

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота
освітній ступінь- магістр

на тему **«ПРІОНОПОДІБНІ БІЛКИ РОСЛИН ТА ВПЛИВ ЗОВНІШНІХ
ФАКТОРІВ НА НИХ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання

Спеціальність: 091 Біологія

Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем

Козікова Дар'я Олексіївна

Керівники: Білько Д.І.,

Кандидат біологічних наук, доцент
НаУКМА

Рашидов Н.М.,

Доктор біологічних наук, професор,
завідуючий лабораторією Інституту
клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України

Рецензент: Кондратюк С.Я., д.б.н.,
професор, завідуючий лабораторії
ліхенології та бріології Інституту ботаніки
ім. М.Г. Холодного НАН України

Кваліфікаційну роботу захищено

з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М. В.

«07» червня 2021 року

Київ – 2021

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1 Властивості пріонних та пріон-подібних білків у рослин.....	6
1.1.1. Використання комп'ютерних методів для прогнозування структури білків.	8
1.2. Рослини, які обрані для дослідження та містять білки з пріонними властивостями.	10
1.3. Гени, які впливають на пріонізацію шаперонів і купінів рослин	12
1.4. Амілоїди у рослин	14
РОЗДІЛ II. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	17
2.1. Методи виявлення пріонних властивостей білків	17
2.1.1. Біоінформаційні методи.	18
2.2. Методи пробідготовки до аналізу на FTIR–спектрометрі.	21
2.2.1. Метод FTIR-спектрометрії.....	22
2.2.2. Методи фарбування амілоїдів у рослин тіофлавіном T.	27
2.3. Статистичні методи	28
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	30
3.1. Біоінформатична оцінка змін вмісту β -шарів у протеомі рослин за допомогою FTIR-спектроскопії.....	30
3.1.1. Рослини, протеом яких містить білки з пріонними властивостями.....	30
3.2. Експериментальний пошук змін конформації протеїнів методом FTIR-спектрометрії у рослин під дією стрес чинників.....	32
3.2.1. Вміст амід I та амід II доменів білків у листках <i>Arabidopsis thaliana</i>	32

3.2.2. Зміна співвідношення амід I до амід II доменів білків у насінні <i>Linum usitatissimum</i> та <i>Glycine max</i> з Чорнобильської зони.	35
3.2.3. Дії засухи на вміст амід I та амід II доменів білків у епідермісі листків <i>Populus sp.</i> (клон «Слава України»).	37
3.2.4. Вміст амід I та амід II доменів білків у листків <i>Prunotia persica</i>	40
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	44
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	47

ВСТУП

Білки з пріонними властивостями можуть без участі нуклеїнових кислот призвести до змін конформації та функцій білків за рахунок автокаталізу. Ці білки вивчені у ряду організмів: ссавців, грибів, бактерій. На жаль, подібної широти спектр наукових досліджень у рослин практично відсутній.

Всі рослини у навколишньому середовищі піддаються певному впливу на них температурного режиму, сольового та кислотного балансу ґрунту, полютантів, важких металів, радіонуклідів, іонізуючого опромінення тощо. З огляду на це, важливим є дослідження формування пріоноподібних білків рослин під впливом абіотичних стресових факторів. Білки з пріоноподібними властивостями забезпечують унікальний режим біохімічної пам'яті за рахунок самоіндукованих змін конформації та функцій.

Отже, формування вторинної та третинної структури протеїнів під впливом різноманітних стрес факторів є досить актуальною темою наукового пошуку. Одним з найважливіших етапів вивчення пріоноподібних білків у протеомах є скринінг на вміст α -структур та β -шарів у різних тканинах рослин, які є піддані стрес чинникам [1,2].

Метою роботи є вивчення впливу зовнішніх абіотичних чинників (температура, засолення, іонізуюче опромінення, фактори інтродукції) на потенційні пріоноподібні протеїни у протеомах рослин, а саме на утворення β -конформацій у вторинній структурі білків.

Об'єкт дослідження: вплив абіотичних стресових факторів на вторинну структуру білків.

Предмет дослідження: зміна вмісту та співвідношення бета-структурних і альфа-спіральных доменів у складі білків протеому рослин під дією абіотичних стресових факторів.

Для досягнення мети поставлені такі завдання:

1. Прогнозувати потенційні пріонні/амілоїдні властивості білків певних рослин, які можуть бути пов'язані з відповіддю на абіотичний стрес з використанням програм WALTZ, SARP, Pasta 2.0.
2. Описати експериментальні підходи до визначення α - та β - конформацій білків у листках і насінні рослин.
3. Вивчити вплив гострого та пролонгованого/хронічного іонізуючого випромінювання, засолення, посухи, інтродукції на перехід α - спіралей у β -структури у тканинах тополі, верби, сої, льону, ячменя, пшениці, паротії перської, арабідопсису за допомогою FTIR-спектроскопії.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Властивості пріонних та пріон-подібних білків у рослин

Термін "пріон" відноситься до всіх інфекційних амілоїдів, проте, не всі пріони утворюють амілоїди. У більш широкому розумінні пріони – це білки, які існують за однакових умов у двох або більше конформаціях, з яких принаймні одна має інфекційні властивості. Хвороби спричинені пріонами можуть розвиватись спонтанно або передаватись генетично, проте не залежачи від утворення, подальше поширення відбувається інфекційним шляхом. За відкриття пріонів та дослідження пріонних захворювань було присуджено декілька Нобелівських премій. Вчені наблизились до розуміння процесів, які відбуваються в організмі при переході пріонних білків із нормальної форми у патогенну. У прокариотів було виявлено щонайменше вісім груп білків, здатних утворювати функціональні амілоїди. Ці амілоїди беруть участь у формуванні біоплівки, долаючи поверхневий натяг, зберігаючи токсини, формуючи пори в мембрані фаголізосоми або активізуючи гіперчутливу відповідь у рослин [1].

Пріоноподібні білки мають унікальну біохімічну пам'ять за рахунок деструктивних самоорганізованих змін конформації та функцій. Вони мають спільну біологічну природу, їх поведінка була широко вивчена у ссавців, бактерій і грибів. Нещодавно припустили, що хронічні стресові фактори можуть бути причиною виникнення пріоноподібних властивостей в рослинних білках [2]. У науковій літературі згадується не більше десяти видів рослин, у яких можливий процес набуття пріонних властивостей білками. Однак, поява амілоїдних фібрил в них чітко не доведена. Амілоїдні фібрили

представляють собою гомополімери білків, які приймають різні перехресні β -конформації.

Амілоїди – це білкові фібрили з характерною структурою, яка називається «перехресним β ». Ця структура виникає внаслідок утворення міжмолекулярних β -шарів, перпендикулярних осі амілоїдних фібрил, і виявляється за допомогою двовимірної рентгенівської дифракції [1]. Така просторова організація робить амілоїди однією з найбільш стабільних біогенних складових і наділяє ці макромолекули унікальними фізико-хімічними властивостями: амілоїди протистоять обробці різними миючими засобами (такими як SDS та саркозил), протеїназами, високими температурами та кислотами; вони можуть зберігатися в навколишньому середовищі роками [3].

Існує декілька гіпотез, щодо розмноження пріонів. Першою гіпотезою, що пояснює розмноження пріонів без участі інших молекул – нуклеїнових кислот, була гетеродимерна модель [4]. Відповідно до цієї гіпотези, одна молекула PrP^{Sc} приєднується до однієї молекулі PrP^C і каталізує її перехід в пріонну форму. Дві молекули PrP^{Sc} після цього розходяться і продовжують перетворювати інші PrP^C в PrP^{Sc}. Однак модель реплікації пріонів повинна пояснювати не тільки механізм розмноження пріонів, а саме чому спонтанне поява пріонів настільки рідкісна. Манфред Ейген показав, що гетеродимерна модель вимагає, щоб PrP^{Sc} був ефективним каталізатором: він повинен підвищувати частоту перетворення нормального білка в пріонну форму в 10^{15} разів [5].

Другою гіпотезою утворення пріонів вважають альтернативну фібрилярну модель, яка передбачає, що PrP^{Sc} існує тільки у вигляді фібрил, при цьому кінці фібрил пов'язують PrP^C, де він перетворюється в PrP^{Sc}. При розвитку пріонів захворювання спостерігається експоненціальне зростання кількості PrP^{Sc} і загальної концентрації інфекційних частинок [6]. В організмі розламування

фібрил здійснюється білками-шаперонами, які зазвичай допомагають очистити клітину від агрегованих білків [7].

1.1.1. Використання комп'ютерних методів для прогнозування структури білків.

Проблема передбачення та реконструкції вторинної та третинної структури білків, особливо активних центрів ферментів має давню історію. У 1972 р. нобелівський лауреат-хімік К. Анфінсен сформулював знамениту тезу, що теоретично амінокислотна послідовність протеїну (його первинна структура) має повністю визначати структури вищих порядків [8]. Ще раніше, у 1969 р. Ц. Левінталь показав, що обчислення 3D-просторової структури методом простого перебору всіх варіантів та оцінки мінімальної вільної енергії станів типового поліпептиду потребує більше часу, ніж існує Всесвіт [9]. З іншого боку, у типових фізіологічних умовах живої клітини фолдинг ново синтезованого білку триває порядку декількох мілісекунд. Ця видима суперечність отримала назву парадоксу Левінталя. Проте вона всього-навсього вказує на те, що, як зазначав А. Ейнштейн, «Старий не грає в кістки [азартну гру]», тобто фолдинг поліпептиду у природних умовах передбачає вибір з варіантів, кількість яких на астрономічне число порядків менше, ніж теоретично можлива. Це потенційно вказує на можливість деякого алгоритму, який би розглядав тільки «правильну» сукупність варіантів вторинної та третинної структури білку під час моделювання його фолдингу за первинною послідовністю.

У 1990-х роках минулого століття була висунута ідея про те, що моделювання фолдингу можна суттєво спростити, орієнтуючись на реально виявлені методом рентгенівської кристалографії 3D-структури гомологічних доменів білків, для яких відома консенсусна амінокислотна послідовність. Прогрес обчислювальної техніки приблизно в той самий час зняв технічні

перепони на шляху розрахунку патернів – способів типового фолдингу білків. Обидві обставини сприяли заснуванню Д. Моултом і К. Фіделісом проекту **Critical Assessment of protein Structure Prediction (CASP)** (1994 р.) [10], який поставив за мету розрахунок конформації поліпептидів, порівняння результату розрахунку з реальними структурами відомих білків та корекцію моделі на основі результатів порівняння. Якість моделей було запропоновано за допомогою метрики GDT (Global Distance Test), яка приймає значення від 0 до 100, а значення $GDT \geq 90$ показує, що модель в цілому правильно передбачає просторову структуру поліпептиду. Нещодавно презентований громадськості алгоритм CASP13 програми AlphaFold, застосований до бази всіх білків з відомою 3D-структурою, має медіанний GDT (Global Distance Test) 92,4 при мінімальному GDT 87,0 навіть у випадку найдовших поліпептидних ланцюгів [11]. Отже з формальної точки зору, 50-річну проблему передбачення структури білка вищого порядку за його первинною амінокислотною послідовністю можна вважати вирішеною.

Питання у практичному застосуванні методу CASP13/CASP14 для передбачення структури реальних білків у фізіологічних умовах клітини та її компартментів. Адже очевидно, що одна і та сама амінокислотна послідовність за різних умов може призводити до формування різних патернів 3D-структури, включаючи кількість та розташування точок зв'язування рандомних та типових структур (бета-шарів, альфа-спіралей, альфа-поворотів і т.д.), вперше описаних Л. Полінгом [12]. Не кажучи вже про те, що заміна однієї чи декількох амінокислот первинної послідовності, що часто є наслідком мутацій, змінює набір патернів просторової структури білка. Ще більш масштабні відмінності функціонально конформації від варіантів, розрахованих на основі первинної структури протеїну, характерні для ізоформ білку, які синтезуються в результаті альтернативного сплайсингу відповідної пре-мРНК, а також точок зв'язування пост трансляційних модифікацій, включаючи убіквітинування та деградацію. Імовірно, що дані проблеми

дослідники будуть намагатися вирішити за допомогою алгоритму CASP14, який зараз удосконалюють представники команди Deepmind.

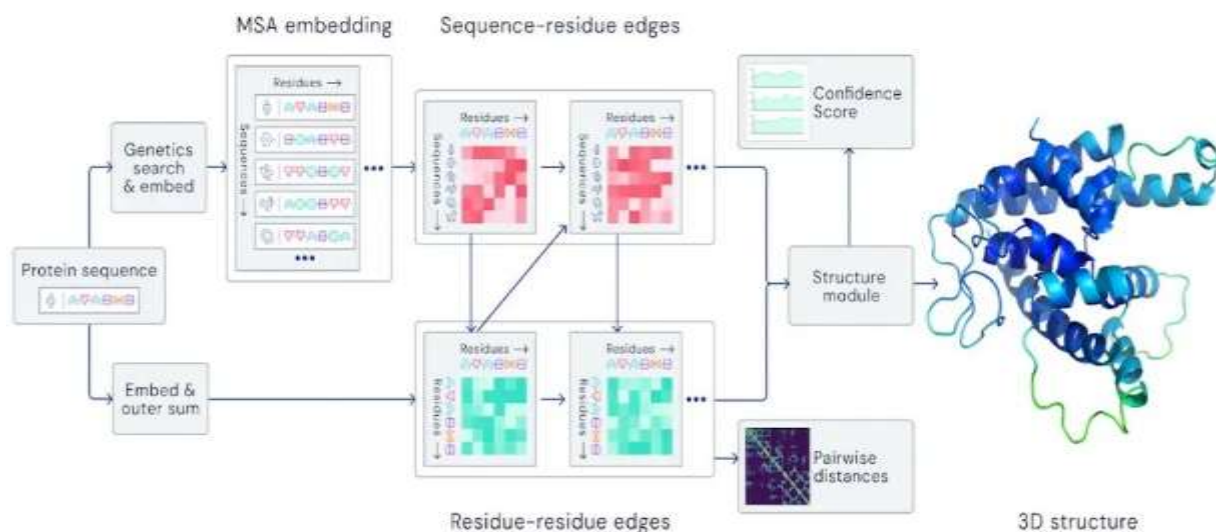


Рис. 1.1. Схема роботи алгоритму CASP13/CASP14 програми AlphaFold [11].

Для нашого пошуку пріоноподібних білків у клітинах рослин, які синтезуються та накопичуються під впливом стресових факторів алгоритм CASP14 та інші методи автоматизованого передбачення структури білка необхідні: 1. для здійснення скринінгу білків, які потенційно можуть проявляти пріонні властивості або утворювати амілоїди; 2. для моделювання фолдингу конкретних білків з пріонними властивостями, виділених з тканин рослин, за їх первинною амінокислотною послідовністю.

1.2. Рослини, які обрані для дослідження та містять білки з пріонними властивостями.

Загальноприйняті модельні рослинні об'єкти займають важливе місце серед швидкозростаючих енергетичних рослин та сільськогосподарських культур з харчової цінності, також вони є досить зручними для вирощування

у лабораторних умовах. Саме тому, до рослин, які є наразі досліджуваними, у роботі відносяться тополя (*Populus trichocarpa*), верба (*Salix sp.*), соя (*Glycine max*), льон (*Linum ussitatissimum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), пшениця (*Triticum aestivum*), паротія перська (*Parrotia persica*) та арабідопсис (*Arabidopsis thaliana*).

Тополя (*Populus trichocarpa*) – дерево, яке зростає по узбережжю Північної Америки. Швидко росте і може вирости до 35 м в висоту. Відома як дуже добрий модельний організм для молекулярної біології. Її геном містить найбільшу кількість генів серед відомих видів рослин. Застосовується для виготовлення лісоматеріалів [13].

Верба (*Salix sp.*) - дерева та кущі, які зростають у Північній Америці, Європі, Україні, Росії, у середній Азії. Зростають у досить вологих місцях, на болотах, озерах. Двodomна рослина, квітки одностатеві та мають плід – коробочку. Застосовуються у бджільництві, кормовому господарстві, як деревина, плетиво, волокно, фарба [14].

Соя (*Glycine max*) – бобова культура, що походить із Східної Азії. Соя широко вирощується завдяки їстівній цінності. Класифікується як олійна культура і належить до найважливіших сільськогосподарських рослин у світі. Найбільшими виробниками сої є США, Бразилія та Аргентина [15].

Льон (*Linum ussitatissimum*) – одна з олійних культур, яка культивується з давніх-давен. Це переважно однорічна рослина, яка самозапилюється. Традиційно льон вирощують як для високоякісних волокон, так і для олії. Волокна використовуються для тканин і виробництва паперу [16].

Ячмінь (*Hordeum vulgare*) – трав'яниста рослина родини Злакових (*Poaceae*), однорічна рослина, суцвіття – колос. Рослина перехресно запліднюється або самозапилюється. Поширена у Північній Африці та східних країнах. Застосовується у якості кормових, у продовольчих цілях [17].

Пшениця (*Triticum aestivum*) – однорічна трав'яниста злакова рослина. Має найбільше сортів серед Злакових (*Poaceae*). Найбільше культивується у Китаї,

Канаді, Індії, США, Росії, Казахстані, Україні, Франції, Німеччині. Застосовується у харчових цілях, з неї виробляється борошно, пиво, віскі, також використовується як кормова культура, у медицині та флористиці [18].

Паротія перська (*Parrotia persica*) – дерево, яке зростає у Азербайджані, Ірані, Каспійському узбережжі, висотою 15-25м заввишки. Може жити до 200 років, має плід – коробочку. Витримує морози до -25 °С градусів, зростає у більш вологому ґрунті, біля річок та озер. Використовується для вироблення столярних виробів [19].

Арабідопсис (*Arabidopsis thaliana*) – відноситься до родини Капустяних (*Brassica*). Є дуже зручним модельним об'єктом у молекулярних та генетичних дослідженнях. Квітки самозапліднюються, має невеликий розмір геному. Може пройти повний цикл розвитку за 6 тижнів. Поширений у Європі, Азії, на півночі Африки [20].

1.3. Гени, які впливають на пріонізацію шаперонів і купінів рослин

Купіни – родина білків, що забезпечують унікальний режим біохімічної пам'яті за допомогою самоіндукованих змін фолдингу, конформації та функції білку. Окрім ролі в біології насіння, купіни мають значення і в харчуванні людини, а деякі з них пов'язані з алергічними реакціями. Вони приймають участь і в індукції квіток, дозріванні плодів, соматичному і зиготичному ембріогенезі, розвитку деревини та бульбочок у бобових, а також у реакціях на абіотичний стрес, включаючи хронічне опромінення.

Купіни – це білки, частина надродини, що включає ферменти та неферментні поліпептиди. Перші члени цієї групи були описані у рослин (зберігаючі білки насіння злаків), згодом вони були ідентифіковані у широкого кола організмів [8, 21].

Надсімейство купінів назване на основі консервативної складки бета-циліндру (“сура” – це латинський термін для маленького циліндру).

Було виявлене за допомогою консервативного мотиву, що міститься у зародках та зародкових білках вищих рослин. Аналіз купінів виявив близько 18 різних функціональних класів, які варіюються від однодоменних бактеріальних ферментів, таких як ізомерази та епімерази, що беруть участь у модифікації вуглеводів клітинної стінки, до дводоменних бікупінів [22].

Надсімейство купінових білків, включаючи зародки та зародкові подібні білки (GLP) вищих рослин, відіграють вирішальну роль у розвитку та захисті рослин. На сьогоднішній день не проводився систематичний аналіз сої (*Glycine max*), який включав би вивчення функціонування генів та їх експресії. У геномі сої було ідентифіковано 69 передбачуваних генів купінів *GmCupin*, які були випадковим чином розподілені по 17 з 20 хромосом. Ці білки були філогенетично згруповані у десять різних підгруп, серед яких генні структури були дуже консервативними. Вісімнадцять пар (52,2%) повторюваних паралогічних генів переважно були збережені у дуплікованих регіонах геному сої. Розподіл генів *GmCupin* передбачав, що довгі сегментарні дублювання суттєво сприяли розширенню сімейства генів *GmCupin*. Селективний аналіз, заснований на одонуклеотидних поліморфізмах (SNP) у культивованій та дикій сої, показав, що ці гени могли пройти сильний відбір під час одомашнення сої [23].

У рослин *Arabidopsis thaliana*, загалом виявлено 27 генів *GLP*, і встановлено, що їх експресія залежить від локалізації та типу тканини (листки, квітки, корені). Стрес-залежним геном, обраним для дослідження, є глутатіон-S-трансфераза (*GST*). Це розповсюджений фермент, який сприяє детоксикації ендогенних або ксенобіотичних сполук та метаболізму окисного стресу у рослин [24]. *GST* поділяються на різні класи, як у рослин, так і у тварин. У рослин *GST* функціонують у декількох метаболічних шляхах, пов'язаних біосинтезом вторинних метаболітів, гомеостазом гормонів, захистом від патогенних мікроорганізмів. Активність вказаних ферментів дозволяє

запобігати та детоксифікувати пошкодження важкими металами та гербіцидами [25].

Також у рослин фермент трансглютаміназа є ще погано охарактеризованою, і зараз клонований лише ген пластидної трансглютамінази кукурудзи (*tgz*) [26]. Короткий С-кінцевий пептид кукурудзяної трансглютамінази утворює амілоїдні фібрили. Поліпептидні послідовності можуть містити локальні ділянки з високою схильністю до агрегації, які здатні ініціювати ранні етапи агрегації. Трансглютаміназа кукурудзи утворює амілоїдоподібні агрегати *in vitro* [26].

1.4. Амілоїди у рослин

Амілоїди – це нерозчинні відкладення фібрилярних білків з базовою структурою перехресних β , спочатку виявлених у контексті захворювань людини. Амілоїдні фібрили представляють собою гомополімери білків, які приймають різні перехресні β -конформації. Перехресні β – шари виникають внаслідок утворення міжмолекулярних β -листів, перпендикулярних осі амілоїдних фібрил [27]. Повторювана підструктура, яка називається поперечний β -шаровий мотив, складається з двох шарів міжмолекулярних β -листів, які проходять уздовж волокна паралельно β -листу, кожна β -нитка лежить точно над β -ниткою під нею, в антипаралельному аркуші кожний β -ланцюг лежить точно над β -ланцюгом в два рядки під ним [28]. Амілоїд утворюється внаслідок переходу від розчинного (мономерного) до нерозчиненого (амілоїдного) стану.

Така просторова організація робить амілоїди однією з найбільш стабільних біогенних сполук. Амілоїдні фібрильні пептиди більш гідрофобні та стабільні (нижчі загальні значення потенційної енергії), ніж неамілоїдні пептиди [29].

На рис.1.4 можна бачити розподіл по тканинам рослин чотири групи рослинних білків, що можуть ідентифікувати нові амілоїди: 1) багаті Q-N білки, особливо ті, які здатні зв'язувати нуклеїнові кислоти; 2) захисні білки та пептиди, що містять гідрофобні області; 3) білки для зберігання насіння, що містять Q- та E-багаті області; та 4) білки, що беруть участь у адгезії клітин водоростей до поверхонь [30].

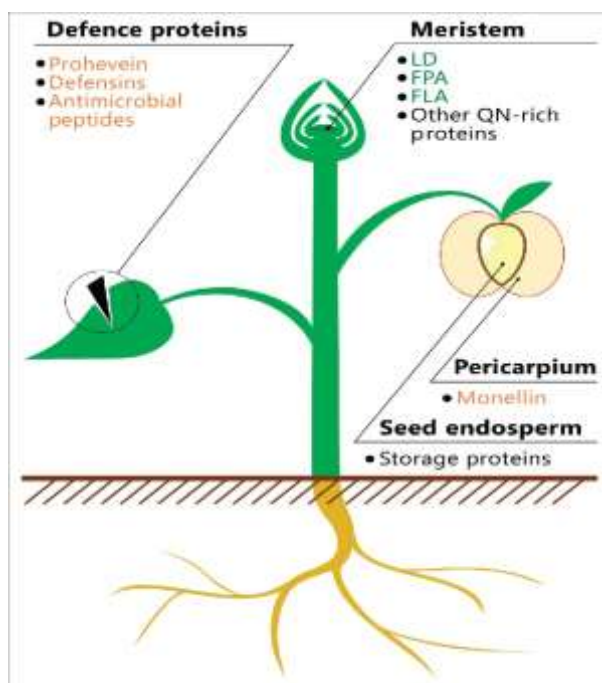


Рис.1. 4. Схематичне розташування потенційно амілоїдогенних білків у рослинах. Зеленим зазначені назви білків або пептидів, амілоїдні властивості яких частково характеризувались *in vivo* та помаранчевим *in vitro*, білки, фрагменти яких мають амілоїдогенні властивості позначені чорним [30].

Гексапептиди, що утворюють амілоїд-фібрилу, демонструють особливості послідовності, що відрізняються від тих, які можуть утворювати

аморфні β -агрегати. Стійкість є важливою ознакою для розрізнення пептидів, що утворюють амілоїд-фібрилу, від їх гомологів, які не утворюють амілоїд-фібрили [31].

Амілоїди також представляють собою функціонально важливу форму структури білка, що бере участь у різних біологічних процесах в організмі, від архей і бактерій до грибів та тварини. В організмі бета-амілоїд утворюються з попередника APP (англ. Amyloid precursor protein, APP), трансмембранного глікопротеїну з невідомими функціями довжиною від 695 до 770 амінокислотних залишків [28].

Протягом довгого часу амілоїди сприймалися виключно як летальні патогени, що викликають десятки невиліковних захворювань у людини і тварин. В останні роки стало очевидним, що крім патологічних амілоїдів, що виникають внаслідок порушення укладання певних білків, існує велика група білків, які формують амілоїд в нормі. Такі амілоїди отримали назву функціональні. Прикладами функціональних амілоїдів у прокариот є участь у формуванні біоплівки і запасання токсинів, у грибів – підвищення стійкості до різних хімічних сполук, а у тварин – формування довгострокової молекулярної пам'яті, регуляція антивірусної відповіді, участь у полімеризації меланіну, запасанні гормонів і біомінералізації зубної емалі [27]. Функціональні амілоїди можуть бути активними в амілоїдному стані або виконувати роль резервуарів для зберігання білків або пептидів. Відомо, що запасні і захисні білки насіння більшості видів рослин багаті на амілоїдогенні ділянки.

Амілоїди є поширеними у всіх живих організмах, у тваринному організмі вони є вивченими досить добре. У рослин амілоїди та пріони взагалі не розглянуті, хоча є досить важливим фактором у зростанні та у утворенні різних хвороб. Задля допомоги агропромислової та уникнення збитків. Саме тому, дослідження та з'ясування вмісту амілоїдів у рослинних клітинах є досить важливим.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Методи виявлення пріонних властивостей білків

Прогнозування амілоїдогенних доменів проводили за допомогою алгоритму Waltz (<http://waltz.switchlab.org/>), з певними встановленими параметрами: поріг – найкраща загальна селективність та рН 7,0. До білкових послідовностей, які не відповідали вимогам Waltz, відносяться послідовності, що містять неканонічні амінокислоти та були довшими за десять тисяч амінокислотних залишків. Білки, які містили принаймні один домен, що відповідає критеріям Waltz, були позначені як потенційно амілоїдогенні білки [7]. Цей метод використовує позиційну матричну оцінку для визначення амілоїдоутворюючих послідовностей. Оцінка послідовності Sprofile обчислюється на основі матриці PSSM. На основі 19 вибраних фізичних властивостей, які найкраще описують амілоїдні властивості поліпептиду, обраховують функцію Sphysprop, що складається з суми добутків частоти амінокислот з нормованим значенням властивостей відповідної амінокислоти для кожної позиції. Кінцевим компонентом скорингової функції Sstruct є специфічна для позиції псевдоенергетична матриця із структурного моделювання з використанням бази структур амілоїдної основи [32].

Був також використаний інший метод, що застосовується для прогнозування областей β -конформацій у білків – метод SARP (sequence analysis based on the ranking of probabilities), аналіз послідовності, який ґрунтується на ранжуванні імовірностей утворення певної конформації [3]. Дивлячись на з'ясовані методи, можна відтворити схему роботи (рис.2.1).



Рис. 2.1. Схема роботи для дослідження.

На схемі дослідження (рис.2.1) обрано лише один з етапів експерименту, надалі задля повноцінного дослідження амілоїдів у обраних рослин, та підтвердження вмісту амілоїдних структур в них, необхідно проробити молекулярні та біоінформатичні методи. Такі як, ПЛР-аналіз, перевірка отриманих даних за програмами SARP та WALTZ, для досягнення виконання повного експерименту.

2.1.1. Біоінформаційні методи.

Для роботи необхідно було залучати різні біоінформаційні методи, які допоможуть зрозуміти схильність до утворення β -конформацій білків у певних тканинах рослин. До біоінформаційних програм належать як бази даних, так і програми для вирівнювання послідовностей та з'ясування вмісту β -шарів, а також алгоритми, які виявляють схильність білків до амілоїдоутворення. Однією з таких програм є UniProt (<https://www.uniprot.org/>) – це база даних, яка

є результатом співпраці між Європейським інститутом біоінформатики (EMBL-EBI), Швейцарським інститутом біоінформатики SIB та Білковим інформаційним ресурсом (PIR). Заснована на базах даних білків, які були отримані раніше, та які створювались під час розробки та використовувались для Swiss-Prot. Також використовувався інструмент пошуку основних локальних вирівнювань BLAST, за допомогою якого знаходять сайти локальної подібності між послідовностями, які можна використовувати для висновку про функціональні та еволюційні взаємозв'язки між білками чи генами, ідентифікувати їх належність до тих чи інших родин [3].

Програмою для вирівнювання послідовностей є BioEdit 7.2. (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>), це редактор біологічного вирівнювання послідовностей. Кілька варіантів аналізу послідовностей, а також посилання на додаткові інструменти оптимізують робоче середовище, яке дозволяє переглядати та маніпулювати послідовностями за допомогою простих операцій.

За для класифікації білків та генів, що їх кодують, з метою полегшення високопродуктивного аналізу була розроблена класифікаційна система Panther (<http://www.pantherdb.org/>). Це велика біологічна база даних родин білків та їх функціонально пов'язаних підродин, які можна використовувати для класифікації та ідентифікації функції генних продуктів.

Білки класифікували за наступними критеріями:

1. Родина та підродина: родини – це групи еволюційно пов'язаних гомологічних білків; підродини – це споріднені білки, які також виконують однакову функцію.
2. Молекулярна функція: функція білка як така, а також функція білків, що безпосередньо взаємодіють з білком у складі молекулярних комплексів, які приймають участь у одному біохімічному процесу.

3. Біологічний процес: функція білка у контексті більшої мережі білків, які взаємодіють для здійснення процесів на рівні клітини або організму в цілому.

4. Шлях: подібний до біологічного процесу, але шлях також чітко визначає взаємозв'язки між взаємодіючими молекулами [33].

Застосування PANTHER – полягає у точному виведенні функції нехарактерних генів будь-якого організму на основі їх еволюційних зв'язків з генами з відомими функції [33].

Pasta 2.0 (<http://old.protein.bio.unipd.it/pasta2/about.html>) є веб-сервером для аналізу амінокислотних послідовностей. Програма передбачає, які частини даної вхідної послідовності частіше стабілізують перехресне β -ядро фібрилярних агрегатів. Також алгоритм дозволяє прогнозувати структурну агрегацію амілоїдів на основі первинної амінокислотної послідовності, найбільш схильні до агрегації ділянки та відповідні β -ланцюги міжмолекулярних пар. Крім того, доступна опція моделювання вторинної структури білка в цілому, що забезпечує можливість аналізу властивостей взаємодоповнюючих послідовностей. Енергетичний поріг Pasta 2.0 був відкалібрований на більшому наборі пептидів і заданий як функція чутливості та специфічності.

Біоінформаційна програма AmylPred (http://aias.biol.uoa.gr/AMYL_PRED2/) є корисним інструментом для ідентифікації амілоїдоутворюючих доменів у білках. Сприяє уточненню параметрів згортання білків та їх агрегації у біотехнології (рекомбінантні білки) та біотерапії (моноклональні антитіла, біофармацевтичні білки) [34].

TANGO (<http://tango.crg.es/>) – програма, яка оцінює тенденцію пептидів до β -агрегації, що відрізняється від тенденції утворення амілоїдної фібрили. [35].

Програма Cordax (<https://cordax.switchlab.org/>) заснована на структурному підході, який дозволяє відповісти на питання, чи схильна

амінокислотна послідовність до амілоїдоутворення в умовах, відмінних від фізіологічних. Цей підхід є обчислювально інтенсивним. З цієї причини довжина вхідної послідовності ($n < 50$) та кількість завдань на користувача обмежуються 10. Інструмент використовує стратегію «лінивого» інтерфейсу, яка зберігає заздалегідь розраховані послідовності у зростаючій базі даних. Це обходить непотрібні обчислення для повторюваних сегментів послідовності або майбутніх прогонів [36].

2.2. Методи пробідготовки до аналізу на FTIR–спектрометрії.

Для аналізу було обрано такі види рослин: тополя (*Populus trichocarpa*), верба (*Salix sp.*), соя (*Glycine max*), льон (*Linum ussitatissimum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), пшениця (*Triticum aestivum*), паротія перська (*Parrotia persica*) та арабідопсис (*Arabidopsis thaliana*). У кожної рослини було обрано орган для подальшого аналізу: листки, корені та/або насіння. Надалі здійснювалась підготовка проб (зразків для аналізу).

Наприклад, для аналізу складу клітин епідермісу листків було відібрано по 2-3 різних за розміром листка з прикореневої розетки кожної рослини. Зрізані цільні листки висушували у паперових конвертах без доступу світла. На кожному з листків було обрано три поля для спектрометрії: в центрі, біля зовнішнього краю листової пластинки та в зоні черешка.

Для вивчення механізмів переходу білків з α -стану в β -структури у рослин за дії водного дефіциту за допомогою FTIR-спектрометрії відбирали листки клону тополі «Слава України», які були вирощені за різних умов зволоження, протягом першого та другого вегетаційних сезонів.

Відбір рослинного матеріалу верби, вирощеної за умов модельованої посухи, проводили на 10-у та 30-у добу культивування в умовах *in vitro* у

контрольних та експериментальних рослин. Для цього використовували по 10 рослин на кожен варіант.

Льон та сою вирощували на радіаційно забруднених ділянках у Чистогалівці в Зоні відчуження ЧАЕС в умовах відкритого ґрунту з 2009 по 2014 рр. Контрольні рослини культивували на вільній від радіаційного забруднення ділянці з аналогічними умовами у м. Чорнобиль. Збирали насіння рослин, сушили та заморожували рідким азотом та потім розтирали у фарфорових ступках до стану дрібнодисперсного порошку.

2.2.1. Метод FTIR-спектрометрії.

Інфрачервона спектроскопія - це розділ спектроскопії, що вивчає взаємодію інфрачервоного випромінювання з речовинами [37]. Інфрачервоне випромінювання було відкрито в 1800 році астрономом Вільямом Гершелем. Використовуючи призму, він спостерігав підвищення температури в області, що знаходиться за червоним кордоном спектра видимого випромінювання. У 1882-1900 роках Вільям Ебні і Едвард Фестінг записали інфрачервоні спектри 52 з'єднань і зіставили смуги поглинання з функціональними групами, присутніми в цих молекулах. Також, досить істотний внесок в метод зробив американський фізик Вільям Кобленц, який з 1903 року, користуючись призмою з хлориду натрію, отримав вельми точні і повні ІЧ-спектри для сотень органічних і неорганічних сполук [38].

Експериментальним результатом в ІЧ - спектроскопії є інфрачервоний спектр - функція інтенсивності пропущеного інфрачервоного випромінювання від його частоти. Зазвичай інфрачервоний спектр містить ряд смуг (піків на спектрограмі), за довжиною хвилі (або оберненою їй величиною) та відносною інтенсивністю яких робиться висновок про будову досліджуваного зразка [49]. Такий підхід став можливий завдяки великій кількості накопиченої експериментальної інформації: існують спеціальні таблиці, що зв'язують

частоти поглинання з наявністю в зразку певних молекулярних фрагментів. Створено також бази ІЧ - спектрів деяких класів з'єднань, які дозволяють автоматично порівнювати спектр невідомої аналізованої речовини з уже відомими і таким чином ідентифікувати цю речовину [38].

Всі ІЧ - спектрофотометри незалежно від конструкції мають загальні елементи: джерело випромінювання, оптичну систему, приймач, систему посилення сигналу [39]. ІЧ - спектроскопія заснована на явищі поглинання хімічними речовинами інфрачервоного випромінювання з одночасним збудженням коливань молекул. Інфрачервоне випромінювання представляє собою електромагнітну хвилю і характеризується довжиною хвилі λ , частотою ν і хвильовим числом [50].

На рис.2.2. вказано список основних поширених у органічних сполуках спектральних смуг, карбоксильна група (-COOH) складається з карбонільної (смуга C = O на 1700 cm^{-1}) і гідроксильної (смуга OH на 3500 cm^{-1}), проте крім цих смуг будуть міститися й інші. Хвильові числа виражені в cm^{-1} [40]. Досліджувані речовини (білки) знаходяться у таких діапазонах поглинань: амід I (C=O) - $1740\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$, амід II (N-C=O) – $1630\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$.

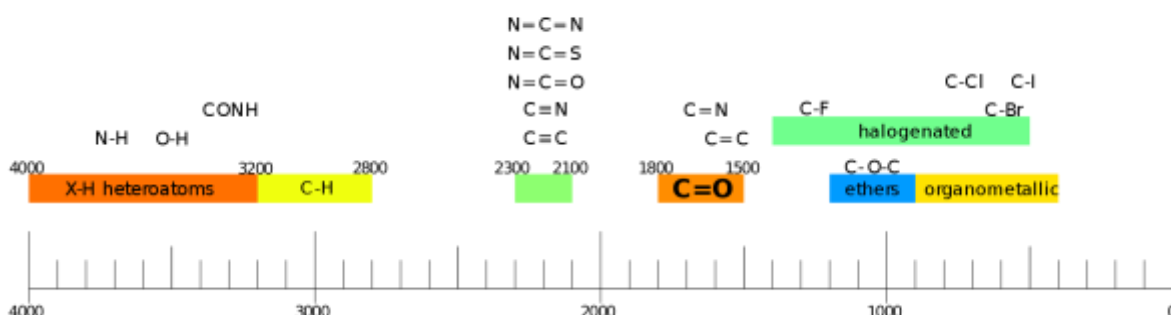


Рис.2.2. Список основних поширених у органічних сполуках спектральних смуг [40].

Задля аналізу змін біохімічного складу листків було використано метод інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (ATR-FTIR). Перевагами методу є швидкість, простота, надійність та відтворюваність результатів, можливість одночасного вимірювання вмісту найбільш важливих біохімічних компонентів клітин без порушення цілісності об'єкту. [41]. Фур'є-спектрометри не потребують зовнішніх стандартів для градуювання шкали хвильових чисел. У них використовується внутрішній стандарт, зазвичай одночастотний газовий лазер. Так, у Фур'є-спектрометрі з криптоновим стандартом була досягнута точність визначення хвильових чисел до 10^{-4} cm^{-1} [4].

Фур'є-ІЧ-спектрометри зазвичай однопроменеві, що унеможливорює запис спектра зі зразком порівняння. З цієї причини також не вдається компенсувати «атмосферні» перешкоди (наявність вуглекислого газу і води, які інтенсивно поглинають інфрачервоне випромінювання). Зазвичай, цей недолік усувається шляхом запису двох послідовних спектрів з вирахуванням спектра зразка порівняння зі спектру аналізованого зразка [42].

Спектри поглинання середньої інфрачервоної області ($400\text{-}4000$ cm^{-1}) були отримані з використанням спектрометра Nicolet FTIR IS50 (Thermo Fisher Scientific, США) лабораторії епігенетики Державної установи «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України». Всі спектри вимірювали з роздільною здатністю 4 cm^{-1} .

На основі співставлення спектрограм з результатами, отриманими іншими дослідниками, було ідентифіковано два стійкі спектральні піки (рис. 2.3, табл. 2.2), характерні для ІЧ-спектру поглинання амід II та амід I структурних доменів білків рослин, які вивчали в області $400\text{-}4000$ cm^{-1} . Амід I та амід II є маркерами β -структурних мотивів та α -спіральных структур, відповідно [49].

Таблиця 2.2

Основні білкові піки ІЧ-спектру поглинання рослин, які досліджувались,
після вирівнювання за базовою лінією

Пік спектру поглинання (вимірювання), cm^{-1}	Хімічна група, зв'язок	Сполуки, характерні для тканин листків
1514-1535	C-N, N-H	протеїни, амід II домен, маркер α -спіральних структур
1608-1640	C=O	протеїни, амід I домен, маркер β -структурних мотивів

На рис.2.2. вказано ІЧ-спектр цільного повітряно-сухого листа рослини (*Populus sp.*, клон «Слава України») після вирівнювання по базовій лінії. Показано розташування амід I та амід II, у діапазоні амід I (C=O) -1740-1630 cm^{-1} , амід II (N-C=O) – 1630-1510 cm^{-1} . Взято 32 зразки дослідження та при аналізі на FTIR-спектрофотометрі було отримано графіки ІЧ-спектрів. Надалі за допомогою вирівнювання по базовій лінії було отримано типовий ІЧ – спектр для кожного виду рослин. За отриманими результатами можна з'ясувати вміст амід I та амід II у певному органі рослин кожного варіанту.

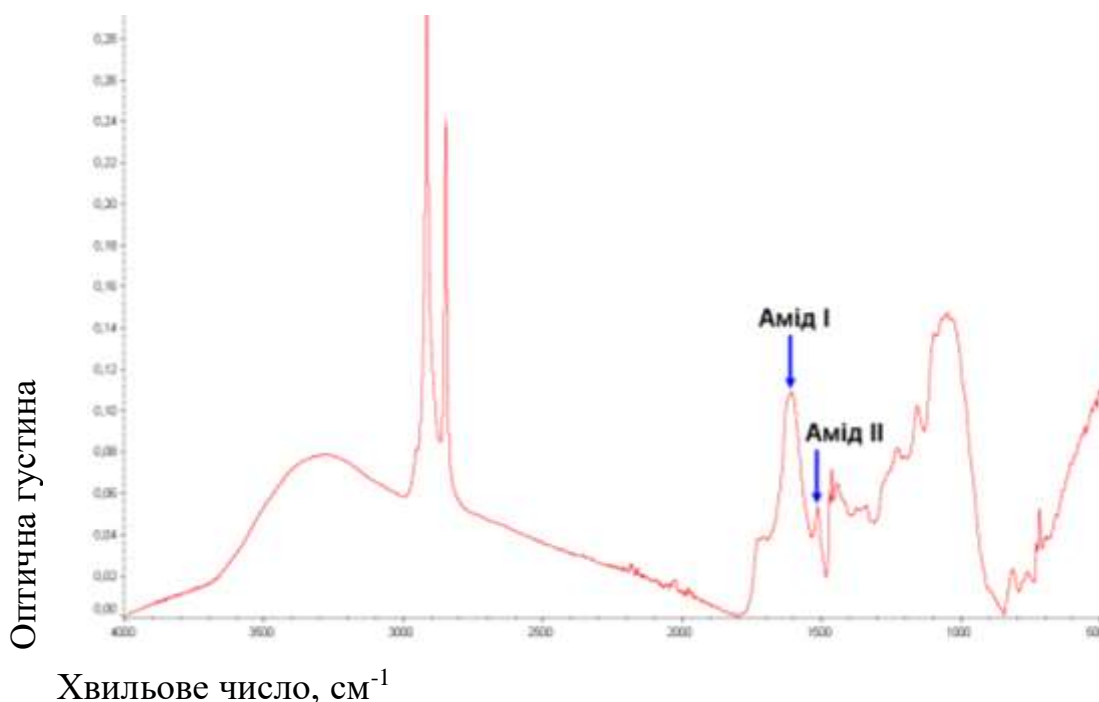


Рис. 2.3. Типовий ІЧ-спектр цілого повітряно-сухого листа рослини (*Populus* sp., клон «Слава України») після вирівнювання по базовій лінії.

При дослідженні необхідно було з'ясувати, як змінюється конформація білків у клітинах епідермісу листків опромінених рослин *Arabidopsis thaliana*, у насінні льону та сої, вирощених на радіаційно забрудненій ділянці у зоні відчуження ЧАЕС (Чистогалівка), у листках *Populus* sp. (клон «Слава України») та верби під впливом модельованої посухи, у листках *Parrotia persica* різних фенотипів в ході процесу інтродукції, проведеної на базі Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України.

Виходячи з попередніх експериментальних результатів, тест-дозами для проростків *A. thaliana* було обрано дозу 20 сГр (хронічне іонізуюче опромінення) та 21 Гр (одноразове опромінення), а також 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр з інтервалом між фракціями 24 години (повторюване опромінення). Рослини дикого типу *Arabidopsis thaliana* WT Col-0 та мутанти за ключовим геном місметч-репарації ДНК, точної гомологічної рекомбінації, репарації

нуклеотидів NER та нуклеотидних основ BER Atmsh2 опромінювали у гамма-полі пробірки з хлористим цезієм-137 при потужності дози 0,24 мГр/год від початку проростання до переходу від вегетативної до генеративної фази розвитку (35 доба вегетації у відкритому ґрунті). Одноразове та повторюване опромінення здійснювали на 35 добу вегетації на рентгенівській установці РУМ-17 (Національний інститут раку, Київ). Після зняття рослин з опромінення визначали відносний вміст та співвідношення амід II (маркер α -спіральних структур у білках) та амід I (маркер β -шарів у білках) доменів. За цими показниками робили висновки щодо конформаційних перетворень білків, а також щодо можливої появи білків з пріонними властивостями, у яких домінують β -структурні мотиви.

Той же підхід застосували до листків та насіння інших рослин, які зазнавали впливів різноманітних стресових факторів в умовах лабораторних, вегетаційних та польових дослідів.

2.2.2. Методи фарбування амілоїдів у рослин тіофлавіном Т.

Тіофлавін Т - флуоресцентна речовина, сіль з групи бензотіазолів, що утворюється при метилюванні дегідротіотолуїдина метанолом в присутності соляної кислоти. Тіофлавін Т (ThT) має вкрай низький квантовий вихід флуоресценції (менш 10^{-3}) у малов'язких розчинниках (таких як вода, етанол, ацетон, метанол та інших) [43]. Барвник здатний специфічним чином зв'язуватися з амілоїдними фібрилами у розчинах, внаслідок чого значно зростає квантовий вихід його флуоресценції (більш, ніж в 1000 разів) [44]. При фарбуванні тіофлавіном Т амілоїд згортається у β -складчастий лист, при цьому кожен п'ятий ланцюжок білка має однаковий N-C-напрямок (рис.2.3). У молекулі тіофлавіну що має лінійні розміри: довжина - $15,2 \pm 0,14$ Å, ширина бензотіазольної частини - $6,1 \pm 0,1$ Å, диметилзамісної анілінової частини - $4,3 \pm 0,1$ Å, у рідкому середовищі відбувається обертання анілінового кільця щодо

бензотіазольного. Обертання здійснюється за рахунок теплової енергії зовнішнього середовища. Вбудовування молекули тіофлавіну у борозди β -листа амілоїду можливо внаслідок ідеальної комплементарності цих молекулярних структур [45].

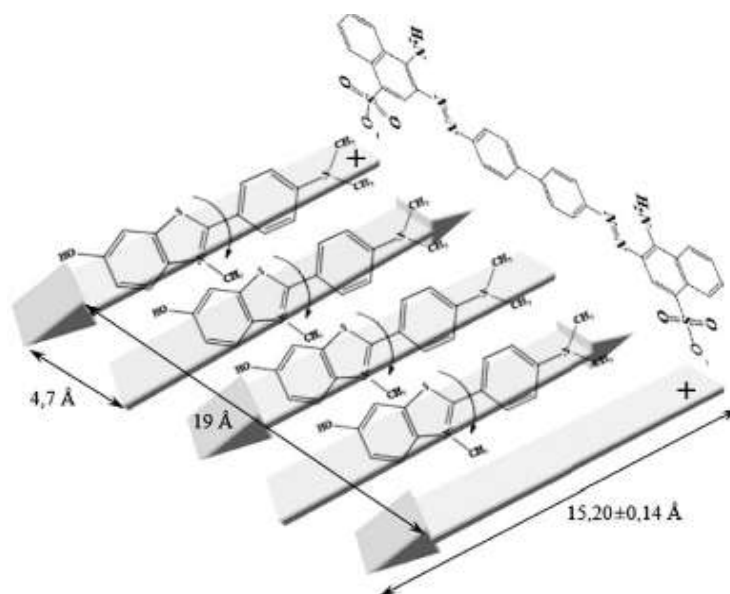


Рис. 2.4. Модель зв'язування тіофлавіну Т з амілоїдами [43].

При фарбуванні цим барвником амілоїд виглядає як зелено-коричневі флуоресцентні об'єкти. Ділянки тканин, що не містять амілоїд, виглядають темно-зеленими, практично чорними. Клітинні ядра диференціюються як округлі об'єкти, які не світяться [44].

2.3. Статистичні методи

Аналіз ІЧ-спектрів проводили за допомогою статистичних методів з використанням статистичних програм Thermo Scientific OMNIC та SPSS 17.0,

а також програмного пакету Thermo Scientific OMNIC (Thermo Fisher Scientific, США), який використовується для вимірювань та квантифікації спектрограм.

Спектри отримували усередненням 32 сканувань одного і того самого поля з фільтрацією за фоновим спектром. Первинні спектрограми вирівнювали по базовій лінії та згладжували за допомогою функції Савіцького-Голя з метою елімінації спектрального шуму. Відносну концентрацію біохімічних сполук оцінювали за площею відповідних піків оптичної густини (центр піку $\pm 6 \text{ cm}^{-1}$) на спектрограмі спектру поглинання з урахуванням вирівнювання по базовій лінії (рис. 2.3).

Однією з найбільш широко використовуваних програм статистичного аналізу в науці є SPSS17.0 (<https://spss.software.informer.com/17.0/>). Під час аналізу SPSS Statistics Base 17.0 використовується глибокий набір даних, що описують конкретний випадок. Програма має великий спектр функцій: введення та зберігання даних, можливість використання змінних різних типів, частота ознак, таблиці, графіки, діаграми, первинна описова статистика [51].

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Біоінформатична оцінка змін вмісту β -шарів у протеомі рослин за допомогою FTIR-спектроскопії

3.1.1. Рослини, протеом яких містить білки з пріонними властивостями.

В роботі проведено теоретичні дослідження на базі опублікованої літератури для прогнозування білків з пріонними властивостями у протеомах рослин, котрі будуть використані у подальшій роботі. У таблиці 3.1 наведено літературні дані, щодо прогнозованих пріоноподібних властивостей у білків, що активно синтезуються в протеомі рослин [3,4]. Тому дослідження базуються переважно на цих білках. У таблиці також представлено деякі потенційно амілоїдогенні білки, передбачені за критерієм Вальса серед білків, виявлених у рослин, які використовуються в експериментах.

Таблиця 3.1

Прогнозовані білки з пріонними властивостями у досліджуваних рослин

Вид рослин	Назва пріоноподібного білку
<i>Brassica oleracea</i>	Glutamate receptor activity Domain_MFS
<i>Brassica rapa subps</i>	ATPase coupled transmembrane transporter Domain_Phollip_ATPase_C
<i>Cicer arietinum</i>	Signal transmembrane 9 superfamily member Cupin superfamily

<i>Glycine max</i>	Cellulose synthase UDP- forming activity Cupin superfamily
<i>Glycine soja</i>	Potassium ion transmembrane transporter Cysteine synthase Dehydrins Glycinins and b-conglycinins
<i>Hordeum vulgare</i>	Cupin superfamily
<i>Linum usitatissimum</i>	Cupin superfamily RuBisCO GST-family DHAR-family ADH Glycinins and b-conglycinins
<i>Parrotia persica</i>	Oligopeptide transport SSP (seed storage proteins)
<i>Picea glauca</i>	Transmem_Helical
<i>Pisum sativum</i>	7S storage globulin vicilin Cupin superfamily
<i>Populus trichocarpa</i>	Cellulose synthase UDP- forming activity GST gene family Transmem_Helical
<i>Salix sp.</i>	Signal transmembrane 9 superfamily member GST-family
<i>Triticum aestivum</i>	Aminoacid transmembrane transporter activity
<i>Zea mays</i>	Carbohydrate transport Domain_Phollip_ATPase_C

3.2. Експериментальний пошук змін конформації протеїнів методом FTIR-спектрометрії у рослин під дією стрес чинників

3.2.1. Вміст амід I та амід II доменів білків у листках *Arabidopsis thaliana*.

При вивченні дії хронічного низькодозового опромінення на конформаційні характеристики протеому листків арабідопсису було зроблено такі висновки. У листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу і мутанту *Atmsh2*^{-/-} доза хронічного опромінення з низькою ЛПЕ 20 сГр достатня для індукції ефектів на організаційному рівні регуляції життєдіяльності рослин *A. thaliana*. Вимірювання площі ідентифікованих піків свідчить про значущі відмінності в концентрації амід II домену у епідермісі листків мутанта *Atmsh2*^{-/-} як в умовах дії хронічної радіації, так і за її відсутності (табл. 3.2).

У клітинах епідермісу листків мутанта містилося набагато менше груп, які відповідають домену амід II. При цьому за вмістом амід I домену таких відмінностей не було виявлено. Тобто, у протеомі мутанта присутня значно менша кількість α -спіральних структур (характерна функціональна група ферментів) порівняно з рослинами дикого типу *Arabidopsis thaliana*, хоча загальний вміст протеїнів достовірно не відрізнявся. Це означає, що нокаутність лише за одним ключовим білком конститутивної репарації ДНК здатна викликати порушення нативної конформації білків та, відповідно, функціонування всією ферментної системи певних типів клітин.

Таблиця 3.2.

Вміст амід I та амід II доменів білків у епідермісі листків *Arabidopsis thaliana*, визначений на основі ІЧ-спектру поглинання

Варіант	Амід I, площа піку, у.о., M±SE	Амід II, площа піку, у.о., M±SE	Амід II/Амід I, M±SE
<i>A. thaliana Col-0</i> (WT), 0 Гр	3,30±0,15	0,28±0,05	0,08±0,01
<i>A. thaliana Col-0</i> (WT), 20 сГр	3,64±0,10 *	0,23±0,03	0,06±0,01
<i>Atmsh2</i> ^{-/-} , 0 Гр	3,40±0,20	0,06±0,04 ***	0,02±0,01 ***
<i>Atmsh2</i> ^{-/-} , 20 сГр	3,54±0,10	0,06±0,03 ***	0,02±0,01 **
<i>Atmsh2</i> ^{-/-} , 21 Гр	3,12±0,43	0,05±0,02	0,02±0,01
<i>Atmsh2</i> ^{-/-} , 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр	2,62±0,25 **	0,02±0,01	0,01±0,00

(Статистична достовірність відмінностей від неопроміненого контролю визначена за U-критерієм Манна-Уїтні: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Статистична достовірність відмінностей мутанта *Atmsh2*^{-/-} від відповідного варіанта контролю: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

При повторюваному опроміненні *Arabidopsis thaliana* рослин *Atmsh2*^{-/-} дозою 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр концентрація амід I доменів у клітинах епідермісу листків зменшувалася у порівнянні з контролем, в той час, як після тієї самої дози одноразового опромінення 21 Гр статистично достовірних відмінностей від неопроміненого контролю не виявлено. Отже, опромінення може як збільшувати кількість β-структурних мотивів у протеомі арабідопсису дикого типу (хронічне опромінення у сумарній дозі 20 сГр, одноразове опромінення

у дозі 21 Гр – про що свідчать результати, отримані у попередні роки), так і призводити до зменшення концентрації β -структурних мотивів у протеомі мутанта *Atmsh2*^{-/-}.

Як у рослин дикого типу, так і у мутанта *Atmsh2*^{-/-} не спостерігалось значущого впливу хронічного іонізуючого опромінення на вміст амід II домену – α -спіральних структур у білках протеому (рис. 3.1).

На діаграмі видно (рис.3.1), що у листках *Arabidopsis thaliana* WT, але не мутантних рослин в умовах хронічної дії радіації зростала концентрація амід I домену білків, тобто збільшувалася частка β -шарів у протеомі. Можливо, це вказує на індуковану стресом відповідь, пов'язану з синтезом білків, в структурі яких переважають β -структурні мотиви, зокрема пріоноподібних білків.

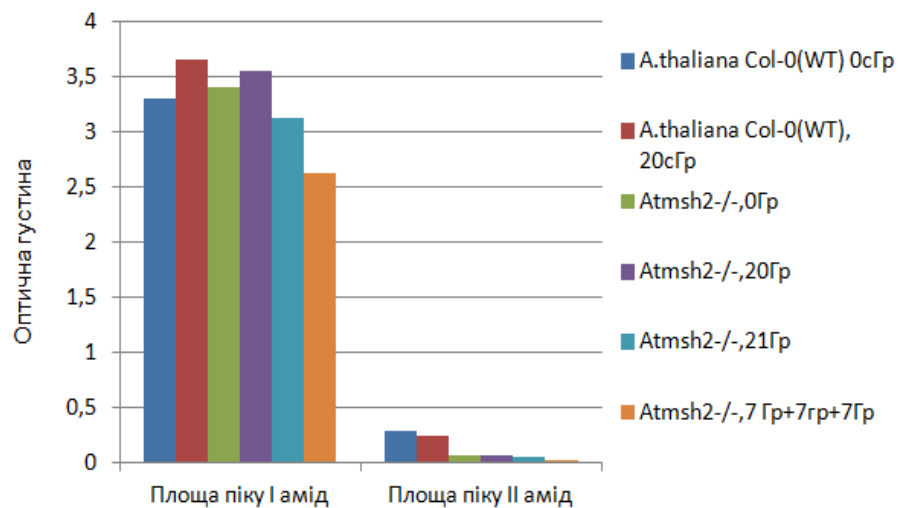


Рис.3.1. Вміст амід I та амід II доменів білків у епідермісі листків *Arabidopsis thaliana*, хронічним та гострим опроміненням визначений на основі ІЧ-спектру поглинання.

На основі скринінгу з використанням ATR-FTIR можна зробити такі висновки, що найбільш перспективно шукати пріоноподібні та амілоїдні білки у протеомі листків *Arabidopsis thaliana* після дії одноразового опромінення у дозі 21 Гр, хронічного опромінення в дозі 20 сГр (підвищення вмісту β -структурних доменів), а також у листках неопромінених рослин мутанта *Atmsh2*^{-/-} (зниження вмісту α -спіральных доменів порівняно з рослинами дикого типу).

3.2.2. Зміна співвідношення амід I до амід II доменів білків у насінні *Linum usitatissimum* та *Glycine max* з Чорнобильської зони.

Аналіз спектрограм розтертого насіння показує, що у перший рік вирощування на радіаційно забрудненій ділянці насіння льону та сої відрізнялося від контролю (табл. 3.3 і 3.4). У насінні зростало співвідношення амід II/амід I – у льону за рахунок зменшення вмісту у протеомі β -структурних доменів, у сої – за рахунок зростання кількості α -спіральных доменів. Проте на основі даних з приводу зросту через 2 та 5 років насіння обох культур із забруднених та чистих ділянок, статистично достовірно не відрізнялося за вмістом амід II та амід I доменів, як і за їх співвідношенням. Даний факт можна зрозуміти, як прояв радіоадаптації рослин.

Таблиця 3.3.

Вміст амід I та амід II доменів білків у розтертому насінні льону посівного (*L. usitatissimum*), визначений на основі ІЧ-спектру поглинання

Варіант	Амід I, площа піку, у.о., M±SE	Амід II, площа піку, у.о., M±SE	Амід II/Амід I, M±SE
<i>L. usitatissimum</i> , Чорнобиль, 2009 (К)	3,39±0,16	1,53±0,08	0,45±0,02
<i>L. usitatissimum</i> , Чистогалівка, 2009	2,65±0,18 **	1,51±0,13	0,57±0,04 **
<i>L. usitatissimum</i> , Чорнобиль, 2011 (К)	4,97±0,14	1,88±0,06	0,38±0,02
<i>L. usitatissimum</i> , Чистогалівка, 2011	4,61±0,31	1,66±0,20	0,36±0,04
<i>L. usitatissimum</i> , Чорнобиль, 2014 (К)	4,54±0,38	1,55±0,20	0,34±0,02
<i>L. usitatissimum</i> , Чистогалівка, 2014	4,46±0,38	1,30±0,18	0,29±0,02

(Статистична достовірність відмінностей від контролю визначена за U-критерієм Манна-Уїтні: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Зростання вмісту β -структурних мотивів у протеомі насіння льону та сої, які культивували на радіоактивно забруднених ділянках не з'ясовано.

Таблиця 3.4.

Вміст амід I та амід II доменів білків у розтертому насінні сої культурної (*G. max*), визначений на основі ІЧ-спектру поглинання

Варіант	Амід I, площа піку, у.о., M±SE	Амід II, площа піку, у.о., M±SE	Амід II/Амід I, M±SE
<i>G. max</i> , Чорнобиль, 2009 (К)	5,15±0,16	1,71±0,04	0,33±0,01
<i>G. max</i> , Чистогаліка, 2009	5,52±0,23	2,44±0,11 ***	0,44±0,01 ***
<i>G. max</i> , Чорнобиль, 2011 (К)	5,58±0,19	2,58±0,14	0,46±0,02
<i>G. max</i> , Чистогалівка, 2011	5,35±0,20	2,21±0,12	0,41±0,02
<i>G. max</i> , Чорнобиль, 2014 (К)	6,30±0,22	3,38±0,13	0,54±0,02
<i>G. max</i> , Чистогалівка, 2014	6,79±0,20	3,53±0,13	0,52±0,02

(Статистична достовірність відмінностей від контролю, визначена за U-критерієм Манна-Уїтні: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

3.2.3. Дії засухи на вміст амід I та амід II доменів білків у епідермісі листків *Populus sp.* (клон «Слава України»).

Populus sp. (клон «Слава України») досліджували за різних умов зволоження впливу на конформацію білків протеому клітин епідермісу листків тополь клону 'Слава України' (табл. 3.5).

При водному дефіциті 25% зволоження від контролю відбувалося максимальне порівняно з іншими варіантами зростання вмісту амід I, який є

маркером β -структурних доменів. При водному дефіциті 50% зволоження від контролю знижувався вміст у протеомі β -структурних доменів та зростала концентрація α -спіральних доменів. В контрольних рослин (100% - нормальний полив) у перший рік вегетації тополь відмічалось деяке зростання кількості β -структурних доменів, а на другому році вегетації – суттєве збільшення вмісту α -спіральних доменів (рис.3.2).

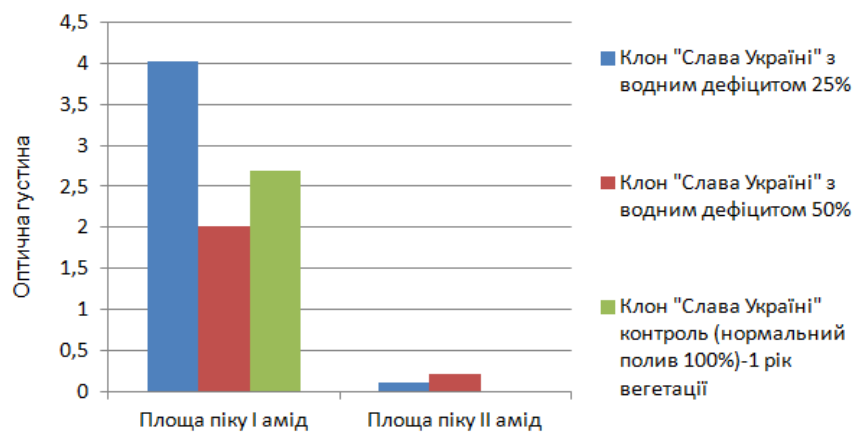


Рис.3.2. Вміст амід I та амід II доменів білків у епідермісі листків у тополі *Populus sp.* (клон «Слава України»).

Таблиця 3.5.

Вміст амід I та амід II доменів білків у епідермісі листків у тополі *Populus sp.* (клон «Слава України»), визначений на основі ІЧ-спектру поглинання

Варіант	Амід I, площа піку, у.о., M±SE	Амід II, площа піку, у.о.,M±SE	Амід II/Амід I, M±SE
Клон 'Слава України' - контроль (нормальний полив -100%)	2,33±0,16	0,05±0,01	0,02±0,01
Клон 'Слава України' – з водним дефіцитом 25% від контролю	4,02±0,27 ***	0,02±0,01	0,00±0,00 **
Клон 'Слава України' – з водним дефіцитом 50% від контролю	2,01±0,08 *	0,11±0,02 **	0,05±0,01
Клон 'Слава України' – з водним дефіцитом 75% від контролю (1-й рік вегетації)	2,30±0,10	0,06±0,01	0,03±0,00
Клон 'Слава України' – з водним дефіцитом 75% від контролю (2-й рік вегетації)	1,97±0,08	0,09±0,02	0,05±0,01
Клон 'Слава України' - контроль (нормальний	2,69±0,08 *	0,03±0,01	0,01±0,00

полив -100%) (1-й рік вегетації)			
Клон 'Слава України' - контроль (нормальний полив -100%) (2-й рік вегетації)	2,24±0,08	0,20±0,02 ***	0,09±0,01 ***

(Статистична достовірність відмінностей від контролю визначена за U-критерієм Манна-Уїтні: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Зволоження 75% від контролю не призводило до яких-небудь достовірних відмінностей від контролю ні на перший, ні на другий рік вегетації.

3.2.4. Вміст амід I та амід II доменів білків у листків *Parrotia persica*.

Інтродукція та акліматизація рослин призводить до значних змін у їх метаболізмі та епігенومی. У дослідях, проведених співробітниками НБС ім. М.М. Гришка НАН України використовували рослини *Parrotia persica* трьох фенотипів з Азербайджану, що проходили процес інтродукції в Україні. Досліджувалось три види з різними фенотипами: ф. 1 Масалінський, ф. 2 Ленкоранський, ф. 3 Лерікський.

Вивчення ІЧ-спектрограм листків інтродукованих рослин паротії показало, що інтродукція призводить до статистично достовірних модифікацій конформації білків (див. табл. 3.6). А саме: для першого фенотипу (походження з Масалінського району Азербайджану) характерне зростання площі піку амід II, що свідчить про збільшення кількості α -спіральних доменів у протеомі епідермісу листя; для другого (Ленкоранський район походження) та третього (Лерікський район походження) фенотипів

спостерігалось збільшення концентрації β -структурних доменів. На рис.3.3. вказано висновки у формі діаграми, що свідчать про те, що фенотипи 2 і 3 *P. persica* – Ленкоранський і Лерікський, є перспективними з точки пошуку у їх протеомі пріоноподібних і/або амілоїдних протеїнів.

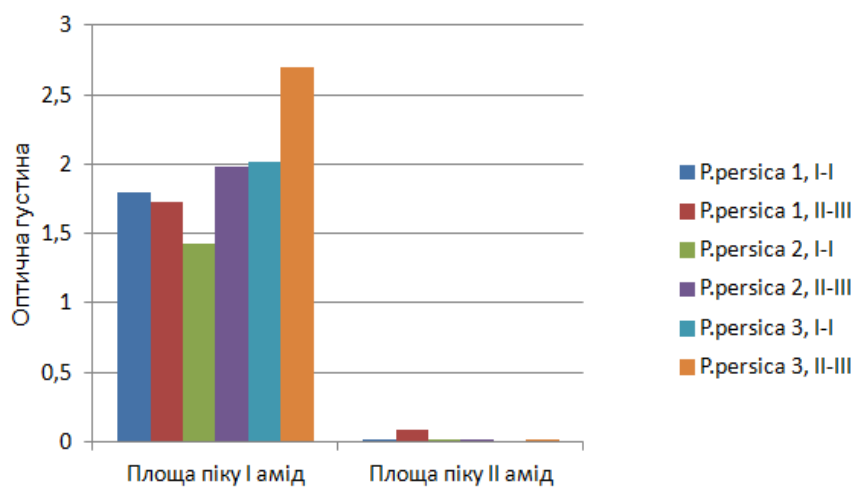


Рис.3.3. Вміст амід I та амід II доменів білків у епідермісі листків *Parrotia persica*.

Таблиця 3.6.

Вміст амід I та амід II доменів білків у епідермісі листків

Parrotia persica, визначений на основі ІЧ-спектру поглинання

Варіант	Амід I, площа піку, у.о., M±SE	Амід II, площа піку, у.о., M±SE	Амід II/Амід I, M±SE
<i>P.persica</i> , ф. 1, I-I, вересень 2020	1,79±0,09	0,02±0,01	0,01±0,00
<i>P. persica</i> , ф. 1, II-III, жовтень 2020	1,73±0,12	0,08±0,01 ***	0,05±0,01 ***
<i>P. persica</i> , ф. 2, I-I, вересень 2020	1,43±0,10	0,02±0,01	0,01±0,00
<i>P. persica</i> , ф. 2, II-III, жовтень 2020	1,98±0,07 ***	0,02±0,01	0,01±0,00
<i>P. persica</i> , ф. 3, I-I, вересень 2020	2,02±0,08	0,01±0,01	0,01±0,00
<i>P. persica</i> , ф. 3, II-III, жовтень 2020	2,70±0,09 ***	0,01±0,00	0,00±0,00

(Статистична достовірність відмінностей від контролю визначена за U-критерієм Манна-Уїтні: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Саме тому, дивлячись на отримані результати, можна зробити висновок, під дією стрес чинника відбувається підвищення відносного вмісту амід I

доменів можна розглядати як маркер можливої появи у пріоноподібних протеїнів або амілоїдних фібрил. А також зростання вмісту амід II доменів можна розглядати як маркер активної адаптивної відповіді рослин на дію стресового чинника. Але дослідження є не завершеним, необхідно зробити певні молекулярні та біоінформатичні дослідження, задля пророблення повного експерименту та уточнення амілоїдних властивостей у обраних рослин.

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Метою роботи було вивчення впливу зовнішніх абіотичних чинників (температура, іонізуюче опромінення, фактори інтродукції) на потенційні пріоноподібні протеїни у протеомах рослин, а саме на утворення β -конформацій у вторинній структурі білків. У результаті дослідження було визначено потенційні пріонні/амілоїдні властивості білків певних рослин, які можуть бути пов'язані з відповіддю на абіотичний стрес з використанням програм WALTZ, SARP, Pasta 2.0. Опановано методи та підходи до визначення α - та β - конформацій білків у листках і насінні рослин. Досліджено вплив гострого та пролонгованого/хронічного іонізуючого випромінювання, посухи, інтродукції на перехід α -спіралей у β -структури у тканинах тополі, верби, сої, льону, ячменя, пшениці, паротії перської, арабідопсису за допомогою FTIR-спектроскопії.

Пріоноподібні білки мають унікальну біохімічну пам'ять за рахунок деструктивних самоорганізованих змін конформації та функцій. Хронічні стресові фактори можуть бути причиною виникнення пріоноподібних властивостей в рослинних білках [2]. Амілоїдні фібрили демонструють собою гомополімери білків, які приймають різні перехресні β -конформації. Амілоїд-фібрилу утворюють гекспапептиди, які демонструють особливості послідовності, що відрізняються від тих, які можуть утворювати аморфні β -агрегати.

В роботі проведено теоретичні дослідження на базі опублікованої літератури для прогнозування білків з пріонними властивостями у протеомах рослин. Також було обрано певні види рослин, які були взяті до розгляду у дослідженні.

Отже, за результатами аналізу прогнозування амілоїдогенних областей за допомогою Фур'є-спектроскопії (ATR-FTIR) було виявлено імовірність їх

утворення у білках певних видів рослин. Було зроблено висновок, що під дією стресових чинників відбувається підвищення відносного вмісту амід I доменів і це можна розглядати як маркер можливої появи пріоноподібних протеїнів або амілоїдів. Також, зростання вмісту амід II доменів можна розглядати як маркер активної адаптивної відповіді рослин на дію середовищного стресу.

ВИСНОВКИ

1. З використанням бази даних та програм WALTZ, SARP, Pasta 2.0 узагальнено та обрано дані щодо прогнозованих властивостей пріоноподібних білків багатьох видів рослин.
2. Для оцінки факторів (радіація, волога, інтродукція) у рослин на утворення α - та β -конформації у листках та насінні обраних рослин застосовувався метод ATR-FTIR-спектроскопії.
3. Під дією стрес чинника відбувається підвищення відносного вмісту амід I доменів можна розглядати як маркер можливої появи у пріоноподібних протеїнів або амілоїдних фібрил.
4. Зростання вмісту амід II доменів можна розглядати як маркер активної адаптивної відповіді рослин на дію стресового чинника.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Антонец К.С. Изучение роли последовательностей, богатых аспарагином и глутамином, в индукции амилоидогенеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* : дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07/ Антонец Кирилл Сергеевич; Санкт-Петербургский государственный университет. – Санкт-Петербург, 2016. – 138 с. <https://disser.spbu.ru/files/disser2/disser/VWYX09hC6L.pdf>
2. Antonets K.S., Belousov M.V., Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Kosolapova A.O., et al. // Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation. - PLOS Biology. – 2020. - 18 (7): e3000564. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000564>
3. Antonets K.S, Nizhnikov A.A. Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants // Int J Mol Sci. – 2017. - Oct 16; 18(10). - 2155.
4. Li Y. Expression of jasmonic ethylene responsive factor gene in transgenic poplar tree leads to increased salt tolerance / Y. Li, X. Su, B. Zhang, Q. Huang [et al.] // Tree Physiol. – 2009. – Vol.29, 2. – P. 273– 279.
5. Lovelli S. Effects of UV-C radiation on common dandelion and purple coneflower: First results / Lovelli S., Candido V., Scopa A. // International Journal of Plant Biology. – 2017. – Vol. 8. – N. 7255. – P. 61-65.
6. Makhnii T., Ilchenko O., Reynt A., Pilgun Y., Kutsyk A., Krasnenkov D., Ivasyuk M., Kukharsky V. Age-related changes in FTIR and Raman spectra of human blood // Ukr. J. Phys. – 2016. – 61 (10). – P. 853-862.
7. Maurer-Stroh S., Debulpaep M., Kuemmerer N., Lopez P.M., Martins I.C., Reumers J., Morris K.L., Copland A., Serpell L., Serrano L., et al. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices // Nat. Methods. – 2010. – 7. – P. 237–242.

8. Anfinsen K.B. Studies on the principles that govern the folding of protein chains. // Nobel Lecture, December 11, 1972. – National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/anfinsen-lecture.pdf>
9. Levinthal C. How to Fold Graciously. // Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois. / Editors: J. T. P. DeBrunner and E. Munck. – Illinois: University of Illinois Press. – 1969. – p. 22-24. <https://web.archive.org/web/20110523080407/http://www-miller.ch.cam.ac.uk/levinthal/levinthal.html>
10. J. Moult, J.T. Pedersen, R.Judson, K.Fidelis. A large-scale experiment to assess protein structure prediction methods. // PROTEINS: Structure, Function, and Genetics. – 1995. – Vol.23. – p. I-IV. <https://doi.org/10.1002/prot.340230303>
11. Senior A.W., Evans R., Jumper J. et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. // Nature. – 2020. – Vol. 577. – p. 1-22. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1923-7>
12. Pauling L., Corey R.B. Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1951. – Vol. 37(11). – p. 729-740. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.11.729>
13. Гайда Ю.І., Яцик Р.М. Щодо доцільності створення й культивування генетично модифікованих дерев // Лісівництво і агролісомеліорація. — 2009. — Вип. 116. — С. 183–189.
14. В. П. Коцура, О. І. Потапенка Енциклопедичний словник символів культури України //— 5-е вид. — Корсунь-Шевченківський: ФОП Гаврищенко В.М., 2015. – С. 110–113. – 912 с.
15. В. А. Вергунов, Л. М. Татарчук Зернобобові культури : тематичний науково-допоміжний бібліографічний покажчик вітчизняних та зарубіжних видань з фондів Національної наукової

- сільськогосподарської бібліотеки НААН // НААН, ННСГБ — К., 2016. — 270 с.
16. Ramin Ansari , Mohammad M Zarshenas A Review on Pharmacological and Clinical Aspects of *Linum usitatissimum* // *Curr Drug Discov Technol* - 2019 - 148-158p.
 17. Губанов И. А. *Hordeum vulgare* L. — Ячмень обыкновенный // Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. — М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2002.
 18. Pushpendra Kumar Gupta , Harindra Singh Balyan Genetics of yield, abiotic stress tolerance and biofortification in wheat (*Triticum aestivum* L.) / 2020 May - 1569-1602p. - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32253477/>
 19. Hassan Ali , Khair Ullah , Hina Siddiqui Chemical constituents from *Parrotia persica*- Structural derivatization and their potential prolyl endopeptidase inhibition activity/ - 2020 Mar. - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32004898/>
 20. Губанов И. А. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. — Резуховидка Таля / Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. — М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2003. — Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). — С. 257
 21. Jim M. Dunwell, Alan Purvis, Sawsan Khuri Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? / The BioCentre School of Plant Sciences, The University of Reading, Whiteknights, Reading RG6 6AS, UK – 2003 <https://sci-hub.se/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14697267/>
 22. Wang X. A Comprehensive analysis of the cupin gene family in soybean (*Glycine max*) / Wang X., Zhang H., Gao Y., Sun G., Zhang W., Qiu L. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – N 10. – e110092.
 23. Wei Z., Dong L., Tian Z.H. Fourier transform infrared spectrometry study on early stage of cadmium stress in clover leaves // *Pak. J. Bot.* – 2009. – 41(4). – P. 1743-1750. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41\(4\)/PJB41\(4\)1743.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41(4)/PJB41(4)1743.pdf)

24. Zhuge X.L. Biochemical functions of glutathione S-transferase family of *Salix babylonica* / Zhuge X.L., Xu H., Xiu Z.J., Yang H.L. // Front Plant Sci. – 2020. – Vol. 3. – N 11. – P. 364.
25. Monticolo F. Shaping the evolutionary tree of green plants: evidence from the GST family / Monticolo F., Colantuono Ch., Chiusano M.L // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7. – N 1. – P. 14363.
26. Kirill S. Antonets,, Mikhail V. Belousov Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation // -2020 -PLoS Biol 18(7): e3000564. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000564>
27. Daniel Otzen , Roland Riek Functional Amyloids // Cold Spring Harb Perspect - October 2019 - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31088827/> October (2019)
28. Enrico Schleiff , Lutz Andreas Eichacker , Kerstin Eckart , Thomas Becker , Oliver Mirus , Tanja Stahl , Jürgen Soll Prediction of the plant β -barrel proteome: A case study of the chloroplast outer envelope// Volume12, Issue - January (2009) - Pages 748-759 <https://doi.org/10.1110/ps.0237503>
29. Chuang E., Hori A. M., Hesketh C. D., Shorter J. Amyloid assembly and disassembly // Journal of Cell Science. - 2018. - 131(8). - jcs189928.
30. Antonets and A. A. Nizhnikov Amyloids and prions in plants: Facts and perspectives // Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. - 2017 - 11(5): 300-312.
31. A Mary Thangakani , Sandeep Kumar, D Velmurugan, M Michael Gromiha Distinct position-specific sequence features of hexa-peptides that form amyloid-fibrils: application to discriminate between amyloid fibril and amorphous β -aggregate forming peptide // BMC Bioinformatics 2013;14 Suppl 8(Suppl 8):S6. doi: 10.1186/1471-2105-14-S8-S6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23815227/>
32. <http://waltz.switchlab.org/>
33. <http://www.pantherdb.org/>

34. <http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRED2/>
35. <http://tango.crg.es/>
36. <https://cordax.switchlab.org/>
37. Larkin P. J. Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. — Elsevier, 2011. — 230 p. — ISBN 978-0-12-386984-5.
38. Stuart B. H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications// — Wiley, 2004. — 242 p.
39. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry // Lindon J. — 2nd Ed. — Academic Press, 2010. — 3312 p. (англ.)
40. Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных = Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data // Пер. с англ. Б. Н. Тарасевича. — Бином. Лаборатория знаний, 2006. — С. 251—318. — 1500 экз. — ISBN 5-94774-572-0.
41. Makhnii et al., 2016; Mazurek et al., 2013; Movasaghi et al., 2008; Perromat et al., 2003; Schulz, Baranska, 2007; Wei et al., 2009; Zhao et al., 2009
42. Б.Н.Тарасевич, «Основы ИК спектроскопии с преобразованием Фурье»? Москва 2012 http://chemnet.ru/rus/teaching/tarasevich/Tarasevich_FT-IR_basic.pdf
43. Alexander A Maskevich , Vitali I Stsiapura, Valeriy A Kuzmitsky, Irina M Kuznetsova, Olga I Povarova, Vladimir N Uversky, Konstantin K Turoverov Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form // Proteome Res - 2007 Apr:1392-401
44. Vitali I Stsiapura , Alexander A Maskevich, Valery A Kuzmitsky, Vladimir N Uversky, Irina M Kuznetsova, Konstantin K Turoverov Thioflavin T as a

molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity // J Phys Chem B2008 Dec 11; - 112p.

45. A I Sulatskaia, I M Kuznetsova Thioflavin T interaction with amyloid fibrils as an instrument for their studying // Tsitologiya. - 2010;52(11):955-9.

46. Nadav Amdursky , Yuval Erez, Dan Huppert Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker // Acc Chem Res- 2012 Sep 18;45(9):1548-57

47. Matthew Biancalana , Shohei Koide Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils // Biochim Biophys Acta - 2010 Jul;1804(7):1405-12

48. Hannah Tiernan , Bernadette Byrne , Sergei G Kazarian ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc- 2020 Nov 5;241:118636.

49. Suren A Tatulian FTIR Analysis of Proteins and Protein-Membrane Interactions // Methods Mol Biol. 2019;2003:281-325.

50. Daichi Yamada , Hideki Kandori FTIR spectroscopy of flavin-binding photoreceptors // Methods Mol Biol 2014;1146:361-76.

51. <https://spss.software.informer.com/17.0/>