

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова
Российской академии наук
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

На правах рукописи

Сорокина Светлана Анатольевна

**ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТИОННЫХ
ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ С АМИЛОИДОГЕННЫМ БЕЛКОМ**

02.00.06 – Высокмолекулярные соединения

03.01.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Лаборатории макромолекулярной химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН), а также в отделе биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (НИИ ФХБ МГУ).

Научные руководители:	доктор химических наук, доцент, заведующая лабораторией макромолекулярной химии ИНЭОС РАН Шифрина Зинаида Борисовна доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биохимии животной клетки НИИ ФХБ МГУ Муронец Владимир Израилевич
Официальные оппоненты:	Штильман Михаил Исаакович доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», заведующий кафедрой биоматериалов;
	Левицкий Дмитрий Иванович доктор биологических наук, профессор Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Институт биохимии им. А.Н. Баха), заведующий лабораторией структурной биохимии белка
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится « » 2019 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 002.250.02 по присуждению ученой степени кандидата химических наук при ИНЭОС РАН по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, В-334, ул. Вавилова, 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЭОС РАН.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 002.250.02

кандидат химических наук

Беломоина Н.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Дендримеры - сверхразветвленные монодисперсные макромолекулы со строго определенной, регулярной структурой. Возможности их биологического применения обусловлены особенностями строения этих молекул, а именно, точно регулируемые нанометровыми размерами, большим числом функциональных групп на поверхности и возможностью их модификации, наличием полостей, способностью формировать комплексы «гость-хозяин», а также монодисперсностью макромолекул, достигаемой за счет поэтапного синтеза. Благодаря этому, строение и свойства таких молекул могут направленно изменяться в зависимости от поставленной задачи.

Одним из направлений исследования биологических свойств новых макромолекулярных объектов является изучение принципов их взаимодействия с белками. Белки выполняют важнейшие функции в организме, включая ферментативную, транспортную, строительную, регуляторную и пр. Однако, структурная конверсия белков и связанное с ней формирование амилоидных фибрилл ведут к развитию ряда нейродегенеративных заболеваний, которые в настоящий момент не имеют эффективных способов лечения.

В связи с этим усилия многих исследователей направлены на поиск путей ингибирования амилоидной агрегации белков, а также уменьшение цитотоксического эффекта амилоидов и небольших агрегатов, образующихся на пути к их формированию.

Определенные успехи в этом направлении были достигнуты с использованием низкомолекулярных химических соединений, таких как, производные фенола и коричной кислоты (Blazquez-Sanchez M.T., 2017; Zanyatkin I., 2017), а также некоторых полимеров, например, полистиролсульфоната (Ojha B., 2013; Sofronova A., 2017). Однако, использование низкомолекулярных соединений не всегда достаточно эффективно, ввиду непрочного связывания с белком, а полидисперсность синтетических полимеров затрудняет исследование образующихся белок-полимерных комплексов из-за их неоднородности и не позволяет получать однозначные и воспроизводимые результаты.

По этим причинам в качестве основного объекта исследований нами были выбраны катионные пиридилфениленовые дендримеры. Наличие в молекуле четвертичного азота обеспечивает независимость заряда от pH и других условий среды, например, ионной силы, а ограниченное вращение вокруг углерод-углеродных связей, соединяющих фениленовые кольца, обуславливает жесткость молекулы в целом. Эти свойства определяют стабильность процессов взаимодействия дендримеров с биологическими объектами, в том числе белками, при любых характеристиках среды. В качестве белковой составляющей был выбран полноцепочечный рекомбинантный овечий прионный белок. Среди различных амилоидогенных белков прионы

занимают особое место, благодаря уникальному механизму передачи и распространения заболевания, в котором единственной инфекционной частицей является сам белок – прион.

Целью работы является изучение взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров (КПФД) с прионным белком, установление физико-химических свойств образующихся комплексов, а также возможности использования дендримеров как перспективных агентов, способных ингибировать амилоидную агрегацию белков.

Достижение поставленной цели потребовало решения следующих **задач**:

- синтез и характеристика КПФД трех генераций;
- исследование взаимодействия дендримеров с нативным белком; выявление движущей силы и механизма взаимодействия, потенциальных сайтов связывания, изучение влияния строения дендримера на комплексообразование с белком;
- изучение способности дендримеров препятствовать белковой агрегации, а также предотвращать структурную конверсию приона на пути к образованию наиболее токсичных амилоидных форм – олигомеров белка;
- выявление возможности разрушения белковых агрегатов амилоидной природы с помощью катионных пиридилфениленовых дендримеров;
- изучение цитотоксичности дендримеров.

Научная новизна работы. В работе впервые проведено комплексное изучение взаимодействия КПФД с амилоидогенным прионным белком. Установлен механизм образования стабильных комплексов. Экспериментально доказана принципиальная возможность использования пиридилфениленовых дендримеров как для предотвращения белковой агрегации, так и для разрушения уже сформировавшихся агрегатов. Показано, что токсичность дендримеров ниже наиболее часто используемых поли(амидоаминных) и поли(этилениминовых) дендримеров.

Практическая ценность работы заключается в возможности использования полученных фундаментальных закономерностей комплексообразования КПФД с амилоидогенным белком для дальнейшего исследования и разработки новых лекарственных средств.

Личный вклад автора состоит в участии в постановке задач исследования, разработке подходов к их решению, непосредственном выполнении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов, формулировании выводов и подготовке публикаций. Исследования, описанные в диссертации, выполнены автором лично или совместно с сотрудниками НИИ ФХБ МГУ.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных и Всероссийских конференциях и симпозиумах: Шестой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2014» (Москва, 2014); Международной химической

конференции для молодых ученых «ChemCYS 2014» (Бланкенберг, Бельгия, 2014); Четвертом международном симпозиуме, посвященном биологическому применению дендримеров «Biodendrimer 2014» (Лугано, Швейцария, 2014), конференции «Химия Элементоорганических Соединений и Полимеров 2014» (Москва, 2014), Пятой Всероссийской с международным участием конференции и школе для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокompозиты» (Московская область, 2015), 11-й Международной конференции «Биокатализ-2017» (Москва, 2017), Международной конференции «Modern trends in dendrimer chemistry and applications» (Москва, 2017), Конгрессе «FEBS 2018» (Прага, Чехия, 2018).

Публикации. Основное содержание работы опубликовано в 12 научных работах, в том числе 4 статьях в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах, рекомендованных ВАК, и 8 тезисах в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, 6 глав обсуждения результатов, экспериментальную часть, выводы, и список литературы (249 наименований), содержит 54 рисунка и 6 таблиц. Общий объем составляет 193 страницы.

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-33-00593 мол_а).

Автор выражает искреннюю благодарность за участие в работе над диссертацией сотрудникам НИИ ФХБ МГУ: к.б.н. Ю.Ю. Стройловой, к.б.н. П.И. Семенюку, д.б.н. А.М. Арутюняну и д.б.н. Е.В. Шевалю, отделу Биохимии животной клетки; сотрудникам ИНЭОС РАН: лаборатории микроанализа, ядерного магнитного резонанса, лаборатории Макромолекулярной химии.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность научного исследования, определены цели диссертационной работы.

В Литературном обзоре рассмотрены основные классы дендримеров, имеющие перспективы биологического применения, проанализированы закономерности комплексообразования дендримеров с белками, изложены современные представления о механизмах развития нейродегенеративных заболеваний, а также о строении и свойствах исследуемого прионного белка (**PrP**), систематизированы данные об анти-амилоидной активности дендримеров.

В экспериментальной части приведены методики синтеза КПФД, способы их очистки, а также выделения и очистки рекомбинантного овечьего PrP. Описаны методики формирования комплексов между дендримерами и PrP, а также эксперименты по изучению анти-амилоидных свойств дендримеров: способности препятствовать белковой агрегации, а также разрушать

сформировавшиеся амилоидные агрегаты. Приведены методы анализа и характеристики соединений и их комплексов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Синтез и исследование катионных пиридилфениленовых дендримеров

Катионные пиридилфениленовые дендримеры (КПФД) были получены по методике, разработанной ранее в лаборатории макромолекулярной химии ИНЭОС РАН. Для этого на первом этапе по реакции Дильса-Альдера с использованием 1,3,5-триэтинилбензола в качестве центрального фрагмента и тетраарилзамещенных цикlopентадиенонов в качестве «строительных» блоков были синтезированы гидрофобные пиридилфениленовые дендримеры (Рисунок 16 в Главе «Результаты и обсуждение» диссертации) Строение и чистота полученных соединений были подтверждены методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), MALDI ToF масс-спектрометрии и, элементного анализа. На следующем этапе алкилированием исходных гидрофобных дендримеров по реакции Меншуткина с использованием диметилсульфата в качестве алкилирующего агента были получены водорастворимые дендримеры второй (**G2**), третьей (**G3**) и четвертой (**G4**) генераций, представленные на рисунке 1. Степень алкилирования определяли на основании данных элементного анализа на серу в противоионе, а также по данным ^1H ЯМР спектроскопии. Некоторые характеристики дендримеров приведены в таблице 1.

Стоит отметить, что КПФД характеризуются постоянством заряда и его независимостью от pH, поскольку положительный заряд данных дендримеров обусловлен присутствием четвертичного азота в структуре. Ограниченное вращение вокруг одинарных C-C связей, соединяющих ароматические кольца, обуславливает жесткость структуры в целом. За счет этого, ветви таких дендримеров не претерпевают так называемый "backfolding", т.е. не заворачиваются внутрь, вследствие чего количество функциональных терминальных групп всегда остается неизменным.

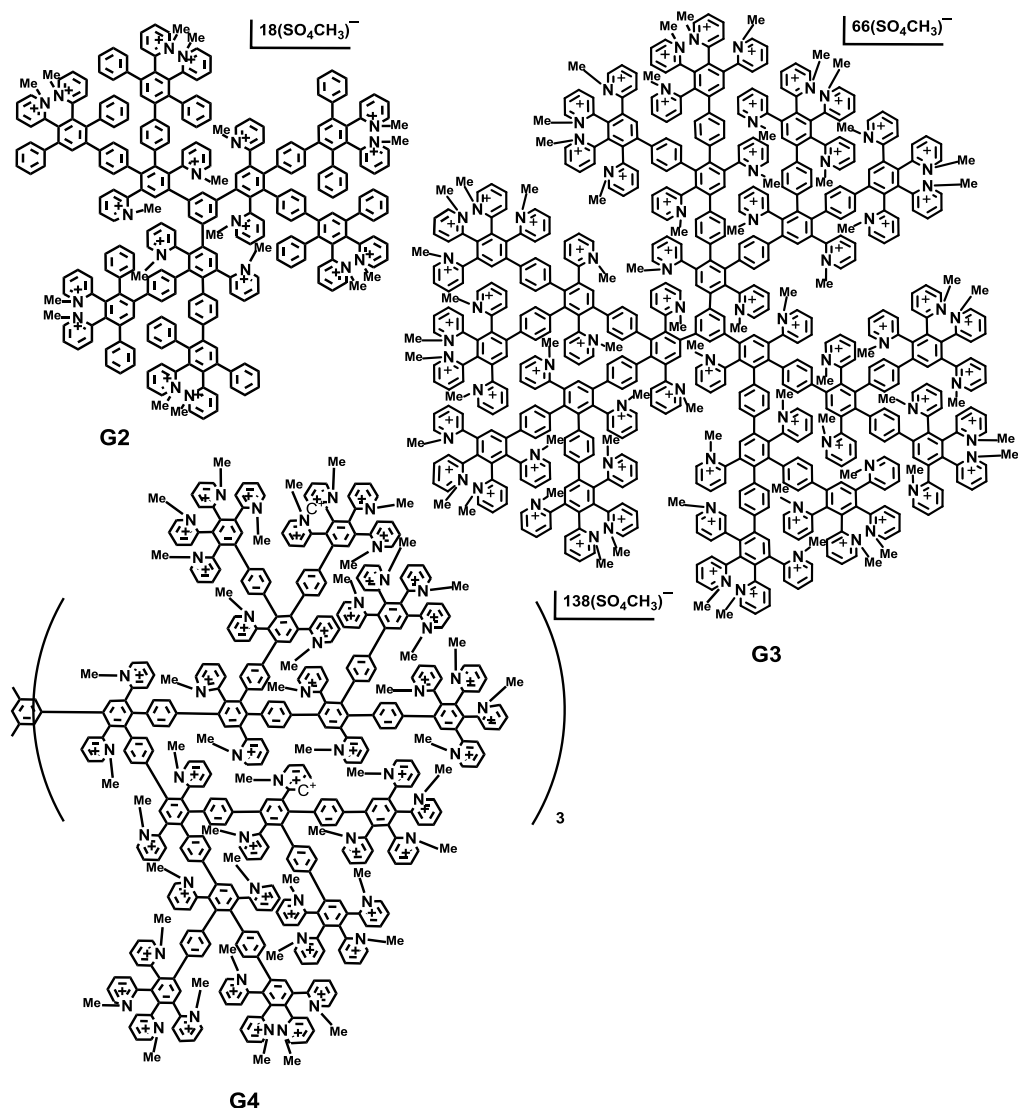


Рисунок 1 – Катионные пиридилфениленовые дендримеры второй (G2), третьей (G3) и четвертой (G4) генераций

Таблица 1 – Некоторые характеристики КПФД

Дендример	Описание	Степень алкилирования		Заряд ^a	Молекулярная масса	Размер ^b нм
		Эл. анализ	¹ H ЯМР			
G2	Дендример второй генерации, 18 пиридилных групп	85 %	82 %	15 «+»	5142	5
G3	Дендример третьей генерации, 66 пиридилных групп	75 %	73 %	50 «+»	14440	5
G4	Дендример четвертой генерации, 138 пиридилных групп	83 %	82%	115 «+»	31841	32

^a рассчитанный на основании найденной степени алкилирования

^b на основании данных динамического светорассеяния

2. Взаимодействие дендримеров с нативным прионным белком

Для изучения движущей силы взаимодействия КПФД с PrP был использован метод изотермической титрационной калориметрии. Полученные изотермы связывания приведены на рисунке 2 А, Б. Титрование PrP дендримером G2 сопровождается значительным выделением тепла. Тепловой процесс при связывании PrP и G3 выражен в существенно меньшей степени. Тем не менее, в обоих случаях процесс экзотермический, что указывает на возникновение электростатических взаимодействий. При этом константа ассоциации PrP с G3 оказалась на порядок выше, чем с G2. Исходя из приведенных на рисунке 2 значений термодинамических параметров связывания, можно заключить, что повышенная прочность связывания G3 с PrP обусловлена энтропийным вкладом и, вероятно, связана с возникновением гидрофобных взаимодействий. Необходимо отметить, что титрование сопровождается достаточно большим фоновым теплопоглощением. По этой же причине получить результаты для G4 не удалось, так как контрольное титрование буфера раствором дендримера характеризовалось выделением тепла, соизмеримым с его количеством при связывании белка с дендримером.

Моделирование взаимодействия методом молекулярной динамики позволило предположить сайты связывания дендримеров с белком, а также проанализировать механизм взаимодействия (Рисунок 3). Молекула PrP имеет два сайта, доступных для связывания дендримера, в основной цепи, а также один сайт, расположенный в боковой цепи. Сайты насыщены кислотными остатками и представляют собой отрицательно заряженные участки белка, включающие остатки Асп, Глу, а также С-концевой Тир (Рисунок 3 Г).

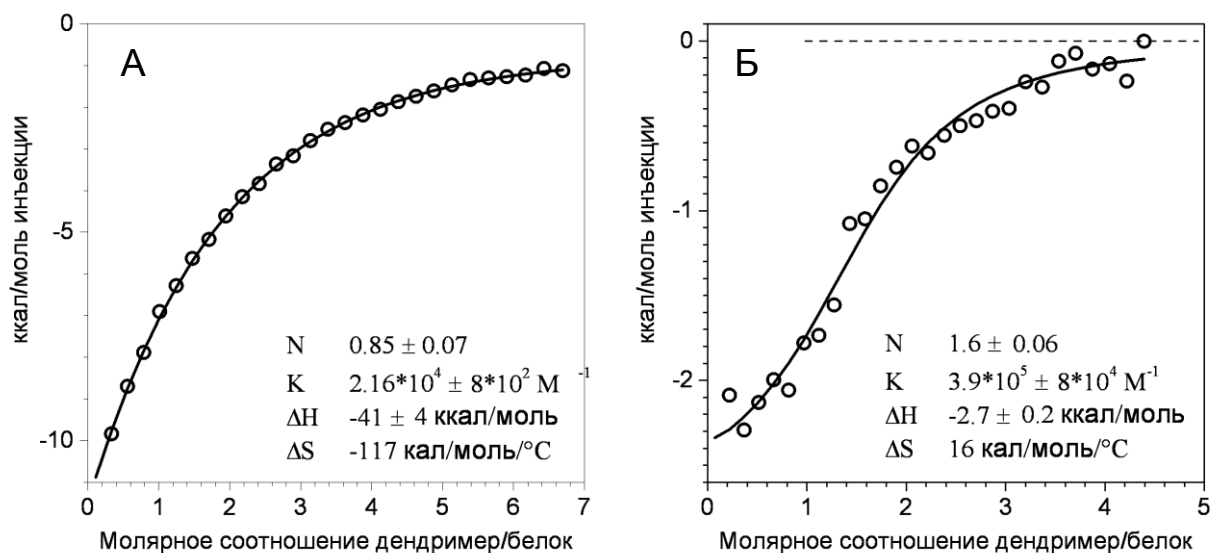


Рисунок 2 – Изотермы связывания, полученные при калориметрическом титровании PrP дендримерами G2 (А) и G3 (Б). Стехиометрия (N), константа ассоциации (K), энтальпия (ΔH) и энтропия (ΔS) связывания показаны на нижних панелях и определены с использованием модели “one site of sites”.

Связывание G2 может происходить одновременно по всем указанным сайтам, в то время как связывание G3 с боковым сайтом блокирует взаимодействие с основными, и наоборот. Так, если две молекулы G3 связываются с основными сайтами, взаимодействия с боковым сайтом не происходит. Всего, согласно результатам моделирования, PrP способен одновременно связать 3 – 4 молекулы G2 и всего 2 молекулы G3.

Связывание сопровождалось формированием ионных пар. При этом не наблюдалась диссоциация комплекса и каждая молекула дендримера оставалась связанной вплоть до окончания моделирования в течение 20 – 30 нс. С другой стороны, в связывание были также вовлечены неполярные контакты: число неполярных углеродных атомов в радиусе 0,35 нм незначительно возрастало после взаимодействия с дендримером. Стоит также отметить, что общее число ионных пар, формируемых между белком и G3 равно или немного превышает число ионных пар, образующихся с G2. Учитывая тот факт, что с белком связывается меньшее количество молекул G3, очевидно, каждая молекула G3 способна формировать большее количество ионных пар с белком.

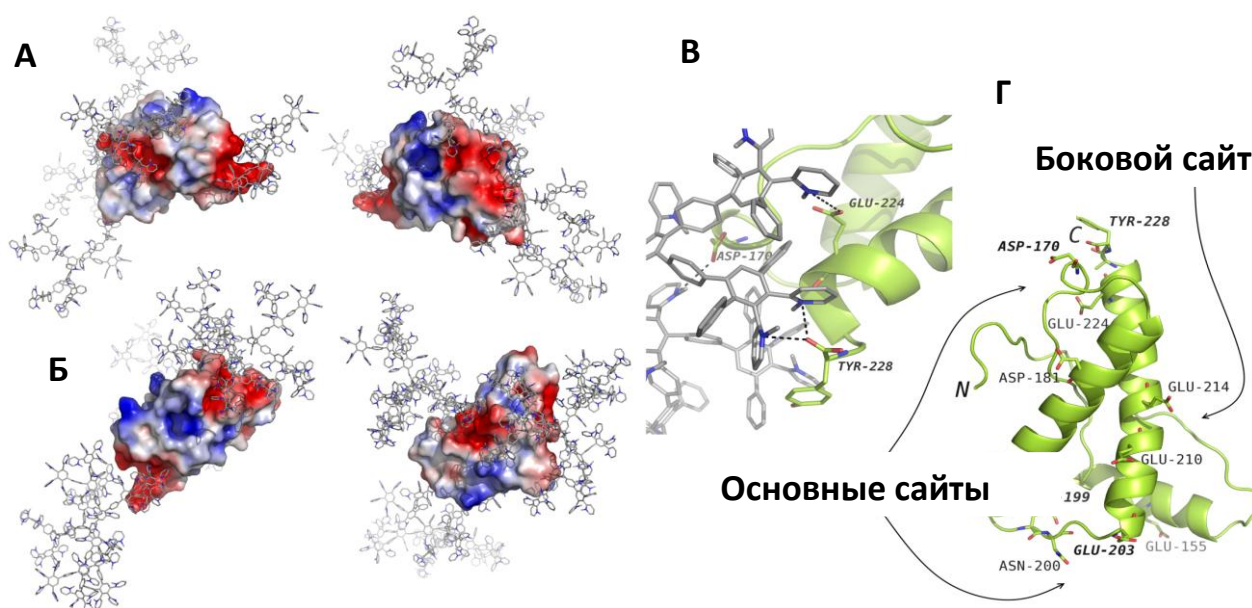


Рисунок 3 - Результаты моделирования взаимодействия PrP с G2 (А) и G3 (Б) методом молекулярной динамики. Дендримеры показаны серым цветом с синими молекулами азота, белок окрашен согласно электростатическому потенциалу поверхности, при этом положительно заряженные области окрашены в синий цвет, отрицательно заряженные – в красный. Увеличенное изображение взаимодействия дендримеров с белком (Рисунок В). Аминокислотные остатки, участвующие в связывании дендримера (Рисунок Г).

Кроме того, были проанализированы **изменения вторичной структуры** белка при взаимодействии с дендримером (Рисунок 4). Согласно данным изменения среднеквадратичных отклонений атомных позиций белка (RMSD) во времени, G3 оказывал большее влияние на

структуру PrP, чем G2. Тем не менее, основная часть структуры белка оставалась интактной в обоих случаях, однако, один из основных связывающих сайтов (остатки 190 – 200, включая Глу199 и Асн200) может изменяться под действием дендримеров.

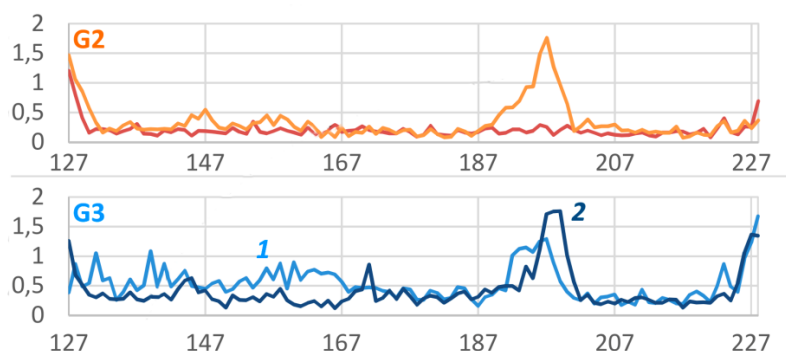


Рисунок 4 - Кривые изменения значений RMSD на аминокислотный остаток взаимодействия овечьего прионного белка с G2 и G3. Кривые 1 и 2 отображают связывание дендримеров с боковым и основным сайтами, соответственно.

Влияние дендримеров на **вторичную структуру** белка также было проанализировано с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД). Добавление дендримеров вплоть до 5-кратного молярного избытка не оказало существенного влияния на вторичную структуру белка и не вызывало его разворачивания, либо денатурации (Рисунок 5). Результаты не изменялись в зависимости от генерации дендримера, поэтому в качестве примера на рисунке 5 приведен КД спектр PrP при взаимодействии с G3.

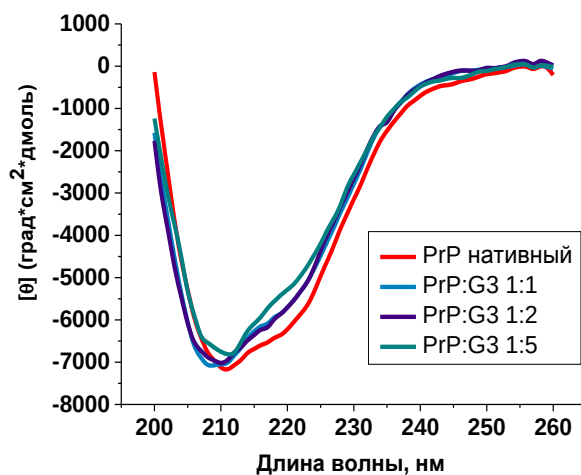


Рисунок 5 – Спектры КД PrP в присутствии КПФД третьей генерации в разных молярных соотношениях.

Наличие в структуре PrP 7 триптофановых остатков позволяет использовать метод тушения флуоресценции белка для изучения комплексообразования с дендримерами.

Эксперименты показали, что все использованные дендримеры эффективно тушат флуоресценцию, что служит дополнительным подтверждением формирования комплекса (Рисунок 6). Спектры поглощения дендримеров не перекрываются со спектрами флуоресценции PrP, поэтому наблюдаемый эффект тушения можно относить к истинному тушению за счет формирования комплекса. При увеличении генерации дендримера (Рисунок 6) эффективность тушения возрастает.

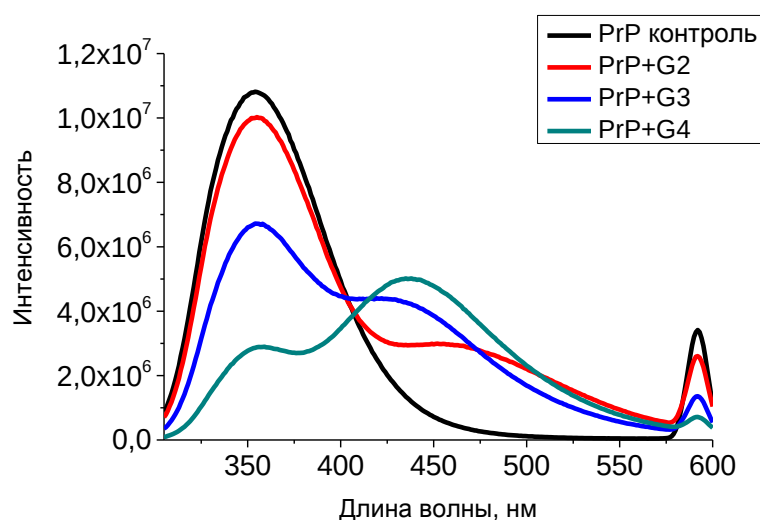


Рисунок 6 - Кривые тушения собственной флуоресценции PrP под действием КПФД разных генераций (концентрация дендримеров 0,5 μM)

Тушение флуоресценции описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q],$$

где K_{SV} – константа тушения, $[Q]$ – концентрация тушителя, F_0 и F – интенсивности флуоресценции в отсутствие и присутствии тушителя, соответственно. Константа K_{SV} , определяемая как угол наклона зависимости относительной интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя (дендримера), позволяет количественно оценить эффективность взаимодействия дендримеров с PrP (таблица 2). G4 характеризуется наибольшим значением K_{SV} , что означает, что сила взаимодействия дендримеров с белком последовательно растет с увеличением генерации.

Таблица 2 - Рассчитанные константы Штерна-Фольмера

Дендример	$K_{SV} (\text{M}^{-1})$
G2	1.5×10^5
G3	1.3×10^6
G4	2.9×10^6

Флуоресценция триптофановых остатков чрезвычайно чувствительна к изменениям микроокружения, что позволяет использовать этот метод также и для **оценки конформационных изменений**, происходящих в белке под действием лиганда. Так, сдвиг максимума флуоресценции триптофана в длинноволновую область при взаимодействии белка с лигандом свидетельствует о том, что триптофановые остатки экспонированы в раствор, в то время как коротковолновый сдвиг является результатом экранирования триптофана белковой матрицей. При добавлении дендримеров положение максимума в спектре эмиссии PrP не меняется. Следовательно, взаимодействие с дендримерами не приводит к частичному разворачиванию, либо уплотнению белковой молекулы. Полученные данные соответствуют результатам спектроскопии КД.

Эффект тушения флуоресценции триптофановых остатков в PrP под действием дендримеров был положен в основу изучения **стабильности** полученных комплексов. Последовательное добавление хлорида натрия к комплексам PrP-дендример должно сопровождаться их диссоциацией, и, как следствие, ростом флуоресценции триптофановых остатков. Однако, как это видно из кривых флуориметрического титрования раствором хлорида натрия эквимольных смесей PrP с дендримерами (Рисунок 7), ни для одного из изученных дендримеров не наблюдалось значительного увеличения флуоресценции, соответствующего разрушению комплекса. Наибольший рост флуоресценции наблюдался для G2, однако, он составил лишь 10 % от исходного значения. В случае G3 и G4 рост флуоресценции не превысил 5%.

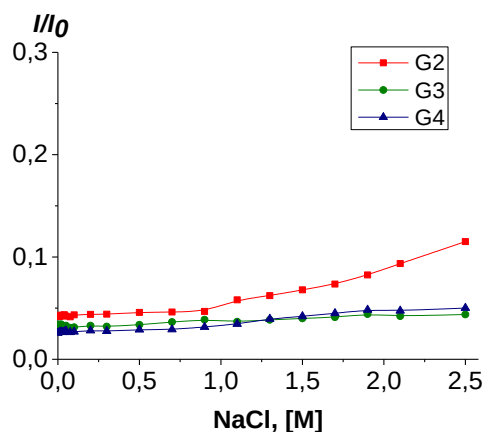


Рисунок 7 - Кривые флуориметрического титрования комплексов PrP-дендример раствором NaCl

Разрушить комплексы не удалось конкурентной реакцией в результате взаимодействия с противоположно заряженным полимером - декстран сульфатом - с молекулярной массой 15 кДа. Напротив, добавление декстран сульфата привело к увеличению гидродинамического диаметра частиц за счет сорбции молекул полианиона на поверхности существующих

комплексов с формированием тройного комплекса – декстран сульфат-дендример-PrP. Вместе, эти данные указывают на исключительную роль гидрофобных взаимодействий в стабильности комплексов, очевидно реализуемую за счет присутствия в молекуле дендримера фениленовых фрагментов.

Таким образом, КПФД способны формировать прочные комплексы с овечьим прионным белком. Согласно результатам изотермической титрационной калориметрии и моделирования методом молекулярной динамики, движущей силой взаимодействия являются электростатические и гидрофобные взаимодействия. Последние обуславливают экстремальную стабильность комплекса. Связывание дендримеров с белком не оказывает существенного влияния на его вторичную структуру. С ростом генерации дендримера уменьшается количество молекул, способных связаться с белком. При этом увеличивается вклад гидрофобных взаимодействий в связывание, что, в свою очередь, повышает константы связывания и ведет к бóльшей стабильности комплекса.

3. Изучение способности дендримеров препятствовать белковой агрегации

Формирование амилоидных фибрилл, являющихся одной из основных причин нейродегенеративных заболеваний, представляет собой последовательный процесс. Он включает в себя разворачивание нативной структуры белка, формирование небольших растворимых олигомеров, сопровождаемое переходом некоторых альфа-спиральных участков в бета-складки, и упорядочивание олигомеров в структурированные амилоидные фибриллы. Электростатическое и гидрофобное взаимодействие дендримеров с белком на одном из этих этапов может привести к ингибированию всего процесса. При этом токсическим эффектом обладают не только фибриллы, но и белковые олигомеры. Поэтому, нами было изучено как влияние дендримеров на формирование олигомеров PrP, так и на формирование амилоидных фибрилл.

Олигомеры были получены методом термоагрегации (инкубирование белка при 65 °C в течение 150 мин) в присутствии или отсутствии (контрольные пробы) дендримеров. Влияние дендримеров на процесс формирования прионных олигомеров было оценено с помощью динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) (Рисунок 8).

Согласно результатам ДЛС, термическая дестабилизация белка привела к возникновению структур с гидродинамическим диаметром 21 нм (Рисунок 8). При добавлении дендримеров наиболее выраженное влияние на процесс оказывал G3. В этом случае размер образовавшихся частиц (13 нм) оказался меньше, чем контрольных олигомеров, но больше, чем размеры мономеров (Рисунок 8, б). Добавление G2 (Рисунок 8, а) не оказывало существенного влияния на процесс и размер полученных частиц оказался равен размеру контрольных олигомеров. В случае G4 (Рисунок 8, в) размер частиц, полученных в присутствии дендримера, оказался

больше, чем в случае контрольных олигомеров, однако, G4 склонен к формированию ассоциатов размером 32 нм в растворе (таблица 1). Кроме того, G4 может связывать одну или несколько молекул мономера PrP, образуя достаточно крупные частицы. По этой причине сложно на основании только данных ДЛС судить о влиянии G4 на процесс формирования белковых олигомеров.

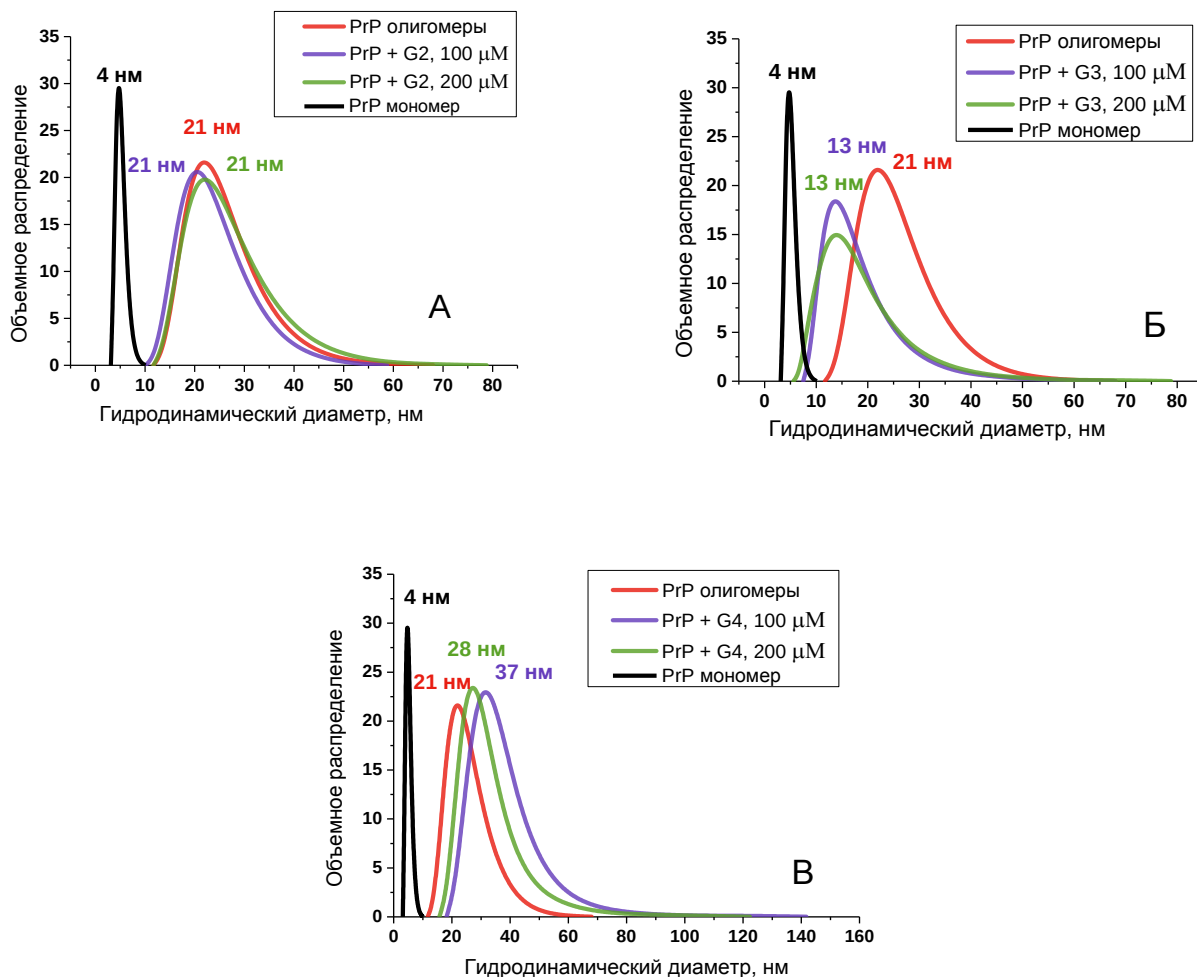


Рисунок 8 – Объемное распределение гидродинамических диаметров олигомеров PrP (красные линии), а также комплексов, полученных при ингибировании олигомеризации PrP дендримерами второй (А), третьей (Б), и четвертой генераций (В).

Как отмечалось выше, формирование олигомеров PrP сопровождается структурным переходом α -спиралей в β -складки. Изменения, происходящие во вторичной структуре белка, отслеживались с помощью спектроскопии КД (Рисунок 9). Олигомеры PrP характеризовались высоким содержанием бета-складчатой структуры, на что указывает наличие выраженного минимума при 216 нм (Рисунок 9, черные линии).

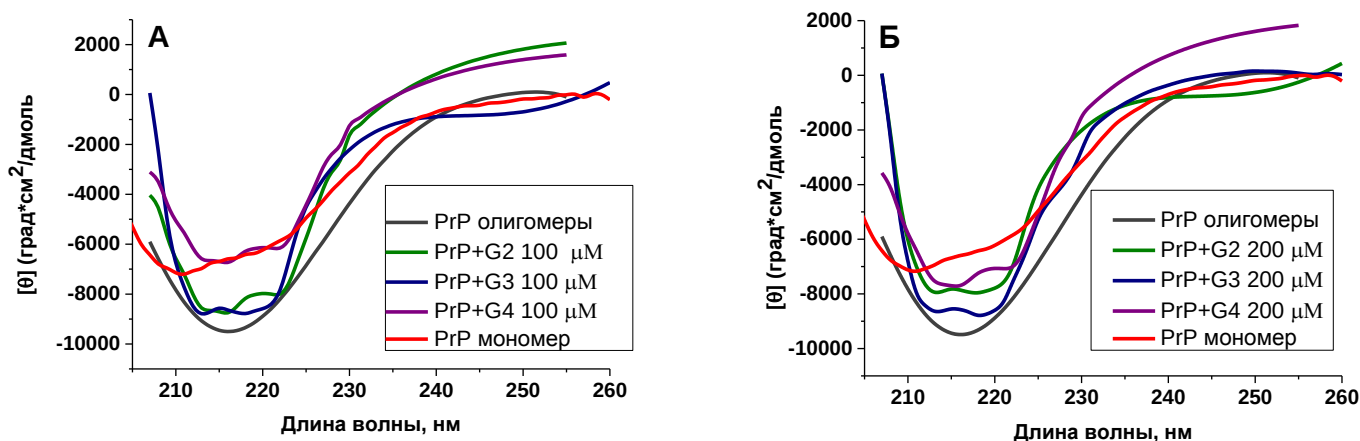


Рисунок 9 –Спектры кругового дихроизма нативного PrP (красные линии), прионных олигомеров (черные линии), а также комплексов PrP с дендримерами второй (зеленые линии), третьей (синие линии) и четвертой (фиолетовые линии) генераций в концентрации 100 (А) и 200 (Б) μM .

При этом после инкубации PrP с дендримерами характер спектров указывает на присутствие смешанной α/β структуры, что говорит об ингибировании формирования амилоидных олигомеров всеми протестированными соединениями. Результаты не изменялись с увеличением концентрации дендримера.

Таким образом, формирование комплексов между дендримерами и PrP частично предотвращает амилоидную трансформацию белка, сопровождаемую структурным переходом альфа-спиралей в бета-складки, на пути к формированию олигомеров. Построенная модель взаимодействия дендримеров с нативным PrP показывает (рисунок 3), что связывание затрагивает участок 190–200, который вовлечен в процесс амилоидной трансформации белка. Очевидно, что это взаимодействие имеет решающее значение для проявления анти-амилоидной активности дендримеров. Однако, принимая во внимание результаты ДЛС, действие дендримеров зависело от генерации и G3 наиболее явно предотвратил формирование прионных олигомеров. Полученные комплексы были стабильны и не подвержены дальнейшей агрегации в течение 7 дней, что подтверждается данными ДЛС.

На следующем этапе была изучена способность КПФД ингибировать более глубокую агрегацию - формирование амилоидных фибрилл. Формирование фибрилл индуцировалось добавлением гуанидин гидрохлорида к смеси PrP с дендримерами и инкубированием при постоянном перемешивании, 37 °C, 70ч.

Влияние дендримеров на процесс фибриллизации было оценено измерением флуоресценции тиофлавина Т. Так, спектры флуоресценции фибрилл PrP характеризуются сильной интенсивностью флуоресценции (Рисунок 10, красные линии). Добавление

дендримеров (Рисунок 10, голубые и зеленые линии) значительно снижает интенсивность флуоресценции, что говорит об эффективном ингибировании процесса.

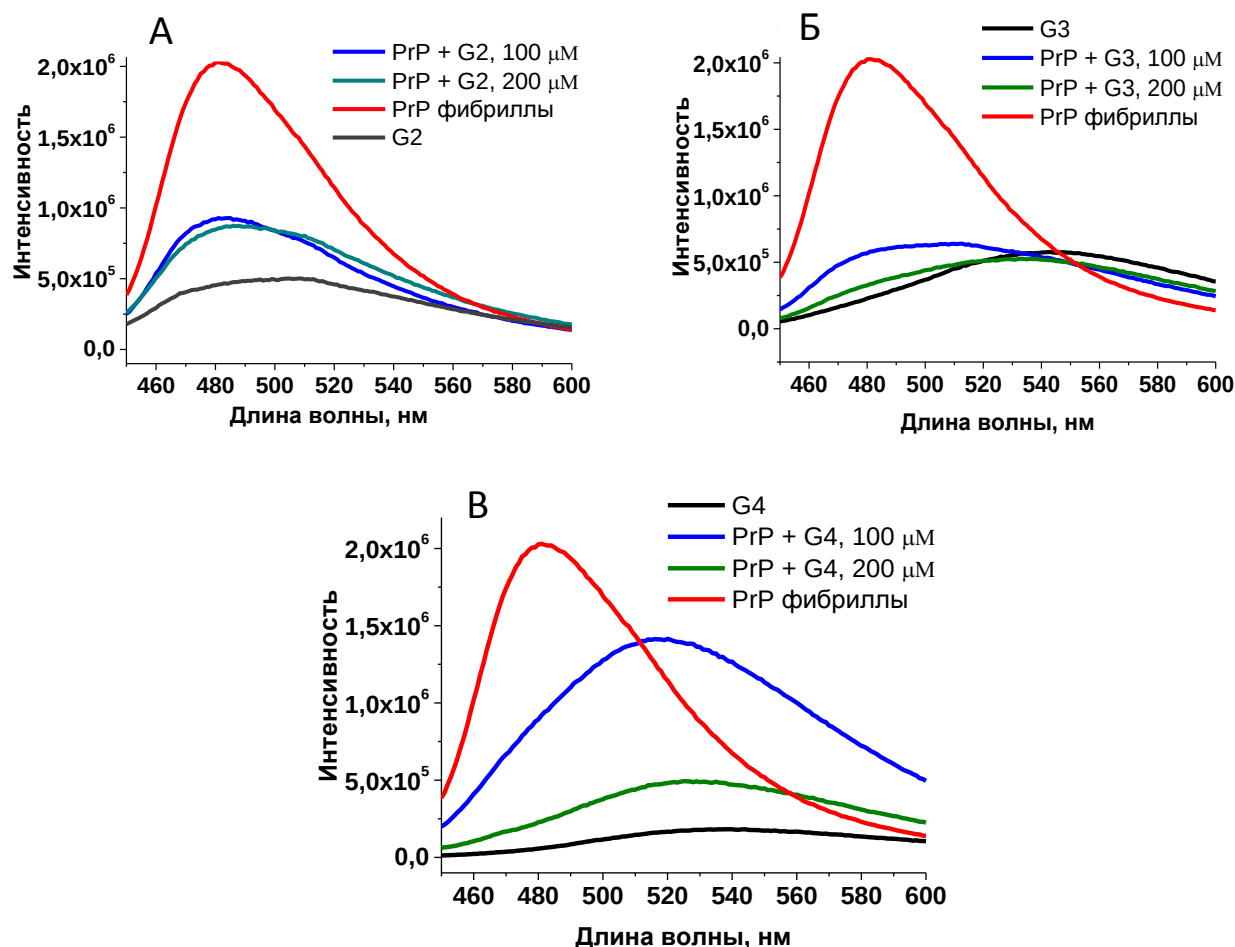


Рисунок 10 – Спектры флуоресценции тиофлавина Т фибрилл PrP в отсутствии дендримеров (красные линии) и в присутствии дендримеров второй (А), третьей (Б) и четвертой (В) генераций в концентрации 100 μM (синие линии) и 200 μM (зеленые линии).

Сравнение относительных интенсивностей максимума флуоресценции показало, что интенсивность флуоресценции снижается с увеличением генерации дендримера (Рисунок 11). Однако, наименьшая интенсивность флуоресценции, соответствующая наибольшей степени ингибирования процесса, достигалась при добавлении G3 в концентрации 200 μM. Данные указывают на то, что высокий заряд, а также большая плотность поверхностных функциональных групп положительно влияют на способность дендримеров предотвращать белковую агрегацию. Однако, для наибольшей активности дендримера необходимо стерическое соответствие объектов, поэтому размер молекулы дендримера также оказывает влияние.

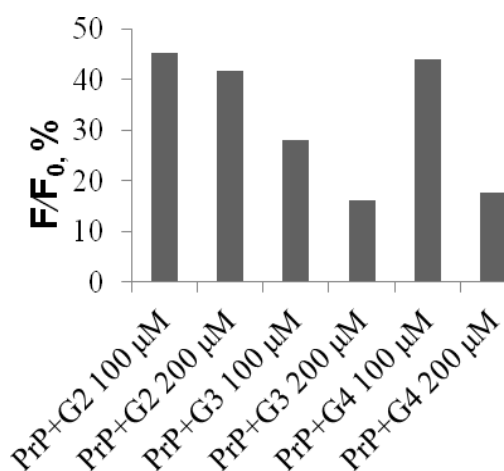


Рисунок 11 - Относительные интенсивности флуоресценции тиофлавина Т фибрилл PrP, полученных в присутствии дендримеров. F - интенсивность флуоресценции пробы, полученной в присутствии дендримеров ($\lambda=480$ нм); F_0 – интенсивность флуоресценции фибрилл PrP без добавления дендримеров при той же длине волны.

Особенностью прионов является способность неправильно свернутых прионных молекул вызывать аналогичную трансформацию нормального клеточного белка, что приводит к прогрессированию заболевания. Поэтому крайне важным при ингибировании фибриллизации PrP является отсутствие конвертирующей способности у сформировавшихся комплексов с дендримером. Это свойство было определено методом "seeding" – использованием затравки фибрилл.

На первом этапе проводили описанный ранее процесс фибриллизации PrP в присутствии дендримера, после чего полученные комплексы приона с дендримерами отделяли от реакционной смеси и добавляли в качестве затравки к раствору нативного PrP. Пробы инкубировали при 37 °C в течение 100 ч. В качестве контроля использовали затравку PrP, полученную в процессе агрегации в отсутствие дендримера. Анализ проводили путем измерения флуоресценции тиофлавина Т.

Эффективность ингибирования (ЭИ) оценивали по формуле:

$ЭИ = 1 - F/F_0$, где F – максимум интенсивности флуоресценции пробы, содержащей комплекс приона с дендримером в качестве затравки, F_0 – максимум интенсивности флуоресценции контрольной пробы.

На рисунке 12 изображены изменения флуоресценции тиофлавина Т в присутствии и отсутствие (контрольные пробы) комплексов дендримеров в различных концентрациях с PrP. Добавление дендримеров даже в таких низких концентрациях, как 5 и 10 μM на этапе фибриллизации белка, значительно снижало интенсивность флуоресценции по сравнению с контрольной пробой. Наибольшее влияние на процесс оказывал G4, который ингибировал фибриллизацию под действием затравок фибрилл даже в концентрации 1 μM (Рисунок 12, В). Повышение концентрации закономерно привело к большей эффективности ингибирования, которая достигает ~90% при использовании дендримеров в концентрации 200 μM.

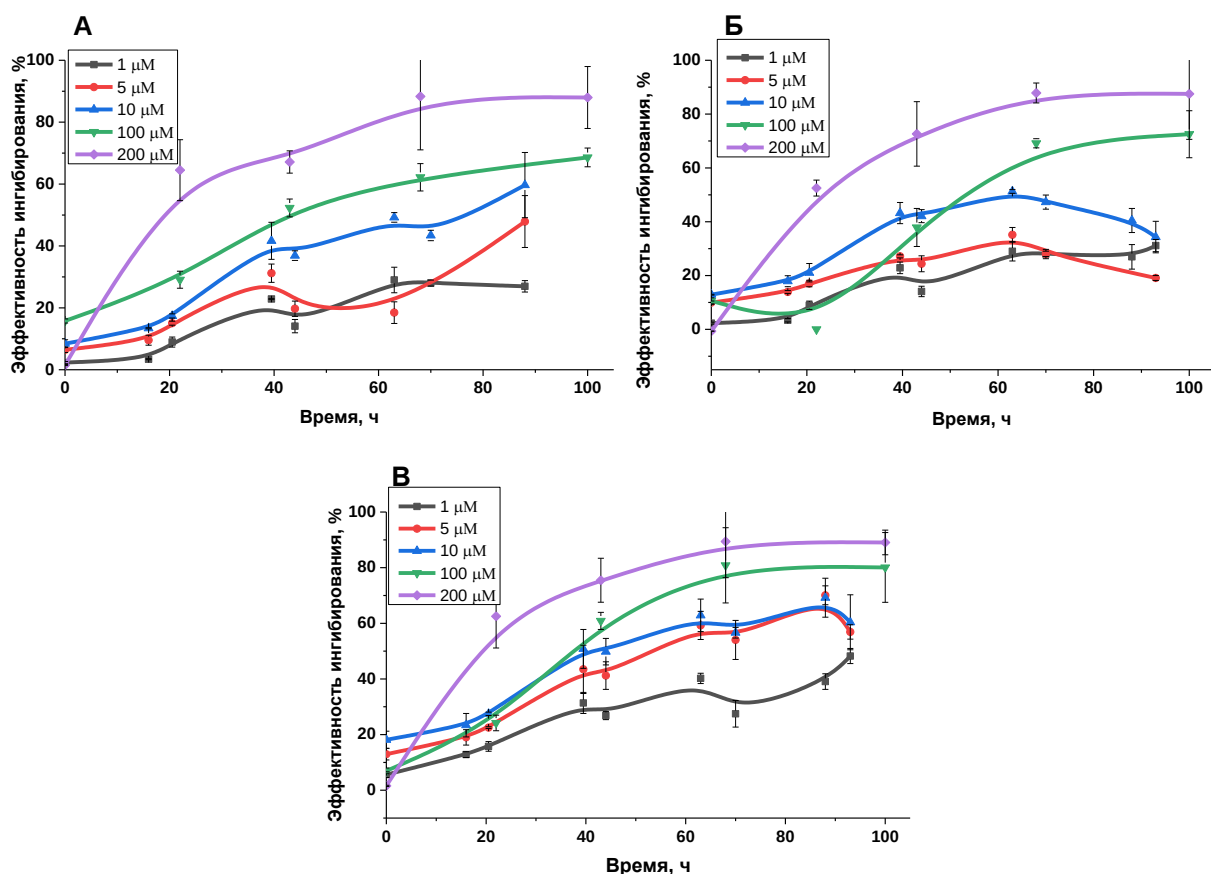


Рисунок 12 - Влияние дендримеров второй (А), третьей (Б) и четвертой (В) генераций на агрегацию прионного белка, индуцированную затравкой фибрилл. В качестве затравки использовали полученные на этапе фибриллизации комплексы PrP с дендримерами. За процессом следили по изменению флуоресценции тиофлавина Т. Концентрации, указанные в рамке, соответствует концентрациям дендримеров, использованным на этапе фибриллизации белка.

Таким образом, КПФД дендримеры могут препятствовать переходу PrP в амилоидную форму под действием затравок фибрилл. Результаты указывают на отсутствие конвертирующей способности у комплексов дендримера с PrP, так как они не вызывают патологической трансформации нативного PrP в неправильно свернутую форму. Важно, что в данном случае агрегация PrP происходит наиболее естественным образом, а значит наблюдаемый от дендримеров эффект «защиты» PrP крайне значим для понимания развития этой патологии.

4. Разрушение белковых агрегатов амилоидной природы

Способность КПФД разрушать белковые агрегаты амилоидной природы была проанализирована на примере телец включения (ТВ) овечьего PrP и дендримеров трех генераций.

Мы предположили, что инкубация ТВ с дендримерами должна приводить к частичному растворению белковых агрегатов за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий с

дендримерами и к переходу образующихся комплексов в растворимое состояние. После совместной инкубации ТВ с дендримерами при 37 °С комплексы были отделены от смеси путем центрифугирования и проанализированы различными методами.

При электрофоретическом анализе проб было обнаружено присутствие новых частиц высокой молекулярной массы после инкубации ТВ с дендримерами G3 и G4. Детектированные соединения не разрушались в денатурирующих условиях электрофореза. Для более точной идентификации комплекса и подтверждения присутствия белка было проведено иммунохимическое окрашивание соединений с помощью моноклональных антител против овечьего PrP, высокоспецифически связывающихся с определяемым белком (Рисунок 13).

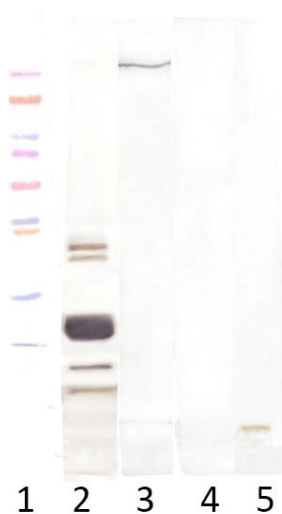


Рисунок 13 – Вестерн-блоттинг

- (1) – белки-маркеры (260, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20 кДа);
- (2) – суспензия ТВ PrP;
- (3) – супернатант ТВ PrP после инкубирования с G3;
- (4) - супернатант ТВ PrP без обработки дендримером;
- (5) - G3

Согласно полученным результатам, после инкубации ТВ с G3 в супернатанте была обнаружена только одна полоса, идентифицируемая с помощью антител к PrP (дорожка 3), представляющая собой комплекс PrP с дендримером. Аналогичные результаты были получены с G4.

Влияние дендримеров на амилоидные агрегаты PrP было также оценено с помощью ДЛС (Рисунок 14). G3 и G4 в концентрации 100 μ M разрушали нерастворимые ТВ, т.к. в супернатанте присутствовали частицы меньшего размера: 10 нм для G3 и 24 нм для G4. Использование G2 в этой концентрации не привело к возникновению небольших комплексов, детектируемых с помощью ДЛС.

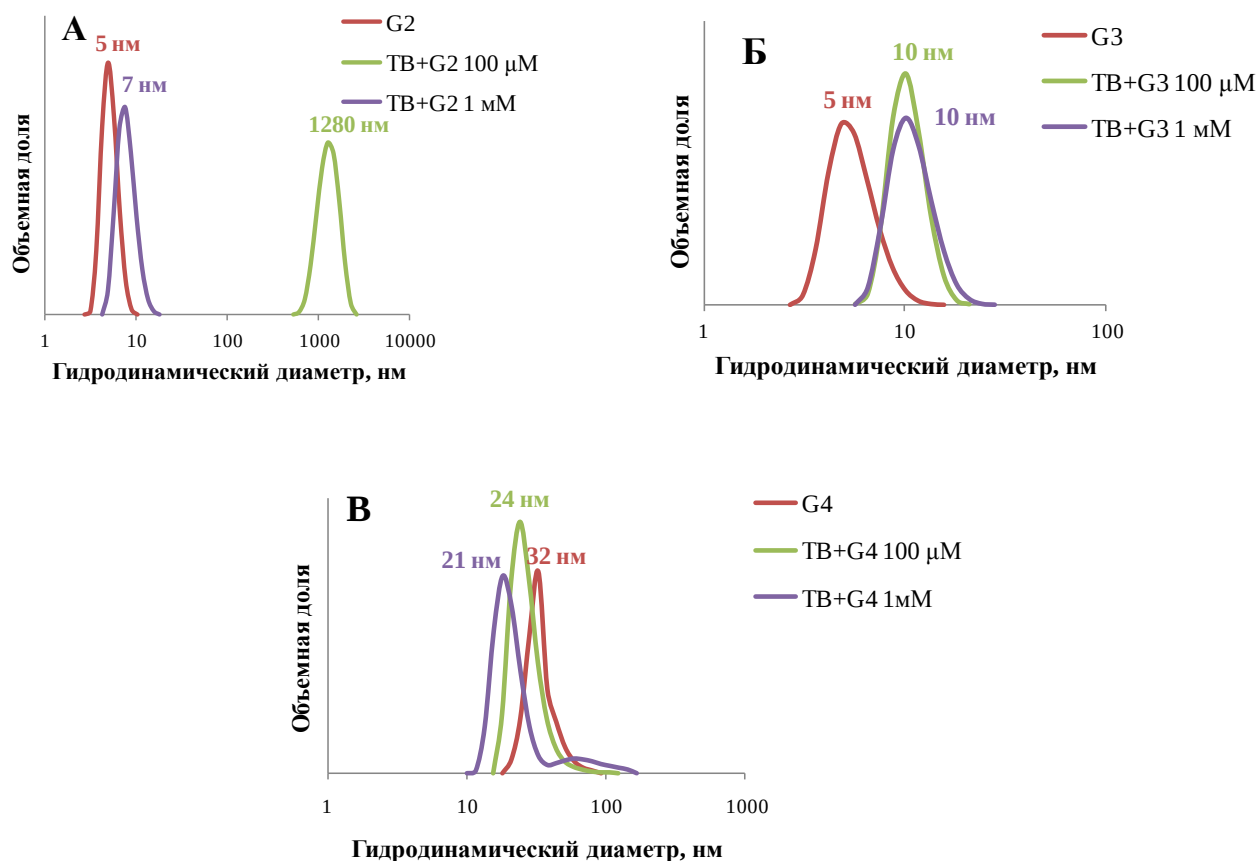


Рисунок 14 – Объемное распределение гидродинамических диаметров комплексов РгР-дендример, полученных после инкубации телец включения прионного белка с дендримерами второй (А), третьей (Б) и четвертой (В) генераций.

Таким образом, чем выше генерация дендримера и, соответственно, его заряд, тем выше его способность к растворению белковых агрегатов. Повышение концентрации дендримера до 1 мМ позволило получить растворимые комплексы дендримера с белком для всех трех протестированных соединений, а при уменьшении концентрации до 0,01 мМ практически все дендримеры, за исключением G3, оказались не эффективны (данные не показаны).

Влияние дендримеров на ТВ было исследовано также с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием тиюфлавина S (Рисунок 15). После обработки дендримерами ТВ становятся более «рыхлыми»: дендример сорбируется на их поверхности, увеличивая расстояния между отдельными элементами ТВ, что, вероятно, и приводит в итоге к отщеплению фрагментов ТВ и их переходу (в комплексе с дендримерами) в растворимое состояние.

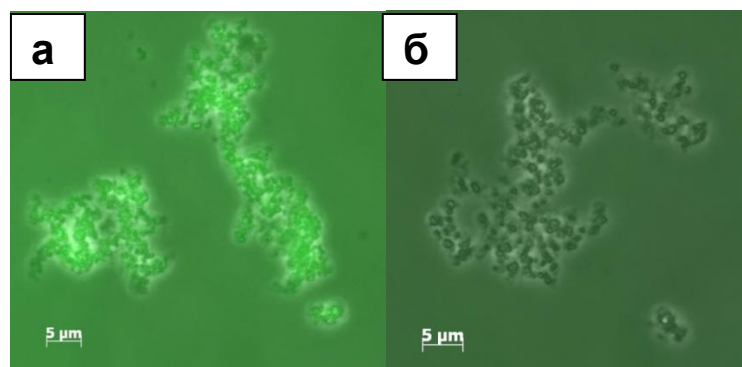


Рисунок 15 – Флуоресцентные микрофотографии ТВ, окрашенных тиофлавином S без обработки дендримером (а), после взаимодействия с G3 (б)

5. Исследование цитотоксичности дендримеров

Цитотоксичность дендримеров была измерена с помощью МТТ анализа на двух линиях клеток: нейробластомы и меланомы (Рисунок 16). МТТ анализ основан на способности живых клеток восстанавливать растворимый бромид 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в пурпурно-голубые кристаллы формазана. Неживые клетки такой способностью не обладают. Токсичность дендримеров возрастала с ростом генерации, и G4 обладал наибольшей токсичностью. ЛД₅₀ равнялись 9, 5, 4 мкМ для G2, G3 и G4, соответственно. Соединения обладали практически одинаковой токсичностью для обеих клеточных линий.

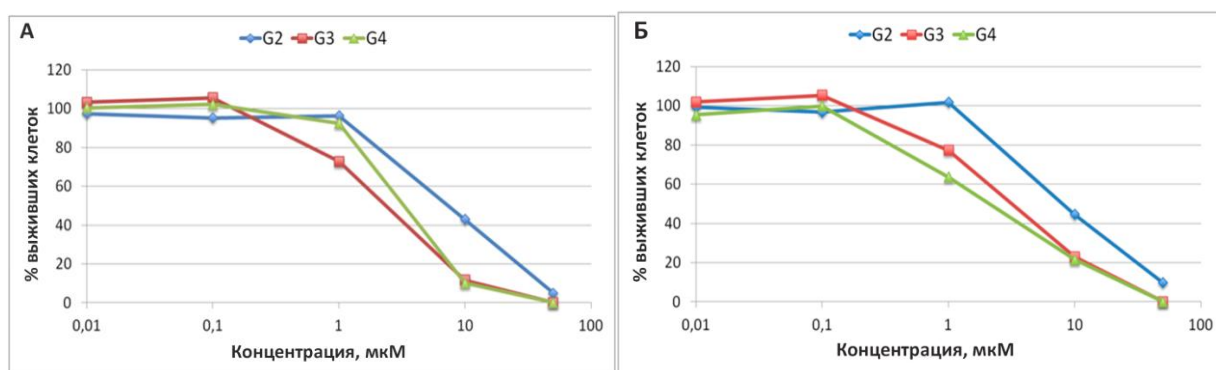


Рисунок 16 – Цитотоксичность катионных пиридилфениленовых дендримеров. Выживаемость клеток меланомы Mel1L (А) и нейробластомы SH-SY5Y (Б).

Стоит отметить, что токсичность КПДФ ниже часто используемых полиамидаминных и полиэтилениминовых дендримеров, по всей видимости, за счет кватернизации азота, являющейся известным методом снижения токсичности. Тем не менее, использованные в настоящей работе концентрации дендримеров находятся выше их нетоксичного уровня и дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на их поверхностной модификации, позволяющей снизить токсичность. Вместе с тем, стоит отметить, что уровень экспрессии РгР в клетках невысок, что позволяет предположить, что нетоксичных концентраций дендримеров будет достаточно для того, чтобы воздействовать на белковые агрегаты *in vivo*.

Выводы

1. Синтезированы катионные пиридилфениленовые дендримеры и показано, что они формируют стабильные комплексы с нативным овечьим прионным белком. Формирование комплексов обусловлено электростатическими и гидрофобными взаимодействиями.
2. Методом молекулярной динамики определены потенциальные, отрицательно заряженные сайты связывания молекулы PrP с катионными пиридилфениленовыми дендримерами: один в основной цепи белка и один в его боковой цепи. Электростатические взаимодействия реализуются между положительно заряженными пиридилными звеньями дендримеров с локально расположенными отрицательно заряженными аминокислотными остатками белка, гидрофобные - между фениленовыми фрагментами дендримера с гидрофобными группами белка.
3. Изучено влияние номера генерации (размера) дендримеров на свойства формируемых комплексов. Установлено, что с увеличением генерации дендримеров возрастают значения констант связывания, уменьшается количество молекул дендримера, способных взаимодействовать с белком. Вне зависимости от генерации образование комплексов не сопровождается изменением вторичной структуры белка.
4. Впервые продемонстрирована способность катионных пиридилфениленовых дендримеров ингибировать амилоидную агрегацию белка. Установлено, что дендримеры предотвращают как формирование небольших, но наиболее токсичных амилоидных агрегатов – олигомеров, так и зрелых амилоидных фибрилл. Ингибирование олигомеризации обусловлено связыванием дендримеров с сайтом, вовлеченным в амилоидную трансформацию прионного белка, и формированием прочных комплексов дендример-PrP, которые предотвращают как структурную конверсию приона, так и образование амилоидных фибрилл.
5. Эффективность ингибирования амилоидной агрегации белка зависит от генерации дендримера. Обнаружено, что наибольшую активность проявляет дендример третьей генерации, по сравнению со второй и четвертой генерациями дендримеров.
6. Продemonстрирована принципиальная возможность разрушения белковых агрегатов с помощью катионных пиридилфениленовых дендримеров. Дендримеры второй, третьей и четвертой генерации при концентрации 1мМ способны разрушать тельца включения.
7. Цитотоксичность катионных пиридилфениленовых дендримеров, изученная на линиях клеток меланомы MelLL и нейробластомы SH-SY5Y, ниже коммерчески доступных дендримеров - поли(амидоаминных) и поли(этилениминовых) дендримеров.

Статьи в рецензируемых журналах

1. Kuchkina N.V., Yuzik-Klimova E.Yu., Sorokina S.A., Peregudov A.S., Antonov D.Yu., Gage S.H., Boris B.S., Nikoshvili L.Z., Sulman E.M., Morgan D.G., Mahmoud W.E., Al-Ghamdi A.A., Bronstein L.M., Shifrina Z.B. Polyphenylenepyridyl dendrons with functional periphery and focal points: syntheses and applications // *Macromolecules*. – 2013. – V. 46. - № 15. – P. 5890–5898.
2. Sorokina S.A., Stroylova Y.Yu., Shifrina Z.B., Muronetz V.I. Disruption of amyloid prion protein aggregates by cationic pyridylphenylene dendrimers // *Macromolecular bioscience*. – 2016. – V16. – №2. – P. 266-275.
3. Sorokina S.A., Semenyuk P.I., Stroylova Y.Yu., Muronetz V.I., Shifrina Z.B. Complexes between cationic pyridylphenylene dendrimers and ovine prion protein: do hydrophobic interactions matter? // *RSC Advances*. – 2017. – V.7. – №27. – P. 16565-16574.
4. Stroylova Y.Yu., Sorokina S.A., Stroylov V., Melnikova A.K, Gaillard C., Shifrina Z.B., Haertlé T., Muronetz V.I. Spontaneous formation of nanofilms under interaction of 4th generation pyridylphenylene dendrimer with proteins // *Polymer*. – 2018. – V.137. – P. 186-194.

Тезисы докладов

1. Pyridylphenylene dendrimers influence amyloid transformation of prion protein // FEBS congress, Prague, Czech Republic, 2018.
2. Complexation of dendrimers with proteins: a promising tool for treatment of neurodegenerative disorders // *Modern trends in dendrimer chemistry and applications*, Moscow, Russia, 2017.
3. Molecular modeling of the dendrimer-protein complexes and protein incorporation into the nanofilms // 11-я Международная конференция Биокатализ-2017, Москва, Россия.
4. Влияние катионных пиридилфениленовых дендримеров на амилоидную агрегацию прионного белка // *Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты*, Московская область, 2015.
5. Cationic pyridylphenylene dendrimers disrupt amyloid aggregates // *Химия элементоорганических соединений и полимеров*, Москва, 2014.
6. Cationic pyridylphenylene dendrimers for disruption amyloid protein aggregates // 4th International Symposium on Biomedical Application of Dendrimers, Lugano, Switzerland, 2014.
7. Study on ability of cationic pyridylphenylene dendrimers to disrupt protein aggregates // *Chemistry Conference for Young Scientists*, Blankenberge, Belgium, 2014.
8. Изучение способности катионных пиридилфениленовых дендримеров разрушать белковые агрегаты // VI Всероссийская Каргинская конференция "Полимеры-2014", Москва, Россия.