



Amyloidné samozbalenie proteínov

Doktorandský seminár 2020

RNDr. Miroslav Gančár, 4. ročník PhD.

Ústav experimentálnej fyziky SAV

Oddelenie biofyziky

Vedúci práce: doc. RNDr. Zuzana Gažová, CSc.

Konzultant: RNDr. Zuzana Bednáriková, PhD.

Amyloidné samozbalenie (agregácia) proteínov

Amyloidná agregácia → sprievodný jav viac ako 50 degeneratívnych ochorení → amyloidózy → doposiaľ neliečiteľné

- Komplexnosť → špecifické terapeutické prístupy



- Primárny cieľ:

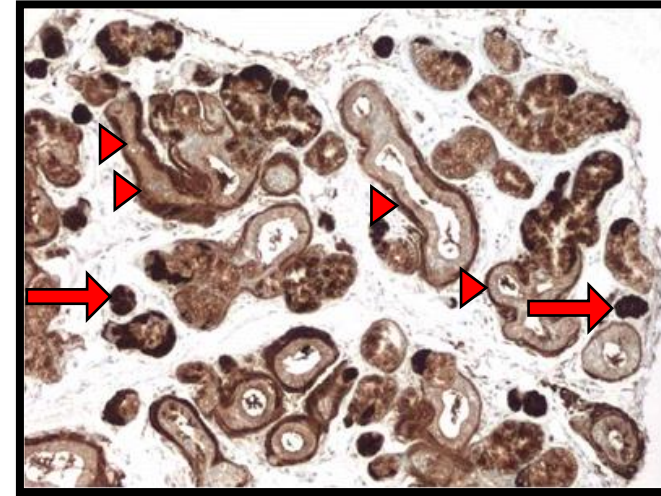
- Zabrániť vzniku ochorenia / liečiť ochorenie



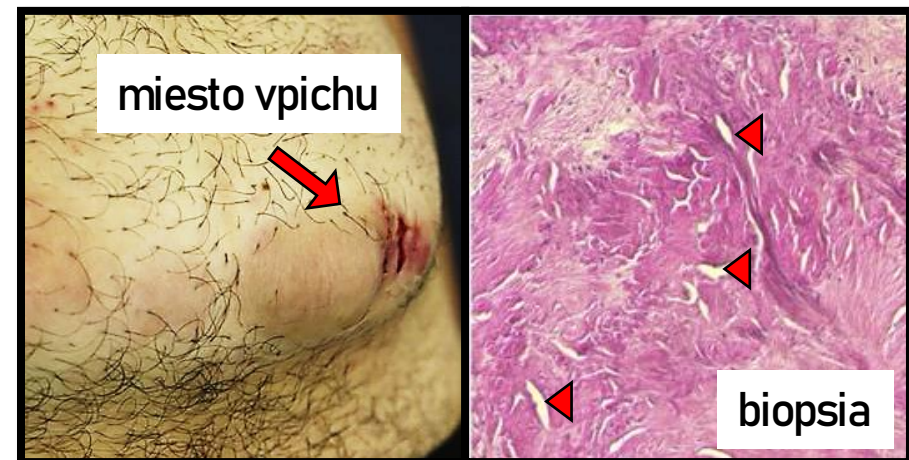
- Látky s nízkou molekulovou hmotnosťou

- Ekvimolárne zmesi prírodných látok
- Molekulárna hybridizácia

↓
Systémová lyzozýmová amyloidóza

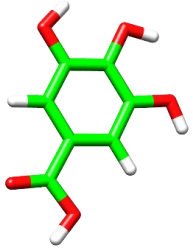


Injekčná lokalizovaná amyloidóza

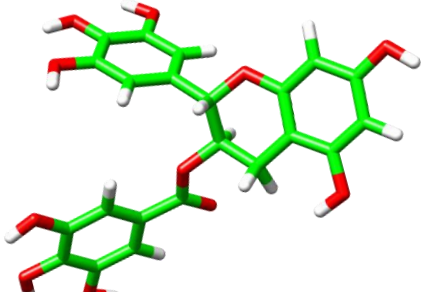


Ekvimolárne zmesi prírodných látok – interakčná štúdia vybraných zložiek zeleného čaju a ich vplyv na agregáciu inzulínu

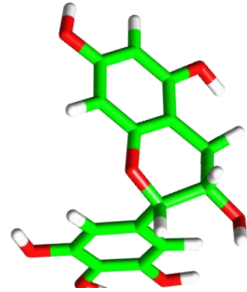
Kys. galová (GA)



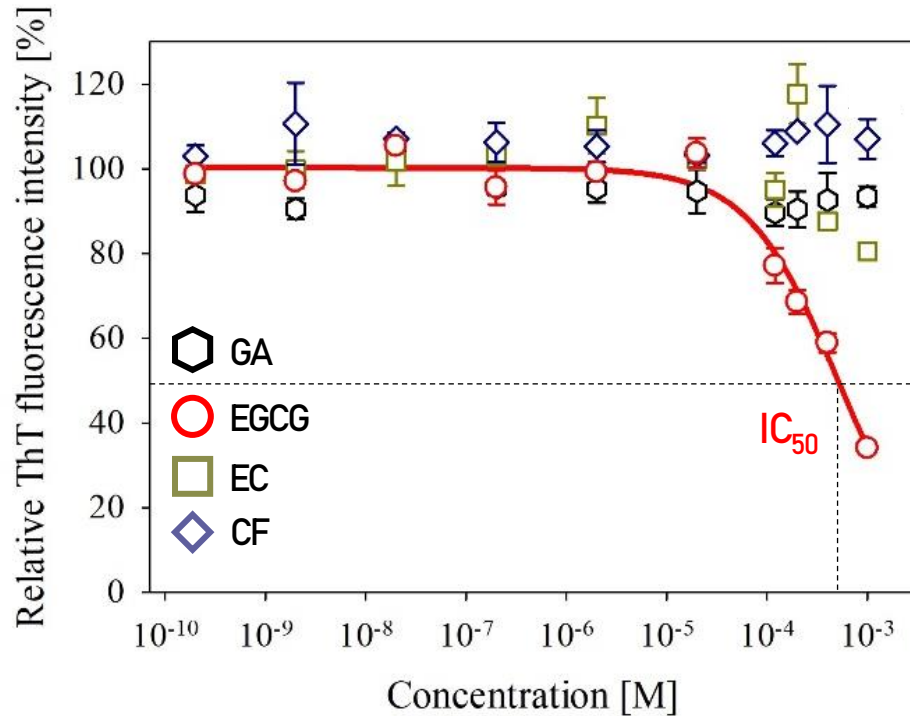
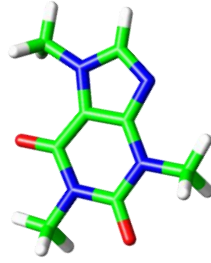
Epigalokatechín galát (EGCG)



Epigalokatechín (EC)



Kofeín (CF)



Viazanie tioflavínu T, stanovenie IC₅₀

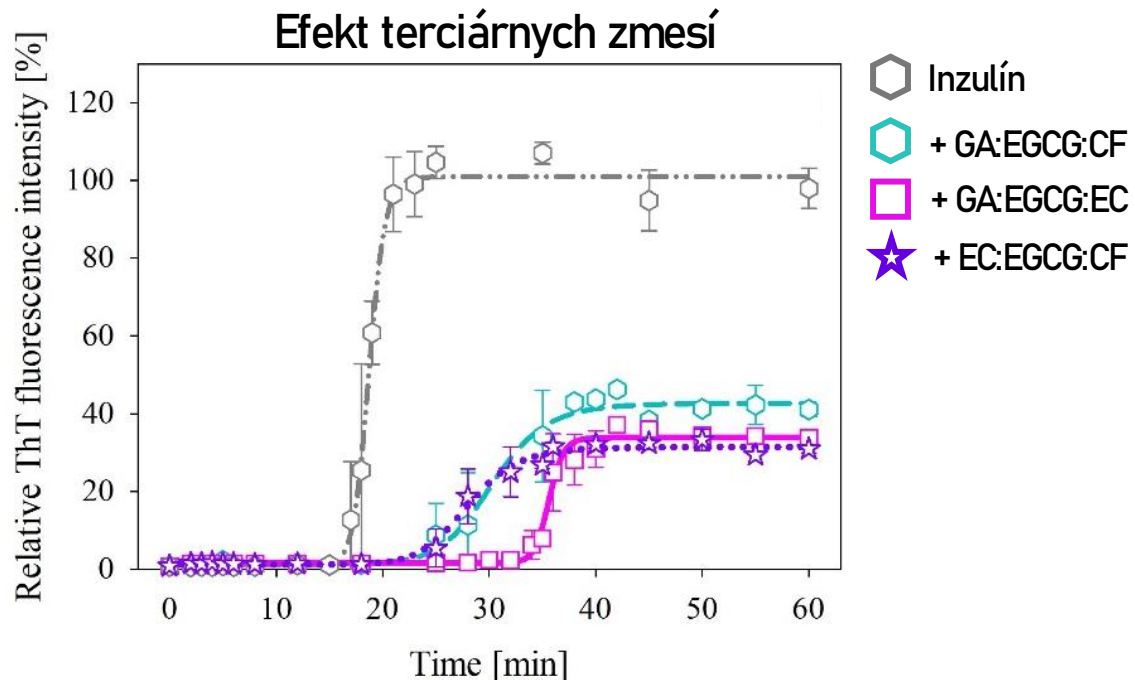
- ThT fluorescencia → kvantifikácia agregácie
- IC₅₀ → efektivita inhibície

Individuálne látky	IC ₅₀ [μM]	Binárne zmesi	IC ₅₀ [μM]
GA	-	GA:EGCG	268.6 ± 40.8
EGCG	476.1 ± 32.5	GA:EC	-
EC	-	GA:CF	-
CF	-	EGCG:EC	514.8 ± 13.0
		EGCG:CF	525.9 ± 32.0
		EC:CF	-
Terciárne zmesi	IC ₅₀ [μM]	Kvartérna zmes	IC ₅₀ [μM]
GA:EGCG:EC	1032.7 ± 85.8	GA:EGCG:EC:CF	390.4 ± 24.2
EGCG:EC:CF	350.5 ± 24.8		
GA:EGCG:CF	1753.6 ± 33.6		
GA:EC:CF	1332.8 ± 59.9		

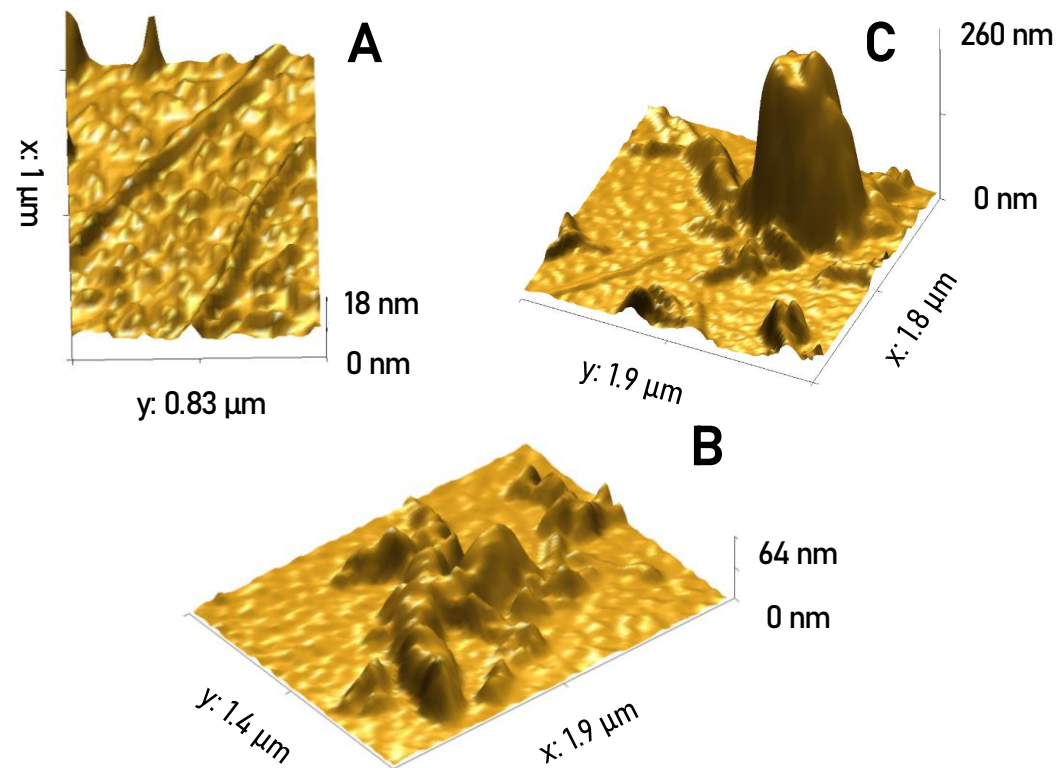
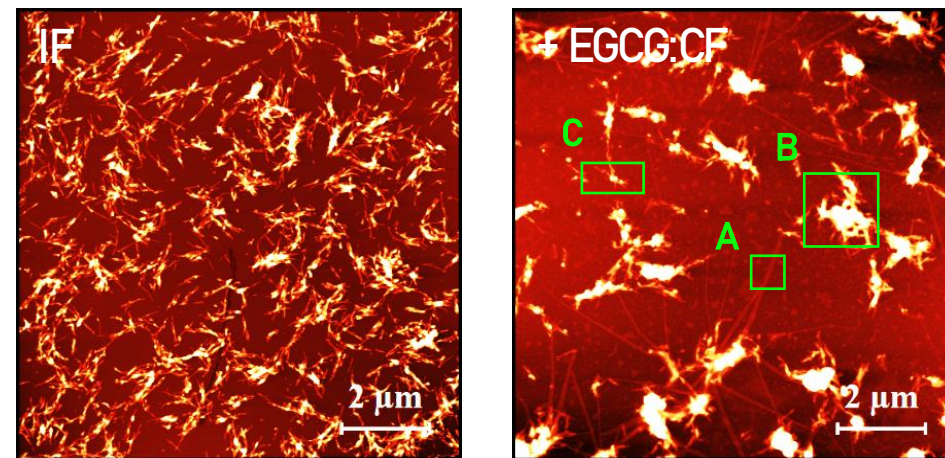
- EGCG → jediná samostatne účinná zložka
- Nevyhnutnosť prítomnosti EGCG v zmesiach

Kinetická štúdia vplyvu vybraných zložiek zeleného čaju na agregáciu inzulínu

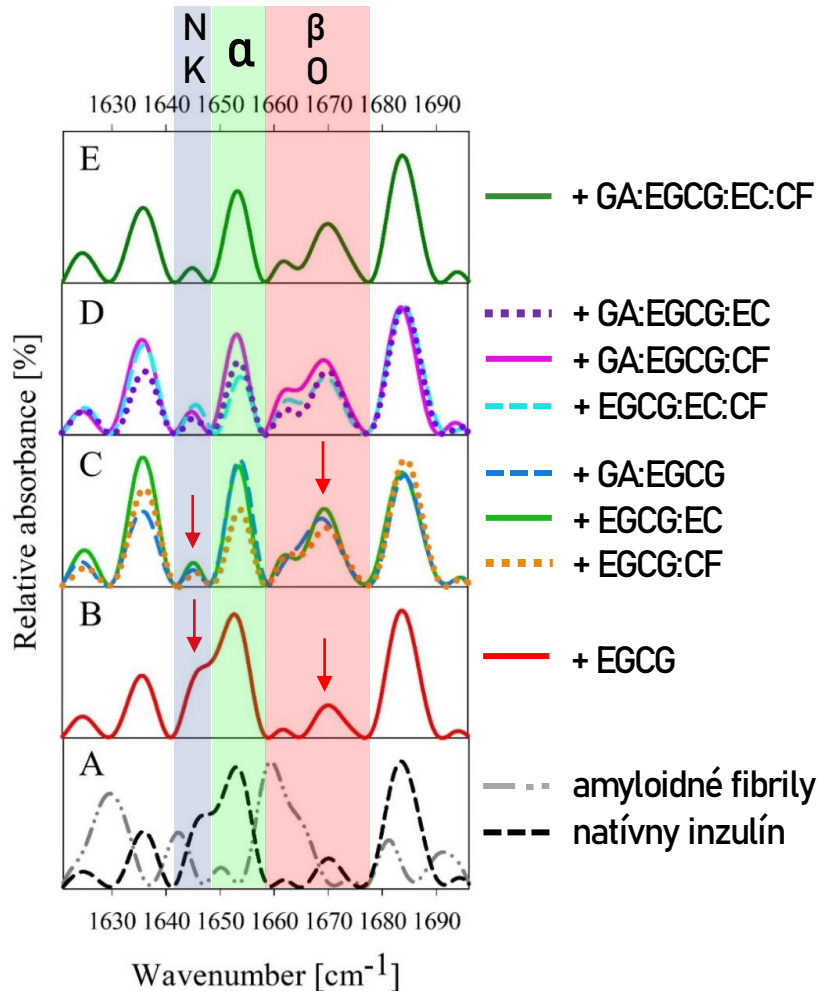
AFM a analýza morfológie amyloidných agregátov



- Pozorovaný efekt:
 - redukcia množstva agregátov
 - EGCG – predĺženie lag fázy
 - GA – vysoká agregáčna konštanta
- Morfologicky odlišné agregáty → 3-5 nm amyloidné fibrily; 40 – 60 nm zhluky fibríl a 200 nm vysoké amyloidné útvary



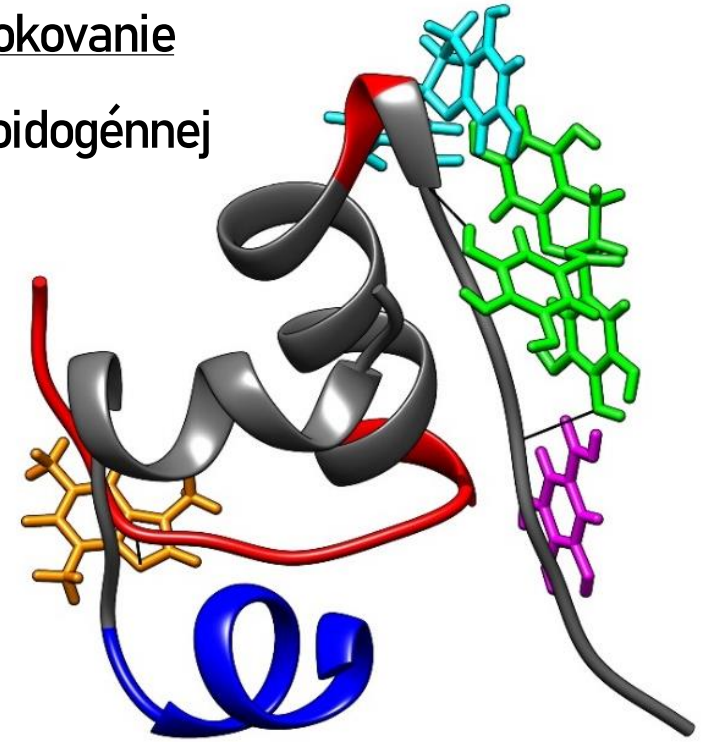
FT-IR – sekundárna štruktúra



- EGCG → zachovanie α -štruktúry
- Rôzne zmesi EGCG + iných zložiek čaju → formácia β -otočiek a úbytok štruktúry náhodného klobka

In silico experimenty – molekulárne dokovanie

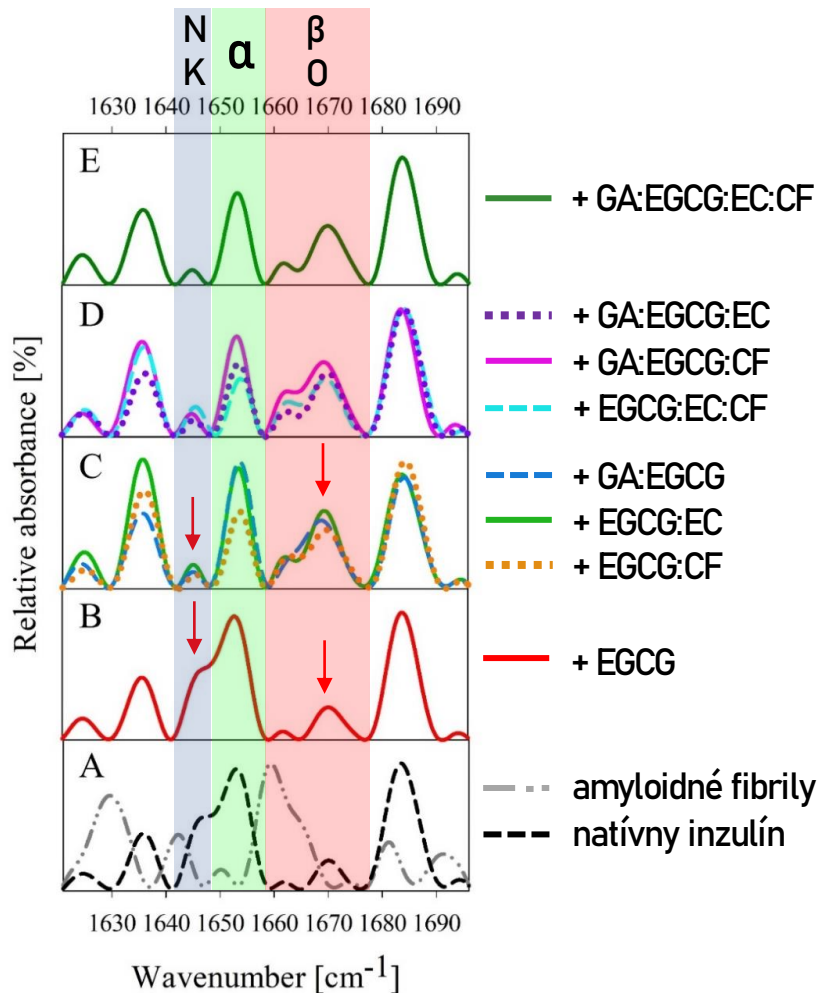
- GA + EGCG + EC → väzba do amyloidogénnej oblasti
- CF → väzba d'aleko od amyloidogénnych oblastí



Záver

- Rozdiely v morfológii amyloidných agregátov a kinetike agregácie → simultánny účinok rôznych intermolekulárnych komplexov látok + jednotlivých zložiek, kt. sa v procese agregácie uvoľňujú na základe ich stability → najefektívnejšia zmes → GA:EGCG

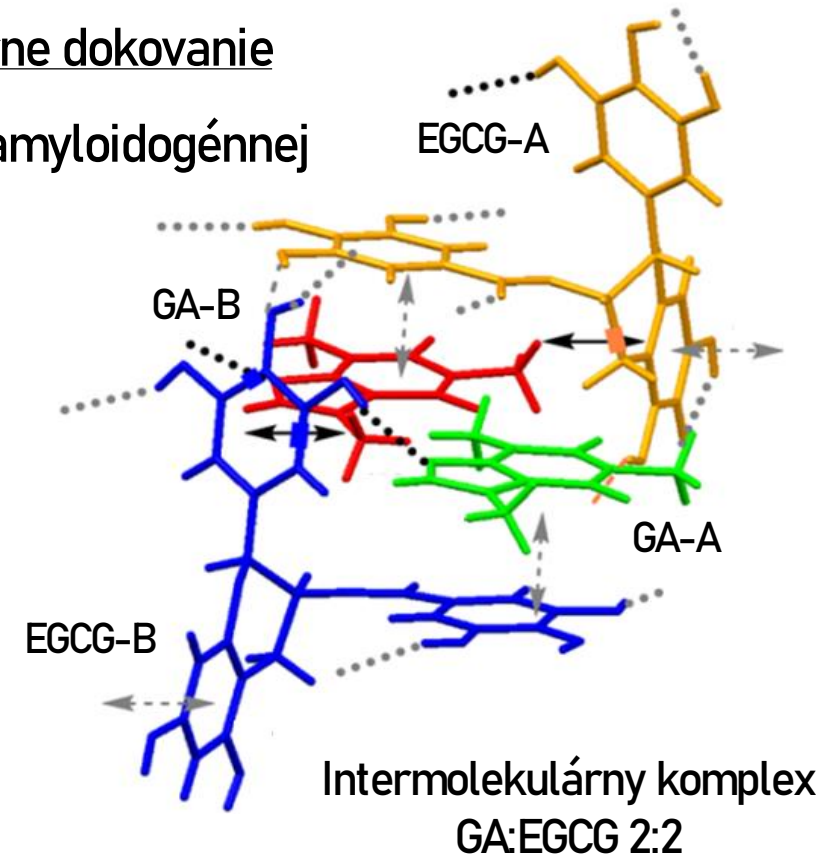
FT-IR – sekundárna štruktúra



- EGCG → zachovanie α -štruktúry
- Rôzne zmesi EGCG + iných zložiek čaju → formácia β -otočiek a úbytok štruktúry náhodného klobka

In silico experimenty – molekulárne dokovanie

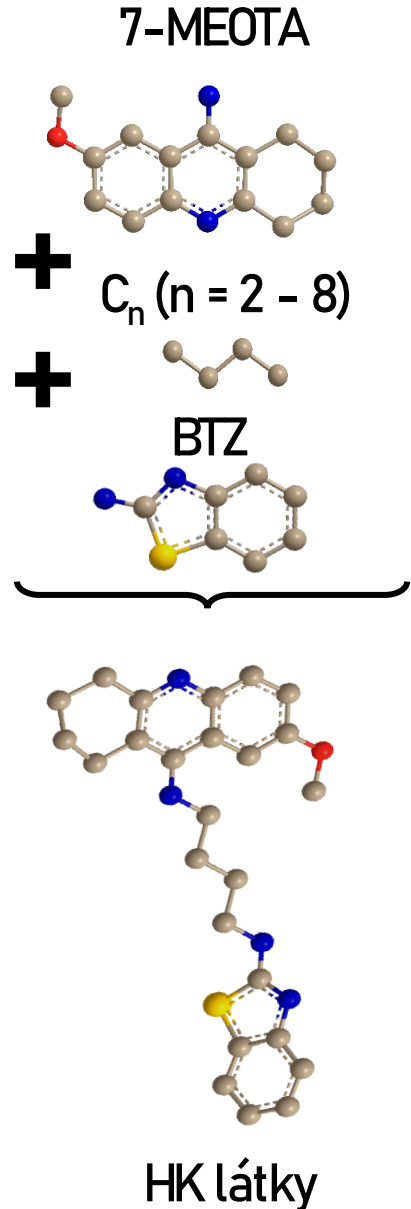
- GA + EGCG + EC → väzba do amyloidogénnej oblasti
- CF → väzba ďaleko od amyloidogénnych oblastí



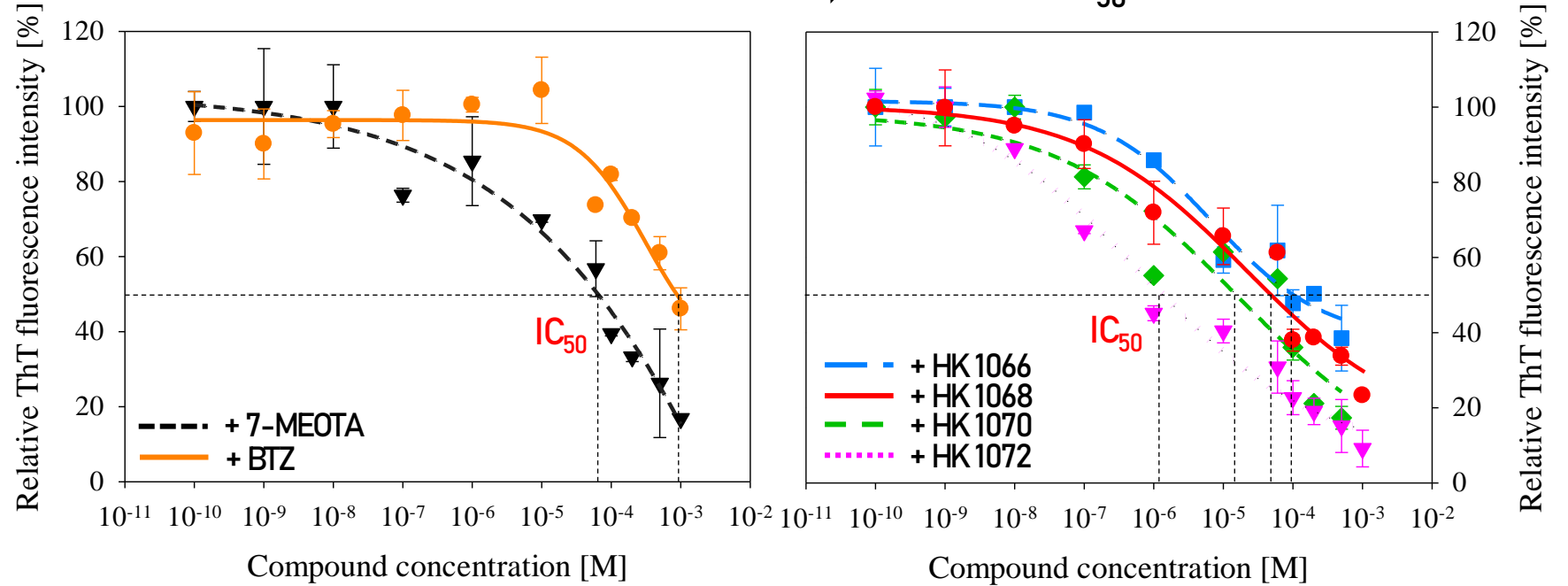
Záver

- Rozdiely v morfológii amyloidných agregátov a kinetike agregácie → simultánny účinok rôznych intermolekulárnych komplexov látok + jednotlivých zložiek, kt. sa v procese agregácie uvoľňujú na základe ich stability → najefektívnejšia zmes → GA:EGCG

Molekulárna hybridizácia → 7-MEOTA - BTZ heterodiméry → HK látky a ich vplyv na agregáciu lyzozýmu



Viazanie tioflavínu T, stanovenie IC₅₀



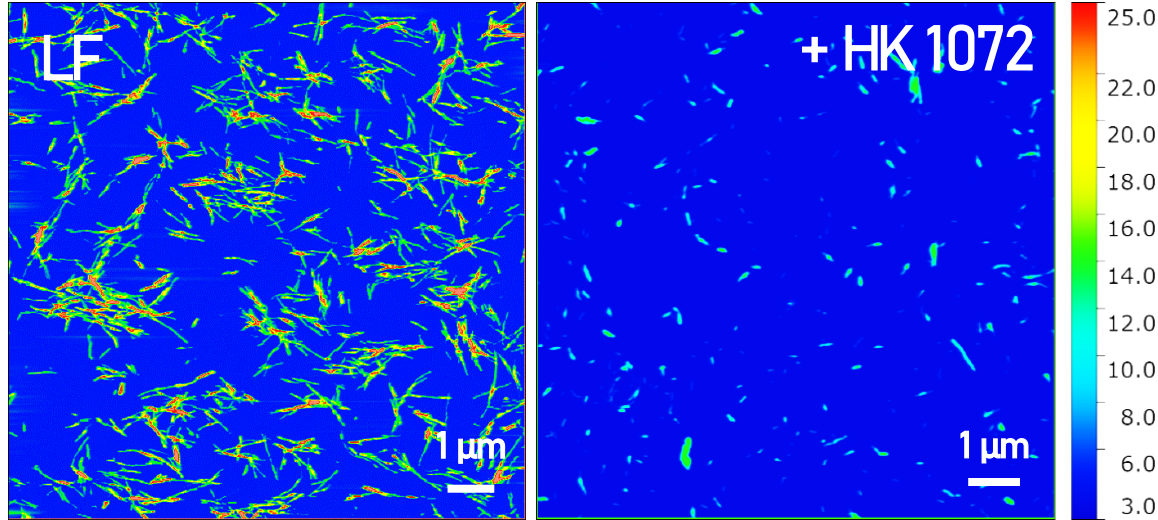
Závislosť IC₅₀ od dĺžky linkera

Látka	C _n	IC ₅₀ [μM]
7-MEOTA	-	66.8 ± 4.4
BTZ	-	871.4 ± 64.3
HK 1066	2	115.6 ± 11.3
HK 1068	4	48.7 ± 7.6
HK 1070	6	15.4 ± 0.9
HK 1072	8	1.59 ± 0.3



Vplyv HK látok na morfológiu a sekundárnu štruktúru amyloidných agregátov

AFM – kvantifikácia množstva agregátov

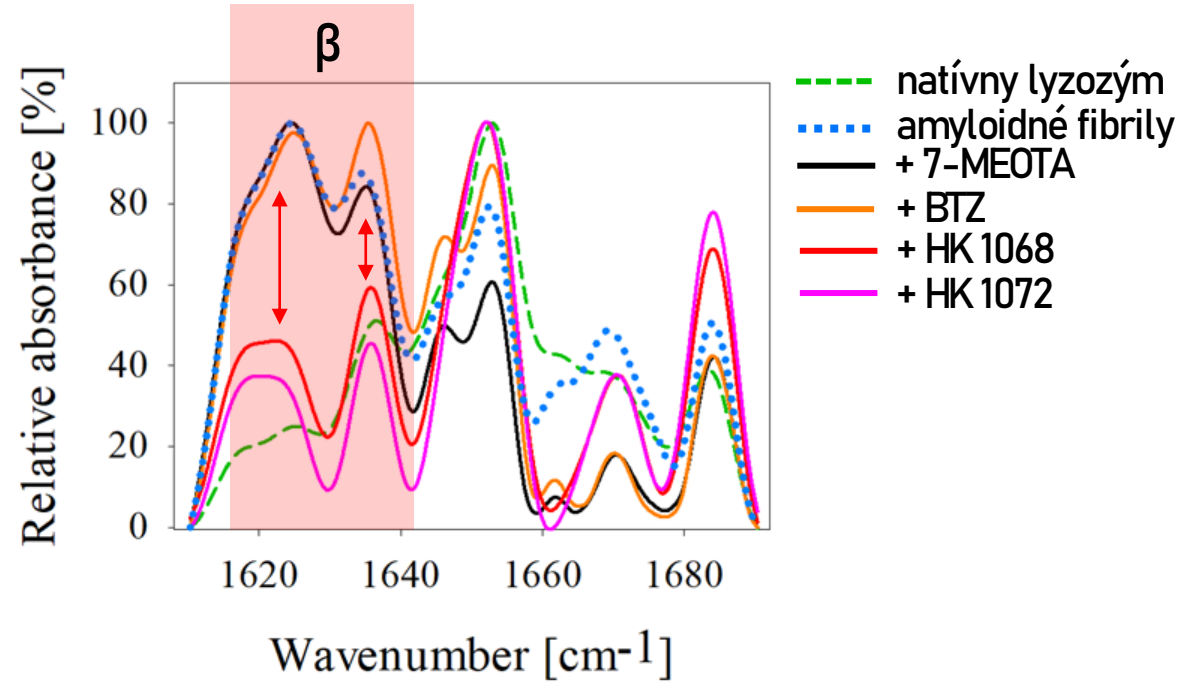


- Výrazný pokles množstva amyloidných agregátov
- Krátke fragmenty

Najúčinnejšia látka → HK 1072

↓
najdlhší linker (8 C)

FT-IR – sekundárna štruktúra



- V prítomnosti HK látok ↓ β štruktúry v porovnaní so samostatnými materskými molekulami

Mechanizmus účinku HK látok

In silico experimenty

- Korelácia s hodnotami IC_{50}
- vdW interakcie > elektrostatické interakcie
- Molekulárna dynamika (MM-PBSA) $\rightarrow \Delta G_v$

NMR experimenty

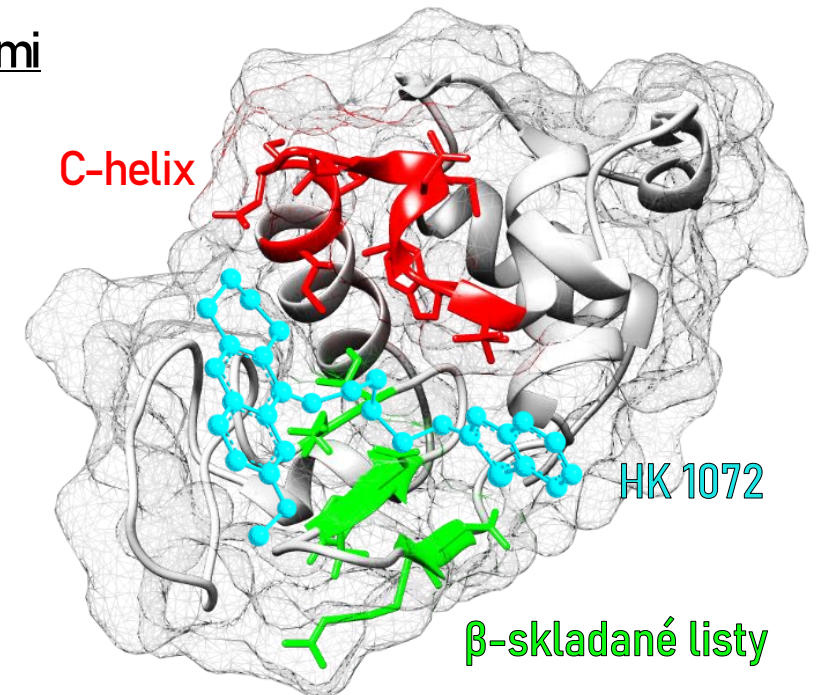
\rightarrow korelácia s *in silico* experimentmi \rightarrow množstvo interakcií s β -skladanými listami (43 – 63) a C-helixom (98-109)

\rightarrow alifatické C (linker) v tesnej blízkosti proteínu

Záver

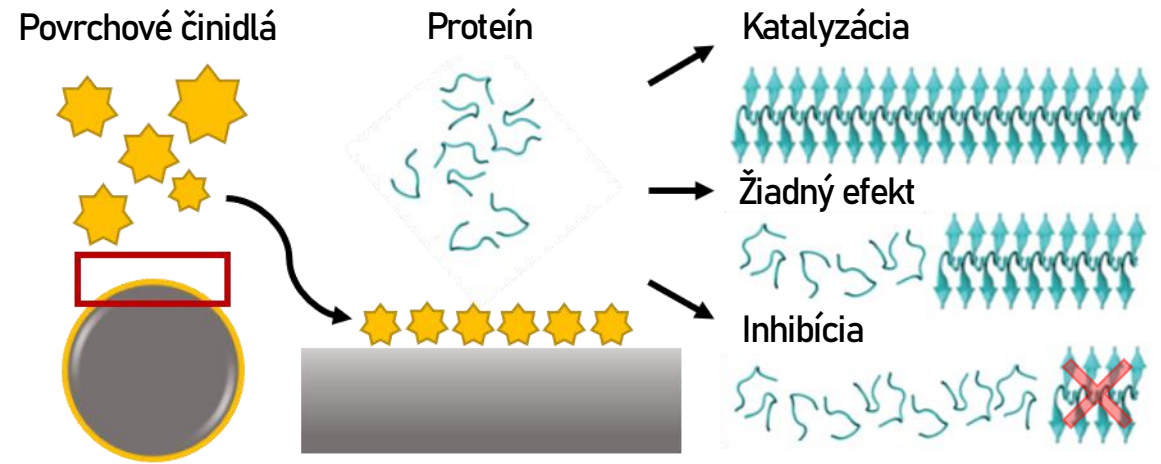
- **Najúčinnejšia látka \rightarrow HK 1072 (8 C) \rightarrow predlžujúci sa linker \rightarrow $\uparrow\uparrow\uparrow$ interakcia linkera s C-helixom (98 -109) \rightarrow \uparrow stabilizácia monoméru a sterická obštrukcia brániaca tvorbe amyloidných konformérov**

Látka	C_n	ΔG_v [kcal.mol ⁻¹]
BTZ	-	-7.4 \pm 2.4
7-MEOTA	-	-17.6 \pm 5.2
HK 1066	2	-15.8 \pm 3.2
HK 1068	4	-18.7 \pm 4.9
HK 1070	6	-27.2 \pm 4.7
HK 1072	8	-28.6 \pm 6.2



Povrchovo-modifikované magnetické nanočastice (Coat-MNPs) – vplyv na amyloidnú agregáciu lyzozýmu

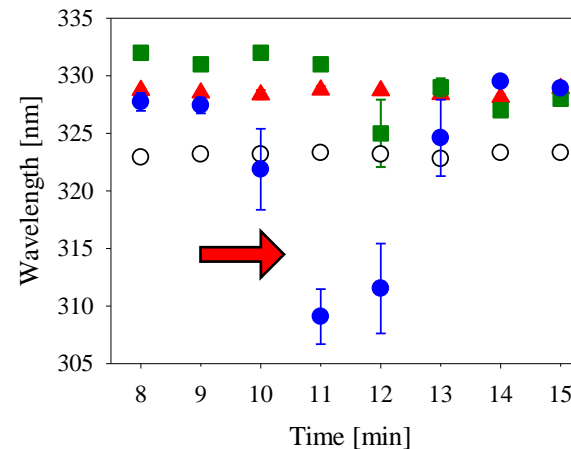
- Povrchové činidlá → modulácia efektu nanočastíc
 - Citrát trisodný (TC)
 - Arabská guma (GAR)
 - Kyselina cintrónová (CA)



Viazanie tioflavínu T, stanovenie IC_{50} a DC_{50}

Coat-MNPs	IC_{50} [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	DC_{50} [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]
TC-MNPs	183.1 ± 4.3	47.8 ± 2.3
GAR-MNPs	280.3 ± 2.7	86.7 ± 5.8
CA-MNPs	950.0 ± 1.8	83.9 ± 4.1

Posun fluorescenčného maxima fluorescencie tryptofánu



Vedecké aktivity 2019/2020

- Účasť na biofyzikálnom kongrese EBSA – ICBP-IUPAP Madrid
- Účasť a organizácia na konferencii Štruktúra a stabilita biomakromolekúl – SSB 2019
 - Najlepšia orálna prezentácia mladých vedeckých pracovníkov
- Získanie grantu NŠP (SAIA)
 - Študijný pobyt CNR Bologna (Feb. 2020)
- **26.8.2020 – obhajoba PhD.**

Vedecké výstupy počas trvania PhD. štúdia

ACS Chemical
Neuroscience Cite This: ACS Chem. Neurosci. 2018, 9, 2588–2598 pubs.acs.org/chemneuro Research Article

- **Compound CID 9998128 Is a Potential Multitarget Drug for Alzheimer's Disease**

Nguyen Quoc Thai,^{†,‡,§,◆} Zuzana Bednarikova,^{||,◆} Miroslav Gancar,^{||} Huynh Quang Linh,[§] Chin-Kun Hu,^{*,†,‡,||,▽} Mai Suan Li,^{*,○} and Zuzana Gazova^{*,||,◎}

IF-4.21; Q1

ACS Chemical
Neuroscience

pubs.acs.org/chemneuro Research Article

- **7-Methoxytacrine and 2-Aminobenzothiazole Heterodimers: Structure–Mechanism Relationship of Amyloid Inhibitors Based on Rational Design**

Miroslav Gancar,[†] Kiet Ho,[†] Sk. Abdul Mohid, Nguyen Quoc Thai, Zuzana Bednarikova, H. Linh Nguyen, Anirban Bhunia, Eugenie Nepovimova, Mai Suan Li,^{*} and Zuzana Gazova^{*}

IF-3.86; Q1

- **SCIENTIFIC REPORTS** Amyloid Aggregation of Insulin: An Interaction Study of Green Tea Constituents **IF-4.12; Q1**
natureresearch Miroslav Gancar¹, Elena Kurin^{2,✉}, Zuzana Bednarikova¹, Jozef Marek¹, Pavel Mucaj², Milan Nagy² & Zuzana Gazova^{1,✉}

<i>Kat.</i>	<i>Typ príspevku</i>	<i>Poč.</i>
ADM	Vedecké práce v zahraničných časopisoch registrovaných v databázach WOS / SCOPUS	3
AFG	Abstrakty zo zahraničných vedeckých konferencií	4
AFH	Abstrakty z domácich vedeckých konferencií	8
-	Citácie registrované v databázach WOS / SCOPUS	7

Ďakujem za pozornosť