

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

ВУС КАТЕРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА



УДК 577.352.335.152

ФЛУОРЕСЦЕНТНЕ ДЕТЕКТУВАННЯ АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛ

03.00.02 – біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук, професор
Горбенко Галина Петрівна
Харківський національний університет імені
В.Н. Каразіна
професор кафедри ядерної та медичної фізики

Офіційні опоненти: доктор фізико-математичних наук, професор
Гордієнко Ольга Іванівна, Інститут проблем
кріобіології і кріомедицини НАН України,
завідувач відділу низькотемпературного
консервування;

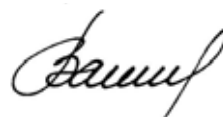
доктор фізико-математичних наук, старший
науковий співробітник **Єфімова Світлана**
Леонідівна, Інститут сцинтиляційних
матеріалів НАН України, завідувач відділу
нанокристалічних матеріалів;

Захист відбудеться «30» березня 2016 року о 15⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий «29» лютого 2016 року.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради



В.П. Берест

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Медична діагностика нейродегенеративних та «конформаційних» захворювань на доклінічних стадіях, на яких відбувається формування та відкладання амілоїдних фібрил у різних органах та тканинах організму, полягає у кількісному визначенні цих високоупорядкованих агрегатів *in vivo* або *in vitro*. Іншою проблемою, яка потребує термінового вирішення, є пошук ліків проти хвороб Альцгеймера, Паркінсона, системного амілоїдозу та ін. Механізм дії потенційних лікувальних препаратів полягає у блокуванні фібрилогенезу та зниженні токсичності пре-фібрилярних агрегатів білка, що викликають апоптоз клітин. Поряд з цим, унікальні фізичні властивості амілоїдних фібрил є підґрунтям для створення різноманітних наноматеріалів на їх основі. Зазначені вище фактори зумовили невпинне зростання в останні десятиріччя активності науковців у вивченні структурно-фізичних особливостей амілоїдних фібрил. Зокрема, було визначено роль водневих та гідрофобних зв'язків у стабілізації структури агрегатів, залежність токсичності від морфології фібрил, причини їх формування *in vivo* (генетичні мутації, оксидативний стрес, тощо) та основні дестабілізуючі фактори, що призводять до фібрилогенезу *in vitro*: екстремальні значення рН, наявність денатурантів чи солей, підвищена температура. Однак, підвищення чутливості медичної діагностики, розробка якісних лікувальних препаратів та амілоїдних наноматеріалів із заданими фізичними властивостями потребують більш глибоких досліджень характеристик патогенних агрегатів білків, зокрема, при варіюванні факторів зовнішнього середовища. Одним із основних фізичних методів, що дає можливість провести такі дослідження на молекулярному рівні, є метод флуоресцентних зондів. У контексті флуоресцентного детектування амілоїдних фібрил найбільш широко застосовуваним є представник класу бензотіазольних барвників, тіофлавін Т. Ідентифікація патогенних білкових агрегатів за допомогою тіофлавіну Т – найпопулярніший метод медичної діагностики «конформаційних» захворювань, оскільки зв'язування з фібрилами супроводжується зростанням квантового виходу барвника на 2–3 порядки. Однак, тіофлавіновий тест має суттєві недоліки, зокрема: псевдо-позитивний сигнал при зв'язуванні зонда з бактеріями та нативними білками; здатність впливати на кінетику фібрилізації та стабільність амілоїдних фібрил; залежність чутливості до фібрилярних агрегатів від типу білка, рН та іонної сили. У зв'язку з цим особливої актуальності набуває проблема тестування нових флуоресцентних зондів з покращеними спектральними властивостями, як потенційних амілоїдних маркерів та репортерів структурно-фізичних особливостей білкових агрегатів. Серед питань, що потребують вирішення, слід зазначити: 1) визначення параметрів зв'язування флуоресцентних зондів з амілоїдними фібрилами; 2) виявлення кореляції між структурними особливостями і фізичними властивостями амілоїдних фібрил та спектральною відповіддю потенційних амілоїдних маркерів та інгібіторів фібрилізації; 3) ідентифікація факторів, що модулюють взаємодії нових флуоресцентних зондів

з патогенними білковими агрегатами, 4) встановлення залежності між специфічністю барвників до амілоїдних фібрил та їх структурою.

Серед розмаїття наявних барвників особливу увагу привертають похідні бензантронну, які характеризуються високими коефіцієнтами екстинкції, значним Стоксовим зсувом, термо- та фотостабільністю. Крім того, акцепторна природа карбонільної групи бензантронів та багата електронами аміногрупа у позиції С3 зумовлюють перерозподіл заряду при збудженні зондів, а отже і чутливість до полярності і в'язкості мікрооточення. З огляду на це, похідні бензантронну були застосовані у якості репортерів при вивченні в'язкості клітинних мембран, структурних змін білків та ДНК у пацієнтів з різними патологіями. Інший клас сполук – сквараїнові зонди, які широко використовуються для дизайну сенсорів, біологічного мічення, у фотопровідних пристроях та у фотодинамічній терапії. Ці барвники характеризуються високою фотостабільністю та вузькою полосою поглинання в області «фототерапевтичного вікна», у якому глибина проникнення світла у тканини суттєво підвищується.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна у відповідності з планом науково-дослідних робіт кафедри за темами: «Дослідження механізмів формування відгуку біологічних систем та фізичних засад нових методів медичної мікро- та макродіагностики» (№ держреєстрації 0109U001322); «Роль іонів важких металів в мембранних ефектах амілоїдних білків» (№ держреєстрації 0113U005246) Державного фонду фундаментальних досліджень; «Дослідження мембрано-опосередкованих механізмів токсичності пре-амілоїдних агрегатів білків» (№ держреєстрації 0112U004611) Державного фонду фундаментальних досліджень; «Білок-ліпідні взаємодії як детермінант амілоїдогенних властивостей білків» (№ держреєстрації 0111U008000) Державного фонду фундаментальних досліджень.

Мета і задачі дослідження. Мета даної роботи полягала у встановленні фізичних механізмів взаємодії нових потенційних флуоресцентних амілоїдних маркерів бензантронного, сквараїнового та бензотіазольного класів з амілоїдними фібрилами різної морфології. Для досягнення цієї мети були поставлені та вирішені наступні задачі:

- за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії отримати ізотерми зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами ряду білків, утворених *in vitro* при варіюванні зовнішніх умов; визначити параметри зв'язування барвників з білковими агрегатами; оцінити чутливість нових флуорофорів до змін морфології амілоїдних фібрил;
- охарактеризувати спектральну поведінку нових флуоресцентних зондів за умов варіювання полярності та в'язкості їх мікрооточення, а також встановити залежність чутливості барвників до амілоїдних фібрил від рН та іонної сили розчину;
- з використанням часороздільної флуоресцентної спектроскопії визначити час життя бензантронних зондів в амілоїдних фібрилах лізоциму;

- за допомогою методу індуктивно-резонансного переносу енергії оцінити локалізацію зондів, зв'язаних з амілоїдними фібрилами;
- на основі квантово-хімічних розрахунків та кореляційного аналізу виявити фактори, що впливають на константу асоціації, квантовий вихід та інші фотофізичні властивості флуорофорів у присутності патогенних білкових агрегатів та при варіюванні фізико-хімічних характеристик середовища;
- відібрати флуорофори, котрі можуть бути використані у якості амілоїдних маркерів з покращеними спектральними властивостями, порівняно з тіофлавіном Т.

Об'єкт дослідження – модельні системи, що склались із нових флуоресцентних зондів бензантронового, скварайнового або бензотіазольного ряду, та амілоїдних фібрил лізоциму, інсуліну або аполіпропротеїну А-І (сформованих *in vitro*).

Предмет дослідження – процес взаємодії нових потенційних флуоресцентних амілоїдних маркерів з фібрилярними агрегатами білків.

Методи дослідження – флуоресцентна спектроскопія, спектрофотометрія, часороздільна флуоресцентна спектроскопія, електронна мікроскопія, спектроскопія кругового дихроїзму, квантово-хімічні розрахунки, комп'ютерне моделювання. Для обробки експериментальних даних використовували нелінійну оптимізацію та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів:

1. За допомогою методів флуоресцентної спектроскопії вперше отримано інформацію щодо взаємодії нових флуоресцентних зондів з амілоїдними фібрилами, утвореними *in vitro*. В рамках моносайтової моделі зв'язування проведено оцінку термодинамічних параметрів процесу асоціації досліджуваних флуорофорів з патогенними білковими агрегатами. Аналіз чутливості зондів до амілоїдних фібрил дозволив виявити найбільш перспективні потенційні амілоїдні маркери: G6, G7, ІАН, АВМ, АМ4, ІВН, АМ12, А4, ЗАМ39, АМ15, АМ2-23, АМ18-23. Специфічність G6, G7 та низки бензантронів до фібрил лізоциму певної морфології виявилася вищою, ніж Тіофлавіну Т. G6, G7 та АМ2, АМ3 показали найбільшу чутливість до морфології амілоїдних фібрил.
2. З використанням методу часороздільної флуоресцентної спектроскопії вперше визначено часи життя нових бензантронових флуоресцентних зондів, зв'язаних з амілоїдними фібрилами лізоциму.
3. На основі аналізу червоного зсуву максимумів флуоресценції, змін спектроскопічних характеристик флуорофорів при варіюванні в'язкості та полярності середовища, даних часороздільної флуоресцентної спектроскопії та квантово-хімічних розрахунків, продемонстровано, що нові скварайнові зонди – G6, G7, похідні тіофлавіну Т – ІСТ2, ІСТ3 – найбільш чутливі до в'язкості, а бензантронові зонди – до полярності мікрооточення.

4. За допомогою методу індуктивно-резонансного переносу енергії вперше запропоновано модель локалізації бензантронових зондів у жолобках бета-складчатого остову амілоїдних фібрил.
5. На основі квантово-хімічних розрахунків та QSAR аналізу вперше встановлено позитивну кореляцію між чутливістю до амілоїдних фібрил найкращих амілоїдних маркерів бензантронового ряду та такими молекулярними дескрипторами, як ліпофільність, ширина молекули зонда і сума зарядів на атомах азоту.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи створюють підґрунтя для більш детального розуміння молекулярних механізмів взаємодії флуоресцентних зондів різних класів з амілоїдними фібрилами білків *in vitro* та *in vivo*. Отримані значення параметрів зв'язування флуорофорів з патогенними білковими агрегатами та квантового виходу флуоресценції, поряд з даними стосовно високої чутливості зондів до фізико-хімічних параметрів оточення, дозволяють не тільки детектувати амілоїдні структури, але і диференціювати їх по морфології при використанні нових барвників у медичній діагностиці. Висновки стосовно впливу дескрипторів ліпофільності, ширини бензантронових зондів і суми зарядів на атомах азоту на чутливість цих сполук до амілоїдних фібрил можуть бути корисними при синтезі нових флуоресцентних маркерів з покращеними спектральними властивостями, або ж інших органічних молекул, здатних інгібувати формування токсичних агрегатів білка шляхом високоспецифічної асоціації з амілоїдними інтермедіатами. Нові бензантронові та сквараїнові зонди зарекомендували себе як флуорофори, фотофізичні характеристики яких є високочутливими до морфології фібрилярних агрегатів, утворених різними білками та/або певним білком при варіюванні зовнішніх умов. Результати аналізу спектральних характеристик бензантронових, сквараїнових зондів та похідних тіофлавіну Т, зв'язаних з амілоїдними фібрилами, можуть бути використані при розробці ліків проти «конформаційних» захворювань. Окрім цього, отримані результати можуть бути корисними з точки зору нанотехнологічних застосувань амілоїдів, наприклад, при створенні флуоресцентних амілоїдних наноплівочок, що випромінюють поляризоване світло.

Особистий внесок здобувача. В опублікованих зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає: у роботах [14,15,19,25] – участь в отриманні та інтерпретації експериментальних даних, обговоренні результатів, написанні статей та тез; у роботах [13,16-18] – отримання експериментальних даних, їх інтерпретація та написання статей; у роботах [12,34] – проведення експериментів, квантово-хімічних розрахунків, написання статей та тез; у роботах [20-24,26,27-33,35] – отримання та інтерпретація експериментальних даних, написання тез доповідей.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені та доповідались на: VII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, 2011; VIII-th European Biophysics Congress, Budapest, Hungary, 2011; VI міжнародній конференції

молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, 2011; 19 міжнародної школи-конференції «Математика. Комп'ютер. Образование», Пушино, Росія; VIII міжнародній науково-технічній конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії «БФФХ – 2012», Севастополь, 2012; XVI міжнародної Пущинської школи-конференції молодих учених «Биология – наука XXI века», Пушино, Росія, 2012; IV Всероссийської конференції молодих учених «Актуальные проблемы химии и биологии», Пушино, Росія, 2012; International conference «Development and application of new fluorescent materials and methods», Daugavpils, Latvia, 2012; IV Съезде биофизиков России «Физико-химические основы функционирования биополимеров», Новгород, Росія), 2012; X міжнародній міждисциплінарній науковій конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна – 2013: Науки про життя», Київ, 2013; Міжнародній науково-практичній конференції «Нанотехнології та наноматеріали (NANO-2013), Буковель, 2013; 13-th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes (MAF-13), Genoa, Italy, 2013; IV міжнародної конференції молодих учених “Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2014», Пушино, Росія, 2014; III міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології», Донецьк, 2014; Науково-технічній конференції «Люмінесцентні процеси у конденсованих середовищах», Харків, 2015; Міжнародної конференції молодих учених “Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2015», Пушино, Росія, 2015.

Публікації. Основні матеріали дисертації опубліковано у 24 наукових працях, у тому числі в 8 статтях у наукових фахових журналах та в 16 тезах доповідей на міжнародних і національних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, п'яти основних розділів, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації складає 227 сторінок (без урахування списку використаних джерел, додатків, рисунків і таблиць, що займають повну сторінку – 158 сторінок). Дисертація містить 73 рисунки, 31 таблицю. Список використаних джерел (404 найменування) займає 44 сторінки; додаток – 3 сторінки; таблиці та рисунки, що займають повну сторінку – 23 сторінки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність обраної теми, сформульовано мету та основні задачі досліджень, визначено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, а також дані про апробацію роботи та публікації автора.

Перший розділ «Взаємодія флуоресцентних зондів з амілоїдними фібрилами (огляд літератури)» є оглядовим. У цьому розділі детально описано структуру та біологічну роль фібрилярних агрегатів (патологічну та функціональну). Розглянуто кінетичні аспекти фібрилізації білка. Визначено, що завдяки унікальним фізичним властивостям агрегатів, ці структури широко

використовуються для розробки наноматеріалів. Охарактеризовано основні вимоги до ефективних флуоресцентних амілоїдних маркерів та механізми взаємодії класичних зондів, тіофлавіну Т та конго червоного, з фібрилами. Зроблено висновок, що через недоліки тіофлавіну Т, актуальним є пошук нових амілоїдних маркерів.

У другому розділі «Матеріали і методи» наведено загальну характеристику матеріалів та методів дослідження. Об'єктом дослідження слугували модельні системи, що склались з амілоїдних фібрил яєчного лізоциму, інсуліну підшлункової залози бика та варіантів N-кінцевого фрагменту 1-83 аполіпропротеїну А-I (рисунок 1), сформованих *in vitro*, та нових флуоресцентних зондів бензантронового, скварайнового та бензотіазольного класів (рисунок 2). Спектрофотометричним методом визначали концентрації зондів та білків. Спектри поглинання цих сполук вимірювали на спектрофотометрі Varian Cary100Bio (США) при кімнатній температурі.

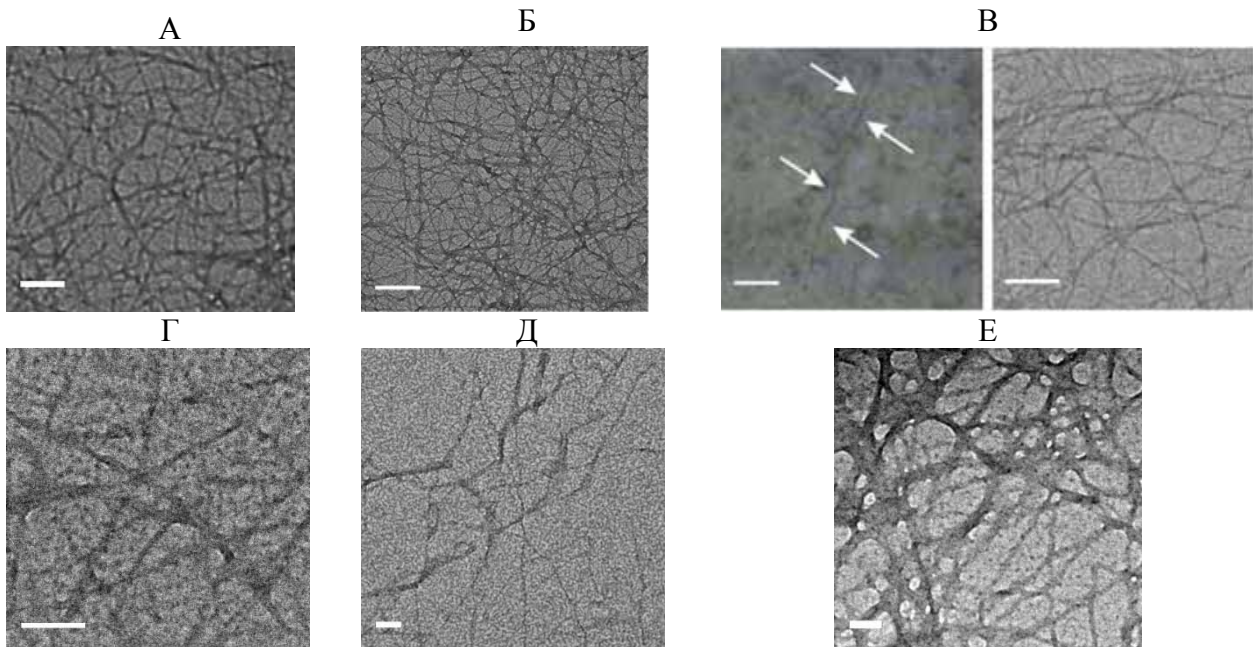


Рисунок 1. Електронні мікрофотографії фібрил лізоциму F_{acs} (82 μM) (А) та інсуліну Ins_{acs} (354 μM) (Б). Електронні мікрофотографії фібрил лізоциму F_{eth} (~130 μM) (В, ліворуч) та F_{ac} (~685 μM) (В, праворуч). Електронні мікрофотографії фібрил інсуліну Ins_{ac} (Г) та варіантів G26R/W50F_W72F (Д) та G26R (Е). Концентрація білка становила 30 μM (Д, Е). Шкала: 200 нм (А, Б, В (ліворуч)); 100 нм (В (праворуч), Г, Д); 50 нм (Е)

Варіювання морфології амілоїдних фібрил здійснювали шляхом зміни зовнішніх параметрів. Для отримання фібрил F_{acs} , F_{ac} нативний лізоцим (~15 мг/мл) розчиняли у буфері та інкубували близько 10 діб при рН 2, 60°C, наявності та відсутності шейкінгу, відповідно. Агрегати лізоциму F_{eth} (~3 мг/мл) готували 30 діб при рН 7,4, 25°C за наявності магнітної мішалки, та концентрації етанолу 80%. Фібрили інсуліну Ins_{acs} , Ins_{ac} (~6 мг/мл) утворювали при рН 2, 60°C та за наявності чи відсутності шейкінгу, відповідно. Фібрили інсуліну Ins_{acst} та аполіпропротеїну А-I інкубували при 37°C, за умов шейкінгу, при рН 2 або 7,4, відповідно. Докази на користь фібрилізації білків отримували методами електронної мікроскопії (рисунок 1), спектрів кругового дихроїзму,

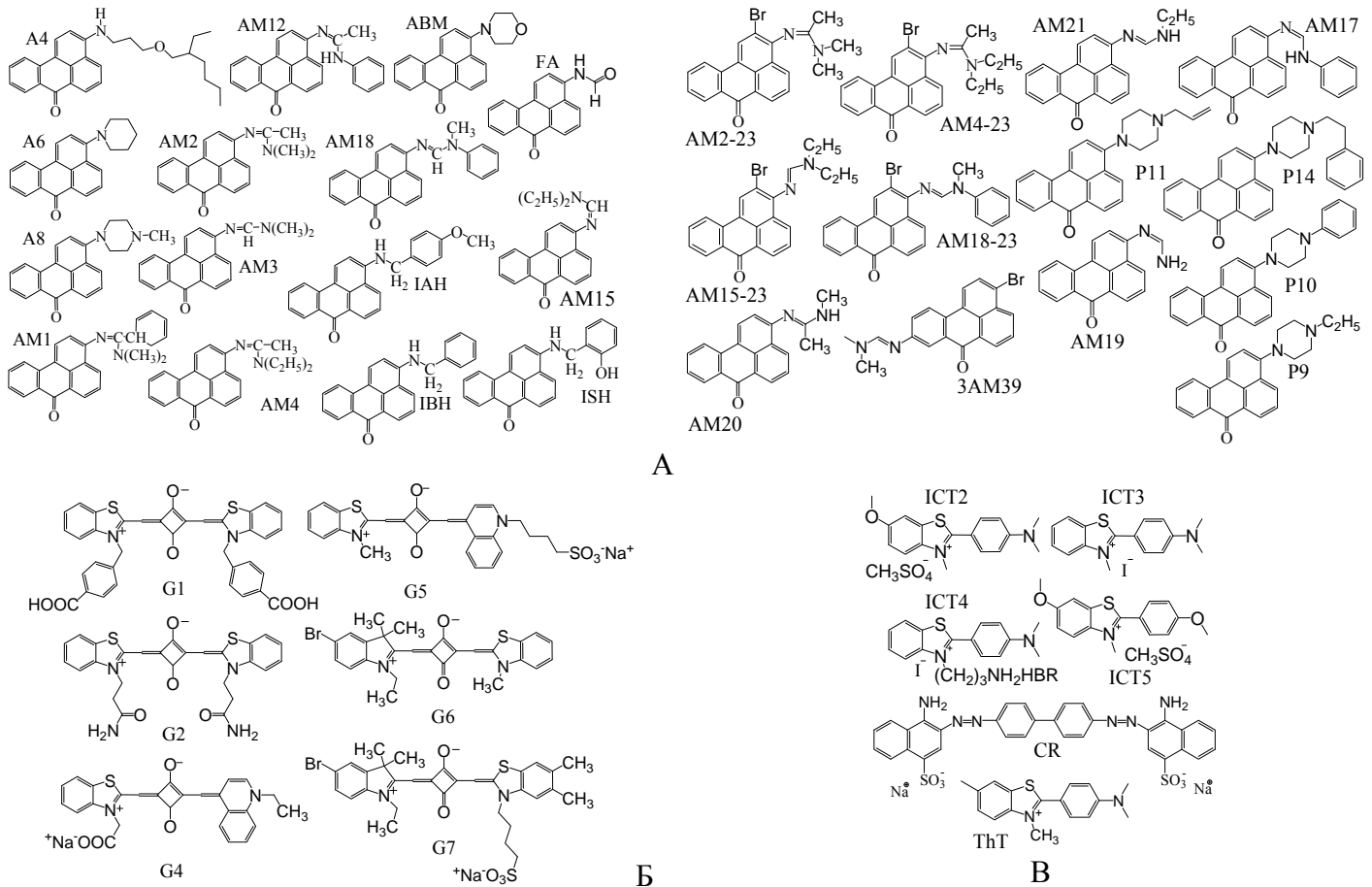


Рисунок 2. Структурні формули бензантронових (А), скварайнових (G1, G2, G4, G5, G6, G7) (Б) зондів, похідних тіофлавіну Т (ICT2, ICT3, ICT4, ICT5), тіофлавіну Т та конго червоного (В)

диференційних спектрів поглинання конго червоного, спектрів флуоресценції тіофлавіну Т. Вимірювали флуоресценцію на спектрофлуориметрах Varian Cary Eclipse (Varian Instruments, США), LS-50B (Perkin-Elmer, Велика Британія) та CM-2203 (Solar, Білорусь), при фіксованій температурі та постійному перемішуванні. Квантовий вихід флуоресценції (Q) оцінювали за формулою:

$$Q = \frac{n_D^2 Q_S (1 - 10^{-A_S}) S_D}{n_S^2 (1 - 10^{-A_D}) S_S}, \quad (2.1)$$

де Q_S – квантовий вихід стандартів в етанолі (Rh101 ($Q_S = 0.91$) або Cy5 ($Q_S = 0.28$)); S_D , S_S (A_D , A_S) – площі флуоресцентних спектрів (поглинання на довжині хвилі збудження зонда) зонда та стандарта, відповідно; n_D , n_S – показники заломлення фібрил ($\sim 1,5$) та буфера/етанола ($\sim 1,33/1,6$), відповідно.

Аналіз параметрів комплексоутворення зондів з фібрилами проводили за допомогою мономодальної моделі адсорбції Ленгмюра:

$$\Delta I = 0.5\alpha \left[Z + nP + 1/K_a - \sqrt{(Z + nP + 1/K_a)^2 - 4nPZ} \right], \quad (2.2)$$

де $\Delta I = I - I_0$ – зростання інтенсивності при титруванні білка зондом або зонда білком, Z та P – концентрації зонда та білка у кожній точці титрування, відповідно. Отримані параметри (K_a, n, α – константа асоціації, стехіометрія зв'язування та коефіцієнт, пропорційний до різниці квантових виходів зонда у зв'язаному та вільному станах, відповідно) використовували для розрахунків: змін вільної енергії Гібса (ΔG); зростання інтенсивності флуоресценції 0,5 мкМ зонда у присутності 100 мкМ фібрил відносно буфера (I/I_0) або нативного білка (I/I_n); та границі детектування ($ГД$) – концентрації білка, при якій флуоресценція 0,1 мкМ зонда зростає у 2 рази (таблиця 1). Для зондів, що мали нелінійні графіки Скетчарда, аналіз проводили за допомогою двохмодальної моделі адсорбції.

Часороздільну флуоресценцію бензантронів вимірювали за допомогою спектрофлуориметра Photon Technology International (PTI), що мав у складі лазерну систему GL-302 Dye Laser (Канада). Ефективність індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ), E та відстань r між донором та акцептором оцінювали методом гасіння флуоресценції донора:

$$E = \frac{F_{DA}}{F_D}, \quad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.3)$$

де F_{DA} та F_D – флуоресценція донора у присутності та за відсутності акцептора, відповідно, а R_0 – радіус Фьорстера.

Квантово-хімічні дескриптори зондів було розраховано у програмному пакеті MOPAC напівемпіричним методом PM6 та у програмному пакеті WinGamess з використанням базису 6-31G (d,p), а також теорії функціоналу густини (DFT або TDDFT для основного та збудженого станів, відповідно) та функціоналу B3LYP. Обробку експериментальних даних і чисельне інтегрування та моделювання здійснювали у середовищі MathCad 2001 (MathSoft Inc., США). Обробку та графічну ілюстрацію отриманих даних здійснювали у програмному пакеті OriginPro 7.5.

Третій розділ «Вивчення зв'язування нових флуоресцентних зондів з амілоїдними фібрилами» присвячений дослідженню процесу зв'язування нових зондів білковими агрегатами та визначенню фізико-хімічних параметрів оточення барвників в амілоїдних фібрилах. Зв'язування бензантронів з фібрилами лізоциму F_{acs} супроводжувалося зростанням Q та короткохвильовими зсувами максимумів флуоресценції відносно буфера на 20–100 нм ($\lambda_{em}^{Facs} - \lambda_0$), що свідчить про чутливість цих сполук до змін полярності оточення (таблиця 1). Крім того, Q зондів у нативному лізоцимі ($Q \sim 0,002 - 0,098$) був на порядок нижче, ніж у фібрилярному, а максимумами емісії сполук A6, AM1, AM4, AM12, AM15, AM18, AM2-23, AM21, P9, A8, P11, P14, IAH, ABM, AM4-23 у F_{acs} були зсунуті у довгохвильову область на

7–39 нм відносно нативного білка. Це свідчить про чутливість Q даних зондів до обмеження рухливості їх мікрооточення. Методом подвійного флуоресцентного титрування зонда білком або білка зондом отримано ізотерми зв'язування барвників з фібрилами лізоциму (рисунок 3). Аналіз розрахованих параметрів Q , I/I_0 , I/I_n та ΓD показав, що чутливість барвників до агрегатів білка спадала у наступному ряді: **тіофлавін Т (ThT) → IAH → АВМ → АМ4, ІВН → АМ12 → А4, 3АМ39 → АМ15, АМ2-23 → АМ18-23**, нільський червоний (NR) → АМ3, АМ18, Р9, Р11, ІSH → АМ1 → АМ15-23 → АМ20, А8 → АМ2 → АМ4-23 → Р14 → А6, АМ21 → Р10 → АМ19 → АМ17 → FА. Виділені зонди були найбільш ефективні при детектуванні фібрил. Оскільки Q та геометричні розміри бензантронів та ThT подібні, зроблено припущення про розташування нових зондів у жолобках уздовж головної осі фібрили.

У подальших експериментах досліджували чутливість ряду бензантронів до морфології фібрил лізоциму F_{ac} та F_{eth} . Отримано характеристики зв'язування показали, зонди АМ2, АМ3 мають найвищу чутливість квантових

Таблиця 1

Характеристики зв'язування бензантронів зондів, ThT та NR з фібрилами лізоциму F_{acs}

| Зонд | K_a , мкМ ⁻¹ | n | α , мкМ ⁻¹ | I/I_0 | I/I_n | $\lambda_{em}^{F_{acs}}$, нм | λ_0 , нм | Q | Q_n | ΔG , кДж/ моль | ΓD , мкМ |
|---------|------------------------------|------|---------------------------------|---------|---------|----------------------------------|---------------------|-------|-------|------------------------------|---------------------|
| А6 | 0,4 | 0,07 | 1247±125 | 9 | 2,3 | 612 | 620 | 0,23 | 0,07 | -31 | 1,5 |
| АМ1 | 0,5 | 0,05 | 677±68 | 13 | ∞ | 617 | 637 | 0,15 | 0,002 | -32 | 1 |
| АМ2 | 0,2 | 0,12 | 381±40 | 36 | 16,4 | 616 | 679 | 0,16 | 0,004 | -30 | 0,3 |
| АМ3 | 0,25 | 0,13 | 875±88 | 14 | 14 | 610 | 660 | 0,18 | 0 | -30 | 0,8 |
| АМ4 | 0,63 | 0,02 | 1150±116 | 44 | 17 | 624 | 706 | 0,33 | 0,009 | -33 | 0,3 |
| АМ12 | 0,62 | 0,05 | 1222±122 | 29 | 26 | 604 | 665 | 0,34 | 0,007 | -33 | 0,4 |
| АМ15 | 1 | 0,04 | 1546±155 | 41 | 21 | 615 | 665 | 0,17 | 0,009 | -34 | 0,2 |
| АМ18 | 5,6 | 0,12 | 718±72 | 23 | ∞ | 597 | 615 | 0,08 | 0,001 | -36 | 0,1 |
| АМ2-23 | 0,47 | 0,06 | 623±62 | 33 | 9 | 610 | 707 | 0,22 | 0,015 | -32 | 0,3 |
| Р9 | 0,53 | 0,07 | 936±94 | 13 | 8 | 599 | 574 | 0,34 | 0,075 | -32 | 0,8 |
| АМ18-23 | 0,20 | 0,05 | 785±79 | 22 | 22 | 562 | 644 | 0,17 | 0 | -30 | 0,7 |
| А8 | 0,08 | 0,16 | 636±63 | 8 | 10 | 598 | 573 | 0,47 | 0,024 | -28 | 2,2 |
| Р11 | 0,14 | 0,13 | 837±84 | 13 | 9 | 604 | 572 | 0,37 | 0,013 | -29 | 1,2 |
| Р14 | 1,6 | 0,04 | 794±80 | 8 | 3,5 | 605 | 603 | 0,17 | 0,043 | -35 | 1,0 |
| А4 | 0,46 | 0,06 | 978±98 | 161 | 42 | 614 | 649 | 0,04 | 0,003 | -32 | 0,07 |
| IAH | 0,2 | 0,33 | 492±50 | 135 | 132 | 602 | 628 | 0,2 | 0,061 | -30 | 0,04 |
| IBH | 0,33 | 0,43 | 386±39 | 98 | 81 | 595 | 665 | 0,1 | 0,042 | -31 | 0,03 |
| ISH | 0,96 | 0,4 | 158±16 | 49 | 37 | 600 | 667 | 0,03 | 0,034 | -34 | 0,03 |
| ThT | 0,51 | 0,02 | 7439±75 | 99 | 82 | 482 | 489 | 0,55 | 0,007 | -32 | 0,16 |
| NR | 9,8 | 0,04 | 2487±25 | 29 | - | 623 | 656 | 0,063 | - | -39 | 0,09 |
| АВМ | 0,93 | 0,06 | 1200±120 | 75 | 13 | 603 | 671 | 0,35 | 0,015 | -34 | 0,1 |
| 3АМ39 | 0,61 | 0,07 | 813±82 | 27 | 14 | 611 | 644 | 0,23 | 0,013 | -32 | 0,3 |
| АМ4-23 | 0,43 | 0,05 | 805±81 | 11 | 4 | 597 | 605 | 0,22 | 0,017 | -32 | 1,3 |
| АМ20 | 0,42 | 0,04 | 755±72 | 12 | 3,4 | 597 | 645 | 0,36 | 0,026 | -32 | 1,3 |
| АМ15-23 | 0,87 | 0,04 | 923±92 | 28 | 20 | 593 | 615 | 0,12 | 0,007 | -33 | 0,4 |

виходів до менш полярних агрегатів F_{eth} ($Q \sim 0,77$ та $0,38$, відповідно) та найнижчу – до полярних сайтів F_{ac} ($Q \sim 0,04$ та $0,1$, відповідно). Ці результати пояснили вищим ступенем кластеризації гідрофобних частин β -листів фібрил F_{eth} у порівнянні з F_{ac} .

Цікаво, що сайти з різною морфологією мали також фібрили одного типу. Зокрема, нелінійні графіки Скетчарда 9 зондів у присутності агрегатів Ins_{acs} виявили наявність двох типів сайтів зв'язування зондів з білком (таблиця 2). Однак параметри зв'язування барвників з сайтами другого типу були на порядок нижчі, ніж у сайтів першого типу, тому наявність неспецифічних сайтів не призведе до значних похибок при визначенні ступеня агрегації білка.

Аналіз комплексоутворення бензантронів з пре-фібрилярними агрегатами лізоциму, що характеризуються високою токсичністю та формуються на більш ранніх стадіях конформаційних захворювань показав, що тільки зонд АМ4

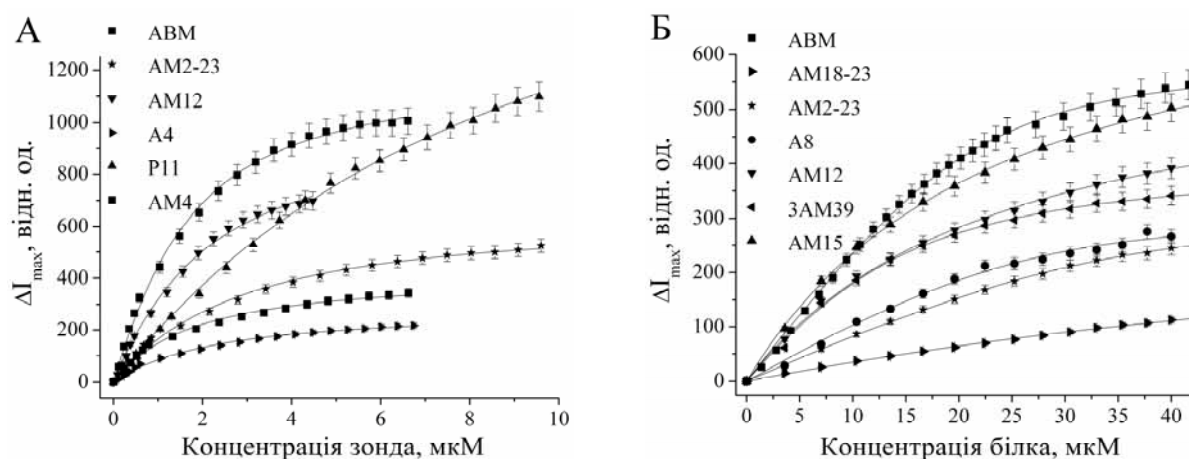


Рисунок 3. Типові ізотерми зв'язування зондів з фібрилами F_{acs} , отримані шляхом титрування білка зондом (А) та зонда білком (Б). Концентрація білка – 18 мкМ (А), зондів – 0.5 мкМ (Б)

мав більше зростання інтенсивності флуоресценції в олігомерах ($I/I_0 \sim 4,9$), ніж у фібрилах білка ($I/I_0 \sim 3,7$). Ці результати підтверджують наше припущення про локалізацію бензантронів у жолобках фібрил, оскільки олігомери не мають таких сайтів зв'язування.

Скварайнові барвники також виявилися чутливими до фібрил лізоциму. Зокрема, їх квантовий вихід у F_{ac} та F_{acs} відносно буферу зростав на порядок (таблиця 3). Крім того, специфічність скварайнів до нативного білка була дуже низькою: значення K_a були до 4 порядків нижче, а Q зондів G6, G7 – на 2–3 порядки нижче у мономерах білка, ніж у фібрилярних агрегатах. Аналіз параметрів зв'язування показав, що G6, G7 є найбільш чутливими маркерами фібрил лізоциму, порівняно з ThT, а також найбільш чутливими до фібрил найменшої полярності – F_{acs} . На порядок вищі значення K_a цвіттерійного G6 у фібрилах лізоциму та інсуліну, ніж у негативно зарядженого G7, свідчать про переважний внесок гідрофобних взаємодій у стабілізацію комплексу скварайнів з фібрилами. Однак вища специфічність обох сполук до більш жорстких фібрил

Таблиця 2

Параметри зв'язування нових зондів та ThT з фібрилами, отримані за допомогою двохсайтової моделі

| Білок | Зонд | $K_{a1}, \mu\text{M}^{-1}$ | n_1 | $\alpha_1, \mu\text{M}^{-1}$ | $K_{a2}, \mu\text{M}^{-1}$ | n_2 | $\alpha_2, \mu\text{M}^{-1}$ |
|--------------------|---------|----------------------------|-------|------------------------------|----------------------------|-------|------------------------------|
| Ins _{acs} | ABM | 0,2 | 0,02 | 3000±300 | 0,02 | 0,02 | 1000±100 |
| F _{ac} | ThT | 0,8 | 0,04 | 4500±450 | 0,02 | 0,1 | 1500±150 |
| | G2 | 4 | 0,05 | 1692±170 | 0,13 | 1 | 550±255 |
| | G4 | 4 | 0,005 | 1100±110 | 0,2 | 0,05 | 200±20 |
| F _{acs} | AM18-23 | 0,05 | 0,2 | 785±80 | 0,01 | 0,4 | 75±8 |
| | A8 | 0,06 | 0,3 | 600±60 | 0,01 | 0,9 | 100±10 |
| | IAH | 0,2 | 0,3 | 550±55 | 0,01 | 0,7 | 50±5 |
| | IBH | 0,3 | 0,4 | 420±42 | 0,04 | 0,7 | 10±2 |
| | ISH | 0,8 | 0,5 | 130±13 | 0,007 | 0,9 | 10±2 |

Таблиця 3

Характеристики зв'язування нових сквараїнових зондів та ThT з фібрилами лізоциму (F_{ac} та F_{acs})

| Зонд | $K_a, \text{мкМ}^{-1}$ | n | $\alpha, \text{мкМ}^{-1}$ | I/I_0 | I/I_n | $\lambda_0, \text{нм}$ | $\lambda_{em}^{Fac}, \text{нм}$ | Q | Q_0 | $\Delta G, \text{кДж/моль}$ | $ГД, \text{мкМ}$ |
|--------------------|------------------------|-------|---------------------------|---------|---------|------------------------|---------------------------------|-------|--------|-----------------------------|------------------|
| G1 | 2,5 | 0,015 | 457±46 | 1,7 | 0,8 | 680 | 680 | 0,11 | 0,032 | -36 | 88 |
| G2 | 2,5 | 0,009 | 1692±170 | 4,1 | 2 | 677 | 677 | 0,14 | 0,011 | -36 | 2,3 |
| G4 | 3,5 | 0,013 | 918±92 | 7,4 | 3,7 | 674 | 674 | 0,08 | 0,028 | -37 | 0,9 |
| G5 | 0,4 | 0,093 | 1020±100 | 39 | 19,5 | 542 | 542 | 0,03 | 0,0015 | -31 | 0,2 |
| G6 | 57 | 0,02 | 3700±370 | 90 | 11 | 662 | 662 | 0,13 | 0,014 | -43 | 0,07 |
| G7 | 33 | 0,028 | 3707±370 | 35 | 17,6 | 656 | 656 | 0,12 | 0,005 | -42 | 0,02 |
| ThT | 0,8 | 0,049 | 3700±370 | 30 | 15 | 484 | 484 | 0,058 | 0,0008 | -33 | 0,2 |
| G6 _{Facs} | 25 | 0,024 | 6368±640 | 133 | 25 | 667 | 667 | 0,22 | 0,032 | -41 | 0,04 |
| G7 _{Facs} | 7,6 | 0,032 | 4300±430 | 180 | 33 | 658 | 658 | 0,23 | 0,011 | -39 | 0,02 |

Ins_{ac} (квантовий вихід зондів у Ins_{ac} був у 3–6 разів вище, ніж в Ins_{acs}) також виявила чутливість G6, G7 до в'язкості оточення.

Похідні тіофлавіну Т виявилися найменш ефективними при детектуванні фібрил лізоциму та інсуліну у порівнянні з ThT, бензантронами та сквараїнами. Зокрема, їх значення I/I_0 були до 120 разів нижчі, ніж у ThT (таблиця 4).

На наступному етапі роботи для визначення фізико-хімічних параметрів оточення бензантронів використовували аналіз червоного зсуву максимумів флуоресценції (ЧЗМФ, рисунок 4А), часороздільну флуоресцентну спектроскопію та ІРПЕ. Виявилось, що значення ЧЗМФ для першої групи зондів (P10, AM4, AM15, AM3, AM18, IAH, 3AM39, AM2-23, AM12, IBH) у F_{acs} становило 0–7 нм, для другої групи (решта бензантронів) – 8–21 нм. Крім того, значення ЧЗМФ першої групи обернено корелювали з короткохвильовими зсувами максимумів флуоресценції зондів у фібрилах відносно буфера. На основі цих результатів, зробили припущення про зв'язування барвників першої групи з гідрофобною поверхнею β-листів фібрил лізоциму, а решти – з гідрофільною областю. Методом ЧЗМФ також показано, що зонди AM2, AM3,

Таблиця 4

Характеристики зв'язування похідних ThT з фібрилами інсуліну (Ins_{acst}) та лізоциму (F_{acs})

| Амілоїдні фібрили | Зонд | K_a , μM^{-1} | n | α , μM^{-1} | I/I_0 | Q | ΔG , кДж/моль | $ГД$, μM |
|-------------------|------|----------------------------|-------|-------------------------------|---------|-------|-----------------------|----------------------|
| Ins_{acst} | ThT | 1,80 | 0,005 | 6119 ± 610 | 56 | 0,65 | -35 | 0,03 |
| | ICT2 | 0,06 | 0,245 | 176 ± 18 | 3,5 | 0,14 | -28 | 7 |
| | ICT3 | 0,11 | 0,057 | 1014 ± 100 | 6 | 0,27 | -28 | 4,2 |
| F_{acs} | ThT | 0,5 | 0,02 | 7439 ± 745 | 99 | 0,5 | -32 | 0,16 |
| | ICT2 | 0,8 | 0,26 | 39 ± 4 | 2,2 | 0,003 | -33 | 8,2 |
| | ICT3 | 3,1 | 0,02 | 208 ± 21 | 4 | 0,02 | -36 | 3,2 |

AM12, AM15, AM18 формують комплекси з гідрофобною частиною β -листів фібрил F_{eth} . Однак усі бензантрони зв'язувалися з гідрофільною областю β -листів фібрил F_{acs} , що свідчить про вищий ступінь їх латерального пакування. Апроксимація профілів затухання флуоресценції бензантронів в F_{acs} (рис 4Б) виявила пряму кореляцію між значенням середнього часу життя зондів ($\langle \tau \rangle \sim 2,6\text{--}6,1$ нс) та ЧЗМФ, що свідчить про чутливість спектральних параметрів флуорофорів до мікров'язкості оточення. Методом ІРПЕ визначили ефективність переносу енергії, мінімальні та максимальні значення відстаней (R_{min} та R_{max} , відповідно) між ThT та бензантронами (таблиця 5). Аналіз отриманих даних з урахуванням геометричних розмірів зондів та жолобків фібрил (ширина $\sim 8\text{--}11$ Å, товщина ~ 7 Å), дозволив запропонувати, що: А6, ІАН, ІВН зв'язуються з жолобком фібрил лізоциму F_{acs} : W63_N65; АВМ, А8, ІSH – з жолобком R61_W63. Ці результати узгоджуються з аналізом короткохвильових зсувів максимумів та ЧЗМФ, і свідчать про меншу полярність оточення першої трійки барвників. Також АВМ, А8, ІSH, імовірно, зв'язуються з сайтами G8_N10_V12 фібрил інсуліну Ins_{ac} ; А6, ІАН, ІВН – з жолобком Q4_L6. Методом ІРПЕ показано, що ІАН, ІВН, ІSH можуть

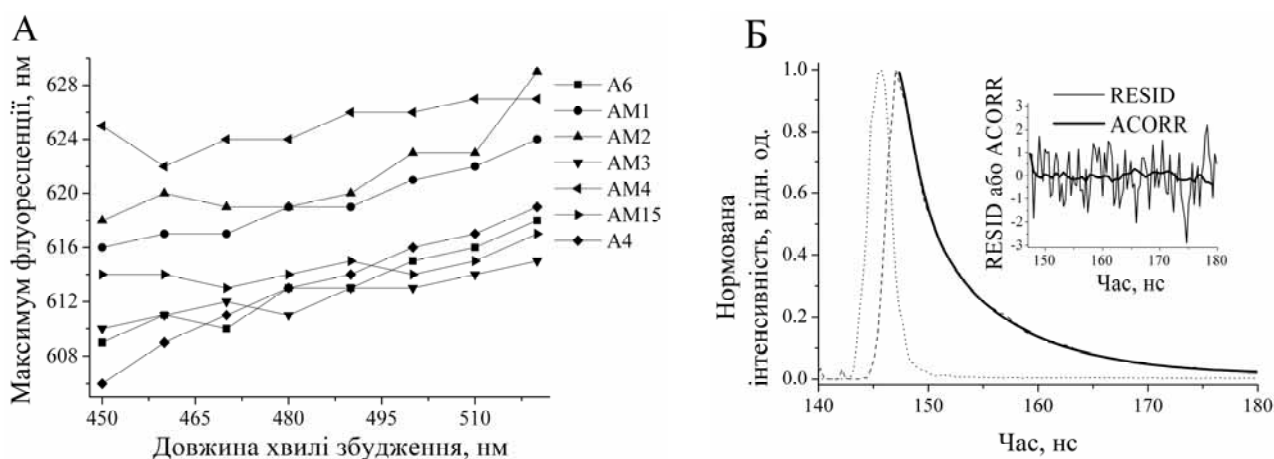


Рисунок 4. Типові залежності максимуму флуоресценції зондів від довжини хвилі збудження у присутності фібрил F_{acs} (А) та спектри часороздільної флуоресценції А6 у F_{acs} (Б). Профілі затухання було апроксимовано двооекспоненційною функцією (суцільна лінія). У вставці – зважені залишки та функція автокореляції залишків. Концентрація зонда, білка: 0,65, 30 μM , відповідно (Б)

Таблиця 5

Кількісні параметри індуктивно-резонансного переносу енергії між тіофлавіном Т та бензантроновими зондами, зв'язаними з фібрилами лізоциму (F_{acs}) та інсуліну (Ins_{acs})

| Зонд | $E, \%$ | $R_{min}, \text{нМ}$ | $R_{max}, \text{нМ}$ |
|------|---------|----------------------|----------------------|
| A6 | 11 (30) | 3,5 (3,1) | 6,2 (5,3) |
| ABM | 65 (78) | 2,3 (2,1) | 3,9 (3,6) |
| A8 | 26 (62) | 2,6 (2,1) | 4,5 (3,7) |
| IAH | 42 (58) | 2,7 (2,7) | 4,7 (4,6) |
| IBH | 35 (69) | 3 (2,5) | 5,1 (4,2) |
| ISH | 68 (79) | 2,5 (2,3) | 4,3 (4,1) |

досліджено залежність чутливості флуоресцентних сполук до амілоїдних фібрил при варіюванні зовнішніх умов комплексоутворення – рН (при значеннях іонної сили $I \sim 5-10$ мМ) та іонної сили. Встановлено, що бензантропи мають на порядок нижчі значення Q у дихлорметані, ніж у гліцерині (рисунок 5А). Для ThT, його похідних та сквараїнів G6, G7 спостерігали обернений ефект, причому значення Q G6, G7 були значно вищі, ніж у ThT. Такі результати свідчать про високу чутливість Q бензантронів до полярності, а сквараїнів – до в'язкості оточення, і пояснюють вищі значення Q G6, G7 у фібрилах лізоциму, ніж у ThT. Додатковим підтвердженням гідрофобної природи взаємодій між бензантронами та фібрилами стали низькі значення Q зондів в агрегатах F_{acs} при рН 2 (рисунок 5Б). З іншого боку, зниження Q барвників у F_{acs} та довгохвильові зсуви в області рН 9–11 відносно рН 7,4 можуть свідчити про латеральну агрегацію фібрил. Сквараїновий зонд G6 мав вищі значення Q у F_{acs} (рН 2) та Ins_{acs} (рН 11,4), ніж при рН 7,4, але Q знижувався при високих значеннях іонної сили ($I=0,15-2,4$ М). Це свідчить про

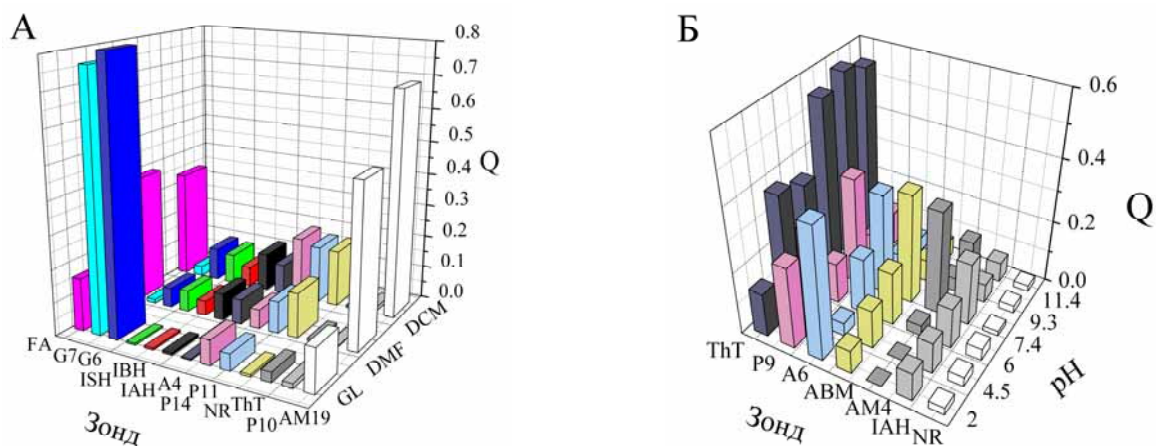


Рисунок 5. Значення квантового виходу зондів у гліцерині (GL), дихлорметані (DCM) та диметилформаміді (DMF) (А) та у присутності F_{acs} при варіюванні рН середовища (Б)

розташовуватися у жолобку L22_D24 агрегатів G26R/W50F_W72F, а сайтом зв'язування похідних ThT з фібрилами F_{acs} є к T51_Y53, з Ins_{acs} – Y16_V18. Таким чином, можна стверджувати, що ThT та його похідні локалізуються в однакових жолобках фібрил.

У четвертому розділі «Детектування амілоїдних фібрил за допомогою нових зондів при варіюванні умов зовнішнього середовища» проведено вивчення спектральних параметрів нових зондів у різних розчинниках, а також

підвищення ролі електростатичних взаємодій у стабілізації комплексу зондів з фібрилами у випадку специфічних взаємодій з розчинником. З огляду на отримані дані зроблено висновок, що краща область детектування фібрил за допомогою бензантронів та сквараїнів відповідає значенням рН 7,4 та іонної сили не більше 0,15 М.

У п'ятому розділі «Квантово-хімічні розрахунки бензантронів, сквараїнових зондів та похідних тіофлавіну Т» для визначення детермінантів амілоїдної специфічності нових зондів проводили квантово-хімічні розрахунки та кореляційний аналіз. Встановлено кореляцію між експериментальним параметром I/I_0 бензантронів у фібрилах F_{acs} та розрахованими квантово-хімічними дескрипторами просторової, електронної структури та міжмолекулярними дескрипторами. Зокрема, для групи бензантронів з високою чутливістю до амілоїдних фібрил методом полілінійного регресійного аналізу отримано стабільну та статистично значущу теоретичну модель для I/I_0 , з високою передбачувальною здатністю. Згідно з цією моделлю, потенційними амілоїдними маркерами є такі бензантрони, що мають високі значення дескриптора ліпофільності, більшу ширину та вище значення суми зарядів на атомах азоту.

Аналіз залежності квантово-хімічних дескрипторів від торсійного кута між бензотіазольним та фенольним кільцями похідних тіофлавіну Т показав високу вірогідність утворення закрученого стану внутрішньмолекулярного переносу заряду (ТІСТ) при збудженні зондів. Стабільність стану ТІСТ ThT була вища, ніж у його похідних ІСТ2, ІСТ3, а зонди ІСТ4, ІСТ5 мали вищу стабільність локально збуджених станів, ніж класичний амілоїдний маркер. Отримані результати зумовлюють низьку чутливість похідних ThT до амілоїдних фібрил.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі зроблено внесок у вирішення однієї з важливих проблем сучасної молекулярної біофізики – встановлення молекулярних механізмів взаємодії флуоресцентних зондів різних класів з амілоїдними фібрилами. З використанням різних модифікацій методу флуоресцентної спектроскопії проведено комплексне дослідження взаємодії нових зондів з амілоїдними фібрилами, утвореними *in vitro*. Отримані дані дають основу для розуміння механізмів дії потенційних лікувальних засобів проти «конформаційних» захворювань.

1. За допомогою методу флуоресцентної спектроскопії вперше отримано інформацію щодо взаємодії нових бензантронів, сквараїнових зондів та похідних тіофлавіну Т з фібрилами лізоциму та інсуліну. В рамках мономодальної моделі зв'язування проведено оцінку термодинамічних параметрів процесу асоціації цих флуорофорів з білковими агрегатами.
2. Продемонстровано залежність чутливості нових флуоресцентних сполук до амілоїдних фібрил від типу білка, зовнішніх умов формування білкових агрегатів, та від фізико-хімічних параметрів оточення.

3. Встановлено, що серед 39 флуорофорів, які були протестовані в даній роботі, найбільш перспективними амілоїдними маркерами є сквараїни G6, G7, та бензантрони ІАН, АВМ, АМ4, ІВН, АМ12, А4, ЗАМ39, АМ15, АМ2-23, АМ18-23. Також G6, G7 виявляють вищу специфічність до амілоїдних фібрил лізоциму, ніж тіофлавін Т. Експериментально доведено, що чутливість сквараїнів G6, G7 до в'язкості, а бензантронів до полярності мікрооточення зумовлює їх здатність до детектування змін цих параметрів амілоїдних фібрил.
4. Аналіз зв'язування бензантронів та цвіттеріонного сквараїну G6 з фібрилами лізоциму та інсуліну при варіюванні рН та іонної сили середовища дозволив визначити, що оптимальними умовами детектування білкових агрегатів є значення рН 7,4 та іонної сили менше 0,15 М. При цьому нові зонди були здатні детектувати зміни морфології фібрил, викликані локальними змінами рН та іонної сили.
5. Аналіз графіків Скетчарда виявив для більшості нових зондів наявність лише одного типу сайтів зв'язування – жолобків вздовж головної осі амілоїдної фібрили, хоча 9 барвників мали ще й неспецифічні сайти. Руйнування жолобків лікувальними засобами може призвести до зниження квантового виходу флуорофорів.
6. При вивченні індуктивно-резонансного переносу енергії між тіофлавіном Т та досліджуваними флуорофорами зроблено припущення про локалізацію бензантронів зондів у збагачених ароматичними амінокислотами жолобках фібрил інсуліну, лізоциму та фрагменту 1-83 аполіпопротеїну А-І.
7. На основі квантово-хімічних розрахунків та QSAR аналізу виявлено позитивну кореляцію між чутливістю до амілоїдних фібрил найкращих амілоїдних маркерів бензантронів ряду та такими дескрипторами, як ліпофільність, ширина молекули зонда та сума зарядів на атомах азоту. Внесок дескрипторів ліпофільності та ширини молекули узгоджується з експериментальними даними про те, що висока специфічність зондів до фібрил зумовлена їх чутливістю до полярності оточення та стеричними ефектами.
8. Аналіз залежностей квантово-хімічних дескрипторів похідних тіофлавіну Т від торсійного кута між донорними та акцепторними частинами молекул покатиофлавінзав, що менша чутливість цих зондів до фібрил, ніж у тіофлавіну Т, та високі значення квантових виходів флуорофорів у буфері, зумовлені стабільністю локально збуджених станів сполук ІСТ4, ІСТ5, або меншою стабільністю станів закрученого внутрішньомолекулярного переносу заряду ІСТ2, ІСТ3, у порівнянні з тіофлавіном Т.

Перелік опублікованих праць за темою дисертації.

1. Vus K. Thioflavin T derivatives for the characterization of insulin and lysozyme amyloid fibrils in vitro: Fluorescence and quantum-chemical studies

- / **K. Vus**, V. Trusova, G. Gorbenko, R. Sood, P. Kinnunen // *Journal of Luminescence*. – 2015. – Vol. 159. – P. 284–293.
2. Vus K. Association of novel benzanthrone dyes with amyloid fibrils: A resonance energy transfer study / **K. Vus**, V. Trusova, G. Gorbenko, P. Kinnunen, E. Kirilova, G. Kirilov, E. Adachi, H. Saito // *Вісник Львівського Університету*. – 2014. – 68. – Т. 189 – С. 194.
 3. Vus K.O. Novel squarylium dyes for detection of amyloid insulin and lysozyme in vitro / **K.O. Vus**, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, R. Sood, P. Kinnunen // *Біофізичний Вісник*. – 2014. – Т. 32, № 2. – С. 61 – 68.
 4. Vus K. Fluorescence investigation of interactions between novel benzanthrone dyes and lysozyme amyloid fibrils / **K. Vus**, V. Trusova, G. Gorbenko, R. Sood, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina, P. Kinnunen // *Journal of Fluorescence*. – 2014. – Vol. 24. – P. 493–504.
 5. Vus K.O. The role of metal ions in the fibrillization of lysozyme and insulin in vitro / **K.O. Vus**, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E.I. Slobozhanina, L.M. Lukyanenko, R. Sood, P. Kinnunen // *Біофізичний Вісник*. – 2013. – Т. 30, №2. – С. 28 – 34.
 6. Vus K. Novel aminobenzanthrone dyes for amyloid fibril detection / **K. Vus**, V. Trusova, G. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina, P. Kinnunen // *Chemical Physics Letters*. – 2012. – Vol. 532. – P. 110 – 115.
 7. Vus K.O. Interaction of novel benzanthrone derivative with amyloid lysozyme / **K.O. Vus**, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, O.A. Zhytniakivska, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // *Біофізичний Вісник*. – 2011. – Т. 26, №1. – С. 73 – 82.
 8. Vus K.O. Quantitative analysis of the benzanthrone aminoderivative binding to amyloid fibrils of lysozyme / **K.O. Vus**, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // *Біофізичний Вісник*. – 2010. – Т. 25, №2. – С. 80 – 87.
 9. Vus K.O. Affinity of new benzanthrone dyes for fibrillar and prefibrillar lysozyme / **K.O. Vus**, V.M. Trusova, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // *Матеріали VII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, Львів, Україна. – 5-8 квітня 2011. – Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2011. – С. 18 – 19.
 10. Vus K.O. Development of new fluorescent probes for amyloid detection / **K.O. Vus**, V.M. Trusova, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // *Proc. VIII European Biophysics Congress, Budapest, Hungary*. – August 23-27, 2011. – *European Biophysical Journal*. – Vol. 40. – Suppl. 1. – S64.
 11. Vus K.O. Characterization of the aminobenzanthrones' specificity to prefibrillar lysozyme / **K.O. Vus**, V.M. Trusova, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // *Abstr. of the VI International young scientists' conference «Biology: from a molecule up to the biosphere»*, Kharkiv, Ukraine. – November 22-25 2011. – Kharkiv: V.N. Karazin Kharkiv National University, 2011. – P. 39 – 40.

12. Vus K.O. Spectral properties of benzanthrone dyes in solvents with different viscosity / **К.О. Vus**, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Тезисы 19 международной школы-конференции «Математика. Компьютер. Образование», Дубна, Россия. – 30 января-4 февраля 2012. – Москва: Изд. R&C Dynamics, 2012. – С. 12.
13. Vus K.O. Novel benzanthrone dyes for studying amyloid morphology / **К.О. Vus**, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Матеріали VIII міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії БФФХ – 2012», Севастополь, Україна. – 23-27 квітня 2012. – Севастополь: Севастопольський національний технічний університет, 2012. – С. 121 – 122.
14. Vus K.O. Fluorimetric detection of lysozyme amyloid fibrils and their membrane interactions / **К.О. Vus**, A.P. Kastorna, E.M. Kirilova, G.K. Kirilov, I. Kalnina // Материалы IV съезда биофизиков России, Нижний Новгород, Россия. – 20-27 августа 2012. – Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, 2012. – С. 336.
15. Вус Е.А. Оценка амилоид-специфичности новых бензантроновых зондов / **Е.А. Вус**, В.М. Трусова, Г.П. Горбенко, Е. Кирилова, Г. Кирилов, И. Калниня // Сборник тезисов XVI международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, Россия. – 16-21 апреля 2012. – С. 99 – 100.
16. Вус Е.А. Влияние ионной силы на связывание аминокбензантроновых зондов с фибриллами лизоцима / **Е.А. Вус**, В.М. Трусова, Г.П. Горбенко, Е. Кирилова, Г. Кирилов, И. Калниня // Сборник тезисов IV всероссийской конференции «Актуальные проблемы химии и биологии», Пушкино, Россия. – 30 июля-3 августа 2012. – С.16.
17. Vus K.O. Aminobenzanthrone dyes as prospective fluorophores for detection and characterization of amyloid fibrils / **К.О. Vus**, V. Trusova, G. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Abstr. of international conference «Development and application of new fluorescent materials and methods», Daugavpils, Latvia. – September 12 2012. – P. 33.
18. Vus K.O. Association of novel aminobenzanthrone dyes with fibrillar variants of apolipoprotein A-I probed by resonance energy transfer / **К.О. Vus**, M.S. Girysh, E. Adachi, C. Mizuguchi, H. Saito, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov // Abstract book of X International Interdisciplinary Scientific Conference of Students and Young Scientists «Shevchenkivska Vesna – 2013: Life Sciences», Kyiv, Ukraine. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 2013. – March 18-22 2013. – P. 12.
19. Vus K.O. Varying the environmental conditions is important for the formation of amyloid nanomaterials with designed properties / **К.О. Vus**, M.V. Romanova, I.L. Maliyov, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, R. Sood, P. Kinnunen, E.M. Kirilova, G.K. Kirilov // Materials of International research

- and practice conference «Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2013)», Bukovel, Ukraine. – August 25 – September 1 2013. – P. 326.
20. Vus K. Probing amyloid fibrils of lysozyme with novel benzantrone dyes / **K. Vus**, V. Trusova, G. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Abstr. of 13-th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes (MAF-13), Genoa, Italy. – September 8-11 2013. – P. 251.
 21. Vus K.O. Effect of metal ions on the kinetics of lysozyme amyloid formation / **K.O. Vus**, O.K. Kutsenko, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, P. Kinnunen // Materials of III-rd International conference of young scientists «Fundamental and applied research in biology», Donetsk, Ukraine. – February 24-27 2014. – Donetsk National University, 2014. – P. 300 – 301.
 22. Vus K.O. Effect of oxidized and anionic phospholipids on the kinetics of insulin fibrillization / **Vus K.O.**, Trusova V.M., Gorbenko G.P., Kinnunen P.K.J // Сборник тезисов IV международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2014», Пушкино, Россия. – 27-29 октября 2014. – С. 99 – 100.
 23. Vus K. Sensitivity of novel Thioflavin T derivatives to amyloid fibrils: Fluorescence and quantum-chemical studies / **K. Vus**, V. Trusova, G. Gorbenko, Rohit Sood, P. Kinnunen // Book of abstracts of 4-th International Scientific and Technical Conference for Young Scientists «Luminescent Processes in Condensed State of Matter – LUMCOS – 2015», Kharkiv, Ukraine. – October 7-9 2015. – Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, 2015. – P. 49 – 50.
 24. Vus K.O. QSAR analysis of novel benzantrone dyes for amyloid detection / **K.O. Vus**, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, P. Kinnunen // Сборник тезисов международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2015», Пушкино, Россия. – 2-3 ноября 2015. – С. 66 – 67.

АНОТАЦІЯ

Вус К.О. Флуоресцентне детектування амілоїдних фібрил. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2016.

За допомогою методу флуоресцентної спектроскопії та мономодальної моделі зв'язування проведена оцінка термодинамічних параметрів процесу асоціації нових флуорофорів бензантронового, скварайнового та бензотіазольного класів з амілоїдними фібрилами, що дозволило виявити найбільш перспективні амілоїдні маркери. За допомогою індуктивно-резонансного переносу енергії встановили, що локалізація бензантронів у жолобках фібрил, що містять ароматичні амінокислоти, є найбільш вірогідною. Отримано позитивну кореляцію між чутливістю до амілоїдних фібрил лізоциму

найкращих амілоїдних маркерів бензантронового ряду та квантово-хімічними дескрипторами ліпофільності, ширини молекули зонда та суми зарядів на атомах азоту.

Ключові слова: амілоїдні фібрили, бензантроны, сквараїни, тіофлавін Т, мономодальна модель адсорбції, квантовий вихід флуоресценції, полярність, квантово-хімічні дескриптори.

АННОТАЦІЯ

Вус Е.А. Флуоресцентное детектирование амилоидных фибрилл. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, 2016.

Методом флуоресцентной спектроскопии и мономодальной модели связывания проведена оценка термодинамических параметров процесса ассоциации новых флуорофоров бензантронового, сквараинового и бензотиазольного классов с амилоидными фибриллами, что позволило выявить наиболее перспективные амилоидные маркеры. При помощи индуктивно-резонансного переноса энергии показано, что связывание бензантронов с желобками фибрилл, содержащих ароматические аминокислоты, является наиболее вероятным. Обнаружена положительная корреляция между чувствительностью к амилоидным фибриллам лизоцима лучших амилоидных маркеров бензантронового ряда и квантово-химическими дескрипторами липофільності, ширини молекули зонда і сумми зарядов на атомах азота.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, бензантроны, сквараины, тиофлавин Т, мономодальная модель адсорбции, квантовый выход флуоресценции, полярность, квантово-химические дескрипторы.

SUMMARY

Vus K.O. Fluorescent detection of amyloid fibrils. – A manuscript.

Thesis for scientific degree of candidate of sciences in physics and mathematics by speciality 03.00.02 – biophysics. – V.N. Karazin Kharkiv national university, Kharkiv, 2016.

During the past decades tremendous research efforts have been directed towards identification of a molecular basis for the development of conformational disorders, including Alzheimer's and Parkinson's diseases, type 2 diabetes, systemic amyloidosis, etc., associated with protein misfolding and subsequent accumulation of the amyloid fibrils in different tissues. Amyloid fibrils share a core cross- β -sheet structure, in which β -strands (polypeptide chains) associated via intermolecular hydrogen bonds run perpendicularly to the long axis of the fibril. Furthermore, the outstanding physical properties of these aggregates, i.e. plasticity, the values of the tensile strength similar to that of steel, and the ability of amyloid self-organization on the molecular level are the prerequisites of their use in material science. One widespread criterion for identification of amyloid assemblies is based on the

measurement of significantly enhanced fluorescence of a benzothiazole dye Thioflavin T (ThT) that specifically targets highly ordered fibrillar protein aggregates. However, ThT suffers from the following drawbacks: i) rather high affinity for native proteins, amorphous protein aggregation and bacteria; ii) ability to perturb fibril structure; iii) dependence of amyloid sensitivity on the amino acid sequence, pH and ionic strength of bulk solution. These pitfalls suggest the necessity of designing of novel fluorescent markers.

To this end, the present study was focused on the establishment of the physical mechanisms of interaction between the novel benzanthrone, squaraine and benzothiazole dyes and amyloid fibrils of varying morphology. Fluorescent spectroscopy and the one-site Langmuir adsorption model were employed to estimate thermodynamic parameters of the association of 39 dyes with lysozyme and insulin fibrils, prepared *in vitro*. Quantum yields of the fibril-incorporated probes appeared to be ~1–2 orders of magnitude higher than those in buffer, and emission maxima shifts (blue or red for benzanthrone and squaraines, respectively) were observed for the fibril-bound fluorophores. Furthermore, new compounds possessed very low affinity to native protein. When comparing the above parameters, we concluded that squaraines G6, G7, and benzanthrone IAH, ABM, AM4, IBH, AM12, A4, 3AM39, AM15, AM2-23, AM18-23 are the most promising amyloid markers.

Analysis of the spectral parameters of the fibril-bound probes at varying pH, solvent type and the protein sequence showed that the sensitivity of benzanthrone and squaraines to the microenvironmental polarity and viscosity, respectively, underlie their ability to identify the effects of solvents on fibril morphology. Notably, dyes AM2, AM3 had the highest sensitivity of quantum yields to the distinctions in the hydrophobic clustering of fibrillar lysozyme β -sheets. Furthermore, G6 and G7 showed greater specificity to amyloid lysozyme than ThT. Linear Scatchard plots were observed for the binding of the majority of the probes to amyloid fibrils, although the 2 types of binding sites were found for 9 dyes. However, sites of the second type appeared to be non-specific. Analysis of the dye-amyloid binding parameters at varying pH and ionic strength showed that optimal detection of fibrils by the novel dyes could be performed at pH 7.4 and the ionic strength value less than 0.15 M. Förster resonance energy transfer studies between ThT and benzanthrone indicated that novel fluorophores are incorporated into the aromatic fibril grooves.

A positive correlation was obtained between the sensitivity of the most promising benzanthrone to amyloid lysozyme and quantum-chemical descriptors of lipophilicity, dye width and the sum of nitrogen charges. Finally, quantum-chemical study of torsional relaxation of benzothiazole and phenol moieties revealed that the probability of the non-fluorescent twisted internal charge transfer state formation of ThT derivatives is lower than that of ThT. This explains why the novel dyes had up to *ca.* 4000 times order higher fluorescence quantum yields in buffer solution and low amyloid sensitivity as compared to ThT.

Key words: amyloid fibrils, benzanthrone, squaraine, Thioflavin T, the one-site Langmuir adsorption model, fluorescence quantum yield, polarity, quantum-chemical descriptors.