

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології

та біоінформатики

к.б.н, доц. Нипорко

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 20__ р.

**ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРНИХ І БІОФІЗИЧНИХ
ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕМБРАН АРХЕЙ *HALOFERAX VOLCANII***

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студентки спеціальності 091 Біологія
ОП «Біоінформатика і структурна біологія»
Афоніної Уляни Костянтинівни

Науковий керівник від кафедри
Асистент кафедри молекулярної біотехнології
та біоінформатики
к.ф.-м.н. **Войтешенко Іван Сергійович**

Робота виконана у науково - дослідницькій групі проф. Ulrike

Endesfelder при Боннському університеті, Німеччина.

Під керівництвом проф. **Ulrike Endesfelder.**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Афоніна У.К. Вивчення структурних і біофізичних властивостей мембран архей *Haloferox Volcanii*. - Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія, освітня програма «Біоінформатика і структурна біологія».

Метою даної роботи було дослідження мембран і можливості створення ліпосом з ліпідів галоархей *Haloferox volcanii*. Робота виконувалась із застосуванням методів біоінформатики, молекулярної біології і біофізики.

Актуальність теми кваліфікаційної роботи зумовлена великим потенціалом мембран галоархей у біотехнологіях і медицині. Оскільки мембрани галоархей є визначальним фактором стійкості цих організмів. Проте сучасні уявлення про структуру і механізми функціонування мембран *Haloferox volcanii* є дуже обмеженими і, в певних моментах, суперечливими. Саме тому дослідження мембран і можливих мембранних міметиків є актуальним вектором досліджень, що дасть можливість дізнатись механізми стійкості архей і, можливо, застосовувати ці особливості в різних сферах біології і фармакології.

При роботі над даним проектом за допомогою методів розрахункової молекулярної динаміки, електроформації, інфрачервоної спектроскопії з Фур'є перетворенням і одномолекулярної локалізаційної мікроскопії було змодельовано поведінку мембран і встановлено можливість руху мембранних складових в товщі бішару. Проведено оптимізацію протоколів для виділення і подальшої роботи з ліпідами галоархей. Досліджена і доведена можливість створення гігантських уніламельярних везикул з мембран *Haloferox volcanii*.

В майбутньому планується подальша робота над даним дослідженням, а саме біофізичні дослідження плинності мембран і можливої наявності ліпідних рафтів. В процесі дослідження генералізованої поляризації і

можливості переходів ліпідних фаз при змінах температур під час електроформації.

Результати досліджень будуть представлені на симпозіумі Асоціації загальної і прикладної мікробіології в Гетінгені, Німеччина.

Ключові слова: археї, *Haloferax volcanii*, гігантські уніламельярні ліпосоми, одномолекулярна локалізаційна мікроскопія.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ.....	9
1.1 Археї.....	9
1.2 Молекулярна динаміка.....	11
1.2..1 База даних LIPID MAPS.....	13
1.2..2 CHARMM-GUI.....	13
1.2.3 NAMD	14
1.3 Мікроскопія надвисокої роздільної здатності.....	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	18
2.1 Список використаних матеріалів.....	18
2.2 Робота з матеріалом	18
2.2.1 Середовище для культивування архей.....	18
2.2.2 Виділення архей і складових.....	18
2.3 Утворення гігантських уніламельярних везикул.....	19
2.4 Електроформація ліпосом.....	20
2.5 Одномолекулярна локалізаційна мікроскопія.....	20
2.6 Підготовка зразків до мікроскопії.....	21
2.7 ІЧ спектроскопія.....	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ.....	23
3.1 Дослідження динаміки мембран архей.....	23
3.1.1 Підбір системи.....	23
3.1.2 Збірка системи.....	26
3.1.3 Проведення молекулярної динаміки	20
3.2 Структура мембран і маніпуляції з ліпосомами.....	31
3.2.1 Інфрачервона спектроскопія з Фур'є перетворенням.....	31
3.2.2 Побудова приладу і оптимізація протоколу	37

електроформації.....	
3.2.3 Мікроскопія.....	40
ВИСНОВКИ.....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	44
ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ.....	49

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

DOPC	phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
S-DGD-5-PA	1-O-[6-O-(2,3-di-O-phytanyl-1-phospho-sn-glycerol)-2-O-(2-HSO ₃ -alpha-D-mannopyranosyl)-alpha-D-glucopyranosyl]-2,3-di-O-phytanyl-sn-glycerol
BPG	bisphosphatidylglycerol
PGP-Me	2,3-di-O-phytanyl-sn-glycero-1-phospho-(3'-sn-glycerol-1'-methyl phosphate)
PG	Phosphatidylglycerol
GUV	giant unilamellar vesicles
NAMD	Not Another Molecular Dynamics
STED	Stimulated emission depletion microscopy
SIM	Structured illumination microscopy
SMLM	single molecular localization microscopy
PALM	Photo-activated localization microscopy
VMD	Visual Molecular Dynamics
(d)STORM	Direct stochastic optical reconstruction microscopy
GSDIM	Ground state depletion microscopy
МД	Молекулярна динаміка
ІЧ	Інфрачервоний

ВСТУП

Існує група організмів, яка живе в екстремальних умовах зовнішнього середовища, при високих температурах і високих концентраціях солей, в той час, як і бактерії і еукаріоти за таких умов не здатні до виживання. Цей домен унікальних організмів називається археями. Одним з ключових факторів, що відрізняє археї від бактерій та еукаріотів, є мембрани цих організмів. Інвертована стереохімія гліцерину їхніх ліпідів, етерові зв'язки і ненасиченість ліпідних хвостів - усе це виняткові характеристики, що притаманні мембранам архей [1]. Тобто саме ареальні мембрани є тою складовою, що визначає стійкість цих організмів до хронічних енергетичних стресів. На даний момент археї вважаються нетоксичними для людей. Також на сьогодні відомо, що різним родинам архей притаманні різні ліпіди. Багато представників цього домену мають мембрани, що побудовані з біполярних тетраетерових ліпідів, що формують замкнений моношар. Наприклад мембрани представників родини *Sulfolobaceae* майже на 90% складається з тетраетерових ліпідів [2]. Проте існують також археї, що в своєму складі не має тетраетерових ліпідів, а складається з диетерових ліпідів, що, в свою чергу, дає їх можливість формувати бішари. Саме такі мембрани притаманні родині *Haloferax*. Це робить архей цієї родини цікавим об'єктом для дослідження мембранних характеристик.

Отже, оскільки ці нетоксичні для людей мембрани зберігають свою структурну цілісність навіть в екстремальних умовах, їх застосування потенційно відкриває захоплюючі можливості для їхнього застосування при вирішенні широкого спектру різних задач, включаючи біологію, фізику і медицину. Згідно нашої ідеї, ліпосоми, утворені з ареальних ліпідів, є перспективними об'єктами, що можуть виступати в ролі транспортних засобів для доставки ліків в екстремальних умовах [3]. Однак біофізичні властивості мембран архей є відносно недослідженими, на відміну від добре вивчених мембранних властивостей бактерій та еукаріотів [3]. Окрім цього, в

ареальних мембранах нічого не відомо про існування мікродоменів, таких як ліпідні рафти, які широко досліджуються в еукаріотичних мембранах і так само існують в деяких мембранах бактерій [3]. Як наслідок, існування, характеристики та функції мембранних мікродоменів архей залишаються невідомими.

Саме тому, ідеєю проекту стало вивчення потенціалу ліпідів, отриманих з мембран архей, їх структурних і біофізичних характеристик. Найзручнішою формою для вирішення даної задачі є гігантські уніламельярні везикули, які є розповсюдженим мембранним міметиком в біології.

У цьому дослідженні ми застосували методи електроформування для створення гігантських одношарових везикул (GUV) [4]–[6], використовуючи ізольовані археальні ліпіди з *Haloferox volcanii*. Ми провели узагальнені дослідження для оптимізування протоколів виділення, електроформації і візуалізації археосом. З цією метою ми використовували засоби розрахункової молекулярної динаміки, одномолекулярну локалізаційну мікроскопію та інфрачервону спектроскопію.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1 Археї

Унікальний домен живих організмів, що справедливо привертають до себе велику увагу вчених різних галузей біології, біотехнологій і промисловості. Вони винесені в окремий домен життя дякуючи своїм визначальним, відмінним від еукаріот і прокаріот характеристикам та еволюційною історією. Мабуть головна риса, що відрізняє архей від усіх інших живих організмів і робить їх такими особливими – це здатність виживати в різних екстремальних середовищах, таких як гарячі джерела, глибоководні вихрі, та кислотні ґрунти [7]. Археї також беруть участь в важливих біогеохімічних циклах, таких як карбоновий та азотний, та відіграють важливу роль у розкладі органічної речовини.

Зокрема, основним фактором стійкості цих мікроорганізмів до таких умов зовнішнього середовища, де можливість продукування енергії обмежена відносно енергії, необхідної для підтримки клітин вважається будова їхніх мембран, що у своєму складі містять ізопереноїдні гліколіпіди з етеровими зв'язками, що на відміну від звичних, притаманних еу- та прокаріотам жирнокислотних хвостів з етеровими зв'язками, виявляються нечутливими до таких, здавалось би, суворих факторів [7, 8].

На відміну від бактерій, більшість архей не має зовнішньої мембрани [9]. Проте часто вони мають зовнішню клітинну оболонку з S- шаром. Саме тому доступ до ареальних ліпідів має певні особливості.

Нашим об'єктом було вибрано галоархеї *Haloferox volcanii*, які відносяться до порядку *Halobacteriales* і являються екстремофілами. Археї цих родин живуть у різних надсолоних середовищах. Деякі види архей з цього порядку здатні жити в середовищах з надвисокими температурами. Діапазон температурних значень досить широкий, проте деякі з представників виживають в умовах 50°C [10,11]. Проте, окрім екстримально

високих температур, деякі з видів архей цього порядку також стійкі до зовнішніх умов з дуже високою концентрацією катіонів, до 5 М NaCl [12,13].

Однією з найбільших відмінностей між клітинними мембранами галоархей та інших архей є відсутність у них тетраефірних ліпідів (і таким чином моношарів). Проте достеменний склад і структура цих мембран залишається невідомою. Існує кілька досліджень стосовно мембранного складу *Haloferax volcanii* [13-15]. Було проаналізовано наявність літературних джерел на теми складу мембран *Haloferax volcanii* для подальшого моделювання.

Проте в даних роботах відомості щодо ліпідного складу відрізняються між собою.

В роботі [14] заявлено про присутність в мембранах *Haloferax* sn-2,3-дифітанілгліцерол-6-фосфо-sn-2,3-ді-О-фітанілгліцеролу, присутність якого не спостерігається в інших літературних джерелах. Склад, відповідно до роботи [16] містить лише 5 ліпідів: бісфосфатидилгліцерин; фосфатидилгліцерин; метиловий ефір фосфатидилгліцерофосфату; моносультатний диглікозил дифітанілгліцериновий діефір; глікозил-кардіоліпін, проте немає відомості про інші складові. Нарешті в роботі [13] наводиться відсотковий склад різних ліпідів, що є складовими арельних мембран для нашого досліджуваного об'єкта (рис. 1.1).

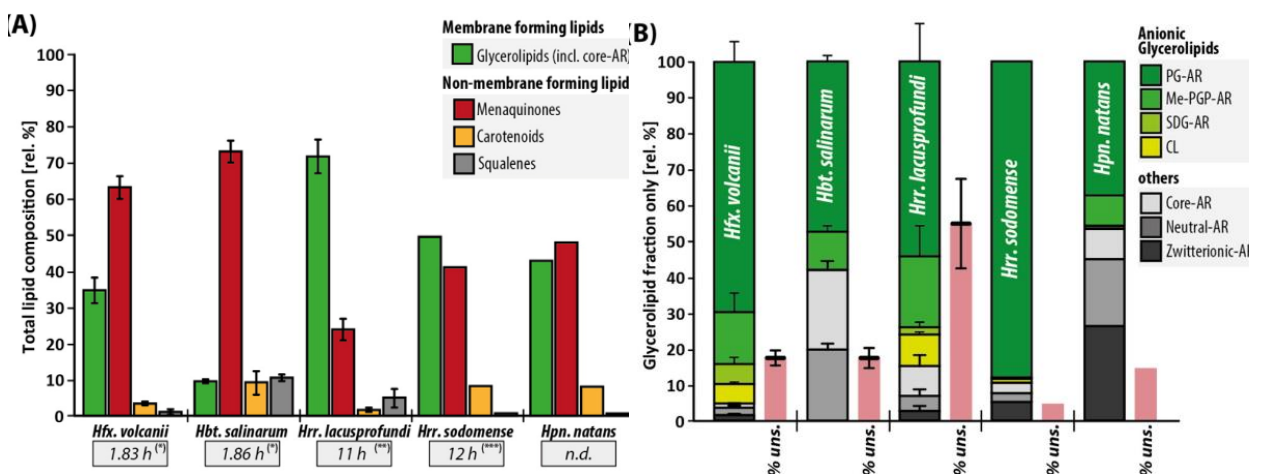


Рис. 1.1. Порівняльний вміст різних складових мембран різних галоархей. (а) Вміст усіх мембранних компонентів. (Б) Вміст різних гліколіпідів [13].

В даній роботі вказано відсоткові вмісти різних ліпідів і показано, що кількість мембранотворних гліцероліпідів вцілому досить низька, порівняно з надвисоким вмістом менахіонів у мембранах. Проте які саме менахіони містяться у мембранному складі залишається невідомим. За допомогою методів, застосованих в даній роботі неможливо визначити особливості розташування менахіонів в бішарі мембран, і їх роль залишається невідомою. Автори пропонують кілька можливих гіпотез стосовно розташування і ролі цих елементів (рис. 1.2.).

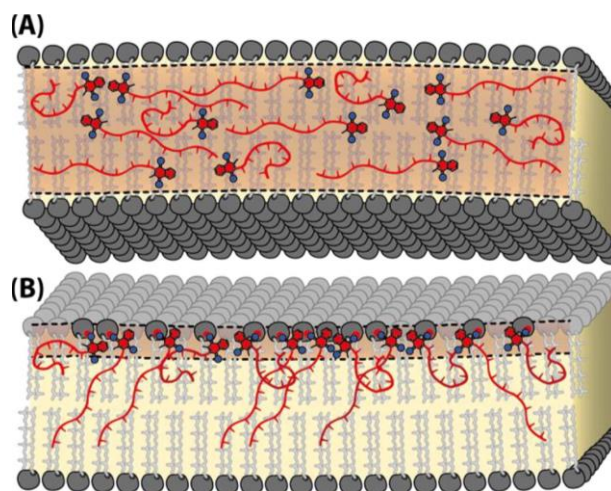


Рис.1.2. Висунуті гіпотези розташування менахіонів в товщі бішару галоархей.

Вони вважають, що менахіони можуть бути визначальними факторами у питаннях плинності і стійкості мембран галоархей. Саме тому останню роботу було взято за референт в подальшому моделюванні мембран архей, разом з іншими роботами, щоб обрати ліпід, що точно присутні в мембранах *Haloferax volcanii*.

1.2 Молекулярна динаміка

В сучасній біології, фізиці і хімії для *in silico* дослідження поведінки систем, особливо біологічних, існує такий потужний розрахунковий метод

як молекулярна динаміка. Необхідність таких методів була продиктована потребою опису квантово-механічних рухів і хімічних реакцій великих і складних молекулярних систем, які неможливо чи дуже важко і дорого досліджувати *in vitro*. Саме через це у другій половині минулого століття було запропоноване застосування простих наближень, що базуються на Ньютонівській фізиці, для розрахункових досліджень руху атомів [17,18].

Спершу, для того щоб в принципі зробити комп'ютерну модель, що відповідає певній молекулярній системі використовують різноманітні експериментальні дані, наприклад: дані ядерного магнітного резонансу, кристалографічні дані. Сучасна біоінформатика з цією ж метою також дозволяє застосувати дані гомологічного моделювання [19,20].

Для того, щоб забезпечити оцінку сил, що діють на атоми системи використовуються диференційні рівняння. Оскільки системи зазвичай складаються з пулу зв'язаних і незв'язаних атомів, то у рівняннях описується сума сил, що діє на кожен з цих типів атомів. Окрім цього, при розрахунках молекулярної динаміки беруться до уваги атомні кути і хімічні зв'язки між атомами, які при спрощенні набувають вигляду віртуальних пружин, а двогранні кути задаються синусоїдальною функцією, що апроксимує енергетичну різницю між екліптичною конформацією і антиклінальною конформацією молекул. Для опису Ван дер Ваальсових взаємодій, що відповідають за зв'язані атоми, використовуються представлення параметрів для описування кривої міжатомної взаємодії, що відповідає потенціалу Ленарда Джонса. Електростатичні взаємодії відповідають за незв'язані компоненти і в молекулярній динаміці модулюються за допомогою закону Кулона [18,19,21].

Після опису енергетичних умов молекулярних систем за допомогою описаних принципів, виникає необхідність модулювання фактичної поведінки молекул у процесі руху. Для цього відбувається параметризація цих даних відповідно до експериментальних даних і квантово - механічних розрахунків. Сукупність параметрів параметризації – це так зване силове

поле. Воно зазвичай включає в себе такі параметри, як визначення Ван дер Ваальсових радіусів атомів, визначення оптимальних часткових атомних зарядів для обчислень енергій електростатичних взаємодій, чи, для опису атомних кутів і зв'язків, визначення довжини умовних пружин і їх ідеальної жорсткості [18,21,22]. Існують різні силові поля, які відрізняються способами параметризації і мають особливості для моделювання різних за розміром чи складом систем [23,24]. Під час самого процесу МД відбувається розрахунок усіх сил, що діють на кожен з атомів системи і, відповідно до закону Ньютона, положення атома змінюється [15].

1.2.1 База даних LIPID MAPS

Після проведення дослідження літературних даних було визначену вибірку ліпідів, з яких може складатись системи мембрани *Haloferax volcanii*. Для того щоб визначити їх структурні формули було досліджено базу даних LIPID MAPS [25].

Це база даних з вільним доступом, яка надає можливість знайти вичерпну інформацію про структуру, функції та властивості різних груп ліпідів. Саме ця база даних є найбільшою і найякіснішою в контексті ліпідів.

У LIPID MAPS міститься детальна інформація про понад 40 000 унікальних структур ліпідів, включаючи їх хімічні формули, систематичні та загальні назви, а також фізичні та хімічні властивості. Окрім цього, там можна знайти інформацію про шляхи біосинтезу та метаболічні функції ліпідів, а також про їхню роль у різних біологічних процесах.

1.2.2 CHARMM-GUI

Мембрани, з визначеним ліпідним складом було побудовано в сервісі CHARMM-GUI membrane builder [26-28].

Це веб-графічний інтерфейс, який допомагає користувачам

налаштовувати і генерувати вхідні файли і готувати системи для молекулярно-динамічного моделювання за допомогою покрокового підходу. Користувачі можуть вказати деталі свого моделювання, такі як силове поле, модель розчинення та умови моделювання. CHARMM-GUI також надає інструменти для візуалізації та аналізу результатів моделювання [26,28].

1.2.3 NAMD

Для досліджень з розрахунків молекулярної динаміки фосфоліпідних мембран архей *Haloferax volcanii* використовувався програмний пакет NAMD (Not Another Molecular Dynamics). Ця програма без графічного інтерфейсу, що, як і GROMACS, керується за допомогою інпутів з командного рядка. Зазвичай цей пакет використовується для розрахунків великих молекулярних систем. Для роботи в NAMD необхідно підготувати вихідні файли з описом самої системи і її параметрами, які попередньо були виконані у CHARMM-GUI. Як детально описано вище, за допомогою цього веб за стосунку було зроблено усі необхідні кроки з опису і підготовки системи: підготований вихідний файл топології, координати системи, файл параметрів моделювання і параметрів силового поля (у нашому випадку силового поля CHARMM36m); там же було згенеровано файли молекул води, що розташовувались навколо ліпідів (по 50 молекул води на один ліпід); після цього також було згенеровано необхідні для коректних симуляцій іони солі, які, для врівноваження системи, були нейтралізовані за допомогою протиіонів. Після отримання усіх необхідних вхідних файлів у CHARMM-GUI, у програмному пакеті NAMD було проведено такі основні кроки:

1. Мінімізація системи. Тобто було проведено енергетичну мінімізацію для зменшення потенційної енергії.

2. Шестикрокове еквілібрування системи. Це процес врівноваження і збалансування системи, для встановлення контрольованих чинників (таких як тиск, температура і т.д.) і їх збереження протягом певного періоду часу (в

нашому випадку 50 пікосекунд).

3. І останнім кроком було проведено симуляцію.

Після чого було отримано топологічні файли, які далі використовувались для візуалізації поведінки системи у програмі VMD.

1.3 Мікроскопія надвисокої роздільної здатності

Низка сучасних методів візуалізації, таких як широкопольна, конфокальна або багатофотонна флуоресцентна мікроскопія, дають можливість проведення неінвазивних дослідження живих клітин чи тканин практично в реальному часі з високим рівнем роздільної здатності. Проте, незважаючи на переваги даних класичних методів мікроскопії, на просторову роздільну здатність усіх таких технологій накладені певні обмеження за рахунок неможливості подолання дифракційного бар'єру. Звісно такий нюанс не дає повноцінно застосовувати дані методики, особливо коли мова йде про нанорозмірні системи. Для подолання даного обмеження було розроблено нові підходи для обходу дифракційного бар'єру, що стало новим етапом еволюції мікроскопії. Методи, що застосовують такі підходи називаються мікроскопією з надвисокою роздільною здатністю. До них належать три основні види мікроскопії:

1. Мікроскопія зі стимульованим випромінюванням (STED),
2. Мікроскопія зі структурованим освітленням (SIM),
3. Одномолекулярна локалізаційна мікроскопія (SMLM) [29].

В наших дослідженнях буде використовуватись метод одномолекулярної локалізаційної мікроскопії. В свою чергу це не один певний метод. Це низка методів, що на основі різних закладених принципів дають можливість локалізувати і досліджувати динаміку маленьких молекулярних доменів, чи навіть окремих молекул на основі принципів збудження флуоресцентних зондів. В залежності від принципів, що лежать в основі одномолекулярної локалізаційної мікроскопії, виділяють (PALM) - фотоактивовану

локалізаційну мікроскопію, ((d)STORM) - стохастичну оптичну реконструкційну мікроскопію, (GSDIM) - виснаження основного стану з наступним поверненням окремої молекули) і багато інших новітніх методів. Усі ці методи базуються на основі трекінгу і фіксації фотоперемикання окремих флуорофорів під дією різних довжин світла. Після цього в одномолекулярній локалізаційній мікроскопії використовуються різні алгоритми пост-обробки даних для генерації зображень із високою роздільною здатністю. Окрім цього можна проводити порівняльні дослідження алгоритмів локалізації та алгоритмів відстеження окремих частинок, більшість відповідних необхідних для цих задач «вимкненим» і «ввімкненим» станами. Більшість програмних алгоритмів знаходяться у відкритому доступі [30].

У SMLM основним принципом є стохастичне фотоперемикання просторово розділених флуорофесцентних зондів та виявлення на цій основі окремих молекул [29,31]. Щоб досягти цього, усі флуорофори для SMLM модулюються таким чином, щоб була можливість їх фотоперемикання між включеним і виключеним станами. Лише невелика підгрупа флуорофорів у включеному стані може випромінювати флуоресценцію в певний час. В методі одномолекулярної локалізаційної мікроскопії використовується ця особливість. Відбувається послідовна детекція і фіксація зображення, як правило, кількох тисяч піднаборів просторово розділених і помітних флуорофорів, після проходження певного часу проявляються інші флуорофори і таким чином усі випромінювачі фіксуються на детекторі. Конкретно, на детекторі реєструються випромінювані флуорофорами фотони, які в свою чергу розподіляються в обмежених явищем дифракції ділянках. Відбувається запис цілої низки зображень із роздільною здатністю в часі, доки не будуть зчитані всі флуорофори [32]. Плями свічення на місці флуорофорів можна ідентифікувати за допомогою алгоритмів обробки зображень, що дозволяє точно визначити положення флуорофорів та інші притаманні їм властивості (інтенсивність флуоресценції, тривалість

флуоресценції, точність підгонки позиціонування тощо).

Таким чином, границя роздільної здатності в одномолекулярній локалізаційній мікроскопії в основному визначається точністю, з якою локалізуються окремі флуорофори, що можна спростити до формули вигляду:

$$d_{SMLM} \approx \frac{d}{\sqrt{N}} \quad (1.1)$$

Роздільна здатність одномолекулярного локалізаційного мікроскопа

d — умовна межа роздільної здатності, а N — кількість фотонів, виявлених в одній плямі флуоресценції [29,33].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Список використаних матеріалів

CHARMM-GUI, VMD, NAMD, Масово паралельний процесор Bonna MPP cluster (Fraunhofer Institute for Algorithms and Scientific Computing SCAI), Апаратно обчислювальна платформа Arduino, програмований модуль AD9833, флуоресцентний барвник Nile Red (TermoFisher scientific); NaCl, MgSO₄, cMgCl₂, KCl, HCl; фосфатний буфер; метанол, хлороформ, NH₄Cl, CaCl₂, тіамін, біотин, 3д принтері Ender 3 pro.

2.2 Робота з матеріалом

2.2.1 Середовище для культивування архей

HV-min [34] готувалося наступним чином:

1. Для стокового розчину (на літр) додавали 144 г NaCl, 21 г MgSO₄ 7H₂O, 18 г MgCl₂ 6H₂O, 4,2 г KCl і 42мМ HCl (pH 7,5).
2. Після цього проводилоась автоклавування та охолодження.
3. Потім додавали 4,25 мл розчину DL-лактату натрію, 0,25 мл гліцерину, 5 мл 1 М розчину NH₄Cl, 6 мл 0,5 М розчину CaCl₂, 2 мл 0,5 М калій-фосфатного буферу (pH 7,5), 1 мл розчину мікроелементів, 0.8 мг тіаміну та 0,1 мг біотину.
4. Останніми додавали лейцин, триптофан і урацил, - до концентрації 50 г/м.

2.2.2 Виділення архей і складових

Археї *Haloferax volcanii* були вирощені в рідкому спеціальному середовищі з підвищеним вмістом солі.

Після 5 днів культивування зі зміною середовища кожні два дні було виділено загальну ліпідну фракцію з архей за стандартним протоколом:

Відміряли 25 мг осаджених архей, які відмивали фосфатним буфером і додавали 100 μ l 0.1молярного розчину HCL+100 μ l 0.5 молярного NaCL.

Далі додавали 600 μ l метанолу та хлороформу у пропорції 1:1.

Одержану суміш перемішували на мішалці Vortex протягом 45 хвилин.

Після цього додавали 200 μ l розчин 0.1M HCL та 0.5M NaCL у пропорції 1:1.

Знову перемішували за допомогою Vortex мішалки протягом 15 хвилин Далі проводили центрифугування за 14000 об\хв. протягом 5 хвилини.

Ми внесли зміни до стандартного протоколу виділення ліпідів, оскільки клітини архей містять зовнішній Sшар, для усунення якого необхідно було збільшити час центрифугування, кількість обертів на хвилину.

Протокол розділення ліпідів.

Далі загальна ліпідна фракція була розділена на полярні та неполярні ліпіди за допомогою протоколу:

1. За допомогою вакуумного випарювання спочатку випарювали хлороформ протягом 1 години при температурі 60°C і тиску 95 мБар.

2. До висушеного ліпідного екстракту додали приблизно 20-30 об'ємів ацетону.

3. Перемішали на вортексі протягом однієї хв. і залишили на льоду на одну годину.

4. Відцентрифугували та зібрати супернатант.

5. Гранулят, багатий фосфоліпідами та гліколіпідами, висушили під потоком азоту і вакуумом, і повторно розчинили у суміші хлороформ/метанол для подальшого аналізу.

6. Ацетон випарювали протягом 45 хвилин за температури 50°C і тиску 95 мБар.

2.3 Утворення гігантських уніламельярних везикул

Для створення ліпосом з виділеної ліпідної фракції *Haloferax volcanii* в

камеру для електроформації [35,36] (безпосередньо на платинові електроди) на один електрод наносилось по 12 мікролітрів ліпідів, розчинаних у хлороформі. Ліпіди висушувались під вакуумом для утворення ліпідної плівки. Далі в камеру заливалась 380 мікролітрів 300 мМолярного розчину сахарози. У електроформаційну камеру подавався струм з частотою 12 Гц протягом 90 хвилин, далі режим змінювався на 9 Гц протягом 40 хвилин для відшарування ліпосом від електродів. Отримані ліпосоми збирали з камери у сахарозному розчині і зберігали за температури 4°C.

2.4 Електроформація ліпосом

Було зібрано прилад на основі Arduino і платинових електродів. Генератор синусоїдних хвиль передає струм на платинові електроди, які поміщені у спеціальній камері для формації гігантських уніламельярних везикул. Генератор хвиль регулюється Ардуіно і зібраний на основі програмованого модуля AD9833. За допомогою Arduino регулюється подача і кількість струму на платинові електроди. Камера для електроформації була надрукована на 3д принтері Ender 3 pro.

2.5 Одномолекулярна локалізаційна мікроскопія

Експерименти з візуалізацією будуть проведені виготовленому на замовлення налаштуваному локалізаційному інвертованому мікроскопі Olympus IX71, оснащеному масляними іммерсійними об'єктиви 60× або 100× (PlanApo 60x для одномолекулярних поверхонь і PLAPO 100x TIRFM для клітин $NA \geq 1,45$, Olympus). Буде проведена мікроскопія за допомогою діодного лазера 405 нм (CUBE 405-100C, Coherent), багатолінійної суміші аргон-криптонного іонного лазера 568 нм (Innova70C, Coherent) та діодного лазера 643 нм (iBeam smart, Toptica), чотиридіапазонного дихроїчного дзеркала (F73-888, АНФ). Флуоресцентне світло збирається об'єктивом,

спектрально відділеним від збуджуючого світла фільтрами (F76-568, F39-617; F47-700) і проектується на мікросхему 512×512 пікселів пристрою з зарядовим зв'язком електронного розмноження EMCCD (iXon, Andor).

2.6 Підготовка зразків до мікроскопії.

Після електроформації гігантських уніламельярних везикул для того щоб їх візуалізувати на одномолекулярному локалізаційному мікроскопі проводили процес іммобілізації зразка в 3d агарозних пластинах. Для цього низькотемпературну агарозу розчиняли дистильованою водою до кінцевої концентрації 1% і нагрівали при температурі 80°C протягом 8 хвилин. Після цього розчин агарози переносили в середовище, нагріте до $^{\circ}\text{C}$. На цьому етапі додавали зразок попередньо сформованих ліпосом об'ємом 30 мікролітрів на 300 мікролітрів стоку агарози. Зразок залишався в середовищі з температурою 37 градусів на декілька хвилин. Протягом цього часу спеціальне скло для одномолекулярної локалізаційної мікроскопії інкубували в розчині КОН, потім промивали у воді і висушували. Зразки наносили на підготовлене сухе скло з розрахунку 100 мікролітрів зразка на предметне скло.

Після цього зразки покривали тонким знежиреним і очищеним покривним склом і залишали на 90 хвилин до затвердіння агарози. Таким чином гігантські уніламельярні везикули були зафіксовані в різних шарах агарози без ушкодження мембран і зі збереженням шаровидної форми ліпосом.

Після цього уже зафіксовані зразки фарбувались за допомогою флуоресцентного зонду Nile Red [37,38]. З цією метою порошок барвника було розчинено 1:40 і доведено до концентрації $5\mu\text{моль}$. Потім ми додали 20 мікролітрів 5 мікромольярного розчину Nile Red на зафіксовані зразки агарози і інкубували протягом двох годин.

2.7 ІЧ спектроскопія

Для валідації протоколу виділення ліпідів з архей *Haloferax volcanii*, отриману ліпідну фракцію перевіряли на забрудненість білком за допомогою інфрачервоної спектроскопії [39]. Одержані при екстракції ліпідні розчини наносили на спеціальний кристал ZnSe, висушували за кімнатної температури протягом години під потоком нітрогену. Запис ІЧ спектрів проводився на спектрофотометрі Bruker INVENIO R за такими параметрами :

Кількість повторів 120	Роздільна здатність 4 cm^{-1}
Діаметр діафрагми 6 мм	Підсилення x1

Для запису інфрачервоних спектрів використовували спеціальну приставку порушеного повного внутрішнього відбивання (ППВВ) на кристалі ZnSe, після отримання спектрів, була проведена корекція базової лінії та нормалізація за інтенсивністю смуги C=O на 1652 cm^{-1}

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1 Дослідження динаміки мембран архей

3.1.1 Підбір системи

У базі даних LIPID MAPS є власна система класифікації ліпідів. Вона складається з восьми категорій ліпідів, кожна з яких має власну ієрархію підкласифікації.

Для того щоб знайти необхідні для мене ліпіди у структурній датабазі LIPID MAPS ми відшукали правильні категорії. Було знайдено структурні формули ліпідів, з яких, відповідно до літературних джерел, складаються мембрани архей *Haloferax volcanii* [13].

1. PGP-ME (рис. 3.1). У категорії гліцерофосфоліпіди (GP) було відкрито основний клас гліцерофосфогліцерофосфати, згідно класифікації бази даних має номер GP05. Перший ліпід – дифінтаїл гліцеро-1- фосфор-1- гліцеро-1- метил фосфат ($C_{47}H_{98}O_{11}P_2$), концентрація якого в мембранах галоферакса найвища [13] знаходиться у субкласі діалкілгліцерофосфогліцерофосфати (згідно класифікаційної системи бази даних GP0504). Має порядковий номер LM ID LMGP05040001.

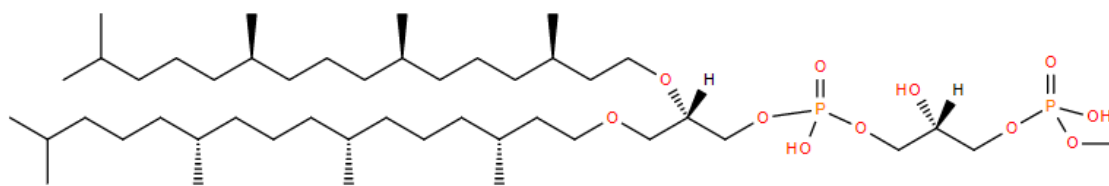


Рис. 3.1. Структурна формула PGP-ME

2. PG (рис. 3.2). Другий ліпід, структуру якого ми хотіли знайти був дифінтаніл – гліцеро -1- фосфо- 1- гліцерол, що має формулу $C_{46}H_{95}O_8P$. Цей ліпід знаходиться в тому тій же категорії, проте в іншому класі – гліцерофосфогліцероли (GP04) в субкласі діалкілгліцерофосфогліцероли – GP0404. LMGP04040008.

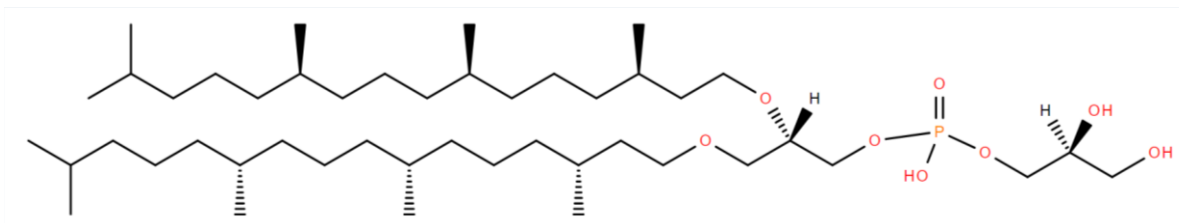


Рис. 3.2. Структурна формула PG

3. BPG (рис. 3.3). Третім за поширеністю ліпідом, згідно літературним даним є бідифітаніл -1- гліцери -1- фосфогліцерол, що має формулу $C_{89}H_{182}O_{13}P_2$. У базі даних його структурну формулу було знайдено в класі гліцерофосфогліцерофосфогліцеролів GP12 у субкласі діалкілгліцерофосфогліцерофосфодіраділгліцероли GP1212 з порядковим номером LMGP12120001.

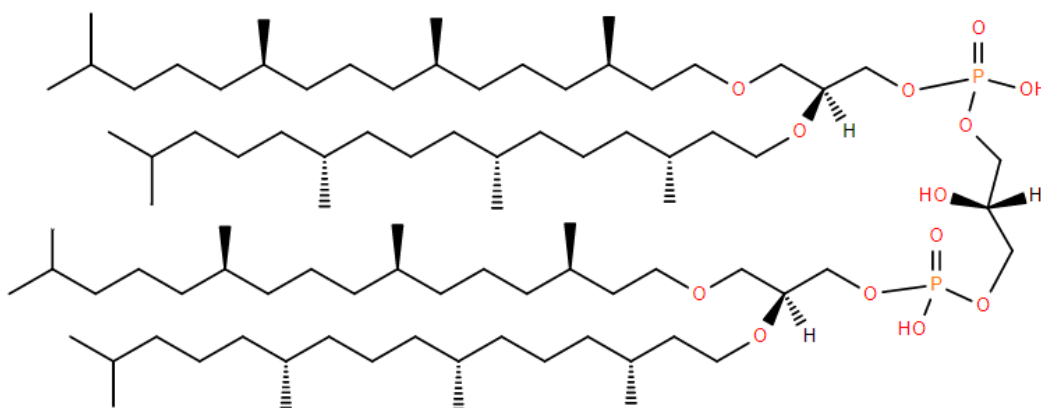


Рис. 3.3. Структурна формула BPG

4. S-DGD-5-PA (рис. 3.4). Останнім з основних ліпідів, який ми вирішили додати до системи був 2'-HSO₃-Man α 1-2Glc α 1-1-2,3-ді-О-фітаніл-sn-гліцерин-6 фосфо-2,3-ді-О-фітаніл-sn-гліцерол (S-DGD-5-PA), що має формулу $C_{98}H_{195}O_{21}PS$. Це гліцероліпід, що, згідно з класифікацією бази даних LIPID MAPS, відноситься до категорії GL, до класу глікозилдіраділгліцеролів (GL05), і знаходиться в субкласі глікозилдіалкілгліцеролів (GL0503) і має порядковий номер LMGL05030007.

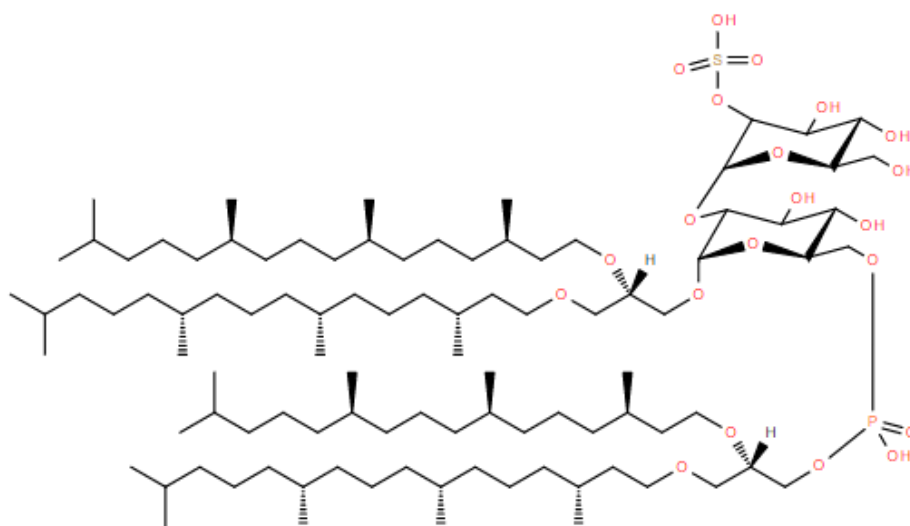


Рис. 3.4. Структурна формула S-DGD-5-PA

Проте, згідно з літературними даними [13], загальний відсоток фосфоліпідів у мембранах архей *Haloferax volcanii* є на рівні порядку 30%. В цей же час, основними компонентами їх мембран є дигідроменахінони. Це жиророзчинні вітаміни, похідні вітаміну K2. Проблема зі збіркою мембрани полягала в тому, що інформації про те, які саме менахінони зустрічаються в мембранах *Haloferax volcanii* немає. Проте, узгоджуючи згодом наявність менахінонів у CHARMM-GUI ми обрали 3 різні молекули у рівній пропорції і включили їх всі до нашої системи. У ліпідній базі даних вони всі знаходяться в категорії пренолових ліпідів (PR), у класі хінонів і гідрохінонів (PR02) в субкласі убіхінонів (PR0201).

Для збірки моделі мембрани архей *in silico* ми в свою чергу обрали:

1. Сульфатований дигідроменахінон 9 (рис. 3.5), що має формулу $C_{56}H_{82}O_6S$ з порядковим номером LMPR02010038.

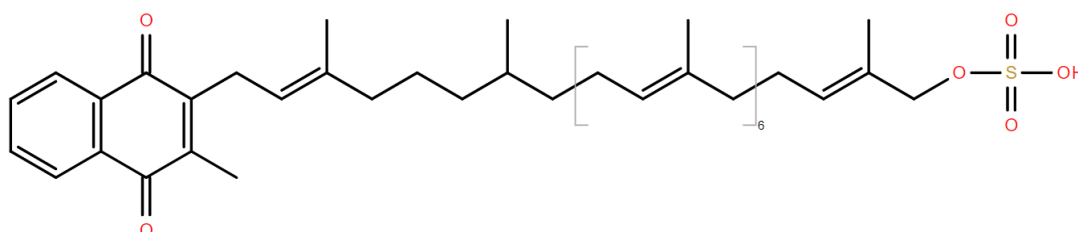


Рис. 3.5. Структурна формула MEN9

2. Дигідроменахінон 8 (рис. 3.6), з формулою $C_{51}H_{74}O_2$ і порядковим номером LMPR02010039.

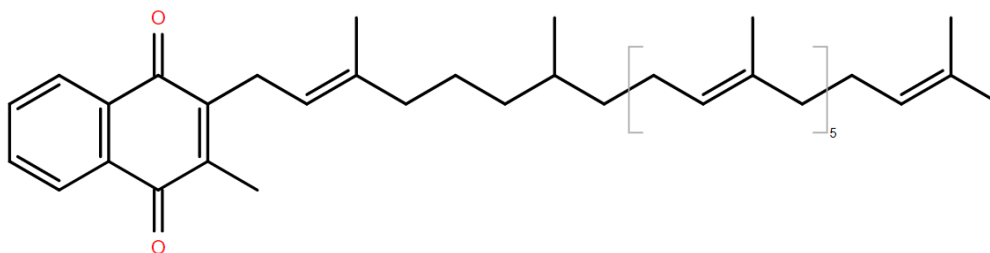


Рис. 3.6. Структурна формула ME8

3. І останнім було обрано менахінон 7 (Рисунок 3.7), що знаходиться в субкласі вітаміну К (PR0203) з формулою $C_{46}H_{64}O_2$ і порядковим номером LMPR02030041.

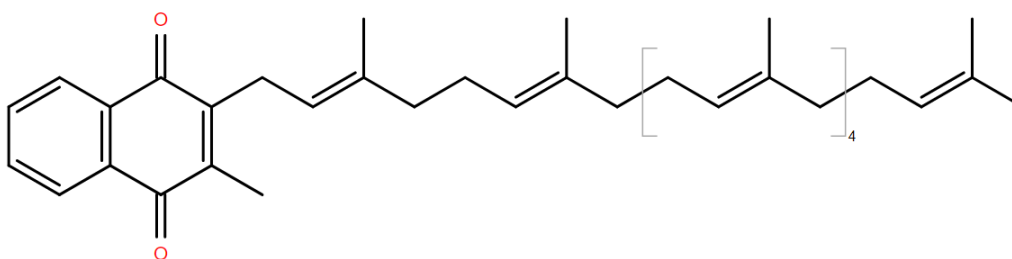


Рис. 3.7. Структурна формула MEN7

3.1.2 Збірка системи

Для збірки системи використовувався веб додаток CHARMM-GUI. Там були знайдені ліпиди, необхідні для створення моделі мембрани архей *Haloferax volcanii*.

Для збірки системи мембрани у веб сервісі CHARMM-GUI було обрано 49 ліпідів, для утворення бішару кількість була подвоєна. За допомогою вбудованих алгоритмів було пораховано (рис. 3.8) кількість ліпідів, їх загальна площа і усереднена площа, що припадає на один ліпід.

РОЗРАХОВАНИЙ РОЗМІР СИСТЕМИ:

	Верхній моношар	Нижній моношар
Площа, що займають білки	0	0
Площа, що займають ліпіди	3136	3136
Кількість ліпідів	49	49
Загальна площа	3136	3136
Середня площа	3136.00	
A	60.18	
B	60.18	

Рис. 3.8. Кількість ліпідів і розрахована площа одного ліпиду.

Оскільки археї *Haloferax volcanii* живуть в певних екстремальних умовах зовнішнього середовища, при підготовці мембран до молекулярної динаміки було необхідно максимально дотримуватись реальних умов. Тому систему було сольватовано з розрахунком 50 молекул води на один ліпід і систему було додано високу концентрацію солі - 2.4 моль NaCl. Окрім цього була задана висока температура для системи, що відповідає природнім умовам існування *Haloferax volcanii*, а саме – 314.15K (еквівалент 42 °C).

Після цього, в сервісі CHARMM-GUI було зібрано систему, поміщено її у воду і підготовано файли для проведення молекулярної динаміки у NAMD і Gromacs.

Було вибрано систему з розрахунку 49 ліпідів на моношар в пропорції, наведеній в таблиці 1.

Таблиця 1. Ліпідний склад заданої системи.

Назва ліпиду верхнього шару	Кількість молекул даного ліпиду	Назва ліпиду нижнього шару	Кількість молекул даного ліпиду
PGP-Me	12	PGP-Me	12
PG	5	PG	5

S-DGD-5-PA	2	S-DGD-5-PA	2
BPG	2	BPG	2
MEN 7	9	MEN 7	9
MEN 8	10	MEN 8	10
MEN 9	9	MEN 9	9

Після цього було поміщено згенеровано водняний бокс прямокутної форми (рис. Д.1).

Наступним кроком, систему було сольватовано додаванням 2.4 Молярної солі NaCl, для збереження натуральних умов існування архей [40,41]. Іони було додано методом Монте-карло (рис. 3.9).

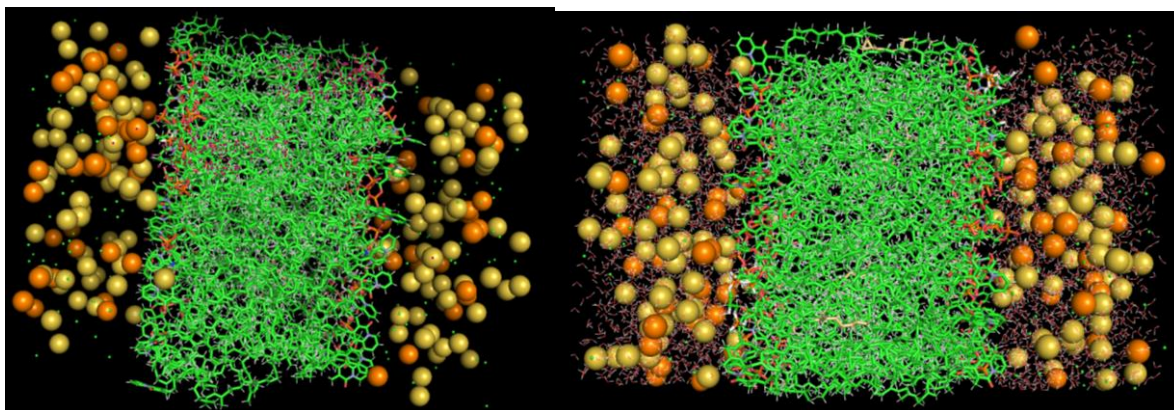


Рис. 3.9. Крок іонізації системи. Зображення отримане у програмі PyMol.

Після задання усіх необхідних параметрів зібрали повну систему, поміщену у воду з додаванням іонів солі. CHARMM-GUI при збірці усіх ліпідів в одну систему використовує Метод заміни. Цей метод заключається в тому, що кожен елемент спочатку упаковується в ліпідоподібні сфери, положення яких потім використовуються для розміщення випадково вибраних молекул ліпідів з бібліотеки.

Застосунок CHARMM-GUI після збірки системи генерує усі необхідні для проведення молекулярної динаміки файли з інвойсами (рис. 3.7) і запропонованою схемою еквілібрування системи.

Equilibration Input Notes:

```
!
! Setup Restraints for Protein and Lipids (see @liptype_restraint.str)
!
! Suggested Equilibration Scheme [Reducing Force Constants]
! (5 Cycles, 1 cycle = 50 - 100 ps )
!-----!
!           1 cycle   2 cycle   3 cycle   4 cycle   5 cycle   6 cycle
!-----!
! BB       10.0      5.0       2.5      1.0      0.5      0.1
! SC        5.0      2.5       1.0      0.5      0.1      0.0
! wforce    2.5      2.5       1.0      0.5      0.1      0.0
! tforce    2.5      2.5       1.0      0.5      0.1      0.0
! mforce    2.5      2.5       1.0      0.5      0.1      0.0
! ion       10.0      0.0       0.0      0.0      0.0      0.0
!-----!
!
```

Рис. 3.7. Автоматично запропонована схема урівноваження системи.

BB і SC відповідають за важкі атоми білкового скелету і бічних ланцюгів (backbone and side chain) [42].

Мінімізація енергії системи відбувалась за допомогою використання силового поля CHARMM36m. (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics).

Це силове поле широко розповсюджене в процесах моделювання молекулярної динаміки для оптимізації багатоатомних макромолекул і великих об'єктів. У силовому полі CHARMM36m деякі неполярні атоми водню об'єднані з сусідніми важкими атомами, зменшуючи кількість явних атомів у симуляції (тобто це силове поле з об'єднаними атомами). Для того щоб коректно описати процеси взаємодії між атомами у системі, у CHARMM36m використовуються як незв'язані, так і зв'язані елементи. До групи перших відноситься ван дер ваальсові та електростатичні взаємодії. Тобто сили притягання і відштовхування між різними атомами і сили Кулона між зарядженими елементами системи, що знаходяться на великій відстані. В свою чергу до другої групи зв'язаних членів відносяться ті елементи, що відповідають за ковалентну взаємодію: торсійні обертання, кручення, розтягування зв'язків і згинання під кутом.

3.1.3 Проведення молекулярної динаміки

За допомогою пакету NAMD було проведено розрахунки молекулярної динаміки за температури 43 °C, і згенеровані файли траєкторії руху молекул.

Останнім кроком була візуалізація нашої згенерованої і еквіліброваної системи з файлами траєкторій за допомогою програми VMD (рис. 3.10). До за стосунку Visual Molecular dynamics було завантажено файли самої системи і топологічні координати з різними рамками.

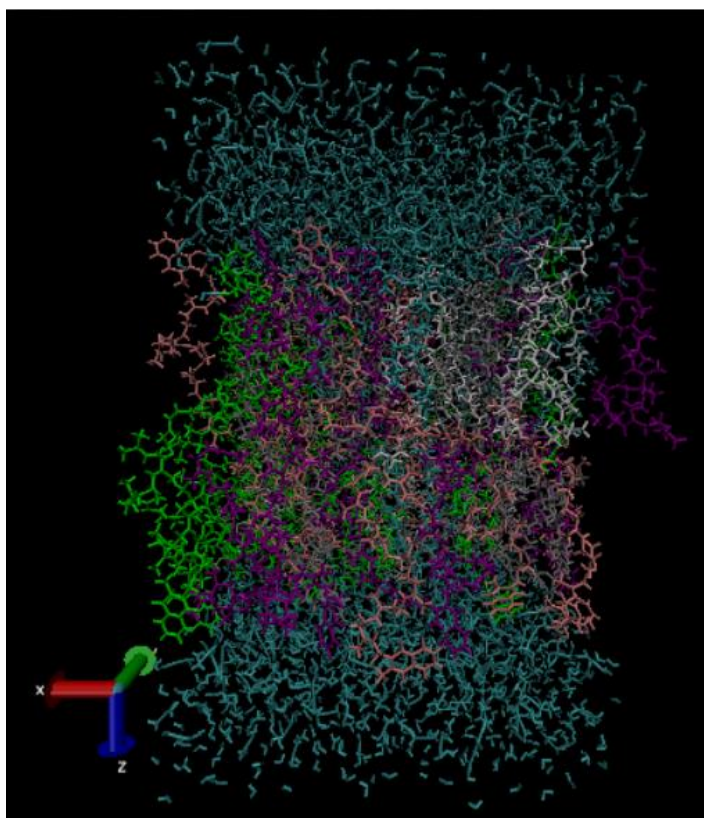


Рис.3.10. Зображення повної системи після проведення молекулярно динамічних розрахунків.

Перший крок еквілібрування системи проводився протягом 1 фемтосекунди, усі інші кроки займали 50 пікосекунд. Аналізуючи перші результати молекулярної динаміки, чітко спостерігається переміщення певних елементів в межах бішару. Усі переходи притаманні різним молекулам менахінонів. При чому, згідно з молекулярно динамічними даними, менахінони мігрують як в горизонтальній так і у вертикальній

тратторії бішару. Менахінони можуть спричиняти точкові зміни плинності мембран, що сприяє утворенню мембранних доменів.

3.2 Структура мембран і маніпуляції з ліпосомами

3.2.1 Інфрачервона спектроскопія з Фур'є перетворенням

Для перевірки ефективності протоколів виділення було проведено дослідження ІЧ характеристик ліпідів, екстрагованих з архей. Ми хотіли визначити особливості, притаманні як мембранотворним гліколіпідам і фосфоліпідам, так і окремо неполярним елементам, наявність яких, найімовірніше більшою мірою визначає особливості поведінки і унікальні властивості мембран галоархей – менахінони. З цією метою ми розділили загальну ліпідну фракцію на полярну і неполярну частини і проводили дослідження цих аліквот окремо.

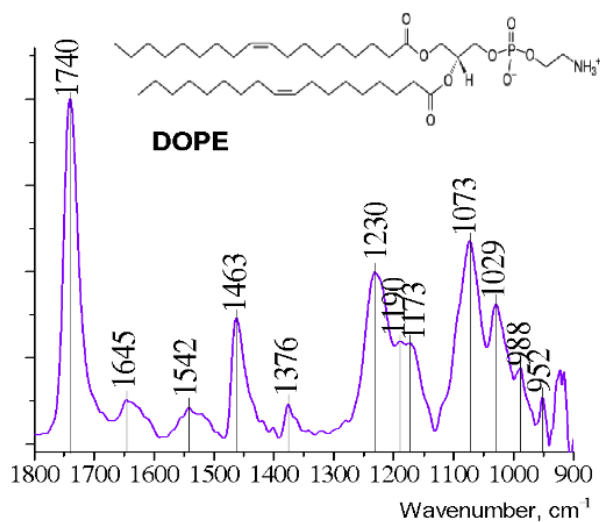


Рис.3.11. ІЧ спектр штучного фосфоліпіда DOPE.

Для того, щоб визначити інфрачервоні маркери, специфічні для ареальних ліпідів, окрім розшифровки і віднесення молекулярних груп, також проводився порівняльний аналіз спектрів ареальних ліпідів до класичного штучного фосфоліпіда DOPE (рис. 3.11).

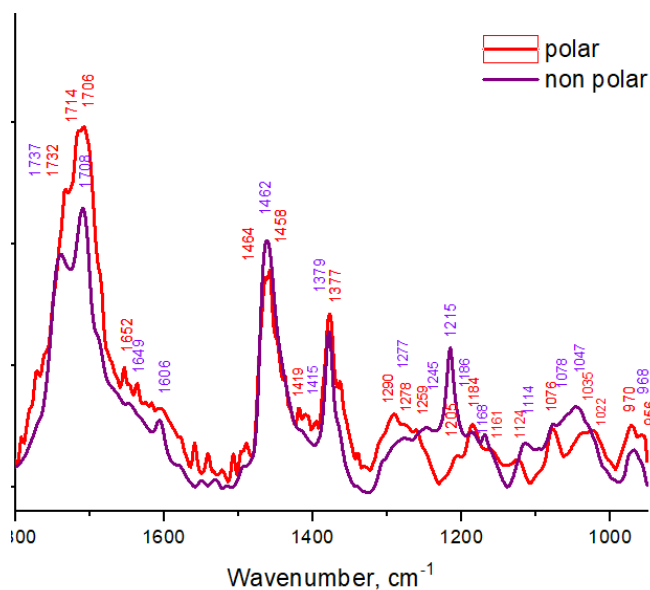


Рис. 3.12. ІЧ спектр фракції полярних і неполярних ліпідів з *Haloferax volcanii* в діапазоні 900-1800 cm^{-1} .

Таблиця 2. Віднесення піків у спектрах у діапазоні 900-1800 cm^{-1} .

NON		POLAR		DOPE 18:1	
968	PO ₄	958 970	Симетричні валентні PO ₄		
				988	C-O
1047	C-O валентні	1022 1035	C-C cis конформація, CH ₂ OH, CO валентні, зв'язані з C-O згинаннями	1026	C-O
1078	Симетричні коливання ns PO ₂ (Фосфат 1)	1076		1073	C-O
				1095	Валентні

					симетричні PO ₂
1114	Симетричні валентні PO ₂	1124	CH _{2,6} вигини у площині C1-Ca-Ha; і вигини n(CO), n(CC)		
1168	Валентні коливання (CC), деформаційні (COH), валентні (CO) C-OH	1161	C-OH	1170	C-O
1186	CH ₂	1184	CH ₂		
1215	PO ₂ асиметричні коливання (фосфат 2)	1205	C-O-C, C-O флуктуації полісахаридних кілець C-O-P, P-O-P		
1245	PO ₂ валентні асиметричні коливання (фосфат 2)	1259	CH ₂ коливання ацильних ланцюгів фосфоліпідів	1230	PO ₂ валентні коливання
1277	CHa' rocking	1278 1290		1283	
1379	CH ₃ деформаційні коливання CH, валентні коливання C-O	1377	dCH ₃ валентні коливання C-O, деформаційні коливання C-H,	1377	

1415	Деформаційні коливання CH_2 ,	1419			
1462	CH_2 коливання ацильних ланцюгів ліпідів	1458 1464	Асиметричні CH_3 CH_2 коливання ацильних ланцюгів ліпідів	1464	Деформаційні CH_2 коливання
1494	Деформаційні коливання C-H ліпідних хвостів				
1606	C=O валентні коливання			1557	C-NH ₃ ⁺
1649		1652	C=O	1638	C=C
1708	C=O	1706	C=O		
		1714	C=O		
1737	C=O ліпідні валентні коливання	1732	C=O ліпідні валентні коливання	1740	Валентні C=O

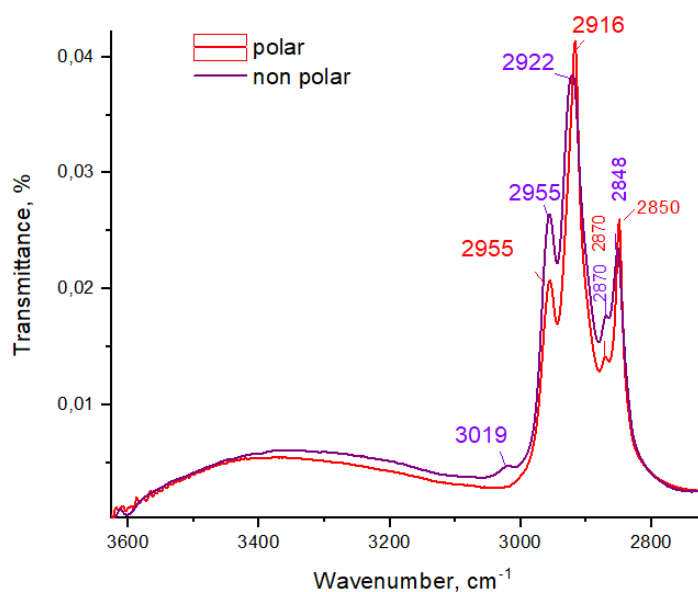


Рис. 3.13. ІЧ спектр фракції полярних і неполярних ліпідів з *Haloferax volcanii* в діапазоні 3000-2000 cm^{-1}

Таблиця 3. Віднесення піків у спектрах у діапазоні 2000- 3000 cm^{-1} .

POL		NON		DOPE	
				18:1	
2848	Ліпідні валентні коливання CH_2 & CH_3 фосфоліпідів і холестеролу	2850	Валентні коливання C-H	2854	Валентні симетричні CH_2
2870	Симетричні валентні коливання CH_3 ацильних ланцюгів ліпідів.			2871	Валентні сим. CH_3
2916	валентні коливання CH_2 і CH_3 фосфоліпідів, холестерину та креатину	2922	Асиметричні валентні коливання CH_2 ацильних хвостів ліпідів.	2924	Валентні асиметричні CH_2 коливання
2955	Асиметричні валентні коливання CH_3 ацильних ланцюгів ліпідів			2955	Валентні CH_3 асиметричні коливання
		3019	Валентні СН кільцеві		

Було проведено віднесення смуг інфрачервоних спектрів (рис. 3.12, 3.13; таблиці 2 і 3). Віднесення робились згідно з літературними джерелами

[39,43–46]. Спектри і віднесення штучного ліпиду DOPE віднесені згідно з наданими неопублікованими даними групи Довбешко Г.І. відділу фізики біологічних систем НАНУ. Проводячи порівняльний аналіз отриманих даних до естерових ліпідів, було визначено, що склад молекулярних груп ліпідів, виділених з археальних мембран практично повністю відповідає складу молекулярних груп, присутніх у мембранах організмів з естеровими ліпідами. Проте сильно відрізняється композиція цих молекулярних груп, що простежується з деяких піків інфрачервоної спектроскопії. Високий явний пік деформаційних коливань C-H в районі 1490 cm^{-1} в археальних ліпідів пояснюється високою кількістю насичених зв'язків у хвостів ліпідів. Окрім того, порівнюючи з класичними штучними ліпідами, або з ліпідними фракціями, виділеними з еукаріот, у ліпідів, виділених з архей значно вищий відсоток деформаційних CH_2 коливань ацильних ланцюгів і коливань, що відносяться до C=C подвійних зв'язків, що пояснюється високим вмістом ненасичених зв'язків у ліпідах, притаманних археям. Окрім цього, у спектрах археальних ліпідів, вища кількість CH_3 асиметричних і симетричних коливань у ліпідних хвостах, що вкотре вказує на відмінність будови археальних ліпідів.

Далі, важливо звернути увагу на те, що при процедурі розділення мембранної фракції ми мали отримати полярні і неполярні ліпіди. Усі фосфоліпіди мають потрапити у фракцію полярних, а менахінони, як неполярні елементи залишаються в другій фракції. Саме надвисокий вміст менахінонів, які складаються з бензольних кілець і ізопренових хвостів і є основною відмінністю мембран *Haloferax volcanii*. У фракції неполярних ліпідів ми спостерігаємо два маркерні піки – 1205 cm^{-1} і 3019 cm^{-1} . Це маркери кільцевих C-H деформаційних коливань, які є особливими для менахінонів. Також ми спостерігаємо різницю в спектрах між ліпідами, виділеними з мембран *Haloferax volcanii* і мембранами, створеними зі штучних ліпідів в ділянках $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, що відповідає за валентні C=O. Ці піки у археальних ліпідів мають дуже складну структуру з великою кількістю плечей, на

відміну від спектрів мембранних міметиків. Що вказує на внески різних структур в ці піки. Таким чином було проведено аналіз коливальних характеристик молекулярних груп різних складових мембран *Haloferax volcanii*, визначено спектральні маркери археальних ліпідів, які можна після цього використовувати для ідентифікації мембран архей. Окрім того визначили спектральні маркери менахінонів, що присутні у мембранах гало архей. І, вирішуючи одну з поставлених цілей дипломної роботи, було доведено ефективність протоколів екстракції ліпідів з мембран галоархей.

3.2.2 Побудова приладу і оптимізація протоколу електроформації

За допомогою приладу з електроформації ліпосом (рис. 3.14), з попередньо виділених ліпідів *Haloferax volcanii* було створено гігантські ліпосоми.

Було протестовано низку протоколів для утворення ліпосом, що включали в себе електроформацію на платинових електродах, електроформацію із застосуванням скла з напівпровідниковим покриттям оксиду індію олова (ІТО). Також змінювались параметри електричного струму і часу, для отримання найкращого результату (рис. 3.15; 3.16; Д.1).

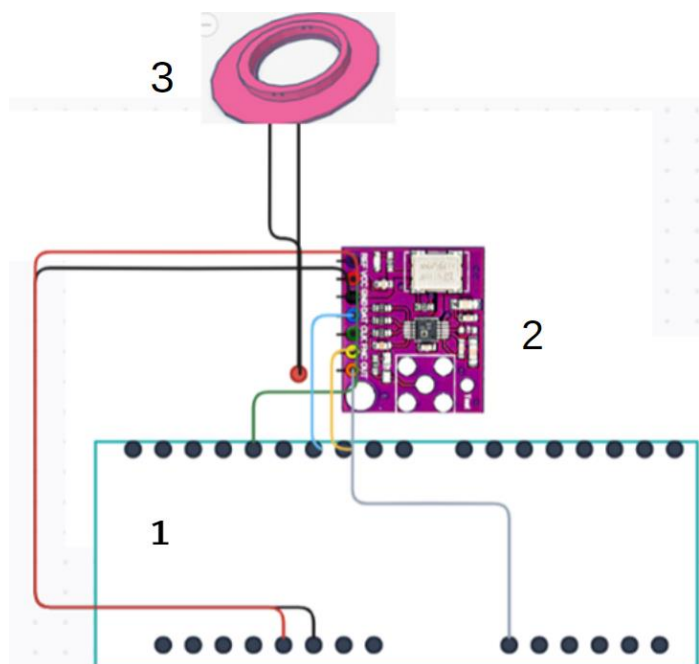


Рис. 3.14. Зображення схеми з основними елементами побудованого приладу. 1- ардуіно, 2- мікросхема, 3-камера для електроформації.

Було визначено, що електроформація на платинових електродах

1. Дає змогу отримати більшу кількість ліпосом з еквівалентної аліквоти ліпідної фракції.
2. Дає гетерогенність результатів. Ліпосоми, утворені таким методом були різнорозмірними (від 2 до 60 μm у діаметрі) (рис.2.Д).

Електроформація за допомогою ІТО скла.

1. Дає меншу кількість ліпосом за однакової кількості аліквоти виділених ліпідів.
2. Дає більш гомогенні результати, ліпосоми в середньому більшого розміру (20-50 μm у діаметрі) (рис.2.Д).

Для подальших експериментів з одномолекулярною локалізаційною мікроскопією було вирішено використовувати платинові електроди. Проводились експерименти з визначення оптимальних характеристик струму. Згідно з протоколами електроформації, затвердженими для ліпосом зі штучних ліпідів для різних ліпідних композицій застосовують різні значення характеристик електричного струму. Для чистої фракції

фосфатидилхоліну використовують 1МГц [36]. Для інших типів ліпідів використовуються кардинально інші характеристики [47]. Тому, не знаючи оптимальних параметрів для процесу електроформації гігантських везикул з етерових ліпідів з *Haloferax volcanii* проводили різні експерименти з дивіацією характеристик електричного струму. При застосуванні 1 МГц утворювались ліпосоми середнього розміру 2 μm (рис. 3.15, рис. Д. 2).

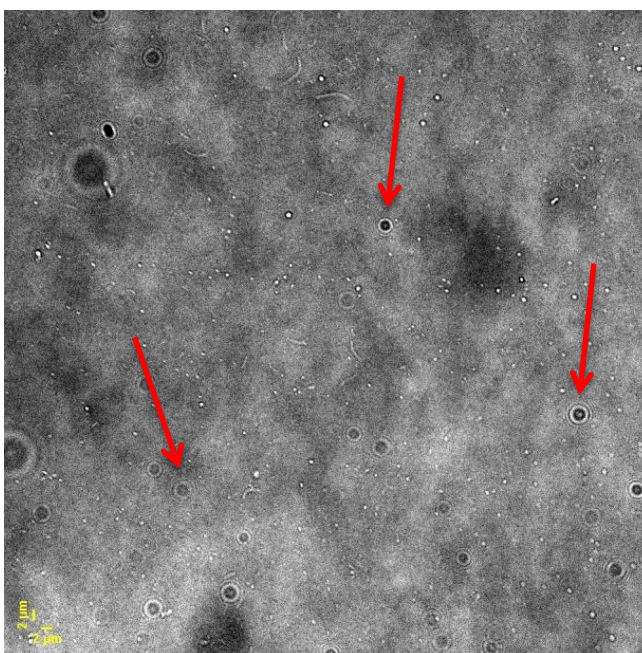


Рис. 3.15 - Мікрофотографія ліпосом утворених при застосуванні 1МГц струму. Стрелками зображено ліпосоми в різних фокальних площинах агарози.

Процес електроформації проводився згідно найоптимальнішого протоколу, а саме з застосуванням синусоїдального струму 15 кГц протягом 100 хвилин для самої електроформації і додатковим застосуванням 12 кГц струму протягом 30 хвилин для відшарування утворених гігантських ліпосом від платинових електродів.

3.2.3 Мікроскопія

Після електроформації археосом, згідно з протоколом іммобілізації у агарозі низької температури плавлення, було підготовано низку зразків для одномолекулярної локалізаційної мікроскопії. Ці зразки включали в себе:

1. Порожню агарозу.
2. Агарозу з завантаженим розчином 300 мілімолярної сахарози для подальшої роботи з компенсації фонового шуму.
3. Агарозу з завантаженим розчином 300 мілімолярної сахарози і з додаванням аліквоти флуоресцентного зонду Nile Red.
4. Два зразки агарози, зі зразком гігантських ліпосом, що знаходяться у 300 мілімолярній сахарозі.
5. Агарозу зі зразком гігантських ліпосом, попередньо інкубованих з флуоресцентним зондом протягом 20 хвилин.

Після цього відбувалась інкубація і перенесення зразків на попередньо підготоване скло для мікроскопії. Далі зразки покривались підготованим попередньо покривним склом і іммобілізувались протягом двох годин. Після остаточної іммобілізації, один зі зразків незабарвлених гігантських везикул розкривався і туди ми навантажували аліквоту флуоресцентного барвника, що є можливим за рахунок великих розмірів пор агарози, у порівнянні з маленькими молекулами флуоресцентного зонду. Усі підготовані зразки записувались на мікроскопі.

Спочатку усі зразки були записані у білому світлі. Було знайдено археосоми і ідентифіковано їх розмір (рис. 3.16, рис. Д.3).

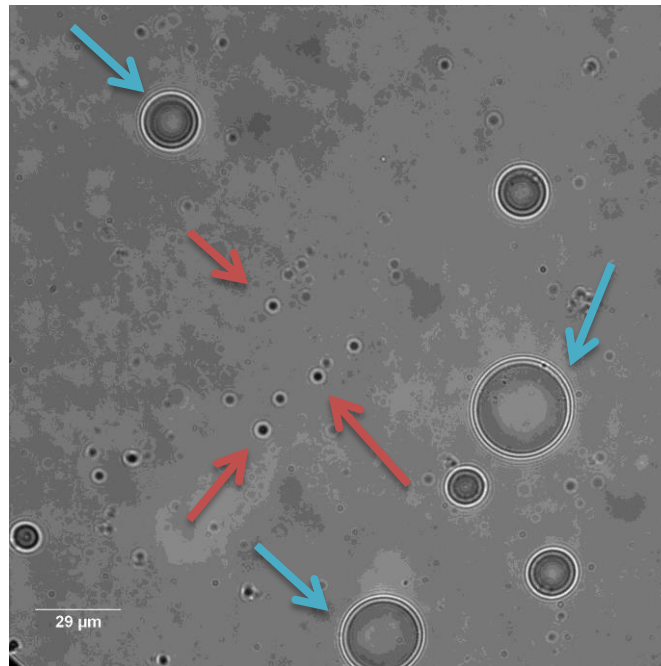


Рис. 3.16. Мікрофотографії отриманих гігантських ліпосом. Блакитними стрілками зображено гігантські археосоми. Червоними стрілками позначено 2 μм археосоми.

Усі гігантські ліпосоми знаходились в одній фокальній площині зразку. За рахунок їх великих розмірів, вони не мігрують вглиб агарозних пор. При цьому чітко спостерігається (рис. 3.15; 3.16; рис. Д.3.) міграція ліпосом меншого розміру вглиб товщі агарозного шару. Вони знаходяться на різних фокальних площинах, за рахунок свого маленького розміру вони мають можливість мігрувати між шарами агарози, тому для фіксації таких зразків необхідна підвищена концентрація агарози.

Після цього проводилась мікроскопія за допомогою безперервного лазера 568нм для збудження свічення молекул зонду і з використанням пульсуючого ультрафіолетового лазера для збудження одномолекулярних переходів молекули барвників (блмання) (рис. 3.17, рис. Д.4).

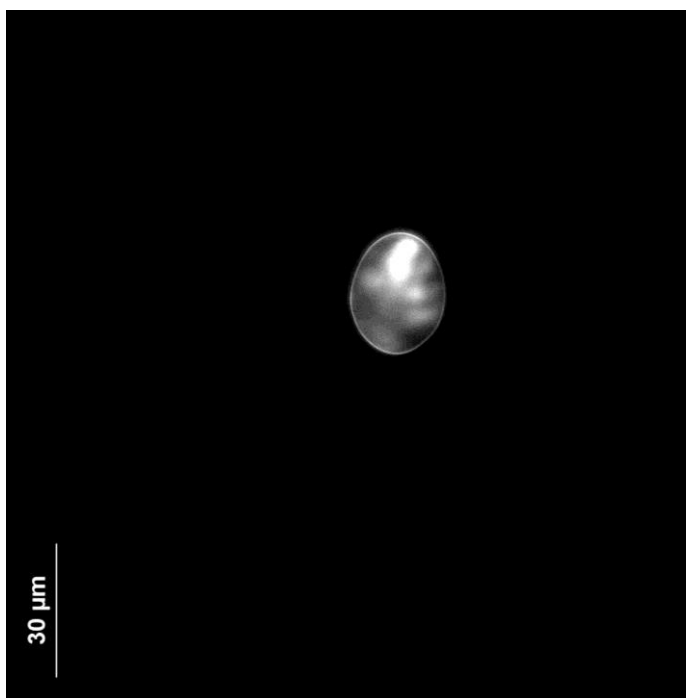


Рис. 3.17. На рисунку зображено збуджене свічення Nile Red, що забарвлює археосомну мембрану.

Ми визначили, що маленький гідрофобний флуоресцентний барвник Nile Red специфічно зв'язується з мембранами архей, що робить його підходящим для проведення подальших досліджень мембран *Haloferax volcanii*. Розподіл флуоресцентного барвника на мембрані археосом не є гомогенним. Окрім цього при зміні мікроскопічних характеристик на одномолекулярний режим, було зафіксовано одномолекулярні переходи флуоресцентного зонду в межах однієї ліпосоми. Це може означати можливість проникнення молекул барвника всередину мембран і, подібно до переходів менахінонів, можливість переходів в межах бішару мембран *Haloferax volcanii*.

ВИСНОВКИ

Археї родини *Haloferacaceae* володіють унікальними за своїми властивостями і структурою мембранами. Це бішарові мембрани, основа яких складається з гліцероліпідів. Проте у *Haloferox volcanii* мембрани також збагачені надзвичайно високою кількістю менахінонів, тип, розташування і функції яких залишались невідомими. Археальні мембрани, і мембранні міметики у формі археосом мають великий потенціал знайти своє застосування у багатьох сферах біології та технологій, наприклад при доставці ліків чи виробництві вакцин.

В нашій роботі проведено молекулярно-динамічні дослідження, де було виявлено можливості руху менахінонів в товщі ліпідного бішару, що може свідчити про функції переносу електронів, про гетерогенність мембранної щільності і може бути маркером наявності рафтоподібних структур в мембранах архей.

При роботі над даним дослідженням було вдосконалено та розроблено низку протоколів для роботи з *Haloferox volcanii* і формуванні гігантських уніламельярних везикул з їх ліпідів.

За допомогою методів коливальної спектроскопії було визначено спектральні маркери менахінонів і ареальних гліколіпідів, їх відмінність від естерових ліпідів, було висвітлено внесок менахінонів і їх коливань, що може підтверджувати результати молекулярно динамічних розрахунків. Також було апробовано і доведено ефективність протоколів, що використовувались для роботи з археями.

Вперше було візуалізовано гігантські археосоми. За одномолекулярної локалізаційної мікроскопії було зафіксовано переходи сольватохромного барвника в товщі ліпідної мембрани архей. Було продемонстровано гетерогенність мембран, що може свідчити про існування доменів, які, в свою чергу, можуть бути динамічними за рахунок міграції менахінонів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] C. Kropp *et al.*, “Identification of acetylated diether lipids in halophilic Archaea,” *Microbiologyopen*, 2022, doi: 10.1002/mbo3.1299.
- [2] C. Jeworrek *et al.*, “Structure and phase behavior of archaeal lipid monolayers,” *Langmuir*, vol. 27, no. 21, pp. 13113–13121, 2011, doi: 10.1021/la202027s.
- [3] D. López and R. Kolter, “Functional microdomains in bacterial membranes,” *Genes Dev.*, 2010, doi: 10.1101/gad.1945010.
- [4] A. Witkowska, L. Jablonski, and R. Jahn, “A convenient protocol for generating giant unilamellar vesicles containing SNARE proteins using electroformation,” *Sci. Rep.*, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27456-4.
- [5] S. F. Fenz and K. Sengupta, “Giant vesicles as cell models,” *Integrative Biology (United Kingdom)*. 2012, doi: 10.1039/c2ib00188h.
- [6] S. E. Ghellab, W. Mu, Q. Li, and X. Han, “Prediction of the size of electroformed giant unilamellar vesicle using response surface methodology,” *Biophys. Chem.*, vol. 253, no. March, p. 106217, 2019, doi: 10.1016/j.bpc.2019.106217.
- [7] D. L. Valentine, “Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea,” vol. 5, no. April, pp. 1070–1077, 2007.
- [8] T. Baba, H. Minamikawa, M. Hato, and T. Handa, “Hydration and Molecular Motions in Synthetic Phytanyl-Chained Glycolipid Vesicle Membranes,” *Biophys. J.*, vol. 81, no. 6, pp. 3377–3386, 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)75970-X.
- [9] M. Pohlschroder and S. V. Albers, “Editorial: Archaeal Cell Envelope and Surface Structures,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. JAN, pp. 2015–2016, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2015.01515.
- [10] M. F. Mullakhanbhai and H. Larsen, “Halobacterium volcanii spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement,” *Arch. Microbiol.*, vol. 104, no. 1, pp. 207–214, 1975, doi: 10.1007/BF00447326.

- [11] K. J. Bowers and J. Wiegel, “Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: A mini-review,” *Extremophiles*, vol. 15, no. 2, pp. 119–128, 2011, doi: 10.1007/s00792-010-0347-y.
- [12] M. Camacho, J. Ramos, and A. Rodríguez-Navarro, “Potassium requirements of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Curr. Microbiol.*, vol. 6, no. 5, pp. 295–299, 1981, doi: 10.1007/BF01566880.
- [13] M. Y. Kellermann, M. Y. Yoshinaga, R. C. Valentine, L. Wörmer, and D. L. Valentine, “Important roles for membrane lipids in haloarchaeal bioenergetics,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1858, no. 11, pp. 2940–2956, 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2016.08.010.
- [14] A. Corcelli, “The cardiolipin analogues of Archaea,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 10, pp. 2101–2106, 2009, doi: 10.1016/j.bbamem.2009.05.010.
- [15] M. Y. Yoshinaga, L. Wörmer, M. Elvert, and K. U. Hinrichs, “Novel cardiolipins from uncultured methane-metabolizing Archaea,” *Archaea*, 2012, doi: 10.1155/2012/832097.
- [16] S. Lobasso, R. Vitale, P. Lopalco, and A. Corcelli, “*Haloferax volcanii*, as a novel tool for producing mammalian olfactory receptors embedded in archaeal lipid bilayer,” *Life*, vol. 5, no. 1, pp. 770–782, 2015, doi: 10.3390/life5010770.
- [17] H. Ojha, M. Sethi, R. Kakkar, M. Sharma, M. Saini, and M. Pathak, *Chem-bioinformatic approach for drug discovery: In silico screening of potential antimalarial compounds*. Elsevier Inc., 2021.
- [18] S. B. Choi, B. K. Yap, Y. S. Choong, and H. Wahab, “Molecular dynamics simulations in drug discovery,” *Encycl. Bioinforma. Comput. Biol. ABC Bioinforma.*, vol. 1–3, pp. 652–665, 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20154-4.
- [19] H. A. L. Filipe and L. M. S. Loura, “Molecular Dynamics Simulations: Advances and Applications,” *Molecules*, vol. 27, no. 7, pp. 37–47, 2022, doi: 10.3390/molecules27072105.

- [20] J. Trosset and C. Cave, “Chapter 6,” vol. 1953, 2019.
- [21] R. M. Venable, A. Krämer, and R. W. Pastor, “Molecular Dynamics Simulations of Membrane Permeability,” *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 9, pp. 5954–5997, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00486.
- [22] D. Lopes, S. Jakobtorweihen, C. Nunes, B. Sarmiento, and S. Reis, “Shedding light on the puzzle of drug-membrane interactions: Experimental techniques and molecular dynamics simulations,” *Progress in Lipid Research*. 2017, doi: 10.1016/j.plipres.2016.12.001.
- [23] O. Guvench and A. D. MacKerell, “Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 443, pp. 63–88, 2008, doi: 10.1007/978-1-59745-177-2_4.
- [24] “Force Fields for MD simulations,” 2005, [Online]. Available: <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Workshop/SanFrancisco/lectures/>.
- [25] M. Sud *et al.*, “LMSD: LIPID MAPS structure database,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. SUPPL. 1, pp. 527–532, 2007, doi: 10.1093/nar/gkl838.
- [26] J. Lee *et al.*, “CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 12, no. 1, pp. 405–413, 2016, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00935.
- [27] J. Lee *et al.*, “CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 15, no. 1, pp. 775–786, 2019, doi: 10.1021/acs.jctc.8b01066.
- [28] “J Comput Chem - 2008 - Jo - CHARMM-GUI A web-based graphical user interface for CHARMM.pdf.” .
- [29] K. Prakash, B. Diederich, R. Heintzmann, and L. Schermelleh, “Super-resolution microscopy: A brief history and new avenues,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 380, no. 2220, 2022, doi: 10.1098/rsta.2021.0110.
- [30] M. Heilemann *et al.*, “Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 33,

- pp. 6172–6176, 2008, doi: 10.1002/anie.200802376.
- [31] D. Axelrod, “Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology,” *Methods Enzymol.*, vol. 361, no. 1996, pp. 1–33, 2003, doi: 10.1016/S0076-6879(03)61003-7.
- [32] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, “Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes,” *Biophys. J.*, vol. 82, no. 5, pp. 2775–2783, 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75618-X.
- [33] E. Betzig *et al.*, “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution,” *Science (80-.)*, vol. 313, no. 5793, pp. 1642–1645, 2006, doi: 10.1126/science.1127344.
- [34] T. Allers, H. Ngo, M. Mevarech, and R. G. Lloyd, “Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* Based on the *leuB* and *trpA* Genes Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* Based on the *leuB* and *trpA* Genes,” no. March 2004, 2017, doi: 10.1128/AEM.70.2.943.
- [35] Z. Boban and I. Mardeši, “Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles from Damp Lipid Films Formed by Vesicle Fusion,” 2023.
- [36] T. J. Politano, V. E. Froude, B. Jing, and Y. Zhu, “AC-electric field dependent electroformation of giant lipid vesicles,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 79, no. 1, pp. 75–82, 2010, doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.032.
- [37] O. A. Kucherak *et al.*, “Switchable Nile red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 13, pp. 4907–4916, 2010, doi: 10.1021/ja100351w.
- [38] D. B. Iaea and F. R. Maxfield, “Membrane order in the plasma membrane and endocytic recycling compartment,” *PLoS One*, vol. 12, no. 11, pp. 6–13, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0188041.
- [39] P. Taylor, Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. Rehman, “Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues Fourier Transform

- Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues,” no. June 2013, pp. 37–41, doi: 10.1080/05704920701829043.
- [40] R. U. Haque, “Haloferax volcanii for biotechnology applications : challenges , current state and perspectives,” pp. 1371–1382, 2020.
- [41] R. T. De Silva, M. F. Abdul-, D. A. Pittrich, H. J. Brown, and M. Pohlschroder, “Improved growth and morphological plasticity of Haloferax volcanii,” 2021, doi: 10.1099/mic.0.001012.
- [42] Y. Huang, J. A. Henderson, and J. Shen, “Continuous Constant pH Molecular Dynamics Simulations of Transmembrane Proteins,” in *Methods in Molecular Biology*, 2021.
- [43] A. Blume, “Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 64–77, 1996, doi: 10.1016/S1359-0294(96)80046-X.
- [44] P. V Escribá *et al.*, “Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies,” *J Cell Mol Med*, 2008.
- [45] O. A. Pinto and E. A. Disalvo, “A new model for lipid monolayer and bilayers based on thermodynamics of irreversible processes,” *PLoS One*, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0212269.
- [46] H. Liu *et al.*, “Characterization and cytotoxicity studies of DPPC: M2+ novel delivery system for cisplatin thermosensitivity liposome with improving loading efficiency,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.04.029.
- [47] Z. Boban, I. Mardešić, W. K. Subczynski, and M. Raguz, “Giant unilamellar vesicle electroformation: What to use, what to avoid, and how to quantify the results,” *Membranes (Basel)*., vol. 11, no. 11, 2021, doi: 10.3390/membranes11110860.

ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

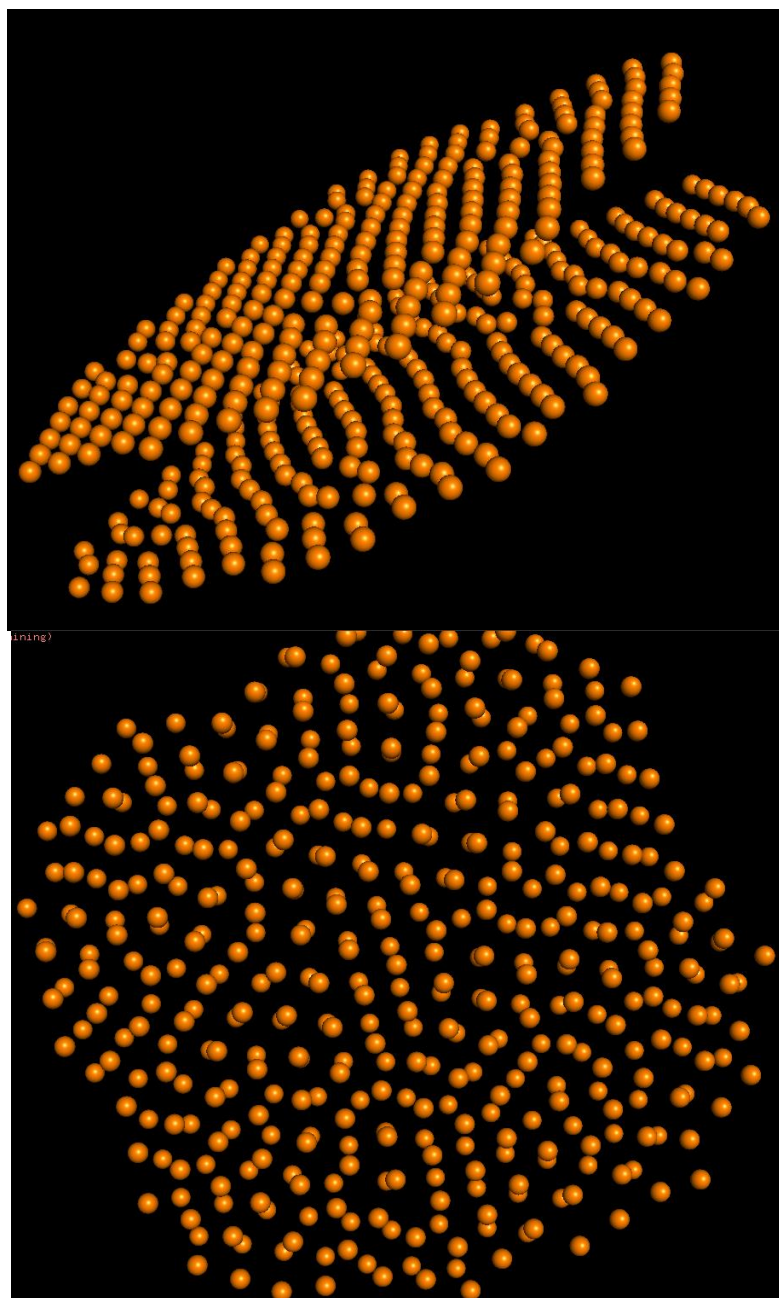
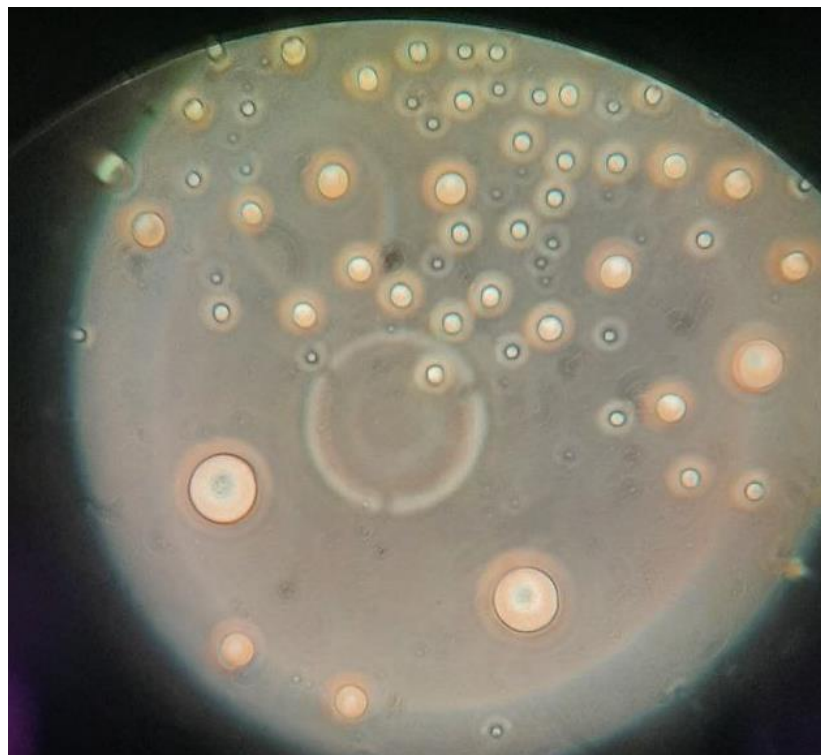


Рис. Д.1. Молекули води, в які поміщувалась згенерована системи.
Візуалізація у програмі Avogadro .



А.



В.

Рис. Д. 2. А- знімок з мікроскопа ліпосом, утворених за допомогою електроформації із застосуванням ІТО скла. В- знімок з мікроскопа ліпосом, утворених за допомогою платинових електродів.

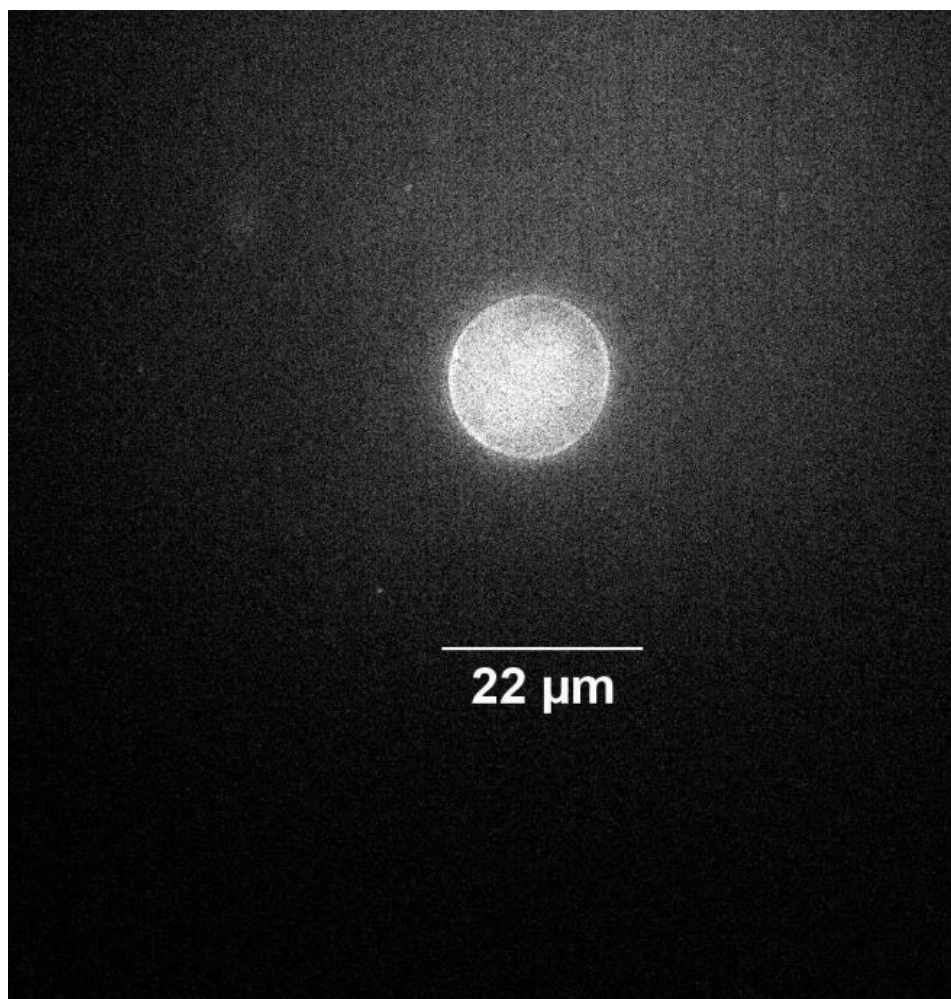


Рис. Д.3 Мікрофотографія забарвленої за допомогою флуоресцентного барвника Nile Red гігантської уніламельярної везикули, отриманої за допомогою електроформації методом електроформації на ІТО покритому склі.

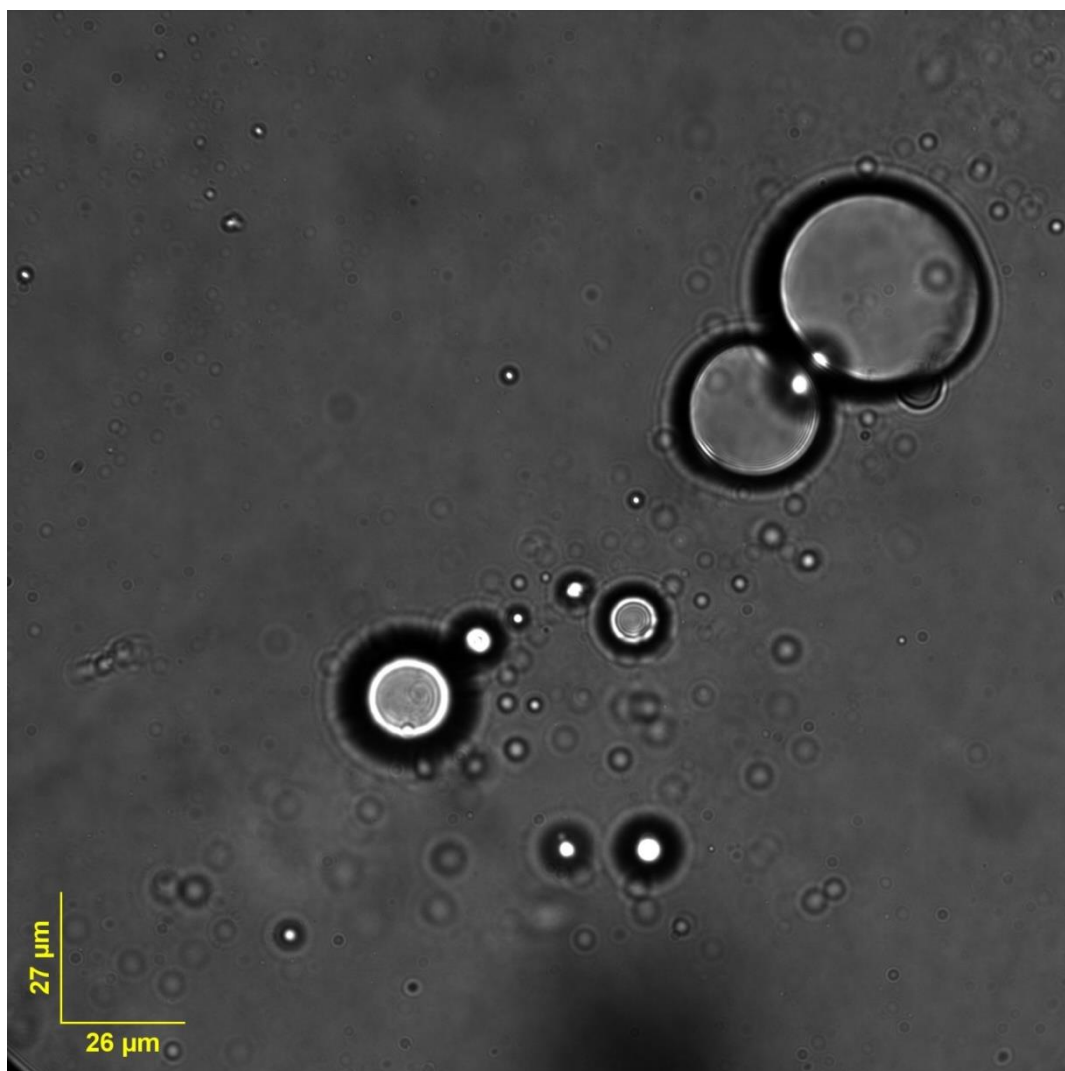


Рис. Д.4. можливий процес злиття гігантських уніламельярних везикул.