

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТИОФЛАВИНА Т С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИХ СТРУКТУРЫ

© A. I. Сулацкая,^{1, 2,*} И. М. Кузнецова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ² С.-Петербургский государственный политехнический университет;
* электронный адрес: ansul@mail.ru

Бензтиазольный краситель тиофлавин Т (ThT) широко и эффективно используется для диагностики возникновения амилоидных и амилоидо-подобных фибрилл *in vivo* и *in vitro*. Однако механизмы специфического связывания красителя с амилоидными фибриллами и причины существенного возрастания квантового выхода флуоресценции ThT при его инкорпорации в амилоидные фибриллы до сих пор недостаточно изучены. Результаты, полученные в настоящей работе, позволили заключить, что ThT встраивается в амилоидные фибриллы в мономерной форме, а предположения об образовании красителем димеров, эксимеров или мицелл необоснованы. Было показано, что увеличение квантового выхода флуоресценции ThT при встраивании красителя в амилоидные фибриллы обусловлено ограничением торсионных колебаний бензтиазольного и аминобензольного колец друг относительно друга. Методом равновесного микродиализа показано существование двух мод связывания ThT с фибриллами на основе инсулина. Определены количество мест связывания и константы связывания ThT с каждой из этих мод.

Ключевые слова: тиофлавин Т, амилоидные фибриллы, квантовый выход, поглощение, флуоресценция, инсулин.

Бензтиазольный краситель тиофлавин Т (ThT) широко и эффективно используется для диагностики возникновения амилоидных и амилоидо-подобных фибрилл *in vivo* и *in vitro* (LeVine, 1993, 1999). Это обусловлено высокой специфичностью взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами. Краситель не взаимодействует с белками в нативном, развернутом и промежуточных частично свернутых состояниях, а также с аморфными агрегатами белков (Maskevich et al., 2007; Turoverov et al., 2007). При взаимодействии с белками в состоянии амилоидных фибрилл его квантовый выход возрастает в тысячи раз, тогда как свободный краситель в водном растворе имеет очень низкий квантовый выход флуоресценции (по нашим данным около 0.0001).

Первоначально флуоресценция красителя использовалась как тест на возникновение амилоидных фибрилл при ряде тяжелых заболеваний человека и животных, связанных с нарушением фолдинга белков, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабет второго рода, прионные заболевания и др. (Carrell, Gooptu, 1998; Koo et al., 1999; Uversky et al., 1999a, 1999b). Исследования последних лет показали, что при определенных условиях и другие белки, никак не связанные с возникновением болезней (а возможно, все белки), могут образовывать амилоидо-подобные фибриллы.

Для образования амилоидных фибрилл необходимо, чтобы силы межмолекулярного взаимодействия превалировали над внутримолекулярными. Белки, имеющие гло-

булярную структуру в нативном состоянии, могут участвовать в образовании амилоидных фибрилл после перехода белка в частично или полностью развернутое состояние. Кроме того, многие белки в принципе не могут сформировать в водном окружении жесткую глобулярную структуру, но тем не менее способны выполнять присущие им функции, т. е. являются нативными. Наличие неупорядоченных участков полипептидной цепи позволяет этим белкам взаимодействовать со своими партнерами и друг с другом с образованием агрегированных форм — олигомеров, аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл.

Морфологически амилоидные фибриллы представляют собой образования, обогащенные β -складчатыми структурами, диаметром 10—20 нм и длиной до 1000 нм, состоящие из протофибрилл, в которых β -слои ориентированы перпендикулярно оси волокна (Krebs et al., 2005).

Поскольку амилоидные фибриллы — одно из основных состояний белковой молекулы, изучение их структуры имеет существенное значение как для понимания фундаментальных основ фолдинга и организации белков, так и практическое значение для медицины.

Среди прочих методов исследования структуры амилоидных фибрилл методу, основанному на изучении их взаимодействия с флуоресцентным красителем ThT, отводится существенная роль. Однако до сих пор нет единого мнения относительно механизмов взаимодействия краси-

теля с фибриллами, а также причин существенного возрастания квантового выхода флуоресценции ThT при его инкорпорации в амилоидные фибриллы. В литературе приводятся противоречивые данные о спектральных свойствах этого красителя.

В некоторых работах было отмечено, что при встраивании в амилоидные фибриллы спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции красителя испытывают значительный длинноволновый сдвиг, а квантовый выход флуоресценции существенно возрастает. Это послужило основанием для предположений о том, что флуоресцентные свойства и увеличение квантового выхода флуоресценции ThT, инкорпорированного в амилоидные фибриллы, обусловлены димерами (Shirra, 1985), эксимерами (Raj, Ramaraj, 1997) или мицеллами (Khurana et al., 2005), которые образует краситель.

Однако никто не обратил внимания на тот факт, что коротковолновый спектр возбуждения флуоресценции красителя в воде не совпадает с длинноволновой полосой спектра поглощения красителя, как это должно быть, а сдвинут относительно нее в коротковолновую сторону так, что максимум спектра возбуждения находится на минимум в спектре поглощения. При возбуждении в области длинноволновой полосы поглощения ThT в воде флуоресцирует в той же спектральной области, что и ThT, инкорпорированный в амилоидные фибриллы. При этом спектры флуоресценции свободного красителя в водном растворе и в составе амилоидных фибрилл сдвинуты в длинноволновую сторону относительно длинноволновой полосы поглощения, как это и должно быть. Поэтому, на наш взгляд, специального объяснения требуют не флуоресцентные свойства ThT в фибриллах, а существование «коротковолновых» полос флуоресценции и возбуждения флуоресценции красителя в водном растворе.

В связи с этим задача настоящей работы состояла в том, чтобы сделать выбор между существующими моделями взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами, а также объяснить возрастание квантового выхода флуоресценции при встраивании красителя в амилоидные фибриллы.

Материал и методика

В работе использовали ThT (Sigma-Aldrich and AnaSpecs, США), ATTO (ATTO-TEC, Германия), глицерин (Мекк, Германия), NaCl, инсулин и уксусную кислоту (Sigma, США), K₂HPO₄ и NaOH (Реахим, Россия) и GdnHCl (ICN Biomedicals, США).

Амилоидные фибриллы получали путем инкубирования инсулина в 20%-ной уксусной кислоте в присутствии 100 mM NaCl (pH 2.0) при 37 °C и интенсивном перемешивании в течение 24 ч (Goers et al., 2002).

Спектры поглощения ThT измеряли с помощью спектрофотометра ESP-3T (Hitachi, Япония). Флуоресцентные измерения выполняли с использованием спектрофлуориметров со стационарным и импульсным возбуждением (Туроверов и др., 1998). При определении квантового выхода флуоресценции в качестве эталона использовали флуоресцентный краситель ATTO-425 с известным квантовым выходом, имеющий спектральные характеристики, близкие к спектральным характеристикам ThT. Флуоресценцию ThT и ATTO-425 возбуждали излучением с длиной волны 435 нм, регистрировали при длине волны 480 нм.

Равновесный микродиализ. Эксперименты выполняли с использованием аппаратуры фирмы Harvard Apparatus/Amika (США) с объемом камер 500 мкл и мембранными MWCO 10 кДа.

Результаты и обсуждение

Было показано, что положение и форма спектров поглощения, а также величина коэффициента молярной экстинкции ThT в широком диапазоне концентраций не зависит от концентрации красителя (рис. 1, а). Тем самым было отвергнуто существующее предположение об образовании красителем димеров.

Поскольку в основном состоянии краситель не образует димеров, маловероятно, что за короткое время жизни возбужденного состояния, которое, по нашим данным, в водном растворе не превышает 0.001 нс, может произойти образование эксимеров. Измерение концентрационной за-

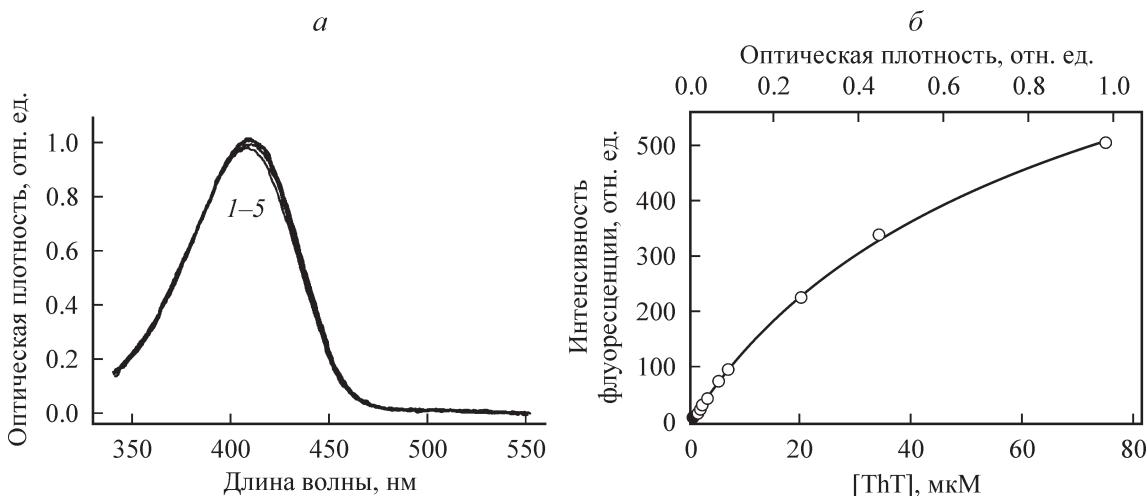
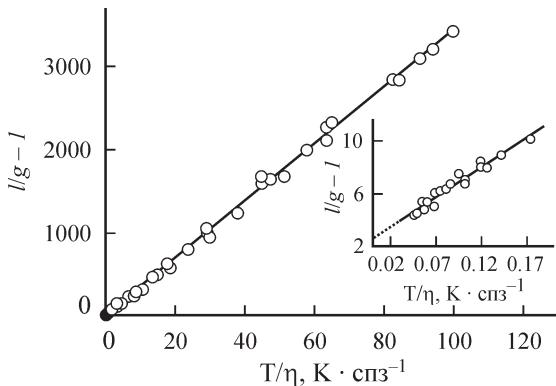


Рис. 1. Фотофизические свойства ThT.

а — спектры поглощения ThT в воде для разных концентраций красителя от 10^{-5} до 10^{-3} М (кривые 1—5); для измерений использовали кюветы с длиной оптического пути 0.1, 0.2, 0.5, 1 и 5 см. б — зависимость интенсивности флуоресценции ThT от концентрации красителя (возбуждение — 435 нм, регистрация — 480 нм).

Рис. 2. Зависимость $1/q - 1 = f(T/\eta)$ для ThT.

Вставка: участок зависимости, соответствующий низким температурам и высокой вязкости растворителя, показывающий, что даже в условиях твердого раствора, не допускающего существования крутильных колебаний бензтиазольного и аминобензольного колец ThT друг относительно друга, квантовый выход ThT существенно меньше единицы.

вимости интенсивности флуоресценции ThT позволило сделать вывод о том, что представления об образовании красителем мицелл в водном растворе и при связывании с амилоидными фибрillами также необоснованы — зависимость интенсивности флуоресценции ThT от оптической плотности раствора ничем не отличается от аналогичных зависимостей для любого флуоресцирующего вещества (рис. 1, б).

Измерение квантового выхода ThT (q) в широком диапазоне температур (T) и вязкости растворителя (η) подтвердило выдвинувшее ранее предположение о том, что увеличение квантового выхода флуоресценции ThT при встраивании красителя в амилоидные фибрillы обусловлено ограничением торсионных колебаний бензтиазольного и аминобензольного колец друг относительно друга (рис. 2). Наряду с торсионными колебаниями фрагментов молекулы ThT друг относительно друга существует по крайней мере еще одна причина безызлучательной дезактивации возбужденного состояния ThT, приводящая к тому, что даже в условиях твердого раствора, не допускающего существования крутильных колебаний колец друг относительно друга, квантовый выход этого красителя существенно меньше единицы. С нашей точки зрения, причиной этого может быть неплоскость молекулы ThT в основном состоянии, обусловленная наличием массивной метильной группы в положении N5 бензтиазольного кольца (Maskevich et al., 2007). При встраивании в амилоидные фибрillы конформация молекулы ThT может отличаться от конформации в жестких изотропных средах. Этим могут быть обусловлены различные величины квантового выхода флуоресценции ThT, связанного с амилоидными фибрillами, полученными на основе различных белков.

Все экспериментальные данные хорошо согласуются с моделью, согласно которой ThT в мономерной форме встраивается в бороздки, образованные боковыми цепями аминокислот, ориентированные вдоль оси волокна амилоидных фибрill перпендикулярно β -листам (Krebs et al., 2005).

Использованию флуоресценции ThT для изучения структуры амилоидных фибрill препятствует то обстоятельство, что раствор ThT, содержащий амилоидные фибрillы, представляет собой равновесную систему свободного и связанного с фибрillами красителя. Отсутствие

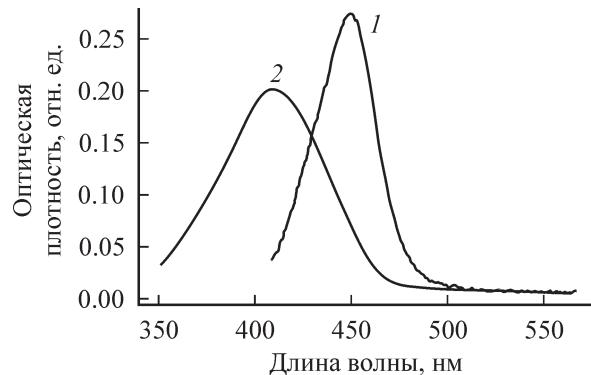


Рис. 3. Спектры поглощения ThT, инкорпорированного в фибрillы, полученные на основе амилоидогенного белка инсулина.

1 — спектр поглощения связанного с фибрillами красителя; 2 — спектр поглощения свободного красителя в концентрации, равной концентрации связанного красителя.

способа получения информации о доле возбуждающего света, поглощаемого молекулами ThT, связавшимися с амилоидными фибрillами, а также о спектральных свойствах (спектрах поглощения и коэффициенте молярной экстинкции) этой фракции молекул красителя не позволяло оценить характеристики взаимодействия ThT с амилоидными фибрillами. Нами показано, как эти вопросы могут быть легко решены с использованием метода равновесного микродиализа.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при инкорпорации в амилоидные фибрillы спектр поглощения ThT сдвигается в длинноволновую сторону: длина волн максимума спектра поглощения для свободного красителя — 413 нм, а для красителя, инкорпорированного в амилоидные фибрillы на основе инсулина, — 450 нм, и происходит увеличение коэффициента молярной экстинкции (рис. 3). Значительно более коротковолновое положение спектра поглощения свободного ThT в водном растворе по сравнению со спектром поглощения красителя, инкорпорированного в амилоидные фибрillы, является проявлением существенного ориентацион-

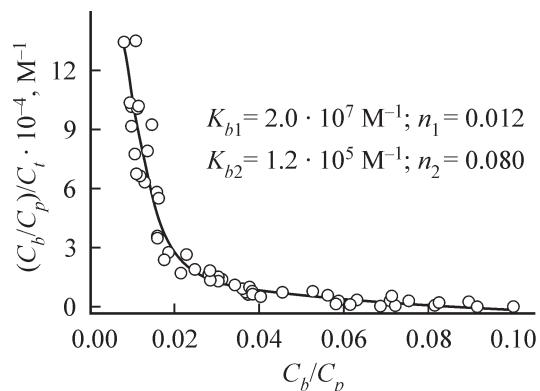


Рис. 4. Зависимость Скетчарда, характеризующая связывание ThT с амилоидными фибрillами на основе инсулина.

C_p — концентрация белка, из которого образованы амилоидные фибрillы; C_f , C_b — концентрации свободного и связанного с фибрillами красителей соответственно; n_1 , n_2 — число мест связывания красителя с амилоидными фибрillами для каждой из мод связывания в пересчете на молекулу белка; K_{b1} , K_{b2} — константы связывания красителя с фибрillами для каждой из мод связывания.

ного диполь-дипольного взаимодействия молекулы красителя с полярным растворителем в основном состоянии. Возрастание молярной экстинкции при инкорпорации ThT в амилоидные фибриллы, возможно, обусловлено тем, что молекула красителя при встраивании в фибриллы становится более плоской, что приводит к возрастанию сопряженности π -электронных системベンзтиазольного и аминобензольного колец. Этот эффект может быть также одним из факторов, ответственных за длинноволновый сдвиг спектра поглощения ThT при инкорпорации красителя в амилоидные фибриллы.

Кроме того, с помощью метода равновесного микродиализа были получены все величины, необходимые для построения зависимостей Скетчарда, и определены число мест связывания красителя в пересчете на молекулу белка и константы связывания красителя с фибриллами. Нелинейный характер зависимостей Скетчарда, полученный нами для связывания ThT с амилоидными фибриллами на основе инсулина, свидетельствует о том, что существуют по крайней мере две моды связывания, которые могут различаться по их локализации в фибриллах, величине констант связывания и числу однотипных мест связывания в пересчете на молекулу белка (рис. 4).

Экспериментальные данные достаточно хорошо отвечают модели, предполагающей существование двух мод связывания. Уравнение Скетчарда, написанное в предположении существования двух мод связывания ThT с амилоидными фибриллами, было использовано для определения констант связывания и числа мест связывания в пересчете на одну молекулу белка методом нелинейной регрессии. Число мест связывания в пересчете на молекулу белка для обеих мод связывания оказалось меньше единицы. Это, возможно, обусловлено тем, что потенциальные места связывания протофибрилл, находящихся внутри жгута фибриллы, могут быть недоступными для молекул красителя.

Таким образом, метод равновесного микродиализа позволяет получить ряд характеристик (которые трудно, если вообще возможно, получить иным способом) взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами и определить спектральные характеристики красителя, инкорпорированного в амилоидные фибриллы: число мод связывания, число мест связывания красителя с амилоидными фибриллами для каждой из мод связывания в пересчете на молекулу белка, константы связывания красителя с фибриллами для каждой из мод связывания и спектр поглощения красителя, инкорпорированного в амилоидные фибриллы. Использование метода равновесного микродиализа существенно расширяет информативность метода изучения структуры амилоидных фибрилл, в основе которого лежит взаимодействие ThT с фибриллами.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы РАН «Молекулярная и клеточная биология», фонда Дмитрия Зимины «Династия» и Российской фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-90038-Бел.).

Список литературы

- Turoverov K. K., Biktaev A. G., Doroфеев A. B., Kuznetsova I. M. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 (8/9) : 806—817.
- Carrell R. W., Gooptu B. 1998. Conformational changes and disease — serpins, prions and Alzheimer's. Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 799—809.
- Goers J., Permyakov S. E., Permyakov E. A., Uversky V. N., Fink A. L. 2002. Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation. Biochemistry. 41 : 12 546—12 551.
- Khurana R., Coleman K., Ionescu-Zanetti C., Carter S. A., Krishna V., Grover R., Roy R. K., Singh S. 2005. Mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils: localization and implications. J. Struct. Biol. 151 : 229—238.
- Koo E. H., Lansbury P. T., Kelly J. W. 1999. Amyloid disease abnormal protein aggregation in neurodegeneration. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 9989—9990.
- Krebs M. R., Bromley E. H., Donald A. M. 2005. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. J. Struct. Biol. 149 : 30—37.
- LeVine H., 3rd. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. Protein Sci. 2 : 404—410.
- LeVine H., 3rd. 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. Methods Enzymol. 309 : 274—284.
- Maskevich A. A., Stsiapura V. I., Kuzmitsky V. A., Kuznetsova I. M., Povarova O. I., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2007. Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. J. Proteome Res. 6 : 1392—1401.
- Raj C. R., Ramaraj R. 1997. γ -Cyclodextrin induced intermolecular eximer formation of thioflavin T. Chem. Phys. Lett. 273 : 285—290.
- Schirra R. 1985. Dye aggregation in freezing aqueous solutions. Chem. Phys. Lett. 119 : 229—238.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Maskevich A. A., Stepanov V. L., Kuzmitsky V. A., Uversky V. N. 2007. ThT as an instrument for testing and investigation of amiloid and amiloid-like fibrils. Proc. of SPIE. 6733 : 1R—11R.
- Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink A. L. 1999a. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Pt. I. Systemic amyloidoses. Med. Sci. Monitor. 5 (5) : 1001—1012.
- Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink A. L. 1999b. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Pt. II. Localized amyloidosis and neurodegenerative disorders. Med. Sci. Monitor. 5 (6) : 1238—1254.

Поступила 20 V 2010

THIOFLAVIN T INTERACTION WITH AMYLOID FIBRILS AS AN INSTRUMENT
FOR THEIR STUDYING

*A. I. Sulatskaya,^{1, 2}, * I. M. Kuznetsova¹*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,
and ² St. Petersburg State Polytechnical University
* e-mail: ansul@mail.ru

Benzthiazole dye thioflavin T (ThT) is widely used to study the formation and structure of amyloid fibrils. Nevertheless, till now there is no common opinion concerning molecular mechanisms of ThT binding to amyloid fibrils and the reasons of dramatic increase in its fluorescence quantum yield on incorporation into amyloid fibrils. Our data prove that ThT molecules incorporate in the amyloid fibrils in the monomeric form and there is no ground to suppose the formation of ThT dimers, eximers, or micells. It was shown that the increase in the quantum yield of ThT incorporated in amyloid fibrils was caused by restriction of benzthiazole and aminobenzene rings torsion fluctuations relative to each other. The use of equilibrium microdialysis allowed determining the absorption spectrum, the number of binding modes of ThT with insulin amyloid fibrils and for each mode determining the binding constants and the number of binding sites for each mode.

Key words: thioflavin T, amyloid fibrils, quantum yield, absorption, fluorescence, insulin.