

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

Charles University, Faculty of Science

Department of biochemistry

Doktorský studijní program: Biochemie

Doctoral study programme: Biochemistry

Autoreferát disertační práce

Summary of the Doctoral thesis



Výzkum a inhibice agregace alfa-synukleinu

Investigation and inhibition of α -synuclein aggregation

MSc. Kseniia Afitska

Školitel/Supervisor: Dmytro Yushchenko, PhD,

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences

Praha, 2019

Abstrakt

Alfa-synuklein (AS) je malý, vnitřně neuspořádaný protein exprimovaný v neuronech a hojně přítomný v synapsích, kde se podílí na regulaci transportu proteinů zprostředkovaném synaptickými vezikuly. Chybné poskládání AS do amyloidních fibril je klíčovým procesem v progresi Parkinsonovy choroby (PD), druhé nejběžnější neurodegenerativní nemoci, která je dosud neléčitelná.

Inhibice agregace AS a blokování šíření těchto fibril z buňky do buňky je slibná strategie pro léčbu PD. Racionální design těchto inhibitorů však zůstává komplikovaný vzhledem k nedostatku detailních znalostí o mechanismech agregace. Cílem této práce bylo proto získat hlubší znalosti o agregaci AS a aplikovat je na vývoj inhibitorů fibrilizace.

Při studiu mechanismů agregace AS jsem nejprve zjistila, že kritická koncentrace AS pro růst fibril je o řád nižší než kritická koncentrace AS pro počáteční tvorbu fibril z monomerů. Zkoumala jsem rozpad fibril při koncentracích nižších než K_d a charakterizovala jsem agregaci AS při mikromolárních koncentracích. Poté jsem zkoumala, jak různé modifikace C-terminálu AS (zejména extenze o různé velikosti a náboji) ovlivňují růst fibril a ukázala jsem, že fúze AS s proteiny, jako je GFP, potlačují agregaci AS.

Na základě těchto zjištění jsem ve spolupráci s kolegy vytvořila první racionálně navržený inhibitor, který blokuje růstová centra fibril AS. Jedná se o chimérický protein obsahující AS a globulární protein, který se váže na konec fibrily a vytváří stericou překážku pro následnou vazbu monomeru. Dokázali jsme, že ten inhibitor cílící na růstová centra fibril, která jsou mnohem méně hojná ve srovnání s monomerem AS, je účinný při velmi nízkých koncentracích. Dále jsme u tohoto typu inhibitorů zkoumali vztah mezi strukturou a účinností a definovali jsme zásadní vlastnosti molekuly inhibitoru pro jeho dobrou funkci. Konkrétně jsme prokázali lineární korelaci mezi účinností inhibitoru a jeho afinitou ke koncům fibril. Kromě toho jsme při hledání dalších způsobů, jak zlepšit účinnost inhibitoru, objevili také silné inhibiční vlastnosti kovalentních dimerů AS.

V souhrnu, v této studii jsem zkoumala determinanty agregace AS a společně se svými kolegy jsem vytvořila dosud neúčinnější inhibitory růstu fibril složených z AS.

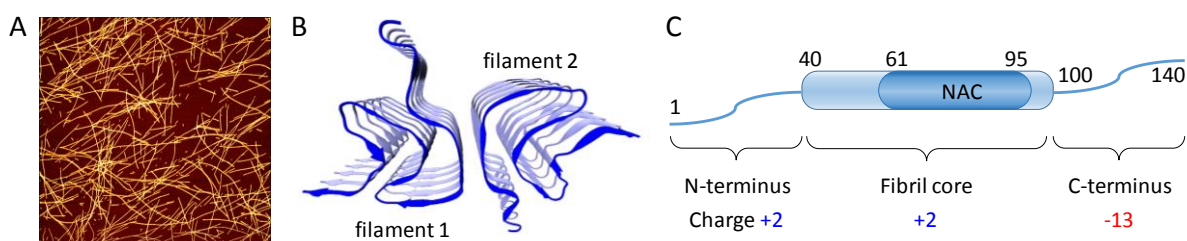
Úvod

Alfa-synuklein (AS) je malý (140 aminokyselin), vnitřně neuspořádaný protein, lokalizovaný primárně v presynaptických koncích neuronů [1, 2], kde se pravděpodobně podílí na regulaci transportu proteinů synaptickými vezikuly a na zprostředkování interakcí těchto vezikulů [3].

AS je spojen s rozvojem Parkinsonovy choroby (PD), progresivní neurodegenerativní poruchy charakterizované tvorbou inkluzí obsahujících AS (Lewyho tělíska) v mozku a ztrátou dopaminergních neuronů, které vedou k pohybovým poruchám [4]. Účinná léčba PD dosud neexistuje. Terapeutické přístupy, které se v současné době používají, jsou pouze symptomatické a většinou zahrnují udržování hladiny dopaminu nebo používání neuroprotektivních látek [5, 6].

Existuje mnoho důkazů, že AS souvisí s rozvojem PD. Zejména, multiplikace genu pro AS [7, 8] a missense mutace v něm [9] způsobují časný nástup PD. Bylo prokázáno, že hladiny mRNA pro AS v mozku pacientů s PD jsou zvýšené [10]. Po inokulaci zvířecích mozků předem vytvořenými fibrilami, AS získanými buď *in vitro* [11, 12] nebo z post mortem mozků pacientů s PD [13], byla pozorována buněčná propagace patologie PD a progresivní neurodegenerace. Přidání předem vytvořených fibril AS do kultivovaných neuronálních buněk způsobilo strukturální a funkční defekty [14]. Proto jsou amyloidní fibrily složené z nesprávně složeného AS považovány za odpovědné za cytotoxicitu a šíření patologie mezi buňkami během PD [15].

Fibrily AS jsou nekovalentní polymery, které se skládají z několika tisíc proteinových jednotek a dosahují délky několika mikrometrů (obr. 1A). Ve fibrilárním stavu tvoří AS molekula několik beta-řetězců (obr. 1B), které se spojují do rovnoběžných beta-skládaných listů vodíkovou vazbou se sousedními proteiny podél osy fibrily [16, 17]. Jedna fibrila má dva filameny, které se krouží okolo sebe [17, 18].

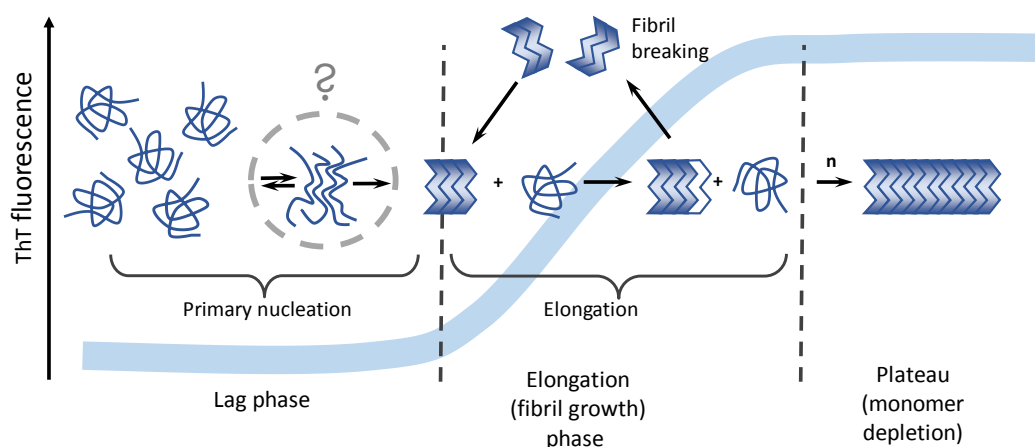


Obr. 1. A. Snímek (AFM) fibril AS na slídě, 10x10 μm . B. Struktura centra fibril AS podle dat z CryoEM (PDB ID: 6CU7) [17]. C. Schématická struktura AS.

Centrum fibrily AS se skládá převážně z oblasti NAC (obr. 1C), jež je proto pro fibrilizaci klíčová. N- a C-terminální oblasti AS jsou většinou flexibilní a nemají ve fibrilách žádnou výraznou sekundární strukturu [16]. Nicméně oba konce AS ovlivňují proces fibrilizace, například bylo prokázáno, že AS zkrácený na C-terminálu fibrilizuje rychleji [19, 20].

Fibrilizace AS je komplexní proces, který zahrnuje primární nukleaci, prodloužení a sekundární nukleaci způsobenou rozlomením fibrily. Souhra těchto procesů vede k sigmoidální kinetické křivce, která zahrnuje tzv. lag fázi, elongační fázi a plató (obr. 2).

Agregace začíná spojením monomerních proteinů do počátečních fibril. Tento proces se nazývá primární nukleace, protože tyto počáteční fibrily později slouží jako centra pro růst fibril (nuclei). Trvání této fáze (prodleva) *in vitro* je obvykle několik dní [21].



Obr. 2. Schematické znázornění procesu agregace.

Proces počátečního spojování monomerů do prvotních fibril není dosud vyjasněn kvůli přechodné povaze vznikajících produktů. Existuje hypotéza, že oligomerní meziproduct spojuje monomerní a fibrilární stavy AS [22, 23]. Oligomery AS s různou velikostí, strukturou a stabilitou byly připraveny a studovány mnoha výzkumnými skupinami [24]. Mezitím, souhra mezi monomery, oligomery a fibrilami není dosud dobře studována a v oboru neexistuje shoda ohledně toho, které oligomery jsou meziproducty tvorby fibril.

Druhou fází agregace AS je prodloužení počátečních fibril navázáním monomerů na konce fibril [25, 26]. Toto je mnohem rychlejší proces než primární nukleace fibril [27] a je to mechanismus, kterým se tvoří velká většina fibrilárního proteinu. Po dosažení určité délky se fibrily AS mohou zlomit, což vede k tvorbě nových konců fibril, které slouží jako nová centra růstu fibril [26]. Tento sekundární nukleární proces činí agregaci AS autokatalytickou a vede k drastickému zrychlení fibrilizace po vytvoření prvotních fibril [26].

Agregace AS *in vitro* je studována pomocí barviva Thioflavinu T (ThT), které silně zvyšuje svou intenzitu fluorescence po interkalaci do amyloidních fibril [28]. Intenzita fluorescence ThT je úměrná koncentraci amyloidních fibril a může být použita pro měření rychlosti růstu fibril.

Jelikož fibrilizace AS je autokatalytická reakce, přidání předem vytvořených fibril do roztoku monomerů AS zrychluje růst fibril a obchází lag fázi. Tento proces vede k přenosu patologie PD mezi neurony v důsledku šíření fibril AS. Proto je inhibice růstu a schopnosti fibril AS být agregačními jádry považována za slibnou strategii pro prevenci AS toxicity a neurodegenerace spojené s PD [6, 29].

Dosud bylo popsáno několik přístupů k inhibici fibrilizace AS. Ukázalo se, že stabilizace monomerní formy AS pomocí aptamerů DNA [30] nebo uměle vytvořeného peptidu beta-wrapinu [31] inhibuje fibrilizaci AS. Bylo popsáno, že různé typy protilátek zpomalují fibrilizaci AS vazbou na oligomerní formu AS [32, 33]. Několik malých aromatických molekul (EGCG, dopamin, Amph [35], SynuClean-D [36], na bázi mannitolu [34]) interkaluje do amyloidních fibril AS a destabilizuje je. Nicméně, všechny inhibitory, které cílí na hojně typy AS, jsou účinné pouze v koncentracích srovnatelných s koncentrací AS (až 22 μM v neuronech [1]). Slibnější jsou inhibitory, které blokují vzácné entity (např. centra růstu fibril) a působí tak v mnohem nižších koncentracích. Blokování může být dosaženo vazbou inhibitorů na konce fibril AS, které tak zabrání jejich prodloužení. Tento mechanismus inhibice byl navržen pro proteiny teplotního šoku (Hsp) [37-39] a di-tyrosinové dimery AS [40], které fungují jako inhibitory při nízkých mikromolárních koncentracích.

Cíle práce

1. Zkoumání mechanismu agregace AS:
 - a) stanovení kritických koncentrací tvorby fibril AS a jejich růstu;
 - b) testování vlivu strukturních modifikací AS na kinetiku agregace (ve fázi tvorby fibril a růstu fibril).
2. Vývoj inhibitorů fibrilizace AS:
 - a) návrh a příprava sloučenin, které působí jako inhibitory při substechiometrických koncentracích;
 - b) definování mechanismu inhibice;
 - c) zkoumání vztahu mezi strukturou inhibitoru a jeho aktivitou.

Materiál a metodika

Plazmidy pro expresi proteinů byly buď poskytnuty externími laboratořemi nebo byly vytvořeny molekulárním klonováním v naší laboratoři.

Všechny proteiny byly **exprimovány** v *E. coli* (BL21 DE3 nebo BL21 NiCo). AS, mutanty AS obsahující extenze o 6, 12, 22 aminokyselinách a Cys mutanty AS byly purifikovány pomocí chromatografie iontovou výměnou, zatímco AS-GFP a inhibitory sestávající z AS a objemné skupiny byly purifikovány pomocí His-tag za použití Ni-NTA nosiče.

Tvorba fibril a jejich růst během **agregačních experimentů** byly monitorovány měřeními fluorescence Thioflavinu T (ThT) na čtečce destiček Tecan.

Při studiu počáteční tvorby fibril (primární nukleace) jsme určili prodlevu fibrilizace za různých podmínek. Prodleva byla stanovena jako čas potřebný pro začátek tvorby fibril, který byl detekován zvýšením fluorescence ThT. Rychlost tvorby fibril byla vypočtena jako převrácená hodnota času prodlevy.

Pro studium prodlužování fibril odděleně od tvorby fibril jsme prováděli agregaci s agregačními jádry. Agregační jádra byla připravena sonikací úplně fibrilizovaného vzorku a byla přidána v 1 až 2 mol % do agregačního roztoku. Rychlost růstu fibril byla vypočtena ze sklonu lineární části kinetické křivky.

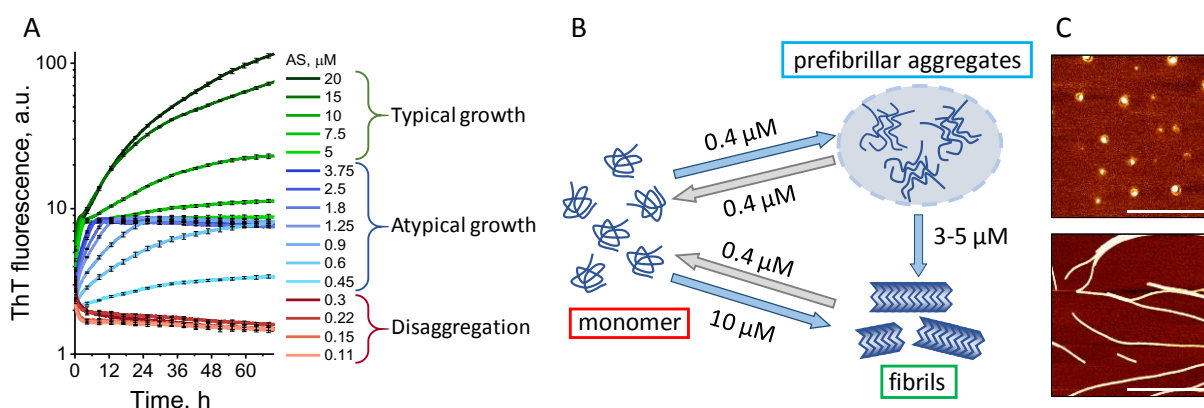
Morfologie (výška, délka, periodicita) agregátů byla charakterizována pomocí mikroskopie **AFM**. Odhad zastoupení struktury beta-skládaného listu v agregovaných vzorcích byl proveden s pomocí **spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD)**. Distribuce velikosti agregátů ve vzorcích byla měřena **dynamickým rozptylem světla (DLS)**. Ve studovaných agregátech AS jsme zkoumali hydrataci a polaritu okolí AS prostřednictvím agregace AS, který byl značen **barvivy citlivými na prostředí** a zaznamenávali jsme fluorescenční emisní spektra agregátů. Pro stanovení afinity monomeru AS nebo inhibitoru ke konci fibril jsme označili protein a následně jsme měřili **anisotropii fluorescence**.

Pro srovnání účinnosti studovaných inhibitorů jsme vypočítali hodnotu **IC₅₀**. Poměr rychlosti růstu fibril v přítomnosti a v nepřítomnosti inhibitoru byl vynesena jako funkce koncentrace inhibitoru. Koncentrace inhibitoru, která odpovídala dvojnásobnému snížení rychlosti růstu fibril, byla brána jako IC₅₀.

Výsledky a diskuse

Agregace AS při nízkých koncentracích

Fibrilizace AS je složitý patologický proces podléjící se na rozvoji PD. Má dvě fáze: tvorba fibril a růst fibril. Kinetika obou fází závisí na koncentraci. V této studii jsme se rozhodli zaplnit mezeru ve znalostech agregace AS při nízkých mikromolárních koncentracích (0,11 až 20 μM). K oddělenému studiu tvorby a růstu fibril byly provedeny některé z agregačních experimentů v přítomnosti agregačních jader - krátkých zralých fibril, které umožňují růst fibril prostřednictvím vazby monomeru na své konce.



Obr. 3 A. Kinetika růstu fibril při různých koncentracích AS. B. Interkonverze monomerů AS, fibril a prefibrilárních amyloidních agregátů. C. AFM snímek prefibrilárních agregátů AS (výše) a fibril AS (dole).

V závislosti na koncentraci AS jsme pozorovali tři typy kinetického chování:

	Nepřítomnost fibrilizace; disagregace fibril	Atypická kinetika	Typická kinetika
Tvorba fibril	<0.4 μM	0.4-10 μM	>10 μM
Růst fibril	<0.4 μM	0.4-3.5 μM	>3.5 μM

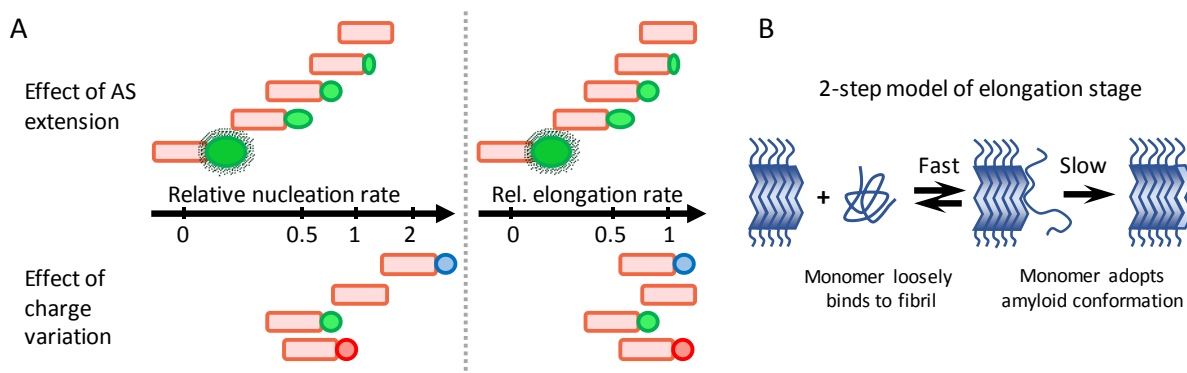
Minimální koncentrace AS monomeru (kritická koncentrace) požadovaná pro tvorbu *de novo* fibril (10 μM , v souladu s údaji z literatury) byla mnohem vyšší než kritická koncentrace růstu fibril ($\sim 0,4 \mu\text{M}$). Ukázali jsme, že fibrily disagregují, pokud je celková koncentrace proteinu pod kritickou koncentrací růstu fibril.

Také jsme charakterizovali agregáty, které se objevily při koncentracích 0,45 až 3,5 μM a byly zodpovědné za atypickou kinetiku agregace AS při těchto koncentracích. Definovali jsme je jako prefibrilární amyloidní agregáty, ač nemají morfologii fibril, jsou svými rysy více podobné fibrilám než monomeru AS.

Tyto výsledky byly publikovány: [Afitska K](#), Fucikova A, Shvadchak VV, Yushchenko DA. α -Synuclein aggregation at low concentrations. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019; 1867:701-9. IF=2.5. Můj přínos: plánovala jsem výzkumný projekt a provedla převážnou většinu experimentů a zpracování dat. Napsala jsem první verzi rukopisu.

Agregace AS: vliv extenzí na C-terminálu

V mnoha studiích *in vivo* je vizualizace AS dosažena fúzí s fluorescenčními proteiny, jako je GFP, ale jejich možný vliv na chování AS se obvykle zanedbává. K vyřešení tohoto problému jsme provedli agregaci mutantů AS nesoucích na C-terminálu extenze s různou velikostí (6, 12, 22 a 250 aminokyselin) a nábojem (+5, 0, -5). Ukázali jsme, že tvorba fibril je ovlivněna nábojem i velikostí těchto extenzí, zatímco růst fibril je ovlivněn pouze velikostí extenze. AS fúzovaný s GFP se neagregoval vůbec, nejspíše kvůli sterickým zábranám, což jasně ukazuje nevhodnost použití AS s navázanými peptidy nebo proteiny pro studium agregace. To je zvláště důležité pro studie v buněčných kulturách, kde se nejčastěji používá AS-GFP. Podle našich znalostí jsme byli první, kdo demonstroval negativní vliv extenze C-terminálů na schopnost agregovat. Navíc neprokázání jakéhokoli vlivu náboje na fázi růstu fibril nás přiměla navrhnout dvoustupňový model růstu fibril. Navrhli jsme, že první relativně rychlý krok závislý na náboji (volná vazba monomeru na konec fibrily) je následován rychlost limitujícím krokem, který je na náboji nezávislý (monomer přijme amyloidní konformaci).

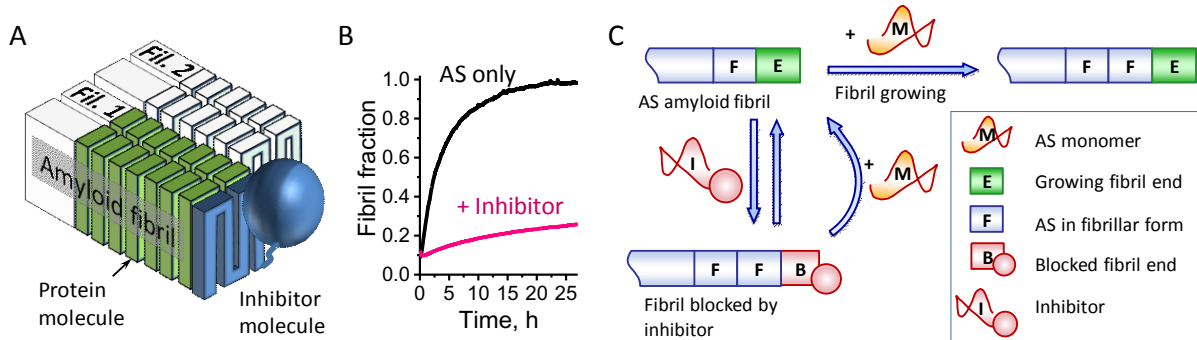


Obr. 4. A. Efekt extenzí AS o různých délkách a nábojích na rychlost primární nukleace a na rychlost růstu fibril. B. Dvoustupňový model růstu fibril.

Tyto výsledky byly publikovány: [Afitska K](#), Fucikova A, Shvadchak VV, Yushchenko DA. Modification of C-terminus provides new insights into the mechanism of α -synuclein aggregation. *Biophys J.* 2017;113:2182-91. IF=3.5. Můj přínos: Podílela jsem se na návrhu sady mutantů použitých v práci, připravila jsem všechny proteiny a provedla většinu experimentů. Aktivně jsem se podílela na analýze dat a napsala první verzi rukopisu.

Inhibice fibrilizace AS blokováním konců fibril

Blokování konců fibril (které slouží jako centra růstu fibril) je slibný přístup k vytváření účinných inhibitorů růstu fibril. Dříve jsme zjistili, že AS-GFP nefibrilizuje ani po přidání předem vytvořených fibril. Podle předpokladu, že protein nefibrilizoval, protože skupina GFP stericky bránila konec fibril, jsme se rozhodli použít tuto strategii pro inhibici růstu fibril.



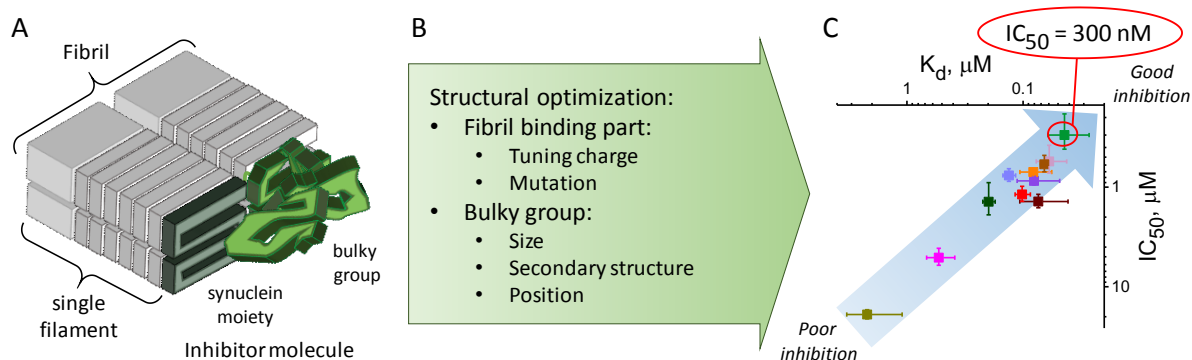
Obr. 5. A. Schematické znázornění inhibitoru AS-2L blokujícího konec AS fibril. B. Inhibitor AS-2L zpomaluje fibrilaci AS. C. Schematické znázornění inhibice.

Vytvořili jsme chimérický protein sestávající ze dvou částí: AS, který je zodpovědný za vazbu na konec fibrily, a objemná globulární skupina 2L, která by měla vytvářet sterickou překážku pro vazbu monomeru na konec fibrily. Výsledný protein AS-2L účinně inhiboval růst fibril, vykazující $IC_{50} \sim 1 \mu M$. Zkoumali jsme kinetický mechanismus inhibice AS-2L a stanovili jsme vlastnosti inhibitoru, které lze dále vylepšit, aby se zvýšila jeho inhibiční aktivita. Navíc jsme prokázali proveditelnost inhibice růstu fibril AS blokováním jejich konců.

Tyto výsledky byly publikovány: Shvadchak VV, Afitska K, Yushchenko DA. Inhibition of α -synuclein amyloid fibril elongation by blocking fibril ends. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2018;57:5690-4. IF=12.3. Můj přínos: připravila jsem všechny proteiny, provedla část experimentů a podílela jsem se na revizi a editaci rukopisu.

Inhibice fibrilizace AS: optimalizace struktury inhibitorů

Výše uvedený inhibitor AS-2L účinně zpomaluje růst fibril blokováním konců fibril, které však mohou být poté reaktivovány v důsledku disociace molekuly inhibitoru z konce fibrily a neúplné sterické překážky. K vyřešení tohoto problému jsme provedli optimalizaci struktury molekuly inhibitoru a vytvořili jsme 14 nových inhibitorů, které mají modifikace v části vážící se na fibrily a které obsahují objemné skupiny s různou sekundární strukturou, velikostí a v různé pozici.



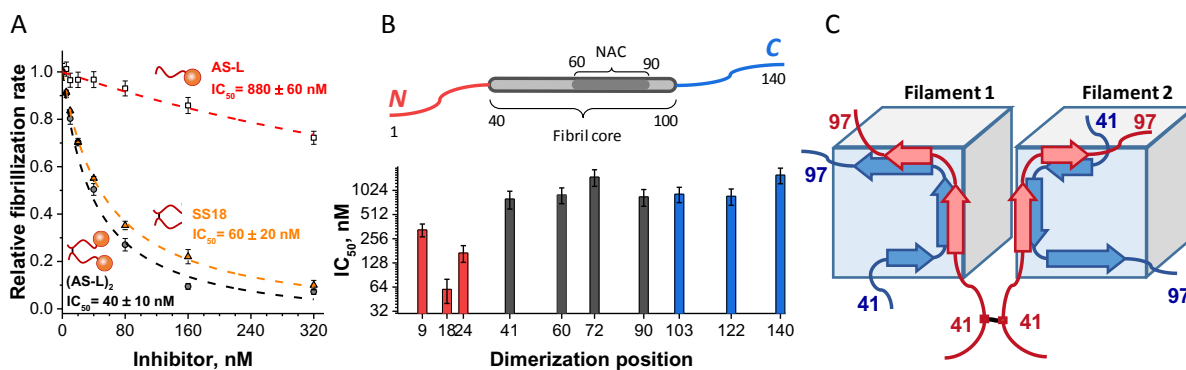
Obr. 6. A. Schematické znázornění vazby inhibitoru na oba filameny na konci fibrily. B. Optimalizace struktury inhibitoru. C. Účinnost inhibitoru závisí na afinitě inhibitoru ke konci fibrily.

Studovali jsme vztah mezi strukturou a funkcí nově vytvořených inhibitorů a definovali jsme jejich vlastnosti, které jsou důležité pro účinnou inhibici. Ukázali jsme, že účinnost inhibitoru v blokování růstu fibril je úměrná afinitě inhibitoru ke konci fibril. Předpokládali jsme, že zatímco AS část inhibitoru interaguje s koncem jednoho filamentu fibrily, objemná skupina bohatá na beta-skládaný list interaguje s koncem druhého filamentu, čímž se zvyšuje celkový počet vodíkových vazeb mezi molekulou inhibitoru a koncem fibrily.

Výsledky této práce jsou shrnuty v rukopisu “Afítska K, Priss A, Yushchenko DA, Shvadchak VV. Structural optimization of inhibitors of α -synuclein fibril growth: affinity to the fibril end as a crucial factor”, který je v současné době revidován v *Journal of Molecular Biology* (IF=5). Můj přínos: navrhla jsem pro tuto studii sadu proteinů, všechny jsem exprimovala a purifikovala. Provedla jsem většinu agregačních experimentů a zpracovala jsem data, napsala jsem první verzi rukopisu.

Inhibice fibrilizace AS: dimery AS jako inhibitory

Abychom dále zlepšili inhibitory růstu fibril, zaměřili jsme se na zvýšení jejich afinity ke konci fibril dimerizační molekulou inhibitoru. Skutečně, dimerizovaný AS-L vykazoval mnohem silnější inhibiční účinnost ve srovnání s monomerním AS-L. K našemu překvapení měl dimer AS použitý jako kontrola, téměř stejnou účinnost jako dimer AS-L. Tato skutečnost nás vedla k podrobnějšímu zkoumání inhibice fibrilizace AS pomocí dimerů AS. Připravili jsme sadu disulfidových dimerů AS s kovalentní vazbou v různých pozicích a demonstrovali jsme, že dimery spojené v N-terminálu AS byly mnohem účinnější (nízká nanomolární hodnota IC_{50}) ve srovnání s dimery, které byly spojené v centru fibrily nebo v C-terminálu. Předpokládáme, že dimer navázaný ve změněné konformaci blokuje konec fibrily proti následné vazbě monomeru, a proto inhibuje růst fibril.



Obr. 7. Rychlost fibrilace jako funkce koncentrace inhibitoru AS-L, jeho dimeru a AS dimeru SS18. B. Účinnost inhibice dimerů AS závisí na poloze kovalentní vazby v dimerní molekule. C. Možná konformace dimerního inhibitoru na konci fibril.

Výsledky této práce jsou shrnuty v rukopisu “Kyriukha Y, Afitska K, Kurochka AS, Sachan S, Galkin M, Yushchenko DA, Shvadchak VV. α -Synuclein dimers as potent inhibitors of fibrillization”, který je v současné době revidován v Journal of Medicinal Chemistry (IF=6). Můj přínos: připravila jsem některé proteiny, provedla část agregačních experimentů a podílela se na revizi a editaci rukopisu.

Závěry

V této práci jsme zkoumali dvě fáze agregace AS, a to tvorbu fibril a růst fibril. Ukázali jsme, že pro tvorbu fibril a růst fibril jsou nutné různé minimální koncentrace monomeru AS. Pozorovali jsme disagregaci fibril pod kritickou koncentrací AS nutnou pro růst fibril a charakterizovali jsme agregaci AS při nízkých koncentracích. Kromě toho jsme odhalili, že tvorba fibril a růst fibril jsou různě ovlivněny AS C-terminálními extenzemi různých nábojů a velikostí, a navrhli jsme dvoustupňový model růstu fibril. Jasně jsme prokázali, že fúze AS s jinými peptidy nebo proteiny, jako je GFP, potlačuje jeho agregaci.

Dále jsme vytvořili inhibitor růstu fibril na bázi proteinu, který působí tak, že blokuje konce fibril a znemožňuje následnou vazbu monomeru, a popsali jsme mechanismus inhibice. Za účelem zlepšení účinnosti inhibitoru jsme zkoumali, které strukturní vlastnosti molekuly inhibitoru jsou důležité pro inhibiční aktivitu, a zjistili jsme, že je úměrná afinitě inhibitoru k konci fibrily. Později jsme objevili silné inhibiční vlastnosti dimerů AS. Charakterizovali jsme vztah mezi pozicí dimerizace a inhibiční účinností dimerů a navrhli mechanismus inhibice.

Naše inhibitory, které blokují konce fibril, jsou účinné v nanomolárních koncentracích a jsou v současnosti nejúčinnějšími inhibitory růstu fibril AS. Věříme, že tato práce je důležitým krokem ve vývoji terapie PD a pomůže vytvořit inhibitory dalších amyloidních onemocnění.

Seznam publikací

Publikace zahrnuté v disertační práci:

1. **Afitska K**, Fucikova A, Shvadchak VV, Yushchenko DA. α -Synuclein aggregation at low concentrations. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019; 1867:701-9. IF=2.5
2. **Afitska K**, Fucikova A, Shvadchak VV, Yushchenko DA. Modification of C-terminus provides new insights into the mechanism of α -synuclein aggregation. *Biophys J*. 2017; 113:2182-91. IF=3.5
3. Shvadchak VV, **Afitska K**, Yushchenko DA. Inhibition of α -synuclein amyloid fibril elongation by blocking fibril ends. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2018; 57:5690-4. IF=12.3
4. **Afitska K**, Priss A, Yushchenko DA, Shvadchak VV. Structural optimization of inhibitors of α -synuclein fibril growth: affinity to the fibril end as a crucial factor. In revision in *J Mol Biol*. IF=5
5. Kyriukha Y, **Afitska K**, Kurochka AS, Sachan S, Galkin M, Yushchenko DA, Shvadchak VV. α -Synuclein dimers as potent inhibitors of fibrillization. In revision in *J Med Chem*. IF=6

Publikace nezahrnuté v disertační práci:

6. Shvadchak VV, Kucherak O, **Afitska K**, Dziuba D, Yushchenko DA. Environmentally sensitive probes for monitoring protein-membrane interactions at nanomolar concentrations. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017;1859:852-9. IF=3.8

Curriculum vitae

Kseniia Afitska

Datum narození: červenec 16, 1991 (Kamjanec'-Podil's'kyj, Ukrajina)

Občanství: Ukrajina

Vzdělání

od 09.2015	doktorandka na PřF Univerzitě Karlově v Praze, oddělení Biochemie
od 02.2015	doktorandka, Ústav organické chemie a biochemie, Praha, ČR
02.2014 – 07.2014	vědecká asistentka, Lékařská fakulta, TU Dresden, Německo
09.2012 – 06.2014	MSc v Biochemii (diplom s vyznamenáním), ESC Biologický ústav, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukrajina. Diplomová práce "Role of dopaminergic system in pathogenesis of ulcerative colitis" byla provedena ve spolupráci s Lékařskou fakultou, TU Dresden
09.2009 – 05.2012	BSc v Biologii (diplom s vyznamenáním), ESC Biologický ústav, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukrajina

Ocenění

2019	cestovní stipendium, Biophysical Society 63 rd Annual Meeting, Baltimore, USA
2019	studentská cena, Biophysical Society 63 rd Annual Meeting, Baltimore, USA
2017	osvobození od poplatku za registraci, EMBO EMBL Symposium: Molecular and Cell Biology of Membranes, Heidelberg, Germany
2013	studentská cena za fyziologii 2012, British Physiological Society
2012	1.cena, X International Interdisciplinary Scientific Conference "Shevchenkivska vesna 2012. Life sciences"

Další informace

Jazyky: ukrajinský (rodný jazyk), anglický (FCE, C1), ruský, německý a český

Účast na konferencích (poster)

- Biophysical Society 63rd Annual Meeting, Baltimore, USA (2019)
- 5th International Conference on Molecular Neurodegeneration, ICMN2018, Stockholm, Sweden (2018)
- EMBO | EMBL Symposium: Molecular and Cell Biology of Membranes, Heidelberg, Germany (2017)
- 20th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, Netherlands (2012)
- X International Interdisciplinary scientific conference "Shevchenkivska vesna. Life sciences", Kyiv, Ukraine (2012)

Publikace

Autorka 4 publikací ve mezinárodních časopisech

ORCID: 0000-0002-3807-6989

Abstract

α -Synuclein (AS) is a small intrinsically disordered protein expressed in neurons and abundantly present in synapses where it is involved in regulation of synaptic vesicle-mediated protein trafficking. Misfolding of AS into amyloid fibrils is a key process in progression of Parkinson's disease (PD), the second most common neurodegenerative disorder which has no cure to date.

Inhibition of AS aggregation and blocking of cell-to-cell spreading of AS fibrils is a promising strategy for PD treatment. However, rational design of inhibitors of this type remains complicated due to the lack of thorough knowledge about the mechanisms of aggregation. Therefore, the aim of this thesis was to gain deeper knowledge about AS aggregation and to apply it for developing inhibitors of AS fibrillization.

In my work on the mechanisms of AS aggregation, I first determined that the concentration of AS that enables the fibril growth is an order of magnitude lower than the concentration of AS required for initial fibril formation from monomers. I explored fibril disaggregation at AS concentrations below its K_d value, and characterized AS aggregation at low micromolar concentrations. I then investigated how different modifications of AS C-terminus (namely, extensions of various sizes and charges) affect fibril growth and demonstrated that fusions of AS with proteins such as GFP suppress AS aggregation.

Based on these findings, together with my colleagues I created the first rationally designed inhibitor that blocks AS fibril growth centres. It is a chimeric protein containing AS and a globular protein that binds to the fibril end and creates steric hindrance to subsequent monomer binding. We showed that this inhibitor targeting fibril growing centres, which are much less abundant compared to AS monomers, is efficient at very low concentrations. Furthermore, we explored the structure-activity relationship of inhibitors of this type and defined the properties of inhibitor molecules that are crucial for good inhibitory activity. Namely, we demonstrated a linear correlation between inhibitor activity and its affinity to the fibril ends. Moreover, in a search of further ways to improve the inhibitor's activity, we also discovered potent inhibition properties of covalent dimers of AS.

To sum up, in this study I investigated determinants of AS aggregation and together with my colleagues I created the most efficient inhibitors of AS fibril growth known to date.

Introduction

α -Synuclein (AS) is a small (140 amino acids) intrinsically disordered protein localized primarily in the presynaptic termini of neurons [1, 2], where it presumably participates in the regulation of synaptic vesicle-mediated protein trafficking and in mediating vesicle interactions [3].

AS is associated with the development of Parkinson's disease (PD), a progressive neurodegenerative disorder characterized by the formation of AS-containing inclusions (Lewy bodies) in the brain and the loss of dopaminergic neurons that leads to a debilitating movement disorder [4]. An effective cure for PD has not been developed yet. The therapeutic approaches currently used are only symptomatic treatments and mostly include maintaining dopamine levels or using neuroprotective agents [5, 6].

There is a lot of evidence for AS involvement in PD development. Namely, multiplication of the AS gene [7, 8] and missense mutations in it [9], which cause early onset of PD. Levels of AS mRNA were shown to be elevated in brains of PD patients [10]. Cell-to-cell propagation of PD pathology and progressive neurodegeneration were observed after inoculation in animal brains of pre-formed AS fibrils, either obtained *in vitro* [11, 12] or derived from post-mortem brains of PD patients [13]. Addition of pre-formed AS fibrils to cultured neuronal cells caused structural and functional defects [14]. Therefore, amyloid fibrils composed of misfolded AS are considered responsible for cytotoxicity and cell-to-cell spreading of pathology during PD [15].

AS fibrils are non-covalent polymers that consist of several thousands of protein units and reach several micrometers in length (Fig. 1A). In a fibrillar state an AS molecule folds to form several β -strands (Fig. 1B), which assemble into parallel β -sheets through hydrogen bonding with neighboring proteins along the fibril axis [16, 17]. One fibril has two filaments that twist around each other [17, 18].

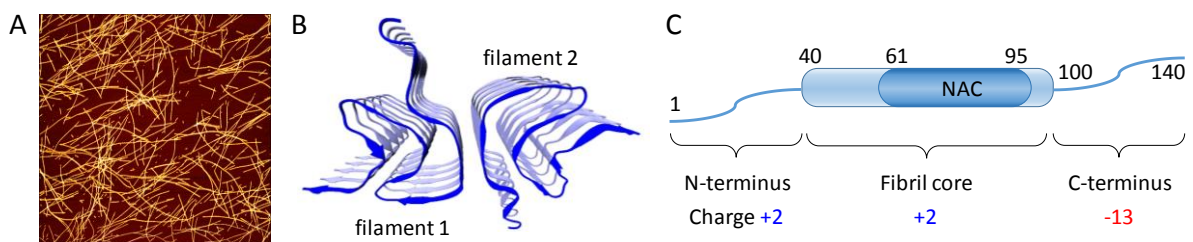


Fig. 1. A. AFM image of AS fibrils on mica, 10x10 μm . B. Structure of AS fibril core, according to CryoEM data (PDB ID: 6CU7) [17]. C. Schematic structure of AS.

The fibril core consists mostly of the NAC region of AS (Fig. 1C), which is therefore crucial for fibrillization. The N- and C-terminal regions of AS are mostly flexible and do not possess any distinct secondary structure in a fibril [16]. Nevertheless, both AS termini affect the process of fibrillization, for instance, C-terminally truncated AS was shown to fibrillize faster [19, 20].

AS fibrillization is a complex process that includes primary nucleation, elongation, and secondary nucleation caused by fibril breaking. Interplay of these processes results in the sigmoidal kinetic curve that includes lag phase, elongation phase and plateau (Fig. 2).

Aggregation starts from the assembling of monomeric proteins into initial fibrils. This process is called primary nucleation, because these first fibrils later serve as fibril growing centers (nuclei). Duration of this phase (lag time) *in vitro* is usually several days [21].

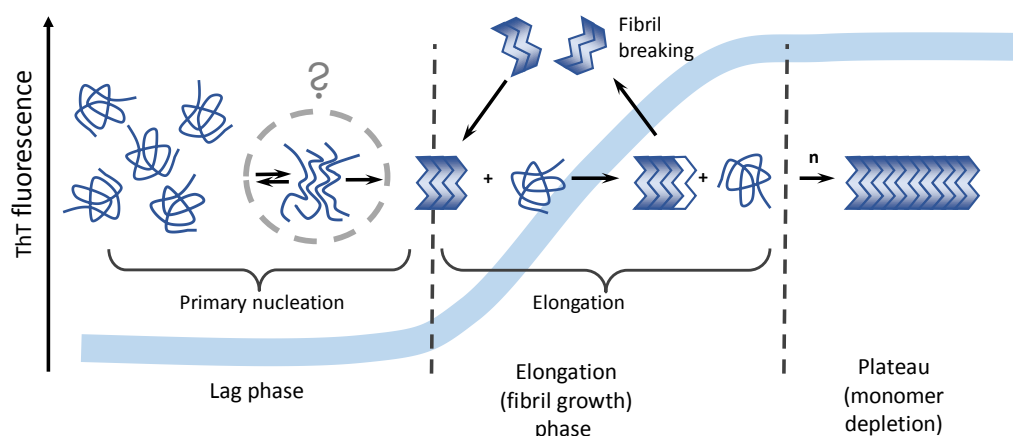


Fig. 2. Schematic representation of aggregation process.

The processes of initial assembly of monomers in the first fibrils are not yet understood due to the transient nature of the appearing species. There is a hypothesis that an intermediate oligomeric state links the monomeric and fibrillar states of AS [22, 23]. AS oligomers of various size, structure and stability have been prepared and studied by many research groups [24]. Meanwhile, the interplay between monomers, oligomers and fibrils is not yet well studied, and there is no consensus regarding which oligomers are intermediates of fibril formation.

The second stage of AS aggregation is elongation of initial fibrils by binding of monomers to the fibril ends [25, 26]. This is a much faster process than fibril nucleation [27], and the mechanism, by which the vast majority of fibrillar AS is formed. After reaching a certain length AS fibrils can break forming new fibril ends that serve as new centers of fibril growth [26]. This secondary nucleation process makes the aggregation of AS autocatalytic and leads to drastic acceleration of fibrillization after the formation of the first fibrils [26].

In vitro AS aggregation is studied using Thioflavine T (ThT) dye that strongly increases its fluorescence intensity upon intercalation into amyloid fibrils [28]. ThT fluorescence intensity is proportional to the concentration of amyloid fibrils and could be used for measuring the rate of fibril growth.

As AS fibrillization is an autocatalytic reaction, addition of pre-formed fibrils to the solution of AS monomer seeds accelerates (seeds) fibril growth, bypassing the lag phase. This process leads to the transmission of PD pathology between neurons due to spreading of AS fibrils. Therefore, inhibition of AS fibril growth and seeding capacity is considered a promising strategy for preventing AS toxicity and PD-related neurodegeneration [6, 29].

Several approaches for inhibition of AS fibrillization have been reported up to now. Stabilizing of the monomeric form of AS by DNA aptamers [30] or engineered peptide β -wrapin [31] has been shown to inhibit AS fibrillization. Different types of antibodies were reported to slow down AS fibrillization by binding to the oligomeric form of AS [32, 33]. Several small aromatic molecules (mannitol-based [34], EGCG, Dopamin, Amph [35], SynuClean-D [36]) destabilize AS amyloid fibrils by intercalation. However, all inhibitors that target abundant species are effective only at concentrations comparable with the AS concentration (up to 22 μ M in neurons [1]). More promising are inhibitors that block rare species (e.g. fibril growth centers) and thus act at much lower concentrations. The blocking can be reached by the binding of inhibitors to the ends of AS fibrils that prevents their elongation. This mechanism of inhibition was proposed for heat shock proteins [37-39] and AS di-tyrosine dimers [40], working at low micromolar concentrations.

Aims of the study

1. Investigating the mechanism of AS aggregation:
 - a) determining the critical concentrations of AS fibril formation and fibril growth;
 - b) testing the influence of AS structural modifications on aggregation kinetics (at fibril formation and fibril growth stages).
2. Development of inhibitors of AS fibrillization:
 - a) design and preparation of compounds that work as inhibitors at substoichiometric concentrations;
 - b) defining the mechanism of inhibition;
 - c) exploring the relationship between inhibitor structure and its activity.

Materials and methods

Plasmids for protein expression were either provided by external laboratories or created in our laboratory by molecular cloning.

All proteins were **expressed** in *E.coli* (BL21 DE3 or BL21 NiCo). AS, AS mutants carrying 6, 12, 22 aa moieties, and AS Cys mutants were purified by ion-exchange FPLC, while AS-GFP and inhibitors consisting of AS moiety and a bulky group were purified by His-tag approach using Ni-NTA resin.

Fibril formation and growth during **aggregation experiments** were monitored by measurement of Thioflavin T (ThT) fluorescence at the Tecan plate reader.

To study initial fibril formation (primary nucleation), we determined the lag times of fibrillization at different conditions. Lag time was determined as the time required for the start of fibril formation, which was detected by increase in ThT fluorescence. Fibril formation rate was calculated as reciprocal to lag time.

To study fibril elongation separately from fibril formation, we performed seeded aggregations. Seeds were prepared by sonication of a completely fibrillized sample, and added at 1-2 mol % to the aggregation solution. The fibril growth rate was calculated from the slope of the initial linear part of a kinetic curve.

Morphology (height, length, periodicity) of aggregates was characterized by **AFM imaging**. Estimation of β -sheet content in aggregated samples was performed using **circular dichroism (CD)** spectroscopy. The size distribution of species in aggregated samples was measured by **dynamic light scattering (DLS)**. For the investigation of hydration and polarity of AS environment in studied aggregates we performed aggregation of AS labelled with **environmentally sensitive dyes**, and recorded fluorescence emission spectra of aggregates. For determination of AS monomer or inhibitor affinity to the fibril end, protein labelling and subsequent **fluorescence anisotropy** measurements were done.

To compare efficiency of studied inhibitors, we calculated their **IC₅₀**. For this, the ratio of fibril growth rate in the presence and in the absence of inhibitor was plotted as a function of inhibitor concentration. Inhibitor concentration that corresponded to the two-fold decrease in the fibril growth rate was taken as IC₅₀.

Results and discussion

AS aggregation at low concentrations

AS fibrillization is a complex pathological process involved in the development of PD. It has two stages: fibril formation and fibril growth, and kinetics of both stages is concentration-dependent. In this study, we decided to fill the gap in the knowledge of AS aggregation at low micromolar concentrations (0.11 to 20 μM). To study fibril formation and fibril growth separately, some of the aggregation experiments were performed in the presence of seeds – short mature fibrils that promote fibril growth through monomer binding to the fibril ends.

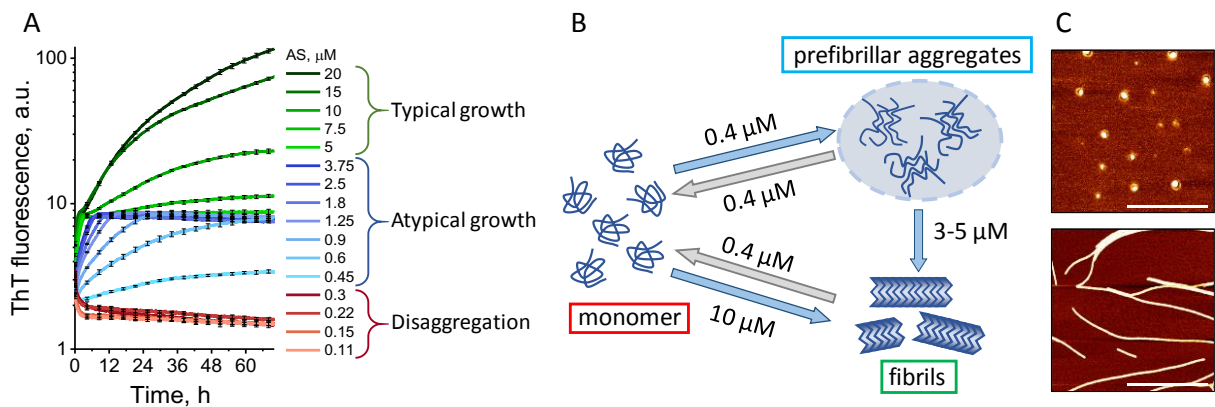


Fig.3. A. Kinetics of fibril growth at different AS concentrations. B. Interconversion of AS monomers, fibrils and prefibrillar amyloid aggregates. C. AFM image of prefibrillar aggregates (above) and fibrils (below) of AS.

Depending on AS concentration, we observed three types of AS kinetic behavior:

	Absence of fibrillization; fibril disaggregation	Atypical kinetics	Typical kinetics
Fibril formation	<0.4 μM	0.4-10 μM	>10 μM
Fibril growth	<0.4 μM	0.4-3.5 μM	>3.5 μM

The minimal concentration of AS monomer (critical concentration) required for *de novo* fibril formation (10 μM , in agreement with the literature data) was much higher than the critical concentration of fibril growth (\sim 0.4 μM). We demonstrated that fibrils disaggregate if total protein concentration is below the critical concentration of fibril growth.

We also characterized the species that appeared at AS concentrations of 0.45-3.5 μM and were responsible for the atypical kinetics of AS aggregation at these concentrations. We defined them as prefibrillar amyloid aggregates, as they do not share fibril morphology, but have features more similar to those of fibrils than of monomeric AS.

These results were published as: [Afitska K](#), Fucikova A, Shvadchak VV, Yushchenko DA. α -Synuclein aggregation at low concentrations. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019; 1867:701-9. IF=2.5. My contribution: I planned the research project and performed vast majority of the experiments and data processing. I wrote a draft of the manuscript.

AS aggregation: influence of C-terminal tags

In many *in vivo* studies, visualization of AS is achieved by fusing it with fluorescent proteins such as GFP, but possible influence of such fusions on AS behavior is usually neglected. To tackle this problem, we performed aggregation of AS mutants bearing C-terminal fusions of different size (6, 12, 22 and 250 amino acids) and charge (+5, 0, -5). We demonstrated that fibril formation is influenced by both charge and size of C-terminal extensions, while fibril growth is affected only by the size of the extension. AS fused with GFP did not aggregate at all, most probably due to steric reasons, clearly showing the inexpedience of using AS fusions with other peptides or proteins for studying AS aggregation. It is especially important for studies in cell cultures, where AS-GFP is mostly used. To the best of our knowledge, we were the first to demonstrate negative effects of C-terminal extensions on AS aggregation propensity. Moreover, the absence of any influence of an extensions charge on fibril growth stage prompted us to propose a 2-step model of fibril elongation. We suggested that the first relatively fast charge-dependent step (loose binding of monomer to the fibril end) is followed by the rate-limiting charge-independent step (monomer adopting amyloid conformation).

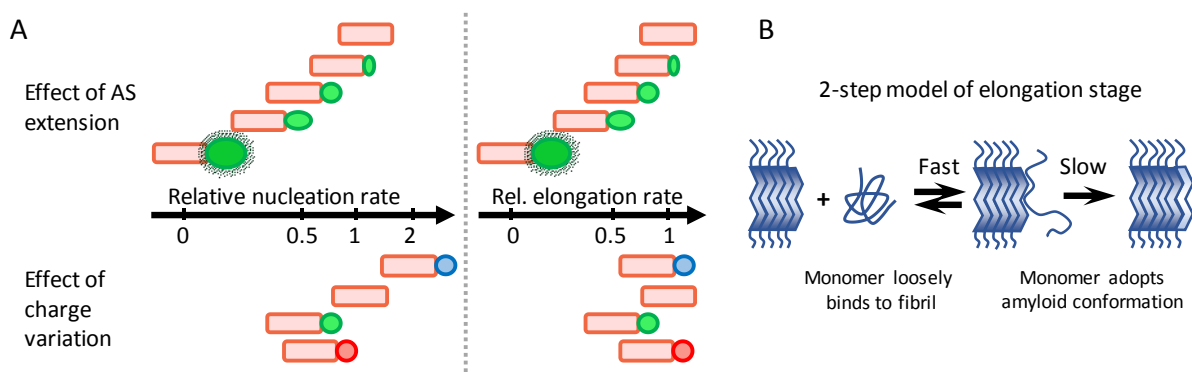


Fig. 4. A. Effect of AS extensions of various length and charges on primary nucleation rate and fibril elongation rate. B. 2-step model of elongation stage.

These results were published as: [Afitska K](#), Fucikova A, Shvadchak VV, Yushchenko DA. Modification of C-terminus provides new insights into the mechanism of α -synuclein aggregation. *Biophys J.* 2017;113:2182-91. IF=3.5. My contribution: I took part in the design

of the set of mutants used in the work, prepared all the proteins and performed the majority of the experiments. I actively participated in the data analysis and wrote a draft of the manuscript.

Inhibition of AS fibrillization by blocking fibril ends

Blocking of fibril ends (that serve as fibril growth centers) is a promising approach for creating efficient inhibitors of fibril growth. Earlier we found that AS-GFP does not fibrillize even upon addition of pre-formed fibrils. We hypothesized that the protein did not fibrillize because GFP moiety sterically hindered the fibril end, and decided to use this strategy for inhibiting fibril growth.

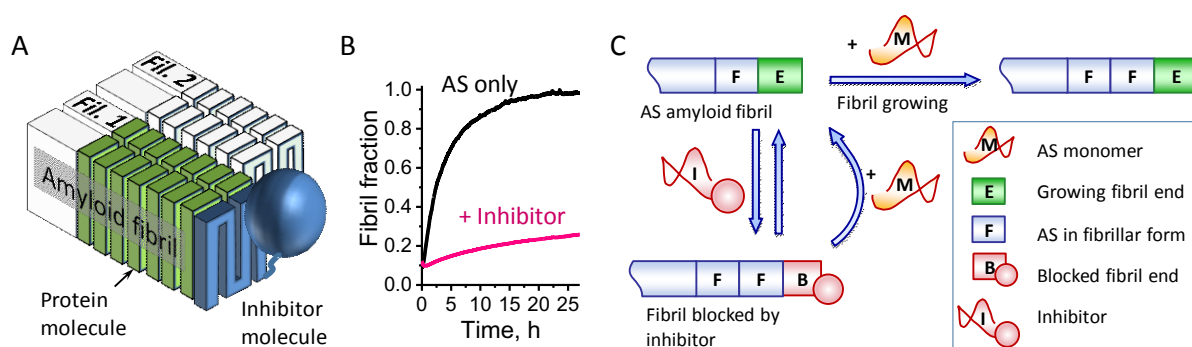


Fig. 5. A. Schematic representation of AS-2L inhibitor blocking the end of AS fibril. B. AS-2L inhibitor slows down AS fibrillization. C. Schematic representation of the inhibition.

We created a chimeric protein consisting of two parts: an AS moiety, responsible for binding to the fibril end, and a bulky globular moiety 2L that should create steric hindrance for monomer binding to blocked fibril end. Resulting protein AS-2L efficiently inhibited fibril growth, showing $IC_{50} \sim 1 \mu\text{M}$. We investigated the kinetic mechanism of inhibition by AS-2L and determined the properties of the inhibitor, which may be further improved to increase its inhibition activity. Moreover, we proved the feasibility of the concept of blocking fibril ends for inhibition of AS fibril growth.

These results were published as: Shvadchak VV, Afitska K, Yushchenko DA. Inhibition of α -synuclein amyloid fibril elongation by blocking fibril ends. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2018;57:5690-4. IF=12.3. My contribution: I prepared all the proteins, performed part of the experiments and took part in reviewing & editing the manuscript.

Inhibition of AS fibrillization: structural optimization of inhibitors

Aforementioned inhibitor AS-2L efficiently suppresses fibril growth by blocking fibril ends, which however can be then reactivated due to the dissociation of an inhibitor molecule from the fibril end and not complete steric hindrance. To solve this problem, we performed

structural optimization of the inhibitor molecule and created 14 new inhibitors with modified fibril-binding parts and bearing bulky groups of different secondary structure, size and position.

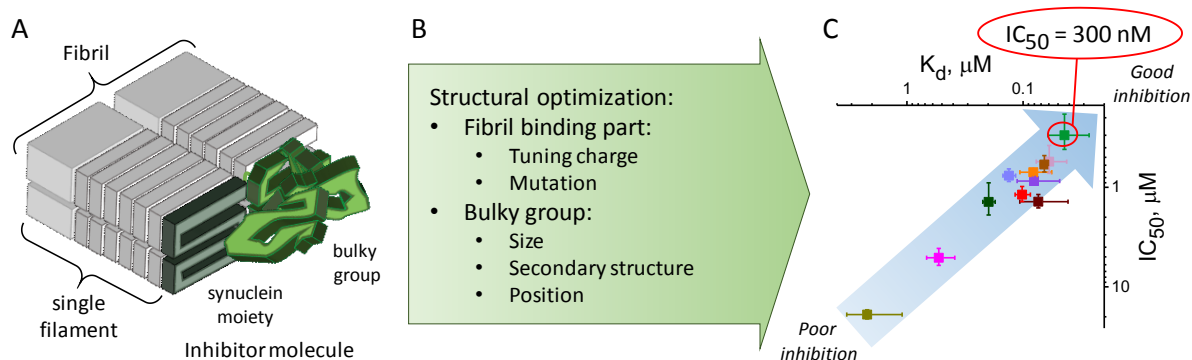


Fig. 6. A. Schematic representation of inhibitor binding to both filaments at the fibril end. B. Optimization of inhibitor structure. C. Inhibitor efficiency depends on inhibitor affinity to the fibril end.

We studied the structure-activity relationship of the newly created inhibitors and defined their properties, which are important for good performance. We showed that inhibitor efficiency in blocking fibril growth is proportional to the inhibitor affinity to the fibril end. We hypothesized that while the AS moiety of the inhibitor interacts with the end of one filament of the fibril, a β -sheet-rich bulky group interacts with the end of the other one, thus increasing the total number of hydrogen bonds between the inhibitor molecule and the fibril end.

The results of this work are summarized in the manuscript “[Afitska K, Priss A, Yushchenko DA, Shvadchak VV. Structural optimization of inhibitors of \$\alpha\$ -synuclein fibril growth: affinity to the fibril end as a crucial factor](#)”, which is currently in revision in the Journal of Molecular Biology (IF=5). My contribution: I designed the set of proteins for this study, expressed and purified all the proteins. I did the majority of the aggregation experiments and data processing, and wrote a draft of the manuscript.

Inhibition of AS fibrillization: AS dimers as inhibitors

To further improve inhibitors of fibril growth, we aimed to increase their affinity to the fibril end by dimerization of the inhibitor molecule. Indeed, dimerized AS-L showed much stronger inhibition efficiency than parent AS-L. Much to our surprise, the AS dimer, used as a control, had almost the same activity as the dimerized AS-L. This fact prompted us to study inhibition of AS fibrillization by AS dimers in more details. We prepared a set of disulfide AS dimers with a covalent link in different positions and demonstrated that dimers linked at the N-terminus of AS were much more efficient (showing low nanomolar IC_{50}) than dimers with the link in the fibril core or at the C-terminus. We hypothesized that the dimer bound in an altered

conformation blocks the fibril end from subsequent monomer binding and therefore inhibits fibril growth.

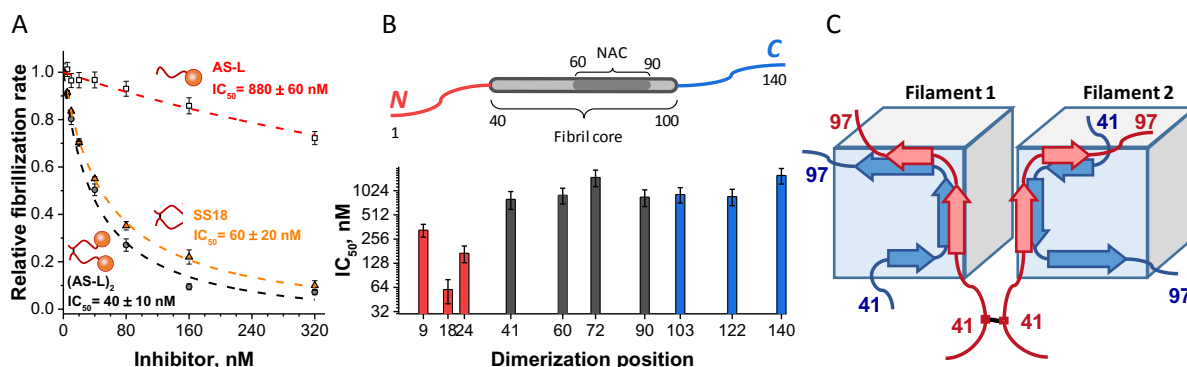


Fig. 7. Fibrillization rate as a function of inhibitor concentration for AS-L, its dimer, and AS dimer SS18. B. Activity of AS dimer inhibitors depends on the position of a covalent bond in dimer molecule. C. Possible conformation of dimer inhibitor at the fibril end.

The results of this work are summarized in the manuscript “Kyriukha Y, Afitska K, Kurochka AS, Sachan S, Galkin M, Yushchenko DA, Shvadchak VV. α -Synuclein dimers as potent inhibitors of fibrillization”, which is currently in revision in the Journal of Medicinal Chemistry (IF=6). My contribution: I prepared some of the proteins, performed part of the aggregation experiments and took part in the review & editing of the manuscript.

Conclusions

In summary, we investigated two stages of AS aggregation, namely fibril formation and fibril growth. We demonstrated that for the fibril formation and the fibril growth, different minimal concentrations of AS monomer are required. We observed fibril disaggregation below the critical concentration of fibril growth, and characterized AS aggregation at low concentrations. Moreover, we revealed that fibril formation and fibril growth are diversely affected by AS C-terminal extensions of various charges and sizes, and proposed a two-step model of fibril elongation. We clearly demonstrated that fusion of AS with other peptides or proteins, such as GFP, suppresses its aggregation.

Next, we created a protein-based inhibitor of fibril growth, which acts by blocking fibril ends from subsequent monomer binding, and described the mechanism of inhibition. In order to improve inhibitor efficiency, we explored which structural properties of inhibitor molecule are important for inhibition activity, and found that it is proportional to the inhibitor affinity to the fibril end. Later we discovered strong inhibitory properties of AS dimers. We characterized the relationship between dimerization position and inhibition activity of dimers and proposed a mechanism of inhibition.

Our inhibitors that block fibril ends work at nanomolar concentrations and are the most efficient inhibitors of AS fibril growth reported to date. We believe that this work is an important step in the development of anti-Parkinson therapies and will help to create inhibitors for other amyloid diseases.

Selected publications

Publications included in the dissertation thesis:

1. **Afitska K**, Fucikova A, Shvadchak VV, Yushchenko DA. α -Synuclein aggregation at low concentrations. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019; 1867:701-9. IF=2.5
2. **Afitska K**, Fucikova A, Shvadchak VV, Yushchenko DA. Modification of C-terminus provides new insights into the mechanism of α -synuclein aggregation. *Biophys J*. 2017; 113:2182-91. IF=3.5
3. Shvadchak VV, **Afitska K**, Yushchenko DA. Inhibition of α -synuclein amyloid fibril elongation by blocking fibril ends. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2018; 57:5690-4. IF=12.3
4. **Afitska K**, Priss A, Yushchenko DA, Shvadchak VV. Structural optimization of inhibitors of α -synuclein fibril growth: affinity to the fibril end as a crucial factor. In revision in *J Mol Biol*. IF=5
5. Kyriukha Y, **Afitska K**, Kurochka AS, Sachan S, Galkin M, Yushchenko DA, Shvadchak VV. α -Synuclein dimers as potent inhibitors of fibrillization. In revision in *J Med Chem*. IF=6

Publications not included in the dissertation thesis:

6. Shvadchak VV, Kucherak O, **Afitska K**, Dziuba D, Yushchenko DA. Environmentally sensitive probes for monitoring protein-membrane interactions at nanomolar concentrations. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017;1859:852-9. IF=3.8

Curriculum vitae

Kseniia Afitska

Date of Birth: July 16, 1991 (Kamyanets-Podilskyy, Ukraine)

Citizenship: Ukraine

Academic activities

- From 09.2015** PhD student of Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry
- From 02.2015** Research Assistant, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, Czech Republic
- 02.2014 – 07.2014** Research Assistant, Medical Faculty of TU Dresden, Germany
- 09.2012 – 06.2014** MSc in Biochemistry (diploma with honour), ESC "Institute of Biology", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine. The work on Master thesis "Role of dopaminergic system in pathogenesis of ulcerative colitis" was performed in ESC "Institute of Biology" in collaboration with Medical Faculty of TU Dresden
- 09.2009 – 05.2012** BSc in Biology (diploma with honour). ESC "Institute of Biology", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Honors and Travel awards

- 2019** Travel Award at Biophysical Society 63rd Annual Meeting, Baltimore, USA
- 2019** Student Research Achievement Award at Biophysical Society 63rd Annual Meeting, Baltimore, USA
- 2017** Registration Fee Waiver for EMBO | EMBL Symposium: Molecular and Cell Biology of Membranes, Heidelberg, Germany
- 2013** Undergraduate Prize for Physiology 2012 from British Physiological Society
- 2012** 1st Oral award in the X International Interdisciplinary Scientific Conference "Shevchenkivska vesna 2012. Life sciences"

Other information

Languages: Ukrainian (native speaker), fluent in English (FCE certificate, C1 level) and Russian, intermediate knowledge of German and Czech

Participation in the Scientific Meetings (posters)

- Biophysical Society 63rd Annual Meeting, Baltimore, USA (2019)
- 5th International Conference on Molecular Neurodegeneration, ICMN2018, Stockholm, Sweden (2018)
- EMBO | EMBL Symposium: Molecular and Cell Biology of Membranes, Heidelberg, Germany (2017)
- 20th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, Netherlands (2012)
- X International Interdisciplinary scientific conference "Shevchenkivska vesna. Life sciences", Kyiv, Ukraine (2012)

Articles

Author of 4 publications in peer-reviewed journals

ORCID: 0000-0002-3807-6989

References

- [1] Wilhelm BG, *et al.* Science. 2014;344:1023-8.
- [2] Iwai A, *et al.* Neuron. 1995;14:467-75.
- [3] Longhena F, *et al.* Int J Mol Sci. 2019;20.
- [4] Raza C, *et al.* Life Sci. 2019.
- [5] Lindholm D, *et al.* Cell Mol Life Sci. 2016;73:1365-79.
- [6] Elkouzi A, *et al.* Nature reviews Neurology. 2019;15:204-23.
- [7] Ross OA, *et al.* Ann Neurol. 2008;63:743-50.
- [8] Farrer M, *et al.* Ann Neurol. 2004;55:174-9.
- [9] Polymeropoulos MH, *et al.* Science. 1997;276:2045-7.
- [10] McLean JR, *et al.* Mol Cell Neurosci. 2012;49:230-9.
- [11] Luk KC, *et al.* Science. 2012;338:949-53.
- [12] Abdelmotilib H, *et al.* Neurobiol Dis. 2017;105:84-98.
- [13] Recasens A, *et al.* Ann Neurol. 2014;75:351-62.
- [14] Froula JM, *et al.* Acta Neuropathol Commun. 2018;6:35.
- [15] Mahul-Mellier AL, *et al.* Cell Death Differ. 2015;22:2107-22.
- [16] Vilar M, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:8637-42.
- [17] Li B, *et al.* Nat Commun. 2018;9:3609.
- [18] Dearborn AD, *et al.* J Biol Chem. 2016;291:2310-8.
- [19] Levitan K, *et al.* J Mol Biol. 2011;411:329-33.
- [20] Hoyer W, *et al.* Biochemistry. 2004;43:16233-42.
- [21] Arosio P, *et al.* Phys Chem Chem Phys. 2015;17:7606-18.
- [22] Kumar R, *et al.* Angew Chem Int Ed Engl. 2018.
- [23] Choi ML, *et al.* FEBS J. 2018.
- [24] Cremades N, *et al.* International review of cell and molecular biology. 2017;329:79-143.
- [25] Buell AK, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:7671-6.
- [26] Shvadchak VV, *et al.* J Phys Chem B. 2015;119:1912-8.
- [27] Fandrich M. J Mol Biol. 2007;365:1266-70.
- [28] Biancalana M, *et al.* Biochim Biophys Acta. 2010;1804:1405-12.
- [29] Savitt D, *et al.* Drugs. 2019.
- [30] Zheng Y, *et al.* Mol Ther Nucleic Acids. 2018;11:228-42.
- [31] Agerschou ED, *et al.* 2019:568501.
- [32] Emadi S, *et al.* J Mol Biol. 2007;368:1132-44.
- [33] Iljina M, *et al.* BMC Biol. 2017;15:57.
- [34] Paul A, *et al.* Front Mol Biosci. 2019;6:16.
- [35] Jha NN, *et al.* ACS Chem Neurosci. 2017;8:2722-33.
- [36] Pujols J, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115:10481-6.
- [37] Bruinsma IB, *et al.* Proteins. 2011;79:2956-67.
- [38] Cox D, *et al.* J Biol Chem. 2018;293:4486-97.
- [39] Aprile FA, *et al.* Biochemistry. 2017;56:1177-80.
- [40] Wordehoff MM, *et al.* J Mol Biol. 2017;429:3018-30.