustatyta amiloido- β 40 ir amiloido- β 42⁹⁷, α -sinukleino⁹⁸, insulino⁹⁹ bei kitų^{100,101} baltymų agregacija.



1.3. paveikslas. Amiloidinių fibrilių formavimosi schematinis atvaizdavimas. Skirtingomis spalvomis žymimi trys agregacinių branduolių formavimosi mechanizmai. Adaptuota pagal [4].

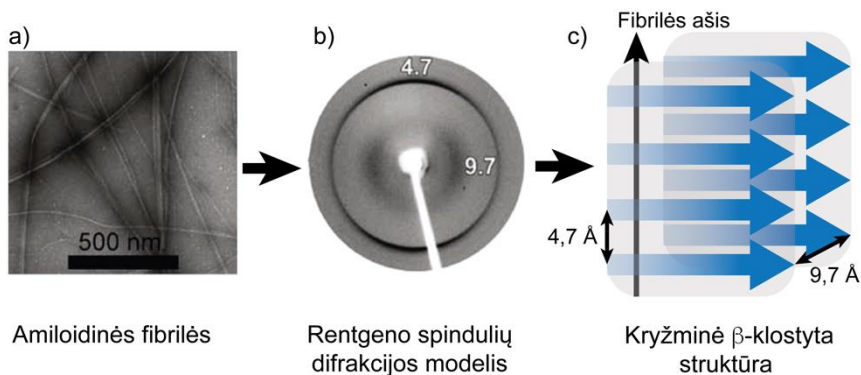
Netinkamai susivynioję baltymo monomerai gali sudaryti agregatus, kurie dėl tam tikrų struktūrinių charakteristikų trūkumo neinicijuoja amiloidinių fibrilių formavimosi.¹⁰² Tačiau tam tikromis sąlygomis (naudojant išcentinę jėgą, ultragarsines bangas, skirtingą tirpalų koncentraciją ar jų inkubacijos laikus) pradiniai agregatai gali persitvarkyti ir įgauti agregaciniam branduoliui būdingą struktūrą, pasižyminčią kataliziniu aktyvumu surišant netinkamai susivyniojusius agregatus. Proceso metu formuojamos amiloidinės fibrilės (žr. 1.3. paveiksle).¹⁰² Branduolių konformacinės konversijos mechanizmo (angl. nucleated conformational conversion mechanism) sparta yra apribota pradinių, netinkamai susivyniojusių oligomerų virtimo agregaciniais branduoliais. Šis modelis taikomas apibūdinant amiloido- β 40⁸⁸, α -sinukleino⁸⁷, amilino (IAPP)¹⁰³, vištos kiaušinio baltymo lizocimo¹⁰⁴ ir kitų⁴ baltymų agregaciją.

Trečiasis agregacinių branduolių susidarymo kelias yra agregacija iš natyvaus tipo baltymo (angl. native-like aggregation), kuri būdinga β 2-mikroglobulinui⁸⁹, transtiretinui¹⁰⁵, žmogaus lizocimui¹⁰⁶ bei kitiems globuliniams baltymams⁴. Į agregaciją linkę globulinių baltymų regionai yra giliai baltymo šerdyje. Norint inicijuoti regiono agregaciją yra būtina globulinės formos konversija iki dalinai išsivyniojusios struktūros, o tolimesnė savitvarka į fibriles vyksta pagal vieną iš anksčiau aprašytų mechanizmų.⁸⁵ Tyrimais nustatyta, kad natūralūs globuliniai baltymai turi mažą, bet reikšmingą polinkį pereiti į amiloidinę būseną. Lokalus baltymo išsivyniojimas, terminės fliktuacijos ir ligandų atsijungimas gali sąlygoti kitų natūralių konformacijų susikūrimą.⁸⁵ Visos tarpinės, natūraliai egzistuojančios, globulinio baltymo konformacijos suteikia galimybę į agregaciją linkusiems segmentams būti lengviau pasiekiamiems, o tai užtikrina natyvaus tipo agregatų formavimąsi.^{4,85} Tolimesnėje agregacijos eigoje susidaro amiloidinio tipo oligomerai bei fibrilės (žr. 1.3. paveiksle).

Labai tikėtina, jog neamiloidinių baltymų virtimas į amiloidines struktūras turi gerokai daugiau alternatyvių kelių, kurie stipriai priklauso nuo eksperimentinių sąlygų, baltymo aminorūgščių sekos ir konformacinės amiloidinių monomerų būsenos.¹⁰⁷ Anksčiau aprašyti trys agregacijos atvejai yra tik maža dalis šiuo metu išaiškintų mechanizmų visumos.

1.1.4. Amiloidinių fibrilių struktūra

Amiloidozes sukeliantys baltymai tarpusavyje yra labai skirtingi savo struktūra, aminorūgščių seka ir funkcija. Bendras juos vienijantis bruožas – β -gijomis (angl. β -stands) praturtintos amiloidinės fibrilės. Fibrilių formavimasis prasideda nuo tarpinių agregatų – oligomerų. Pavyzdžiui, A β (40), A β (42), PrP(106-126), α -sinukleino maži oligomerai yra sudaryti iš antiparaleliai β -klostytų struktūrų.^{108,109} Priešingai BMR tyrimuose pastebima, jog dideliems A β (42) peptido oligomerams būdinga paraleliai β -klostyta struktūra.¹¹⁰ Didžiausią indėlį amiloidinių fibrilių struktūros nustatyme padarė Rentgeno pluošto difrakcijos^{111,112} (angl. X-ray fibre diffraction), Rentgeno spindulių kristalografijos¹¹³ (angl. X-ray crystallography), mikrokristalų elektronų difrakcijos¹¹⁴ (angl. microcrystal electron diffraction), kieto kūno branduolių magnetinio rezonanso^{115,116} (angl. solid-state nuclear magnetic resonance) ir kriogeninės elektronų mikroskopijos¹¹⁷ (angl. cryogenic electron microscopy) tyrimai.



1.4. paveikslas. Elektronų pralaidumo mikroskopija rodo, jog amiloidinės fibrilės susideda iš ilgų filamentų (a). Rentgeno spindulių difrakcijos modelyje matomi atspindžiai ties 4,7 ir 9,7Å (b) parodo, jog amiloidinėse fibrilėse dominuoja kryžminis β -klostytas struktūrinis motyvas (c). Adaptuota pagal [118]

Pastebima, jog amiloidinės fibrilės pasižymi hierarchine struktūra. Jas sudaro nuo vieno iki kelių dešimčių protofilamentų, kurie tarpusavyje jungiasi šoninėmis grupėmis.^{116,119,120} Tipiškai vienas protofilamentas, apibūdinamas β -kryžminiū (angl. cross- β) modeliu, yra iki kelių nanometrų pločio ir iki mikrometro ilgio. Modeliui būdingas filamentą sudarančių β -klosčių išsidėstymas $\sim 9,7$ Å atstumu, kai jį sudarančios β -gijos išsidėsto $\sim 4,7$ Å atstumu statmenai fibrilių ašies (žr. 1.4. paveiksle).^{4,74,116,119–122} Formuojamos amiloidinės struktūros tarpusavyje gali skirtis priklausomai nuo to kaip viena kitos atžvilgiu išsidėsto β -klostės ir kaip jose orientuotos β -gijos (paraleliai ar antiparaleliai). Nemažiau svarbus β -gijų išsidėstymas tarp atskirų β -klosčių ir jų orientacijos pobūdis – vieną į kitą arba priešingas puses.^{70,74} Pavyzdžiui, 11 aminorūgščių ilgio peptidas iš transtiretino formuoja antiparalelines β -gijų poras¹¹⁷, tuo tarpu amiloidas- β_{40} formuoja skirtingas fibrilines struktūras iš paraleliai organizuotų β -gijų¹²³. Didesni baltymai sudaro kompleksiškesnes struktūras iš antiparaleliai išdėstytų β -klosčių masyvų, dar kitaip vadinamų „super“ klostuotais β -lakštais (angl. super-pleated β -sheets), kaip pavyzdys – amilino fibrilės.¹²⁴ Amiloidinėse struktūrose β -gijos saistytos vandenilinių ryšių sudaro sterinius užtrauktukus (angl. steric zippers).⁷⁴ Protofilamentus tarpusavyje jungia šoninės aminorūgščių grandinės su būdingomis hidrofobinėmis, elektrostatinėmis, van der Valso ar aromatinėmis (angl. π -stacking) sąveikomis.^{116,119} Kompaktiška amiloidinės fibrilės struktūra pasižymi energetiniu pranašumu bei yra išskirtinai termodinamiškai¹²⁵ ir mechaniškai¹²⁶ stabili. Struktūrai taip pat būdingas aukštas Jungo modulis, nurodantis didelį atsparumą tempimui ir išilginiam gniuždymui. Dėl pastarųjų

parametrų fibrilės galėtų būti prilyginamos plienui ar anglies nanovamzdeliams.¹¹⁶

In situ amiloidinių sutrikimų tyrimus apsunkina polimorfiška amiloidinės fibrilės struktūra ir ją palaikančių-rišančių jėgų įvairovė.^{116,120,121} Tas pats peptidas/baltymas gali formuoti kelias skirtingas amiloidines struktūras ir lemti didelę fenotipinę variaciją.¹²⁷ Tyrimais nustatyta, jog amiloidinių fibrilių polimorfizmai gali būti sietini su skirtingomis patologijomis.¹¹⁹ Klinikinių tyrimų metu surinkus anamnezę ir atlikus detalų pacientų ištyrimą, pastebėta, kad neurofibrilinių Tau rezginių kaupimasis CNS sukelia neurodegeneracines ligas, kitais atvejais Tau baltymai lemia motorikos sutrikimus ir raumenų atrofiją.^{128–131} Taupatijos yra didelė heterogeniška ligų grupė, kurią sudaro skirtinga simptomatika, klinikinė išraiška, genetiniu profiliu, radiologiniais radiniais ir anatominiiais pakitimais pasižymintys sindromai.¹²⁷ Tyrimai pademonstravo, jog ta pačia liga sergantys pacientai turėjo vienodos struktūros Tau baltymo darinius, tačiau tarp skirtingų kognityvinių ar motorinių taupatijų baltymų intarpai neuronuose ir/arba neuroglijoje buvo polimorfiški.

Platus amiloidinių struktūrų spektras ir klinikinių fenotipų persidengimas išlieka didele problema kuriant terapinius vaistus, klasifikuojant ir laiku diagnozuojant neurosutrikimus. Patologinių amiloidozių diagnozės patvirtinimas dažnu atveju vyksta *post mortem*, pateikus autopsijos išvadas. Siekiant palengvinti polimorfinių baltymų nustatymą, pradėti amiloidų *in vitro* tyrimai, manipuluojant fibrilių auginimo sąlygomis: keičiant tirpiklį¹³², temperatūrą¹³³, peptido/baltymo koncentraciją¹³⁴, pH¹³⁵ ar netgi pridėdant išorinį mėginio maišymą¹³⁶. Eksperimentai *in vitro* turi daug potencialo nustatant specifinę agregaciją sąlygojančius veiksnius.

1.1.5. Vištos kiaušinio baltymas lizocimas ir jo agregacija

Vištos kiaušinio baltymas lizocimas (angl. Hen Egg White Lysozyme, HEWL) yra žmogaus baltymo lizocimo homologas, sudarytas iš 129 aminorūgštis turinčios polipeptidinės grandinės, kurios molekulinė masė yra 14,3 kD. HEWL yra vienas pirmųjų globulinių baltymų, kuriam buvo nustatyta trimatė struktūra.¹³⁷ Natyvioje formoje vištos kiaušinio baltymas yra elipsinės formos, kurią sudaro 40% α -spiralės, 40% β -kilpos, 7% β -klostės bei 13% aiškios struktūros neturintys fragmentai.¹³⁸ Baltymo struktūrą stabilizuoja keturi, iš cisteino aminorūgščių suformuoti disulfidiniai tilteliai.¹³⁷

Daugelis baltymų, tokie kaip insulinas, gliukagonas, galvijų serumo albuminas, kazeinas ir lizocimas gali sudaryti netirpias amiloidines fibriles,

kurios nusėda audiniuose ir organuose lemdamos paveldimas sisteminės amiloidozės.¹³⁹ Fiziologinėmis sąlygomis lizocimas yra stabilus tirpus baltymas ir amiloidus formuoja tik vyraujant nepalankiems veiksniams. Norint inicijuoti baltymo agregaciją bandinio tūryje yra reikalinga jo natyvios struktūros destabilizacija. Literatūroje pateikiama daugybė skirtingų metodikų kaip tai atlikti.^{140–147} Dažniausiai baltymo denatūracija yra sukeliama palaikant žemą pH, aukštą temperatūrą, maišant bandinį arba veikiant įvairiais alkoholiais^{140,143,148}. HEWL hidrolizės metu susiformuoja 49-101 ir 53-101 aminorūgščių fragmentai.¹⁴⁰ Jiems jungiantis tarpusavyje susidaro agregacinės užuomazgos, oligomerinės bei fibrilinės struktūros, kurioms būdinga amiloidams tipiška β -klostyta struktūra. Patologinio lizocimo struktūroje β -gijos yra orientuotos statmenai fibrilės ašiai, o β -klostės išilgai. Amiloidinių fibrilių architektūrą sutvirtina keletas tankiai susisukusių protofilamentų, kurie lemia baltymo (ypatingai amiloido šerdies) stabilumą ir atsparumą proteolizei.¹⁴⁹

Fibrilių struktūra ir formavimosi kinetika įvairių sąlygų fone priklauso nuo eksperimentuose taikomų protokolų. Naudojant šarminį pH viršijantį lizocimo pI (~10,5) ir SDS, CTAB detergentus amiloidinio tipo fibrilės formuojasi kambario temperatūroje, nenaudojant detergentų – matomos labiau amorfinės struktūros.¹⁵⁰ Didelis druskos kiekis baltymo inkubacijos metu, gali pagreitinti amiloidų susidarymą.¹³⁷ Nustatyta, kad anijonai daro žymiai didesnę įtaką lizocimo fibrilizacijos procesui ir jo spartai nei katijonai.¹⁴⁹ Be to, įrodyta, jog druskos gali apspręsti ir susidariusių agregatų morfologiją: natrio chloridas paskatina lizocimą formuoti ilgas, plonas ir nešakotas fibriles, o natrio sulfatu ir natrio perchloratu praturtintuose tirpaluose yra linkusios susidaryti storesnės ir trumpesnės lizocimo fibrilės.¹³⁷ AFM matavimais pademonstruota, jog taikant pH 2 ir 57 °C temperatūros sąlygas, formuojasi ilgos (iki 16 μm) plonos ir tiesios HEWL fibrilės, tuo tarpu 80 °C temperatūroje stebimi gausūs sferinės formos agregatai.¹⁴¹

1.1.6. Lizocimo sąveika su lipidinėmis membranomis

Įprastai amiloidinių baltymų fibrilės formuojasi momentaliai^{151–153}, tačiau lizocimo agregacijos procesą ir skirtingus jo etapus lengva stebėti ir kontroliuoti. Galimybė valdyti agregaciją bei tirti skirtingų agregatų sąveiką su lipidiniais membranų modeliais yra didelis privalumas pasirenkant lizocimą kaip modelinį baltymą.¹⁴⁸

Lizocimas išlieka teigiamai įkrautas plačiame pH diapazone ir pasižymi dideliu afiniškumu jungdamasis su anijoniniais fosfolipidais¹⁵⁴, neutraliomis ar neigiamai įkrautomis vezikulėmis¹⁵⁵. Nustatyta, kad įsiterpdamas į neįkrautų

vezikulių lipidinių dvisluoksnį lizocimas gali pažeisti membranos vientisumą ir paskatinti pūslelių egzocitozę. Lipidinių monosluoksnų paviršiaus slėgio matavimai atskleidė nuo pH ir druskų koncentracijos priklausomą lizocimo adsorbciją, kuri vertinama kaip daugiaveiksmis procesas – pradinę baltymo sąveiką su lipidine membrana inicijuoja joninių ir/arba vandenilinių jungčių susidarymas, baltymo konformacijos pokyčiai, skysto monosluoksnio struktūrinis persigrupavimas ir dalinis lizocimo įsiterpimas į alkilinių grandinėlių regionus.¹⁵⁵ Tyrimais įrodyta, kad mažesnis vandenilinių jungčių kiekis koreliuoja su didesne amiloidogeninių baltymų susidarymo rizika bei didesniu tirpių baltymų ir PC dvisluoksnų afiniškumu.^{139,155}

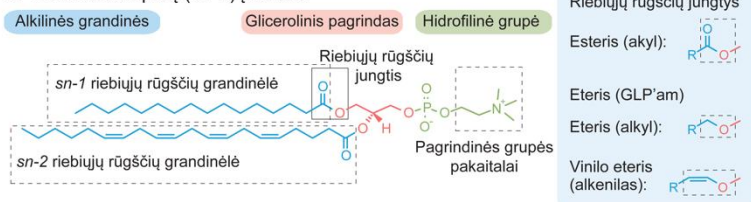
Modelinių baltymų sąveikos tyrimams dažnai pasitelkiama didelė įvairovė metodų, kurie suteikia skirtingo pobūdžio informaciją. Atominės jėgos, elektroninė ar krio-elektroninė mikroskopija naudojamos sąveikos metu susiformuojančių baltymų struktūrų morfologijos nustatymui.^{49,117,121,156,157} Rentgeno spindulių kristalografija ar kieto kūno branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija leidžia identifikuoti sąveikos metu kintančią agregatų kristalinę struktūrą.⁷⁵ Fluorescencinės koreliacijos spektroskopija tinkamos analizuojant baltymų įsiterpimą bei jų judėjimą membranose.¹⁵⁸ Membranai sukeliamų pažeidimų tyrimams pasitelkiama elektrocheminio impedanso spektroskopija^{49,157}, o virpesinės spektroskopijos metodikos suteikia molekulinio lygio informaciją apie baltymų-lipidų sistemas^{49,159–161}.

1.2. Biologinė membrana ir jos sandara

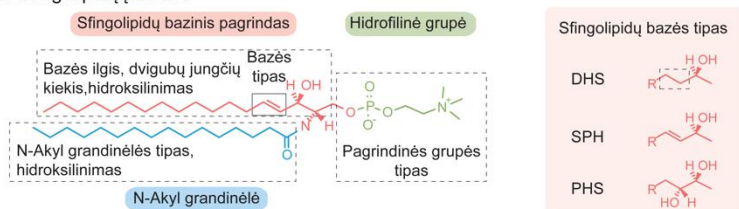
Citoplazminė membrana – ląstelės vidų ir jos turinį gaubianti apsauginė bei struktūrą suteikianti dvisluoksnė kompozicija, sudaryta iš skirtingų lipidų, funkcinų baltymų, receptorių, jonų kanalų ir jonų pompų. Fosfolipidų dvisluoksniai formuoja visų eukariotų membranų pagrindą ir atlieka gyvybiškai svarbias funkcijas: dalyvauja selektyvioje tirpių baltymų ar kitų biomolekulių pernašos reguliacijoje ir kontrolėje, užtikrina signalo perdavimą, homeostazės palaikymą, katalizuoja chemines reakcijas bei kitus biologinius procesus.^{162,163} Lipidų ir peptidų/baltymų sinergija yra gyvybiškai svarbi tinkamos ląstelių veiklos palaikymui.

Pagrindinė statybinė dvisluoksnio medžiaga yra amfifiliškumu pasižymintys lipidai sudaryti iš hidrofiliinės galvutės ir dviejų hidrofobinių riebiųjų rūgščių grandinėlių.^{164–166} Plazminėje membranoje yra trijų skirtingų klasių lipidai: glicerofosfolipidai, sfingolipidai bei steroliai.^{164,167,168} Glicerofosfolipidai ir sfingolipidai skiriasi riebiųjų rūgščių grandinėlių ilgiais, dvigubų jungčių ir/arba hidroksilo grupių kiekiu, jų lokalizacija grandinėlėje bei galvutės pakaitine grupe (žr. 1.5. paveiksle).¹⁶⁷ Visi glicerofosfolipidai

a. Glicerofosfolipidų (GPL) įvairovė



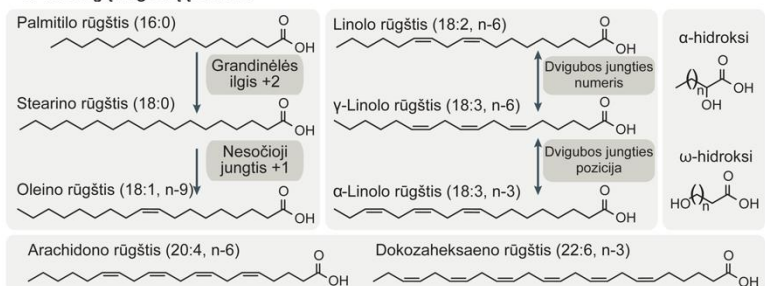
b. Sfingolipidų įvairovė



Glicerofosfolipidai	Hidrofilinės grupės pakaitalai
Fosfatido rūgštis	-
PC	Cholinas
PE	Etanolaminas
PS	Serinas
PI	Inozitolis
PG	Glicerolis
Kardiolipidai	PG
LBPA	LPA

Sfingolipidai	Hidrofilinė grupė
Cer	Hidroksilas
Sfingomielinas	Fosfocholinas
CerPE	Fosfoetanolaminas
GlcCer	Gliukozė
GalCer	Galaktozė
Kompleksiniai glikosfingolipidai (GSL)	Oligosacharidai
C1P	Fosfatas

c. Riebiųjų rūgščių įvairovė

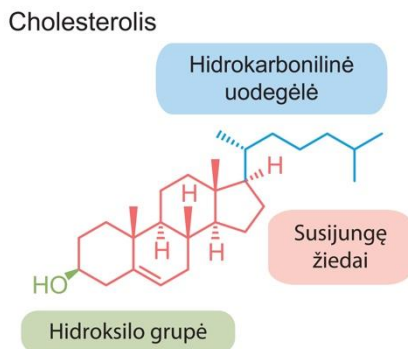


1.5. paveikslas. Žinduoliuose sutinkamų membraninių lipidų cheminė įvairovė. (a) Glicerofosfolipidus (GPL) sudaro prie glicerolio pagrindo *sn-1* ir *sn-2* padėtyse prisijungusios riebiųjų rūgščių grandinės. Hidrofilinę galvutę sudaro fosfatas ir alkoholis, kurie apibrėžia GPL pavadinimą. (b) Sfingolipidai susideda iš sfingoidinės bazės (kuri tuo pačiu metu yra pagrindas ir hidrofobinė uodega), N-akilo grandinės bei hidrofilinės grupės. Hidroksilinimas ir dvigubų jungčių skaičius apibrėžia sfingoidinio pagrindo tipą, hidrofilinę galvutę apibrėžia paties sfingolipido pavadinimą. (d) Riebiųjų rūgščių grandinės gali skirtis savo ilgiu, dvigubų jungčių kiekiu bei padėtimi, paveiksle pavaizduota kaip (XX:Y, n-Z), čia XX, Y ir Z atitinkamai yra anglies atomų skaičius, dvigubų jungčių skaičius bei pirmosios dvigubos jungties padėtis. Trumpiniai paveiksle: PC – fosfatidylcholinas; PE – fosfatidyletanolaminas; PS – fosfatidylserinas; PI – fosfatidylinozitolis; PG – fosfatidylglicerolis; LBPA – lizobisfosfatido rūgštis; DHS – sfinganinas; SPH – sfingozinas; PHS – 4-hidroksi-sfinganinas; Cer – keramidas; CerPE – keramido; GlcCer – gliukozilkeramidas; GalCer – galaktozilkeramidas; C1P – keramido-1-fosfatas. Adaptuota pagal [167]

pasizymi jiems būdinga hidrofiliinės galvutės struktūra, sudaryta iš fosfato ir prie jo prisijungusios papildomos pakaitinės grupės (žr. 1.5. A paveiksle).¹⁶⁷ Priklausomai nuo pakaitinės grupės tipo, glicerofosfolipidai gali būti skirstomi į: fosfotidilcholiną (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS), fosfatidilglicerolis (PG), fosfatidilinozitolis (PI) ir fosfatido rūgštį (PA).^{164,167} Nustatyta, kad labiausiai paplitęs yra fosfotidilcholinas (PC), kuris sudaro daugiau nei 40 % visų žinduolio ląstelės lipidų.¹⁶⁵

Sfingolipidai nuo glicerofosfolipidų skiriasi tuo, kad prie fosfato grupės esanti glicerolinė jungtis yra pakeičiama amino-alkoholine jungtimi (žr. 1.5. B paveiksle). Sfingolipiduose taip pat kaip ir glicerofosfolipiduose prie fosfato grupės yra prisijungusi kelių klasių pakaitinė grupė – dažniausi yra keramidai (Cer), sfingomielinai (SM) bei ganglioizidai (GM).¹⁶⁴

Cholesterolis yra vienintelis žinduolių plazminėje membranoje aptinkamas sterolis su išskirtine chemine struktūra (žr. 1.5. paveiksle).¹⁶⁹ Molekulės hidrofiliinę dalį sudaro tik viena hidroksilo grupė, o likusią į membraną įsiterpusią hidrofobinę dalį formuoja nepolinė hidrokarbonilinė uodegėlė (žr 1.6. paveiksle). Ląstelių plazminėje membranoje cholesterolio kiekis varijuoja nuo 40-50 %, likusią dalį sudaro glicerofosfolipidai ir sfingolipidai, kurių pasiskirstymas priklauso nuo gyvūninės ląstelės ir audinio tipo.¹⁶⁴ Vidutiniškai plazminę membraną sudaro ~43 % PC, ~23 % SM, ~21 % PE, ~7 % PI, ~4 % PS bei kiti lipidai.^{165,170} Smulkesnių ląstelės komponentų (organelių) membranose cholesterolio kiekis mažesnis – nuo 20 iki 50 %.¹⁶⁴ Labiausiai paplitusius fosfolipidus sudaro 16 ir 18 anglies atomų ilgio alkilinės grandinės tarp kurių ~30 % sočiosios, ~43 % mononesočiosios bei ~22 % polinesočiosios riebalų rūgštys.^{164,170}



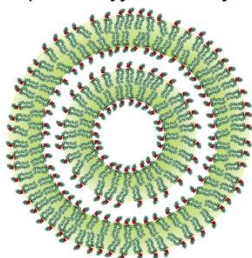
1.6. paveikslas. Cholesterolio molekulės struktūra žmogaus ir gyvūnų organizme. Adaptuota pagal [167]

Plazminės membranos kompleksiskumą lemia ne tik struktūrinių elementų gausa, bet ir savybė formuoti skirtingą kompoziciją turinčius sluoksnius (angl. leaflet). Žinduolių membranos citozolinis, į citoplazmą orientuotas sluoksnius yra praturtintas zwitterijoniniu PE bei labiau anijoniniais fosfolipidais PS, PI, tuo tarpu išoriniame sluoksnyje dažniau aptinkami zwitterijoniniai PC, SM.^{171–173} Natūralus asimetriškos dvisluoksnių sistemos sutrikdymas gali sąlygoti specifines biologinės apsaugos reakcijas. Pavyzdžiui, PS lipidų kiekio padidėjimas išorinėje dvisluoksnių dalyje užtikrina hemostazę – kraujo krešėjimo procesus, kitais atvejais gali būti vykdoma programuota ląstelių žūtis (apoptozė).¹⁷⁴ Ne visuomet pakitus dvisluoksnių kompozicijai yra aktyvuojami ląstelių apsaugos mechanizmai, galimas ir priešingas efektas inicijuojant žalingus amiloidinių baltymų agregacijos procesus.³¹

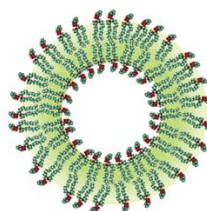
1.2.1. Modelinės membranų sistemos

Gyva ląstelė kartu su ją sudarančiais struktūriniais elementais yra ypatingai sudėtinga sistema. Molekulės struktūra kinta įvairių dinaminių procesų metu, o vyksmus gyvose biologinėse sistemose yra problematiška tirti biofizikiniais metodais. Šios problemos sprendimas yra modelinės lipidinių membranų sistemos, kurios gali būti sudarytos iš riboto skaičiaus elementų, dažnu atveju vieno ar kelių skirtingų lipidų ir/ar cholesterolio. Tokių modelių sistemų pranašumas yra paprastas ir greitas paruošimas bei platus suderinamumas su skirtingomis tyrimų metodikomis.

A. Tirpalo tūryje formuojamų lipidinių membranų modeliai

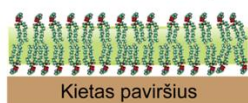


Daugiasluoksniės liposomos

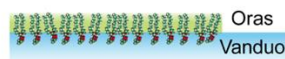


Vienasluoksniės vizikulės

B. Paviršiuose formuojamų lipidinių membranų modeliai



Lipidiniai dvisluoksniai



Lipidiniai monosluoksniai

1.7. paveikslas. Modelinės lipidinių membranų sistemos. (a) Tirpalo tūryje formuojamų lipidinių membranų modeliai. (b) Paviršiuose formuojamų lipidinių membranų modeliai.

Modelinės membranų sistemos gali būti išskiriamos į dvi pagrindines kategorijas: tirpalo tūryje ir ant paviršių formuojamas membranas (žr. 1.7. paveiksle).¹⁶⁴ Tirpalo tūryje formuojamos membranos, žinomos kaip vizikulės arba liposomos, yra tirpios sferinės dalelės, sudarytos iš vieno ar daugiau lipidinių dvisluoksnių (žr. 1.7. A paveiksle.). Tokio tipo sistemos tinkamos tūrio apribotoms analizės metodikoms, taikomoms Rentgeno spindulių sklaidos, fluorescencijos, branduolių magnetinio rezonanso (angl. nuclear magnetic resonance, NMR), elektronų paramagnetinio rezonanso (angl. electron paramagnetic resonance, EPR) spektroskopinių ir kalorimetrinių matavimų tyrimuose.^{175–177} Galimybė tirpalo tūryje suformuoti skirtingos kompozicijos dvisluoksnius, iš abiejų pusių apgaubtus skysčio,^{178,179} yra pagrindinis modelio privalumas lyginant jį su mažai besiskiriančia biologine gyvaja sistema.¹⁸⁰

Kita modelinių membranų kategorija yra ant kietų ar skystų paviršių formuojamos membranos (žr. 1.7. B paveiksle). Tokio tipo sistemos tinkamos paviršiumi apribotoms analizės metodikoms: neutronų ir Rentgeno spindulių difrakcijos ar atspindžio, pažeistojo vidaus atspindžio Furje atvaizdo infraraudonoji (angl. attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR), virpesinė suminio dažnio generacijos (angl. sum-frequency generation, VSFG) spektroskopijoms, Langmuir izotermų matavimams ar elektroninei, fluorescencinei, atominės jėgos ar Briusterio kampo mikroskopijoms.^{177,181} Ant kietų paviršių formuojamos membranos gali būti skirstomos į palaikomąsias (angl. supported bilayer lipid membrane, sBLM), hibridines (angl. hybrid bilayer lipid membrane, hBLM) arba pakabinamas (angl. tethered bilayer lipid membrane, tBLM) lipidines membranas. Palaikomoji dvisluoksnė membrana (sBLM) gali būti gaminama dviem būdais: ant hidrofiliinio paviršiaus išliejant dvisluoksnes liposomas arba pasinaudojant Langmuir-Blotgett/Schäfer metodu, dvisluoksnius formuojant merkimo būdu iš vieno sluoksnio molekulių įleidžiant ir ištraukiant hidrofiliinį paviršių.¹⁸² Tokio tipo membranos yra nestabilios ir turi daug defektų, kadangi jas prie paviršiaus laiko silpna fizikinė adsorbicija.

Hibridinė lipidinė membrana (hBLM) pagaminama hidrofobinį paviršių padengiant savitvarkiu monosluoksniu (SAM) bei ant jo išliejant vieno sluoksnio liposomas. Atsirandanti hidrofobinė sąveika orientuoja liposomos lipidus alkilinėmis grandinėmis į SAM paviršių. Tokia hibridinė membranų struktūra, dėl aukštesnės fazinio virsmo temperatūros, pasižymi stabilumu bei padidėjusiu kietumu. Atitinkamai tai gali paveikti membranų lipidų bei baltymų dinamiką.

Pakabinama lipidinė membrana (tBLM) ruošiama labai panašiai kaip ir hBLM. Pirmiausiai paviršiumi paskleidžiamas mišrus inkarinis savitvarkis

monosluoksnis ir ant jo daugiasluoksnių liposomų liejimo metodu suformuojama membrana.¹⁸³ Pagrindinis pakabinamos membranos privalumas – susidaranti izoliuota pomembraninė erdvė, kuri panaudojama transmembraninių baltymų tyrimuose išvengiant sąveikos su kietu paviršiumi ir sBLM atveju – stebimos analizuojamo baltymo domenų denatūracijos.¹⁸⁴

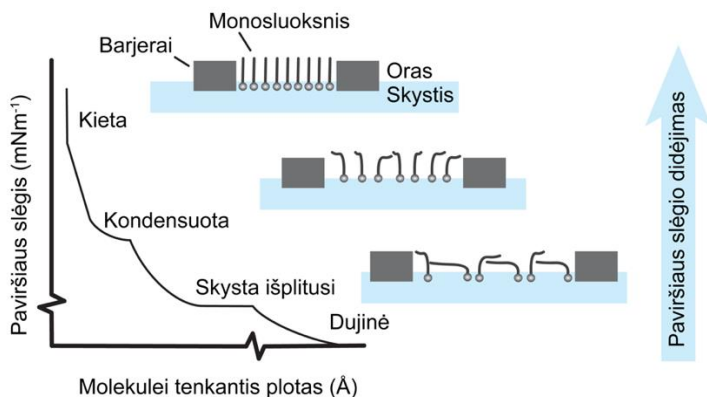
Kietame paviršiuje formuojamoms membranoms didelę įtaką daro paviršius mikroskopiniai netolygumai, kurie gali lemti nepageidaujamus membranos defektus. Alternatyva yra ant skystų paviršių ruošiamos membranos – lipidiniai monosluoksniai (detalesniam apžvelgiami 1.2.3. skyriuje). Nors toks pavyzdys mažiau atitinka realią sistemą nei anksčiau aptarti membranų modeliai, visgi ant skystų paviršių formuojamos membranos yra paprastai gaminamos, lengvai modifikuojamos ir kontroliuojamos keičiant eksperimento sąlygas. Privalumai suteikia galimybę specifiskai analizuoti lipidas-lipidas, lipidas-peptidas/baltymas, lipidas/vanduo bei kitų biomolekulių sąveikos fenomenus.

1.2.2. Langmuir lipidiniai monosluoksniai

Langmuir lipidiniu monosluoksniu yra laikomas iš lipidų ar kitų amfifiliškumu pasižyminčių molekulių sudarytas netirpus monomolekulinis sluoksnis išsidėstęs oras/skystis fazinėje riboje. Eksperimentinė Langmuir monosluoksnių formavimo procedūra yra pakankamai paprasta. Amfifiliškumu pasižyminčios bei organiniame tirpiklyje ištirpintos molekulės yra paskleidžiamos ant skysto, dažniausiai vandens, paviršiaus. Tirpikliui išgaravus vandens paviršiuje pasilieka tik lipidai, kurių polinė grupė orientuojama į skystą fazę, o nepolinė angliavandenilinė grandinė – į orą. Pagal poreikį tokiu Langmuir lipidiniu monosluoksniu galima manipuliuoti keičiant lipidų užimamą plotą su sistemoje esančiais barjeriais. Molekulių suspaudimo ir/ar jų atlaisvinimo metu stebimi paviršiaus slėgio pokyčiai yra registruojami Wilhelmy plokštelės mikrobalsu. Paveiksle 1.8. pateikiamas Wilhelmy plokštele registruojamos izotermos pavyzdys.

Modelinių membranų tyrimuose taikoma Langmuir technika leidžia tiksliai kontroliuoti paskleistų lipidų tankį ir tuo pačiu metu registruoti paviršiaus slėgio pokyčius.¹⁸⁵ Supaprastinta reali sistema užtikrina galimybę selektyviai tirti amiloidinių baltymų sąveiką su ląstelės plazminės membranos lipidais. Pasinaudojant Langmuir monosluoksnių technika bei BAM (Briusterio kampo mikroskopija) ir AFM Alvarez su kolegomis pademonstravo, kad A β 40 peptidas gali agreguoti į amiloidinio tipo fibriles sąveikaudamas su mažu tankio POPC lipidiniu monosluoksniu, priešingai – didelio tankio DSPC lipidiniam monosluoksniui šie struktūriniai pokyčiai

nebuvo stebimi.¹⁸⁶ Fu kartu su kolegomis savo tyrime pademonstravo Langmuir monosluoksniu, suformuoto iš DPPG įtaką hIAPP ir rIAPP baltymų agregacijai.¹⁸⁷ Pasinaudojant suminio dažnio generacijos spektroskopija (VSFG) mokslininkai nustatė, jog vandens paviršiuje dviejų tipų baltymai įgauna panašias struktūras, tačiau sąveikaudami su lipidiniu monosluoksniu hIAPP baltymai efektyviai persitvarko į β -klostytą, o rIAPP baltymų struktūra išlieka nepakitusi. Suminio dažnio generacijos spektroskopija yra viena iš nedaugelio virpesinės spektroskopijos rūšių, galinčių tirti baltymų antrinių struktūrų pokyčius paviršiumi apribotose sistemose. Plačiau apie metodą kitame skyriuje.



1.8. paveikslas. Izotermos registravimas lipidinių monosluoksnių formavimo metu. Priklausomai nuo paviršiaus suspaudimo, kinta vienai molekulei tenkantis plotas ir tai sąlygoja registruojamo paviršiaus slėgio pokyčius.

1.3. Įvadas į suminio dažnio generacijos spektroskopiją

Virpesinė suminio dažnio generacijos (angl. Vibrational Sum-Frequency Generation, VSFG) spektroskopija – spektrometrijos rūšis paremta antros eilės netiesiniais optiniais procesais. VSFG spektroskopijos metu bandinio paviršius apšviečiamas dviem didelio intensyvumo lazerinėmis spinduliuotėmis, kurių sąveika ir persiklojimas erdvėje ir laike, leidžia generuoti suminį dažnį. Vienas iš šių spindulių skirtas žadinti molekulių virpesinius šuolius, todėl yra derinamo dažnio ir lokalizuotas infraraudonojoje spektro srityje. Antrasis naudojamas rezonansiniam pirmojo šviesos spindulio stiprinimui, todėl yra fiksuoto regimojo dažnio. Paviršiuje sugeneruojamas suminio dažnio signalas teikia informaciją apie riboje esančių molekulių virpesius.

VSFG spektroskopija yra pakankamai nauja technologija, kurios galimybės pirmą kartą buvo pademonstruotos 1987 metais prof. Sheno grupės JAV.¹⁸⁸ Metodas pasižymi dideliu paviršiaus jautrumu ir specifiskumu, o

gaunama informacija yra išskirtinai išsami įtraukiant paviršiaus struktūrą, sudėties, sandaros, atskirų molekulinų grupių orientacijos bei tarpusavio sąveikos parametrus. Svarbus VSFG privalumas – galimybė atlikti tyrimus įvairių skysčių paviršiuose, todėl metodas sėkmingai naudojamas molekulių adsorbcijos analizėje skirtingose fazinėse ribose.^{189,190} Pastaraisiais metais biomolekulių struktūros, orientacijos, agregacijos ir tarpusavio sąveikos tyrimai^{6,8,9,13–18,24,55,56,187–199} gerokai išplėtė VSFG spektroskopijos pritaikymo galimybes, tačiau kokybiškam eksperimento planavimui ir korektiškam rezultatų įvertinimui yra būtinas kiek detalesnis VSFG teorinis supratimas.

1.3.1. Netiesinis poliarizuojamumas ir jo prigimtis

Mažo intensyvumo šviesos sąveika su medžiaga pasižymi tiesine priklausomybe nuo į ją kritusios šviesos intensyvumo, o atsakas lemia šviesos lūžį ir atspindį. Šviesos intensyvumui išaugus, medžiagos atsakas tampa priklausomas nuo šviesos intensyvumo aukštesnės eilės narių, kuris aprašomas netiesine optika.²⁰⁰ Tiesiniai ir netiesiniai optiniai procesai vyksta dėl medžiagos atomus supančių elektronų tankio pasiskirstymo. Atomus paveikiant išoriniu elektriniu lauku, vyksta elektronų tankio persiskirstymas, dėl kurio elektronai pasislenka link branduolių, taip sudarydami indukuotus elektrinius dipolius. Šio proceso metu indukuotų elektrinių dipolių tūrio vieneto vidurkis apibrėžia medžiagos poliarizuotumą. Darant prielaidą, kad medžiaga skaidri, netiesinė poliarizuotumo dalis maža, o netiesinis atsakas momentinis – indukuotas poliarizuotumas per laiko vienetą $\mathbf{P}(t)$ gali būti išskleidžiamas laipsnių eilute pagal elektrinio lauko stiprį (\mathbf{E}).^{200,201}

$$\mathbf{P}(t) = \varepsilon_0(\chi^{(1)}\mathbf{E}(t) + \chi^{(2)}\mathbf{E}^2(t) + \chi^{(3)}\mathbf{E}^3(t) + \dots) = \mathbf{P}_T + \mathbf{P}_{NT} \quad (1.1.)$$

čia $\chi^{(n)}$, kai $n = 1$ - tiesinis optinis jautris, $n = 2$ – antros eilės netiesinis optinis jautris, toliau esantys ($n = 3$ – trečios, $n = 4$ – ketvirtos ir t.t.) poliarizuotumai yra nykstantai mažų dydžių. Bendru atveju $\chi^{(n)}$ yra vadinamas $n + 1$ rango tenzoriumi, \mathbf{P}_T ir \mathbf{P}_{NT} – atitinkamai tiesiniu ir netiesiniu poliarizuotumu. Išskleidus laipsnių eilutę gaunamas $\mathbf{P}^{(2)}(t) = \varepsilon_0\chi^{(2)}\mathbf{E}^2(t)$ dydis vadinamas antrosios eilės (kvadratinu) netiesiniu poliarizuojamu.

Medžiagos poliarizuotumas yra neatsiejama netiesinės optikos dalis. Tik laike kintanti poliarizacija gali lemti naujų elektromagnetinių bangų susidarymą. Laikant, jog terpėje, kurioje sklinda šviesa nėra laisvųjų krūvininkų, ar indukuotų mikroskopinių magnetinių dipolių, apibendrintą sistemos lygtį galime užrašyti taip:^{200,202,203}

$$\nabla^2 \mathbf{E} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E} = -\frac{4\pi}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} (\mathbf{P}_T + \mathbf{P}_{NT}) \quad (1.2.)$$

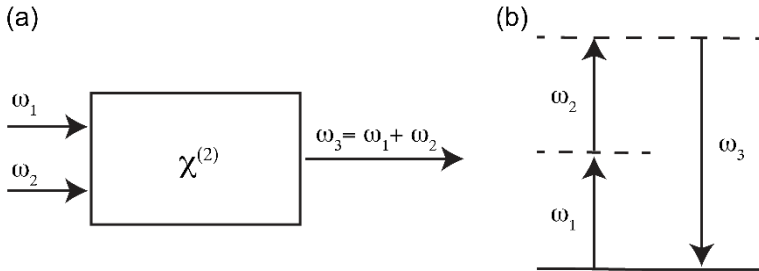
kur \mathbf{E} – elektrinio lauko stipris, c – šviesos greitis vakuume, \mathbf{P}_T ir \mathbf{P}_{NT} – tiesinis ir netiesinis poliarizuotumas. Lygtis aprašo indukuojamų elektromagnetinių bangų elektrinio lauko amplitudžių pokyčius, sąlygotus šviesos sąveikos su tiesiniu ir/arba netiesiniu poliarizuotumu pasižyminčia medžiaga. Elektromagnetinės bangos yra spinduliuojamos, kai dešinys lygties narys $\neq 0$. Vykstant šviesos sugerčiai P_T ir P_{NT} vertės tampa palyginamos, todėl medžiaga veikiamą intensyvią spinduliuotę yra jonizuojama.

1.3.2. Suminio dažnio generacija

Paprasčiausiu atveju suminio dažnio generacija gali būti pavaizduojama dviem tarpusavyje sąveikaujančiais elektriniais laukais, kurie osciliuoja ω_1 ir ω_2 dažniais. Proceso metu dviems bangoms sklindant netiesinė terpėje yra indukuojama netiesinė poliarizacija P_{NT} ir kartu generuojama nauja suminiu dažniu $\omega_{SDG} = \omega_1 + \omega_2$ osciliuojanti banga. Tokių bangų sąveikos elektrinis laukas gali būti užrašytas:^{202,203}

$$\mathbf{E}(t) = 2\mathbf{E}_1 \cos(\omega_1 t) + 2\mathbf{E}_2 \cos(\omega_2 t) = \mathbf{E}_1 (e^{-i\omega_1 t} + e^{i\omega_1 t}) + \mathbf{E}_2 (e^{-i\omega_2 t} + e^{i\omega_2 t}) \quad (1.3.)$$

Schematinis sistemos atvaizdavimas 1.9. paveiksle.



1.9. paveikslas. Schematinis suminio dažnio generacijos netiesinėje terpėje atvaizdavimas (a) bei energinių lygmenų diagrama (b).

Taikant suminio dažnio generacijos metodiką svarbus dydis yra antros eilės netiesinio poliarizuojamumo kitimas, tad į jo išraišką $\mathbf{P}^{(2)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} \mathbf{E}^2(t)$ įstačius dvejų bangų sąveikos elektrinių laukų kitimo lygtį (1.3.) gauname:^{201–203}

$$\begin{aligned}
\mathbf{P}^{(2)}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} & [\mathbf{E}_1^2(e^{-i2\omega_1 t} + e^{i2\omega_1 t}) + \\
& \mathbf{E}_2^2(e^{-i2\omega_2 t} + e^{i2\omega_2 t}) + \\
& 2\mathbf{E}_1\mathbf{E}_2(e^{-i(\omega_1+\omega_2)t} + e^{i(\omega_1+\omega_2)t}) + \\
& 2\mathbf{E}_1\mathbf{E}_2(e^{-i(\omega_1-\omega_2)t} + e^{i(\omega_1-\omega_2)t}) + \\
& 2(\mathbf{E}_1^2\mathbf{E}_2^2)] \quad (1.4.)
\end{aligned}$$

Gautoje išraiškoje galime pastebėti, jog dviejų elektrinių laukų sąveikos su dielektrine medžiaga metu, netiesiniame poliarizuotume atsiranda nauji dažniniai nariai $2\omega_1$, $2\omega_2$, $(\omega_1 + \omega_2)$, $(\omega_1 - \omega_2)$. Kiekvienas jų indukuoja atitinkamai osciliuojančias elektromagnetines bangas. Lygtyje (1.4.) yra ir nuo dažnio nepriklausantis narys, kuris apsprendžia kryptingo elektrinio lauko susidarymą. Priklausomai nuo dažninio nario procesai atitinkamai vadinami:

- Antrosios harmonikos generacija (angl. *second harmonic generation, SHG*), kai atsiranda dvigubo dažnio nariai $\omega_{SHG} = 2\omega_1$ arba $2\omega_2$;
- Suminio dažnio generacija (angl. *sum frequency generation, SFG*), kai atsirandančios naujos bangos dažnis yra priklausomas nuo ją inicijavusių bangų suminių dažnių $\omega_{SFG} = \omega_1 + \omega_2$; (1.4.) lygtyje paryškintas narys.
- Skirtuminio dažnio generacija (angl. *difference frequency generation, DFG*), kai atsirandant naujai bangai, šios dažnis kinta ją inicijavusių bangų dažnių skirtumu $\omega_{DFG} = \omega_1 - \omega_2$;

Atitinkamais dažniais osciliuojančių bangų susidarymo tikimybė bei generacijos efektyvumas yra apsprendžiamas fazine sinchronizmo sąlyga, kuri priklauso nuo sąveikaujančių bangų poliarizacijos, geometrijos, netiesinio kristalo orientacijos, temperatūros bei kita.

Virpesinėje suminio dažnio generacijoje yra naudojamos dvi skirtingo dažnio spinduliuotės. Vienas iš spinduliuotės pluoštų yra parenkamas taip, kad sutaptų su molekulių virpesine sugertimi, todėl yra derinamo dažnio infraraudonojoje spektro srityje. Kitas spindulys yra fiksuoto dažnio, lokalizuotas regimojoje spektro srityje. Pasinaudojant judesio kiekio momento tvermės dėsniumi, suminio dažnio bangos vektorius yra tiesiog jį indukuojančių bangų vektorių suma.^{202,203}

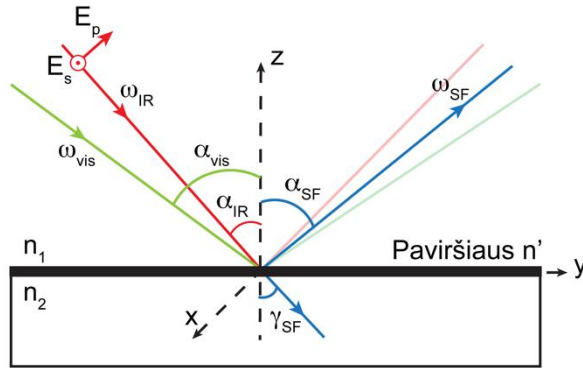
$$\mathbf{k}_{SF} = \mathbf{k}_{IR} + \mathbf{k}_{VIS} \quad (1.5.)$$

Jei spinduliai nėra kolinearūs, judesio kiekio momentas x-kryptimi gali būti perrašomas:

$$n_{SF}\omega_{SF}\sin\alpha_{SF} = n_{IR}\omega_{IR}\sin\alpha_{IR} + n_{VIS}\omega_{VIS}\sin\alpha_{VIS} \quad (1.6.)$$

čia α_{IR} ir α_{VIS} atitinkamai yra infraraudonosios ir regimosios srities spindulių kritimo kampai. Generuojamo suminio dažnio signalo atspindžio kampas yra α_{SF} . Lygtis 1.6. yra laikoma fazinio sinchronizmo sąlyga.

Suminio dažnio signalas įprastai yra generuojamas ne tik atspindyje, bet ir pralaidume (žr. 1.10. paveiksle), tačiau tam reikia specifinės spektrometro modifikacijos. Būtent dėl šios priežasties mūsų darbe signalo registracija buvo pasirinkta ir vykdoma tik atspindžio geometrijoje.



1.10. paveikslas. Suminio dažnio spektroskopijos eksperimento geometrija.

1.3.3. Netiesinis optinis jautris

Paviršiaus specifiškumas apsprendžia suminio dažnio generacijos spektroskopijos išskirtinumą. Izotropinės terpės pasižymi centrine simetrija, tai reiškia, jog antros eilės netiesiniai procesai jose vykti negali, o netiesinis antros eilės optinis jautris $\chi^{(2)}$ yra lygus 0. Medžiagų tarpsluoksniuose ar jų paviršiuose ši centrosimetrija yra pažeidžiama, o $\chi^{(2)} \neq 0$. Būtent tai įgalina VSFG metodą molekulių adsorbcijos, orientacijos, paviršiaus fazės transformacijos tyrimuose įvairių medžiagų fazinėse ribose.^{204–207}

VSFG signalas generuojamas, kai laike ir erdvėje persidengia du intensyvios spinduliuotės lazeriniai impulsai, kurių vienas privalo būti infraraudonosios srities bei sutampantis su molekulių virpesinių šuolių dažniu. Išpildant šias sąlygas antros eilės netiesinis poliarizuojamumas $\mathbf{P}^{(2)}$ gali būti užrašytas taip:^{201–203}

$$\mathbf{P}^{(2)} = \chi^{(2)} \mathbf{E}_{VIS} \mathbf{E}_{IR} = \chi^{(2)} E_{VIS} E_{IR} \cos \omega_{VIS} t \cos \omega_{IR} t \quad (1.7.)$$

kur \mathbf{E}_{VIS} ir \mathbf{E}_{IR} atitinkamai yra regimojo ir infraraudonojo spektro ruožo, lazerinės spinduliuotės elektrinio lauko vektoriai. Centrosimetrija pasižyminčiuose medžiagose $\chi^{(2)} = 0$, todėl ir $\mathbf{P}^{(2)} = 0$. Netiesinis antros eilės poliarizuojamumas tampa nelygus nuliui ten kur simetrija yra pažeidžiama – dviejų aplinkų skiriamojame riboje arba pačiame paviršiuje. Suminio dažnio signalo intensyvumas $I(\omega_{SFG})$ elektrinių dipolių priartėjimu, yra proporcingas netiesinio optinio jautrio modulio $|\chi^{(2)}|$ kvadratui, bei regimosios ir infraraudonosios lazerinės spinduliuotės bangų intensyvumų sandaugai:^{201–203}

$$I(\omega_{SDG}) \sim |\chi^{(2)} E_{VIS} E_{IR}|^2 \sim |\chi^{(2)}|^2 I(\omega_{VIS}) I(\omega_{IR}) \quad (1.8.)$$

Bendru atveju 1.8. lygtyje esantis antros eilės netiesinis optinis jautris yra suma dviejų narių: nerezonansinio $\chi_{NR}^{(2)}$ ir rezonansinio $\chi_R^{(2)}$.

$$\chi^{(2)} = \chi_{NR}^{(2)} + \chi_R^{(2)} \quad (1.9.)$$

Nerezonansinis narys yra laikomas pastoviu viso spektro intervale bei siejamas su elektronų atsaku į molekulių virpesinį žadinimą. Rezonansinis narys yra kompleksinis dydis, sudarytas iš realios ir menamos dalies bei sietinas su netiesiniu molekulių poliarizuojamumu.

$$\chi_R^{(2)} = Re\chi^{(2)} + Im\chi^{(2)} \quad (1.10.)$$

Registruojat signalą reali ir menama netiesinio optinio jautrio dalys atspindi molekulių atsaką į šviesos skaidą ir sugertį bei atitinkamai koduoja spektrinių juostų formas.^{208,209} $Im\chi^{(2)}$ ženklas ties tam tikru virpesiniu dažniu tiesiogiai atspindi tuo dažniu virpančios molekulių grupės orientaciją.^{210,211} Įprastu atveju iš registruojamo signalo išskirti realios ir menamos dalies negalime, tačiau tiesioginė šių narių analizė įmanoma su fazei jautriomis suminio dažnio generacijos spektroskopijos metodikomis.^{24,208–211}

Suminio dažnio generacija yra koherentinis (laike ir erdvėje suderintas bangų dažnio, fazės, poliarizacijos) procesas, kuriame kiekvienas virpesinis rezonansas sąveikauja ne tik su nerezonansiniu fonu bet ir su kitais arti esančiais rezonansais. Bendras signalo intensyvumas priklauso ir nuo santykinės optinių jautrių fazės ϕ . Tokiu atveju VSG signalo intensyvumas esant n virpesinių rezonansų kiekiui išreiškiamas taip:

$$I(\omega_{SDG}) \approx \left| \chi_{NR}^{(2)} + \sum_n \frac{A_n e^{i\varphi_n}}{\omega_{IR} - \omega_n + i\Gamma_n} \right|^2 I(\omega_{VIS}) I(\omega_{IR}) \quad (1.11.)$$

Čia A_n , φ_n , ω_n , ir Γ_n atitinkamai yra n-tojo rezonanso amplitudė, santykinė fazė, rezonansinis dažnis bei juostos plotis. Varijuodami žadinimo bangos ω_{IR} dažniu galime gauti rezonansinį, paviršiuje esančių molekulių, virpesinių lygmenų spektrą, kuris nurodo molekulių sudaromus ryšius ir tarpusavio sąveikas. Keičiant į bandinį krintančių ir jame generuojamų spindulių geometriją ir poliarizacijas galime įvertinti molekulių simetriją bei elektrinių dipolių orientaciją jame.

$$\chi_{ijk}^{(2)} = \begin{pmatrix} \chi_{xxx}^{(2)} & \chi_{xxy}^{(2)} & \chi_{xxz}^{(2)} \\ \chi_{xyx}^{(2)} & \chi_{xyy}^{(2)} & \chi_{xyz}^{(2)} \\ \chi_{xzx}^{(2)} & \chi_{xzy}^{(2)} & \chi_{xzz}^{(2)} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \chi_{zzx}^{(2)} & \chi_{zzy}^{(2)} & \chi_{zzz}^{(2)} \end{pmatrix} \quad (1.12.)$$

Antros eilės netiesinis optinis jautris yra trečio rango tenzorius, sudarytas iš 27 narių $\chi_{ijk}^{(2)}$, kur i, j, k atspindi koordinačių ašis (i, j, k atitinka x, y, z) (žr. 1.12. išraiškoje). Žinant visus tenzoriaus elementus galima nustatyti tiriamų molekulių simetriją bei vidutinę orientaciją. Tai galioja tik tuo atveju, kai sistemą sudarančios molekulės turi tam tikrą gerai apibrėžtą tvarką, kitu atveju chaotiškai orientuotoms sistemoms suminis $\chi^{(2)}$ tampa lygus nuliui. Tai galime nesunkiai parodyti analizuojant centrosimetrinės aplinkos atvejį, kai $\chi^{(2)}$ vertė priešingomis kryptimis turėtų sutapti:

$$\chi_{ijk}^{(2)} = \chi_{-i-j-k}^{(2)} \quad (1.13.)$$

Tačiau pagrindinė tenzorių taisyklė teigia, jog trijų sistemos ašių ženklų pakeitimas apsuka visos sistemos ašį:

$$\chi_{-i-j-k}^{(2)} = -\chi_{ijk}^{(2)} \quad (1.14.)$$

Abi 1.13. ir 1.14. išraiškos bus tenkinamos tik tada kai $\chi_{ijk}^{(2)}$ bus lygus nuliui.

Informacija apie netiesinio optinio jautrio elementus surenkama pasinaudojant skirtingomis VSFG eksperimento spindulių poliarizacijų kombinacijomis. Kiekvienas spindulys gali turėti dvi elektrinio lauko

poliarizacijos: S orientuotą statmenai bei turinčią komponentę tik x ašyje arba P orientuotą lygiagrečiai spindulių kritimo plokštumos bei turinčią komponentes y ir z ašyse. (žr. 1.10. paveiksle). Pavyzdžiui, SSP spindulių poliarizacijų derinys atitinkamai žymi S poliarizuotą VSFG, S poliarizuotą VIS ir P poliarizuotą IR spindulių poliarizacijas. Verta paminėti, jog SSP poliarizacijos kombinacijoje informacija surenkama nuo fazinei ribai statmenų virpesių, SPS – lygiagrečiai paviršiui esančių, o PPP kombinacijoje galima stebėti stipriai persiklojančius vienus su kitais.

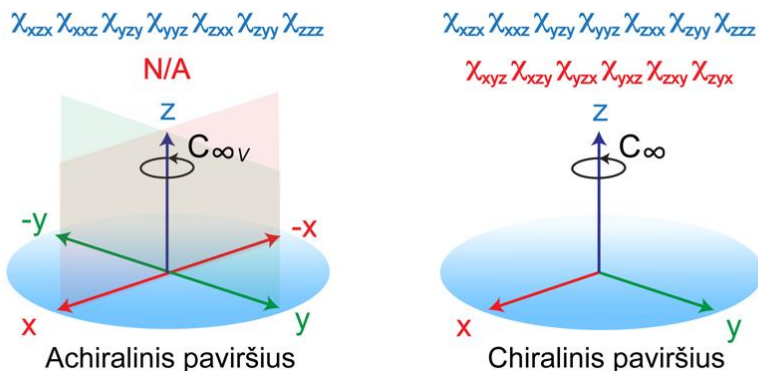
Tūryje egzistuojanti simetrija paviršiuose yra pažeidžiama, tad nagrinėjant achiralinių paviršių, kuriam būdinga $C_{\infty v}$ simetrija, galime parodyti, jog dalis optinio jautrio elementų yra nelygūs nuliui (žr. 1.11. paveiksle). Šią simetriją turinčiam paviršiui $x = -x$ ir $y = -y$ tačiau $z \neq -z$, o tai reiškia, jog x ir y ašių apvertimas neturi keisti $\chi_{ijk}^{(2)}$ tenzorius ženklo.

Pavyzdžiui, turime tenzorių $\chi_{xxz}^{(2)}$ ir apskame x ašį, tokiu atveju tenzorius $\chi_{-x-xz}^{(2)} = -\chi_{-xxz}^{(2)} = \chi_{xxz}^{(2)}$ gali išlaikyti savo ženklą, vadinasi pastarasis yra nelygus nuliui. Nagrinėjant kito tenzorius elemento atvejį, pavyzdžiui, $\chi_{xzz}^{(2)}$ galime parodyti, jog $\chi_{-xzz}^{(2)} = -\chi_{xzz}^{(2)}$, tačiau ši sąlyga tenkinama tik tada kai tenzorius elementas lygus nuliui. Pasinaudojant tuo nesunkiai galime matyti, jog $C_{\infty v}$ simetriją turinčio paviršiaus atveju nenuliniai $\chi_{ijk}^{(2)}$ tenzorius elementai bus tik tie, kurie turės lygiai dvi x ar y (x ir y izotropinio paviršiaus atveju yra identiški) ašis. Papildomai prisideda ir $\chi_{zzz}^{(2)}$ narys, kadangi x arba y ašių apskimas šiam elementui poveikio nedaro. Tokiu būdu peržvelgus visus 27 netiesinio optinio jautrio tenzorius $\chi_{ijk}^{(2)}$ narius galime rasti tik 7 nelygius nuliui: $\chi_{xxz}^{(2)} = \chi_{yyz}^{(2)}$, $\chi_{xzx}^{(2)} = \chi_{yzy}^{(2)}$, $\chi_{zxx}^{(2)} = \chi_{zyy}^{(2)}$, $\chi_{zzz}^{(2)}$.^{192,197} Jiems išmatuoti yra naudojamos įvairios spindulių poliarizacijų kombinacijos, pavyzdžiui, SSP matuojamas $\chi_{xxz}^{(2)}$ tenzorius elementas, SPS ir PSS atitinkamai matuojami $\chi_{xzx}^{(2)}$ ir $\chi_{zxx}^{(2)}$ elementai, tuo tarpu su PPP registruojama visų nelygių nuliui tenzorių suma.²¹²

Taikant tas pačias taisykles nesunkiai galime parodyti, jog chiralinio (izotropinio) paviršiaus pasižyminčio C_{∞} simetrija atveju, be anksčiau paminėtų $C_{\infty v}$ tenzorius elementų, turime 6 papildomus narius: $\chi_{xyz}^{(2)}$, $\chi_{xzy}^{(2)}$, $\chi_{yzx}^{(2)}$, $\chi_{yxz}^{(2)}$, $\chi_{zxy}^{(2)}$, $\chi_{zyx}^{(2)}$.^{192,197} Iš aštuonių galimų poliarizacijos derinių, tik trys PSP, SPP, PPS yra naudojamos šiems nariams nustatyti. Esant tam tikroms sąlygoms keturi iš šešių tenzorius elementų yra lygūs nuliui, o likę du lygūs vienas kitam $\chi_{zyx}^{(2)} = \chi_{xzy}^{(2)}$. Akivaizdu, jog visais galimais chiralinių

poliarizacijų deriniais gaunama informacija tik apie vieną $\chi_{zyx}^{(2)}$ tenzoriaus elementą.

Nenuliniai optinio jautrio elementai:

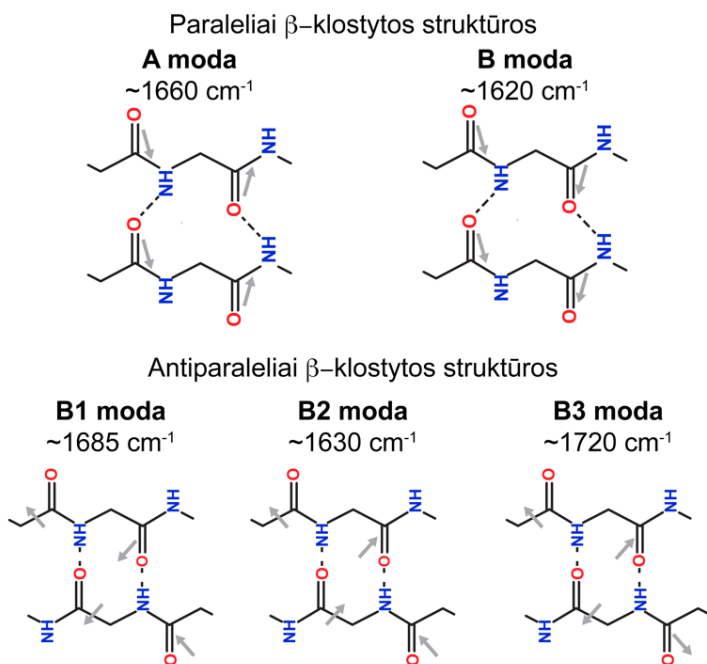


1.11. paveikslas. Achiralinio ($C_{\infty v}$ simetrija) bei chiralinio (C_{∞} simetrija) paviršiaus iliustracija. Mėlyna spalva pažymėti netiesinio optinio jautrio elementai charakterizuojantys abu paviršius, raudona – charakterizuoja tik chiralinį paviršius. Adaptuota pagal [197]

1.3.4. Poliarizaciniai matavimai nustatant baltymų antrines struktūras

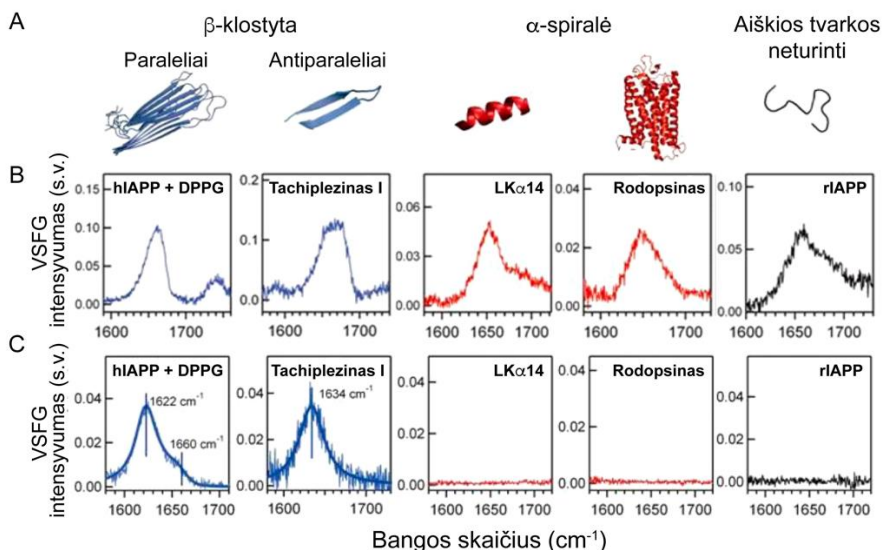
Natvūs ir struktūriškai pakitę baltymai gali turėti sudėtingas tretines ar ketvirtines struktūras, tačiau visos jos pradžioje formuojasi iš įvairių antrinių struktūrinių kombinacijų. Paraleliai/antiparaleliai β -klostyti, α -spiraliniai ar aiškios tvarkos neturintys fragmentai yra pagrindiniai baltymų statybiniai bei funkciniai vienetai.¹⁹² Antrinių struktūrų identifikavimui spektroskopijoje dažnai pasitelkiamas Amidas I (1600-1700 cm^{-1}) regionas. Ne išimtis ir VSFG, kuri gali identifikuoti skirtinguose paviršiuose adsorbuotus baltymus.^{160,192,195,197,206,213–215}

Analizuojant amiloidinių fibrilių susidarymo procesus, išskirtinis dėmesys skiriamas β -klostytoms struktūroms bei jų jungimuisi į didesnius baltyminius subvienetus. Suminio dažnio generacijos spektroskopijoje Amidas I regione teoriškai yra iki 5 virpesinių modų skirtų β -klosčių identifikacijai. Dvi iš jų (A ir B modos žr. 1.12. paveiksle) charakterizuoja paraleliai,¹⁹⁵ o likusios trys (B1, B2 ir B3 modos žr. 1.12. paveiksle) antiparaleliai β -klostytą struktūrą.²¹⁶ Išskiriama ir papildoma virpesinė moda ties $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ generuojama α -spiralinių bei aiškios tvarkos neturinčių fragmentų.²¹⁷



1.12. paveikslas. VSFG aktyvios Amidas I virpesių modos charakterizuojančios paraleliai ir antiparaleliai β -klostytas struktūras. Adaptuota pagal [195,216].

Pasinaudojant poliarizaciniais VSFG matavimais achiralinėse (SSP, SPS, PSS, PPP) spindulių kombinacijose gaunama bendra visų paviršiuje esančių struktūrų informacija. Unikali galimybė yra selektyviai atskirti iš prigimties chiraliskumu pasižyminčių β -klostytų struktūrų ar jų fragmentų generuojamą signalą pasinaudojant PSP, SPP, PPS poliarizacijomis. Antiparaleliai β -klostytos struktūros teoriškai gali turėti iki trijų VSFG aktyvių virpesinių modų lokalizuotų ties ~1630, ~1685 ir ~1720 cm^{-1} ,²¹⁶ nors eksperimentiškai parodytos tik dvi: žemadažnė ~1620 – 1635 cm^{-1} ^{196,198} ir aukštadažnė ~1670 – 1685 cm^{-1} ^{41,216,217}. Paraleliai β -klostytos struktūros turi dvi aktyvias modas ties ~1620 ir ~1660 cm^{-1} ,¹⁹⁵ iš kurių informatyvesnė yra ~1620 cm^{-1} srityje^{187,195}. Yan su kolegomis analizuodami griežtas struktūras formuojančius modelinius baltymus pademonstravo, jog kombinuota achiralinių ir chiralinių spektrų analizė įgalina β -klostytų struktūrų signalo atskyrimą nuo α -spiralinių bei aiškios tvarkos neturinčių (žr. 1.13. paveiksle).²¹⁵ Tarpusavyje paralelinės ir antiparalelinės β -klostės yra atskiriamos dėl pastarajai būdingos aukštadažnės virpesinės modos ties ~1685 cm^{-1} .



1.13. paveikslas. Paviršiuje oras/vanduo adsorbuotų baltymų VSFG spektrai užregistruoti Amidas I virpesių regione. (A) Schematinė modelių baltymų struktūra. Analizuotų baltymų achiraliniai (B) ir chiraliniai (C) VSFG spektrai atitinkamai užrašyti SSP ir PSP spindulių poliarizacijų kombinacijoje. Adaptuota pagal [215].

Pritaikant šį VSFG išskirtinumą buvo pademonstruota daugybės baltymų struktūriniai virsmai. Tan su kolegomis parodė, jog amilino (hIAPP) baltymas sąveikaudamas su DPPG lipidiniu dvisluoksniu esant pH 4 terpėje agreguoja į β -klostytus oligomerus per pradines β -kilpines struktūras.⁴⁰ Padidinus pH iki 7,4 agregacija prasideda nuo α -spiralių ir aiškios struktūros nesudarančių fragmentų.^{160,187} Okuno su kolegomis savo tyrimuose pademonstravo, jog lektino ConA, pepsino bei α -chemotripsino baltymai vandens paviršiuje yra antiparaleliai β -klostytoje struktūroje, nors α -chemotripsino struktūra nėra stabili ir oras/vanduo riboje stebima momentinė jo denatūracija.²¹³ Strazdaitė su kolegomis analizuodama VSFG spektrus užrašytus Amidas I ir Amidas II virpesių spektrinėse srityse achiralinėje SSP ir chiralinėje SPP spindulių poliarizacijų kombinacijose nustatė, jog A β (1-42) peptidas įgaudamas skirtingas struktūras adsorbuojasi prie neigiamai įkrautų DOPG ir zwitterijoninių DOPC lipidinių monosluoksnių. Tyrime buvo pastebėta, jog DOPC monosluoksnyje adsorbuotas peptidas formuoja mažas, oligomeres iš β -kilpų sudarytas struktūras. Tuo tarpu DOPG monosluoksnyje stebimos struktūros yra labiau amiloidinio tipo, t.y. siūliškos ir β -klostytos.¹⁹¹

II. EKSPERIMENTINIAI TYRIMŲ METODAI BEI MEDŽIAGOS

2.1. Tyrimų metodai

2.1.1. FTIR spektroskopija

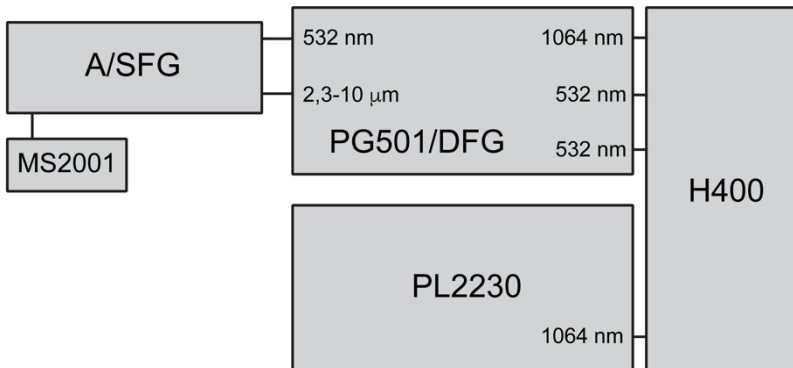
Vištos kiaušinio baltymo lizocimo agregacijos vandens tūryje stebėsenai buvo naudotas Bruker Vertex 80v FTIR spektrometras. Bandinių spektrai buvo registruojami spektrometre įmontuotu, skystu azotu šaldomu MCT detektoriumi. Prieš registruojant spektrus spektrometre ir matavimo kameroje buvo sukuriamas vakuumas, pašalinant orą ir eliminuojant vandens garų infraraudonosios spinduliuotės sugertį. Norint lengviau kontroliuoti agregacijos proceso spartą, buvo naudojamos mažos 5 mg/mL baltymo lizocimo koncentracijos, dėl kurių skysčių celėje nebuvo gauti santykinai intensyvūs FTIR spektrai. Atsižvelgiant į tai, spektrai buvo registruojami ant CaF₂ langelio švelniu azoto srautu išdžiovinus ~100 µL lizocimo bandinio. Matavimų metu švarus CaF₂ langelis buvo skirtas atraminio/kontrolinio spektro registravimui. Visais atvejais spektrai buvo užrašomi atliekant 128 nuskaitymus su 1 cm⁻¹ spektrine skyra. Pirminis spektrų apdorojimas, atimant atraminį spektrą, buvo atliekamas pasinaudojant Opus 7.0 programine įranga, kuri yra skirta valdyti Bruker Vertex 80v spektrometrą.

2.1.2. Atominės jėgos mikroskopija

Trimačiai lizocimo mėginių AFM žemėlapiai buvo sudaromi pasinaudojant Bruker Dimension Icon atominės jėgos mikroskopu, veikiančiu tapšnojimo (angl. tapping) režimu ir turinčiu Budget Sensors 40 Nm⁻¹ silicio konsolę Tap300AI-G su tipišku 8 nm galiuko kreivumo spinduliu. Bandinys AFM vaizdinimui buvo specialiai paruošiamas: po 30 minučių ir 3, 24, 50, 80 bei 130 valandų inkubacijos termostate 10 µL lizocimo tirpalas buvo skiedžiamas su D₂O (pD = 4.5, koreguotas su DCl) santykiu 1/10. Tuomet 20 µL atskiesto bandinio buvo paskleidžiama ant šviežiai paruošto žėručio paviršiaus ir inkubuojama 1 minutę. Po inkubacijos žėručio paviršius buvo nuplaunamas 1 mL Milli-Q vandeniu ir išdžiovinamas po švelniu azoto dujų srautu. Aukštos raiškos (1024 x 1024 pikselių) vaizdai buvo gaunami skenuojant paviršius 0.5 Hz greičiu ir vėliau apdorojant SPIP programine įranga.

2.1.3. Virpesinė suminio dažnio generacijos eksperimentinė sistema

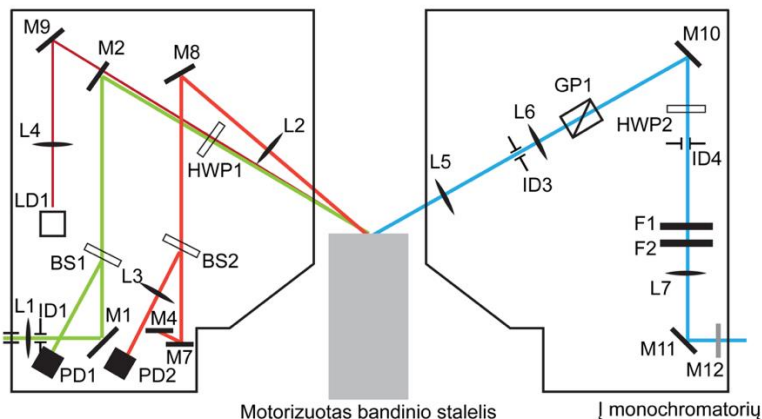
Tiriamajame darbe naudotas EKSPLA (Vilnius, Lietuva) pagamintas VSFG spektrometras, kurio veikimo schema pateikiama 2.2. paveiksle. Ši sistema paremta fiksuotos modos pikosekundiniu Nd:YAG lazeriu (PL2230), kuris generuoja 1064 nm bangos ilgio, 28 ps trukmės ir 30 mJ energijos impulsus, pasikartojančius 50 Hz dažniu. Dalis šios spinduliuotės energijos (8 mJ) panaudojama kaip optinis užkratas parametriniame stiprintuve (PG501) ir skirtuminio dažnio generatoriuje (DFG) norint gauti kintamo dažnio infraraudonuosius (IR) impulsus. Visi PG501/DFG esantys optiniai elementai yra pilnai motorizuoti ir sinchronizuoti, todėl infraraudonųjų spindulių bangos ilgį galima keisti tiesiogiai programinėje įrangoje įvedus norimą bangos dažnį. Ši sistema pasižymi plačiu infraraudonosios spinduliuotės dažnių ruožu apimančiu nuo 2,3 iki 10 μm , kurių impulso energija kinta intervale nuo 50-200 μJ . VSFG spektrometro spektrinė skyra yra apribota infraraudonosios šviesos bangos pločiu, kuris yra $\sim 6 \text{ cm}^{-1}$. Likusi dalis Nd:YAG lazerio spinduliuotės panaudojama antros harmonikos generatoriuje (H400) generuojant fiksuoto 532 nm bangos ilgio ir $\sim 350 \mu\text{J}$ energijos regimosios srities (VIS) impulsus.



2.2. paveikslas. Suminio dažnio spektrometro veikimo schema. PL2230 - fiksuotos modos pikosekundinis Nd:YAG lazeris; H400 – antros harmonikos generatorius; PG501/DFG – optinis parametrinis stiprintuvas kartu su skirtuminio dažnio generatoriumi; A/SFG – pavyzdėlio skyrius; MS2001 – MS2001 modelio monochromatorius.

Laike ir erdvėje sinchronizuoti fiksuoto bangos ilgio VIS ir kintamo bangos ilgio IR pluoštai yra nukreipiami ir sufokusuojami į bandinio paviršių, A/SDG skyriuje (žr. 2.3. paveiksle). Bandinio paviršiuje generuojamas suminio dažnio (SF) signalas nukreipiamas į monochromatorių (MS2001) už

kurio vyksta signalo registracija fotodaugintuvu (R7899 tipo PMT, Hamamatsu Photonics, Japonija).



2.3. paveikslas. Suminio dažnio generacijos spektrometro A/SDG detalizuota schema. L – lęšiai, ID – diafragmos, BS – pluošto dalikliai, M – veidrodžiai, HWP – pusės bangos ilgio plokštelės, GP – Glano prizmės, F – holografiniai filtrai, PD – piroelektriniai detektoriai, LD – lazerinis diodas.

Suminio dažnio generacijos spektrometro sistema valdoma LabVIEW programine įranga, kurios pagalba visų trijų sąveikoje dalyvaujančių spindulių (IR, VIS, SF) poliarizacija yra laisvai kontroliuojama. Tiriamajame darbe buvo naudojamos trys poliarizacijų kombinacijos, SSP (S-SF, S-VIS, P-IR), PPP ir PSP. Spektrai buvo registruojami skenavimo būdu: IR pluošto kintamas bangos ilgis buvo keičiamas su 1 cm^{-1} žingsniu, o kiekviename tokiaame žingsnyje apskaičiuojamas 200 suminio dažnio signalo impulsų vidurkis. Norint kompensuoti atsirandančias energijos fliktuacijas, visi spektrai buvo normalizuoti atsižvelgiant į infraraudonosios ir regimosios srities impulsų energijas, kurios buvo registruojamos piroelektriniais detektoriais tuo pačiu metu kaip ir generuojamas signalas.

2.1.4. Spektrinių juostų išskyrimas iš virpesinės suminio dažnio generacijos spektrų

Norint išgauti virpesinių juostų parametrus iš VSFG spektro yra būtinas spektro skaidymas į spektrines juostas. VSFG spektras gali būti aprašytas formule:

$$I_{VSFG} \propto \left| X_{NR}^{(2)} + X_R^{(2)} \right|^2 = \left| A_{NR} e^{-i\varphi_{NR}} + \sum_q \frac{A_q}{\omega_{IR} - \omega_q + i\Gamma_q} \right|^2 \quad (2.1.)$$

čia $X_{NR}^{(2)}$ ir $X_R^{(2)}$ atitinkamai yra nerezonansinis ir rezonansinis antros eilės netiesinis optinis jautris. A_{NR} ir φ_{NR} yra nerezonansinė amplitudė bei fazė, tuo tarpu A_q , ω_q ir Γ_q atitinkamai yra q-tojo rezonanso amplitudė, centrinis dažnis bei pusplotis.

Spektrinių juostų išskyrimui naudotas Matlab (versija R2021a, The Math Works Inc., JAV) „Curve Fitting Tool” programos plėtinys, leidžiantis be didesnių programavimo žinių aprašyti daugiakomponentį spektrą su visų parametrų vertėmis.

Tiriamajame darbe pateikti spektrai apdoroti Origin Pro 2021 (versija 9.8.0.200, OriginLab Corporation, JAV) programine įranga. Visi VSFG spektrai buvo sunormuojami atsižvelgiant į infraraudonosios ir regimosios srities impulsų energijas. Pasinaudojant spektrinio išskyrimo metu gautais parametrais, VSFG spektrų smailės buvo atvaizduojamos perskaičiuojant individualius smailių intensyvumus pagal (2.2.) formulę:

$$I_q = \left| \sum_q \frac{A_q}{\omega_{IR} - \omega_q + i\Gamma_q} \right|^2 \quad (2.2.)$$

2.1.5. Fosfolipidinių monosluoksnių formavimas bei baltymų įvedimas į tirpalą

Lipidiniai monosluoksniai VSFG eksperimentams buvo formuojami specialiose 40 mm skersmens tefloninėse celėse, kurios buvo įstatomos į individualiai joms pagamintą temperatūrinį valdiklį. Prieš kiekvieną eksperimentą tefloninė celė buvo užpildoma NoChromix tirpalu ir paliekama 30 minučių. Praėjus laikui, celė skalaujama gausiu kiekiu Milli-Q vandens, įstatoma į temperatūrinį valdiklį palaikantį 20 °C temperatūrą ir užpildoma 6 mL H₂O/D₂O. Norint kontroliuoti bandinio garavimą nepaveikiant paties eksperimento, temperatūros parametras buvo pasirenkamas atsižvelgiant į kambario temperatūrą (~22 ± 1 °C).

Eksperimentuose naudoti lipidai buvo ištirpinami 0,5 arba 1 mg/ml koncentracijos chloroforme. Tirpalo paskleidimui naudotas 50 µL Hamilton švirkštas, kuris prieš ir po tirpalo paėmimo būdavo praplaunamas chloroformu. Tinkamam lipido paskleidimui buvo stebimi paviršiaus slėgio pokyčiai, kuriuos registruodavo platinos strypu papildyta, komerciškai prieinama KSV NIMA sistema (Biolin Scientific, Švedija). Bendru atveju paviršiaus slėgis (π) yra išreiškiamas kaip $\pi = \gamma_0 - \gamma$, kur γ_0 yra oras/vanduo paviršiaus įtempis, o γ yra paviršiaus įtempis kartu su paviršiuje paskleistu

lipidu. Kiekvieno eksperimento metu paviršiuje paskleidus atitinkamą kiekį lipido skysčio, buvo palaukiama ~30 min kol monosluoksnius stabilizuosis ir pasieks pastovų paviršiaus slėgį.

Baltymų injekcija po lipidiniais monosluoksniais buvo vykdoma užrašius stabilizuoto monosluoksniu VSFG spektrus. Mikroadata 40 μL , 5 mg/mL koncentracijos baltymo tirpalo buvo suleidžiama po monosluoksne membrana. Tūrinė baltymo koncentracija matavimo celėje ~2,3 μM . Po injekcijos matavimo celė būdavo uždengiama ir paliekama stabilizuotis per naktį. Galutiniai adsorbuoto baltymo VSFG spektrai buvo užrašomi apytiksliai po 20 valandų nuo tirpalo suleidimo.

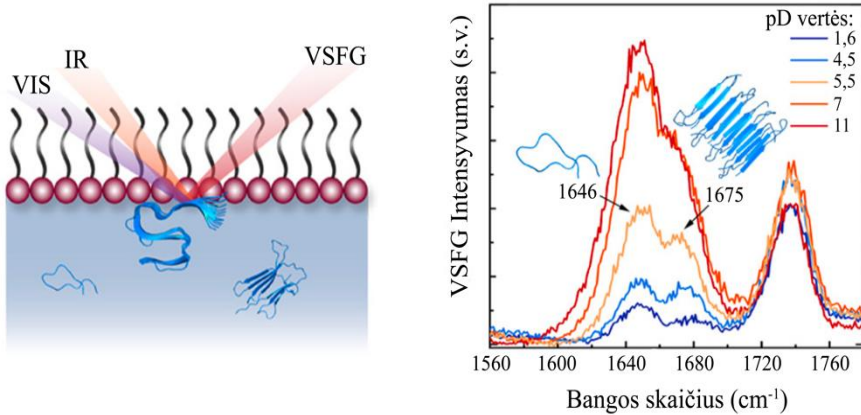
2.1.6. Kvantinės chemijos skaičiavimai DPPC hidrofilinės fosfato grupės fragmentui

Kvantinės chemijos skaičiavimai buvo taikomi susidūrus su problemomis eksperimentinių duomenų interpretacijoje. Teorinės struktūros modeliavimams bei kvantinės chemijos skaičiavimams naudota Gaussian programa skirta Windows operacinei sistemai (paketo versija G09W A.02).²¹⁸ Geometrijos optimizavimas, vandens įtaka ir dažnio skaičiavimai atlikti DFT metodu su B3LYP funkcionalu bei pasinaudojant 6-311++G(d,p) bazinių funkcijų rinkiniu H, C, O, N ir P atomams. Optimizuotam molekulių geometrijos atvaizdavimui bei pirminiams spektrinių juostų priskyrimams buvo naudota Chemcraft programa (versija 1.8). Kiekybiniam virpesinių atomų indėlio įvertinimui, atlikta potencinės energijos pasiskirstymo (PED) analizė taikant VEDA 4 programinį paketą.²¹⁹

2.2. Tyrimuose naudotos medžiagos

Vištos kiaušinio baltymo lizocimo milteliai (HEWL)	Sigma-Aldrich (Kanada), liofilizuoti, gauti SDS elektroforezės metodu, vienos grandinės molekulinė masė 14,3 kDa, grynumas $\geq 98\%$.
DOPG (C₄₂H₇₈O₁₀PNa)	Avanti Polar Lipids (JAV), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerolis), naudota be papildomo gryninimo, grynumas $\geq 98\%$;
DPPC-d0 (C₄₀H₈₀NO₈P)	Avanti Polar Lipids (JAV), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocholinas, grynumas $> 99\%$;
DPPC-d13 (C₄₀H₆₇NO₈PD₁₃)	Avanti Polar Lipids (JAV), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocholino-1,1,2,2-d ₄ -N,N,N-trimetil-d ₉ , grynumas $> 99\%$;
DPPC-d62 (C₄₀H₁₈NO₈PD₆₂)	Avanti Polar Lipids (JAV), 1,2-dipalmitoil-d ₆₂ -sn-glicero-3-fosfocholinas, grynumas $> 99\%$;
DPPC-d75 (C₄₀H₅₁NO₈PD₇₅)	Avanti Polar Lipids (JAV), 1,2-dipalmitoil-d ₆₂ -sn-glicero-3-fosfocholino-1,1,2,2-d ₄ -N,N,N-trimetil-d ₉ , grynumas $> 99\%$;
Dejonizuotas vanduo (H₂O)	Direct-Q3UV vandens valymo sistema (Merck, Vokietija) valomas Millipore vanduo ($\geq 18,2$ M Ω cm);
Sunkus vanduo (D₂O)	Sigma-Aldrich (Kanada), grynumas $\geq 99,9\%$;
Deuterio chlorido tirpalas (DCI)	Sigma-Aldrich (JAV), DCI 35 wt% sunkiame vandenyje (D ₂ O), $\geq 99\%$ D atomų;
Natrio deuteroksidas (NaOD)	Sigma-Aldrich (JAV), NaOD 40 wt% sunkiame vandenyje (D ₂ O), $\geq 99\%$ D atomų;
Natrio chloridas (NaCl)	Sigma-Aldrich (JAV), grynumas $\geq 99,5\%$;
Kalcio chloridas (CaCl₂)	Sigma-Aldrich (JAV), grynumas $\geq 99,5\%$;
Chloroformas (CHCl₃)	Sigma-Aldrich (Vokietija), grynumas 99–99,4%;
Amonio peroksodisulfatas (NH₄)₂S₂O₈	Penta (Čekijos respublika), grynumas $\geq 98\%$;
Sieros rūgštis (H₂SO₄)	Carl Roth (Vokietija), grynumas $\geq 95\%$;

III. VIŠTOS KIAUŠINIO BALTYMO LIZOCIMO AGREGATŲ, ADSORBUOTŲ ORAS/VANDUO BEI LIPIDAS/VANDUO FAZINĖSE RIBOSE, STRUKTŪRŲ NUSTATYMAS

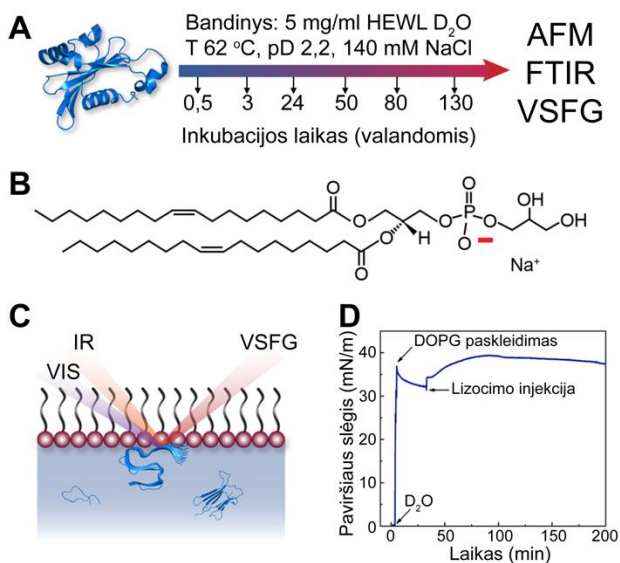


Pasinaudodami virpesine suminio dažnio generacijos (VSFG) spektroskopija atlikome struktūrinę vištos kiaušinio baltymo lizocimo (HEWL) analizę oras/D₂O bei DOPG/D₂O fazinėse ribose. Identifikavome, jog baltymo bei skirtingų jo agregatų adsorbcija oras/D₂O fazėje yra sąlygota šių struktūrų hidrofobiškumo. Adsorbcija DOPG/D₂O riboje yra paremta elektrostatinės sąveikos tarp įkrautų baltymo grupių ir lipido polinės fosfato grupės, tačiau neatmetamas ir hidrofobiškumo indėlis. Darbe pademonstruojama, jog abiejose fazinėse ribose adsorbuojasi ne tik denatūravusio baltymo fragmentai ar mažesni aiškios struktūros nesudarantys agregatai, bet ir paraleliai ir antiparaleliai β-klostytos baltyminės struktūros. Papildomai nustatėme, jog aplinkos pH pokyčiai gali veikti adsorbuojamų lizocimo struktūrų orientaciją DOPG/D₂O riboje.

3.1. Lizocimo agregavimas ir adsorbicija

Vištos kiaušinio baltymas lizocimas, kaip modelinis baltymas tyrime pasirinktas dėl gerai žinomos natyvos ir amiloidinių agregatų antrinės struktūros. Lyginant su rekombinantiniais peptidais, lizocimas yra pigus ir lengvai komerciškai prieinamas baltymas. Literatūroje pateikiamas platus agregacijos metodų ir protokolų pasirinkimas leidžiantis valdyti ir manipuluoti lizocimo fibrilių formavimosi procesus išvengiant greitos, nekontroliuojamos agregacijos reakcijos.

HEWL agregacijai vykdyti buvo pasitelkta rūgštinės aplinkos ir padidintos iki 62 °C temperatūros procedūra.¹⁴⁸ Baltymas buvo ištirpinamas D₂O pasiekiant 5 mg/mL koncentraciją. Į tirpalą papildomai įdedama 140 mM NaCl druskos ir įpilama 0,1 M DCl tirpalo sumažinant pD vertę iki 2,2. Paruoštas tirpalas filtruojamas su 0,22 μm PES membraniniu filtru (Corning, Vokietija) bei sonifikuojamas (veikiamas ultragarsu) vandens vonelėje ~15 minučių. Ši procedūra naudojama norint suskaldyti pradinius baltymo agregatus. Kontroliuojamai baltymo agregacijai inicijuoti tirpalas inkubuojamas 62 °C temperatūroje uždareme termostate be papildomo išorinio maišymo. Schematinis bandinio paruošimas pavaizduotas 3.1. A paveiksle.



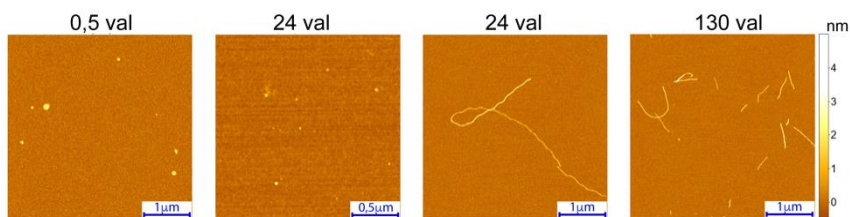
3.1. paveikslas. Bandinio paruošimo bei eksperimentinių procedūrų iliustracija (A). Molekulinė 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerolio) (DOPG) struktūra (B). Schematinė VSFG eksperimento iliustracija (C). Pavyzdinė paviršiaus slėgio kinetika po monosluoksnio suformavimo bei lizocimo injekcijos (D).

Tūryje besiformuojančioms baltymo struktūroms charakterizuoti pasitelkti AFM ir FTIR metodai. Iš anksto suformuotų lizocimo agregatų adsorbicijai stebėti skirtinguose paviršiuose buvo taikyta VSFG spektroskopija, kombinuota kartu su Langmuir monosluoksnių metodu (žr. 3.1. C ir D paveikslą). Tyrime suformuoti du skirtingomis savybėmis pasižymintys paviršiai: hidrofobinis oras/D₂O ir neigiamai įkrautas DOPG (cheminė struktūra pateikiama 3.1. B paveiksle) lipidinis monosluoksnis. Neigiamą krūvį turintys lipidai su PS hidrofiline galvute yra labiau paplitę žinduolių membranose, tačiau DOPG pasirinkimą lėmė paprastesnė PG grupės struktūra ir mažesnė krūvio variacija prie skirtingų pH verčių.

3.2. Rezultatai ir jų aptarimas

Lizocimo agregatų morfologija bei struktūra

Tam tikrais laiko momentais, po 0,5, 24 ir 130 valandų, iš inkubuojamo lizocimo tirpalo buvo paimami trys bandiniai. Pirmasis skirtas agregatų morfologijai bei lizocimo fibrilių susidarymui nustatyti pasinaudojant AFM. Antrasis – tirpalo tūryje susidariusių struktūrų identifikavimui pasinaudojant FTIR metodu. Trečiasis – baltymo agregatų adsorbicijos bei struktūros identifikavimui VSFG metodu. 3.2. paveiksle pateikiami 0,5, 24 ir 130 valandų inkubuo to lizocimo bandinio AFM vaizdai, o 3.1. lentelėje pateikiami matomų struktūrų aukščiai. Paskleidus 30 min inkubuo tą bandinį ant žėručio paviršiaus pastebimi maži oligomeriniai dariniai. Po ilgesnių 24 ir 130 val. inkubacijos laikų vaizduose matomos ~1,5-4 nm aukščio fibrilės, o 24 val. bandinyje išlieka pastebimos ir oligomerinės struktūros (žr. 3.1. lentelę).

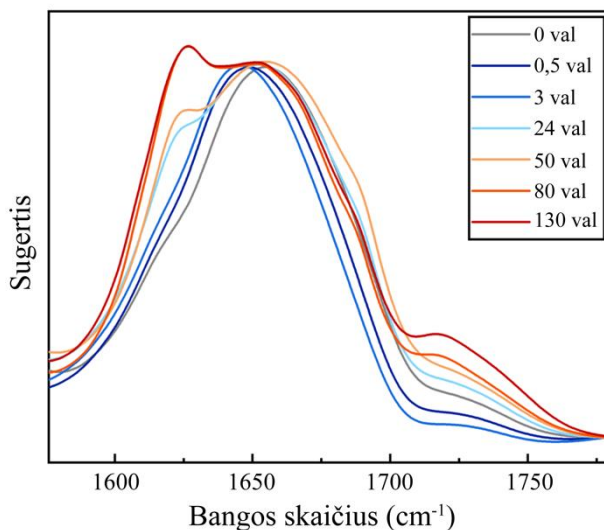


3.2. paveikslas. Skirtingą laiką (0,5; 24; 130 valandų) inkubuo tų lizocimo bandinių nusodintų ant žėručio paviršiaus AFM vaizdai.

3.1. lentelė. Informacija apie AFM vaizduose matomus baltymo agregatus.

Inkubacijos laikas	Agregatų tipas bei aukštis		
	Oligomerai	Oligomerai	Fibrilės
0,5 val		~2,5 nm	
24 val	0,8 – 1,5 nm	~2,5 nm	1,5 – 3 nm
130 val			1,5 – 4 nm

Bendru atveju AFM vaizdai suteikia informaciją, jog pradinis lizocimo bandinys yra sudarytas iš mažų oligomerinių struktūrų, tačiau agregacijos metu bandinys tampa nevienalyčiu ir jame galime registruoti tiek fibrilines tiek ir oligomerines struktūras. Šis pastebėjimas puikiai atspindi ankstesnius branduolių susidarymo kinetikos darbus, kuriose pademonstruojama, jog lizocimo agregacija vyksta hierarchiškai. Tokio tipo baltymo agregacija vyksta monomerinėms struktūroms jungiantis į oligomerines, iš kurių toliau formuojasi protofibrilės, o šioms kombinuojantis tarpusavyje gaunami gerokai kompleksiškesni fibriliniai junginiai.¹⁴² Nors atlikti AFM matavimai puikiai atspindi tipinę lizocimo agregaciją, tačiau būtina paminėti, jog 30 min ir 24 valandas inkubuotuose bandiniuose matomas mažų oligomerų atsiradimas gali būti sąlygotas tirpalo kontakto su žėručiu. Literatūroje nurodoma, jog tokio kontakto metu baltymo agregacija gali būti paspartinama.²²⁰ Pan su kolegomis taip pat nustatė, jog kontakto su žėručiu metu baltymas agreguoja net ir tada, kai tūrinė agregacija įprastai nevyktų.²²¹



3.3. paveikslas. Skirtingą laiką inkubuotų lizocimo bandinių, išdžiovintų azoto dujų srautu ant CaF₂ langelio, FTIR spektrai. Iš FTIR spektrų buvo pašalintas fonas, bei juostų intensyvumai sunormuoti ties 1650 cm⁻¹.

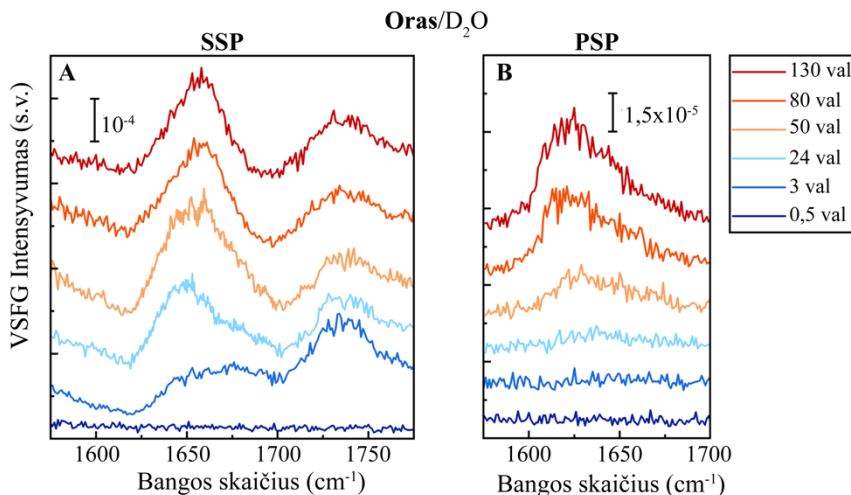
Atominės jėgos mikroskopija yra puikus metodas leidžiantis įvertinti susidariusių baltymų morfologiją, tačiau nieko nepasako apie jų struktūrą. Tuo tarpu FTIR spektroskopijos metodas leidžia įvertinti ne tik β-klostių kiekį baltymų agregatuose, bet ir išskirti juos į paraleliai ir antiparaleliai β-klostytus. Daugybė teorinių ir eksperimentinių darbų pademonstravo, jog paraleliai ir antiparaleliai β-klostytas struktūras galima diferencijuoti registruojant Amidas I virpesių sritį. Literatūroje nurodoma, jog paraleliai β-klostytos struktūros turi joms būdingą žemo dažnio juostą, esančią žemiau

1640 cm^{-1} , o antiparaleliai β -klostytoms struktūroms stebima papildoma aukšto dažnio juosta, esanti 1680 cm^{-1} srityje.^{222–224} Ankstesni FTIR lizocimo agregacijos tyrimai pademonstravo, jog priklausomai nuo baltymo inkubacijos sąlygų bei laiko, tirpale gali formotis paraleliai ir antiparaleliai β -klostyti agregatai.^{104,148} Pažvelgus į 3.3. paveikslą, matome skirtingą laiką inkubuoto lizocimo FTIR spektrus Amidas I virpesių regione. Šviežiai paruošto lizocimo bandinio FTIR spektras rodo plačią, ties $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ centruotą juostą, atitinkančią α -spiralinę struktūrą, kuri yra viena iš pagrindinių komponentų natyviame HEWL. Patalpinus bandinį 62 °C temperatūroje, per pirmas 3 valandas tampa pastebimas pagrindinės juostos poslinkis į žemesnius dažnius. Šis spektrinis pokytis siejamas su lizocimo natyvios struktūros pilnu išsiskleidimu.¹⁴¹ Inkubuojant baltymą 24 valandas spektre atsiranda dvi papildomos smailės: aiškiai išreikšta ties $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$ bei gerokai silpnesnė ties $\sim 1685 \text{ cm}^{-1}$. Šios smailės siejamos su struktūriniais baltymo pokyčiais, kurių metu ima daugėti antiparaleliai β -klostytų kompozitų. Esant ilgesniems inkubacijos laikams žemo dažnio smailė tampa labiau išreikšta. Šiuo atveju tai siejama su paralelinių β -klostytų struktūrų pagausėjimu. Nepaisant to, jog 30 minučių inkubuoto bandinio AFM vaizduose galime matyti mažas oligomerines struktūras, tačiau FTIR spektras net ir po 3 valandų, jokių agregacijos pokyčių nerodo. Tikėtina, jog tirpale susiformavusių agregatų koncentracija yra per maža norint jas aptikti FTIR spektroskopijos pagalba. Kartu su inkubacijos laiku, aukštame dažnyje ima ryškėti juosta ties $\sim 1725 \text{ cm}^{-1}$, kuri kyla iš protonuotų asparto ($\nu(\text{C}=\text{O})$) ir glutamo ($\nu(\text{C}=\text{O})$) aminorugščių šoninių grandinelių sugerties.²²⁵ Neįprastai žemas šios juostos dažnis leidžia manyti, jog tarp grupių yra susidarę vandeniliniai ryšiai. Tyrimais buvo pademonstruota, jog vandenilniais ryšiais nesaistomo $\nu(\text{C}=\text{O})$ virpesio dažnis lokalizuojasi 1770-1780 cm^{-1} srityje ir formavimosi metu gali pasislinkti iki 1700-1725 cm^{-1} .²²⁶

Lizocimo agregatų struktūra fazinėse ribose oras/D₂O ir DOPG/D₂O

Lizocimo agregatų adsorbicijai bei adsorbuotų struktūrų nustatymui fazinėse ribose oras/D₂O ir DOPG/D₂O buvo pasitelkta virpesinė suminio dažnio spektroskopija. Maža dalis (40 μL , 5 mg/mL koncentracijos) lizocimo tirpalo buvo suleidžiama po fazine riba, taip pasiekiant bendrą $\sim 2,3 \mu\text{M}$ tūrinę koncentraciją. Dėl tokio praskiedimo pakinta bandinio rūgštingumas iš pD 2,2 pakyla iki pD $\simeq 4,5$. Adsorbicija, po baltymo tirpalo injekcijos, yra stebima realiu laiku taikant paviršiaus slėgio registravimo sistemą KSV Nima. VSFG spektrai buvo registruojami kai paviršiaus slėgio sistemos rodmenys pasiekdavo stabilias vertes. Iš pradžių buvo atlikti lizocimo bei jo agregatų

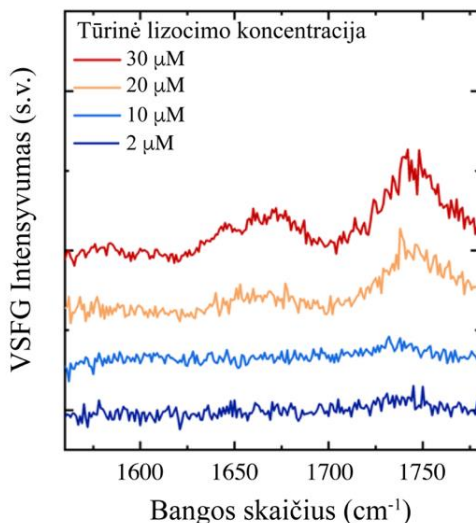
adsorbcijos tyrimai oras/D₂O fazinėje riboje. Skirtingą laiką 62 °C laipsnių temperatūroje inkubuotų ir po fazine riba injekuotų bandinių VSFSG spektrai užregistruoti SSP ir PSP spindulių poliarizacijų kombinacijose atitinkamai pateikiami 3.4. A ir B paveiksluose. Matomas Amidas I signalas SSP spindulių kombinacijoje patvirtina, jog adsorbcijos metu į paviršių iškyla baltyminės struktūros, tačiau įvertinti ar tai agregavęs baltymas, pagal šią poliarizacijų kombinaciją – negalime. Tuo tarpu chiralinėje PSP spindulių poliarizacijos kombinacijoje išryškėjantis signalas suteikia papildomą informaciją, jog į paviršių adsorbuojami agregatai yra su jiems būdinga β-klostyta struktūra.^{192,197}



3.4. paveikslas. Skirtingą laiką 62 °C temperatūroje inkubuoto lizocimo ir jo agregatų, adsorbuotų ties oras/D₂O fazine riba, VSFSG spektrai užrašyti SSP (A) ir PSP (B) spindulių poliarizacijų kombinacijose.

Alahverdžievos su kolegomis taikydami elipsometrijos matavimus atskleidė, jog esant minimaliai 10^{-7} M tūrinei lizocimo koncentracijai, sėkmingai vyksta baltymo adsorbcija oras/vanduo fazinėje riboje.²²⁷ Tyrimo metu ~2 kartus padidinus tūrinę lizocimo koncentraciją, po 30 minučių bandinio agregacijos VSFSG spektruose (SSP ir PSP) signalo vis dar nebuvo. Gautas rezultatas nurodo, jog ~2,3 μM tūrinė koncentracija yra per maža norint užregistruoti pradinius lizocimo bei jo agregatų VSFSG spektrus. Adsorbatų kiekis taip pat buvo nepakankamas inicijuoti paviršiaus slėgio pokyčius (žr. P3.1.A paveikslą priede). Norint įsitikinti, ar maža koncentracija gali lemti signalo nebuvimą, buvo užrašyti to paties bandinio VSFSG spektrai, esant ~30 μM tūrinei koncentracijai (žr. 3.5. paveiklą). Šiuo atveju VSFSG signalas SSP poliarizacijoje ryškiai matomas. Nepaisant to, tolimesniems matavimams mažesnė koncentracija buvo pasirinkta dėl keletos svarbių priežasčių. (i)

Perteklinis baltymo kiekis gali apriboti adsorbuojamas struktūras, t.y. didesnis natyvių ar betvarkių struktūrų kiekis paviršiuje gali išotinti paviršių ir taip sumažinant baltymo agregatų adsorbciją. (ii) Esant didelei baltymo koncentracijai gali adsorbuotis net keli lizocimo bei jo agregatų sluoksniai. Dėl skirtingų sluoksnių VSFG signalų interferencijos, iškreipiama bendro signalo forma. (iii) Sumažinant lizocimo adsorbciją natyvioje ir/ar betvarkėje struktūroje, tampa paprastesnis su agregatais sietinų spektrinių juostų identifikavimas.

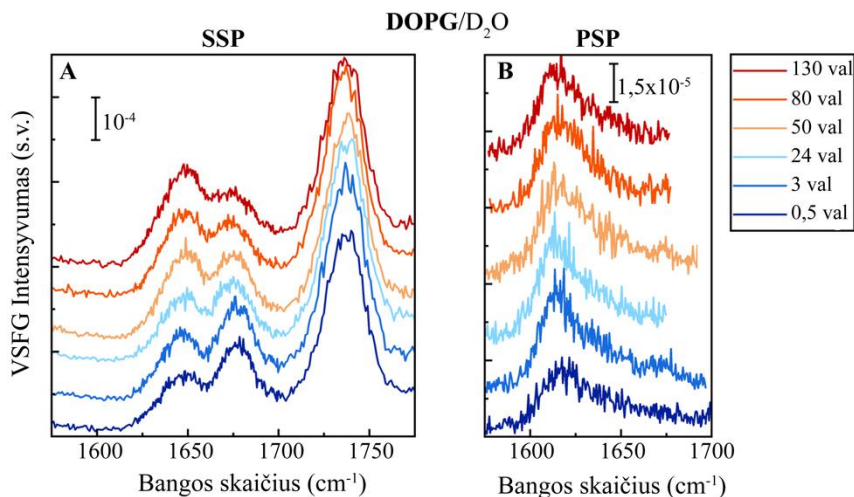


3.5. paveikslas. 30 minučių inkubuoto lizocimo tirpalo, adsorbuoto oras/D₂O fazinėje riboje, VSFG spektrai SSP spindulių poliarizacijų kombinacijoje esant skirtingoms tūrinėms koncentracijoms (žr. legendoje).

VSFG signalas SSP poliarizacijoje pradeda ryškėti po 3 ir 24 valandų bandinių inkubacijos, tačiau PSP poliarizacijoje signalo nėra. Signalas centruotas ties $\sim 1622 \text{ cm}^{-1}$ atsiranda tik po 50 valandų inkubacijos ir ilgiau inkubuojant bandinį intensyvumas pastoviai didėja. Atitinkamai SSP poliarizacijos atveju pastebimos dvi juostos: pirmoji labai asimetriška ir centruota ties $\sim 1650\text{--}1655 \text{ cm}^{-1}$ bei antroji ties $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$ galimai kylanti iš asparto ir glutamo amino rūgščių šoninių grupių $\nu(\text{C}=\text{O})$.

Tuo tarpu lizocimo bei jo agregatų adsorbuotų DOPG/D₂O fazinėje riboje spektrai (žr. 3.6. A ir B paveiksluose) atrodo visiškai kitaip, lyginant juos su oras/D₂O fazine riba. Galime atkreipti dėmesį, jog VSFG signalas abiejose spindulių poliarizacijų kombinacijose (SSP ir PSP) yra matomas net po 30 minučių bandinio agregacijos. SSP spektre išryškėja dvi mažesnio intensyvumo juostos ties ~ 1645 ir $\sim 1675 \text{ cm}^{-1}$, atitinkančios baltymo ir jo

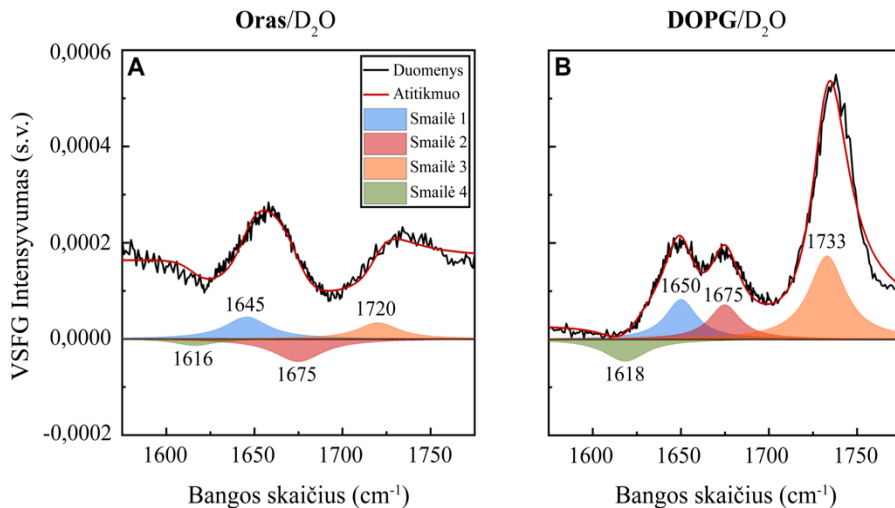
agregatų virpesius. Kiek didesnio intensyvumo juosta ties $\sim 1734 \text{ cm}^{-1}$, atsiranda dėl paviršiuje paskleisto DOPG lipido karbonilo grupės (C=O) virpesio. Nepriklausomai nuo lizocimo agregacijos laiko, juostos išlieka ~ 1645 ir $\sim 1675 \text{ cm}^{-1}$ spektro srityse ir yra stebimi tik minimalūs juostų intensyvumo pokyčiai. Tuo tarpu PSP spektruose matoma tik viena juosta, centruota ties $\sim 1618 \text{ cm}^{-1}$, kurios intensyvumas priklausomai nuo baltymo inkubacijos laiko, nežymiai kinta.



3.6. paveikslas. Skirtingą laiką, $62 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, inkubuoto lizocimo ir jo agregatų, adsorbuotų ties DOPG/D₂O fazinė riba, VSF spektrai užrašyti SSP (A) ir PSP (B) spindulių poliarizacijų kombinacijose.

Palyginus oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėse ribose adsorbuotų lizocimo bei jo agregatų VSF spektrus, galime matyti akivaizdžius skirtumus. Pavyzdžiui, 80 valandų agreguoto lizocimo VSF spektrai (žr. 3.7. paveikslą) PSP poliarizacijoje atrodo beveik identiški. Iš to galima daryti išvadą, jog ties abiem paviršiais yra adsorbuojami struktūriškai panašūs agregatai. Tačiau SSP spektrai turi ryškių skirtumų: oras/D₂O paviršiaus atveju matoma viena juosta, centruota ties $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$, tuo tarpu DOPG/D₂O paviršiuje – dvi smailės ties ~ 1645 ir 1675 cm^{-1} . Norint išanalizuoti ir suprasti šiuos spektrinius skirtumus, reikia atsižvelgti į tai, jog VSF signalas – proporcingas antros eilės netiesinio optinio jautrio kvadratui $\chi^{(2)}$, yra visų registruojamų virpesių suma (žr. 1.8 ir 1.9. lygtyse). Kiekvienas virpesys yra aprašomas $\chi_{Rq}^{(2)}$ nariu, susidedančiu iš realios ir menamos dalies (žr. 1.10. lygtyje), kurios interferuodamos tarpusavyje generuoja bendrą VSF signalą. Taip pat galutiniam užregistruotam VSF signalui įtakos turi ir

nerezonansinis $\chi_{NR}^{(2)}$ narys (žr. 1.9. lygtyje). Taigi registruojamo VSFG signalo forma gali smarkiai pakisti dėl virpesių tarpusavio interferencijos, interferencijos su nerezonansiniu atsaku ir dėl registruojamo $\chi^{(2)}$ kvadrato.²²⁸ Norint nustatyti tikslias virpesines juostas būtinas spektriną sudarančių juostų išskyrimas taikant 2.1. formulę.



3.7. paveikslas. VSFG spektrai 80 val. inkubuoto lizocimo ir jo agregatų, adsorbuotų ties oras/D₂O (A) ir DOPG/D₂O (B) fazinėmis ribomis, SSP spindulių poliarizacijos kombinacijoje. Kartu vizualizuotos ir spektrinių juostų išskyrimo metu gautos smailės.

3.2. lentelė. Spektrinių juostų išskyrimo metu gauti smailių parametrai 80 val. inkubuoto lizocimo, adsorbuoto ties oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėmis ribomis, spektrams.

Oras/D₂O	$\chi_{NR}^{(2)}$	φ_{NR}	A_{NR}	
		2,83	0,4	
	$\chi_R^{(2)}$	ω_q, cm^{-1}	A_q	Γ_q, cm^{-1}
	Smailė 1	1646	2,15	15
	Smailė 2	1675	-2,51	17
Smailė 3	1720	1,52	14	
Smailė 4	1616	-0,59	14	
DOPG/D₂O	$\chi_{NR}^{(2)}$	φ_{NR}	A_{NR}	
		2,02	0,17	
	$\chi_R^{(2)}$	ω_q, cm^{-1}	A_q	Γ_q, cm^{-1}
	Smailė 1	1650	2,8	11
	Smailė 2	1675	2,4	11
Smailė 3	1734	6,83	13	
Smailė 4	1618	-2,1	15	

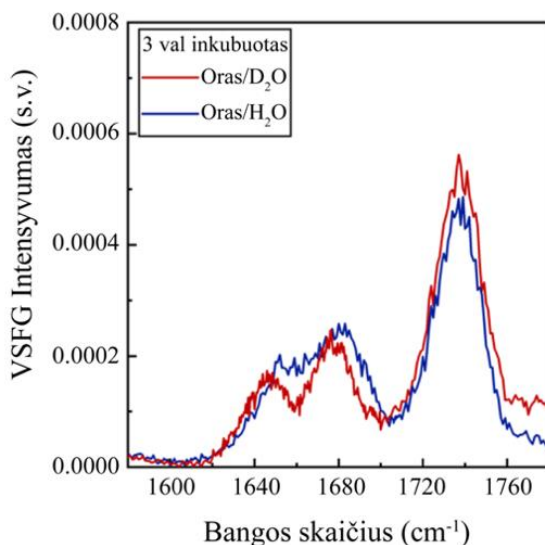
Spektrinių juostų išskyrimo metu gautos smailės pademonstruotos 3.7. paveiksle. Smailių parametrai pateikiami 3.2. lentelėje. Abejų fazinių ribų atveju 80 valandų agreguoto lizocimo bandinio spektruose yra reikalingos bent 4 smailės norint užtikrinti gerą duomenų atitikimą. Oras/D₂O fazinės ribos atveju Amidas I spektrinę sritį sudaro 3 juostos: 1645 cm⁻¹ bei dvi priešingai orientuotas smailės ties ~1616 ir 1675 cm⁻¹. Taip pat spektre matoma ir juosta ties ~1720 cm⁻¹ atitinkanti valentinį asparto ir glutamo amino rūgščių šoninių grandinių virpesį $\nu(\text{C}=\text{O})$. Nepaisant to, kad VSFG spektras DOPG/D₂O fazinės ribos atveju stipriai skiriasi nuo oras/D₂O fazinės ribos spektro, pažvelgus į atskiras juostas, galime pastebėti, jog Amidas I virpesių regionas abiem atvejais yra sudarytas iš labai panašaus dažnio juostų (1618, 1650 bei 1675 cm⁻¹ DOPG/D₂O atveju). Taip pat VSFG spektre DOPG/D₂O atveju matoma didesnio intensyvumo juosta ties ~1734 cm⁻¹, kuri kyla iš DOPG lipido hidrofiliinės galvutės C=O virpesio.

Amidas I spektrinėje srityje matomų juostų priskyrimai suteikia informacijos apie oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėse ribose adsorbuotas lizocimo struktūras. Yra žinoma, jog antiparalelinės β -klostytos struktūros gali turėti iš viso tris VSFG aktyvias virpesines modas: B₁ ties ~1685 cm⁻¹, B₂ ties ~1630 cm⁻¹ bei B₃ ties ~1720 cm⁻¹.²¹⁶ Tuo tarpu paralelinės β -klostytos struktūros gali turėti tik dvi: A ties ~1660 cm⁻¹ ir B ties ~1620 cm⁻¹.¹⁹⁵ β -klostytų struktūrų spektrai gali būti selektyviai užrašomi pasinaudojant chiralinėmis spindulių poliarizacijų kombinacijomis (SPP, PSP ar PPS), o tai padeda atskirti jas nuo α -spiralinių ar betvarkių struktūrų, kurios chiraliniuose spektruose nėra aktyvios. Be to, tarpusavyje antiparaleliai ir paraleliai β -klostytos struktūros gali būti atskiriamos pagal aukšto dažnio smailę (>1685 cm⁻¹), kuri būdinga tik antiparalelinėms β -klostėms. Toks struktūrų išskyrimas pasinaudojant VSFG buvo įrodytas ir eksperimentiškai. Fu su kolegomis tirdami žmogaus kasos salelių amiloido polipeptidą (hIAPP), kuris adsorbuotas prie lipidinių paviršių formuoja paraleliai β -klostytas struktūras, identifiko dvi virpesines juostas ties ~1622 ir 1660 cm⁻¹.¹⁸⁷ Tuo tarpu Wang su kolegomis pademonstravo, jog LKLKLLK aminorūgščių peptidas, kuris oras/vanduo fazinėje riboje formuoja antiparaleliai β -klostytas struktūras, turi būdingą Amidas I B₂ virpesinę modą ties ~1619 cm⁻¹.¹⁹⁶ Tyrimai su tachipirinu I, formuojančiu antiparaleliai β -klostytas struktūras, demonstravo juostas ties ~1685 cm⁻¹ SSP, bei ~1634 cm⁻¹ PSP VSFG spektruose.¹⁹⁸

3.3. Lentelė. Fazinėse ribose oras/D₂O ir DOPG/D₂O adsorbuotų lizocimo bei jo agregatų VSFG spektrų dažnių priskyrimas.

Bangos skaičius, cm ⁻¹				
Oras/D ₂ O		DOPG/D ₂ O		Priskyrimas
SSP	PSP	SSP	PSP	
1616	1622	1618	1618	Antiparalelinės arba paralelinės β-klostės
1645	-	1650	-	Betvarkės struktūros
1675	-	1675	-	Antiparalelinės β-klostės

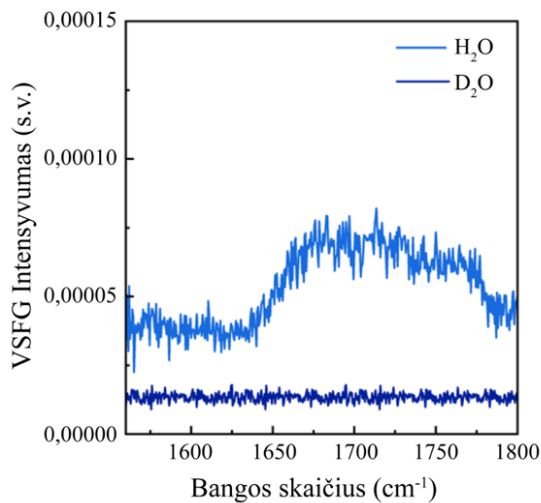
Struktūrizuotas VSFG juostų priskyrimas pateikiamas 3.3. lentelėje. Spektrų smailę ties ~1646–1650 cm⁻¹ priskyrimė aiškios tvarkos neturinčioms lizocimo struktūroms ir mažiems agregatams. Smailė ties ~1616–1618 cm⁻¹ atvaizduoja tiek paralelines tiek antiparalelines β-klostes, kai juosta ~1675 cm⁻¹ spektre priklauso tik antiparaleliai β-klostytoms struktūroms.



3.8. paveikslas. 3 valandas inkubuoto lizocimo tirpalo, adsorbuoto oras/D₂O ir oras/H₂O fazinėse ribose, VSFG spektrai SSP spindulių poliarizacijos kombinacijoje.

Palyginus su kitų darbų rezultatais (~1685 cm⁻¹), identifikuota spektrinė juosta, sietina su antiparalelinėmis struktūromis, pasižymi žemu dažniu.^{41,148,214,216,225,229} Tokius skirtumai galėjo lemti tyrime naudotas tirpiklis – sunkus vanduo. Norint tuo įsitikinti buvo atliekami papildomi matavimai, registruojant 3 valandas agreguoto lizocimo adsorbciją DOPG/H₂O fazinėje riboje. Gauti spektrai patvirtina, jog pakeitus tirpiklį į H₂O, DOPG/D₂O riboje

aiškiai išsiskyrusios smailės ties $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ ir $\sim 1675\text{ cm}^{-1}$ susilieja į vieną bendrą juostą (žr. 3.8. paveikslą). Užregistravus oras/ H_2O fazinės ribos VSFG spektrus aiškiai matoma ties $\sim 1655\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ esančios H_2O deformacinės moda (žr. 3.9. paveikslą). Spektuose atsirandanti interferencija apsunkina adsorbuoto baltymo juostų išskyrimą, tačiau antiparalelinių β -klosčių juosta ties $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ geriau sutampa su ankstesniuose VSFG darbuose publikuotais rezultatais.

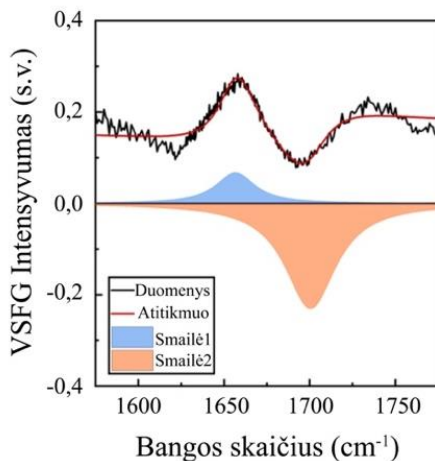


3.9. paveikslas. Oras/ H_2O ir oras/ D_2O fazinių ribų VSFG spektrai SSP spindulių poliarizacijos kombinacijoje.

Rzeznicka su kolegomis atliko analogiškus lizocimo agregacijos VSFG tyrimus, kurie parodė, kad agregacija gali būti sąlygota silpnai rūgštinės aplinkos (pH 6) ir sąveikos su DPPG/ D_2O fazine riba.⁴¹ Juostą 1685 cm^{-1} , atsirandančią SSP spektuose, autoriai priskyrė antiparalelinėms β -klostėms.⁴¹ Visgi mūsų darbuose stebimą ir išliekantį $\sim 10\text{ cm}^{-1}$ dažnio nesutapimą, galėjo lemti skirtingų antiparaleliai β -klostytų fibrilinių struktūrų formavimasis. Rzeznicka atliktas eksperimentas įrodė, kad lizocimo agregaciją paskatina šio baltymo sąveika su lipidais, kuomet HEWL fibrilės formuojasi iš pilnos baltymo aminorūgščių sekos. Mūsų atliktų tyrimų metu, esant padidintai temperatūrai bei rūgštinei aplinkai, vyksta negrįžtama baltymo hidrolizė, kurios metu lizocimas suskyla į amiloidogeninius 49–101 ir 53–101 aminorūgščių fragmentus ir galutinai agreguojasi.

Atliktas VSFG spektrų spektrinių juostų išskyrimas, abiejų fazinių ribų atveju, atskleidžia, jog Amidas I virpesių regionas susideda iš trijų smailių, kurių orientacija ir indėlis į spektrą skiriasi. Svarbu paminėti, jog spektrinių juostų išskyrimo metodas nėra unikalus, tai įrodo mūsų atveju analizuoti

oras/D₂O fazinės ribos VSFG spektrai. Keisdami smailių orientaciją bei jų padėtį, galime gauti daugiau nei vieną puikų spektro atitikmenį, tad dėl šios priežasties smailių intensyvumo kiekybinis įvertinimas tampa subjektyviu ir labai dviprasmišku. Nepaisant to, VSFG Amidas I virpesių spektrams, oras/D₂O fazinėje riboje, negali būti pasiekti geri atitikmenys pasinaudojant tik viena smaile. Patenkinamam atitikmeniui yra reikalingos bent dvi priešingai orientuotos smailės (žr. 3.10. paveikslą).



3.10. paveikslas. VSFG spektrai 80 val. inkubuoto lizocimo tirpalo, adsorbuoto ties oras/D₂O fazine riba, SSP spindulių poliarizacijos kombinacijoje, kartu su spektrinių juostų išskyrimu, pasinaudojant dviem smailėm Amidas I virpesių regione.

Adsorbciją nulemiančios sąveikos

Norint suprasti spektruose pastebimus adsorbcijos kinetikos skirtumus oras/D₂O bei DOPG/D₂O fazinėse ribose, turime nustatyti adsorbcijos priežastis. Bendru atveju yra išskiriamos keturios pagrindinės adsorbciją lemiančios, varančiosios jėgos: elektrostatika, hidrofobika, Van der Waalso sąveika ir vandenilinių jungčių susidarymas. Iš prigimties, vandens paviršius yra laikomas hidrofobiniu. Tokiame paviršiuje baltymo agregatai gali nukreipti dalį savo hidrofobinių aminorūgščių į orą, taip eliminuojant jų kontaktą su vandeniu ir to pasekoje sumažinant bendrą sistemos energiją. Tuo tarpu visos krūvį turinčios tiek baltymo, tiek jo agregatų grupės yra linkusios būti hidratuojamos vandens tūryje. Būtent šių jėgų pusiausvyra ir nulemia ar baltymas ir jo agregatai bus adsorbuojami oras/vanduo fazinėje riboje, ar liks hidratuoti vandens tūryje.

Pansieri su kolegomis savo tyrimais pademonstravo, jog baltymo agregatų krūvis bei hidrofobiškumas kinta viso agregacijos proceso metu.²³⁰ Pradėjus formotis agregatams vis daugiau ir daugiau hidrofobinių aminorūgščių

lokalizuojasi ant susidarančio agregato paviršiaus. Tuo tarpu visos krūvį turinčios grupės formuoja jungtis, kurios prilaiko ir stabilizuoja β -klostytą struktūrą, arba yra ekranuojamos agregato viduje. Tokiu atveju, didėjantys baltymo agregatai savo paviršiuje turi daugiau hidrofobinių, nei krūvį turinčių grupių, kurios yra nukreiptos į aplinką.

Mūsų tyrime gauti oras/D₂O paviršiaus duomenys (žr. 3.4. A ir B paveikslus) padėjo nustatyti, jog po 30 minučių baltymo inkubacijos, kai baltymas vis dar yra savo natyvioje arba daliniai išsivyniojusioje būsenoje, VSFG signalas nėra generuojamas. Lizocimo pI (izoelektrinis taškas) yra ~10,5, taigi mūsų matavimo sąlygomis, kai pD = 4,5, jo bendras krūvis – teigiamas. Tokiu atveju, įkrautos baltymo grupės su vandens molekulėmis sudaro vandenilinius ryšius. Šios sąveikos metu gaunama energija viršija energiją reikalingą hidrofobinėms grupėms solvatuoti, tad baltymas lieka hidratuotas vandens tūryje. AFM ir FTIR metodikos parodo, jog 30 minučių inkubuotame bandinyje jau aptinkamos mažos oligomerinės struktūros, tačiau jų koncentracija oras/D₂O fazinėje riboje yra per maža, kad jas būtų galima užregistruoti taikant VSFG ir paviršiaus įtempio metodus.

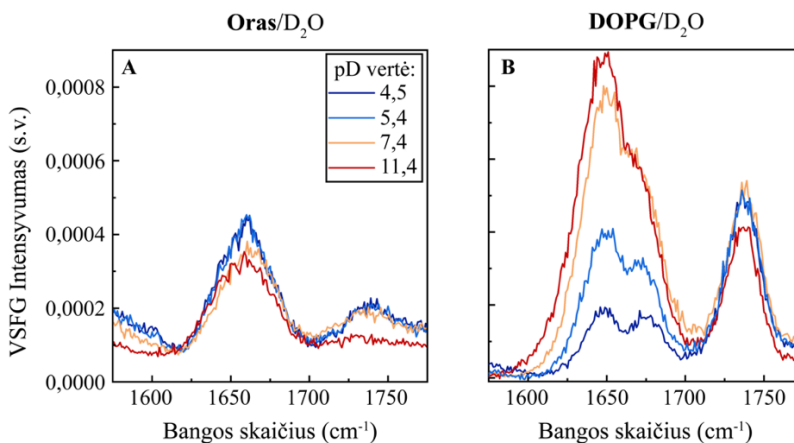
VSFG SSP poliarizacijos spektruose spektrinės juostos atsiranda baltymą inkubavus 3 ir 24 valandas, tais pačiais laiko momentais PSP poliarizacijoje signalas nėra gaunamas. Tai leidžia daryti prielaidą, jog tam tikri agregatai yra adsorbuojami, tačiau šios struktūros nėra tvarkingai β -klostytos. Stebimi spektrai galimai atitinka pilnai denatūravusį baltymą arba kiek mažesnius agregatus tokius kaip dimerai, trimerai bei kt. Dideli agregatai, turintys gerokai daugiau hidrofobinių grupių savo struktūros paviršiuje, formuojasi po ilgesnių (≥ 50 val.) baltymo inkubacijos laikų. Intensyvus PSP signalas nurodo, kad tokios struktūros lengvai adsorbuojasi oras/D₂O fazinėje riboje, o agregatams yra būdinga tvarkingai β -klostyta struktūra.

Visiškai kitokio pobūdžio baltymo bei jo agregatų adsorbcija yra stebima DOPG/D₂O fazinėje riboje (žr. 3.6. A ir B paveikslus). Priklausomai nuo terpės pH, sistema pasižymi paviršiniu krūviu ir elektrostatinė sąveika tarp lipido ir baltymo yra kritinis adsorbciją lemiantis veiksnys. Mūsų eksperimento sąlygomis, kai pD = 4,5, lipidinis monosluoksnis yra įkrautas neigiamai, tuo tarpu lizocimas kartu su savo agregatais pasižymi bendru teigiamu krūviu. Stebimas VSFG signalas ne tik SSP poliarizacijos kombinacijoje, bet ir PSP spektruose rodo, jog šis paviršius iš 30 minučių agreguoto tirpalo geba adsorbuoti ne tik aiškios struktūros neturintį ar mažus netvarkingus agregatus suformavusį baltymą, bet ir didesnius agregatus su tvarkingai β -klostyta struktūra. Visais atvejais DOPG/D₂O paviršiuje yra stebima stiprios elektrostatinės sąveikos nulemta baltymo adsorbcija.

Nepaisant daugybės HEWL baltymo agregacijos tyrimų yra tik keli mums žinomi moksliniai darbai, kurie ištyrė iš anksto suformuotų lizocimo agregatų adsorbciją lipidais/vanduo fazinėje riboje. Yudintseva su kolegomis pasinaudojant Langmuir monosluoksnių metodika nustatė, jog HEWL fibriliniai agregatai pasižymi gerokai didesniu afinitetu adsorbuojantis bei įsiskverbiant į lipidinį monosluoksnį, lyginant su baltymais savo natyvioje būsenoje.²³¹ Šis rezultatas sutampa su mūsų pastebėjimais, jog 30 minučių inkubuoto baltymo tirpale aptinkamas nedidelis kiekis agregatų adsorbuojasi prie lipidinio monosluoksniu. Minėtame tiriamajame darbe buvo pademonstruota, jog HEWL fibrilės pasižymi membraną ardančiu poveikiu. C-H virpesių regiono VSFG spektre nustatėme, jog po 20 valandų agreguoto baltymo adsorbcijos, DOPG monosluoksnis tapo mažiau tvarkingas (žr. P3.2. paveikslas). Įdomu tai, jog Hirano su kolegomis atliktų tyrimų metu buvo pademonstruotas lizocimo fibrilių destruktinis poveikis ne tik neigiamą krūvį turinčioms, bet ir neutralioms liposomoms.¹⁴⁹ Šis pastebėjimas įrodo, jog adsorbciniam procesui hidrofobinė sąveika yra nemažiau svarbi nei elektrostatinė. Patvirtinant šią teoriją, mums pavyko pademonstruoti, jog lizocimo agregatai gali adsorbuotis prie DOPG monosluoksniu net tada, kai baltymo bei jo agregatų krūvis yra stipriai sumažinamas.

Baltymo krūvio įtaka adsorbcijai

Elektrostatinės jėgos poveikį adsorbcijai galima iširti sistemingai keičiant lizocimo ir jo agregatų krūvį, kuris priklauso nuo tirpalo rūgštingumo. Šiuo tikslu, pridėdant atitinkamą kiekį 0,1 M NaOD, buvo keičiamas sunkaus vandens pD nuo 4,5 iki 11,4. Pasiekus norimą pD ant šio tirpalo buvo suformuojamas DOPG monosluoksnis ir po juo suleidžiamas agreguoto lizocimo bandinys. Mūsų naudoto lipido pK_a vertė yra ~3. Viršijant šią vertę lipidai įgauna neigiamą krūvį, o pasiekus pD 4,5 krūvis tampa maksimalus. Toliau mažinamas rūgštingumas lipido krūviui įtakos nedaro. Tuo tarpu didinamos pD vertės, akivaizdžiai pakeičia lizocimo, kurio $pI \approx 10,5$, krūvį: iš teigiamai įkrauto (pD 4,5) tampa silpnai neigiamu (pD 11,4). Po 80 valandų inkubacijos lizocimo bei jo agregatų adsorbuotų oras/D₂O bei DOPG/D₂O fazinėse ribose VSFG spektrai, esant skirtingoms pD vertėms, pateikiami 3.11. A ir B paveiksluose. Oras/D₂O fazėje Amidai I spektriniame regione matomas minimalus intensyvumo sumažėjimas, tuo tarpu kiek ryškesni pokyčiai stebimi ties ~1730 cm⁻¹. Juosta silpnai matoma, kai matavimai vykdomi esant pD 11,4 – tokį rezultatą sąlygoja asparto ir glutamo šoninių grandinių deprotonacija.



3.11. paveikslas. VSF spektrai 80 val. inkubuoto lizocimo tirpalo, adsorbuoto ties oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėmis ribomis, SSP spindulių poliarizacijos kombinacijoje esant skirtingoms pD vertėms.

VSF spektro intensyvumas DOPG/D₂O fazėje, keičiant pD vertes, drąstiškai pakinta. Amidas I srityje (1650 ir 1675 cm⁻¹) juostų intensyvumas didėja kartu su pD verte, tuo tarp lipidui priklausanti juosta ties ~1730 cm⁻¹ išlieka pastovi. Įdomu tai, jog visais adsorbcijos atvejais matuojant paviršiaus įtempį, prie skirtingų pD verčių, paklaidų ribose yra pasiekiamas pastovus paviršiaus įtempio matas (žr. P3.1. D paveikslą priede). Tad jeigu DOPG/D₂O fazinės ribos atveju baltymo adsorbcija būtų sąlygota vien tik elektrostatinės sąveikos, būtų galima tikėtis paviršiaus adsorbatų kiekio sumažėjimo, dėl lizocimo bei jo agregatų krūvio neigiamėjimo. Tačiau P3.1. D paveiksle matomas paviršiaus įtempio kitimo grafikas rodo, jog adsorbatų kiekis paviršiuje, pasiekus įsotinimą, praktiškai nekinta.

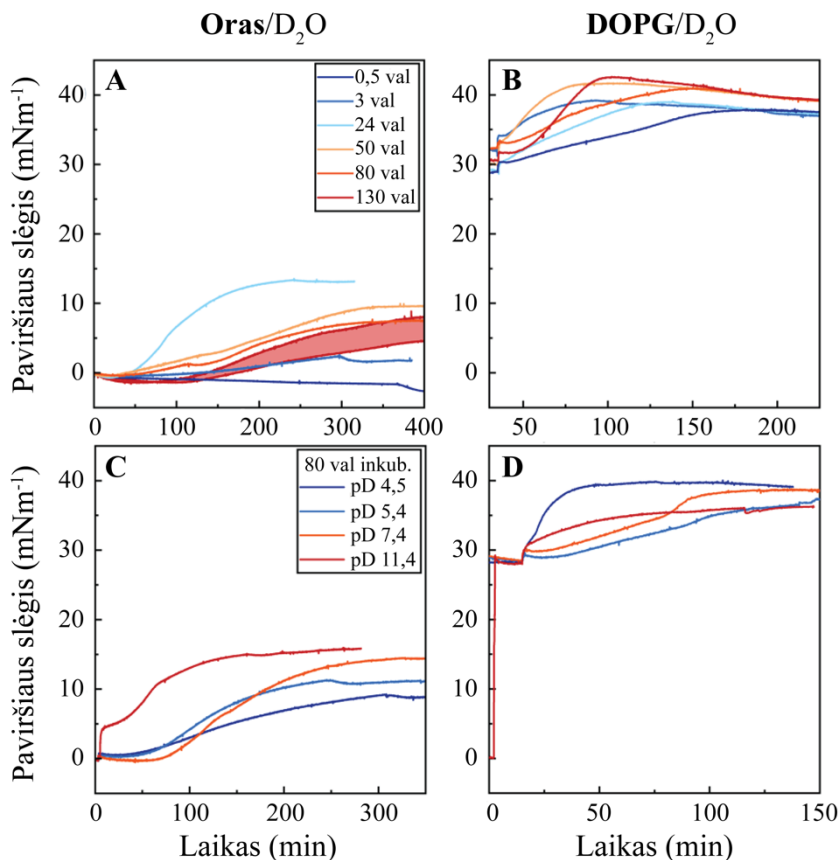
VSF registruojamo spektro intensyvumas gali būti paveikiamas kelių veiksnių, dėl to sudėtinga vienareikšmiškai įvertinti adsorbatų kiekį vien iš VSF spektrų. VSF generuojamo signalo intensyvumas yra proporcingas registruojamų struktūrų koncentracijos kvadratui ir gali būti stipriai paveikiamas šių pokyčių: registruojamų virpesinių dipolių orientacijos ir bendros jų tvarkos.¹⁹⁴ Šio tyrimo metu nustatėme, jog adsorbuotų baltymo struktūrų VSF spektro intensyvumas DOPG/D₂O fazinėje riboje didėja kartu su didėjančiomis pD vertėmis (žr. 3.11. B paveikslas), kai tuo tarpu adsorbuojamo baltymo bei jo agregatų kiekis paviršiuje, remiantis paviršiaus įtempio duomenimis (žr P3.1. D paveikslas), atrodo nepakitęs. Atsižvelgiant į tai, galime daryti prielaidą, jog stebimas VSF intensyvumo pokytis yra sąlygotas kintančios molekulių orientacijos ir/ar tvarkos. SSP spindulių poliarizacijų kombinacijos metu yra registruojami paviršiumi statmeni

virpesiniai dipoliai. Labai tikėtina, jog keičiant tirpalo pD vertes kartu kinta ir baltymo bei jo agregatų dipolių orientacija. Tokiu atveju, esant mažoms pD vertėms baltymo bei jo agregatų adsorbciją į DOPG/D₂O paviršių lemia sąveikos tarp krūvį turinčių grupių. Didėjant pD vertėms, baltymo krūvis mažėja, tuo pačiu didėja hidrofobinės sąveikos daroma įtaka. Būtent tokia adsorbcijos kinetika ir varančiųjų jėgų pokyčiai DOPG paviršiuje gali inicijuoti agregatų virpesinių dipolių persiorientavimą.

3.3. Rezultatų apibendrinimas

Atliktų tyrimų metu siekėme išanalizuoti vištos kiaušinio baltymo lizocimo bei jo formuojamų agregatų adsorbciją oras/D₂O ir DOPG/D₂O paviršiuose, pasinaudojant virpesine suminio dažnio generacijos spektroskopija. Tai yra vienas iš pirmųjų mums žinomų VSFG darbų, kuriuose buvo tiriama iš anksto suformuotų baltymo agregatų adsorbcija. Šiame darbe nustatėme, jog abejose fazinėse ribose gali adsorbuotis aiškios struktūros neturintis baltymas ir/ar jo fragmentai, tiek maži agregatai, kuriems nėra būdinga tvarkinga struktūra, tiek dideli agregatai, pasižymintys paraleliai ir antiparaleliai β -klostyta struktūra. Norint išskirti spektrą veikiančių virpesinių juostų skaičių buvo taikyta VSFG spektrinių juostų išskyrimo procedūra, įtraukianti $\text{Im}\chi^{(2)}$ ir $\text{Re}\chi^{(2)}$ narių indėlius. Baltymo adsorbcija oras/D₂O fazėje labiausiai nulemiama hidrofobinės sąveikos, tuo tarpu DOPG/D₂O fazinėje riboje elektrostatinė sąveika buvo pagrindinė adsorbcijos varomoji jėga su ją papildančiu hidrofobinės sąveikos indėliu. Ankstyvos inkubacijos laike (3-24 valandos), aiškios struktūros neturintis baltymas kartu su mažais padrikais agregatais yra adsorbuojami oras/D₂O fazinėje riboje, tačiau agregatai pasižymintys β -klostyta struktūra yra adsorbuojami tik ilgesnį laiką inkubavus baltymą (50-130 valandų). Svarbu paminėti, kad β -klostyta struktūra pasižymintys agregatai DOPG/D₂O fazinės ribos atveju yra adsorbuojami ankstyvoje inkubacijoje (0,5-3 valandos), kurios metu struktūrų adsorbciją lemia stipri elektrostatinė baltymas-lipidas sąveika. Taip pat tyrimais pademonstravome, jog tirpalo pD verčių keitimas, DOPG/D₂O fazinės ribos atveju, daro didelį poveikį VSFG signalo intensyvumui, kuris gali būti siejamas su adsorbatų virpesinių dipolių orientaciniais pokyčiais. Palyginus oras/D₂O fazinėje riboje, krūvio kitimas sukelia tik nedidelį poveikį.

PRIEDAS



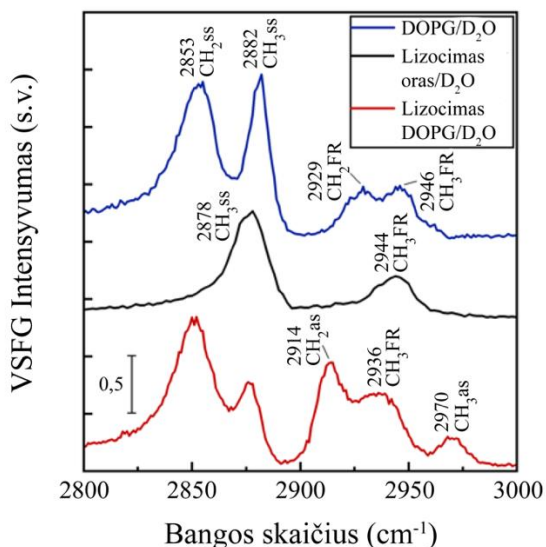
P3.1. paveikslas. Skirtingą laiką agreguoto lizocimo tirpalo adsorbcijos metu registruojamas paviršiaus įtempio kitimas oras/D₂O (A) ir DOPG/D₂O (B) fazinių ribų atveju. Taip pat paveiksle pateikiami 80 valandų agreguoto lizocimo tirpalo adsorbcijos sukelti paviršiaus įtempio kitimai oras/D₂O (C) ir DOPG/D₂O (D) fazinių ribų atveju esant skirtingoms pD vertėms.

P3.1. A ir B paveiksle pateikiami skirtingą laiką, 62 °C temperatūroje, inkubuoto lizocimo adsorbcijos (oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėse ribose) paviršiaus slėgio kitimo duomenys. Paviršiaus slėgio registravimas buvo naudojamas sistemos nuostoviosios būsenos stebėjimui. Kiekybinė analizė, dėl didelio nuostoviosios būsenos paviršiaus slėgio kitimo, yra neįmanoma. Atsikartojamumo paklaida pateikiama 130 valandų agreguoto baltymo adsorbuoto oras/D₂O fazinėje riboje (žr. P3.1. A paveiksle rausvai paryškinta sritis tarp dviejų skirtingų matavimų).

Paviršiaus slėgio augimas rodo, kad lizocimas ir/arba jo agregatai adsorbuojasi atitinkamoje fazinėje riboje. Pradinis paviršiaus slėgio kitimas yra sąlygotas baltymo injekcijos gylio po regimuoju paviršiumi, kuris atskirų eksperimentų metu galėjo svyruoti tarp 1 ir 5 mm. Verta pastebėti, jog oras/D₂O fazinės ribos atveju, naudojant 30 minučių padidintoje temperatūroje inkubuotą lizocimo tirpalą, paviršiaus slėgis monotoniškai mažėja. Šis mažėjimas galimai yra sąlygotas bandinio garavimo ir/arba tenziometro rodmenų svyravimo. Visais kitais atvejais paviršiaus slėgis po baltymo injekcijos didėja, tačiau aiški tendencija neįžvelgiama. Įdomu tai, jog DOPG/D₂O fazinės ribos atveju, kai pradinis paviršiaus slėgis ~30 mNm⁻¹, nuostoviosios būsenos paviršiaus slėgis, po skirtingą laiką inkubuoto baltymo injekcijos, yra $\pi_{eq} \approx 35$ mNm⁻¹ (žr. P3.1. B paveikslą). Ta pati tendencija išlieka net ir keičiant aplinkos pD vertes (žr. P3.1. D paveiksle).

DOPG monosluoksnio tvarkos įvertinimas

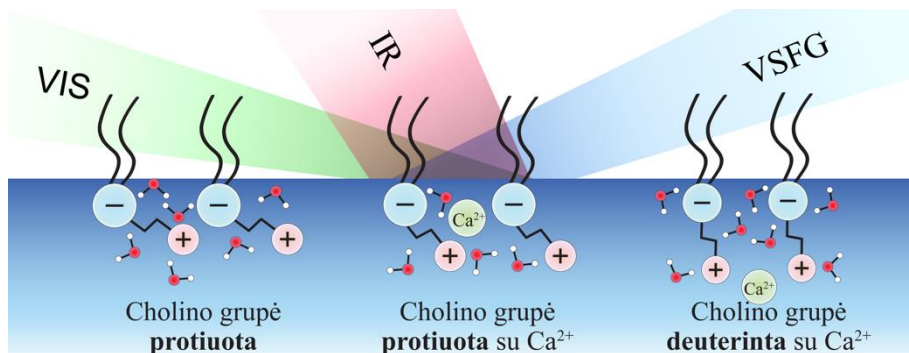
Idealiu atveju lipidai paskleisti vandens paviršiuje įsivaizduojami kaip ypatingai tvarkingos monosluoksnės struktūros, su visomis hidrofobinėmis grandinėlemis nukreiptomis į orą. Tačiau realiu atveju hidrofobinės alkilinės grandinės pasižymi kiek labiau chaotišku susipakavimu, o dalis jų netgi gali įsiterpti į vandens paviršių. Norint patikrinti DOPG monosluoksnio susipakavimą mes užregistravome VSFG spektrus C-H virpesių regione (žr. P3.2. paveikslą). Spektre identifikavome virpesines juostas sietinas su metilo



P3.2. paveikslas. DOPG/D₂O fazinės ribos bei 24 valandas inkubuoto lizocimo adsorbuoto oras/D₂O ir DOPG/D₂O fazinėse ribose VSFG spektrai C-H virpesių regione.

ir metileno grupių virpesiais. Aukštu tvarkos lygiu pasižymintys lipidiniai monosluoksniai esantys *all-trans* konfigūracijoje, VSFG spektre generuoja signalą sietiną su metilo virpesinėmis modomis. Tuo tarpu laisviau susipakavę monosluoksniai, turintys *gauche* defektų, papildomai spektre generuoja signalą sietiną su metileno virpesinėmis modomis.¹⁴ Iš P3.2. paveiksle matomo spektro galime daryti išvadą, jog mūsų tyrimo atveju DOPG monosluoksniai pasižymi dideliais struktūriniais pažeidimais. To pasekoje hidrofobinė sąveika tarp lipido uodegėlių ir hidrofobinių agregatų grupių taip pat galėjo turėti nemažą įtaką šių adsorbacijai. Kim su kolegomis atlikti AFM tyrimai pademonstravo, jog tarp lizocimo ir lipidų gali vyrauti ne tik elektrostatinė, bet ir hidrofobinė sąveikos.⁴⁸

IV. FOSFATIDILCHOLINO DEUTERINIMO POVEIKIS MONOSLUOKSNIO STRUKTŪRINAI



Pasinaudodami virpesine suminio dažnio generacijos (VSFG) spektroskopija siekėme išsiaiškinti galimą deuterinimo poveikį DPPC monosluoksnio savybėms. Tikslui įgyvendinti atlikome DPPC monosluoksnių spektrų analizę taikant skirtingo deuterinimo lygio izotopu pažymėtus (H/D) lipidus. Svarbiausią pokytį nustatėme lipido hidrofilinės fosfato grupės hidratacijoje. Alkilinių grandinių deuterinimas, mūsų eksperimento sąlygomis, spektriškai identifikuojamų pokyčių neparodė. Tirdami fosfato grupės valentinių simetrinių virpesių dinamiką pademonstravome, jog tankesnis monosluoksnio supakavimas sumažina DPPC-d13 ir DPPC-d75 monosluoksnių hidrataciją. Šioje sistemoje įterpti kalcio jonai poveikio neturėjo, nors įprastomis sąlygomis jie sukelia stiprią lipidinių monosluoksnių dehidrataciją. Vienas iš galimų paaiškinimų yra sietinas su cholino grupės deuterinimu, kai monosluoksnis suformuoja Ca²⁺ jonus blokuojančią, tačiau gerai hidratuotą barjerinę struktūrą.

4.1. Fosfolipidai ir jų pritaikymas biomimetinių sistemų tyrimams

Fosfolipidai yra vienas iš pagrindinių žinduolių ląstelės membraną formuojančių komponentų. Biologiniu požiūriu, labiausiai paplitęs yra fosfotidilcholinai (PC), kuris sudaro daugiau nei 40 % visų ląstelės lipidų.¹⁶⁵ Fosfolipidų dvisluoksniai formuoja visų eukariotų membranų pagrindą ir užtikrina ląstelės gyvybingumą, signalo perdavimą, homeostazės palaikymą, medžiagų pernašos reguliaciją ir kontrolę. Visų išvardintų mechanizmų funkcionavimui ypatingai svarbi yra dvisluoksnių struktūrų ir membraninių baltymų tarpusavio sąveika. Atlikti tyrimai demonstruoja, jog pagrindiniai fizikocheminių membranos savybių pokyčiai, tokie kaip šoninis slėgis, skystumas, hidrofobiškumas, poliškumas, elektrostatinis krūvis ar struktūros išlinkimas gali pagreitinti tarpląstelinių baltymų agregaciją.^{5,31,232–235}

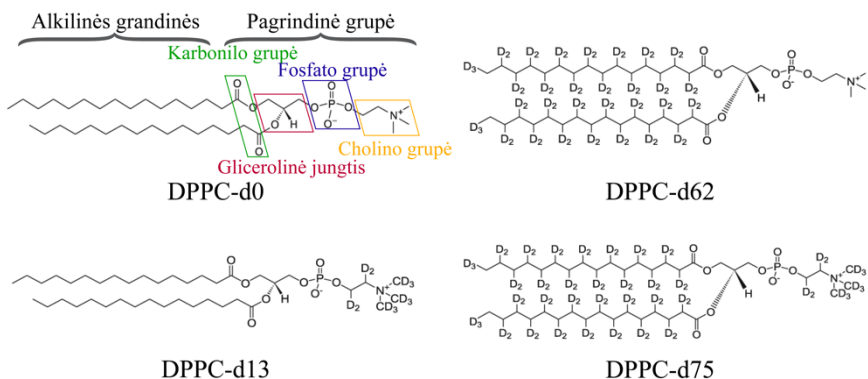
In situ baltymų agregacijos bei sąveikos su ląstelės membrana sukeltų ligų etiologijos ir patogenezės molekulinio lygio analizė yra stipriai apribota eksperimentinėmis metodikomis. Dėl sistemos sudėtingumo ją sunku iširti ir spektroskopiskai, tačiau yra galimybė supaprastinti sistemą panaudojant biomimetines membranas, kurių formavimui pasitelkiami deuterinti fosfolipidai, padedantys išvengti lipidų ir baltymų virpesinių juostų persidengimo. Kalorimetriniais ir spektroskopiniais metodais buvo parodyta, jog protiotų ir deuterintų fosfolipidų fazinio virsmo temperatūros tarpusavyje skiriasi iki 5 °C priklausomai nuo deuterintos srities^{28–30,236–238}, o neutronų difrakcijos ir siauro bei plataus kampo Rentgeno spindulių sklaidos tyrimai nustatė lipidinių dvisluoksnių storio priklausomybę nuo deuterintos srities.^{28,239} Nepaisant biomimetinės sistemos savybių skirtumo virpesinėje spektroskopijoje fosfolipidų izotopinis žymėjimas išlieka plačiai žinomu ir taikomu.

Didelis PC paplitimas biologinėse membranose lėmė tyrimo objekto DPPC pasirinkimą. Lipidai turi dvi sočiasias alkilines grandinėles ir yra stabilūs ore, todėl nebuvo reikalingas sistemos vėdinimas inertinėmis dujomis. DPPC lipidų fazinio virsmo temperatūra yra 41 °C, tačiau siekiant sumažinti bandinio garavimą, matavimai buvo atlikti 20 °C temperatūroje.

Toliau pateikiami tyrimų rezultatai su skirtingo deuterinimo lygio DPPC lipidais, paskleistais D₂O paviršiuje (žr. 4.1. paveiksle). Bandinių spektrai užregistruoti taikant VSFG. Norint stebėti deuterinimo sąlygotus paviršiaus savybių pokyčius buvo formuojami dviejų skirtingų paviršiaus slėgių monosluoksniai:

- 7 mNm⁻¹ atitinkantis skystą-išplitusią (angl. Liquid-Expanded, LE) būseną
- 30 mNm⁻¹ skystą-kondensuotą (angl. Liquid Condense, LC) būseną.

Papildomai po 30 mNm⁻¹ paviršiaus slėgio monosluoksniu buvo suleidžiamas atitinkamas kiekis CaCl₂ tirpalo pasiekiant bendrą 0,4 M tūrinę koncentraciją. Spektroskopinei analizei pasirinkti lipidus charakterizuojantys fosfato, metilo/metileno bei karbonilo grupių virpesiniai regionai.



4.1. paveikslas. Skirtingo deuterinimo lygio DPPC fosfolipido struktūra. DPPC-d0 protiuotas, DPPC-d13 deuterinta tik cholino grupė, DPPC-d62 deuterintos tik alkilinės grandinės, DPPC-d75 deuterinta ir cholino grupė ir alkilinės grandinės.

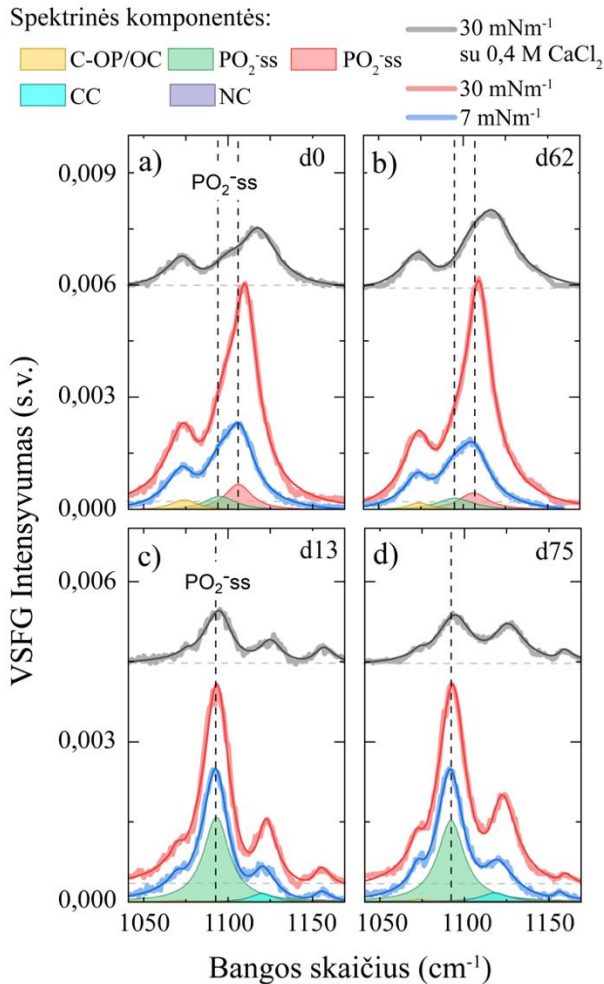
4.2. Rezultatai ir jų aptarimas

Fosfato grupės virpesinis regionas

Hidrofilinės lipido galvutės virpesinės juostos išryškėja ~1000–1300 cm⁻¹ spektriniame diapazone. Šioje spektrinėje srityje esančios fosfato juostos pasižymi dideliu jautrumu susidarantioms vandenilinėms jungtims, tad puikiai tinka tiriant sąveikas su vandeniu, cholesteroliu, biomolekulėmis ar netgi krūvį turinčiais jonais. Fosfato grupė turi dvi gerai išreikštas virpesines juostas, atitinkančias valentinius simetrinius (~1090–1110 cm⁻¹) ir asimetrinius (~1220–1260 cm⁻¹) fosfato grupės virpesius.^{60,61} Asimetriniam fosfato grupės virpesiui būdingas didesnis jautrumas hidratacijai (pastebimas iki ~30 cm⁻¹ raudonasis poslinkis), tačiau generuojamas Ramano signalas šioje srityje yra labai silpnas,²⁴⁰ dėl ko negalime tikėtis charakteringo VSFG signalo. Norint išsiaiškinti, ar lipidų deuterinimas gali sąlygoti jų formuojamų monosluoksnių hidratacinius pokyčius, tyrimui buvo registruojama PO₂’s valentinė simetrinė juosta.

Skirtingo deuterinimo lygio DPPC/D₂O fazinių ribų spektrai, fosfato grupės virpesių regione, esant skirtingoms paviršiaus slėgio vėrtėms, pateikiami 4.2. paveiksle. Dėl pastebimų spektrinių savybių skirtumo tolimesnę fosfato grupės analizę išskyrėme priklausomai nuo cholino grupės deuterinimo. VSFG spektrinių juostų išskyrimo metu gauti parametrai bei juos atitinkančių

juostų priskyrimai cholino grupe protiuotiems (DPPC-d0 ir DPPC-62) ir cholino grupe deuterintiems (DPPC-d13 ir DPPC-d75) lipidams yra atitinkamai pateikiami priede esančiose P4.1. ir P4.2. lentelėse.



4.2. paveikslas. Skirtingo DPPC deuterinimo lygio (DPPC-d0, DPPC-d13, DPPC-d62 ir DPPC-d75) monosluksnių VSFG spektrai fosfato virpesių regione SSP spindulių poliarizacijos kombinacijoje, esant skirtingiems paviršiaus slėgiams be ir su 0,4 M CaCl₂ (žiūrėti legendoje). Atlikus spektrinių juostų išskirimą virpesinių juostų indėlis spektre yra pavaizduotas 7 mNm⁻¹ paviršiaus slėgio monosluksniams. Horizontaliomis punktyrinėmis linijomis žymimi atskirų spektrų nuliniai atskaitos intensyvumai.

Protiuotų lipidų atveju išskiriamos trys charakteringos virpesinės juostos lokalizuotos ties ~1074, ~1095, ~1106 cm⁻¹ (žr. 4.2. a ir b paveiksle). Žemo virpesinio dažnio juostą esančią ~1074 cm⁻¹ priskyrimė fosfato esterio valentininių (angl. stretching) virpesių C-OP superpozicijai su O-C

valentiniais virpesiais.²¹ Aukštesnio dažnio juostoms, lokalizuotoms ~1095 ir ~1106 cm^{-1} srityse, būdingi fosfato grupės (PO_2^- ss) valentiniai simetriniai virpesiai^{6,8,11,19,24,59-61,241,242} su skirtingu vandenilinių jungčių skaičiumi^{23,60}.

Cholino grupe deuterintų lipidų spektruose bendrai gali būti išskiriamos 4 virpesinės juostos: dvi aiškiai išreikštos ties ~1093 ir 1120 cm^{-1} bei dvi mažiau ryškios ~1071 ir ~1155 cm^{-1} (žr. 4.2. c ir d paveiksluose). Juostos lokalizuotos ties 1071 cm^{-1} prigimtis yra ta pati kaip ir cholino grupe protiuoto fosfolipido juostos (1074 cm^{-1}). Aukščiausio dažnio juostos, esančios ~1155 cm^{-1} regione, priskyrimas buvo pagrįstas kvantų-chemijos skaičiavimais, kurie atskleidė, jog juostos prigimtis yra C-N valentiniai virpesiai (žr. 4.2. lentelę). Remiantis skaičiavimais spektruose turėtų būti matomos dvi juostos pasižyminčios dideliu PO_2^- ss virpesio indėliu ties 1056 cm^{-1} (numatomas didelis intensyvumas) bei 1070 cm^{-1} (numatomas mažas intensyvumas) (žr. 4.2. lentelę). Atsižvelgiant į tai, cholino grupe deuterintiems monosluoksniams eksperimentiškai stebimos 1093 ir 1120 cm^{-1} juostos buvo priskirtos simetriniam valentiniam PO_2^- ss.

Išsami dimetil fosfato $[(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{PO}_2^-]$ spektroskopinė analizė esant skirtingiems šio deuterinimo lygiams $[(\text{CH}_3\text{CD}_2\text{O})_2\text{PO}_2^-$, $(\text{CD}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{PO}_2^-$, $(\text{CD}_3\text{CD}_2\text{O})_2\text{PO}_2^-]$ atskleidė, jog PO_2^- ss juosta yra stipriai lokalizuota. Esant skirtingiems etilo grupių deuterinimams, silpna sąveika su kitomis modomis lemia nedidelį fosfato juostos mėlynąjį poslinkį. Potencinės energijos pasiskirstymo (angl. Potential Energy Distribution, PED) analizė atskleidė, jog tiek grupe protiuotame, tiek ir pilnai deuterintame bandinyje PO_2^- ss virpesio indėlis išlieka panašus (51–52 %). Registruojant kietos medžiagos spektrą, tirpalui būdinga PO_2^- ss juosta matoma Ramano spektro 1078–1083 cm^{-1} regione, pasilenka į ilgesnių bangų pusę per ~12–27 cm^{-1} .²⁴³

Darbe atlikti skaičiavimai taikant DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) lygio teoriją H, C, O, N ir P atomams parodo, kad fosfato grupės indėlis į virpesinę juostą mažėja esant cholino grupės deuterinimui (žr. 4.1. ir 4.2. lenteles). Lentelėse 4.1. ir 4.2. pateikiami skaičiavimų metu gauti teoriniai molekulių virpesių bangų skaičiai. Kiekybiniam atomų virpesių indėlio ir tikėtinam VSFG juostų intensyvumo įvertinimui atlikta PED analizė. Skaičiavimai nėra pritaikyti tiesioginiam VSFG juostų aktyvumo nustatymui, tačiau apskaičiuota teorinė Ramano ir IR juostų intensyvumų sandauga leidžia įvertinti tikėtiną juostų aktyvumą: kuo didesnis *IR x Ramano* įvertis, tuo didesnis VSFG signalas.

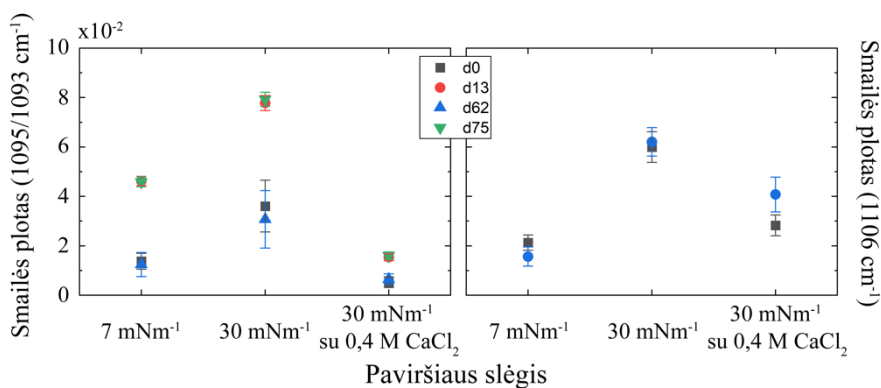
4.1. lentelė. Molekulių virpesių pasiskirstymas paskaičiuotiems virpesių bangų skaičiams bei IR ir Ramano intensyvumo sandaugai esant cholino grupe prituotiems lipidams.

IR x Ramano	Bangos skaičius, cm ⁻¹	Molekuliniai virpesiai, kurių indėlis viršija 5%												
		Ind. %	Atomai	Virpesio tipas	Ind. %	Atomai	Virpesio tipas	Ind. %	Atomai	Virpesio tipas	Atomai	Virpesio tipas		
9033	1052	62	O ₂₄ -C ₂₅	stre	9	P ₂₁ -O ₂₄	stre	5	O ₂₂ -P ₂₁ -O ₂₃	ss stre				
9878	1062	53	O ₂₂ -P ₂₁ -O ₂₃	ss stre	13	C ₁₇ -O ₂₀	stre	5	H ₃ -C ₂ -N ₁ -C ₆	tors			H ₄ -C ₂ -N ₁ -C ₆	tors
1023	1074	38	O ₃₃ -C ₂₈	stre	13	H ₃₁ -C ₃₀ -O ₃₄ -C ₃₅ ; H ₃₂ -C ₃₀ -O ₃₄ -C ₃₅	tors	6	O ₂₄ -C ₂₅	stre			H ₃₁ -C ₃₀ -O ₃₄ ; H ₂₆ -C ₂₅ -O ₂₄	bend
833	1087	30	O ₂₂ -P ₂₁ -O ₂₃	ss stre	20	N ₁ -C ₁₄ -C ₁₇ -O ₂₀ - P ₂₁ -O ₃₄ -C ₂₅	as stre	8	H ₁ -C ₂ -N ₁ -C ₆ ; H ₄ -C ₂ -N ₁ -C ₆ ; H ₉ -C ₆ -N ₁ -C ₁₀	tors			H ₄ -C ₂ -H ₅ ; H ₁₂ -C ₁₀ -H ₁₃ ; H ₃ -C ₂ -H ₅ ; H ₇ -C ₆ -H ₉ ; H ₈ -C ₆ -H ₉	bend
1205	1122	44	C ₂₈ -C ₂₅	stre	9	O ₃₄ -C ₃₅	stre	7	O ₃₃ -C ₃₇	stre			H ₂₆ -C ₂₅ -O ₂₄ - P ₂₁	tors

4.2. lentelė. Molekulių virpesių pasiskirstymas paskaičiuotiems virpesių bangų skaičiams bei IR ir Ramano intensyvumo sandaugai esant cholino grupe deuterintiems lipidams.

IR x Ramano	Bangos skaičius, cm-1	Molekuliniai virpesiai, kurių indėlis viršija 5%											
		Ind. %	Atomai	Virpesio tipas	Ind. %	Atomai	Virpesio tipas	Ind. %	Atomai	Virpesio tipas	Atomai	Virpesio tipas	
1202	1012	54	C ₁₇ -O ₂₀	stre	15	D ₁₈ -C ₁₇ -D ₁₉	bend	8	P ₂₁ -O ₂₀	stre	5	D ₁₈ -C ₁₇ -O ₂₀	bend
18066	1056	45	O ₂₄ -C ₂₅	stre	22	O ₂₂ -P ₂₁ -O ₂₃	ss stre	10	P ₂₁ -O ₂₀	stre	5	O ₂₀ -C ₁₇	stre
622	1067	45	D ₇ -C ₆ -D ₈ ; D ₁₅ -C ₁₄ -D ₁₆ ; D ₁₁ -C ₁₀ -D ₁₃	bend	16	O ₂₂ -P ₂₁ -O ₂₃	ss stre	9	D ₇ -C ₆ -N ₁ -C ₁₀ ; D ₈ -C ₆ -N ₁ -C ₁₀ ; D ₁₁ -C ₁₀ -N ₁ -C ₆ ; D ₄ -C ₂ -N ₁ -C ₆	tors	6	D ₄ -C ₂ -D ₅ ; D ₃ -C ₂ -D ₅ ; D ₃ -C ₂ -D ₄	bend
1471	1070	28	O ₂₂ -P ₂₁ -O ₂₃	ss stre	37	D ₃ -C ₂ -D ₅ ; D ₈ -C ₆ -D ₅ ; D ₇ -C ₆ -D ₈ ; D ₈ -C ₆ -D ₅ ; D ₃ -C ₂ -D ₄	bend	5	D ₁₈ -C ₁₇ -D ₁₉	bend	5	O ₃₃ -C ₂₈	stre
1312	1074	48	O ₃₃ -C ₂₈	stre	10	H ₃₁ -C ₃₀ -O ₃₄ -C ₃₅ ; H ₃₂ -C ₃₀ -O ₃₄ -C ₃₅	bend	6	O ₂₂ -P ₂₁ -O ₂₃	ss stre	6	H ₂₆ -C ₂₅ -O ₂₄ ; H ₃₁ -C ₃₀ -O ₃₄	bend
1927	1122	43	C ₂₈ -C ₂₅	stre	12	O ₃₄ -C ₃₅	stre	8	H ₂₆ -C ₂₅ -O ₂₄ -P ₂₁	tors	5	C ₃₀ -C ₂₈	stre
213	1156	25	N ₁ -C ₆	stre	11	D ₁₉ -C ₁₇ -O ₂₀ -P ₂₁	tors	7	D ₁₈ -C ₁₇ -O ₂₀ -P ₂₁	tors	6	D ₁₈ -C ₁₇ -D ₁₉	bend

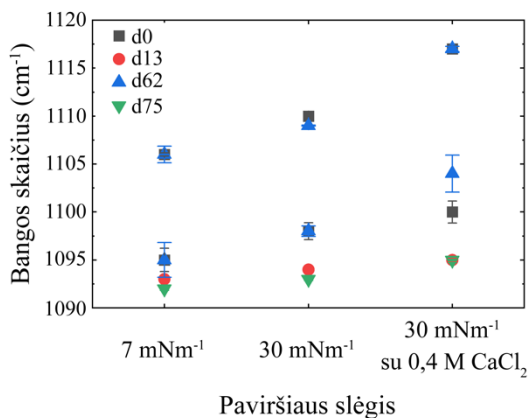
Fosfato grupės virpesys (PO_2ss) yra jautrus monosluoksniu susipakavimui, to priežastimi tampa šios grupės polinkis sudaryti vandenilinius ryšius su lipidą supančiu vandeniu. Ma su kolegomis tirdami dviejų skirtingų paviršiaus slėgių (LE, 12 mNm^{-1} ir LC, 42 mNm^{-1}) DPPC monosluoksnius pademonstravo akivaizdų fosfato PO_2ss juostos poslinkį iš 1094 į 1104 cm^{-1} .⁸ Stebimas mėlynasis poslinkis, pereinant iš LE į LC paviršiaus būseną, buvo siejamas su vandenilinių jungčių silpnėjimu tarp fosfato grupės ir gretimų vandens molekulių. Mūsų tyrimo metu atlikus spektrinių juostų išskyrimą cholino grupę protiuotiems DPPC-d0 ir DPPC-d62 monosluoksniams, esant 7 mNm^{-1} paviršiaus slėgiui (LE paviršiaus būseną), identifikavome dvi PO_2ss virpesines juostas ~ 1095 ir $\sim 1106 \text{ cm}^{-1}$. Spektre matomos kaip viena labiau asimetrinės formos juosta, sąlygota pastarųjų platumo bei visiško persidengimo (žr. 4.2. a ir b paveiksluose). Gerai žinoma, jog vandenilinių jungčių susidarymas turi charakteringą virpesinių juostų išplatėjimą bei poslinkį į žemesnių dažnių pusę (raudonasis poslinkis). Molekulių dinamikos skaičiavimai pademonstravo, jog vandens molekulės su fosfolipidų fosfato grupe gali formuoti įvairius vandenilinius ryšius.²⁴³ Pavyzdžiui: fosfotidilcholinai (PC), pilnai hidratuotoje būsenoje net iki penkių vandens molekulių, gali sudaryti vandenilinius ryšius su fosfato grupe. Tokiu atveju gali formotis ir vandens tilteliai, kurių metu viena vandens molekulė vandenilniais ryšiais suriša du gretimus fosfolipidus.



4.3. paveikslas. PO_2ss virpesinių juostų $\sim 1095/1093 \text{ cm}^{-1}$ (kairėje) ir $\sim 1106 \text{ cm}^{-1}$ (dešinėje) plotai, gauti atlikus spektrinių juostų išskyrimą DPPC-d0, DPPC-d13, DPPC-d62 ir DPPC-d75 VSGF spektrų fosfato virpesių regione.

Monosluoksniu LE būsenoje (7 mNm^{-1}) pasižymi skystumu, o laisvai susipakavusios lipido hidrofilinės grupės yra puikiai solvatuojamos jų supančio vandens. Tikėtina, jog stebimas PO_2ss virpesio išplatėjimas bei pasidalinimas į dvi juostas yra sukeltas daugialypio vandenilinių jungčių

tinklo. Suformavus 30 mNm^{-1} (LC paviršiaus būseną) paviršiaus slėgio monosluoksnių, fosfato grupės solvatacija drastiškai sumažėja. Hidratacinius DPPC-d0 ir DPPC-d62 monosluoksnių pasikeitimus geriau charakterizuoja aukštesnio dažnio ($\sim 1106 \text{ cm}^{-1}$) PO_2^- juostos ploto padidėjimas, nei žemesnio dažnio ($\sim 1095 \text{ cm}^{-1}$) juosta (žr. 4.3. paveiksle). Suformavus 30 mNm^{-1} paviršiaus slėgio monosluoksnius stebimas juostų $\sim 3\text{--}4 \text{ cm}^{-1}$ mėlynasis poslinkis, nurodantis hidrofilinės fosfato grupės dehidrataciją (žr. 4.4. paveiksle). Cholino grupę deuterintiems lipidams (DPPC-d13 ir DPPC-d75) pastebimas tik nežymus ($\sim 1 \text{ cm}^{-1}$) $\sim 1093 \text{ cm}^{-1}$ esančios juostos poslinkis, kuris gali būti sietinas su beveik nekintančia fosfato grupės hidratacija.

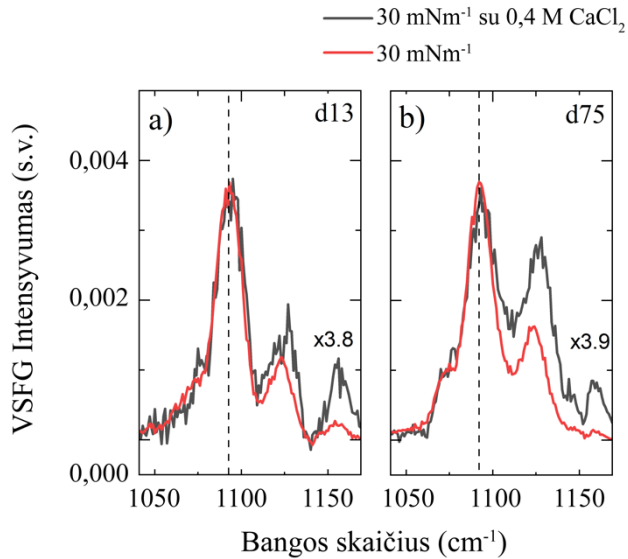


4.4. paveikslas. PO_2^- virpesinių juostų $\sim 1095/1093 \text{ cm}^{-1}$ ir $\sim 1106 \text{ cm}^{-1}$ poslinkiai atlikus spektrinių juostų išskyrimą DPPC-d0, DPPC-d13, DPPC-d62 ir DPPC-d75 VSFG spektrų fosfato virpesių regione.

Akivaizdi pagrindinės lipidų grupės dehidratacija yra stebima, kai po 30 mNm^{-1} paviršiaus slėgio DPPC-d0 ir DPPC-d62 monosluoksniais yra suleidžiamas CaCl_2 . Atlikus spektrinių juostų išskyrimą nustatytas $\sim 7 \text{ cm}^{-1}$ aukšto dažnio bei $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$ žemo dažnio juostų mėlynasis poslinkis (žr. 4.4. paveiksle), sąlygotas ne tik papildomos fosfato grupės dehidratacijos bet ir kiek labiau tiesioginio Ca^{2+} jonų prisijungimo prie fosfato anijoninio deguonies. Analizuojant DPPC-d13 ir DPPC-d75 monosluoksnius stebimas tik $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$ mėlynasis poslinkis. Atsižvelgiant į mažą juostos jautrumą galime daryti išvadą, jog tankesnis susipakavimas ir įterpti Ca^{2+} jonai nedaro didelės įtakos fosfato grupės hidratacijai ir vandens patekimui arčiau fosfato deguonies atomų.

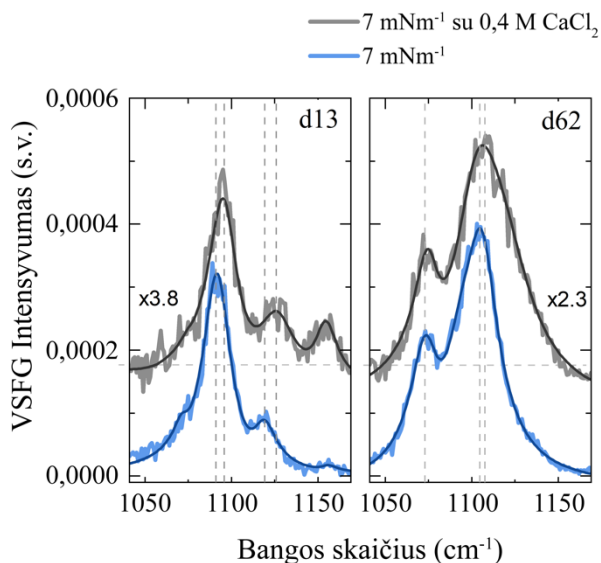
Svarbu paminėti, kad virpesinių juostų pločio pasikeitimai taip pat gali charakterizuoti Ca^{2+} jonų sukeltus spektrinius skirtumus. Lyginant 30 mNm^{-1} paviršiaus slėgio DPPC-d0 ir DPPC-d62 monosluoksnius be ir su $0,4 \text{ M}$

CaCl₂ yra pastebimas žymus ~4 – 6 cm⁻¹ juostų išplėtimas (žr. P4.1. ir P4.2. lentelės esančias priede), o cholino grupę deuterintiems lipidams būdingas juostos išplėtimas ne toks ženklaus – iki 2 cm⁻¹. Spektrinių juostų pločio dinamiką patogiau stebėti ir vertinti sunormalizavus smailių intensyvumus (žr. 4.5. paveikslą).



4.5. paveikslas. DPPC-d13 ir DPPC-d75 monosluoksnių VSGF spektrai fosfato virpesiniame regione užrašyti SSP spindulių poliarizacijų kombinacijoje esant 30 mNm⁻¹ paviršiaus slėgiui be ir su 0,4 M CaCl₂. Spektrai normalizuoti į didžiausio intensyvumo juostą.

Papildomai atliktas VSGF eksperimentas su skystesniu (7 mNm⁻¹ paviršiaus slėgis, LE būseną) DPPC-d13 monosluoksniu ir CaCl₂ pademonstravo intensyviausios juostos ~4 cm⁻¹ poslinkį (žr. 4.6. paveikslą bei P4.3. lentelę priede). Šis rezultatas patvirtina didelį PO₂-ss virpesio indėlį didžiausio intensyvumo juostoje ~1093 cm⁻¹, kadangi Ca²⁺ jonų sukeltas poslinkis yra būdingas tik fosfatiniams virpesiui⁸. Mūsų eksperimento sąlygomis papildomai nustatėme mažo intensyvumo rezonansą ~1118 cm⁻¹, kuris po Ca²⁺ įterpimo pasislinko ~8 cm⁻¹ į ilgų bangų pusę (žr. P4.3. lentelę priede). Šiai juostai taip pat būdingas didelis PO₂-ss virpesio indėlis. Gauti duomenys puikiai atitinka skaičiavimus atliktus su cholino grupę deuterintu fragmentu (žr. 4.2. lentelę, 1056 ir 1070 cm⁻¹ modos). Virpesinių fosfato juostų poslinkiai nebuvo tokie akivaizdūs tankiai supakuoto (30 mNm⁻¹ paviršiaus įtempio, LC būsenos) DPPC-d13 monosluoksniu atveju.



4.6. paveikslas. DPPC-d13 ir DPPC-d62 monosluoksnių VSFG spektrai fosfato virpesiniame regione užrašyti SSP spindulių poliarizacijų kombinacijoje esant 7 mNm^{-1} paviršiaus slėgiui be ir su $0,4 \text{ M CaCl}_2$. Ryški ištininė linija žymi spektrinių juostų išskyrimo metu gautą spektrinį atitikmenį.

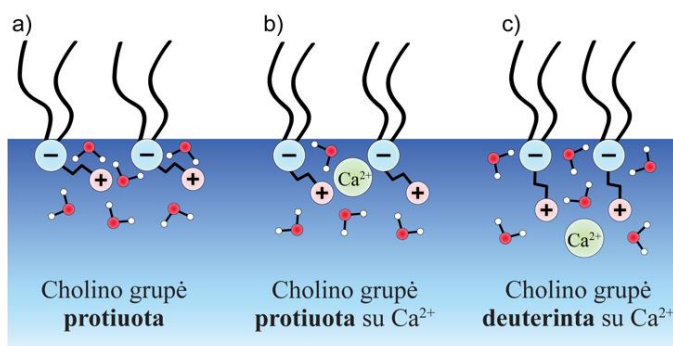
Kalcio jonų sukelta lipidinių monosluoksnių dehidratacija pilnai protiuotiems DPPC lipidams buvo stebima Casillas-Ituarte su kolegomis atliktuose VSFG tyrimuose.¹⁹ Feng su kolegomis, tirdami sfingomieliną (lipidą turintį tą pačią PC hidrofilinę galvutę kaip ir DPPC) taikant aukštos skiriamosios gebos plačiajuostę VSFG spektroskopiją, nustatė Ca^{2+} - PO_2 komplekso virpesinių juostų lokalizaciją 1120 ir 1130 cm^{-1} srityse.¹⁹³ Javanainen su kolegomis atlikti molekulių dinamikos skaičiavimai parodė, jog kalcio prisijungimas prie DPPC fosfato grupės deguonies atomų gali būti daugialypis. Autoriai įvertino, kalcio jonų tiesioginį jungimąsi prie fosfato grupės per vieną ar dvi vandens molekules dalijantis tirpikliu (angl. solvent-share) arba mišriai, kai Ca^{2+} jonai jungiasi tiesiogiai prie vieno lipido fosfato grupės bei papildomai prie 1-2 grupių per tirpiklį.¹¹

Cholino grupės deuterinimo poveikis monosluoksniui struktūrai

Spektruose stebimas smailių ploto sumažėjimas bei aukštesnio dažnio juostos ploto didėjimas po kalcio jonų prisijungimo gali būti siejamas su fosfato-kalcio kompleksų struktūriniu nevienalytiškumu. Tokius juostų parametrus galima sąlygoja plati fosfato grupės orientacija¹⁹ arba lipidų hidrofilinių galvučių telkimasis į klasterius, sukeliamas kalcio chlorido.¹¹ Cordomi su kolegomis atlikti teoriniai molekulių dinamikos skaičiavimai dvisluoksniams DPPC struktūroms parodė, jog kalcio prisijungimas prie

fosfato grupės gali pakeisti visos hidrofilinės fosfato grupės pasvirimo kampą.²⁴⁴ Vidutinis kampas, apibrėžiamas kaip P-N dipolio kampas su fazine riba, sistemoje be jonų buvo 15°, o į sistemą įterpus 0,2 M Ca²⁺ jonų kampas padidėjo iki 33°. Kadangi VSFG intensyvumas yra proporcingas matuojamo virpesio orientacijai, tokie hidrofilinės galvutės orientacijos pokyčiai gali sąlygoti mūsų spektruose užregistruotą virpesinių juostų intensyvumo sumažėjimą.

Akivaizdus spektrinis skirtumas pastebėtas tarp cholino grupės protiuotų ir deuterintų lipidų leidžia daryti išvadą, jog pastarieji formuoja monosluoksnius pasižyminčius skirtinga hidrofilinės fosfato grupės struktūra. Neseniai atlikti tyrimai parodė, jog cholino grupės deuterinimas DOPC dvisluoksnių atveju pasižymi jį storinančiu poveikiu.²⁸ Gauti rezultatai grindžiami cholino grupės struktūriniais pokyčiais, kurių metu susidaro katijonų patekimą prie fosfato grupės stabdantis, bet vandeniui gerai pralaidus barjeras. VSFG spektruose šie struktūros pasikeitimai atvaizduoti žemo dažnio (~1093 cm⁻¹) juostoje indukuojančioje, jog cholino grupės deuterintų lipidų struktūra išlieka gerai hidratuota. Tai patvirtina ir mažas šios juostos dažnio jautrumas pokyčiams atsirandantiems suformavus tankius monosluoksnius bei po jais įterpus kalcio jonus. Stebimas VSFG spektro intensyvumo sumažėjimas galimai yra dėl CaCl₂ įtakos monosluoksniui vienalytiškumui. Tai yra vienas iš labiausiai tikėtinų paaiškinimų, tačiau jų gali būti ir daugiau.



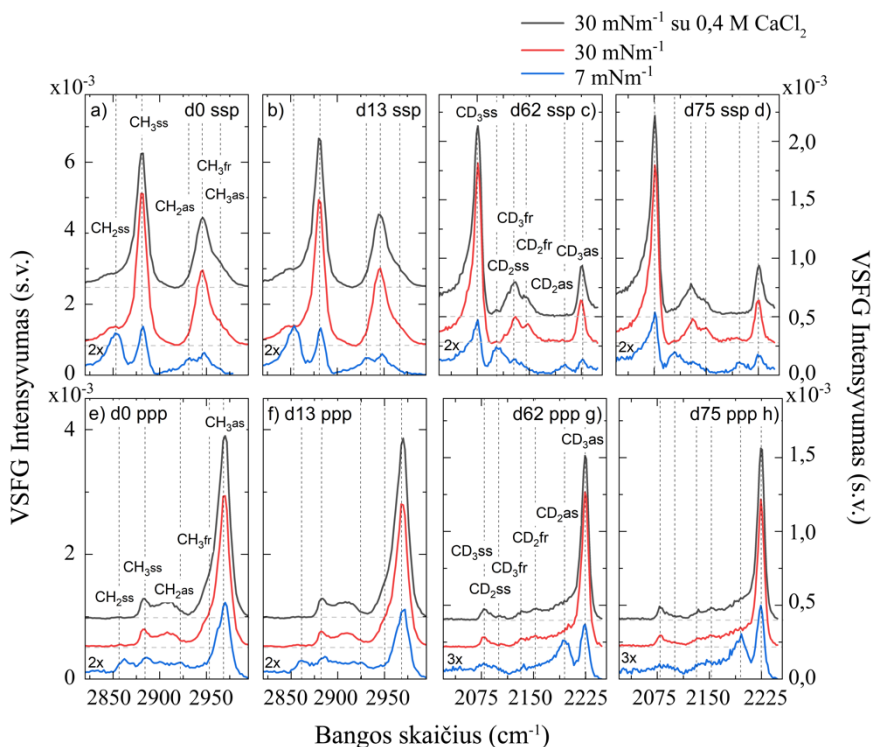
4.7. paveikslas. Schematiškai pavaizduoti cholino grupės struktūriniai pokyčiai esant Ca²⁺ jonų prisijungimui bei deuterinimo daroma įtaka.

Schema 4.7. paveiksle iliustruoja vieną iš tikėtinų cholino grupės struktūros pokyčių deuterinimo metu ir kaip nuo to kinta Ca²⁺ jonų prisijungimas. Remiantis A. Cardomi atliktais molekulių dinamikos skaičiavimais buvo nustatyta, jog cholino grupės protiuotų monosluoksnių atveju, P-N dipolio kampas, po tiesioginio Ca²⁺ jonų prisijungimo prie fosfato grupės (žr. 4.7. paveikslo b dalyje) padidėja nuo 15° į 33°.²⁴⁴ Taip pat cholino

grupės deuterinimas gali paveikti lipidų hidrofilinės fosfato grupės struktūrą taip, jog ši praleidžia vandens molekules, tačiau blokuoja Ca^{2+} jonus (žr. 4.7. paveiksle c dalyje). Tokie hidrofilinės galvutės struktūriniai pokyčiai, kartu su 2019 metais atliktu neutronų sklaidos tyrimu, paašškintų mūsų eksperimentinius VSFG rezultatus. Remiantis literatūra, DPPC hidrofilinės galvutės deuterinimas padidina dvisluoksnio storį ir lemia cholino grupės struktūros pokyčius.²⁸

Metilo ir metileno virpesių spektrinė sritis

Fosfolipidų hidrofobinė dalis – pora alkilinių grandinelių, sudarytų iš metilo ir metileno molekulinų grupių. Virpesiai, išsidėstę 2800-3000 cm^{-1} spektriniuose regionuose, dažnai naudojami tiriant angliavandenilinių grandinelių konformacinius pokyčius bei vertinant jų šoninį susipakavimą ir tvarką.



4.8. paveikslas. Paveiksle pateikiami metilo ir metileno grupių SSP (a, b, c, d) bei PPP (e, f, g, h) spindulių polarizacijose užrašyti VSFG spektrai, DPPC-d0, DPPC-d13 monosluoksnių paskleistų ant D_2O bei DPPC-d62, DPPC-d75 monosluoksnių paskleistų ant H_2O paviršiaus, esant skirtingiems monosluoksnių slėgiams bei ir su 0,4 M CaCl_2 (žiūrėti legendoje).

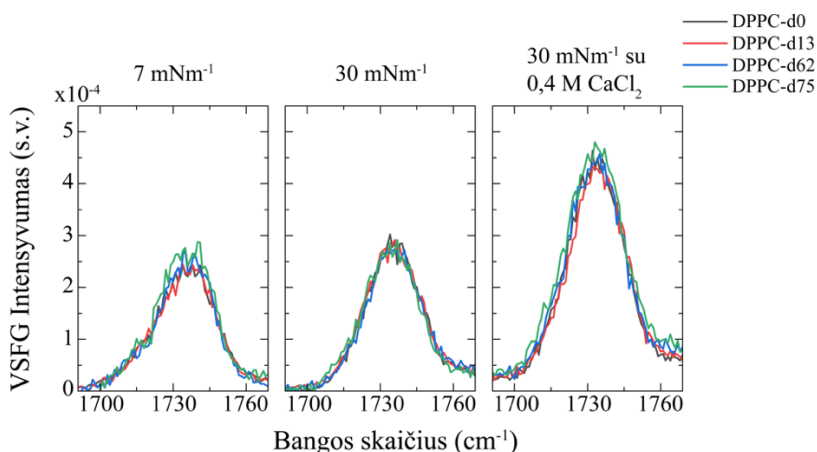
Metilo ir metileno C–H/C–D valentinių virpesių VSFG spektrai pateikiami 4.8. paveiksle. Dalyse (a) ir (b) bei (e) ir (f) pavaizduoti DPPC-d0 ir DPPC-d13 monosluoksnių paskleistų ant D₂O paviršiaus spektrai SSP ir PPP spindulių poliarizacijų kombinacijose. Spektuose matomos ryškiausios smailės yra ties ~2850, ~2880, ~2945 ir ~2965 cm⁻¹, kurios atitinkamai priskiriamos metileno (d⁺, CH₂) ir metilo valentiniams simetriniams (r⁺, CH₃ss), metilo valentiniam simetriniam esančiam Fermi rezonanse (r⁺_{Fermi}, CH₃Fermi) bei metilo valentiniam asimetriniam (r⁻, CH₃as) virpesiams.^{6,8-10,13,14,55,57,59} Tuo tarpu (c) ir (d) bei (g) ir (h) dalyse yra pateikiami DPPC-d62 ir DPPC-d75 monosluoksnių paskleistų ant H₂O paviršiaus spektrai SSP ir PPP spindulių poliarizacijų kombinacijose. Šiuo atveju smailės lokalizuojasi ties ~2076, ~2100, ~2130, ~2150, ~2200 ir 2225 cm⁻¹, kurios atitinkamai priskirtos r⁺ (CD₃ss), d⁺ (CD₂ss), r⁺_{Fermi} (CD₃ Fermi), d⁺_{Fermi} (CD₂ Fermi), d⁻ (CD₂as), r⁻ (CD₃as) virpesinėms modoms.^{6,8,13,15,17,56} Nepaisant to, kad monosluoksniai buvo formuojami fosfolipidus laisvai paskleidžiant D₂O/H₂O paviršiuje, gauti rezultatai puikiai atitinka literatūroje nurodomus monosluoksnių spektrus suformuotus pasinaudojant Langmuir metodu^{8,15,55} ar nusodinimu ant CaF₂ langelio¹⁴.

VSFG spektuose stebimos puikiai išreikštos, nuo fosfolipido deuterinimo nepriklausomos, metileno virpesinės juostos su parinktu 7 mNm⁻¹ paviršiaus monosluoksnių slėgiu. Juostoms yra būdingas VSFG aktyvumas, tik tada kai metileno grupių visuma monosluoksnyje nesudaro centrosimetrinės aplinkos.⁵⁴ Juostos aktyvumas mūsų registruotuose spektuose nurodo įprastus DPPC-d0, DPPC-d13, DPPC-d62 ir DPPC-d75 monosluoksnių alkilinių grandinių *gauche* defektus. Literatūroje teigiama, kad VSFG SSP kombinacijoje užrašytų spektrų CH₃ss ir CH₂ss smailių santykis gali būti taikomas protiuotų alkilo grandinių tvarkos įvertinimui. Tačiau, svarbu paminėti, kad santykį klaidinga naudoti deuterintą alkilinę grandinę turinčių lipidų analizėje. Tyrode su kolegomis šį neatitikimą susiejo su CD₂ss virpesiui būdingu gerokai mažesniu sugerties skerspjūviu (angl. cross-section) bei pasiūlė alternatyvų alkilinių grandinių tvarkos įvertinimo būdą analizuojant CD₃as ir CD₂as virpesinių juostų santykį PPP spindulių poliarizacijoje.²⁴⁵ Lyginant 7 ir 30 mNm⁻¹ paviršiaus slėgio monosluoksnius galime matyti, jog didėjant alkilo grandinių tvarkai, metileno (CH₂/CD₂) juostų intensyvumas sumažėja, o metilo (CH₃/CD₃) – padidėja. Tendencingai didėja ir juostų santykis. Protiuotas alkilines grandines turintiems monosluoksniams papildomai stebimas CH₂ss juostos raudonasis poslinkis iš ~2853 į ~2847 cm⁻¹, kuris yra geras konformacinių pokyčių žymuo – iš *gauche* pereinama į *trans* konformaciją.¹⁰ Tuo tarpu 30 mNm⁻¹ monosluoksniui, suformuotam ant 0,4 M CaCl₂ tirpalo, VSFG spektrai didelių pokyčių neparodė. Lipidų tvarkos

įvertinimas yra problematiškas ir praktiškai neįmanomas, kadangi DPPC-d0 ir DPPC-d13 monosluoksnių metileno virpesinių juostų intensyvumas labai mažas, o DPPC-d62 ir DPPC-d75 – visiškai išnyksta. Remiantis tuo, virpesinių juostų santykio kiekybinės analizės atlikti nepavyko.

Karbonilo grupės virpesių spektrinė sritis

Skirtingo deuterinimo lygio DPPC/D₂O fazinių ribų spektrai, karbonilo grupės (C=O) virpesių regione su skirtingomis paviršiaus slėgio vertėmis pateikiami 4.9. paveiksle. Esant 7 mNm⁻¹ paviršiaus slėgiui, VSFG signalui būdinga asimetrinė forma, kuri sąlygota mažiausiai dviejų persiklojančių juostų. Žemo dažnio juosta lokalizuota ~1730 cm⁻¹ yra priskiriama vandenilinių jungčių nesudarančiais, o aukšto dažnio ~1740 cm⁻¹ – vandenilinėmis jungtimis surištais karbonilo grupei.^{241,246,247} 2019 metais atlikti heterodino VSFG tyrimai įrodė, jog šios dvi karbonilo grupės egzistuoja skirtingose aplinkose, todėl įgyja skirtingą orientaciją.²⁰ Nežymi CO virpesinės juostos asimetrija VSFG spektruose taip pat gali būti sąlygota ir signalo interferencijos su nerezonansiniu fonu. Norint gauti šių juostų individualius parametrų rinkinius, būtinas spektrinių juostų išskyrimas. Dėl ypatingai stipraus juostų persiklojimo bei galimai skirtingos juostų orientacijos mums nepavyko nustatyti individualių parametrų rinkinių be vieno iš parametrų (pvz, juostos dažnio) fiksavimo. Toks spektrinių juostų išskyrimas remiantis iš anksto fiksuotais parametrais yra nekorektiškas ir galimai klaidinantis. Virpesinių juostų kokybinė analizė parodė, jog visų monosluoksnių karbonilo grupės spektrai, nepaisant skirtingo lipidų deuterinimo lygio, atrodo labai panašiai.



4.9. paveikslas. Karbonilo grupės, DPPC, DPPC-d13, DPPC-d62, ir DPPC-d75 monosluoksnių paskleistų ant D₂O paviršiaus, VSFG spektrai SSP spindulių poliarizacijoje esant skirtingiems paviršiaus slėgiams be ir su 0,4 M CaCl₂.

Didėjant paviršiaus slėgiui, monosluoksnių hidratacija mažėja. Kuo tankiau susipakavęs monosluoksnis, tuo mažiau hidratuota fosfato grupė. Tokiu atveju dėl vandenilinių jungčių praradimo yra tikėtinas C=O dažnio padidėjimas. Priešingą efektą pademonstravo Galbiati su kolegomis tirdami seriją alifatinių esterių. Taikant IR ir Ramano spektroskopijas mokslininkai nustatė CO dipolių tarpusavio sąveikos nulemtą karbonilo grupės virpesio dažnio sumažėjimą.²⁴⁴ Mūsų tyrimo metu paviršiaus slėgiui padidėjus iš 7 į 30 mNm⁻¹ bendras juostos dažnis ~1735 cm⁻¹ išliko nepakitęs, tačiau registruojamo signalo forma tapo labiau simetriška. Gautą rezultatą galime pagrįsti vandenilinėmis jungtimis susaistytos karbonilo grupės dehidratacija ir mėlynuoju juostos poslinkiu.

Kalcio chlorido įtaka 30 mNm⁻¹ paviršiaus slėgio monosluoksniui yra aiškiai matoma VSFG spektruose (žr. 4.9. paveiksle). Panaudojant skirtingo deuterinimo lygio monosluoksnius ir 0,4 M CaCl₂ yra stebimas 2 cm⁻¹ raudonasis poslinkis (iš ~1735 į 1733 cm⁻¹) bei bendro signalo intensyvumo padidėjimas. Cordomi su kolegomis molekulių dinamikos simuliacijos tyrimais pademonstravo, jog kalcio jonai gali prisijungti prie protiuotų DPPC karbonilo grupių sudarydami pakankamai stabilius CO-Ca kompleksus.²⁴⁸ Ištirta, kad chloro anijonai negali prasiskverbti į monosluoksniu vidų, todėl lieka vandens tūryje. Nepaisant Cordomi atliktų įžvalgų, mūsų rezultatai vertinant karbonilo juostų pokyčius deuterinimo metu, yra labai menki ir reikšmingų išvadų daryti negalime.

4.3. Rezultatų apibendrinimas

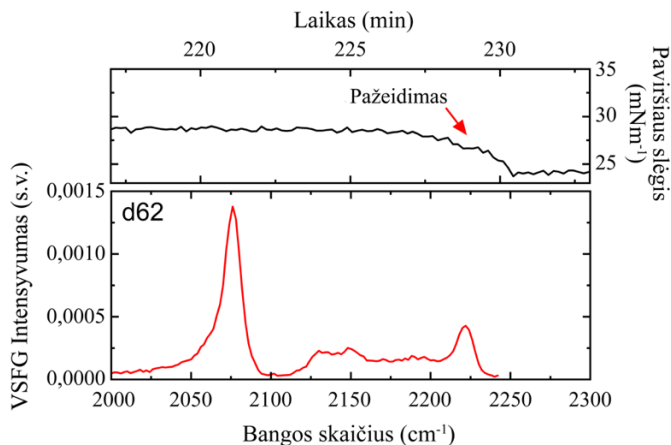
Ląstelių lipidinė membrana yra sudėtinga savitvarkė sistema, kurios struktūra ir savybės apsprendžia jos biologinę funkciją. Daugelis baltymų gali specifiskai jungtis prie tam tikrų lipido polinės galvutės dalių, pvz., arginino ir lizino aminorūgštys pirmiausia sąveikauja su fosfato grupe, o tirozinui ir triptofanui yra būdinga sudaryti ryšį su lipidų gliceroliniais fragmentais.²⁴⁹ Membranos pagrindinių fizikocheminių savybių pokyčiai, atsirandantys dėl lipido polinės galvutės deuterinimo, gali sukelti tikėtinų sąveikų nukrypimus. Būtent dėl šios priežasties antroje disertacijos dalyje didžiausias dėmesys buvo skirtas izotopinio biomimetinių membranų žymėjimo poveikio analizei. Atlikti tik keli tyrimai, kuriuose tiesiogiai lyginami deuterinti ir protiuoti fosfolipidai, rodantys reikšmingus fazinio virsmo temperatūrų skirtumus.^{28-30,236-239,250-253} Šiuo darbu nustatėme reikšmingus VSFG spektrinius pokyčius tarp cholino grupe protiuotų ir deuterintų lipidų, kurie linkę formuoti skirtinga hidrofiliinės galvutės struktūra pasižyminčius monosluoksnius. Tikėtina, jog

struktūriniai veiksniai neapsiriboja tik baltymų prisijungimo ar jų įsiterpimo į membraną kontrole, bet ir sąlygoti baltymo agregacijos nukrypimus.

Atliktų tyrimų metu ištyrėme kaip fosfolipidų izotopinis žymėjimas (H/D) paveikia jų formuojamų modelinių sistemų savybes. Tai yra vienas iš pirmųjų mūsų žinomų VSFG darbų, kuriuose buvo tiriami skirtingą deuterinimo lygį turinčių lipidų (DPPC-d0, DPPC-d13, DPPC-d62 ir DPPC-d75) monosluoksniai skirtinguose virpesiniuose regionuose: metilo/metileno, karbonilo ir hidrofiliinės (fosfato) grupės. Nustatėme, jog mūsų tyrimo atveju metilo/metileno ir karbonilo grupių virpesiai, nėra jautrūs skirtingam lipidų deuterinimui, tačiau fosfato grupės valentinis simetrinis virpesys pademonstravo stiprią cholino grupės deuterinimo reakciją. Deuterintą cholino grupę turintys fosfolipidai, keičiant eksperimento sąlygas (paviršiaus slėgį ir įterpiant Ca^{2+} jonus), sugebėjo išlaikyti gerai hidratuotą fosfato grupę, kai cholino grupę protiuoti lipidai pasižymėjo įprasta dehidratacija. Remiantis gautais pastebėjimais galime teigti, kad lipidų cholino grupės deuterinimas veikia hidrofiliinės fosfato grupės struktūrą, todėl formuojamas monosluoksnis nepraleidžia Ca^{2+} jonų, tačiau išlieka gerai hidratuotas.

PRIEDAS

D₂O paviršiuje suformuoto monosluoksnio pažaida



P4.3. paveikslas. 30 mNm⁻¹ DPPC-d62 monosluoksnio paskleisto ant D₂O paviršiaus VSFG spektras užrašytas kartu stebint paviršiaus slėgio kitimą. Raudona rodyklė žymi spartų paviršiaus slėgio kritimą, kuris gali būti siejamas su monosluoksnio pažaida sąlygota D₂O virpesinės juostos, IR sugerties, krašto.

Papildomas eksperimentas su 30 mNm⁻¹ DPPC-d62 monosluoksniu paskleistu D₂O paviršiuje padėjo nustatyti tiriamo monosluoksnio pažeidimus registruojant aukšto virpesnio dažnio CD₂ juostą. VSFG spektras kartu su paviršiaus slėgio kinetika pavaizduotas P4.3. paveiksle. Monosluoksnio pažaida atsiranda dėl infraraudonosios spinduliuotės sugerties, kuri pataiko į D₂O valentinių virpesių sugerties kraštą, prasidedantį ~2200 cm⁻¹ srityje. Didelės galios infraraudonosios spinduliuotės sugertis paskatina lokalių temperatūros augimą. Parametrui viršijant DPPC fazinio virsmo temperatūrą (41 °C) sukeliama lokali fosfolipido destrukcija. Dėl šios priežasties, registruojant CD virpesių sritį vietoj D₂O buvo naudojamas H₂O.

Spektrinių juostų išskyrimo metu gautų juostų parametų lentelės

P4.1. lentelė. Hidrofilinės fosfato grupės spektrams gauti juostų parametrai. DPPC-d0 ir DPPC-d62 monosluoksniai suformuoti ant D₂O paviršiaus. *A_{NR} fiksuotas dydis.

Lipidai	Priskyrimas	7 mNm ⁻¹	30 mNm ⁻¹	30 mNm ⁻¹ su 0.4 M CaCl ₂		
DPPC-d0	C-OP/ O-C	A _{NR}	0.01			
		φ _{NR} (rad)	4.744 ± 0.058	4.602 ± 0.072	4.693 ± 0.075	
		ω _q (cm ⁻¹)	1074 ± 0.3	1075 ± 0.3	1074 ± 0.4	
		A _q	0.165 ± 0.021	0.242 ± 0.031	0.156 ± 0.021	
		Γ _q (cm ⁻¹)	9.806 ± 0.798	10.09 ± 0.83	10.14 ± 0.96	
		Area	0.009 ± 0.002	0.018 ± 0.005	0.008 ± 0.002	
	PO ₂ ⁻ ss	ω _q (cm ⁻¹)	1095 ± 1.2	1098 ± 0.9	1100 ± 1.1	
		A _q	0.225 ± 0.025	0.369 ± 0.051	0.146 ± 0.028	
		Γ _q (cm ⁻¹)	11.58 ± 0.88	11.88 ± 1.05	12.76 ± 1.69	
		Area	0.014 ± 0.003	0.036 ± 0.010	0.005 ± 0.002	
	PO ₂ ⁻ ss	ω _q (cm ⁻¹)	1106 ± 0.2	1110 ± 0.3	1117 ± 0.3	
		A _q	0.256 ± 0.018	0.40 ± 0.02	0.339 ± 0.024	
		Γ _q (cm ⁻¹)	9.715 ± 0.392	8.40 ± 0.46	12.78 ± 0.57	
		Area	0.021 ± 0.003	0.060 ± 0.006	0.028 ± 0.004	
	DPPC-d62	C-OP/ O-C	A _{NR}	0.01		
			φ _{NR} (rad)	4.718 ± 0.050	4.845 ± 0.065	4.897 ± 0.061
ω _q (cm ⁻¹)			1074 ± 0.4	1075 ± 0.2	1074 ± 0.3	
A _q			0.119 ± 0.020	0.228 ± 0.010	0.194 ± 0.017	
Γ _q (cm ⁻¹)			8.558 ± 0.823	9.633 ± 0.385	10.97 ± 0.67	
Area			0.005 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.011 ± 0.002	
PO ₂ ⁻ ss		ω _q (cm ⁻¹)	1095 ± 1.8	1098 ± 0.5	1104 ± 1.9	
		A _q	0.234 ± 0.041	0.370 ± 0.067	0.158 ± 0.026	
		Γ _q (cm ⁻¹)	13.030 ± 1.533	14.0 ± 1.5	12.02 ± 0.83	
		Area	0.013 ± 0.005	0.031 ± 0.012	0.006 ± 0.002	
PO ₂ ⁻ ss		ω _q (cm ⁻¹)	1106 ± 0.9	1109 ± 0.1	1117 ± 0.3	
		A _q	0.232 ± 0.026	0.407 ± 0.019	0.438 ± 0.037	
		Γ _q (cm ⁻¹)	10.80 ± 1.14	8.378 ± 0.089	14.77 ± 0.66	
		Area	0.016 ± 0.004	0.062 ± 0.006	0.041 ± 0.007	

P4.2. lentelė. Hidrofilinės fosfato grupės spektras gauti juostų parametrai. DPPC-d13 ir DPPC-d75 monosluoksniai suformuoti ant D₂O paviršiaus. *A_{NR} fiksuotas dydis.

Lipidai	Priskyrimas	7 mNm ⁻¹		30 mNm ⁻¹		30 mNm ⁻¹ su 0.4 M CaCl ₂		
DPPC-d13	C-OP/ O-C	A _{NR}	0.01					
		φ _{NR} (rad)	4.46 ± 0.07	4.423 ± 0.071	4.505 ± 0.075			
		ω _q (cm ⁻¹)	1071 ± 0.7	1071 ± 0.8	1076 ± 1.6			
		A _q	0.021 ± 0.008	0.018 ± 0.008	0.008 ± 0.005			
		Γ _q (cm ⁻¹)	4.962 ± 1.620	4.047 ± 1.674	3.000 ± 1.314			
	Area	0.0003 ± 0.0002	0.0003 ± 0.0002	0.0001 ± 0.0001				
	PO ₂ ^{ss}	ω _q (cm ⁻¹)	1093 ± 0.2	1094 ± 0.2	1095 ± 0.2			
		A _q	0.369 ± 0.007	0.482 ± 0.008	0.221 ± 0.009			
		Γ _q (cm ⁻¹)	9.237 ± 0.168	9.375 ± 0.167	9.982 ± 0.417			
		Area	0.046 ± 0.002	0.078 ± 0.003	0.015 ± 0.001			
	C-C / PO ₂ ^{ss}	ω _q (cm ⁻¹)	1120 ± 0.4	1122 ± 0.3	1125 ± 0.4			
		A _q	0.107 ± 0.014	0.145 ± 0.012	0.096 ± 0.009			
		Γ _q (cm ⁻¹)	8.305 ± 0.865	6.857 ± 0.508	8.303 ± 0.792			
		Area	0.004 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.003 ± 0.001			
	N-C	ω _q (cm ⁻¹)	1155 ± 0.8	1154 ± 0.7	1156 ± 0.5			
		A _q	0.038 ± 0.012	0.057 ± 0.006	0.067 ± 0.009			
		Γ _q (cm ⁻¹)	6.15 ± 1.80	6.0 ± 1.6	7.123 ± 1.011			
		Area	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001			
	DPPC-d75	C-OP/ O-C	A _{NR}	0.01				
			φ _{NR} (rad)	4.702 ± 0.051	4.693 ± 0.046	4.794 ± 0.061		
ω _q (cm ⁻¹)			1073 ± 0.4	1073 ± 0.4	1074 ± 1.8			
A _q			0.023 ± 0.002	0.025 ± 0.003	0.010 ± 0.002			
Γ _q (cm ⁻¹)			4.012 ± 1.420	4.13 ± 1.31	4.0 ± 1.2			
Area		0.0004 ± 0.0002	0.0005 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001				
PO ₂ ^{ss}		ω _q (cm ⁻¹)	1092 ± 0.2	1093 ± 0.1	1095 ± 0.3			
		A _q	0.374 ± 0.008	0.504 ± 0.008	0.254 ± 0.011			
		Γ _q (cm ⁻¹)	9.546 ± 0.172	10.05 ± 0.147	12.02 ± 0.427			
		Area	0.046 ± 0.002	0.079 ± 0.003	0.016 ± 0.001			
C-C / PO ₂ ^{ss}		ω _q (cm ⁻¹)	1118 ± 0.4	1121 ± 0.2	1125 ± 0.4			
		A _q	0.135 ± 0.016	0.227 ± 0.012	0.176 ± 0.013			
		Γ _q (cm ⁻¹)	10.21 ± 0.89	9,152 ± 0,402	11,15 ± 0,598			
		Area	0.006 ± 0.001	0.018 ± 0.002	0.009 ± 0.001			
N-C		ω _q (cm ⁻¹)	1155 ± 0.9	1159 ± 0,981	1158 ± 0,478			
		A _q	0.013 ± 0.006	0.017 ± 0.004	0.026 ± 0.006			
		Γ _q (cm ⁻¹)	3.345 ± 1.582	4.0 ± 1.4	4.68 ± 1.01			
		Area	0.0002 ± 0.0002	0.0002 ± 0.0001	0.0004 ± 0.0002			

P4.3. lentelė. Hidrofilinės fosfato grupės spektras gauti juostų parametrai. DPPC-d13 ir DPPC-d62 7 mNm⁻¹ paviršiaus slėgio monosluoksniai be ir su CaCl₂ suformuoti ant D₂O paviršiaus. *A_{NR} fiksuotas dydis.

Lipidai	Priskyrimas	7 mNm ⁻¹	7 mNm ⁻¹ su 0.4 M CaCl ₂	
DPPC-d13	C-OP / O-C	A _{NR}	0.01	
		φ _{NR} (rad)	4.54 ± 0.058	4.5 ± 0.067
		ω _q (cm ⁻¹)	1072 ± 0.8	1075 ± 0.92
		A _q	0.027 ± 0.009	0.004 ± 0.009
		Γ _q (cm ⁻¹)	5.01 ± 1.7	5 ± 1.6
	PO ₂ ss	ω _q (cm ⁻¹)	1092 ± 0.24	1096 ± 0.18
		A _q	0.455 ± 0.008	0.185 ± 0.007
		Γ _q (cm ⁻¹)	9.92 ± 0.184	10.3 ± 0.187
	C-C / PO ₂ ss	ω _q (cm ⁻¹)	1118 ± 0.5	1126 ± 0.45
		A _q	0.099 ± 0.019	0.11 ± 0.012
		Γ _q (cm ⁻¹)	8.1 ± 0.78	13.13 ± 0.508
	N-C	ω _q (cm ⁻¹)	1155 ± 0.84	1154 ± 0.82
		A _q	0.027 ± 0.015	0.057 ± 0.006
		Γ _q (cm ⁻¹)	6.1 ± 1.75	7.8 ± 1.68
	DPPC-d62	C-OP/O-C	A _{NR}	0.01
φ _{NR} (rad)			4.834 ± 0.06	4.65 ± 0.072
ω _q (cm ⁻¹)			1074 ± 0.35	1075 ± 0.21
A _q			0.236 ± 0.024	0.103 ± 0.015
Γ _q (cm ⁻¹)			9.76 ± 0.84	8.5 ± 0.41
PO ₂ ss		ω _q (cm ⁻¹)	1094 ± 1.73	1103 ± 0.6
		A _q	0.35 ± 0.032	0.32 ± 0.071
		Γ _q (cm ⁻¹)	13.71 ± 1.46	15.96 ± 1.72
PO ₂ ss		ω _q (cm ⁻¹)	1105 ± 0.86	1116 ± 0.24
		A _q	0.362 ± 0.031	0.352 ± 0.022
		Γ _q (cm ⁻¹)	10.72 ± 0.94	21.2 ± 0.3

IŠVADOS

1. Palyginus skirtingų vištos kiaušinio baltymo lizocimo struktūrų adsorbciją oras/D₂O fazinėje ribose, nustatyta, kad tūryje suformuotų baltymo darinių hidrofobiškumas yra pagrindinis adsorbciją lemiantis veiksnys. Parodyta, kad natyvioje ar dalinai išsivyniojusioje būsenoje po 30 minučių agregacijos 62 °C temperatūroje HEWL nėra adsorbuojamas oras/D₂O paviršiuje arba adsorbatų koncentracija yra per žema detektuoti su VSFG. Hidrofobiški aiškios struktūros neturintys agregatai paviršiuje stebimi po ≥3 val., o dideli β-klostyta struktūra praturtinti po ≥50 val. HEWL inkubacijos.

2. Ankstyvoje 30 minučių HEWL inkubacijoje DOPG/D₂O fazinėje riboje adsorbuojamos baltyminės struktūros, aiškios formos neturintis baltymas, maži netvarkingi ir didesni β-klostyti agregatai, parodė, kad elektrostatinė sąveika tarp krūvį turinčių baltymo ir fosfolipido dalių yra pagrindinė adsorbciją lemianti jėga.

3. Sistemingas 80 val. inkubuoto lizocimo ir jo formuojamų agregatų krūvio pokytis iš teigiamo į silpnai neigiamą DOPG/D₂O paviršiuje parodė, jog baltymo adsorbcija sąlygota ne tik elektrostatinės bet ir ją papildančios hidrofobinės jėgos. Sąveikos pasikeitimas iš elektrostatinės (pD 4,5) į hidrofobinę (pD 11,4) sukelia VSFG spektre stebimą signalo intensyvumo padidėjimą sietiną su adsorbato orientaciniais pokyčiais paviršiuje.

4. Palyginus skirtingai deuterintus DPPC Langmuir monosluoksnius, nustatyta, kad metilo/metileno ir karbonilo grupių virpesiai nėra jautrūs skirtingam lipidų deuterinimui arba pokyčiai yra per maži detektuoti su VSFG, tačiau fosfato grupės valentinis simetrinis virpesys pademonstravo stiprią cholino grupės deuterinimo reakciją. Deuterintą cholino grupę turintys fosfolipidai, keičiant eksperimento sąlygas (paviršiaus slėgį ir įterpiančią Ca²⁺ jonus), dėl galimai struktūrinių pokyčių išlaikė gerai hidratuotą fosfato grupę, bet Ca²⁺ jonams nepralaidų barjerą. Cholino grupę protiuoti lipidai pasižymėjo įprasta dehidratacija.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- (1) Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Eisenberg, D. S.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. M.; Sekijima, Y.; Sipe, J. D.; Westermark, P. Amyloid Nomenclature 2020: Update and Recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. *Amyloid* **2020**, *27* (4), 217–222. <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>.
- (2) World Health Organization. *Public Health Response to Dementia*; 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240033245>.
- (3) Knowles, T. P. J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. The Amyloid State and Its Association with Protein Misfolding Diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15* (6), 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>.
- (4) Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem* **2017**, *86* (1), 27–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>.
- (5) Bucciantini, M.; Rigacci, S.; Stefani, M. Amyloid Aggregation: Role of Biological Membranes and the Aggregate-Membrane System. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2014**, *5* (3), 517–527. <https://doi.org/10.1021/jz4024354>.
- (6) Liljeblad, J. F. D.; Bulone, V.; Rutland, M. W.; Johnson, C. M. Supported Phospholipid Monolayers. the Molecular Structure Investigated by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (21), 10617–10629. <https://doi.org/10.1021/jp111587e>.
- (7) Dicko, A.; Bourque, H.; Pézolet, M. Study by Infrared Spectroscopy of the Conformation of Dipalmitoylphosphatidylglycerol Monolayers at the Air-Water Interface and Transferred on Solid Substrates. *Chem Phys Lipids* **1998**, *96* (1–2), 125–139. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00084-X).
- (8) Ma, G.; Allen, H. C. DPPC Langmuir Monolayer at the Air-Water Interface: Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Langmuir* **2006**, *22* (12), 5341–5349. <https://doi.org/10.1021/la0535227>.
- (9) Saha, A.; Sengupta, S.; Kumar, A.; Naik, P. D. Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Lipid Monolayer Studied by Sum-Frequency Generation Spectroscopy at Air-Water Interface. *Journal of Physical Chemistry C* **2017**, *121* (24), 13175–13182. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b02294>.

- (10) Wei, F.; Xiong, W.; Li, W.; Lu, W.; Allen, H. C.; Zheng, W. Assembly and Relaxation Behaviours of Phosphatidylethanolamine Monolayers Investigated by Polarization and Frequency Resolved SFG-VS. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (38), 25114–25122. <https://doi.org/10.1039/c5cp03977k>.
- (11) Javanainen, M.; Hua, W.; Tichacek, O.; Delcroix, P.; Cwiklik, L.; Allen, H. C. Structural Effects of Cation Binding to DPPC Monolayers. *Langmuir* **2020**, *36* (50), 15258–15269. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02555>.
- (12) Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N. Phospholipid Phase Transitions in Model and Biological Membranes as Studied by Infrared Spectroscopy. *Chem Phys Lipids* **1991**, *57* (2–3), 213–226. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(91\)90077-O](https://doi.org/10.1016/0009-3084(91)90077-O).
- (13) Feng, R. J.; Li, X.; Zhang, Z.; Lu, Z.; Guo, Y. Spectral Assignment and Orientational Analysis in a Vibrational Sum Frequency Generation Study of DPPC Monolayers at the Air/Water Interface. *Journal of Chemical Physics* **2016**, *145* (24). <https://doi.org/10.1063/1.4972564>.
- (14) Yesudas, F.; Mero, M.; Kneipp, J.; Heiner, Z. High-Resolution and High-Repetition-Rate Vibrational Sum-Frequency Generation Spectroscopy of One- and Two-Component Phosphatidylcholine Monolayers. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (19), 4861–4871. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01690-9>.
- (15) Ma, G.; Allen, H. C. Real-Time Investigation of Lung Surfactant Respreading with Surface Vibrational Spectroscopy. *Langmuir* **2006**, *22* (26), 11267–11274. <https://doi.org/10.1021/la061476k>.
- (16) Ma, G.; Allen, H. C. New Insights into Lung Surfactant Monolayers Using Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Photochem Photobiol* **2006**, *82* (6), 1517–1529. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2006.tb09807.x>.
- (17) Goussous, S. A.; Fellows, A. P.; Casford, M. T. L.; Davies, P. B. A Time Domain Study of Surfactin Penetrating a Phospholipid Monolayer at the Air-Water Interface Investigated Using Sum Frequency Generation Spectroscopy, Infrared Reflection Absorption Spectroscopy, and AFM-Nano Infrared Microscopy. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2019**, *1861* (9), 1568–1578. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.06.004>.

- (18) Liljeblad, J. F. D.; Bulone, V.; Tyrode, E.; Rutland, M. W.; Johnson, C. M. Phospholipid Monolayers Probed by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy: Instability of Unsaturated Phospholipids. *Biophys J* **2010**, *98* (10), L50–L52. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.009>.
- (19) Casillas-Ituarte, N. N.; Chen, X.; Castada, H.; Allen, H. C. Na⁺ and Ca²⁺ Effect on the Hydration and Orientation of the Phosphate Group of DPPC at Air - Water and Air - Hydrated Silica Interfaces. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (29), 9485–9495. <https://doi.org/10.1021/jp1022357>.
- (20) Dreier, L. B.; Bonn, M.; Backus, E. H. G. Hydration and Orientation of Carbonyl Groups in Oppositely Charged Lipid Monolayers on Water. *Journal of Physical Chemistry B* **2019**, *123* (5), 1085–1089. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b12297>.
- (21) Costard, R.; Heisler, I. A.; Elsaesser, T. Structural Dynamics of Hydrated Phospholipid Surfaces Probed by Ultrafast 2D Spectroscopy of Phosphate Vibrations. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2014**, *5* (3), 506–511. <https://doi.org/10.1021/jz402493b>.
- (22) Gurtovenko, A. A.; Vattulainen, I. Effect of NaCl and KCl on Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Lipid Membranes: Insight from Atomic-Scale Simulations for Understanding Salt-Induced Effects in the Plasma Membrane. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (7), 1953–1962. <https://doi.org/10.1021/jp0750708>.
- (23) Arrondo, J. L. R.; Goñi, F. M.; Macarulla, J. M. Infrared Spectroscopy of Phosphatidylcholines in Aqueous Suspension a Study of the Phosphate Group Vibrations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* **1984**, *794* (1), 165–168. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(84\)90310-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(84)90310-2).
- (24) Chen, X.; Hua, W.; Huang, Z.; Allen, H. C. Interfacial Water Structure Associated with Phospholipid Membranes Studied by Phase-Sensitive Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (32), 11336–11342. <https://doi.org/10.1021/ja1048237>.
- (25) Maltseva, E.; Brezesinski, G. Adsorption of Amyloid Beta (1-40) Peptide to Phosphatidylethanolamine Monolayers. *ChemPhysChem* **2004**, *5* (8), 1185–1190. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400045>.

- (26) Lopes, D. H. J.; Meister, A.; Gohlke, A.; Hauser, A.; Blume, A.; Winter, R. Mechanism of Islet Amyloid Polypeptide Fibrillation at Lipid Interfaces Studied by Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. *Biophys J* **2007**, *93* (9), 3132–3141. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.110635>.
- (27) Karaballi, R. A.; Merchant, S.; Power, S. R.; Brosseau, C. L. Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (EC-SERS) Study of the Interaction between Protein Aggregates and Biomimetic Membranes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20* (6), 4513–4526. <https://doi.org/10.1039/c7cp06838g>.
- (28) Bryant, G.; Taylor, M. B.; Darwish, T. A.; Krause-Heuer, A. M.; Kent, B.; Garvey, C. J. Effect of Deuteration on the Phase Behaviour and Structure of Lamellar Phases of Phosphatidylcholines – Deuterated Lipids as Proxies for the Physical Properties of Native Bilayers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2019**, *177* (December 2018), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.040>.
- (29) Guard-Friar, D.; Chen, C. H.; Engle, A. S. Deuterium Isotope Effect on the Stability of Molecules: Phospholipids. *Journal of Physical Chemistry* **1985**, *89* (9), 1810–1813. <https://doi.org/10.1021/j100255a054>.
- (30) Petersen, N. O.; Kroon, P. A.; Kainosho, M.; Chan, S. I. Thermal Phase Transitions in Deuterated Lecithin Bilayers. *Chem Phys Lipids* **1975**, *14* (4), 343–349. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(75\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0009-3084(75)90071-7).
- (31) Burke, K. A.; Yates, E. A.; Legleiter, J. Biophysical Insights into How Surfaces, Including Lipid Membranes, Modulate Protein Aggregation Related to Neurodegeneration. *Front Neurol* **2013**, *4* MAR (March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00017>.
- (32) Aisenbrey, C.; Borowik, T.; Byström, R.; Bokvist, M.; Lindström, F.; Misiak, H.; Sani, M.-A.; Gröbner, G. How Is Protein Aggregation in Amyloidogenic Diseases Modulated by Biological Membranes? *European Biophysics Journal* **2008**, *37* (3), 247–255. <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0237-0>.
- (33) Williams, T. L.; Serpell, L. C. Membrane and Surface Interactions of Alzheimer's A β Peptide - Insights into the Mechanism of Cytotoxicity. *FEBS Journal* **2011**, *278* (20), 3905–3917. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08228.x>.
- (34) Qiang, W.; Yau, W.-M.; Schulte, J. Fibrillation of β Amyloid Peptides in the Presence of Phospholipid Bilayers and the Consequent Membrane Disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848* (1), 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.04.011>.

- (35) Niu, Z.; Zhang, Z.; Zhao, W.; Yang, J. Interactions between Amyloid β Peptide and Lipid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2018**, *1860* (9), 1663–1669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.04.004>.
- (36) Galvagnion, C. The Role of Lipids Interacting with α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* **2017**, *7* (3), 433–450. <https://doi.org/10.3233/JPD-171103>.
- (37) Sharp, J. S.; Forrest, J. A.; Jones, R. A. L. Surface Denaturation and Amyloid Fibril Formation of Insulin at Model Lipid–Water Interfaces. *Biochemistry* **2002**, *41* (52), 15810–15819. <https://doi.org/10.1021/bi020525z>.
- (38) Li, S.; Leblanc, R. M. Aggregation of Insulin at the Interface. *J Phys Chem B* **2014**, *118* (5), 1181–1188. <https://doi.org/10.1021/jp4101202>.
- (39) Sasahara, K.; Morigaki, K.; Okazaki, T.; Hamada, D. Binding of Islet Amyloid Polypeptide to Supported Lipid Bilayers and Amyloid Aggregation at the Membranes. *Biochemistry* **2012**, *51* (35), 6908–6919. <https://doi.org/10.1021/bi300542g>.
- (40) Tan, J.; Zhang, J.; Luo, Y.; Ye, S. Misfolding of a Human Islet Amyloid Polypeptide at the Lipid Membrane Populates through β -Sheet Conformers without Involving α -Helical Intermediates. *J Am Chem Soc* **2019**, *141* (5), 1941–1948. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08537>.
- (41) Rzeźnicka, I. I.; Pandey, R.; Schleegeer, M.; Bonn, M.; Weidner, T. Formation of Lysozyme Oligomers at Model Cell Membranes Monitored with Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Langmuir* **2014**, *30* (26), 7736–7744. <https://doi.org/10.1021/la5010227>.
- (42) al Kayal, T.; Russo, E.; Pieri, L.; Caminati, G.; Berti, D.; Bucciattini, M.; Stefani, M.; Baglioni, P. Interactions of Lysozyme with Phospholipid Vesicles: Effects of Vesicle Biophysical Features on Protein Misfolding and Aggregation. *Soft Matter* **2012**, *8* (35), 9115. <https://doi.org/10.1039/c2sm25992c>.
- (43) Butterfield, S. M.; Lashuel, H. A. Amyloidogenic Protein-Membrane Interactions: Mechanistic Insight from Model Systems. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (33), 5628–5654. <https://doi.org/10.1002/anie.200906670>.
- (44) Kaye, R.; Lasagna-Reeves, C. A. Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, *33* (s1), S67–S78. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129001>.

- (45) Cizas, P.; Budvytyte, R.; Morkuniene, R.; Moldovan, R.; Broccio, M.; Lösche, M.; Niaura, G.; Valincius, G.; Borutaite, V. Size-Dependent Neurotoxicity of β -Amyloid Oligomers. *Arch Biochem Biophys* **2010**, *496* (2), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.02.001>.
- (46) Tesei, G.; Hellstrand, E.; Sanagavarapu, K.; Linse, S.; Sparr, E.; Vácha, R.; Lund, M. Aggregate Size Dependence of Amyloid Adsorption onto Charged Interfaces. *Langmuir* **2018**, *34* (4), 1266–1273. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03155>.
- (47) Grey, M.; Linse, S.; Nilsson, H.; Brundin, P.; Sparr, E. Membrane Interaction of α -Synuclein in Different Aggregation States. *J Parkinsons Dis* **2011**, *1* (4), 359–371. <https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11067>.
- (48) Kim, D. T.; Blanch, H. W.; Radke, C. J. Direct Imaging of Lysozyme Adsorption onto Mica by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2002**, *18* (15), 5841–5850. <https://doi.org/10.1021/la0256331>.
- (49) Ragaliauskas, T.; Mickevicius, M.; Budvytyte, R.; Niaura, G.; Carbonnier, B.; Valincius, G. Adsorption of β -Amyloid Oligomers on Octadecanethiol Monolayers. *J Colloid Interface Sci* **2014**, *425*, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.03.042>.
- (50) Kent, M. S.; Yim, H.; Sasaki, D. Y.; Satija, S.; Majewski, J.; Gog, T. Analysis of Myoglobin Adsorption to Cu(II)–IDA and Ni(II)–IDA Functionalized Langmuir Monolayers by Grazing Incidence Neutron and X-Ray Techniques. *Langmuir* **2004**, *20* (7), 2819–2829. <https://doi.org/10.1021/la036207y>.
- (51) Blume, A.; Kerth, A. Peptide and Protein Binding to Lipid Monolayers Studied by FT-IRRA Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828* (10), 2294–2305. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.014>.
- (52) Nakahara, H.; Lee, S.; Shibata, O. Surface Pressure Induced Structural Transitions of an Amphiphilic Peptide in Pulmonary Surfactant Systems by an in Situ PM-IRRAS Study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828* (4), 1205–1213. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.01.003>.
- (53) Málková, Š.; Long, F.; Stahelin, R. v.; Pingali, S. v.; Murray, D.; Cho, W.; Schlossman, M. L. X-Ray Reflectivity Studies of CPLA2 α -C2 Domains Adsorbed onto Langmuir Monolayers of SOPC. *Biophys J* **2005**, *89* (3), 1861–1873. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061515>.

- (54) Qiao, L.; Ge, A.; Osawa, M.; Ye, S. Structure and Stability Studies of Mixed Monolayers of Saturated and Unsaturated Phospholipids under Low-Level Ozone. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15* (41), 17775. <https://doi.org/10.1039/c3cp52484a>.
- (55) Smits, M.; Sovago, M.; Wurpel, G. W. H.; Kim, D.; Müller, M.; Bonn, M. Polarization-Resolved Broad-Bandwidth Sum-Frequency Generation Spectroscopy of Monolayer Relaxation. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (25), 8878–8883. <https://doi.org/10.1021/jp067453w>.
- (56) Li, Y.; Feng, R.; Lin, L.; Liu, M.; Guo, Y.; Zhang, Z. Ordering Effects of Cholesterol on Sphingomyelin Monolayers Investigated by High-Resolution Broadband Sum-Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. *Chinese Chemical Letters* **2018**, *29* (3), 357–360. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.11.006>.
- (57) Ohe, C.; Sasaki, T.; Noi, M.; Goto, Y.; Itoh, K. Sum Frequency Generation Spectroscopic Study of the Condensation Effect of Cholesterol on a Lipid Monolayer. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *388* (1), 73–79. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1030-0>.
- (58) Sovago, M.; Wurpel, G. W. H.; Smits, M.; Müller, M.; Bonn, M. Calcium-Induced Phospholipid Ordering Depends on Surface Pressure. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (36), 11079–11084. <https://doi.org/10.1021/ja071189i>.
- (59) Pullanchery, S.; Yang, T.; Cremer, P. S. Introduction of Positive Charges into Zwitterionic Phospholipid Monolayers Disrupts Water Structure Whereas Negative Charges Enhances It. *Journal of Physical Chemistry B* **2018**, *122* (51), 12260–12270. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.8b08476>.
- (60) Pohle, W.; Bohl, M.; Böhlig, H. Interpretation of the Influence of Hydrogen Bonding on the Stretching Vibrations of the PO₂ Moiety. *J Mol Struct* **1991**, *242* (C), 333–342. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(91\)87145-8](https://doi.org/10.1016/0022-2860(91)87145-8).
- (61) Pohle, W.; Selle, C.; Fritzsche, H.; Binder, H. Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Probe for the Study of the Hydration of Lipid Self-Assemblies. I. Methodology and General Phenomena. *Biospectroscopy* **1998**, *4* (4), 267–280. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1998\)4:4<267::AID-BSPY5>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1998)4:4<267::AID-BSPY5>3.0.CO;2-%23).
- (62) Tanskanen, M. “Amyloid” — Historical Aspects. In *Amyloidosis*; Dali Feng, Ed.; InTech: London, United Kingdom, 2013; p 13. <https://doi.org/10.5772/53423>.

- (63) Sipe, J. D.; Cohen, A. S. Review: History of the Amyloid Fibril. *J Struct Biol* **2000**, *130* (2–3), 88–98. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4221>.
- (64) Khurana, R.; Uversky, V. N.; Nielsen, L.; Fink, A. L. Is Congo Red an Amyloid-Specific Dye? *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (25), 22715–22721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011499200>.
- (65) Nelson, R.; Eisenberg, D. Structural Models of Amyloid-Like Fibrils. *Adv Protein Chem* **2006**, *73* (06), 235–282. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(06\)73008-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(06)73008-X).
- (66) Fändrich, M.; Dobson, C. M. The Behaviour of Polyamino Acids Reveals an Inverse Side Chain Effect in Amyloid Structure Formation. *EMBO Journal* **2002**, *21* (21), 5682–5690. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf573>.
- (67) Makin, O. S.; Serpell, L. C. Structures for Amyloid Fibrils. *FEBS Journal* **2005**, *272* (23), 5950–5961. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x>.
- (68) Rambaran, R. N.; Serpell, L. C. Amyloid Fibrils: Abnormal Protein Assembly. *Prion* **2008**, *2* (3), 112–117. <https://doi.org/10.4161/pri.2.3.7488>.
- (69) Stefani, M.; Dobson, C. M. Protein Aggregation and Aggregate Toxicity: New Insights into Protein Folding, Misfolding Diseases and Biological Evolution. *J Mol Med* **2003**, *81* (11), 678–699. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5>.
- (70) Eisenberg, D.; Jucker, M. The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* **2012**, *148* (6), 1188–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>.
- (71) Eisenberg, D. S.; Sawaya, M. R. Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annu Rev Biochem* **2017**, *86*, 69–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045104>.
- (72) Kyle, R. A. Amyloidosis: A Convoluted Story. *Br J Haematol* **2001**, *114* (3), 529–538. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02999.x>.
- (73) Thomsen, J. S.; Horn, T.; Schlichting, P. Amyloidosis. A Review. *Ugeskr Laeger* **1999**, *161* (21), 3079–3083. <https://doi.org/10.15761/tim.1000206>.
- (74) Iadanza, M. G.; Jackson, M. P.; Hewitt, E. W.; Ranson, N. A.; Radford, S. E. A New Era for Understanding Amyloid Structures and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19* (12), 755–773. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0060-8>.

- (75) Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu Rev Biochem* **2006**, *75*, 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.
- (76) Pande, M.; Srivastava, R. Molecular and Clinical Insights into Protein Misfolding and Associated Amyloidosis. *Eur J Med Chem* **2019**, *184*, 111753. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111753>.
- (77) Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease. *Nat Med* **2004**, *10* (7), S10. <https://doi.org/10.1038/nm1066>.
- (78) Zoghbi, H. Y.; Beaudet, A. L. Epigenetics and Human Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8* (2), a019497. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019497>.
- (79) Morley, J. F.; Brignull, H. R.; Weyers, J. J.; Morimoto, R. I. The Threshold for Polyglutamine-Expansion Protein Aggregation and Cellular Toxicity Is Dynamic and Influenced by Aging in *Caenorhabditis Elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (16), 10417–10422. <https://doi.org/10.1073/pnas.152161099>.
- (80) Cohen, E.; Dillin, A. The Insulin Paradox: Aging, Proteotoxicity and Neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **2008**, *9* (10), 759–767. <https://doi.org/10.1038/nrn2474>.
- (81) Goto, Y.; Adachi, M.; Muta, H.; So, M. Salt-Induced Formations of Partially Folded Intermediates and Amyloid Fibrils Suggests a Common Underlying Mechanism. *Biophys Rev* **2018**, *10* (2), 493–502. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0370-7>.
- (82) Chaturvedi, S. K.; Siddiqi, M. K.; Alam, P.; Khan, R. H. Protein Misfolding and Aggregation: Mechanism, Factors and Detection. *Process Biochemistry* **2016**, *51* (9), 1183–1192. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.015>.
- (83) Waudby, C. A.; Launay, H.; Cabrita, L. D.; Christodoulou, J. Protein Folding on the Ribosome Studied Using NMR Spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **2013**, *74*, 57–75. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2013.07.003>.
- (84) Uversky, V. N. Unusual Biophysics of Intrinsically Disordered Proteins. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **2013**, *1834* (5), 932–951. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.12.008>.
- (85) Chiti, F.; Dobson, C. M. Amyloid Formation by Globular Proteins under Native Conditions. *Nat Chem Biol* **2009**, *5* (1), 15–22. <https://doi.org/10.1038/nchembio.131>.

- (86) Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. Protein Self-Assembly Intermediates. *Nat Chem Biol* **2013**, *9* (4), 216–217. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1210>.
- (87) 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.; Bertocini, 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**, *149* (5), 1048–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.037>.
- (88) Lee, J.; Culyba, E. K.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. Amyloid- β Forms Fibrils by Nucleated Conformational Conversion of Oligomers. *Nat Chem Biol* **2011**, *7* (9), 602–609. <https://doi.org/10.1038/nchembio.624>.
- (89) Eakin, C. M.; Berman, A. J.; Miranker, A. D. A Native to Amyloidogenic Transition Regulated by a Backbone Trigger. *Nat Struct Mol Biol* **2006**, *13* (3), 202–208. <https://doi.org/10.1038/nsmb1068>.
- (90) Sekijima, Y.; Wiseman, R. L.; Matteson, J.; Hammarström, P.; Miller, S. R.; Sawkar, A. R.; Balch, W. E.; Kelly, J. W. The Biological and Chemical Basis for Tissue-Selective Amyloid Disease. *Cell* **2005**, *121* (1), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.018>.
- (91) Morris, A. M.; Watzky, M. A.; Finke, R. G. Protein Aggregation Kinetics, Mechanism, and Curve-Fitting: A Review of the Literature. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **2009**, *1794* (3), 375–397. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.016>.
- (92) Michaels, T. C. T.; Šarić, A.; Habchi, J.; Chia, S.; Meisl, G.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. Chemical Kinetics for Bridging Molecular Mechanisms and Macroscopic Measurements of Amyloid Fibril Formation. *Annu Rev Phys Chem* **2018**, *69* (February), 273–298. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-050317-021322>.
- (93) Meisl, G.; Kirkegaard, J. B.; Arosio, P.; Michaels, T. C. T.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Linse, S.; Knowles, T. P. J. Molecular Mechanisms of Protein Aggregation from Global Fitting of Kinetic Models. *Nat Protoc* **2016**, *11* (2), 252–272. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.010>.

- (94) Knowles, T. P. J.; Waudby, C. A.; Devlin, G. L.; Cohen, S. I. A.; Aguzzi, A.; Vendruscolo, M.; Terentjev, E. M.; Welland, M. E.; Dobson, C. M. An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science (1979)* **2009**, *326* (5959), 1533–1537. <https://doi.org/10.1126/science.1178250>.
- (95) Adamcik, J.; Mezzenga, R. Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (28), 8370–8382. <https://doi.org/10.1002/anie.201713416>.
- (96) Ferrone, F. A. Assembly of A β Proceeds via Monomeric Nuclei. *J Mol Biol* **2015**, *427* (2), 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.10.028>.
- (97) Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T. The Carboxy Terminus of the .Beta. Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biochemistry* **1993**, *32* (18), 4693–4697. <https://doi.org/10.1021/bi00069a001>.
- (98) Uversky, V. N.; Li, J.; Fink, A. L. Evidence for a Partially Folded Intermediate in α -Synuclein Fibril Formation. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (14), 10737–10744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010907200>.
- (99) Pease, L. F.; Sorci, M.; Guha, S.; Tsai, D. H.; Zachariah, M. R.; Tarlov, M. J.; Belfort, G. Probing the Nucleus Model for Oligomer Formation during Insulin Amyloid Fibrillogenesis. *Biophys J* **2010**, *99* (12), 3979–3985. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.010>.
- (100) Masel, J.; Jansen, V. A. A.; Nowak, M. A. Quantifying the Kinetic Parameters of Prion Replication. *Biophys Chem* **1999**, *77* (2–3), 139–152. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(99\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00016-2).
- (101) Bhattacharyya, A. M.; Thakur, A. K.; Wetzel, R. Polyglutamine Aggregation Nucleation: Thermodynamics of a Highly Unfavorable Protein Folding Reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (43), 15400–15405. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501651102>.
- (102) Serio, T. R.; Cashikar, A. G.; Kowal, A. S.; Sawicki, G. J.; Moslehi, J. J.; Serpell, L.; Arnsdorf, M. F.; Lindquist, S. L. Nucleated Conformational Conversion and the Replication of Conformational Information by a Prion Determinant. *Science (1979)* **2000**, *289* (5483), 1317–1321. <https://doi.org/10.1126/science.289.5483.1317>.

- (103) Wei, L.; Jiang, P.; Xu, W.; Li, H.; Zhang, H.; Yan, L.; Chan-Park, M. B.; Liu, X. W.; Tang, K.; Mu, Y.; Pervushin, K. The Molecular Basis of Distinct Aggregation Pathways of Islet Amyloid Polypeptide. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286 (8), 6291–6300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166678>.
- (104) Zou, Y.; Hao, W.; Li, H.; Gao, Y.; Sun, Y.; Ma, G. New Insight into Amyloid Fibril Formation of Hen Egg White Lysozyme Using a Two-Step Temperature-Dependent FTIR Approach. *Journal of Physical Chemistry B* **2014**, 118 (33), 9834–9843. <https://doi.org/10.1021/jp504201k>.
- (105) Lim, K. H.; Dasari, A. K. R.; Hung, I.; Gan, Z.; Kelly, J. W.; Wright, P. E.; Wemmer, D. E. Solid-State NMR Studies Reveal Native-like β -Sheet Structures in Transthyretin Amyloid. *Biochemistry* **2016**, 55 (37), 5272–5278. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00649>.
- (106) 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. *Nat Struct Biol* **2002**, 9 (4), 308–315. <https://doi.org/10.1038/nsb768>.
- (107) Kumar, S.; Udgaonkar, J. B. Structurally Distinct Amyloid Protofibrils Form on Separate Pathways of Aggregation of a Small Protein. *Biochemistry* **2009**, 48 (27), 6441–6449. <https://doi.org/10.1021/bi900682w>.
- (108) Kreutzer, A. G.; Nowick, J. S. Elucidating the Structures of Amyloid Oligomers with Macrocyclic β -Hairpin Peptides: Insights into Alzheimer's Disease and Other Amyloid Diseases. *Acc Chem Res* **2018**, 51 (3), 706–718. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00554>.
- (109) Salahuddin, P.; Fatima, M. T.; Abdelhameed, A. S.; Nusrat, S.; Khan, R. H. Structure of Amyloid Oligomers and Their Mechanisms of Toxicities: Targeting Amyloid Oligomers Using Novel Therapeutic Approaches. *Eur J Med Chem* **2016**, 114, 41–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.065>.
- (110) Ahmed, M.; Davis, J.; Aucoin, D.; Sato, T.; Ahuja, S.; Aimoto, S.; Elliott, J. I.; van Nostrand, W. E.; Smith, S. O. Structural Conversion of Neurotoxic Amyloid-B1–42 Oligomers to Fibrils. *Nat Struct Mol Biol* **2010**, 17 (5), 561–567. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1799>.
- (111) Morris, K. L.; Serpell, L. C. X-Ray Fibre Diffraction Studies of Amyloid Fibrils. In *Methods in Molecular Biology*; 2012; Vol. 849, pp 121–135. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-551-0_9.

- (112) Sunde, M.; Serpell, L. C.; Bartlam, M.; Fraser, P. E.; Pepys, M. B.; Blake, C. C. F. Common Core Structure of Amyloid Fibrils by Synchrotron X-Ray Diffraction. *J Mol Biol* **1997**, *273* (3), 729–739. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1348>.
- (113) Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J. W.; McFarlane, H. T.; Madsen, A. Ø.; Riek, C.; Eisenberg, D. Atomic Structures of Amyloid Cross- β Spines Reveal Varied Steric Zippers. *Nature* **2007**, *447* (7143), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nature05695>.
- (114) de la Cruz, M. J.; Hattne, J.; Shi, D.; Seidler, P.; Rodriguez, J.; Reyes, F. E.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Weiss, S. C.; Kim, S. K.; Hinck, C. S.; Hinck, A. P.; Calero, G.; Eisenberg, D.; Gonen, T. Atomic-Resolution Structures from Fragmented Protein Crystals with the CryoEM Method MicroED. *Nat Methods* **2017**, *14* (4), 399–402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4178>.
- (115) Qiang, W.; Yau, W.-M.; Lu, J.-X.; Collinge, J.; Tycko, R. Structural Variation in Amyloid- β Fibrils from Alzheimer’s Disease Clinical Subtypes. *Nature* **2017**, *541* (7636), 217–221. <https://doi.org/10.1038/nature20814>.
- (116) Martial, B.; Lefèvre, T.; Auger, M. Understanding Amyloid Fibril Formation Using Protein Fragments: Structural Investigations via Vibrational Spectroscopy and Solid-State NMR. *Biophys Rev* **2018**, *10* (4), 1133–1149. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0427-2>.
- (117) Fitzpatrick, A. W. P.; Debelouchina, G. T.; Bayro, M. J.; Clare, D. K.; Caporini, M. A.; Bajaj, V. S.; Jaroniec, C. P.; Wang, L.; Ladizhansky, V.; Müller, S. A.; MacPhee, C. E.; Waudby, C. A.; Mott, H. R.; De 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- β Amyloid Fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (14), 5468–5473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219476110>.
- (118) Maji, S. K.; Wang, L.; Greenwald, J.; Riek, R. Structure-Activity Relationship of Amyloid Fibrils. *FEBS Lett* **2009**, *583* (16), 2610–2617. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.003>.
- (119) Sawaya, M. R.; Hughes, M. P.; Rodriguez, J. A.; Riek, R.; Eisenberg, D. S. The Expanding Amyloid Family: Structure, Stability, Function, and Pathogenesis. *Cell* **2021**, *184* (19), 4857–4873. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.013>.

- (120) Chatani, E.; Yuzu, K.; Ohhashi, Y.; Goto, Y. Current Understanding of the Structure, Stability and Dynamic Properties of Amyloid Fibrils. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (9), 4349. <https://doi.org/10.3390/ijms22094349>.
- (121) Gallardo, R.; Ranson, N. A.; Radford, S. E. Amyloid Structures: Much More than Just a Cross- β Fold. *Curr Opin Struct Biol* **2020**, *60* (Lc), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.09.001>.
- (122) Fändrich, M.; Nyström, S.; Nilsson, K. P. R.; Böckmann, A.; LeVine, H.; Hammarström, P. Amyloid Fibril Polymorphism: A Challenge for Molecular Imaging and Therapy. *J Intern Med* **2018**, *283* (3), 218–237. <https://doi.org/10.1111/joim.12732>.
- (123) Paravastu, A. K.; Leapman, R. D.; Yau, W.-M.; Tycko, R. Molecular Structural Basis for Polymorphism in Alzheimer's β -Amyloid Fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (47), 18349–18354. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806270105>.
- (124) Kajava, A. v.; Aebi, U.; Steven, A. C. The Parallel Superpleated Beta-Structure as a Model for Amyloid Fibrils of Human Amylin. *J Mol Biol* **2005**, *348* (2), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.029>.
- (125) Baldwin, A. J.; Knowles, T. P. J.; Tartaglia, G. G.; Fitzpatrick, A. W.; Devlin, G. L.; Shammass, S. L.; Waudby, C. A.; Mossuto, M. F.; Meehan, S.; Gras, S. L.; Christodoulou, J.; Anthony-Cahill, S. J.; Barker, P. D.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. Metastability of Native Proteins and the Phenomenon of Amyloid Formation. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (36), 14160–14163. <https://doi.org/10.1021/ja2017703>.
- (126) Knowles, T. P.; Fitzpatrick, A. W.; Meehan, S.; Mott, H. R.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Welland, M. E. Role of Intermolecular Forces in Defining Material Properties of Protein Nanofibrils. *Science (1979)* **2007**, *318* (5858), 1900–1903. <https://doi.org/10.1126/science.1150057>.
- (127) Ganguly, J.; Jog, M. Tauopathy and Movement Disorders—Unveiling the Chameleons and Mimics. *Front Neurol* **2020**, *11* (November). <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.599384>.
- (128) Falcon, B.; Zhang, W.; Murzin, A. G.; Murshudov, G.; Garringer, H. J.; Vidal, R.; Crowther, R. A.; Ghetti, B.; Scheres, S. H. W.; Goedert, M. Structures of Filaments from Pick's Disease Reveal a Novel Tau Protein Fold. *Nature* **2018**, *561* (7721), 137–140. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0454-y>.

- (129) 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**, *568* (7752), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1026-5>.
- (130) Zhang, W.; Tarutani, A.; Newell, K. L.; Murzin, A. G.; Matsubara, T.; Falcon, B.; Vidal, R.; Garringer, H. J.; Shi, Y.; Ikeuchi, T.; Murayama, S.; Ghetti, B.; Hasegawa, M.; Goedert, M.; Scheres, S. H. W. Novel Tau Filament Fold in Corticobasal Degeneration. *Nature* **2020**, *580* (7802), 283–287. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2043-0>.
- (131) Falcon, B.; Zhang, W.; Schweighauser, M.; Murzin, A. G.; Vidal, R.; Garringer, H. J.; Ghetti, B.; Scheres, S. H. W.; Goedert, M. Tau Filaments from Multiple Cases of Sporadic and Inherited Alzheimer's Disease Adopt a Common Fold. *Acta Neuropathol* **2018**, *136* (5), 699–708. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1914-z>.
- (132) Chatani, E.; Yagi, H.; Naiki, H.; Goto, Y. Polymorphism of B2-Microglobulin Amyloid Fibrils Manifested by Ultrasonication-Enhanced Fibril Formation in Trifluoroethanol. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (27), 22827–22837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333310>.
- (133) Tanaka, M.; Chien, P.; Naber, N.; Cooke, R.; Weissman, J. S. Conformational Variations in an Infectious Protein Determine Prion Strain Differences. *Nature* **2004**, *428* (6980), 323–328. <https://doi.org/10.1038/nature02392>.
- (134) Pedersen, J. S.; Dikov, D.; Flink, J. L.; Hjuler, H. A.; Christiansen, G.; Otzen, D. E. The Changing Face of Glucagon Fibrillation: Structural Polymorphism and Conformational Imprinting. *J Mol Biol* **2006**, *355* (3), 501–523. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.100>.
- (135) Sneideris, T.; Darguzis, D.; Botyriute, A.; Grigaliunas, M.; Winter, R.; Smirnovas, V. PH-Driven Polymorphism of Insulin Amyloid-Like Fibrils. *PLoS One* **2015**, *10* (8), e0136602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136602>.
- (136) Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R. Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's β -Amyloid Fibrils. *Science (1979)* **2005**, *307* (5707), 262–265. <https://doi.org/10.1126/science.1105850>.

- (137) Poniková, S.; Antošová, A.; Demjén, E.; Sedláková, D.; Marek, J.; Varhač, R.; Gažová, Z.; Sedlák, E. Lysozyme Stability and Amyloid Fibrillization Dependence on Hofmeister Anions in Acidic PH. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2015**, *20* (6), 921–933. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1276-0>.
- (138) Luo, S. Q.; Huang, C. Y. F.; McClelland, J. F.; Graves, D. J. A Study of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared/Photoacoustic Spectroscopy and Its Application for Recombinant Proteins. *Anal Biochem* **1994**, *216* (1), 67–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1009>.
- (139) Ow, S.-Y.; Dunstan, D. E. The Effect of Concentration, Temperature and Stirring on Hen Egg White Lysozyme Amyloid Formation. *Soft Matter* **2013**, *9* (40), 9692. <https://doi.org/10.1039/c3sm51671g>.
- (140) Frare, E.; Polverino de Laureto, P.; Zurdo, J.; Dobson, C. M.; Fontana, A. A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme. *J Mol Biol* **2004**, *340* (5), 1153–1165. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.056>.
- (141) Arnaudov, L. N.; de Vries, R. Thermally Induced Fibrillar Aggregation of Hen Egg White Lysozyme. *Biophys J* **2005**, *88* (1), 515–526. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048819>.
- (142) Hill, S. E.; Robinson, J.; Matthews, G.; Muschol, M. Amyloid Protofibrils of Lysozyme Nucleate and Grow Via Oligomer Fusion. *Biophys J* **2009**, *96* (9), 3781–3790. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.044>.
- (143) Mishra, R.; Sörgjerd, K.; Nyström, S.; Nordigården, A.; Yu, Y.-C.; Hammarström, P. Lysozyme Amyloidogenesis Is Accelerated by Specific Nicking and Fragmentation but Decelerated by Intact Protein Binding and Conversion. *J Mol Biol* **2007**, *366* (3), 1029–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.084>.
- (144) Kumar, S.; Ravi, V. K.; Swaminathan, R. How Do Surfactants and DTT Affect the Size, Dynamics, Activity and Growth of Soluble Lysozyme Aggregates? *Biochemical Journal* **2008**, *415* (2), 275–288. <https://doi.org/10.1042/BJ20071499>.
- (145) Goda, S.; Takano, K.; Yutani, K.; Yamagata, Y.; Nagata, R.; Akutsu, H.; Maki, S.; Namba, K. Amyloid Protofilament Formation of Hen Egg Lysozyme in Highly Concentrated Ethanol Solution. *Protein Science* **2008**, *9* (2), 369–375. <https://doi.org/10.1110/ps.9.2.369>.

- (146) Vernaglia, B. A.; Huang, J.; Clark, E. D. Guanidine Hydrochloride Can Induce Amyloid Fibril Formation from Hen Egg-White Lysozyme. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (4), 1362–1370. <https://doi.org/10.1021/bm0498979>.
- (147) Khan, J. M.; Qadeer, A.; Chaturvedi, S. K.; Ahmad, E.; Abdul Rehman, S. A.; Gourinath, S.; Khan, R. H. SDS Can Be Utilized as an Amyloid Inducer: A Case Study on Diverse Proteins. *PLoS One* **2012**, *7* (1), e29694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029694>.
- (148) Zou, Y.; Li, Y.; Hao, W.; Hu, X.; Ma, G. Parallel β -Sheet Fibril and Antiparallel β -Sheet Oligomer: New Insights into Amyloid Formation of Hen Egg White Lysozyme under Heat and Acidic Condition from FTIR Spectroscopy. *J Phys Chem B* **2013**, *117* (15), 4003–4013. <https://doi.org/10.1021/jp4003559>.
- (149) Hirano, A.; Yoshikawa, H.; Matsushita, S.; Yamada, Y.; Shiraki, K. Adsorption and Disruption of Lipid Bilayers by Nanoscale Protein Aggregates. *Langmuir* **2012**, *28* (8), 3887–3895. <https://doi.org/10.1021/la204717c>.
- (150) Swaminathan, R.; Ravi, V. K.; Kumar, S.; Kumar, M. V. S.; Chandra, N. *Lysozyme: A Model Protein for Amyloid Research*; 2011; Vol. 84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3>.
- (151) Zagorski, M. G.; Yang, J.; Shao, H.; Ma, K.; Zeng, H.; Hong, A. [13] Methodological and Chemical Factors Affecting Amyloid β Peptide Amyloidogenicity. In *Methods Enzymology*; 1999; Vol. 309, pp 189–204. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09015-1).
- (152) Hellstrand, E.; Boland, B.; Walsh, D. M.; Linse, S. Amyloid β -Protein Aggregation Produces Highly Reproducible Kinetic Data and Occurs by a Two-Phase Process. *ACS Chem Neurosci* **2010**, *1* (1), 13–18. <https://doi.org/10.1021/cn900015v>.
- (153) Brender, J. R.; Krishnamoorthy, J.; Sciacca, M. F. M.; Vivekanandan, S.; D’Urso, L.; Chen, J.; la Rosa, C.; Ramamoorthy, A. Probing the Sources of the Apparent Irreproducibility of Amyloid Formation: Drastic Changes in Kinetics and a Switch in Mechanism Due to Micellelike Oligomer Formation at Critical Concentrations of IAPP. *J Phys Chem B* **2015**, *119* (7), 2886–2896. <https://doi.org/10.1021/jp511758w>.
- (154) Wertz, C. F.; Santore, M. M. Adsorption and Reorientation Kinetics of Lysozyme on Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* **2002**, *18* (4), 1190–1199. <https://doi.org/10.1021/la0108813>.

- (155) Gorbenko, G. P.; Ioffe, V. M.; Kinnunen, P. K. J. Binding of Lysozyme to Phospholipid Bilayers: Evidence for Protein Aggregation upon Membrane Association. *Biophys J* **2007**, *93* (1), 140–153. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.102749>.
- (156) Choucair, A.; Chakrapani, M.; Chakravarthy, B.; Katsaras, J.; Johnston, L. J. Preferential Accumulation of A β (1–42) on Gel Phase Domains of Lipid Bilayers: An AFM and Fluorescence Study. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2007**, *1768* (1), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.005>.
- (157) Musteikytė, G.; Jayaram, A. K.; Xu, C. K.; Vendruscolo, M.; Krainer, G.; Knowles, T. P. J. Interactions of α -Synuclein Oligomers with Lipid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2021**, *1863* (4), 183536. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183536>.
- (158) Hausteiner, E.; Schwille, P. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2007**, *36* (1), 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612>.
- (159) Li, H.; Lantz, R.; Du, D. Vibrational Approach to the Dynamics and Structure of Protein Amyloids. *Molecules* **2019**, *24* (1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24010186>.
- (160) Fu, L.; Liu, J.; Yan, E. C. Y. Chiral Sum Frequency Generation Spectroscopy for Characterizing Protein Secondary Structures at Interfaces. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (21), 8094–8097. <https://doi.org/10.1021/ja201575e>.
- (161) Stefaniu, C.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers as Models to Study Processes at Membrane Surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* **2014**, *208*, 197–213. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.02.013>.
- (162) Bernardino de la Serna, J.; Schütz, G. J.; Eggeling, C.; Cebecauer, M. There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front Cell Dev Biol* **2016**, *4* (SEP), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00106>.
- (163) Fernandis, A. Z.; Wenk, M. R. Membrane Lipids as Signaling Molecules. *Curr Opin Lipidol* **2007**, *18* (2), 121–128. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328082e4d5>.
- (164) Luchini, A.; Vitiello, G. Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies. *Biomimetics* **2021**, *6* (1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6010003>.

- (165) Vance, J. E. Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. *Traffic* **2015**, *16* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/tra.12230>.
- (166) Lombard, J. Once upon a Time the Cell Membranes: 175 Years of Cell Boundary Research. *Biol Direct* **2014**, *9* (1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13062-014-0032-7>.
- (167) Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the Diversity of Membrane Lipid Composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19* (5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
- (168) Siontorou, C.; Nikoleli, G.-P.; Nikolelis, D.; Karapetis, S. Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future. *Membranes (Basel)* **2017**, *7* (3), 38. <https://doi.org/10.3390/membranes7030038>.
- (169) van Meer, G.; de Kroon, A. I. P. M. Lipid Map of the Mammalian Cell. *J Cell Sci* **2011**, *124* (1), 5–8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>.
- (170) Symons, J. L.; Cho, K.-J.; Chang, J. T.; Du, G.; Waxham, M. N.; Hancock, J. F.; Levental, I.; Levental, K. R. Lipidomic Atlas of Mammalian Cell Membranes Reveals Hierarchical Variation Induced by Culture Conditions, Subcellular Membranes, and Cell Lineages. *Soft Matter* **2021**, *17* (2), 288–297. <https://doi.org/10.1039/D0SM00404A>.
- (171) Kobayashi, T.; Menon, A. K. Transbilayer Lipid Asymmetry. *Current Biology* **2018**, *28* (8), R386–R391. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.007>.
- (172) Daleke, D. L. Regulation of Transbilayer Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry. *J Lipid Res* **2003**, *44* (2), 233–242. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200019-JLR200>.
- (173) Rivel, T.; Ramseyer, C.; Yesylevskyy, S. The Asymmetry of Plasma Membranes and Their Cholesterol Content Influence the Uptake of Cisplatin. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 5627. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41903-w>.
- (174) Bevers, E. M.; Williamson, P. L. Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiol Rev* **2016**, *96* (2), 605–645. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2015>.
- (175) Veatch, S. L.; Polozov, I. V.; Gawrisch, K.; Keller, S. L. Liquid Domains in Vesicles Investigated by NMR and Fluorescence Microscopy. *Biophys J* **2004**, *86* (5), 2910–2922. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74342-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74342-8).

- (176) Brzustowicz, M. R.; Brunger, A. T. X-Ray Scattering from Unilamellar Lipid Vesicles. *J Appl Crystallogr* **2005**, *38* (1), 126–131. <https://doi.org/10.1107/S0021889804029206>.
- (177) Berti, D.; Caminati, G.; Baglioni, P. Functional Liposomes and Supported Lipid Bilayers: Towards the Complexity of Biological Archetypes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (19), 8769. <https://doi.org/10.1039/c0cp02400g>.
- (178) Doktorova, M.; Heberle, F. A.; Eicher, B.; Standaert, R. F.; Katsaras, J.; London, E.; Pabst, G.; Marquardt, D. Preparation of Asymmetric Phospholipid Vesicles for Use as Cell Membrane Models. *Nat Protoc* **2018**, *13* (9), 2086–2101. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0033-6>.
- (179) Marquardt, D.; Geier, B.; Pabst, G. Asymmetric Lipid Membranes: Towards More Realistic Model Systems. *Membranes (Basel)* **2015**, *5* (2), 180–196. <https://doi.org/10.3390/membranes5020180>.
- (180) M, E.; M, D.; Eeman, M.; Deleu, M. From Biological Membranes to Biomimetic Model Membranes. *Focus (Madison)* **2010**, *14* (4), 719–736.
- (181) Clifton, L. A.; Campbell, R. A.; Sebastiani, F.; Campos-Terán, J.; Gonzalez-Martinez, J. F.; Björklund, S.; Sotres, J.; Cárdenas, M. Design and Use of Model Membranes to Study Biomolecular Interactions Using Complementary Surface-Sensitive Techniques. *Adv Colloid Interface Sci* **2020**, *277*, 102118. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102118>.
- (182) Steinem, C.; Janshoff, A. Multicomponent Membranes on Solid Substrates: Interfaces for Protein Binding. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2010**, *15* (6), 479–488. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.06.004>.
- (183) Ragaliauskas, T.; Mickevicius, M.; Rakovska, B.; Penkauskas, T.; Vanderah, D. J.; Heinrich, F.; Valincius, G. Fast Formation of Low-Defect-Density Tethered Bilayers by Fusion of Multilamellar Vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2017**, *1859* (5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.015>.
- (184) Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design. *Surf Sci Rep* **2006**, *61* (10), 429–444. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2006.06.001>.
- (185) Giner-Casares, J. J.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers as Unique Physical Models. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2014**, *19* (3), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.07.006>.

- (186) Alvarez, A. B.; Caruso, B.; Rodríguez, P. E. A.; Petersen, S. B.; Fidelio, G. D. A β -Amyloid Fibrils Are Self-Triggered by the Interfacial Lipid Environment and Low Peptide Content. *Langmuir* **2020**, *36* (28), 8056–8065. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00468>.
- (187) Fu, L.; Ma, G.; Yan, E. C. Y. In Situ Misfolding of Human Islet Amyloid Polypeptide at Interfaces Probed by Vibrational Sum Frequency Generation. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (15), 5405–5412. <https://doi.org/10.1021/ja909546b>.
- (188) Guyot-Sionnest, P.; Hunt, J. H.; Shen, Y. R. Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy of a Langmuir Film: Study of Molecular Orientation of a Two-Dimensional System. *Phys Rev Lett* **1987**, *59* (14), 1597–1600. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.59.1597>.
- (189) Richmond, G. L. Molecular Bonding and Interactions at Aqueous Surfaces as Probed by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy. *Chem Rev* **2002**, *102* (8), 2693–2724. <https://doi.org/10.1021/cr0006876>.
- (190) Watry, M. R.; Brown, M. G.; Richmond, G. L. Probing Molecular Structure at Liquid Surfaces with Vibrational Sum Frequency Spectroscopy. *Appl Spectrosc* **2001**, *55* (10), 321A–340A. <https://doi.org/10.1366/0003702011953441>.
- (191) Strazdaite, S.; Roeters, S. J.; Sakalauskas, A.; Sneideris, T.; Kirschner, J.; Pedersen, K. B.; Schiøtt, B.; Jensen, F.; Weidner, T.; Smirnovas, V.; Niaura, G. Interaction of Amyloid- β -(1–42) Peptide and Its Aggregates with Lipid/Water Interfaces Probed by Vibrational Sum-Frequency Generation Spectroscopy. *J Phys Chem B* **2021**, *125* (40), 11208–11218. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c04882>.
- (192) Yan, E. C. Y.; Wang, Z.; Fu, L. Proteins at Interfaces Probed by Chiral Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. *J Phys Chem B* **2015**, *119* (7), 2769–2785. <https://doi.org/10.1021/jp508926e>.
- (193) Feng, R. Juan; Lin, L.; Li, Y. yi; Liu, M. hua; Guo, Y.; Zhang, Z. Effect of Ca²⁺ to Sphingomyelin Investigated by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. *Biophys J* **2017**, *112* (10), 2173–2183. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.04.026>.
- (194) Wang, H. F.; Gan, W.; Lu, R.; Rao, Y.; Wu, B. H. Quantitative Spectral and Orientational Analysis in Surface Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy (SFG-VS). *Int Rev Phys Chem* **2005**, *24* (2), 191–256. <https://doi.org/10.1080/01442350500225894>.

- (195) Fu, L.; Wang, Z.; Psciuk, B. T.; Xiao, D.; Batista, V. S.; Yan, E. C. Y. Characterization of Parallel β -Sheets at Interfaces by Chiral Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**, *6* (8), 1310–1315. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b00326>.
- (196) Wang, Z.; Fu, L.; Yan, E. C. Y. C–H Stretch for Probing Kinetics of Self-Assembly into Macromolecular Chiral Structures at Interfaces by Chiral Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Langmuir* **2013**, *29* (12), 4077–4083. <https://doi.org/10.1021/la304954h>.
- (197) Wang, Z.; Fu, L.; Ma, G.; Yan, E. C. Y. Broad-Bandwidth Chiral Sum Frequency Generation Spectroscopy for Probing the Kinetics of Proteins at Interfaces. *Langmuir* **2015**, *31* (42), 11384–11398. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02100>.
- (198) Nguyen, K. T.; King, J. T.; Chen, Z. Orientation Determination of Interfacial β -Sheet Structures in Situ. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (25), 8291–8300. <https://doi.org/10.1021/jp102343h>.
- (199) Lu, T.; Guo, W.; Datar, P. M.; Xin, Y.; Marsh, E. N. G.; Chen, Z. Probing Protein Aggregation at Buried Interfaces: Distinguishing between Adsorbed Protein Monomers, Dimers, and a Monomer–Dimer Mixture in Situ. *Chem Sci* **2022**, *13* (4), 975–984. <https://doi.org/10.1039/d1sc04300e>.
- (200) Dubietis, A. *Netiesinė optika: universiteto vadovėlis*; Vilniaus universiteto leidykla: Vilnius, 2011.
- (201) Lambert, A. G.; Davies, P. B.; Neivandt, D. J. Implementing the Theory of Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy: A Tutorial Review. *Appl Spectrosc Rev* **2005**, *40* (2), 103–145. <https://doi.org/10.1081/ASR-200038326>.
- (202) Robert W. Boyd. Nonlinear Optics. In *Nonlinear Optics*; Academic Press: Rochester, 2008; Vol. 3, p 620.
- (203) Choudhary, S.; Boyd, R. W. *Tutorial on Nonlinear Optics*; 2016. <https://doi.org/10.3254/978-1-61499-647-7-31>.
- (204) Singh, P. C.; Ahmed, M.; Nihonyanagi, S.; Yamaguchi, S.; Tahara, T. DNA-Induced Reorganization of Water at Model Membrane Interfaces Investigated by Heterodyne-Detected Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2022**, *126* (4), 840–846. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.1c08581>.

- (205) Zhou, D.; Ge, A.; Kogina, T.; Inoue, K.; Chen, Y.-X.; Ye, S. Molecular Structures at Nafion/Graphene Interfaces Investigated by Sum-Frequency Generation Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* **2022**, *126* (14), 6523–6530. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c01641>.
- (206) Perets, E. A.; Olesen, K. B.; Yan, E. C. Y. Chiral Sum Frequency Generation Spectroscopy Detects Double-Helix DNA at Interfaces. *Langmuir* **2022**, *38* (18), 5765–5778. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c00365>.
- (207) Hong, Y.; He, J.; Zhang, C.; Wang, X. Probing the Structure of Water at the Interface with Graphene Oxide Using Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* **2022**, *126* (3), 1471–1480. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c08328>.
- (208) Yu, C.-C.; Seki, T.; Chiang, K.-Y.; Tang, F.; Sun, S.; Bonn, M.; Nagata, Y. Polarization-Dependent Heterodyne-Detected Sum-Frequency Generation Spectroscopy as a Tool to Explore Surface Molecular Orientation and Ångström-Scale Depth Profiling. *J Phys Chem B* **2022**, *126* (33), 6113–6124. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c02178>.
- (209) Balos, V.; Garling, T.; Duque, A. D.; John, B.; Wolf, M.; Thämer, M. Phase-Sensitive Vibrational Sum and Difference Frequency-Generation Spectroscopy Enabling Nanometer-Depth Profiling at Interfaces. *The Journal of Physical Chemistry C* **2022**, *126* (26), 10818–10832. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c01324>.
- (210) Balzerowski, P.; Meister, K.; Versluis, J.; Bakker, H. J. Heterodyne-Detected Sum Frequency Generation Spectroscopy of Polyacrylic Acid at the Air/Water-Interface. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18* (4), 2481–2487. <https://doi.org/10.1039/C5CP06177F>.
- (211) Backus, E. H. G.; Cyran, J. D.; Grechko, M.; Nagata, Y.; Bonn, M. Time-Resolved Sum Frequency Generation Spectroscopy: A Quantitative Comparison between Intensity and Phase-Resolved Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* **2018**, *122* (9), 2401–2410. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b12303>.
- (212) Pickering, J. D.; Bregnhøj, M.; Chatterley, A. S.; Rasmussen, M. H.; Strunge, K.; Weidner, T. Tutorials in Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. I. The Foundations. *Biointerphases* **2022**, *17* (1), 011201. <https://doi.org/10.1116/6.0001401>.
- (213) Okuno, M.; Ishibashi, T. Heterodyne-Detected Achiral and Chiral Vibrational Sum Frequency Generation of Proteins at Air/Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119* (18), 9947–9954. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01937>.

- (214) Wang, J.; Chen, X.; Clarke, M. L.; Chen, Z. Detection of Chiral Sum Frequency Generation Vibrational Spectra of Proteins and Peptides at Interfaces in Situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102* (14), 4978–4983. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501206102>.
- (215) Yan, E. C. Y.; Fu, L.; Wang, Z.; Liu, W. Biological Macromolecules at Interfaces Probed by Chiral Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Chem Rev* **2014**, *114* (17), 8471–8498. <https://doi.org/10.1021/cr4006044>.
- (216) Nguyen, K. T.; King, J. T.; Chen, Z. Orientation Determination of Interfacial β -Sheet Structures in Situ. *J Phys Chem B* **2010**, *114* (25), 8291–8300. <https://doi.org/10.1021/jp102343h>.
- (217) Engel, M. F. M.; VandenAkker, C. C.; Schleegeer, M.; Velikov, K. P.; Koenderink, G. H.; Bonn, M. The Polyphenol EGCG Inhibits Amyloid Formation Less Efficiently at Phospholipid Interfaces than in Bulk Solution. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (36), 14781–14788. <https://doi.org/10.1021/ja3031664>.
- (218) Frisch, M.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, Ga. Gaussian 09, Revision D. 01. Gaussian, Inc., Wallingford CT 2009.
- (219) Jamróz, M. H. Vibrational Energy Distribution Analysis (VEDA): Scopes and Limitations. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2013**, *114*, 220–230. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2013.05.096>.
- (220) Ruggeri, F. S.; Charmet, J.; Kartanas, T.; Peter, Q.; Chia, S.; Habchi, J.; Dobson, C. M.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J. Microfluidic Deposition for Resolving Single-Molecule Protein Architecture and Heterogeneity. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 3890. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06345-4>.
- (221) Y.G. Pan, S. Banerjee, K. Zagorski, L.S. Shlyakhtenko, A. B. K. and Y. L. L. 1. A Molecular Model of the Surface-Assisted Protein Aggregation Process. **2018**, 1–15.
- (222) Decatur, S. M. Elucidation of Residue-Level Structure and Dynamics of Polypeptides via Isotope-Edited Infrared Spectroscopy. *Acc Chem Res* **2006**, *39* (3), 169–175. <https://doi.org/10.1021/ar050135f>.
- (223) Moran, S. D.; Zanni, M. T. How to Get Insight into Amyloid Structure and Formation from Infrared Spectroscopy. *J Phys Chem Lett* **2014**, *5* (11), 1984–1993. <https://doi.org/10.1021/jz500794d>.

- (224) Sarroukh, R.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V. ATR-FTIR: A “Rejuvenated” Tool to Investigate Amyloid Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828* (10), 2328–2338. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.012>.
- (225) Barth, A. Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2007**, *1767* (9), 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>.
- (226) Takei, K.; Takahashi, R.; Noguchi, T. Correlation between the Hydrogen-Bond Structures and the C=O Stretching Frequencies of Carboxylic Acids as Studied by Density Functional Theory Calculations: Theoretical Basis for Interpretation of Infrared Bands of Carboxylic Groups in Proteins. *J Phys Chem B* **2008**, *112* (21), 6725–6731. <https://doi.org/10.1021/jp801151k>.
- (227) Alahverdijeva, V. S.; Grigoriev, D. O.; Ferri, J. K.; Fainerman, V. B.; Aksenenko, E. V.; Leser, M. E.; Michel, M.; Miller, R. Adsorption Behaviour of Hen Egg-White Lysozyme at the Air/Water Interface. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2008**, *323* (1–3), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.12.031>.
- (228) Miranda, P. B.; Shen, Y. R. Liquid Interfaces: A Study by Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy. *J Phys Chem B* **1999**, *103* (17), 3292–3307. <https://doi.org/10.1021/jp9843757>.
- (229) Vosough, F.; Barth, A. Characterization of Homogeneous and Heterogeneous Amyloid-B42 Oligomer Preparations with Biochemical Methods and Infrared Spectroscopy Reveals a Correlation between Infrared Spectrum and Oligomer Size. *ACS Chem Neurosci* **2021**, *12* (3), 473–488. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00642>.
- (230) Pansieri, J.; Halim, M. A.; Vendrely, C.; Dumoulin, M.; Legrand, F.; Sallanon, M. M.; Chierici, S.; Denti, S.; Dagany, X.; Dugourd, P.; Marquette, C.; Antoine, R.; Forge, V. Mass and Charge Distributions of Amyloid Fibers Involved in Neurodegenerative Diseases: Mapping Heterogeneity and Polymorphism. *Chem Sci* **2018**, *9* (10), 2791–2796. <https://doi.org/10.1039/C7SC04542E>.
- (231) Yudintseva, A.; Trusova, V. Interaction of Lysozyme Amyloid Fibrils with Langmuir Monolayers. *Journal of Biological Physics and Chemistry* **2013**, *13* (3), 77–84. <https://doi.org/10.4024/06YU13A.jbpc.13.03>.

- (232) Arce, F. T.; Jang, H.; Ramachandran, S.; Landon, P. B.; Nussinov, R.; Lal, R. Polymorphism of Amyloid β Peptide in Different Environments: Implications for Membrane Insertion and Pore Formation. *Soft Matter* **2011**, *7* (11), 5267–5273. <https://doi.org/10.1039/c1sm05162h>.
- (233) Poojari, C.; Kukul, A.; Strodel, B. How the Amyloid- β Peptide and Membranes Affect Each Other: An Extensive Simulation Study. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2013**, *1828* (2), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.001>.
- (234) Hellstrand, E.; Grey, M.; Ainalem, M. L.; Ankner, J.; Forsyth, V. T.; Fragneto, G.; Haertlein, M.; Dauvergne, M. T.; Nilsson, H.; Brundin, P.; Linse, S.; Nylander, T.; Sparr, E. Adsorption of α -Synuclein to Supported Lipid Bilayers: Positioning and Role of Electrostatics. *ACS Chem Neurosci* **2013**, *4* (10), 1339–1351. <https://doi.org/10.1021/cn400066t>.
- (235) Gorbenko, G. P.; Kinnunen, P. K. J. The Role of Lipid–Protein Interactions in Amyloid-Type Protein Fibril Formation. *Chem Phys Lipids* **2006**, *141* (1–2), 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.02.006>.
- (236) Sunder, S.; Cameron, D.; Mantsch, H. H.; Bernstein, H. J. Infrared and Laser Raman Studies of Deuterated Model Membranes: Phase Transition in 1,2-Perdeuterodipalmitoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine. *Can J Chem* **1978**, *56* (16), 2121–2126. <https://doi.org/10.1139/v78-346>.
- (237) Gaber, B. P.; Yager, P.; Peticolas, W. L. Interpretation of Biomembrane Structure by Raman Difference Spectroscopy. Nature of the Endothermic Transitions in Phosphatidylcholines. *Biophys J* **1978**, *21* (2), 161–176. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85516-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85516-7).
- (238) Gaber, B. P.; Yager, P.; Peticolas, W. L. Deuterated Phospholipids as Nonperturbing Components for Raman Studies of Biomembranes. *Biophys J* **1978**, *22* (2), 191–207. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85484-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85484-8).
- (239) Luchini, A.; Delhom, R.; Demé, B.; Laux, V.; Moulin, M.; Haertlein, M.; Pichler, H.; Strohmeier, G. A.; Wacklin, H.; Fragneto, G. The Impact of Deuteration on Natural and Synthetic Lipids: A Neutron Diffraction Study. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2018**, *168*, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.009>.
- (240) Florián, J.; Baumruk, V.; Štrajbl, M.; Bednářová, L.; Štěpánek, J. IR and Raman Spectra, Conformational Flexibility, and Scaled Quantum Mechanical Force Fields of Sodium Dimethyl Phosphate and Dimethyl Phosphate Anion. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100* (5), 1559–1568. <https://doi.org/10.1021/jp9520299>.

- (241) Hübner, W.; Mantsch, H. H. Orientation of Specifically $^{13}\text{C}=\text{O}$ Labeled Phosphatidylcholine Multilayers from Polarized Attenuated Total Reflection FT-IR Spectroscopy. *Biophys J* **1991**, *59* (6), 1261–1272. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82341-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82341-4).
- (242) Guan, Y.; Thomas, G. J. Vibrational Analysis of Nucleic Acids. IV. Normal Modes of the DNA Phosphodiester Structure Modeled by Diethyl Phosphate. *Biopolymers* **1998**, *39* (6), 813–835. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199612\)39:6<813::AID-BIP7>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199612)39:6<813::AID-BIP7>3.0.CO;2-Y).
- (243) Pasenkiewicz-Gierula, M.; Takaoka, Y.; Miyagawa, H.; Kitamura, K.; Kusumi, A. Hydrogen Bonding of Water to Phosphatidylcholine in the Membrane as Studied by a Molecular Dynamics Simulation: Location, Geometry, and Lipid-Lipid Bridging via Hydrogen-Bonded Water. *Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101* (20), 3677–3691. <https://doi.org/10.1021/jp962099v>.
- (244) Cordoní, A.; Edholm, O.; Perez, J. J. Effect of Ions on a Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Bilayer. A Molecular Dynamics Simulation Study. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (5), 1397–1408. <https://doi.org/10.1021/jp073897w>.
- (245) Tyrode, E.; Hedberg, J. A Comparative Study of the CD and CH Stretching Spectral Regions of Typical Surfactants Systems Using VSFS: Orientation Analysis of the Terminal CH 3 and CD 3 Groups. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (1), 1080–1091. <https://doi.org/10.1021/jp210013g>.
- (246) Le-Deygen, I. M.; Safronova, A. S.; Mamaeva, P. v.; Skuredina, A. A.; Kudryashova, E. v. Cholesterol Significantly Affects the Interactions between Pirfenidone and DPPC Liposomes: Spectroscopic Studies. *Biophysica* **2022**, *2* (1), 79–88. <https://doi.org/10.3390/biophysica2010008>.
- (247) Lewis, R. N.; McElhaney, R. N.; Pohle, W.; Mantsch, H. H. Components of the Carbonyl Stretching Band in the Infrared Spectra of Hydrated 1,2-Diacylglycerolipid Bilayers: A Reevaluation. *Biophys J* **1994**, *67* (6), 2367–2375. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80723-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80723-4).
- (248) Galbiati, E.; Zoppo, M. del; Tieghi, G.; Zerbi, G. Dipole-Dipole Interactions in Simple Esters and in Liquid-Crystal Polyesters. *Polymer (Guildf)* **1993**, *34* (9), 1806–1810. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(93\)90420-F](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90420-F).

- (249) Newport, T. D.; Sansom, M. S. P.; Stansfeld, P. J. The MemProtMD Database: A Resource for Membrane-Embedded Protein Structures and Their Lipid Interactions. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47* (D1), D390–D397. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1047>.
- (250) Davis, J. H. Deuterium Magnetic Resonance Study of the Gel and Liquid Crystalline Phases of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine. *Biophys J* **1979**, *27* (3), 339–358. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(79\)85222-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(79)85222-4).
- (251) Aussenac, F.; Laguerre, M.; Schmitter, J.-M.; Dufourc, E. J. Detailed Structure and Dynamics of Bicelle Phospholipids Using Selectively Deuterated and Perdeuterated Labels. 2 H NMR and Molecular Mechanics Study. *Langmuir* **2003**, *19* (25), 10468–10479. <https://doi.org/10.1021/la034268q>.
- (252) Madrid, E.; Horswell, S. L. Effect of Deuteration on Phase Behavior of Supported Phospholipid Bilayers: A Spectroelectrochemical Study. *Langmuir* **2015**, *31* (45), 12544–12551. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02765>.
- (253) Baldyga, D. D.; Dluhy, R. A. On the Use of Deuterated Phospholipids for Infrared Spectroscopic Studies of Monomolecular Films: A Thermodynamic Analysis of Single and Binary Component Phospholipid Monolayers. *Chem Phys Lipids* **1998**, *96* (1–2), 81–97. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00082-6).
- (254) K.J. Kinnunen, P. Amyloid Formation on Lipid Membrane Surfaces. *Open Biol J* **2019**, *2* (1), 163–175. <https://doi.org/10.2174/1874196700902010163>.

SUMMARY

INTRODUCTION

Currently researchers consider amyloidosis still to be one of the most perplexing illnesses linked to proteins. It occurs when proteins, common to living organisms, aggregate in an unnatural way, thus forming cytotoxic structures that disrupt the functional activity of many organs. To date, close to 40 different proteins that are innate to human organisms have been determined to cause amyloidosis.¹ In 2020 more than 55 million people worldwide suffered from illnesses that caused cognitive dysfunction (dementia), with Alzheimer's disease being one of the most common cause.² In recent years, it was observed that amyloidosis are more and more often found in the aging society, and it is expected that by the year 2030, the number of cases will reach 78 million. Despite continuous research in trying to understand the disease's aetiology, pathogenesis and mechanisms, there is still no fully effective cure.³ The main reason for this is the complex and not fully understood aggregation of peptides/proteins on the molecular level and their interaction with the cell's membrane.^{4,5}

It is of extreme importance to identify the changing structure of proteins when analyzing the interaction of peptides/proteins with cells on the molecular level. Even though vibrational spectroscopy is a perfect method for that, due to the complexity of the cell's membrane and of the whole system, *in situ*, it is rarely used. In order to simplify the system, biomimetic membranes that are limited to one or only a few elements are used. Typically, mono or bilayer structures formed from phospholipids found in cell membranes on liquid or solid surfaces are used for analyzing membrane characteristics. Different spectroscopic methods can be used to analyze conformational⁶⁻¹⁸, orientational^{6,8,13,19} and hydrational^{8,16,19-24} changes of biomimetic membranes. The aggregation of peptides/proteins^{25,26} or their interaction with lipid membranes^{25,27} can be analyzed with these methods as well. Usually, such studies require isotopic labeling of at least one molecular element of the system to be analyzed. Isotopic labeling helps to avoid overlapping vibrational bands. When analyzing the interaction of biomimetic membranes with peptides/proteins, phospholipids that form the membrane are isotope-labeled. During this process, hydrogen (H) atoms in the lipid are exchanged with deuterium (D), and therefore this method is also called deuteration. Different parts of the phospholipid can be deuterated, e.g., alkyl chains, headgroup or both^{28,29}. This method is widely used in spectroscopy without taking into

account that deuteration can alter the properties of biomimetic membranes, as were observed in several of research studies.²⁸⁻³⁰

When analyzing a more complex system, consisting of protein or/and its aggregates, that can interact with the lipid membrane, three harmful processes initiated by the membrane itself can take place. The first one is related to the destabilization of the protein's native structure, which can be caused by its adsorption to the lipid surface. Structurally destabilized protein can initialize its primary aggregation.³¹ The second process is conditioned by the increased concentration of the adsorbed protein at the interface, which can lead to accelerated aggregation.³² Research has shown that amyloid- β (A β) peptide, which is linked to Alzheimer's disease, at low concentrations preferentially adsorbs to lipid/water interface and only then starts forming fibrillar aggregates³³⁻³⁵. Analogous observations were made to α -synuclein³⁶, insulin^{37,38}, human islet amyloid polypeptide (hIAPP)^{39,40}, lysozyme^{41,42}, and other proteins.

The third harmful process is related to protein aggregates that, once adsorbed to the lipid membrane, can permeate the membrane and disrupt its functionality.⁴³ It was believed for a very long time that large, mature fibrillar aggregates cause irreparable cell damage, but the latest studies suggest that biological membrane perforations are induced by small structures such as fragmented fibrils or oligomers.⁴⁴ Research shows that smaller oligomeric aggregates of A β are cytotoxic, while large fibrillar structures do not cause cell damage.⁴⁵ In addition, it was determined that smaller aggregates of A β are adsorbed faster than larger oligomeric or fibrillar aggregates.⁴⁶ Amyloid α -synuclein aggregates can insert into the negatively charged lipid bilayer and form large protein and lipid coaggregates, leading to irreversible destruction of the membrane.⁴⁷

A number of different nonstructural methods are used to study the adsorption of protein aggregates, e.g., quartz crystal micro-balance-dissipation (QCM-D)⁴⁶, atomic force microscopy (AFM)⁴⁸, impedance spectroscopy (EIS)⁴⁹, and others. These methods provide very important information, however, it is limited and does not reflect the molecular level. There are not many methods that allow simultaneous analysis of the kinetics of protein adsorption and determination of the structural changes.⁵⁰⁻⁵³

With the advancements in techniques of surface-specific spectroscopy, vibrational sum-frequency generation (VSFG) spectroscopy, due to its distinctively large surface specificity and submonolayer sensitivity, quickly became an ideal optical probe for investigations of surface interactions. The combination of VSFG and Langmuir monolayer methodology provided the possibility to analyze protiated or deuterated phospholipid membranes *in situ*

and receive information on the conformation of alkyl chains, the packing of the monolayers^{8,10,13-17,54-58}, hydration of the phosphate^{8,10,11,16,19,24,59} and carbonyl²⁰ groups as well as the interaction of lipids with various biomolecules^{60,61}. The greatest distinction of this method is the possibility to identify the secondary structure of surface-adsorbed proteins. It was shown that various surface-adsorbed amyloid proteins have different pathways in fibril formation.^{40,41} Even though VSFG is an excellent methodology to study proteins and their aggregates adsorption to various interfaces on the molecular level, it only recently has been applied to study such systems, thus there are still many unanswered questions. For example, what influences and limits the adsorption of various protein structures to lipid interfaces?

Vibrational sum-frequency generation (VSFG) spectroscopy, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, atomic force microscopy (AFM), Langmuir monolayer technique, quantum chemical calculations and VSFG spectral components isolation **methodologies** were applied in this research work.

This thesis **aims** to apply vibrational sum-frequency generation spectroscopy in studies of biomimetic membranes and the adsorbed of protein aggregates at air/water and lipid/water surfaces.

To accomplish this aim, the following **objectives** were formulated:

1. To form and characterize the aggregates of hen egg white lysozyme (HEWL) which contain different secondary structures;
2. To identify the characteristic VSFG vibrational bands of HEWL secondary structures adsorbed at the interfaces of air/D₂O and DOPG/D₂O;
3. To identify the absorption trends of HEWL aggregates with different secondary structures at the air/D₂O and DOPG/D₂O interfaces;
4. To form Langmuir monolayers of variously deuterated DPPC phospholipids and assign characterize VSFG vibrational bands;
5. To analyze the structural and hydrational changes of DPPC Langmuir monolayers with different deuteration levels.

Scientific novelty and relevance

Close to 40 different proteins were discovered by scientists, which can form cytotoxic structures related to incurable illnesses. Despite a significant amount of continuous research, there is a lack of knowledge explaining the molecular mechanisms of these diseases, with the root cause being a limited number of experimental methods allowing *in situ* research. In order to understand protein aggregation and the interaction of protein aggregates with cell membranes, it is beneficial, to begin with, a simplified biomimetic system, e.g., a monolayer formed from one kind of lipid and a protein. Vibrational sum-frequency generation spectroscopy combined with Langmuir technique fits perfectly in studying such systems; however, not much research has been completed in this field as conditioned by the current lack of knowledge, of how VSFG is to be used correctly in analyzing these systems.

Using a few defined protein/lipid systems, we attempted to determine characteristic patterns and vibrational fingerprints that would assist in analyzing more complex systems, resembling the natural ones. This research is one of the first VSFG works which analyzed the adsorption of preformed protein aggregates to air/D₂O and DOPG/D₂O surfaces. We determined that at the interfaces of air/D₂O and DOPG/D₂O, proteins with disordered structure and/or its fragments, as well as aggregates of diverse sizes with characteristic antiparallel and parallel β -sheet structure, were adsorbed. Our research revealed that the adsorption of proteins at the interface of air/D₂O is determined by the hydrophobic interactions, whereas the adsorption at DOPG/D₂O interface is rather determined by electrostatic interactions between charged protein and lipid groups; with a remained contribution of hydrophobicity.

When studying the previously described protein and lipid monolayer system, an overlap of methyl (CH₃) vibrational bands arising from protein and lipid complicated the analysis. The solution to this problem could be isotopic labelling, which is widely used in spectroscopy. Previous studies found that deuteration of the lipids changed the phase transition temperature of its membranes, however, molecular changes could not have been identified.^{28–30,236–238} For this reason, we used VSFG methodology for the first time to analyze phospholipid monolayer with different deuteration levels in several vibrational regions: the phosphate headgroup, methyl/methylene and carbonyl group. Our study showed that DPPC lipid monolayers with deuterated choline group preserve a well hydrated phosphate group even after monolayer compression or CaCl₂ insertion into the system, whereas lipid monolayers protiated by choline group demonstrated dehydration. We proposed an

explanation for this observation that deuteration of choline group have an influence on the orientation of lipid's main group. It forms a monolayer in such a way that headgroup blocks Ca^{2+} ions, but allows water hydration.

The statements to be defended

1. During aggregation, the hydrophobicity of hen egg white lysozyme (HEWL) structures increases, whereas the number of charged and surface-localized groups decreases. The hydrophobicity of the preformed protein aggregates governs the adsorption at the air/water interface.
2. The electrostatic interaction between charged phospholipid and protein groups is the main driving force for the adsorption of HEWL protein and its aggregates at the DOPG/D₂O interface, with a complementary contribution of hydrophobic interaction when the charge of protein aggregates is neutralized by varying the pD of a system.
3. The shift in adsorption driving force from electrostatic to more hydrophobic inflicts the changes in the vibrational dipole orientation of adsorbates at the DOPG/D₂O interface.
4. In monolayers, the deuteration of the DPPC phospholipid choline group causes structural changes in the lipid headgroup.

EXPERIMENTAL METHODS

Lysozyme sample preparation

Hen-Egg White Lysozyme was dissolved in D₂O to a concentration of 5 mg/mL before being mixed with 140 mM NaCl. Using 0.1 M DCl, the solution's pD was set to 2.2. The produced solution was then filtered using a 0.22 m PES membrane filter (Corning, Germany) to eliminate the larger molecules and sonicated for 15 minutes in a water bath to break up smaller residual aggregates. The protein aggregation was started by heating it at 62 °C without agitation. Small amounts of the solution were taken out at various time intervals for characterization using various techniques.

Lipid monolayer formation for VSFG measurements

A lipid monolayer on the D₂O (H₂O) surface was formed for VSFG studies in a home-built Teflon cell (40 mm diameter) fitted with a temperature controller. The cell was properly cleaned with NoChromix solution and washed with Millipore water before each experiment. The cell was then filled with D₂O (H₂O) and the temperature was set at 20 °C to decrease sample evaporation. A drop of lipid (DOPG with a concentration of 1 mg/mL or various deuteration DPPC with a concentration of 0.5 mg/mL) in chloroform solution was spread on surface using Hamilton syringe. For the lysozyme adsorption experiment, the DOPG monolayer with a surface pressure of ~30 mNm⁻¹ was formed, whereas for DPPC deuteration studies two different monolayers with surface pressures of ~7 and ~30 mNm⁻¹ were formed. The change in surface pressure was registered with a commercial KSV NIMA instrument (Biolin Scientific, Sweden) tensiometer equipped with a platinum rod. Nitrogen gases were used to purge the sample chamber for DOPG monolayer. After DOPG monolayer stabilization, a microsyringe was used to inject lysozyme solution (40 μL, 5 mg/mL concentration, equal to ~2.3 M bulk concentration) beneath the DOPG monolayer, and the surface pressure was continuously monitored.

FTIR spectroscopy

FTIR spectra were recorded using a Bruker Vertex 80v FTIR spectrometer with a nitrogen-cooled MCT detector. To eliminate water vapor absorbance, the spectrometer and sample compartment were vacuumed. When examined in a liquid cell, the concentration of lysozyme in the solution was too low to produce moderately intense FTIR spectra. As a result, we selected to measure a sample placed on a CaF₂ window. Approximately 100 μL of solution was

applied on the window and allowed to dry under nitrogen flow. For the background, a clean CaF₂ window was measured. All spectra were captured using 128 scans, a resolution of 1 cm⁻¹, and a background subtraction was performed using Opus software.

Atomic force microscopy

Three-dimensional AFM maps of lysozyme samples were obtained using a Dimension Icon (Bruker) atomic force microscope in tapping mode and equipped with a silicon cantilever Tap300AI-G (40 N m⁻¹, Budget Sensors) with a tip radius of curvature of 8 nm. The following samples were prepared for AFM imaging: A 10 µL aliquot of the incubated lysozyme solution was diluted with D₂O (pD = 4.5, adjusted with DCl) with a ratio of 1:10. After that 20 µL of diluted solution was deposited and incubated for 1 minute on a newly sliced mica surface. The mica surface was then rinsed with 1 mL of Milli-Q water and dried with a moderate flow of nitrogen. At a scan rate of 0.5 Hz, high-resolution images (1024 1024 pixels) were captured. SPIP (Image Metrology) software was used to flatten the captured AFM images.

VSFG system and measurements

The VSFG spectrometer applied in these research was made by EKSPLA (Vilnius, Lithuania) and it is based on a mode-locked picosecond Nd:YAG laser system that produces 30 mJ energy and 28 ps duration time pulses centered at 1064 nm wavelength and with a repetition rate of 50 Hz. Visible light has a 350 J energy pulses and is fixed at 532 nm. Meanwhile, the infrared light is tunable in a wide frequency range, ranging from 2.3 to 16 m (pulse energies typically range from 50 to 200 J). Incident angle of visible beam at the sample is ~60° and for infrared ~55°, while the standard spot size at the sample is 6 mm.

Based on measurements, VSFG spectra were registered in various polarization combinations after monolayer system stabilization. SSP and PSP were employed to analyze protein adsorption to DOPG monolayers, whereas the SSP polarisation combination was usually utilized for the deuteration study of DPPC. To record spectra the IR wavelength must be scanned with a step of 1 cm⁻¹ across a certain spectral range. The signal is averaged over 200 pulses at each step, resulting in a 6 s acquisition time per point, which results in ~30-50 min per set of spectras. In order to compensate for energy fluctuations, all spectra were normalized to the intensity of infrared and visible pulses, which were recorded simultaneously at each IR step with pyroelectric detectors.

VSGF spectral fit

The VSGF spectrum to determine the number of peaks contributing to the spectrum and their precise location was fitted using the formula:

$$I_{VSGF} \propto \left| X_{NR}^{(2)} + X_R^{(2)} \right|^2 = \left| A_{NR} e^{-i\varphi_{NR}} + \sum_q \frac{A_q}{\omega_{IR} - \omega_q + i\Gamma_q} \right|^2$$

where $X_{NR}^{(2)}$ is a non-resonant second order non-linear susceptibility and $X_R^{(2)}$ is effective resonant second order non-linear susceptibility A_{NR} and φ_{NR} are the non-resonant amplitude and phase. A_q , ω_q and Γ_q are the amplitude, the center frequency and the width of the q-th resonance, respectively.

To perform VSGF spectral fit Matlab “Curve Fitting Tool” expansion (version R2021a, The Math Works Inc., USA) was used. The spectra presented in the research paper were processed in Origin Pro 2021 software (Version 9.8.0.200, OriginLab Corporation, USA).

Quantum-chemical calculations for a DPPC headgroup fragment

Quantum chemical calculations have been used to solve difficulties with experimental data interpretation. The Gaussian software is built for Windows (package version G09W A.02) and is used for theoretical structure simulations and quantum chemistry computations.²¹⁸ DFT approach using B3LYP functional and 6-311++G(d,p) basis functions defined for H, C, O, N, and P atoms was used for geometry optimization, water effect, and frequency calculations. Chemcraft software (version 1.8) was used for optimizing molecular geometry representation and initial spectral band assignment. A potential energy distribution (PED) study was done using the VEDA 4 software tool to quantify the contribution of vibrational atoms.²¹⁹

THE MAIN RESULTS

Structure Determination of Hen Egg-White Lysozyme Aggregates Adsorbed to Lipid/Water and Air/Water Interfaces

Numerous VSFG investigations have been carried out on the adsorption of protein and its aggregates on various interfaces^{41,149,192,196,197,217,227,231}, yet, it has not been used to analyze the properties of the adsorption of different preformed amyloid structures. This study aimed to comprehend and compare how lysozyme and its aggregates adsorb to the air/D₂O and DOPG/D₂O interfaces.

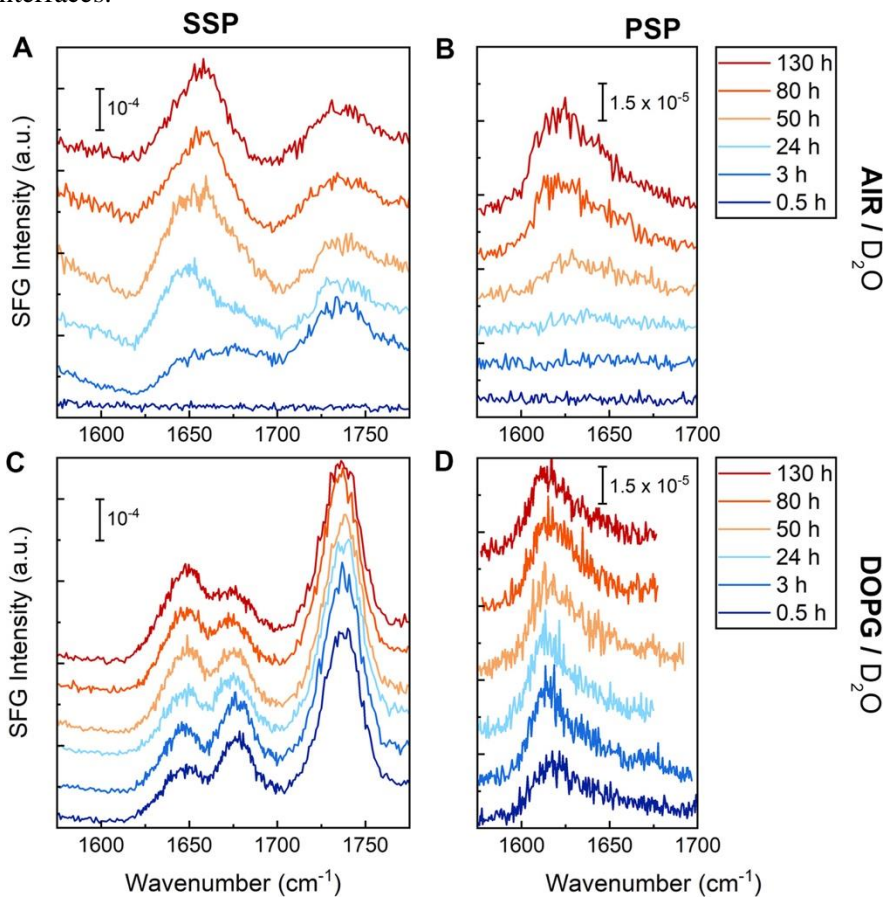


Figure 1. VSFG spectra of lysozyme and its aggregates adsorbed from various time incubated aliquots to air/D₂O and DOPG/D₂O interfaces in SSP and PSP polarization combinations (see legend).

Performed VSFG study indicates that protein successfully adsorbed to both surfaces in its disordered form, together with disorganized small aggregates

and larger aggregates with parallel and antiparallel β -sheet arrangements. We showed that a proper VSGF spectral fitting is crucial for retrieving this information. Since due to interference between peaks with opposing orientations and a nonresonant background, the number of bands contributing to the VSGF spectrum may be misinterpreted. This research also demonstrate that the driving force of protein adsorption varies based on the interface. It was identified that the hydrophobic interaction was primarily responsible for the protein adsorption to the air/D₂O surface. **Figure 1** shows that disordered protein and small aggregates were adsorbed to this interface at early incubation times (3-24 h), whereas aggregates with a β -sheet structure got adsorbed only after longer incubation times (50-130 h). Hydrophobic interaction also plays a role in the adsorption to DOPG/D₂O interface; however, for this interface electrostatic interaction is the primary driving force. **Figure 1** shows that interaction between lipid headgroups and the charged protein groups forced the β -sheet structure to adsorb to DOPG/D₂O interface at a very early protein incubation time (0.5-3 h). Additionally, by varying the pD value of the solution, the lysozyme charge was changed; in **figure 2** it was shown that this alters the orientation of adsorbate's vibrational dipole at the DOPG/D₂O interface. In the case of the air/D₂O interface, a change in pD had almost no effect.

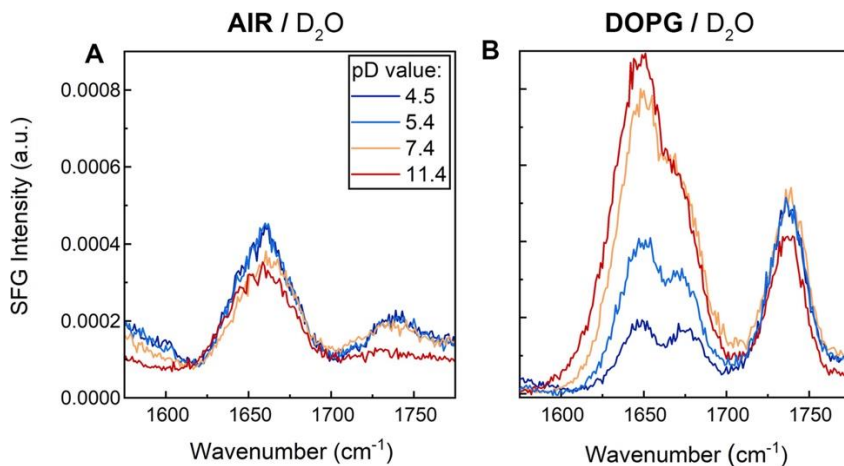


Figure 2. VSGF spectra of an 80-hour aliquot adsorbed to the air/D₂O and DOPG/D₂O interfaces at various pD values in SSP polarization.

Simona Strazdaite, Edvinas Navakauskas, Johannes Kirschner, Tomas Sneideris, Gediminas Niaura. Structure Determination of Hen Egg-White Lysozyme Aggregates Adsorbed to Lipid/Water and Air/Water Interfaces. Langmuir 36, 2020, 4766-4775.

Effect of Deuteration on a Phosphatidylcholine Lipid Monolayer Structure

The cell membrane is a complex self-assemble system whose structure and properties determine its biological activity. Numerous studies have revealed that changes in the principal physicochemical characteristics of lipid membranes, such as lateral pressure, fluidity, hydrophobicity, polarity, electrostatic charge, or even curvature, favour intracellular peptide and protein aggregation.^{5,31,232–234,254} All *in situ* spectroscopic studies of amyloids must consider this before using isotopic labelling of phospholipids since it is still completely unclear how it impacts the characteristics of lipid monolayers or bilayers. To this date, only a few studies that directly compared deuterated and protiated phospholipids have shown significant differences in phase transition temperature.^{28–30,236–239,250–253} We aimed to determine whether or not the isotopic substitution (H/D) impacts the characteristics of phospholipid monolayers and to explain possible effect.

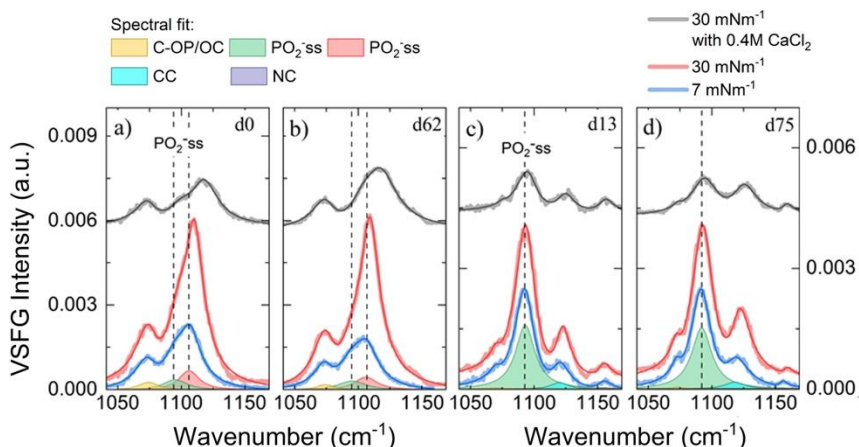


Figure 3. VSFG spectra of DPPC-d0, DPPC-d13, DPPC-d62, and DPPC-d75 monolayers in the phosphate vibrational region at varying surface pressures without and in the presence of 0.4 M CaCl_2 (see legend). For each separate 7 mN/m spectra, the contributions of each vibrational band calculated by fitting are shown.

Vibrational sum-frequency generation spectroscopy was used to examine monolayers of DPPC with various deuteration levels, formed on the D_2O surface. The evaluation focused on several vibrational regions (phosphate headgroup, methyl/methylene, and carbonyl group), of which the phosphate headgroup revealed a remarkable sensitivity to choline group deuteration. For lipids with protiated choline group (DPPC-d0 and DPPC-d62) usual dehydration was observed after the compression of monolayer or addition of

Ca²⁺ ions. The most sensitive band PO₂ss blue-shifted of ~3-4 cm⁻¹ after compression and additionally ~7 cm⁻¹ after Ca²⁺ ions introduction into the system (see **figure 3**). Meanwhile, for lipids with deuterated choline group (DPPC-d13 and DPPC-d75), only a slight ~1 cm⁻¹ blue-shift was observed after compression and ~2 cm⁻¹ after Ca²⁺ ions introduction (see **figure 3**). Based upon these findings, we suggested that the deuteration of the choline group impacts the structure of lipid headgroup, resulting in a restriction of Ca²⁺ binding while preserving solvation by water (see **figure 4**). Furthermore, performed studies revealed that the deuteration of this specific lipid may not modify the methyl/methylene and carbonyl groups, or the changes are too small to be detected.

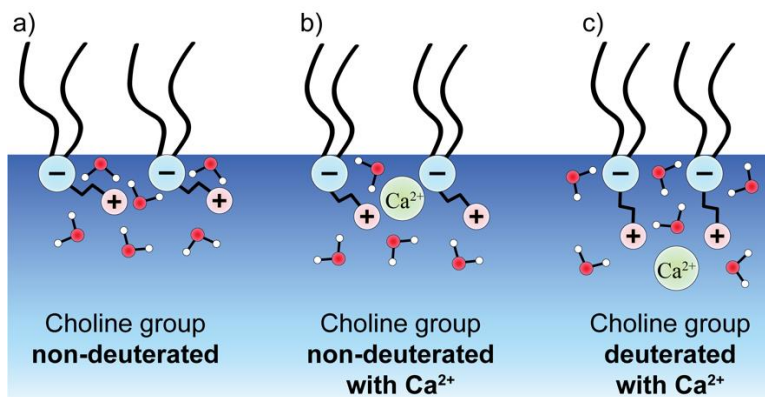


Figure 4. The schematic picture depicts how deuteration of the choline group alters the structure of the lipid's choline group and the binding of Ca²⁺ ions.

Edvinas Navakauskas, Gediminas Niaura, Simona Strazdaite. Effect of deuteration on a phosphatidylcholine lipid monolayer structure: New insights from vibrational sum-frequency generation spectroscopy. Colloids Surfaces B Biointerfaces **220**, 112866 (2022).

CONCLUSIONS

1. When comparing the adsorption of different hen egg white lysozyme structures at air/D₂O interface, it was found that the main factor determining adsorption is the hydrophobicity of protein structures formed in a bulk solution. It was shown that after 30 minutes of incubation at 62 °C temperature protein in its native or partially unfolded form is not adsorbed at air/D₂O interface, or the concentration of adsorbate is too low to be detected by using VSFG. Meanwhile, the hydrophobic disordered and large β -sheeted aggregates got adsorbed at the air/D₂O interface after ≥ 3 and ≥ 50 hours of HEWL incubation respectively.

2. Disordered protein, along with a small disordered and a larger β -sheeted HEWL aggregates, was adsorbed at the DOPG/D₂O interface at very early incubation times of 30 minutes, showing that the main driving force for the adsorption is the electrostatic interaction between charged protein and phospholipid groups.

3. The systemic shift in HEWL charge from positive to slightly negative at the DOPG/D₂O interface after 80 hours of protein incubation revealed that structure hydrophobicity also plays a role in adsorption, in addition to electrostatic interaction. The change in adsorption driving force from electrostatic at pD 4.5 to more hydrophobic at pD 11.4 causes an increase in the signal recorded in the VSFG spectrum, which is related to the change in adsorbate vibrational dipole orientation.

4. When Langmuir monolayers with different deuterations of DPPC were compared, it was found that the vibrations of methyl/methylene and carbonyl groups are not sensitive to it, or the changes are too small to detect by using VSFG, while the symmetric stretching of the phosphate group showed a strong reaction to the deuteration of choline group. When the experimental conditions (surface pressure and Ca²⁺ ion introduction) were varied, phospholipids with a deuterated choline group kept a well-hydrated phosphate group but a Ca²⁺ ion-impermeable barrier due to structural changes in the lipid headgroup. On the other hand, lipids containing the protiated choline group showed usual dehydration.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR AUTORIAUS INDĖLIS

1. Simona Strazdaite, **Edvinas Navakauskas**, Johannes Kirschner, Tomas Sneideris, Gediminas Niaura. Structure Determination of Hen Egg-White Lysozyme Aggregates Adsorbed to Lipid/Water and Air/Water Interfaces. *Langmuir* **36**, 2020, 4766-4775.

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03826>

Autoriaus indėlis: baltymo lizocimo agregavimas, IR ir VSFG spektroskopiniai bei paviršiaus slėgio matavimai, spektroskopinių duomenų analizė ir grafinis atvaizdavimas.

2. **Edvinas Navakauskas**, Gediminas Niaura, Simona Strazdaite. Effect of Deuteration on a Phosphatidylcholine Lipid Monolayer Structure: New Insights From Vibrational Sum-Frequency Generation Spectroscopy. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **220**, 2022, 112866.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112866>

Autoriaus indėlis: lipidų izotopinio žymėjimo problemos iškėlimas, VSFG matavimai, spektroskopinių duomenų analizė, spektrinių juostų išskyrimo darbai, kvantinės chemijos skaičiavimai, grafinis spektrų atvaizdavimas bei publikacijos rašymas.

PRANEŠIMAI MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE

1. **Edvinas Navakauskas**; Simona Strazdaitė; Gediminas Niaura. *Structure Determination of Protein Aggregates Adsorbed at Phospholipid Monolayer by Using Sum Frequency Generation Spectroscopy*. 62nd International Conference for Students of Physics and Natural Sciences „Open readings 2019“, 2019 March 19-22d., 2019 Vilnius, Lithuania: programme and abstract p. 395.
2. **Edvinas Navakauskas**, Simona Strazdaitė ir Gediminas Niaura. *HEWL baltymo agregatų, adsorbuotų ant vandens ir lipidinio monosluoksniu paviršių, struktūrų nustatymas*. 9-oji doktorantų ir jaunųjų mokslininkų konferencija „FizTeCh2019“, 2019 m. spalio 23-24d., Vilnius, Lietuva: pranešimų tezės p. 16.

3. **Edvinas Navakauskas**, Simona Strazdaitė and Gediminas Niaura. *Structure Determination of HEWL Protein Aggregates at liquid interfaces*. Advanced Properties and Processes in Optoelectronic Materials and Systems „APROPOS 17“, 2020 September 29 – October 1 d., 2020 Vilnius, Lithuania: Abstract Book (Oral Session) p. 37.
4. **Edvinas Navakauskas**, Simona Strazdaitė ir Gediminas Niaura. *Amiloidinių struktūrų, adsorbuotų ties modeliniais paviršiais, tyrimas suminio dažnio generacijos metodu*. 10-oji doktorantų ir jaunųjų mokslininkų konferencija „FizTeCh2020“, 2020 m. spalio 22-23d., Vilnius, Lietuva: Tezių rinkinys p. 7.
5. **Edvinas Navakauskas**, Simona Strazdaitė ir Gediminas Niaura. *Adsorbuotų amiloidinių struktūrų tyrimas suminio dažnio generacijos spektroskopijos metodu*. Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvoje“, 2020 m. gruodžio 4 d., Vilnius, Lietuva: Pranešimų santraukos p. 27.
6. **Edvinas Navakauskas**; Simona Strazdaitė. *Comparison of different deuterated dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers using sum-frequency generation spectroscopy*. 64th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences „Open readings 2021“, 2021 March 16-19d., 2021 Vilnius, Lithuania: programme and abstract p. 218.
7. **Edvinas Navakauskas**, Simona Strazdaitė ir Gediminas Niaura. *Deuterinimo įtaka fosfolipidinių monosluoksnių savybėms*. 11-oji doktorantų ir jaunųjų mokslininkų konferencija „FizTeCh2021“, 2021 m. spalio 20-21d., Vilnius, Lietuva: Tezių rinkinys p. 39.
8. **Edvinas Navakauskas**, Simona Strazdaitė. *How does deuteration of the phospholipid affect its monolayer properties?* 65th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences „Open readings 2022“, 2022 March 15-18 d., 2022 Vilnius, Lithuania: Abstract book p. 94.

TRUMPOS ŽINIOS APIE AUTORIŲ

Edvinas Navakauskas

1993-06-08 Marijampolė, Lietuva

Išsilavinimas:

Marijampolės Rygiškių Jono gimnazija | 2008-2012

Vilniaus Universitetas, Fizikos fakultetas | 2012-2016

Fizikos bakalauras

Vilniaus Universitetas, Fizikos fakultetas | 2016-2018

Biofizikos magistras

Fizinių ir Technologijos Mokslų Centras | 2018-2023

Doktorantūros studijos

Darbo patirtis:

Vyresnysis inžinierius | 2023 – dabar

Fizinių ir technologijos mokslų centras, Organinės chemijos skyrius, spektroelektrochemijos laboratorija.

Inžinierius | 2021 – 2023

Fizinių ir technologijos mokslų centras, Organinės chemijos skyrius, spektroelektrochemijos laboratorija.

Jaunesnysis mokslo darbuotojas | 2019 – 2021

Fizinių ir technologijos mokslų centras, Organinės chemijos skyrius, spektroelektrochemijos laboratorija.

Inžinierius | 2017 – 2019

Fizinių ir technologijos mokslų centras, Organinės chemijos skyrius, spektroelektrochemijos laboratorija.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 25 egz.