

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Черній Світлана Вікторівна



УДК 577.336+547.458.83+577.112.7

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФТАЛОЦІАНІНОВИХ КОМПЛЕКСІВ З АКСІАЛЬНО-
КООРДИНОВАНИМИ ЗАМІСНИКАМИ ЯК ІНГІБІТОРІВ АМІЛОЇДНОЇ
АГРЕГАЦІЇ БІЛКІВ**

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Ковальська Владислава Борисівна,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, провідний науковий співробітник відділу біомедичної хімії.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, професор кафедри загальної та медичної генетики;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Верьовка Сергій Вікторович,
ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка» НАМН України, завідувач лабораторії біохімії.

Захист дисертації відбудеться «16» квітня 2019 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Ак. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, 03680, м. Київ, вул. Ак. Заболотного, 150.

Автореферат розіслано « » березня 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук,
старший науковий
співробітник



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. До патогенезу багатьох захворювань, включаючи нейродегенеративні розлади та амілоїдоз, залучені білки, що здатні утворювати β -складчасті нерозчинні агрегати. За цих патологій специфічні білки або білкові фрагменти змінюють функціональну розчинну форму, агрегуючи у нерозчинні амілоїдні фібрили, що накопичуються в різних органах і тканинах. На сьогодні відомо близько 20 специфічних білків, що формують токсичні амілоїдні відкладення при патогенезі конформаційних захворювань людини [Uversky V., 2004, Eisenberg D., 2012]. Крім того, агрегація може відбуватись у білкових препаратах медичного призначення, а можливість блокування цього процесу дозволить запобігти аутоімунним ускладненням, викликаним їх введенням [Верева С., 2008].

Також, амілоїди можуть виконувати важливі функції за фізіологічних умов, наприклад, вони є компонентом біоплівки бактерій та залучені у синтез меланіну в шкірі людини [Pham C., 2014]. Одна із ключових фізичних властивостей фібрил – жорсткість білкової структури – становить інтерес для створення функціональних матеріалів. Амілоїдні фібрили були запропоновані як структурні елементи для активних композитів, нанотрубок, гідрогелів, імітації структури кісток [Knowles T., 2016].

Отже, вивчення амілоїдних фібрил та розробка інструментів впливу на процес фібрилоутворення, як для запобігання формування патологічних чи функціональних амілоїдів, так і для створення композитних матеріалів на їх основі, є актуальним завданням. Серед підходів по впливу на фібрилоутворення можна виділити стабілізацію білка у функціональному стані, блокування та пригнічення процесу амілоїдної агрегації, руйнування сформованих амілоїдів [Shamsi T., 2017]. Раніше було визначено сполуки, що належать до хімічних класів поліфенолів, порфіринів та фталоціанінів, які активно пригнічують процес фібрилоутворення [Churches Q., 2014,].

Макроциклічні сполуки фталоціаніни досліджуються у рядові біомедичних застосувань. Вони низькотоксичні, виявляють антибактеріальні властивості, запропоновані для фотодинамічної обробки крові з метою видалення вірусів, успішно використовуються у фотодинамічній терапії онкологічних захворювань. Для планарних фталоціанінів було показано високу антиамілоїдогенну та антипріонну активність завдяки їх здатності стабілізувати нетоксичні агрегаційні інтермедіати або нормальну ізоформу білка [Valiente-Gabioud A., 2016].

Фталоціаніни з аксіально-координуваними замісниками містять ліганди, з'єднані з центральним атомом металу, що забезпечує характерну об'ємну структуру молекули. Вперше висока інгібуюча активність фталоціанінів з аксіально-координуваними замісниками була виявлена у реакції фібрилоутворення інсуліну [Kovalska V., 2012]. Таким чином, дослідження фталоціанінових комплексів, що містять замісники різної хімічної природи,

надасть інформацію про залежність між структурою та антифібрилогенними властивостями таких комплексів і дозволить створювати високоефективні інгібітори агрегації білків на основі цих макроциклічних сполук.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем «Раціональний дизайн інгібіторів протеїназ як попередників лікарських засобів» (№ держ. реєстрації 0112U004110, 2013-2017 рр.) та «Раціональний дизайн активних сполук проти патогенних штамів мікроорганізмів, резистентних до лікарських засобів» (№ держ. реєстрації 0117U003914, 2018-2022 рр.), спільного проекту НАНУ-ТЮБИТАК №114Z464 (2015-2016 рр.), гранту Європейського Союзу «Горизонт 2020» Дослідна й інноваційна програма імені Марії Склодовської-Кюрі №645628 (2015-2018 рр.), індивідуального гранту Європейської федерації біохімічних товариств (2018 р).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є пошук інгібіторів амілоїдної агрегації білків (фібрилоутворення) серед макроциклічних металокомплексів (фталоціанінів, порфіразинів) об'ємної та планарної геометрії та вивчення їх взаємодії з мономерними та агрегованими білками.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити кінетику реакції агрегації амілоїдогенних білків за відсутності та у присутності макроциклічних комплексів різної геометрії (фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими замісниками, планарних фталоціанінів та порфіразинів магнію і цинку);

2. Дослідити продукти реакції агрегації амілоїдогенних білків у присутності досліджуваних металокомплексів;

3. Проаналізувати залежність інгібуючих властивостей металокомплексів від їх хімічної структури, типу центрального атома металу та наявності/природи аксіально-координованого ліганду;

4. Дослідити взаємодію мономерного білка та амілоїдних фібрил з фталоціанінами методом спектроскопії електронного поглинання. Проаналізувати залежність між здатністю фталоціанінів до самоасоціації в водних розчинах (π - π стекінг) та їх інгібуючими властивостями;

5. Дослідити взаємодію мономерного білка та сформованих фібрил інсуліну з аксіально-координованими фталоціанінами методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії;

6. Охарактеризувати в якості потенційних флуоресцентних зондів для визначення амілоїдних агрегатів білків серію стирилпіридинових барвників. Визначити можливість використання методу підсилення флуоресценції поверхнею металу для підвищення чутливості детекції амілоїдспецифічних зондів.

Об'єкт дослідження: інсулін та лізоцим, амілоїдні фібрили цих білків, макроциклічні комплекси (фталоціаніни, порфіразини).

Предмет дослідження: процес амілоїдної агрегації білків, інгібуюча активність фталоціанінів та порфіразинів в реакції фібрилоутворення білків інсуліну та лізоциму, взаємодія комплексів з мономерними та агрегованими білками.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи дослідження: флуоресцентна спектроскопія, електронна спектроскопія поглинання, атомно-силова мікроскопія, скануюча електронна мікроскопія, спектроскопія динамічного розсіяння світла, поверхнево підсилена раманівська спектроскопія.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено інгібуючу активність серії фталоціанінів та порфіразинів різної геометрії на процес фібрилоутворення білків. Серед досліджених фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками визначено вискоєфективні інгібітори амілоїдної агрегації білків. Крім того, показано, що досліджені комплекси в залежності від структури можуть перенаправляти процес агрегації у бік формування різних типів білкових агрегатів. Визначено, що здатність фталоціанінових комплексів до самоасоціації корелює з їх інгібуючою активністю в реакції фібрилоутворення білків. Вперше показано можливість використання фталоціанінів для визначення амілоїдних фібрил методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії. Проаналізовано вплив структурних особливостей, природи центрального атома металу, геометрії замісників макроциклічних комплексів на їх інгібуючу активність та запропоновано механізм інгібування.

Практичне значення одержаних результатів. Фталоціаніни з аксіально-координованими замісниками пропонуються як ефективні інгібітори амілоїдної агрегації (фібрилоутворення). Запропоновано інгібітори амілоїдної агрегації білків серед досліджених фталоціанінів з аксіально-координованими лігандами. Отримані результати важливі для дизайну антифібрилогенних агентів із необхідними властивостями на основі цих металокомплексів.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальних даних, які викладені у дисертації, отриманий за безпосередньої участі здобувача. Автором самостійно досліджено інгібуючу активність фталоціанінових комплексів на амілоїдну агрегацію інсуліну та лізоциму, визначено значення ефективної концентрації інгібітору, досліджено агрегаційні властивості фталоціанінів. Дані по атомно-силовій мікроскопії отримані у співпраці з В.В.Черепановим (Інститут фізики НАН України). Дані по скануючій електронній мікроскопії та спектроскопії динамічного розсіяння світла отримані у співпраці з Інститутом фізичної хімії ПАН (Варшава, Польща). Обчислення гідродинамічних розмірів популяції фібрил було здійснено к.ф.-м.н. с.н.с М.Ю. Лосицьким. Дослідження поверхнево підсилених раманівських спектрів фталоціанінів здійснено спільно з к.ф.-м.н. с.н.с. М.Ю. Лосицьким та проф. М.Чулха в Університеті Єдитепе (Стамбул, Туреччина). Планування досліджень, обговорення, аналіз, інтерпретацію

отриманих даних і підготовку публікацій до друку здійснено разом із науковим керівником д.б.н., пр.н.с. В.Б. Ковальською.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на конференціях – практичний курс FEBS «Гідродинамічний та термодинамічний аналіз біологічних макромолекул та їх взаємодій» (Прага, Чехія, 2018), XI Парнасівська конференція - Форум молодих вчених «Біохімія та молекулярна біологія для інноваційної медицини» (Київ, Україна, 2018), Міжнародна конференція «Нанотехнології та наноматеріали» (Чернівці, Україна, 2017), XXIII Міжнародна школа-семинар Галини Пучковської «Спектроскопія молекул та кристалів» (Київ, Україна, 2017), Міжнародна конференція 10ті Егейські дні аналітичної хімії (Чанаккале, Туреччина, 2016), VIII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання» (Харків, Україна, 2016), Нанобіофізика: фундаментальні та прикладні аспекти (Київ, Україна, 2015), XIX конференції з неорганічної хімії за участю закордонних вчених (Одеса, Україна, 2015), 14-а конференція «Методи та застосування у флуоресценції» (Вюрцбург, Німеччина, 2015), Міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали» (Львів, Україна, 2014), Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2014), 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення» (Донецьк, Україна, 2014), 14-а Міжнародна конференція-школа «Передові матеріали та технології» (Паланга, Литва, 2012).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях у наукових фахових журналах, а також представлено на 13 наукових конференціях у вигляді усних доповідей та стендових презентацій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, експериментальної частини (3 розділів), висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота, що викладена на 156 сторінках, містить 45 рисунків та 14 таблиць. Список використаної літератури охоплює 165 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність роботи, сформульовано її мету, задачі, коротко описані отримані результати та їх практична значимість.

У розділі **Огляд літератури** викладено структуру амілоїдогенних білків, амілоїдних фібрил та їх залучення у патогенез. Описано особливості процесу фібрилоутворення та токсичність різних типів агрегатів. Описано методи дослідження амілоїдних фібрил. Узагальнено та проаналізовано дані щодо відомих інгібіторів амілоїдної агрегації білків. Як модельні білки для дослідження інгібіторів фібрилоутворення широко використовуються інсулін та лізоцим (рис. 1). Згідно літературних даних, інсулін формує *in vitro* розгалужені

фібрили 5-12 нм в діаметрі та довжиною до декількох мікрон з вираженою латеральною агрегацією [Selivanova O. M., 2012]. В той же час, лізоцим формує *in vitro* нерозгалужені фібрили діаметром 2-5 нм і довжиною 1-2 мікрони [Сао А., 2002]. У формування остову амілоїдної фібрили залучені специфічні, так звані, амілоїдогенні послідовності амінокислот. Інсулін містить дві амілоїдогенні послідовності: (11)LVEALYL(17) у В-ланцюзі, яка відповідає за формування остову фібрили та (13)LYQLEN(18) у А-ланцюзі, що відповідає за латеральну агрегацію. Лізоцим містить одну амілоїдогенну послідовність (56)IFQINS(61) або її довшу версію (49)GSTDYGILQINSRWWC(64).

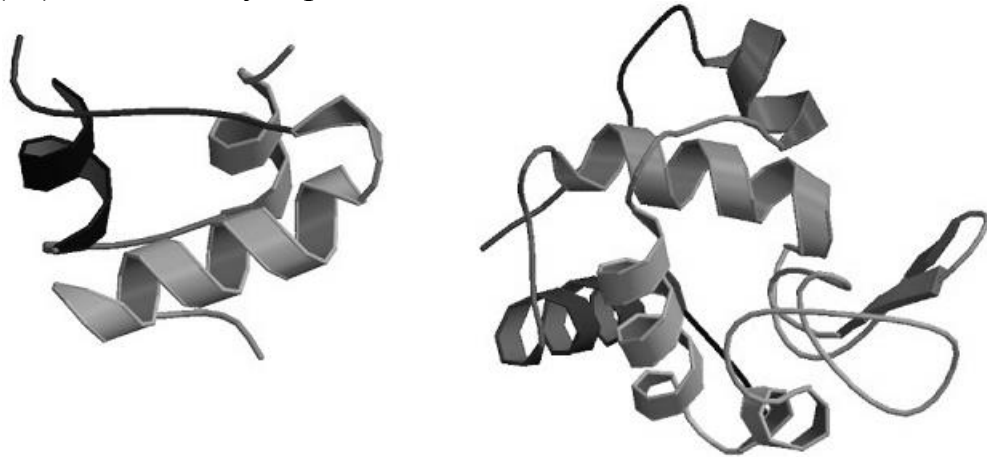


Рис. 1. Структура інсуліну (зліва, [PDB ID 3I40]) та лізоциму (справа, [PDB ID 1GXV])

У розділі **Матеріали та методи дослідження** описано методики, що були використані в даній роботі. Амілоїдні фібрили білків отримано шляхом інкубації розчинів інсуліну (2 мг/мл) та лізоциму (14,5 мг/мл) у 0,1М HCl pH 2 на водяній бані при 65 °С протягом 5 та 24 годин, відповідно. Інкубацію білків проводили за відсутності та у присутності досліджуваних макроциклічних комплексів (концентрація 100 μМ). Моніторинг кінетики фібрилоутворення інсуліну та лізоциму проведено методом флуоресцентної спектроскопії. Для цього було використано амілоїдчутливий ціаніновий барвник 7519 [Volkova K., 2011], який специфічно зв'язується з β-складками у структурі амілоїдних фібрил. При зв'язуванні з β-складчатою структурою барвник значно підвищує інтенсивність флуоресценції. Таким чином, можна оцінити відносну кількість утворених фібрил. Флуоресценція барвника була збуджена на довжині хвилі 580 нм, інтенсивність флуоресценції була зафіксована на довжині хвилі 590 нм. Значення інгібуючого ефекту розраховувалося за формулою $(1-I/I_0) \times 100\%$, де I_0 – інтенсивність флуоресцентного відгуку барвника на зразок без інгібітору, I – інтенсивність флуоресцентного відгуку барвника на зразок з інгібітором. Для розрахунку ефективної концентрації інгібітору (IC_{50}) експериментальну залежність інтенсивності флуоресценції барвника від концентрації інгібітору x апроксимували залежністю $I/I_0 = 1/(1+(x/x_0)^{dx})$, де x_0 та dx – параметри апроксимації, які вираховувались для мінімального відхилення апроксимуючої кривої від експериментальних даних. Параметр x_0 відповідає шуканій концентрації IC_{50} . Продукти реакції фібрилоутворення за відсутності та у

присутності інгібіторів досліджено методами атомно-силової мікроскопії, скануючої електронної мікроскопії та спектроскопії динамічного розсіяння світла. Довжину фібрил за даними СЕМ визначали у програмі Gwyddion. Висоту (діаметр) фібрил за даними АСМ визначали у пакеті програм SPIP. Спостережуваний гідродинамічний розмір фібрил методом динамічного розсіяння світла оцінювали як $d = kT/3\pi\eta D$, де D – це коефіцієнт трансляційної дифузії. Взаємодію фталоціанінів з сформованими амілоїдними фібрилами досліджено методами електронної спектроскопії поглинання та поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії. Обробку та графічну ілюстрацію отриманих експериментальних даних здійснювали у програмному пакеті OriginPro 8.1.

У розділі **Дослідження інгібуючої активності фталоціанінів на фібрилоутворення спектральними методами** вивчено зміни кінетики амілоїдної агрегації модельних амілоїдогенних білків інсуліну та лізоциму, що відбуваються у присутності фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координуваними замісниками, фталоціанінів і порфіразинів магнію та цинку. Структури досліджених сполук наведені на рис. 2.

Було досліджено вплив серії фталоціанінів гафнію та цирконію $PcHfPiramelit$, $PcHfPyr_2$, $PcHfBtfa_2$, $PcHfCl_2$, $PcZrLys_2$ та $PcZrDbm_2$ на кінетику реакції фібрилоутворення інсуліну.

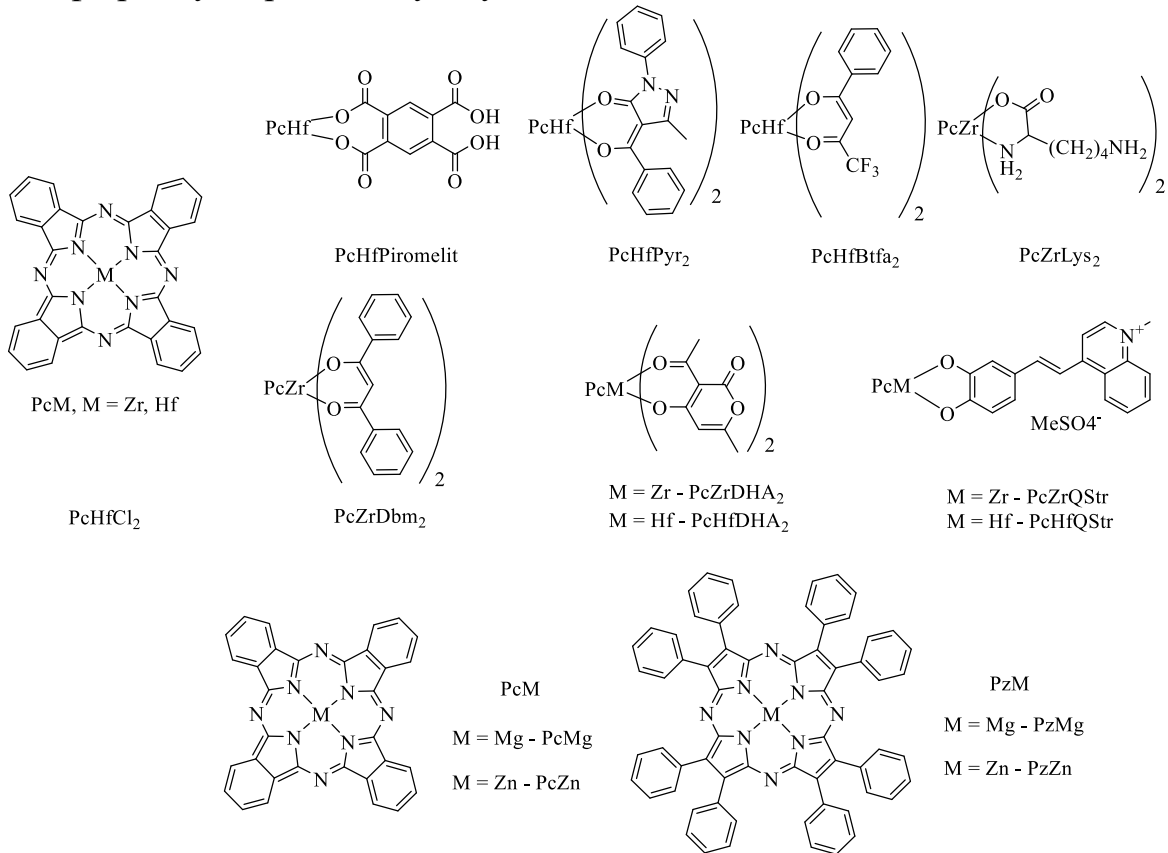
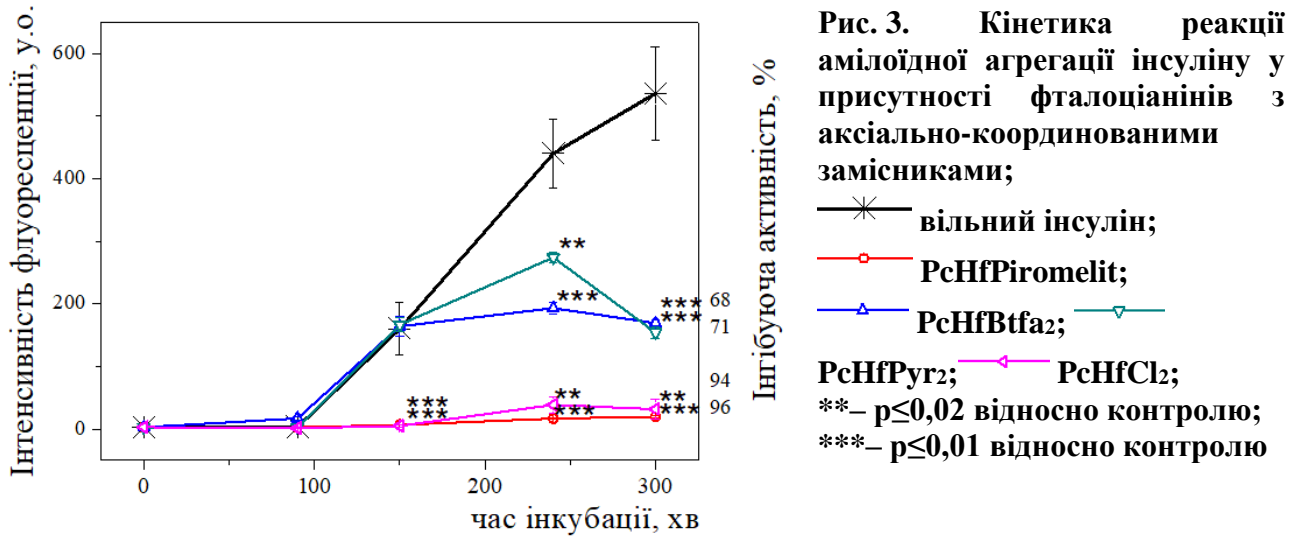
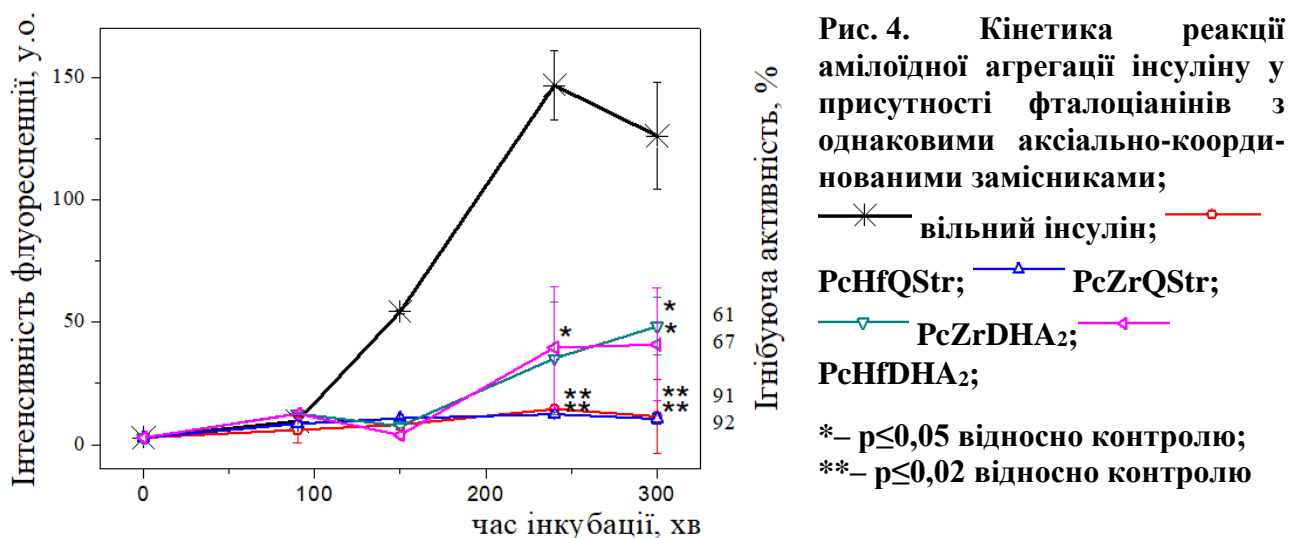


Рис. 2. Структури досліджуваних макроциклічних комплексів

Виявлено, що присутність металокомплексів призводить до суттєвого зниження інтенсивності реакції фібрилоутворення інсуліну. Так, інгібуюча активність для $PcHfPiromelit$ та $PcHfCl_2$ на кінцевий момент інкубації становить 96 та 94%, відповідно (рис. 3). Інгібуючий ефект зменшується у ряду $PcHfPiromelit > PcHfCl_2 > PcHfPyr_2 > PcHfBtfa_2 > PcZrLys_2 > PcZrDbm_2$.



Для вивчення впливу центрального атома металу фталоціанінів на інгібуючу активність було досліджено кінетику фібрилоутворення фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіальними замісниками однакової будови – $PcHfQStr$, $PcZrQStr$ та $PcZrDHA_2$, $PcHfDHA_2$. Фталоціаніни $PcHfQStr$ і $PcZrQStr$ виявляють однакову високу інгібуючу активність на фібрилоутворення інсуліну, що на кінцевий момент інкубації становить близько 90% (рис. 4). Значення інгібуючої активності для фталоціанінів $PcZrDHA_2$ і $PcHfDHA_2$ є близькими і нижчими ніж для $PcHfQStr$ і $PcZrQStr$.



З метою більш детального аналізу впливу найефективніших із досліджених металокомплексів (PcHfPiromelit, PcZrQStr, PcHfQStr) на кінетику фібрилоутворення, було визначено ефективну концентрацію інгібітору, за якої кількість сформованих фібрил інсуліну є вдвічі меншою відносно контролю (IC_{50}). Ефективна концентрація інгібітору IC_{50} складає $2,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ для PcHfPiromelit, $0,11 \pm 0,04 \mu\text{M}$ для PcHfQStr та $0,16 \pm 0,08 \mu\text{M}$ для PcZrQStr (рис. 5).

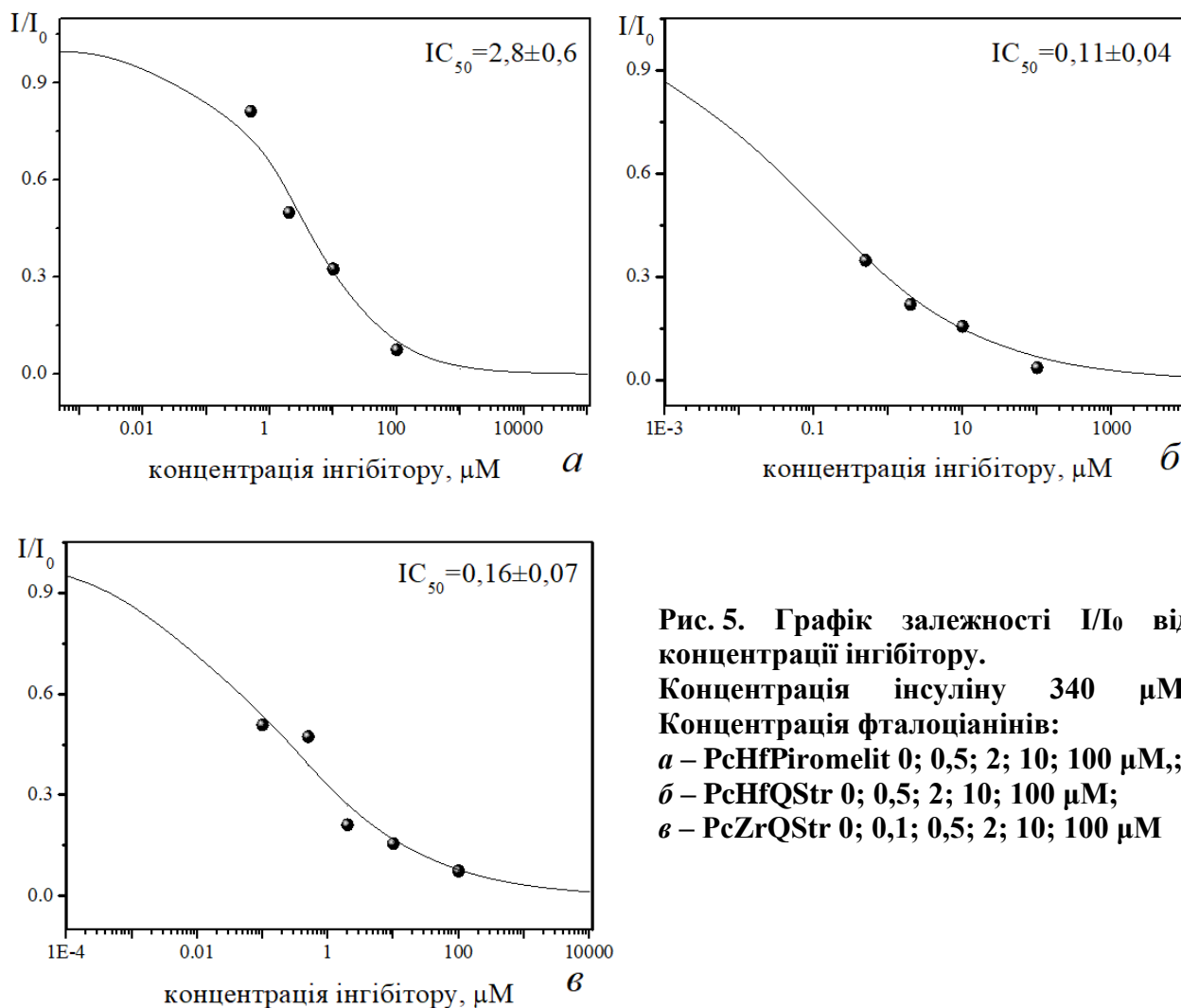
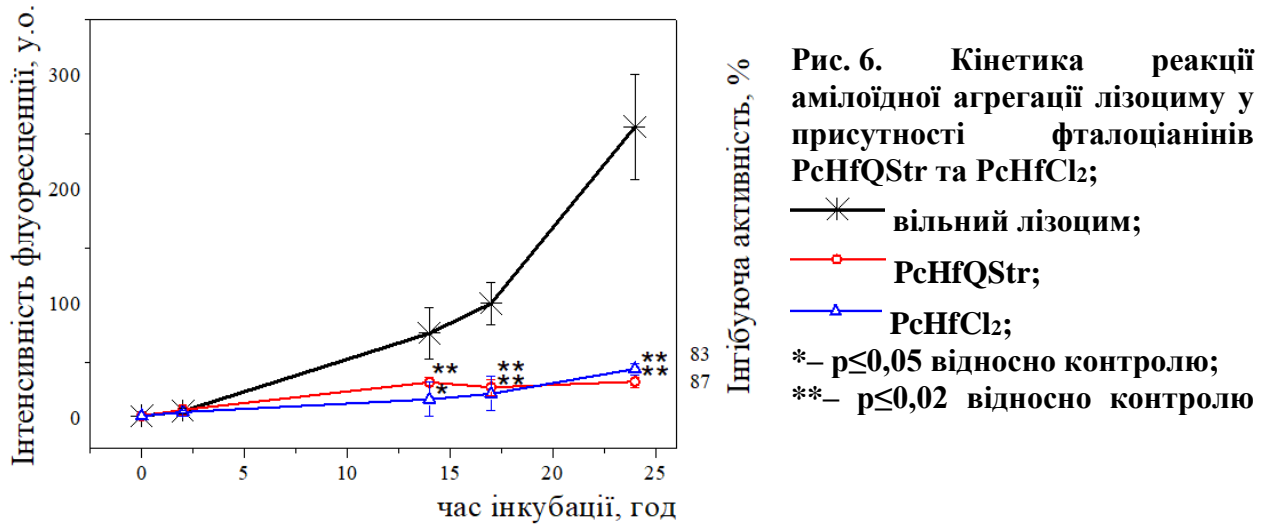


Рис. 5. Графік залежності I/I_0 від концентрації інгібітору. Концентрація інсуліну $340 \mu\text{M}$. Концентрація фталоціанінів:
a – PcHfPiromelit 0; 0,5; 2; 10; 100 μM ;
б – PcHfQStr 0; 0,5; 2; 10; 100 μM ;
в – PcZrQStr 0; 0,1; 0,5; 2; 10; 100 μM

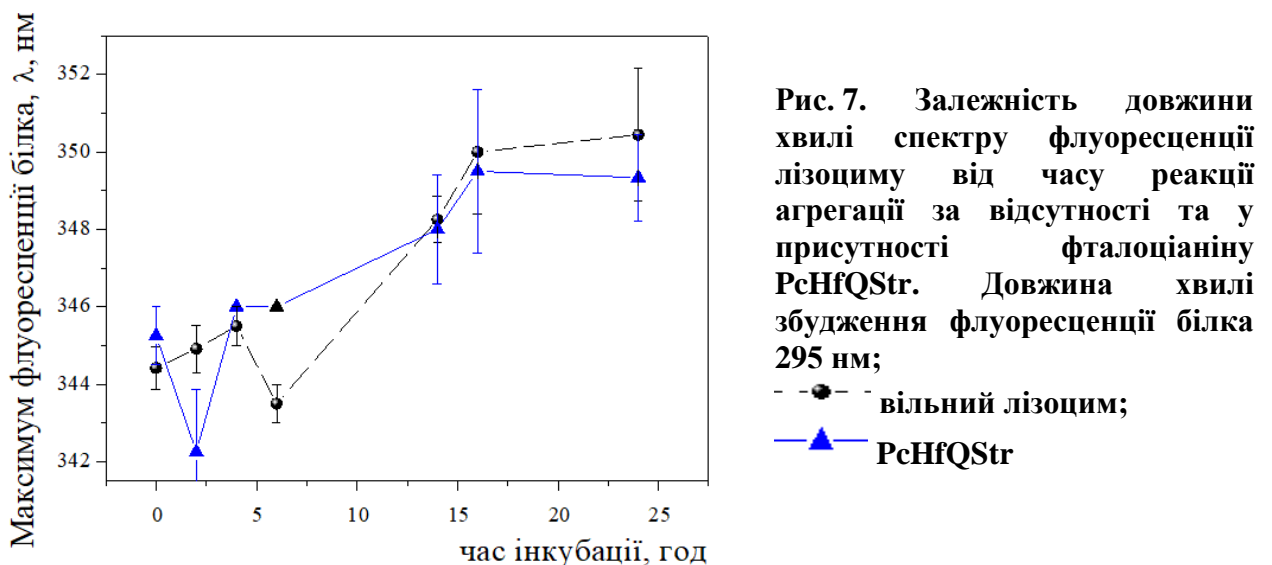
Отже, із близьких значень IC_{50} та інгібуючої активності для фталоціанінів зі стириловим замісником, можна зробити висновок, що здатність пригнічувати реакцію фібрилоутворення визначається структурою ліганду та фталоціаніновим макроциклом, а «закритий» центральний атом металу не впливає на перебіг реакції.

Було досліджено вплив на кінетику процесу амілоїдної агрегації лізоциму для двох високоєфективних інгібіторів фібрилоутворення інсуліну PcHfQStr та PcHfCl₂. На кінцевий момент інкубації обидва фталоціаніни виявляють високу інгібуючу активність, що становить 87% для PcHfQStr та 83% для PcHfCl₂

(рис. 6). Проте, їх вплив на кінетику агрегації інсуліну більш значний. Таким чином, інтенсивність реакції фібрилоутворення обох амілоїдогенних білків – інсуліну та лізоциму, пригнічується дослідженими фталоціанінами з аксіально-координуваними замісниками.

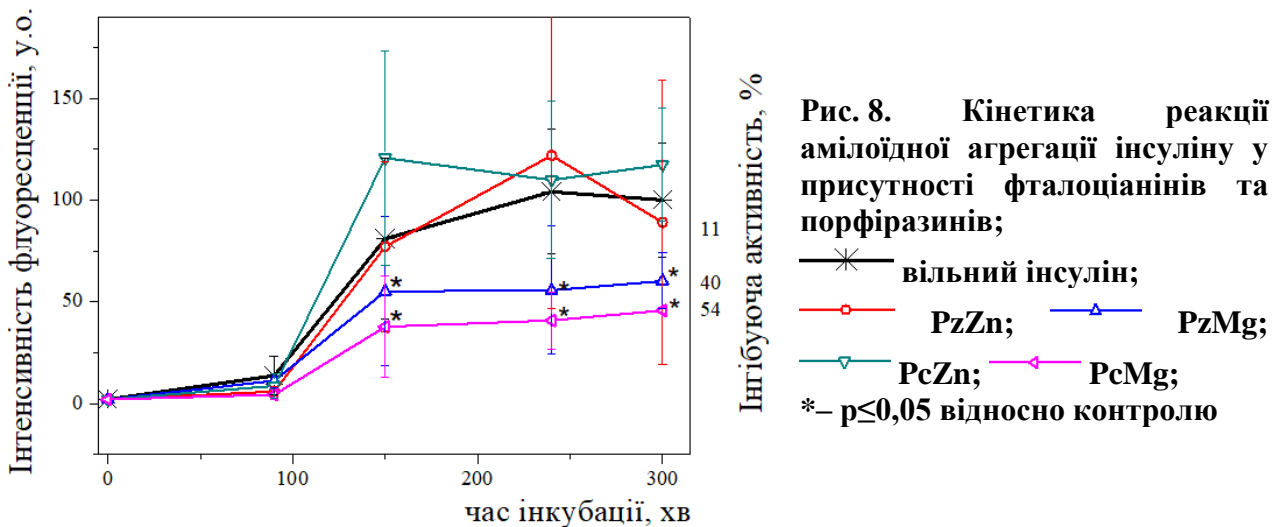


Для оцінки конформаційних змін білка протягом реакції амілоїдної агрегації, спричинених фталоціаніном, було досліджено зміни власної флуоресценції білка для вільного лізоциму та у присутності PcHfQStr. Основний вклад у власну флуоресценцію лізоциму вносять шість залишків триптофану (Trp), два з яких знаходяться у амілоїдогенній послідовності білка (49)GSTDYGILQINSRWWC(64). Показано, що при несуттєвому гасінні власної флуоресценції лізоциму відбувається зсув його максимуму флуоресценції на ранніх стадіях фібрилоутворення в присутності фталоціаніну у короткохвильову область (через 2 години), тоді як для вільного лізоциму аналогічний зсув відбувся лише через 6 годин (рис. 7).



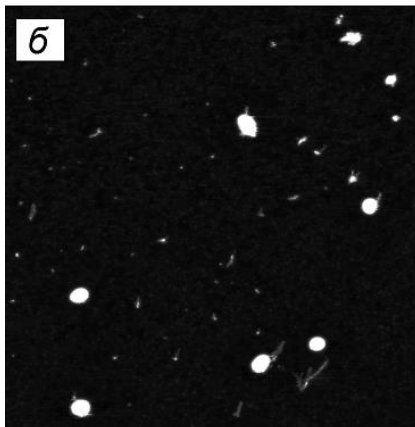
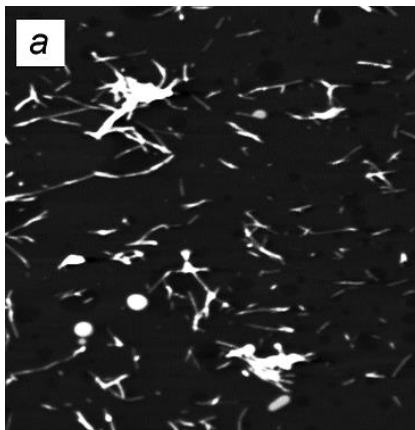
Цей зсув можна пояснити збільшенням гідрофобності середовища навколо Trp на ранніх стадіях реакції (синє зміщення), потім відбувається зменшення гідрофобності, викликане подальшою амілоїдною агрегацією (червоне зміщення). Наявність зазначеного зсуву довжини хвилі максимуму флуоресценції Trp може свідчити про вплив фталоціаніну на конформацію білка на ранніх стадіях фібрилоутворення через їх взаємодію.

Також було досліджено зміни кінетики фібрилоутворення інсуліну в присутності планарних фталоціанінів і порфіразинів магнію та цинку (рис. 2). Інгібуюча активність макрокомплексів зменшується у ряду $PcMg > PzMg > PzZn$, а для $PcZn$ спостерігається незначне стимулювання процесу (рис. 8). Показано, що Zn-вмісні комплекси мають слабкий інгібуючий вплив на кінетику фібрилоутворення інсуліну порівняно з Mg-вмісними аналогами. Таким чином, у випадку сполук, що не містять аксіальних замісників, природа іона металу впливає на інгібуючі властивості металокомплексу.



З метою пошуку нових флуоресцентних барвників для детекції білкових агрегатів та моніторингу кінетики реакції фібрилоутворення в реальному часі було досліджено серію 4-(4-діалкіламіностирил)-піридинових барвників як зондів для визначення амілоїдних фібрил. Було показано підвищення інтенсивності флуоресценції до 23 разів у присутності амілоїдних фібрил при нечутливості до мономерного інсуліну. Флуоресцентний відгук досліджених барвників є нижчим у порівнянні з ціаніновим барвником 7519, що використовується в роботі (підвищення до 40 разів) [Volkova K., 2011]. Інтенсивність флуоресцентного відгуку визначалась структурою барвника: стирилпіридини, що містять піперидинільну та 4-метилпіперидинільну групи виявили найвищу флуоресцентну чутливість до амілоїдних фібрил. Крім того, показано можливість визначення амілоїдних фібрил триметиновим ціаніновим барвником із застосуванням методу підсилення флуоресценції поверхнею металу.

У розділі Дослідження морфології продуктів реакції фібрилоутворення було охарактеризовано продукти реакції амілоїдної агрегації методами атомно-силової, скануючої електронної мікроскопії та динамічного розсіяння світла. Використовуючи метод атомно-силової мікроскопії (АСМ) ми порівняли морфологію амілоїдних агрегатів за впливу макроциклічних металокомплексів. За відсутності інгібіторів інсулін формує амілоїдні фібрили 1,5-8 нм в діаметрі з довжиною 1-5 мкм, як лінійні так і розгалужені (рис. 9а). Більшість фібрил скручені та формують пучки висотою до 20 нм. Присутність $PcHfCl_2$ призводить до формування точкових та аморфних агрегатів та практично повністю інгібує формування філаментів та фібрил (рис. 9б). Діаметр точкових агрегатів становить 10 нм. Сферичні структури 70-100 нм у діаметрі можуть бути аморфними агрегатами,



враховуючи їх розміри та відсутність флуоресцентної відповіді амілоїдчутливого барвника. Нерівний край деяких агрегатів, утворених в присутності $PcHfCl_2$, може свідчити про їх низьку стабільність.

Рис. 9. АСМ-зображення продуктів реакції фібрилоутворення інсуліну, сформованих без інгібіторів (а) та у присутності $PcHfCl_2$ (б). Розмір поля 10×10 мкм

У присутності $PcZrDbm_2$ спостерігається інтенсивне агрегатоутворення, основним продуктом реакції є олігомерні агрегати сферичної форми діаметром 3-12 нм. Серед другорядних продуктів реакції спостерігається невелика кількість ниткоподібних структур (фібрил). Отже, фталоціаніни $PcHfCl_2$ та $PcZrDbm_2$ перенаправляють реакцію фібрилоутворення. Більше того, олігомерні агрегати (індуковані присутністю $PcZrDbm_2$) і великі аморфні агрегати (індуковані присутністю $PcHfCl_2$) суттєво відрізняються за морфологією. На це вказує різна інтенсивність флуоресцентної відповіді амілоїдчутливого барвника 7519 у процесі реакції фібрилоутворення. Відповідно до літературних даних, олігомери містять β -складчасті структури, до яких чутливий барвник, тоді як аморфні агрегати є переважно неструктурованими.

З метою дослідження впливу присутності $PcZrDbm_2$ на морфологію інтермедіатів реакції амілоїдної агрегації, були отримані АСМ-зображення вільного інсуліну та в присутності комплексу через 30, 60 та 120 хв реакції. Показано, що на 30 хв в обох випадках формуються аморфні агрегати, що зникають на 60 хв. Натомість спостерігається формування сферичних агрегатів 2-15 нм, а також великих кластерів до 80 нм, при цьому у присутності

фталоціаніну інтенсивність агрегації нижча. На 120 хв вільний інсулін формує сферичні агрегати 2-5 нм у діаметрі та подовжені тонкі філаменти довжиною до 1 мкм. Основним продуктом реакції на 120 хв у присутності $PcZrDbm_2$ є сферичні агрегати 6-25 нм. Отримані дані свідчать, що $PcZrDbm_2$ пригнічує формування саме фібрилярних структур.

У присутності $PcHfQStr$ основним продуктом реакції є ниткоподібні агрегати, спостерігається помітне зменшення кількості утворених фібрил у порівнянні з вільним інсуліном (рис. 10).

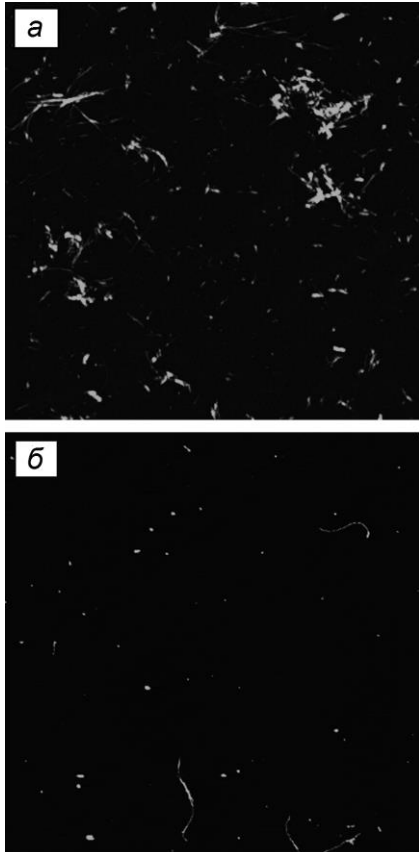


Рис. 10. АСМ-зображення продуктів реакції фібрилоутворення інсуліну, сформованих без інгібітору (а) та у присутності $PcHfQStr$ (б). Розмір поля 10×10 мкм

Крім ниткоподібних агрегатів, у незначній кількості присутні сферичні агрегати різного діаметру. Утворені ниткоподібні агрегати є протофіламентами 0,8-1,5 нм у діаметрі та довжиною 0,4–2 мкм. Також у незначній кількості спостерігаються точкові агрегати 0,8-10 нм, що можуть бути ідентифіковані як олігомерні агрегати чи проміжні інтермедіати. Було досліджено вплив фталоціаніну $PcHfQStr$ на морфологію продуктів амілоїдної агрегації лізоциму. У присутності цього комплексу лізоцим формує довгі ниткоподібні структури діаметром 2,0-3,5 нм. Таким чином, вплив інгібітору $PcHfQStr$ на процес амілоїдної агрегації залежить також від структури білка.

Методом скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) було досліджено продукти фібрилоутворення інсуліну у присутності фталоціанінів та порфіразинів магнію і цинку. Вільний інсулін формує видовжені ниткоподібні агрегати довжиною 1,4-2 мкм (табл. 1, рис. 11), часто з розгалуженою структурою. Крім того, фібрили інсуліну мають виражену латеральну агрегацію, формуючи так звані пучки. У присутності фталоціанінів і порфіразинів магнію та цинку основним продуктом реакції агрегації є фібрили (рис. 11). У присутності $PzZn$ формуються фібрили 0,8-1,6 мкм розгалуженої структури з вираженою латеральною агрегацією. У присутності $PzMg$ інсулін утворює трохи коротші фібрили довжиною приблизно 0,6-1,3 мкм (рис. 11б) та менш вираженою латеральною агрегацією. Присутність $PcZn$ призводить до збільшення дисперсії довжини фібрил 0,9-2,7 мкм. Дисперсія довжини фібрил 1,2-2,3 мкм також спостерігається у присутності $PcMg$ (табл. 1, рис. 11в).

Фталоціаніни та порфіразини магнію і цинку по-різному впливають на морфологію агрегатів інсуліну, індукуючи утворення фібрил різної середньої довжини та схильності до латеральної агрегації. Це можна пояснити різною геометрією комплексів. Фталоціаніни $PcMg$ та $PcZn$ – це планарні молекули,

тоді як порфіразини PzMg та PzZn мають планарний макроцикл з непланарними замісниками на периферії молекули (фенільні фрагменти, що здатні обертатися відносно площини тетрапірольного кільця).

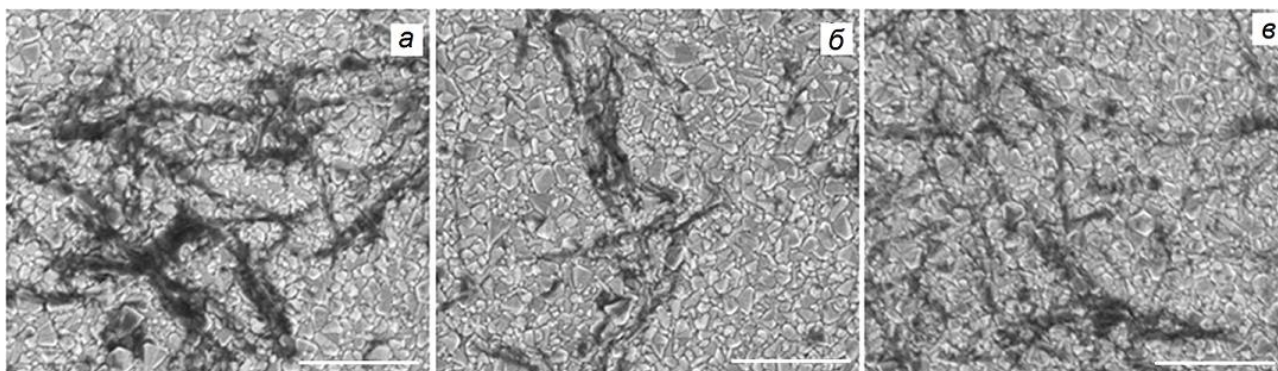


Рис. 11. СЕМ-зображення продуктів реакції фібрилоутворення інсуліну, сформованих без інгібіторів (а) та у присутності –PzMg (б), PcMg (в). Шкала 2 мкм

Методом динамічного розсіяння світла (ДРС) було отримано гідродинамічні параметри агрегатів інсуліну, сформованих у присутності фталоціанінів та порфіразинів. Методом СЕМ було показано формування фібрилярних агрегатів у присутності металокомплексів; ці параметри було порівняно із гідродинамічним розміром фібрил, отриманим ДРС (табл. 1). Гідродинамічні розміри, розраховані за ДРС корелюють з розмірами фібрил, отриманими за СЕМ.

Таким чином, на морфологію сформованих фібрил впливає геометрія комплексів. В той же час, як було показано методом флуоресцентної спектроскопії вище (рис. 6), природа «відкритого» центрального атому металу впливає на інтенсивність пригнічення процесу фібрилоутворення.

Таблиця 1

Довжина фібрил інсуліну та спостережуваний гідродинамічний розмір фібрил, сформованих без інгібіторів та у присутності фталоціанінів та порфіразинів

Зразок	Фібрили вільного інсуліну	У присутності			
		PzZn	PzMg	PcZn	PcMg
L, мкм	1,4-2,0	0,8-1,6	0,6-1,3	0,9-2,7	1,2-2,3
d, мкм	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,3	2,9 ± 0,7	1,7 ± 0,4

Примітки: L – довжина фібрил інсуліну, отриманих із зображень СЕМ; d – спостережуваний гідродинамічний розмір, розрахований за даними ДРС.

У розділі **Дослідження взаємодії фталоціанінів з амілоїдними фібрилами та механізму інгібування** було вивчено взаємодію фталоціанінів зі сформованими амілоїдними фібрилами та зроблено припущення щодо механізму інгібування.

Було досліджено вплив агрегаційних властивостей фталоціанінів на їх інгібуючу активність. Відповідно до флуоресцентних даних (рис. 3), два фталоціанінові комплекси демонструють дуже високу інгібуючу активність 96% для $PcHfPiromelit$ та 94% для $PcHfCl_2$. У спектрах поглинання цих фталоціанінів у буфері відносна інтенсивність короткохвильової смуги збільшується зі збільшенням концентрації фталоціанінового комплексу, а інтенсивність довгохвильової смуги пропорційно падає, що свідчить про високу схильність $PcHfPiromelit$ та $PcHfCl_2$ до самоасоціації (рис. 12а). Таким чином, ці фталоціаніни з високими агрегаційними властивостями демонструють високу інгібуючу активність на фібрилоутворення інсуліну. Тоді як для фталоціанінів з низькою інгібуючою активністю ($PcHfPyr_2$, $PcHfVtfa_2$) самоасоціації в буфері не спостерігалось. Це дає змогу припустити, що фталоціаніни з високою схильністю до самоасоціації за рахунок π - π стекінгу більш ефективно інгібують реакцію фібрилоутворення.

Для фталоціанінів $PcHfPiromelit$ та $PcHfCl_2$ було досліджено їх взаємодію з інсуліном у буфері та 0,1 М HCl (в умовах реакції фібрилоутворення). У буфері присутність мономерного чи фібрилярного інсуліну призводить до значного зниження інтенсивності короткохвильового піку, що відповідає агрегатам, і зростання інтенсивності довгохвильового піку, що відповідає мономерам (рис. 12б). Руйнування самоасоціатів фталоціаніну свідчить про його взаємодію з мономерним білком і фібрилами. При цьому, висока схильність до самоасоціації може виступати рушійною силою при зв'язуванні. В умовах реакції фібрилоутворення аксіально-координовані фталоціаніни знаходяться у мономерній формі.

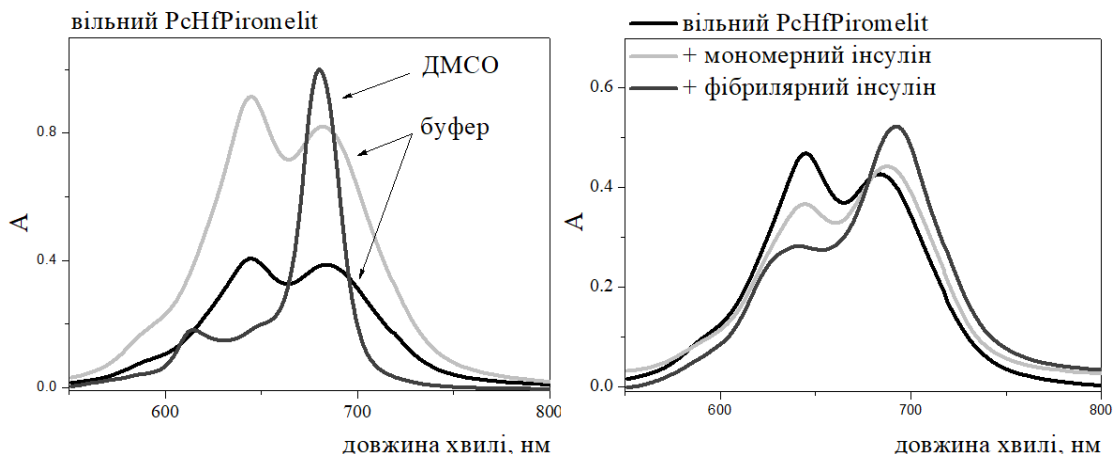


Рис. 12. Спектри поглинання $PcHfPiromelit$ у 50 мМ TRIS-HCl буфері рН 7,9 (концентрація 5 та 10 μ М) та ДМСО (а) та у присутності мономерного та фібрилярного інсуліну у 50 мМ TRIS-HCl буфері рН 7,9 (б). Концентрація інсуліну 34 μ М, концентрація фталоціаніну 10 μ М. А – оптична густина

Отже, на антифібрилогенні властивості досліджуваних сполук може впливати саме їх схильність до самоасоціації, а агрегати не беруть безпосередньої участі в інгібуванні реакції. Взаємодія з мономерним фталоціаніном може відбуватися шляхом π - π стекінгу з ароматичними амінокислотами білка, а схильність фталоціанінів до самоасоціації є «індикатором» здатності утворювати стекінг-взаємодії та антифібрилогенної активності.

Було охарактеризовано взаємодію між амілоїдними фібрилами інсуліну та молекулами $PcHfCl_2$ методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії на наночастинках срібла $AgNP$. Поверхнево підсилені раманівські спектри $PcHfCl_2$ у присутності різних концентрацій фібрил інсуліну містять інтенсивні смуги, що відповідають вібраціям фталоціаніну (рис. 13), та, як правило, в кілька разів інтенсивніші порівняно з вільним $PcHfCl_2$. Ці дані свідчать про взаємодію між фталоціаніном та фібрилами.

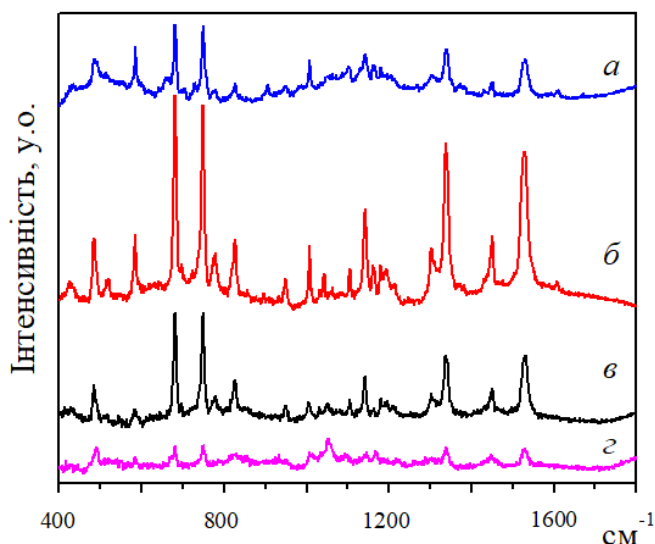


Рис. 13. Поверхнево підсилені раманівські спектри $PcHfCl_2$ (0,5 μM) у присутності фібрил інсуліну у концентраціях 0,425 μM (а), 0,142 μM (б), 0,0425 μM (в) та без фібрил інсуліну (г). Довжина хвилі збудження 830 нм

Найбільш інтенсивний сигнал спостерігається для середньої концентрації фібрил інсуліну в 0,142 μM (підвищення інтенсивності до 10 разів). Можна припустити, що на зміну інтенсивності піків фталоціаніну у присутності фібрил інсуліну впливають декілька факторів. Серед таких факторів можна зазначити зміну агрегації $AgNP$ через взаємодію з фібрилами, зменшення інтенсивності поверхневого підсилення через взаємодію з фібрилами, збільшення відстані між фталоціаніном та наночастинками через зв'язування фталоціаніну з фібрилою. Співвідношення цих факторів при різних концентраціях білка визначає загальний рівень інтенсивності спектру фталоціаніну.

Припущення щодо механізму взаємодії. Специфічні сегменти в структурі білків – амілоїдогенні послідовності – мають вирішальне значення для утворення амілоїдних агрегатів. Як один з головних механізмів інгібування фібрилоутворення запропоновано стекінг-взаємодії між ароматичними фрагментами у молекулах інгібіторів та ароматичними амінокислотними залишками білка [Porat Y., 2006, Valiente-Gabioud A., 2016].

Як зазначалося, у структурі інсуліну людини дві амілоїдогенні послідовності: (11)LVEALYL(17), що розташована у В-ланцюзі та (13)LYQLEN(18), що розташована в А-ланцюзі та може бути або залучена у формування структури фібрили, або залишатися за межами остову.

Можна припустити, що фталоціанін з замісниками малого розміру $PcHfCl_2$ зв'язується з двома залишками тирозину в амілоїдогенних послідовностях інсуліну таким чином, що перешкоджає утворенню β -складчастої структури, перенаправляючи агрегацію білка у бік формування неструктурованих аморфних агрегатів.

Взаємодія з інсуліном фталоціаніну $PcZrDbm_2$, що містить об'ємні ліганди, перенаправляє процес фібрилоутворення у бік утворення сферичних олігомерних агрегатів замість амілоїдних фібрил. Можна припустити, що фталоціанін з об'ємним замісником зв'язується з молекулою інсуліну в місці, що має менші стеричні перешкоди для молекули такого розміру, тобто поза амілоїдогенними послідовностями. Таким чином, амілоїдогенні послідовності є «доступними» для утворення β -складчастої структури. Це дає змогу сформуватись амілоїдогенним інтермедіатам білка, але перешкоджає їх подовженню у філаменти.

Таким чином, зв'язування фталоціаніну з білковою молекулою визначається не тільки планарною ароматичною системою макроциклу, але і його лігандом.

Різницю у інгібуючій активності комплексів магнію і цинку можна пояснити здатністю іону Zn^{2+} координувати залишки амінокислот гістидину та цистеїну в білках. У інсуліні залишок гістидину Н10 (рис. 14) залучений у формування функціонального гексамеру з координацією Zn^{2+} .

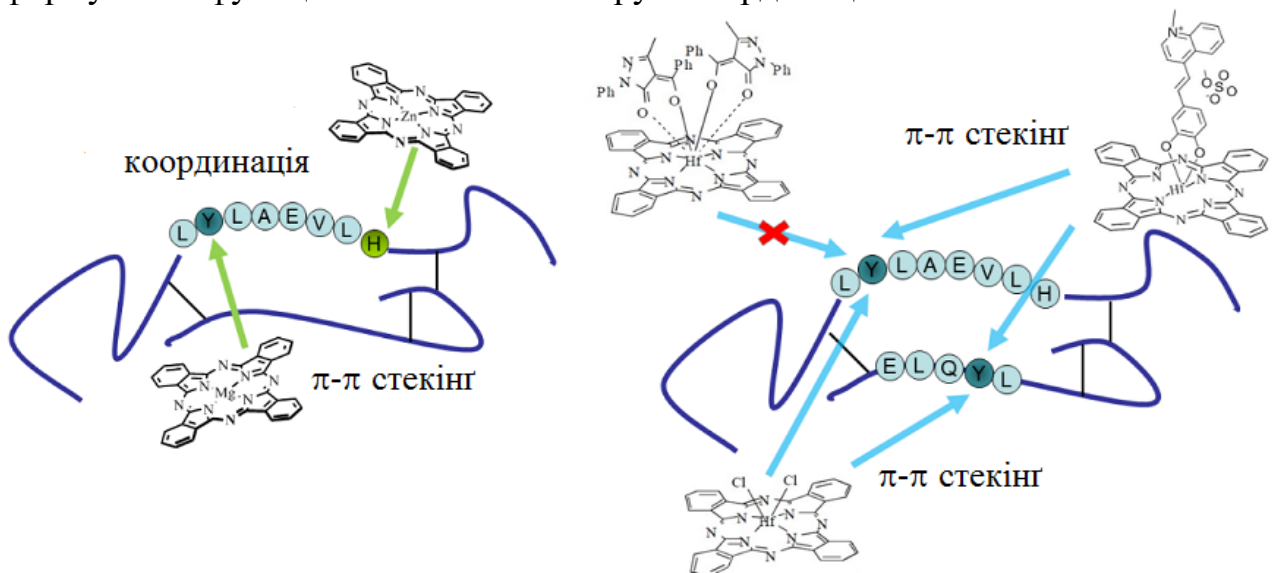


Рис. 14. Схема інсуліну людини. Наведені дві амілоїдогенні послідовності, розташовані у В- та А-ланцюгах. Додатково вказано розташування залишків тирозину Y14, Y16 та гістидину H10, що пропонуються як можливі місця зв'язування досліджуваних комплексів

Цей залишок H10 розташований поблизу амілоїдогенної послідовності (11)LVEALYL(17) в В-ланцюзі інсуліну. Припускається, що завдяки спорідненості цинку до залишку гістидину, комплекси магнію та цинку можуть надавати перевагу різним сайтам зв'язування у амілоїдогенній послідовності інсуліну. Комплекси магнію можуть переважно координуватися до залишку тирозину Y16 у амілоїдогенній послідовності, що формує остов фібрили. Комплекси цинку можуть переважно зв'язуватись на периферії остову шляхом координації до залишку гістидину. Таким чином, здатний до координації центральний атом металу може визначати місце зв'язування макроциклічного комплексу з білком.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі вирішується проблема створення вискоєфективних інгібіторів амілоїдної агрегації білків, що є причиною ряду патологічних станів, на основі фталоціанінових комплексів з аксіально-координованими замісниками.

1. Вперше досліджено інгібуючу активність серії фталоціанінів та порфіразинів на процес амілоїдної агрегації білків. Показано, що вплив таких сполук на кінетику фібрилоутворення білків та морфологію утворених агрегатів (тобто взаємодія між макроциклічним металокомплексом та агрегаційним інтермедіатом білка) в значній мірі визначається:

- природою та геометрією позаплощинного ліганду у випадку аксіально-координованих фталоціанінів;
- природою та координаційною здатністю «відкритого» центрального атома металу у випадку планарних фталоціанінів і порфіразинів;
- наявністю об'ємних замісників по периферії макроциклу, тобто його геометрією.

2. Встановлено, що інтенсивність утворення амілоїдних агрегатів білків може суттєво пригнічуватись аксіально-координованими фталоціанінами. Досліджувані комплекси можуть суттєво (до 96%) пригнічувати інтенсивність реакції амілоїдної агрегації. Фталоціаніни гафнію та цирконію, що містять хіноліновий стириловий ліганд пропонуються як агенти з високою антифібрилогенною активністю. Для них ефективна концентрація інгібітору IC₅₀ становить 0,16 μM для PcZrQStr та 0,11 μM для PcHfQStr.

3. Встановлено, що морфологія продуктів амілоїдної агрегації білків залежить від природи та геометрії ліганду аксіально-координованих фталоціанінів. Реакція фібрилоутворення інсуліну була переспрямована у бік формування олігомерних агрегатів 2-10 нм (фталоціанінами PcHfCl₂ та PcZrDbm₂), аморфних структур діаметром до 100 нм (PcHfCl₂), протофіламентів близько 0,8 нм у діаметрі (PcHfQstr). Для лізоциму, присутність аксіально-координованих фталоціанінів призводила до збільшення довжини та зменшення діаметру філаментів.

4. Показано, що у реакції агрегації білків фталоціанінові комплекси з високою здатністю до самоасоціації (до π - π стекингу) проявляють високу інгібуючу активність. Такі макроциклічні сполуки також здатні до асоціації зі сформованими фібрилами.

5. Утворення комплексів між сформованими амілоїдними фібрилами та фталоціаніном було показано методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії. Найбільше підвищення інтенсивності піків фталоціаніну у раманівському спектрі у присутності фібрил інсуліну становило 10 разів для молярного співвідношення фібрили:фталоціанін 1:3,5. Таким чином, показано можливість детекції амілоїдних фібрил за допомогою фталоціанінів цим методом.

6. Досліджено флуоресцентну чутливість до амілоїдних фібрил інсуліну серії стирилпіридинових барвників, що виявляють підвищення інтенсивності флуоресценції до 23 разів. Показано можливість визначення амілоїдних фібрил триметиновим ціаніновим барвником із застосуванням методу підсилення флуоресценції поверхнею металу.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines in amyloid aggregation of insulin / V. Kovalska, **S. Chernii**, M. Losytskyu, J. Ostapko, I. Tretyakova, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // Journal of Molecular Recognition. – 2018. – Vol. 31(1). – e2660. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності фталоціанінів та порфіразинів магнію та цинку на фібрилоутворення, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

2. Characterization of the interaction between phthalocyanine and amyloid fibrils by surface-enhanced raman scattering (SERS) / M. Losytskyu, N. Akbay, **S. Chernii**, E. Avci, V. Chernii, S. Yarmoluk, M. Culha, V. Kovalska // Analytical Letters. – 2018. – Vol. 51(1-2). – P. 221-228. *Особистий внесок здобувача – отримання зразків фібрил, обробка результатів.*

3. The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme / V. Kovalska, **S. Chernii**, V. Cherepanov, M. Losytskyu, V. Chernii, O. Varzatskii, A. Naumovets, S. Yarmoluk // Journal of Molecular Recognition. – 2017. – Vol. 30(8). – e2622. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності фталоціаніну з аксіально-координованим замісником на фібрилоутворення спектральними методами, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

4. Design of 4-(4-dialkylaminostyryl)-pyridinium dyes for fluorescent detection of amyloid fibrils / D. Inshyn, **S. Chernii**, V. Kovalska, S. Yarmoluk // Biopolymers and Cell. – 2017. – Vol. 32(4). – P. 289-299. *Особистий внесок здобувача – дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей серії стрилпіридинових барвників як зондів для детекції амілоїдних фібрил, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

5. Anti-fibrillogenic properties of phthalocyanines: effect of the out-of-plane ligands / V. Kovalska, V. Cherepanov, **S. Chernii**, M. Losytskyu, A. Senenko, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol.22(24). – P. 6918-6923. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності серії фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками на фібрилоутворення інсуліну, обробка результатів, участь у написанні статті.*

6. Towards the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines with out-of-plane ligands: correlation with self-association proneness / V. Kovalska, M. Losytskyu, **S. Chernii**, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – Vol. 29(6). – P. 473-479. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності серії фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками на фібрилоутворення, дослідження їх агрегаційних властивостей, підготовка статті до друку.*

7. Study of inhibitory activity of phthalocyanine-related complexes against pathological amyloid aggregation / S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii S. Yarmoluk, V. Kovalska // Abstract of FEBS Advanced course «Hydrodynamic and thermodynamic analysis of biological macromolecules and their interactions». September 23-28 2018, Prague, Czech Republic. – P. 24.

8. β -ketoenole dye as an amyloid-sensitive fluorescent probe for bacterial biofilm investigation / S. Chernii, O. Moshynets, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, V. Kovalska // FEBS 3+ Meeting – XI Parnas Conference – Young Scientists Forum Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine. September 3-5 2018, Kyiv, Ukraine. P. – 57.

9. Spectral-luminescent characterization of β -ketoenoles as amyloid-sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection / S. Chernii, M. Losytskyu, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk, V. Kovalska // *Nanotechnology and nanomaterials*. August 23-26 2017, Chernivtsi, Ukraine. – P. 158.

10. β -ketoenoles as amyloid-sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection / S. Chernii, M. Losytskyu, A. Gorski, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, V. Kovalska // XXIII Galyna Puchkovska International School-Seminar «Spectroscopy of Molecules and Crystals». September 20-25 2017, Kyiv, Ukraine. – P. 221.

11. Use of SERS for characterization of interaction between phthalocyanine complex and amyloid fibrils / M. Losytskyu, N. Akbay, S. Chernii, E. Avci, V. Chernii, M. Culha, V. Kovalska // International conference 10th Aegean Analytical Chemistry Days. September 29 October 02 2016, Çanakkale, Turkey. – P. 324.

12. The effect of Zn and Mg phthalocyanines on insulin amyloid aggregation / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, J. Ostapko, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // VIII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання». 22-24 квітня 2016, Харків, Україна. – С. 13-14.

13. Effect of the macrocyclic metal complexes on lysozyme amyloid aggregation / S.V. Chernii, V. Kovalska, V. Cherepanov, M. Losytskyu, I. Tretyakova, O. Varzatskyu, S. Yarmoluk // *Nanobiophysics 2015: Fundamental and Applied Aspects* October 1-4 2015, Kyiv, Ukraine. – P. 43.

14. Effect of the out-of-plane ligands on the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanine complexes / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // XIX конференція з неорганічної хімії за участю закордонних учених, 7-11 вересня 2014, Одеса, Україна. – С. 26.

15. Amino-substituted β -ketoenole dyes for fluorescent detection of amyloid fibril / S. Chernii, N. Akbay, V. Chernii, I. Tretyakova, Ya. Dovbiy, V. Kovalska // The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence (MAF), September 13-16 2015, Würzburg, Germany. – P. 99.

16. Anti-fibrillogenic activity of the phthalocyanine complexes: Role of the out-of plane ligands / V. Kovalska, S. Chernii, V. Cherepanov, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials», August 23-30 2014, Lviv, Ukraine. – P. 91-92.

17. Phthalocyanines with out-of-plane quinolinium styryl ligand as inhibitors of insulin amyloid fibrils formation / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, V. Cherepanov, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk // Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», 29-30 квітня 2014, Київ, Україна. – С. 25.

18. Phthalocyanines with axially-coordinated styryl-quinolinium ligand as anti-fibrillogenic agents / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk // 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення», 17-20 березня 2014, Донецьк, Україна. – С. 157.

19. Correlation of anti-fibrillogenic activity of hafnium phthalocyanines and their tendency to self-association / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii, S. Yarmoluk // 14th International conference-school «Advanced materials and technologies». August 27-31 2012, Palanga, Lithuania. – P. 124.

АНОТАЦІЯ

Черній С.В. Дослідження фталоціанінових комплексів з аксіально-координованими замісниками як інгібіторів амілоїдної агрегації білків. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

Одним з важливих підходів по впливу на амілоїдну агрегацію є пошук молекул, здатних інгібувати або перенаправляти утворення амілоїдних фібрил. Метою роботи було дослідження інгібуючої активності на фібрилоутворення інсуліну та лізоциму макроциклічних металокомплексів об'ємної і планарної геометрії (фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими лігандами, планарних фталоціанінів та порфіразинів магнію і цинку) та з'ясування того, яким чином їх взаємодія з білком впливає на морфологію продуктів агрегації.

Залежно від хімічної структури, досліджені сполуки суттєво змінюють кінетику фібрилоутворення і структуру амілоїдних агрегатів. У присутності фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками спостерігається формування одиничних протофіламентів, олігомерних або великих аморфних агрегатів. Вважається, що ліганд в структурі об'ємних аксіально-координованих фталоціанінів забезпечує або додаткову фіксацію при зв'язуванні з білком або запобігає їй, а «закритий» атом центрального металу не впливає на взаємодію. У присутності металокомплексів планарної будови відбувається пригнічення реакції фібрилоутворення. У випадку планарних фталоціанінів та порфіразинів «відкритий» атом центрального металу сприяє взаємодії з білком шляхом координації.

Ключові слова: фібрилоутворення, амілоїдні фібрили, фталоціаніни, порфіразини, інгібітор, флуоресцентна спектроскопія, мікроскопія, спектроскопія електронного поглинання

АННОТАЦІЯ

Черний С.В. Изучение фталоцианиновых комплексов с аксиально-координированными заместителями как ингибиторов амилоидной агрегации белков. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора философии (кандидата биологических наук) по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.

Одним из важных подходов по воздействию на амилоидную агрегацию является поиск молекул, способных ингибировать или перенаправить образование амилоидных фибрилл. В работе исследована ингибирующая активность на фибрилообразование инсулина и лизоцима макроциклических металлокомплексов объемной и планарной геометрии, в том числе фталоцианинов гафния и циркония с аксиально-координированными заместителями, планарных фталоцианинов и порфиразинов магния и цинка. В зависимости от химической структуры, исследованные соединения существенно изменяют кинетику фибрилообразования и структуру амилоидных агрегатов. В присутствии фталоцианинов с аксиально-координированными заместителями наблюдается формирование единичных протофиламентов, олигомерных или крупных аморфных агрегатов. Предполагается, что лиганд в структуре объемных аксиально-координированных фталоцианинов обеспечивает или дополнительную фиксацию при связывании с белком или предотвращает ее, а «закрытый» атом центрального металла не влияет на взаимодействие. В случае планарных фталоцианинов и порфиразинов «открытый» атомом центрального металла способствует взаимодействию с белком путем координации.

Ключевые слова: фибрилообразование, амилоидные фибриллы, фталоцианины, порфиразины, ингибитор, флуоресцентная спектроскопия, микроскопия, спектроскопия электронного поглощения

ABSTRACT

Chernii S.V. Investigation of phthalocyanine complexes with axially-coordinated ligands as inhibitors of amyloid aggregation of proteins. – Manuscript.

Thesis for scientific degree of Doctor of Philosophy in Biology (Candidate of Sciences), speciality 03.00.03 – Molecular biology. Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

In the pathogenesis of many conformational diseases, such as neurodegeneration and amyloidoses, proteins forming β -pleated stable aggregates called amyloid fibrils are involved. One of the important approaches against amyloid aggregation is a search for molecules able to inhibit or redirect the formation of amyloid fibrils. The goal of this work is to find potential inhibitors of amyloid aggregation among macrocyclic metal complexes (phthalocyanines, porphyrins) with different geometry and investigate how their interaction with proteins affects protein aggregation and morphology of the aggregation products.

A fluorescent dye-based assay was used to study the kinetics of protein aggregation, atomic force and scanning electron microscopies (SEM) – to characterize the morphology of single aggregates, dynamic light scattering (DLS) – to estimate the hydrodynamic parameters of the aggregates. Also, UV-VIS absorption and Raman spectroscopy were used to study the phthalocyanine aggregation and binding ability of phthalocyanines.

Hf and Zr phthalocyanine complexes with axially coordinated ligands were strongly able to change the kinetics of the aggregation reaction and structure of the aggregates. It was shown that the intensity of the kinetics of amyloid fibril formation could be significantly suppressed by axially coordinated phthalocyanines (up to 96%). Zr and Hf phthalocyanines with quinolinium styryl ligand demonstrated the same high inhibitory activity of about 90% and similar values of IC_{50} equal to $0.16 \pm 0.08 \mu\text{M}$ for PcZrQStr and $0.11 \pm 0.04 \mu\text{M}$ for PcHfQStr. Similar values of inhibitory activity and IC_{50} suggest that the nature of the «closed» central metal atom does not affect the inhibitory activity.

Depending on the structure of axially coordinated ligands, binding of phthalocyanines to insulin during its aggregation reaction could redirect fibrillization towards the formation of products of different morphology: single β -pleated protofilaments, oligomeric aggregates or large amorphous species. Insulin itself forms elongated filamentous species – amyloid fibrils with a diameter about 6-8 nm and length about 1-5 μm with branched morphology. The presence of Hf phthalocyanine (PcHfCl₂) with small-size ligands induces the appearance of large size aggregates with a diameter about 70-100 nm, that are identified as amorphous

species. The presence of Zr phthalocyanine (PcZrDbm₂) with bulky ligands redirects insulin fibril reaction to the formation of oligomeric aggregates with the diameter up to 10 nm as the main product. In the presence of Hf phthalocyanine (PcHfQStr) containing the quinolinium styryl fragment, the number, and diameter of formed fibrils is significantly reduced, only single filaments with a diameter about 1-2 nm and fibrils with diameter about 6 nm were observed.

The inhibitory activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines of planar structure on the kinetics of insulin fibrillization was also shown. Interaction of Mg-containing complexes with insulin more strongly suppresses the protein aggregation comparing to their Zn-containing analogs. Binding of Zn and Mg porphyrazines to insulin during fibrillization led to the formation of shorter fibrils comparing to free protein. Hydrodynamic diameters of fibrils population estimated by DLS generally correlate with the size of single fibrils obtained by SEM.

UV-VIS absorption spectroscopy study revealed that axially coordinated phthalocyanines with a higher tendency to self-association demonstrate higher inhibitory activity in fibrillization reaction compared to poorly associated complexes. It was shown the destruction of phthalocyanine self-associates in the presence of insulin amyloid fibrils, which is evidence of complex formation between them. The formation of the complex between amyloid fibrils and phthalocyanine was also demonstrated by surface-enhanced Raman spectroscopy. The biggest increase in the intensity of the phthalocyanine peaks in the Raman spectrum in the presence of insulin fibrils was ten times for the molar ratio fibrils:phthalocyanine 1:3.5.

According to literature, the structural basis for the effect of the macrocyclic compound on amyloid fibril formation relies on specific π - π interactions between the aromatic ring system of molecules and aromatic residues of proteins. We have suggested that ligands of axially coordinated phthalocyanines, dependently on structure and geometry, could provide additional fixation upon the binding to the protein or prevent this binding. In the case of phthalocyanines and porphyrazines, «opened» central metal atom can contribute to the interaction of the macrocyclic compound to protein due to additional coordination bonding. The difference between Zn- and Mg-containing complexes could be explained by the ability of Zn atom of phthalocyanine to coordinate to the histidine residues of the protein. This way Mg and Zn phthalocyanines could have different preferable sites for the binding to insulin molecule and differently affect fibril formation.

Keywords: fibrillization, amyloid fibrils, phthalocyanines, porphyrazines, inhibitor, fluorescent spectroscopy, microscopy, UV-VIS absorption spectroscopy