

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КРАСИТЕЛЯ КОНГО КРАСНЫЙ С ФИБРИЛЛАМИ ЛИЗОЦИМА, БЕТА2-МИКРОГЛОБУЛИНА И ТРАНСИРЕТИНА

© *О. И. Антимонова*^{1,2,*} *Н. А. Грудина*^{1,2} *В. В. Егоров*^{3,4} *Д. С. Поляков*^{1,5}
*В. В. Ильин*¹ *М. М. Шавловский*^{1,5}

¹ *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376,*

² *Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197341,*

³ *Научно-исследовательский институт гриппа Мининистерства здравоохранения РФ,
Санкт-Петербург, 197022,*

⁴ *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова,
Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300, и*

⁵ *Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 191015;*

** электронный адрес: oa0584@mail.ru*

Методом спектрофотометрии исследовали взаимодействие красителя Конго красный (КК) с фибриллами модельных белков — лизоцима куриного яйца, рекомбинантного бета2-микроглобулина (б2М) человека и рекомбинантного транстиретина (ТТР) человека. Обнаружено, что коммерческий препарат красителя содержит значительное количество примесей. Предложены методы очистки красителя и определен его молярный коэффициент поглощения при 490 нм (ϵ_{490}), который составляет $3.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при $\text{pH} > 6.0$. Образование комплекса КК с фибриллами сопровождается изменением спектра поглощения красителя в видимой области. По данным титрования растворов фибрилл избытком красителя, КК связывается с фибриллами лизоцима в соотношении примерно 5 молекул на мономер белка в составе фибрилл, с фибриллами б2М — примерно 4 молекулы на мономер, с фибриллами ТТР — примерно 4 молекулы на субъединицу белка.

Ключевые слова: амилоидозы, амилоидогенные белки, лизоцим, бета2-микроглобулин, транстиретин, Конго красный, спектрофотометрия.

Принятые сокращения: б2М — бета2-микроглобулин, КК — Конго красный, ФСБ — фосфатно-солевой буфер, ТТР(L55P) — транстиретин с заменой L55P, ТТР(WT) — транстиретин дикого типа.

Заболевания, патогенез которых обусловлен образованием белков с аномальной пространственной организацией и их последующей агрегацией, известны под названием «амилоидозы» или «конформационные протеопатии» (Шавловский, 2010). В основе этих заболеваний лежит фибриллогенез некоторых белков или пептидов (формирование нитчатых структур в результате агрегации белков с измененной конформацией), который может рассматриваться как автокаталитический процесс, приводящий к нарушению трехмерной структуры полипептидов. Впервые данный вид патологии был описан в XIX в. выдающимися морфологами Рокитанским (Rokitansky, 1842) и Вирховым (Virchow, 1854, 1855). Последний и предложил термин «амилоид» для характерных окрашивающихся иодом отложений, образующихся в тканях больных. Изначально амилоидоз рассматривали как единую патологию, причиной которой являлись хронические воспалительные процессы. Однако после того, как было обнаружено, что амилоид специфически связывает некоторые красители, в частности КК (Picken, 2010),

разработали простой способ гистохимической идентификации амилоида в пораженных тканях. После выяснилось, что в дополнение к классическому амилоидозу, вызываемому хроническими воспалительными процессами, существует целая группа заболеваний, характерной особенностью которых также является внеклеточное формирование амилоида. При этом в составе амилоидных образований обнаружены различные белки и пептиды. К настоящему времени число известных истинных амилоидозов у человека достигло 31 (Sipe et al., 2014). Помимо этого, существует около десятка амилоидозоподобных заболеваний (например, болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона и др.), характеризующихся внутриклеточным образованием амилоида. Несмотря на то что диагностика амилоидозов достаточно хорошо разработана, достоверная идентификация амилоида в биоптатах или в секционном материале все еще может вызывать затруднения. Это связано с относительной специфичностью окраски амилоида КК или флуоресцентными тиофлавидами (Поляков, Шавловский, 2014). Поэтому разработка

эффективной идентификации амилоида в срезах тканей до сих пор является актуальной.

КК представляет собой анионный азокраситель, получаемый путем сочетания диазопроизводного бензидина с двумя молекулами нафтионовой кислоты. Он имеет симметричную структуру и содержит центральный гидрофобный бифенильный фрагмент, расположенный между отрицательно заряженными сульфогруппами. Взаимодействие КК с некоторыми видами амилоидных фибрилл описано в литературе. Например, проведены исследования связывания красителя с фибриллами инсулина, поли-L-лизина (Klunk et al., 1989) и фибриллами бета-амилоида (Klunk et al., 1999). КК наряду с другими методами используется для обнаружения фибрилл в экспериментах на модельных фибриллогенных белках, таких как лизоцим (Krebs et al., 2004). Кроме того, имеются сведения о способности КК препятствовать агрегации молекул амилоидогенных белков (Lendel, 2009). Однако использование красителя ограничивается его токсичностью: данное соединение обладает цитотоксическим, генотоксическим, гематотоксическим и нейротоксическим действием, может вызывать аллергические реакции (Yaneva, Georgieva, 2012), обладает канцерогенным и мутагенным действием (Yaneva, Georgieva, 2012; Nade, 2015). Один из подходов к увеличению эффективности обнаружения амилоида и фибрилл амилоидогенных белков заключается в поиске новых аналогов КК, например с измененным числом ароматических колец в центральном фрагменте молекулы. Изучение их влияния на процесс фибрилlogenеза представляет значительный интерес, так как менее токсичные аналоги КК могут выступать потенциальными ингибиторами формирования амилоида.

Необходимым этапом исследования взаимодействия аналогов красителя с амилоидом является выяснение механизмов связывания самого КК с модельными фибриллами. Несмотря на широкое практическое применение этого красителя, детальному изучению его взаимодействия с белками и их фибриллярными производными посвящено крайне незначительное число работ, и молекулярные основы взаимодействия КК с амилоидом не совсем понятны. К настоящему моменту предложено несколько моделей. Согласно одной из них, молекула КК располагается перпендикулярно полипептидным цепям (и параллельно оси фибриллы) амилоидного белка, имеющего бета-складчатую структуру, и взаимодействует с этим белком посредством связей между своими двумя отрицательно заряженными сульфогруппами и двумя положительно заряженными аминокислотными остатками двух отдельных белковых молекул (Klunk et al., 1989); другие модели предполагают интеркаляцию молекул КК между бета-слоями амилоидных фибрилл или комбинацию водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий (Klunk et al., 1999; Sereikaite, Bumelis, 2006). Также была предложена модель, в соответствии с которой КК (и другие способные к взаимодействию с амилоидами красители) образуют в результате процесса самосборки надмолекулярные комплексы, состоящие из нескольких молекул соединения и связывающиеся с фибриллами как единый лиганд (Stora et al., 2003).

Цель настоящей работы — спектрофотометрическое исследование взаимодействия очищенного коммерческого красителя КК с фибриллами лизоцима, а также рекомбинантных б2М и ТТР человека и оценка стехиометрии связывания красителя с фибриллами.

Материал и методика

Использованные реактивы: Конго красный и ДМСО (Sigma, США); лизоцим белка куриного яйца (Helicon, Россия); Tris и глицин (Amresco, США); 1-пропанол, уксусная кислота и аммиак водный (Вектон, Россия); никель-агарозный сорбент Ni-NTA Agarose (QIAGEN GmbH, Германия).

Получение рекомбинантных ТТР человека и б2М человека. Ранее на основе плазмидного вектора рЕТ-22b(+) (Novagen, США) мы сделали генетические конструкции для экспрессии в бактериальной системе, кодирующие белки ТТР(WT), ТТР с заменой L55P (ТТР(L55P)) (Соловьев и др., 2006) и б2М (Поляков и др., 2011), содержащие 6 гистидиновых остатков на С-конце. Данные конструкции предусматривают выделение нативных белков из периплазмы и их очистку на никель-агарозном сорбенте. ТТР и б2М получали из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3); очистку белков осуществляли посредством аффинной хроматографии на никель-агарозе в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для повышения выхода целевых белков использовали инкубацию бактериальных клеток в течение 30 мин при 42 °С (тепловой шок) перед индукцией синтеза белка (Solovyov et al., 2012).

Получение модельных фибрилл. Фибриллы лизоцима белка куриного яйца получали путем инкубации белка при низких значениях pH и 55 °С, как описано ранее (Krebs et al., 2004). Фибриллы ТТР(WT) выращивали в 50 мМ глицин-HCl (pH 2.0) в течение 7 сут при 37 °С с перемешиванием при 500 об/мин в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия). Фибриллы ТТР(L55P) выращивали в 50 мМ ацетате натрия (pH 4.5) в течение 24 ч при 37 °С с перемешиванием при 500 об/мин. Для получения фибрилл б2М белок инкубировали в 150 мМ глицин-HCl (pH 2.0) в течение 14 сут при 37 °С с перемешиванием при 500 об/мин. Наличие фибрилл подтверждали с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии (Соловьев и др., 2006; Поляков и др., 2010а, 2011; Solovyov et al., 2011; Артеева и др., 2013).

Анализ КК посредством ТСХ и ВЭЖХ. Коммерческий препарат КК хроматографировали в тонком слое силикагеля на пластинках Silufol UV 254 (Avalier, Чехия) в системе 1-пропанол : CH₃COOH : H₂O (89 : 2 : 9, по объему) и в системе 1-пропанол : водный NH₃ (28 %) : H₂O (6 : 1 : 2.5, по объему). Аналитическую ВЭЖХ выполняли на обращеннофазной колонке УМС-Triart C18 250 × 4.6 мм, 3 мкм, 12 нм. Хроматографирование проводили в градиентном режиме. Подвижная фаза имела состав АВ, где А — 25 мМ Tris (pH 8.6), В — ацетонитрил. Состав подвижной фазы изменяли от 95 % А + 5 % В до 5 % А + 95 % В. Для анализа использовали раствор вещества с концентрацией 0.7 мг/мл в смеси вода : ДМСО (1 : 1, по объему). Детекцию осуществляли с помощью проточного спектрофотометра, настроенного на длины волн 360, 480 и 550 нм.

Связывание КК с фибриллами модельных белков. Очищенные препараты КК растворяли в дистиллированной воде до концентрации 500 мкМ (исходный раствор). К растворам фибрилл с концентрацией 1—10 мкМ в буферном растворе 50 мМ фосфата натрия (pH 8.0) добавляли необходимые объемы исходного раствора КК так, чтобы конечная концентрация красителя составляла 5—70 мкМ, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, перемешивали и регистрировали спектры поглощения образцов на приборе

NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Для оценки стехиометрии связывания красителя с фибриллами красные ассоциаты, образующиеся после инкубации в течение 30 мин, осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 18 000 g на центрифуге Microfuge 22R (Beckman Coulter, США) и регистрировали спектры поглощения супернатантов.

Результаты

Очистка и спектральные характеристики КК. Для характеристики взаимодействия КК с модельными фибриллами необходимо иметь представление о спектральных свойствах самого красителя. К сожалению, даже такой параметр, как молярный коэффициент поглощения КК в водных растворах, существенно различается от работы к работе (Klunk et al., 1989, 1999; Sladewski et al., 2006; Zhou et al., 2011; Yaneva, Georgieva, 2012). По-видимому, это связано с недостаточной степенью очистки коммерческих препаратов красителя. Действительно, чистота таких препаратов (например, от компании Sigma) чаще всего не превышает 40 % согласно спецификации. Именно эти препараты используют в морфологических лабораториях. Изучать стехиометрию связывания красителя с фибриллами не представлялось возможным без однозначного знания молярного коэффициента поглощения красителя с поправкой на условия его измерения.

Предварительные опыты по определению степени чистоты коммерческого образца КК посредством ВЭЖХ показали высокую степень сродства красителя к сорбенту и невозможность использования стандартных систем элюции для разделения отдельных компонентов препарата красителя. Поэтому предприняли попытку хроматографии КК на тонком слое силикагеля. В системе 1-пропанол : CH_3COOH : H_2O краситель мигрировал в виде трех зон: с фронтом растворителя перемещалась широкая полоса, слабо окрашенная в оранжевый цвет ($R_f = 1$), далее мигрировала зона в виде расплывчатого пятна серо-фиолетового цвета, $R_f = 0.63$. Часть материала оставалась строго на старте ($R_f = 0$). Эта часть материала имела красную окраску и обладала интенсивной красной флуоресценцией в ультрафиолетовом свете. Материал зон с $R_f = 0$ и $R_f = 0.63$, полученных в кислой системе, при нанесении на новую пластинку и помещении в систему 1-пропанол :

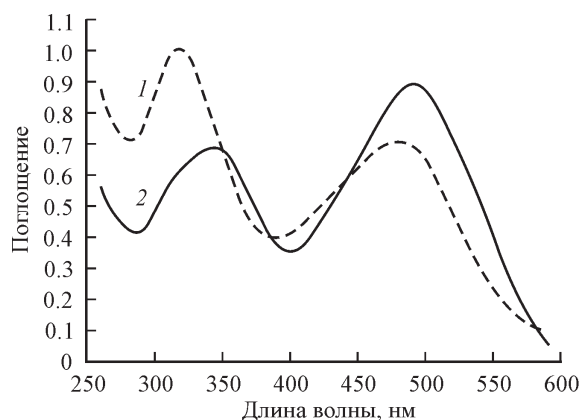


Рис. 1. Спектры поглощения компонентов коммерческого препарата Конго красного (КК).

1 — отделенная примесь, 2 — КК после очистки.

водный NH_3 : H_2O перемещался в виде единственной окрашенной в красный цвет зоны, $R_f = 0.70$. Более того, материал каждой из двух этих зон при повторной хроматографии в кислой системе снова разделялся на две зоны — мигрирующую в виде фиолетового пятна и остающуюся на старте. Таким образом, за исключением материала, который перемещался в кислой системе с фронтом растворителя, в составе коммерческого препарата красителя содержались компоненты, повторно разделяющиеся в процессе ТСХ в системе 1-пропанол : CH_3COOH : H_2O на мигрирующий и остающийся неподвижным. Соответствующие этим компонентам зоны содержали одно и то же вещество. По-видимому, в данном случае мы имеем дело с различиями в степени ассоциации молекул самого КК. Неспособный к перемещению в кислой среде материал может представлять собой димеры или ассоциаты более высокого порядка. На агрегацию молекул красителя указывает также флуоресценция неподвижного материала, которая может быть связана со стабилизацией красителя в определенной конформации.

С учетом вышесказанного проводили очистку коммерческого КК путем экстракции примесных соединений смесью 1-пропанол : CH_3COOH : H_2O (89 : 2 : 9, по объему) с последующим растворением основного вещества в ДМСО и осаждением этанолом в присутствии HCl . В результате получили продукт в виде темно-синего осадка (гидрохлорид КК), который после промывки холодным этанолом высушивали в вакууме до постоянной массы. По данным ТСХ в кислой системе, полученный препарат содержал только материал, представленный зонами с $R_f = 0$ и $R_f = 0.63$. Также опробовали другой способ очистки КК, заключавшийся в переосаждении красителя в используемой для ТСХ кислой системе. Для этого навеску КК (1 часть по массе) растворяли в минимальном объеме ДМСО (10 частей по объему) и далее после фильтрования через бумажный фильтр разбавляли в 10 раз системой 1-пропанол : CH_3COOH : H_2O . При этом образовывался мелкодисперсный осадок темно-синего цвета (уксуснокислая соль КК). Осадок отделяли от супернатанта красно-коричневого цвета центрифугированием в течение 20 мин при 10 000 g и повторно суспендировали в том же объеме кислой системы. После центрифугирования осадок высушивали в вакууме до постоянной массы. Выход сухого КК составлял 40 % от первоначальной массы красителя. Таким образом, из коммерческого препарата с учетом потерь удаляется около 50 % солей и примесных органических соединений. Спектрофотометрический анализ отдельных фракций показал, что в ходе экстракции или переосаждения отделялся примесный компонент, существенно отличающийся по спектру поглощения в УФ и видимой областях от очищенного КК (рис. 1). Спектры растворов двух полученных очищенных препаратов КК с равными молярными концентрациями были практически идентичны.

ВЭЖХ-анализ очищенных препаратов красителя выявил единственный компонент, элюируемый в виде симметричного пика с объемом удерживания 10.33 мл. Посторонних примесей в образце обнаружено не было.

В предварительных опытах с использованием неочищенного коммерческого КК кажущийся молярный коэффициент поглощения этого препарата в максимуме поглощения при 490 нм (ϵ_{490}) в буферном растворе 50 мМ фосфата натрия (рН 8.0) имел значение $2.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Значение ϵ_{490} очищенного красителя при рН > 6.0 составляло $3.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, т. е. примерно в 1.6 раза превыша-

ло ϵ_{490} исходного красителя. Больше всего полученный коэффициент соответствует приведенному в работе (Klunk et al., 1989).

Зависимость ϵ_{490} КК от рН и состава буферного раствора. С целью выбора буферного раствора для экспериментов с фибриллами белков изучали влияние состава и рН раствора на спектр поглощения КК. Значение ϵ_{490} очищенного препарата КК изменялось в зависимости от рН (рис. 2). Минимальное значение ϵ_{490} , равное $1.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, наблюдали при рН 3.0 (50 мМ глицин-HCl) и 4.0 (50 мМ ацетат натрия). При рН 6.0 (50 мМ ацетат натрия) ϵ_{490} составлял $3.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Эта величина оставалась постоянной в фосфатных буферных растворах с более высоким значением рН (ФСБ, рН 7.4, и 50 мМ фосфат натрия, рН 8.0 и 9.0). Значение ϵ_{490} в буферных растворах 50 мМ глицин-HCl и 50 мМ Tris-HCl с рН выше 5.0 достигало $4.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (на рисунке не показано).

Результаты исследования указывали на необходимость проведения последующих экспериментов при строгом контроле уровня рН и состава буферного раствора. Для изучения взаимодействия КК с фибриллами модельных белков решили использовать 50 мМ фосфат натрия (рН 8.0), в котором ϵ_{490} красителя составляет $3.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Взаимодействие КК с фибриллами лизоцима. Связывание КК с фибриллами лизоцима оценивали путем сравнения спектров поглощения красителя в отсутствие и в присутствии фибрилл (рис. 3, а), как описано ранее (Klunk et al., 1989, 1999). Поскольку комплексы красителя с фибриллами представляют собой агрегаты, во всех экспериментах учитывали вклады обусловленного фибриллами рассеяния. Спектр поглощения КК в присутствии фибрилл изменялся: имели место сдвиг максимума поглощения в видимой области от 490 до 500 нм и некоторое возрастание интенсивности поглощения, что свидетельствовало о связывании красителя с фибриллами. Разностный спектр (полученный в результате вычитания спектра самого КК из спектра красителя после инкубации с фибриллами) характеризовался наличием максимума при 540 нм. При добавлении к раствору КК мономера белка выраженных изменений спектра не наблюдалось. Через некоторое время (около 30 мин) после смешивания КК с фибриллами происходило образование

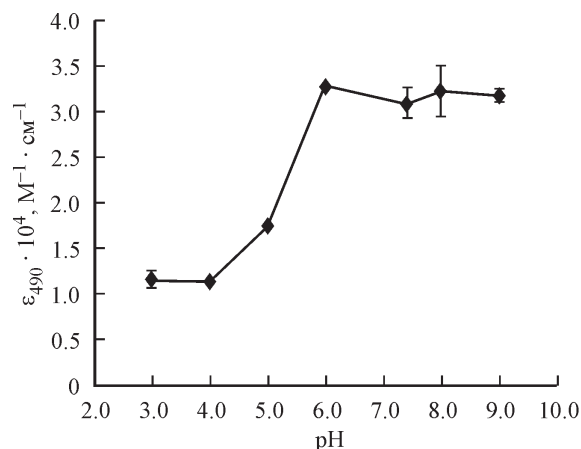


Рис. 2. Зависимость молярного коэффициента поглощения КК (ϵ_{490}) от величины рН буферного раствора.

Вертикальными отрезками представлены ошибки среднего.

красных взвешенных хлопьев, которые при перемешивании раствора дезагрегировали и затем вновь формировались. Центрифугирование комплекса фибрилл с красителем приводило к получению осадка красного цвета, при этом супернатант в зависимости от молярного соотношения КК : фибриллы имел различную интенсивность окраски. Несвязавшийся краситель по спектральным характеристикам не отличался от исходного свободного КК. Возможность осаждения комплекса позволила определить стехиометрию взаимодействия красителя с фибриллами.

Для выяснения стехиометрии связывания КК с фибриллами лизоцима было предпринято титрование постоянного количества фибрилл (в пересчете на молярную массу мономера белка) возрастающими количествами красителя с последующим осаждением комплекса красителя с фибриллами и определением поглощения при 490 нм в супернатанте ($A_{490 \text{ sup}}$). При молярном соотношении КК : фибриллы выше 4 : 1 в супернатанте начинал оставаться свободный краситель. Используя значения $A_{490 \text{ sup}}$, оценивали число молекул красителя, приходящихся на 1 молекулу мономера белка в составе фибрилл (рис. 3, б). Оказалось, что с 1 моль лизоцима в составе фибрилл

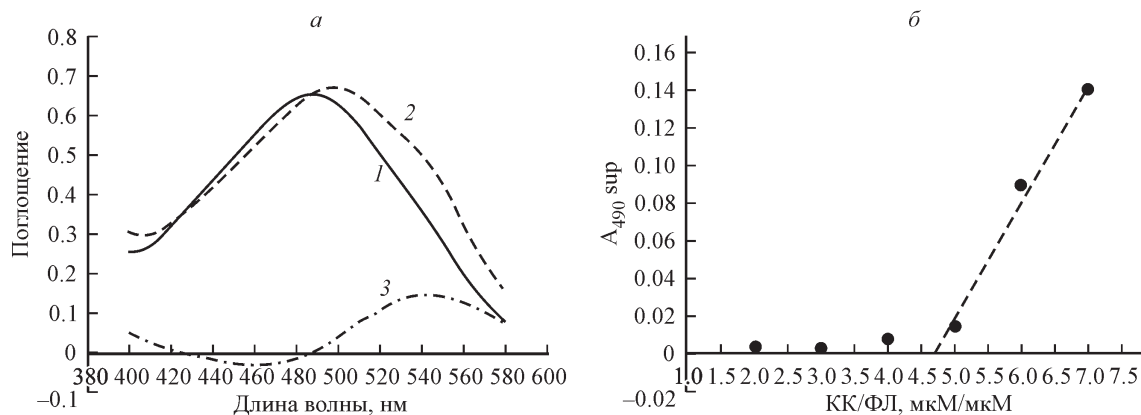


Рис. 3. Параметры взаимодействия КК с фибриллами лизоцима (ФЛ).

а — спектры поглощения свободного КК в растворе (кривая 1), КК в присутствии ФЛ (кривая 2) и разностный спектр (кривая 3); б — график, позволяющий оценить стехиометрию взаимодействия КК с ФЛ по изменению поглощения в супернатанте, полученном после удаления КК, связавшегося с ФЛ (здесь и на рис. 4, 5 — $A_{490 \text{ sup}}$).

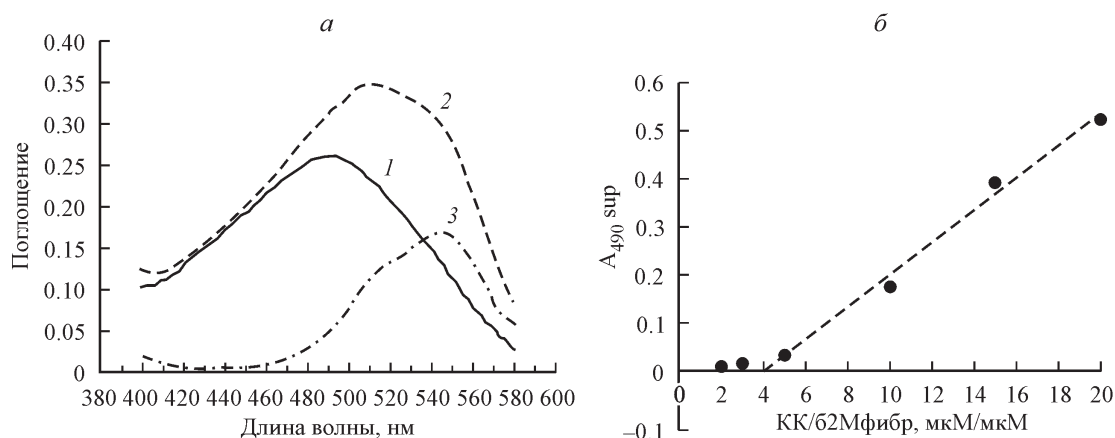


Рис. 4. Параметры взаимодействия КК с фибриллами бета2-микроглобулина (б2Мфибр).

a — спектры поглощения свободного КК в растворе (кривая 1), КК в присутствии фибрилл б2М (кривая 2) и разностный спектр (кривая 3); *б* — график, позволяющий оценить стехиометрию взаимодействия КК с фибриллами.

связывалось приблизительно 5 моль КК. Взаимодействие красителя с фибриллами характеризовалось образованием весьма прочных связей. Органические растворители (этанол, ацетон, хлороформ, ДМСО и др.) были неспособны экстрагировать КК из комплекса с фибриллами.

Полученные результаты позволили предположить, что осаждение комплекса красителя с фибриллами характеризуется высокой избирательностью в отношении фибриллярного состояния и может быть использовано при исследовании процессов фибриллогенеза. С целью выяснения возможности изучения фибриллогенеза других белков в качестве модельных объектов были выбраны получаемые в нашей лаборатории рекомбинантные б2М и ТТР человека.

Взаимодействие КК с фибриллами рекомбинантного б2М человека. При изучении взаимодействия красителей с фибриллами б2М необходимо иметь в виду, что эти фибриллы формируются в кислых условиях, а в нейтральной и щелочной средах — только при наличии определенных дополнительных факторов (Muers et al., 2006; Поляков и др., 2010б, 2011). Как и в случае фибрилл лизоцима, инкубация КК с фибриллами б2М сопровождалась изменением спектра поглощения красителя и достаточно быстрым образованием

хлопьев красного цвета. Центрифугирование комплекса фибрилл с красителем приводило к образованию красного осадка. Следует отметить, что изменения спектра поглощения КК в присутствии фибрилл б2М — сдвиг максимума поглощения от 490 до 515 нм и возрастание интенсивности поглощения — были более выраженными, чем для фибрилл лизоцима (рис. 4, *a*). Разностный спектр характеризовался наличием максимума при 545 нм. В присутствии мономерной формы белка спектр поглощения красителя не изменялся.

Определение стехиометрии взаимодействия КК с фибриллами б2М проводили путем титрования фибрилл возрастающими количествами красителя аналогично опыту с фибриллами лизоцима. Установили, что КК связывался с фибриллами б2М в соотношении примерно 4 моль красителя : 1 моль мономера б2М в составе фибрилл (рис. 4, *б*).

Способность фибрилл б2М к взаимодействию с КК использовали для исследования стабильности данных фибрилл в слабощелочной среде. Фибриллы помещали в ФСБ (рН 7.4) и перемешивали при 500 об/мин и 37 °С в течение 24 ч. Анализ спектров КК после добавления к обработанному таким образом фибриллам показал, что в результате инкубации при рН > 7.0 последние переставали

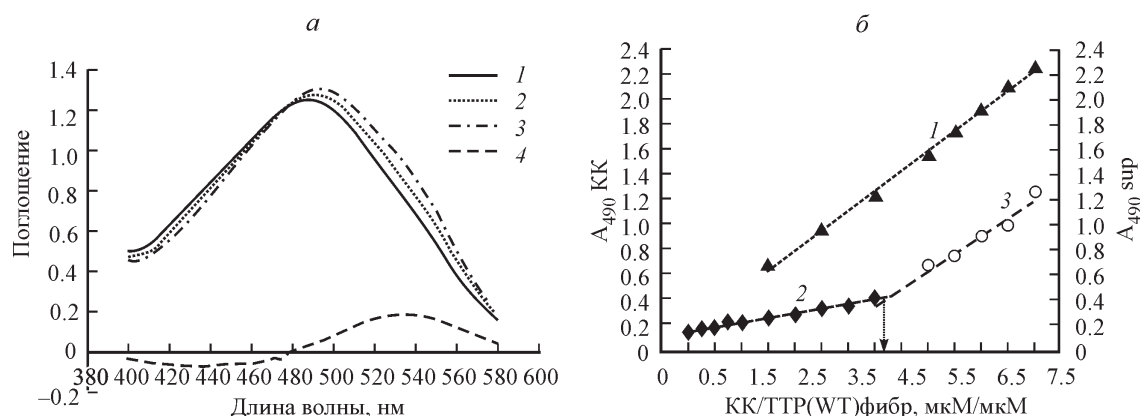


Рис. 5. Параметры взаимодействия КК с фибриллами транстретина дикого типа (ТТР(WT)фибр) и с тетрамером ТТР(WT). *a* — спектры поглощения свободного КК (кривая 1), КК в присутствии тетрамера ТТР(WT) (кривая 2), КК в присутствии фибрилл ТТР(WT) (кривая 3) и разностный спектр (кривая 4); *б* — график, позволяющий оценить стехиометрию взаимодействия КК с фибриллами. Кривая 1 — изменение уровня поглощения свободного КК в зависимости от концентрации при 490 нм ($A_{490 \text{ KK}}$); кривые 2, 3 — поглощение при 490 нм в супернатанте, полученном после удаления связавшегося с фибриллами КК.

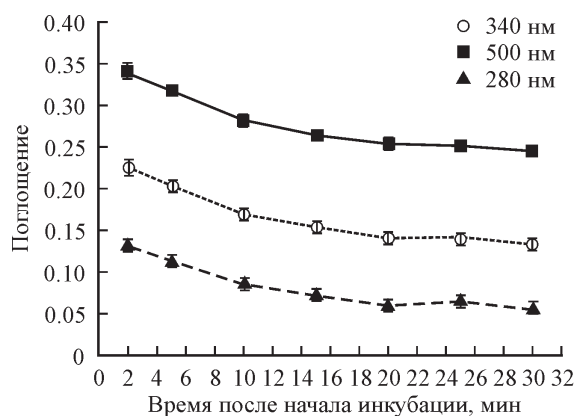


Рис. 6. Изменение интенсивности поглощения КК в присутствии фибрилл ТТР(L55P) в первые минуты после начала инкубации.

связывать краситель; также не происходило формирования окрашенного осадка при центрифугировании. В то же время в параллельном эксперименте инкубация уже образовавшегося комплекса КК с фибриллами б2М в идентичных условиях не приводила к изменению спектра поглощения комплекса (рис. 4, а, кривая 2) на протяжении нескольких суток, что свидетельствовало о стабилизации фибрилл красителем.

Взаимодействие КК с фибриллами рекомбинантного ТТР человека. Еще одним модельным фибриллогенным белком являлся рекомбинантный ТТР(WT). Аналогично фибриллам двух других белков фибриллы ТТР(WT) демонстрировали взаимодействие с красителем, о чем свидетельствовали сдвиг максимума поглощения от 490 до 500 нм и некоторое возрастание интенсивности поглощения (рис. 5, а). Разностный спектр характеризовался наличием максимума при 535 нм. В отличие от опытов с нефибриллярными мономерными формами лизоцима и б2М добавление к раствору КК нефибриллярной формы ТТР(WT), представляющей собой тетрамер, вызывало сдвиг максимума поглощения до 492 нм без изменения интенсивности поглощения. Через некоторое время после инкубации КК с фибриллами происходило образование красного хлопьевидного осадка, но осадок не появлялся при смешивании красителя с нативным ТТР(WT). Фибриллы рекомбинантного ТТР(WT) и фибриллы рекомбинантного ТТР(L55P) — наиболее фибриллогенного мутантного варианта — по изменениям спектра КК не различались.

При титровании фибрилл ТТР(WT) красителем получили кривую зависимости A_{490} sup от молярного соотношения КК : субъединица ТТР, которая имела точку перегиба при молярном соотношении, составляющем приблизительно 4 : 1 (рис. 5, б). По сравнению с фибриллами других модельных белков угол наклона прямой A_{490} sup до точки перегиба (рис. 5, б, кривая 2) в случае ТТР(WT) был существенно меньше. Наклон прямой A_{490} sup после точки перегиба был близок к наклону прямой A_{490} самого красителя (рис. 5, б, кривые 1, 3). Эти данные указывают на то, что с 1 моль белка в составе фибрилл (в расчете на субъединицу ТТР) связывалось примерно 4 моль красителя.

Интересное наблюдение сделали при исследовании взаимодействия КК с фибриллами ТТР(L55P). В наших экспериментах указанные фибриллы образовывались наиболее быстро и формировали крупные, визуально

определяемые агрегаты. В спектре КК в присутствии фибрилл ТТР(L55P) наряду со сдвигом максимума поглощения в длинноволновую область отмечали уменьшение интенсивности поглощения при 490—500 нм в течение 20—30 мин после начала инкубации фибрилл с красителем. Поскольку в процессе регистрации спектров растворы перемешивали непосредственно перед каждым измерением, такое уменьшение интенсивности, вероятно, не было связано с осаждением комплекса КК с фибриллами. Для изучения данного явления исследовали кинетику изменения спектра поглощения красителя в присутствии фибрилл. Оказалось, что уменьшение интенсивности поглощения происходило и в других областях спектра (рис. 6). Приблизительно через 20—30 мин после добавления фибрилл к раствору КК изменение интенсивности поглощения при различных длинах волн прекращалось. В контрольном растворе фибрилл ТТР(L55P) без красителя некоторое снижение интенсивности поглощения также наблюдалось, но в значительно меньшей степени.

Обсуждение

Мы провели спектрофотометрическое исследование взаимодействия фибриллярных форм ряда модельных амилоидогенных белков с красителем КК, который широко используется для выявления амилоида в образцах тканей больных с подозрением на амилоидоз. Нас интересовали как сам факт связывания красителя с фибриллами и нефибриллярными нативными формами белков в растворе, так и стехиометрия связывания. Результаты настоящей работы могут быть использованы для последующей характеристики других полученных нами синтетических аналогов КК.

Прежде всего необходимо было установить причины различий в оценке молярного коэффициента поглощения КК в максимуме поглощения при 490 нм (ϵ_{490}), значения которого приведены в литературе. Мы обнаружили, что использованный коммерческий препарат содержит достаточно большое количество примесей, включающих в себя как органические соединения, так и, по-видимому, неорганические соли. Кроме того, величина ϵ_{490} в значительной степени зависела от pH (что неудивительно, поскольку КК, как и многие другие красители, является кислотно-основным индикатором) и присутствия органических компонентов буферных растворов, таких как Tris и глицин. Поэтому изучение параметров взаимодействия красителя с фибриллами следовало осуществлять в буферном растворе с определенным pH и составом.

Проведенное исследование позволяет разработать способ оценки содержания фибриллярных форм белка путем титрования красителем и осаждения нерастворимых окрашенных комплексов. Исследование фибрилл использованных нами модельных белков показало, что вне зависимости от природы белка фибриллы связывали приблизительно равное количество красителя в расчете на полипептидную цепь, что еще раз указывает на сходство строения исследованных фибрилл и их свойство взаимодействовать с низкомолекулярными красителями. Мономерные формы белков краситель практически не связывал (в случае тетрамера ТТР спектральные изменения были минимальны), при этом окрашенный осадок не образовывался. Более плавное изменение поглощения в супернатанте при 490 нм в опытах по титрованию фибрилл ТТР(WT) в какой-то степени может объяснять относи-

тельно слабое возрастание флуоресценции тиофлавина Т при инкубации с фибриллами ТТР по сравнению с фибриллами других белков (Соловьев и др., 2006; Biancalana, Koide, 2010; Groenning, 2010; Kuznetsova et al., 2012). Величины молярного соотношения мономер (субъединица) белка : краситель, по-видимому, указывают на то, что связанные с белком молекулы КК способны к дальнейшему присоединению дополнительных молекул красителя. Такая ассоциация, возможно, объясняет плохую растворимость и способность к агрегации комплексов КК с фибриллами.

К интересным наблюдениям также можно отнести факт стабилизации фибрилл б2М за счет связывания с молекулами красителя. В отсутствие КК фибриллы этого белка достаточно быстро диссоциировали при помещении в слабощелочной раствор. Данное обстоятельство указывает на изменение свойств фибрилл после присоединения красителя. В случае фибрилл ТТР(L55P) оказалось, что на начальных этапах взаимодействия КК, вероятно, происходит разрушение крупных ассоциатов фибрилл, которое объясняет динамику изменения поглощения в первые минуты инкубации красителя с фибриллами. Пропорциональность снижения поглощения при разных длинах волн (280, 340 и 500 нм) может быть обусловлена уменьшением размеров исходных агрегатов ТТР(L55P) и одновременным увеличением размеров комплексов фибрилл с красителем, конечным результатом которого является образование окрашенного осадка. Таким образом, присоединение КК, с одной стороны, стабилизирует фибриллы, а с другой стороны, скорее всего, способствует дезагрегации крупных надфибриллярных структур. Дальнейшие исследования должны решить вопрос о возможном блокировании роста фибрилл в присутствии красителей — как КК, так и его аналогов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Протеом человека» и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-01912 и 14-04-31145).

Список литературы

- Артеева И. В., Егоров В. В., Горшков А. Н., Гармай Ю. П., Алейникова Т. Д., Шавловский М. М. 2013. Моделирование олигомеризации и фибриллогенез мутантных форм бета2-микроглобулина. Мед. академ. журн. 13 (4) : 92—100. (Arteeva I. V., Egorov V. V., Gorshkov A. N., Garmay Y. P., Aleinikova T. D., Shavlovsky M. M. 2013. Modeling oligomerization and fibrillogenesis mutant forms of beta2-microglobulin. Med. Acad. J. 13 (4) : 92—100.)
- Поляков Д. С., Грудинина Н. А., Соловьев К. В., Егоров В. В., Сироткин А. К., Алейникова Т. Д., Тотолян А. А., Шавловский М. М. 2010а. Бета2-микроглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантных бета2-микроглобулинов человека. Мед. академ. журн. 10 (2) : 40—49. (Polyakov D. S., Grudinina N. A., Solovyov K. V., Egorov V. V., Sirotkin A. K., Aleinikova T. D., Totolyan A. A., Shavlovsky M. M. 2010a. Beta2-microglobulin amyloidosis: fibrillogenesis of natural and recombinant beta2-microglobulin person. Med. Acad. J. 10 (2) : 40—49.)
- Поляков Д. С., Грудинина Н. А., Соловьев К. В., Егоров В. В., Сироткин А. К., Алейникова Т. Д., Тотолян А. А., Шавловский М. М. 2011. Получение рекомбинантного бета2-микроглобулина человека и его фибриллогенез при низких и нейтральных значениях pH. Молекуляр. мед. 2 : 36—39. (Polyakov D. S., Grudinina N. A., Solovyov K. V., Egorov V. V., Sirotkin A. K., Aleinikova T. D., Totolyan A. A., Shavlovsky M. M. 2011. Recombinant beta2-microglobulin man and his fibrillogenesis at low and neutral values of pH. Mol. Med. 2 : 36—39.)
- Поляков Д. С., Тотолян А. А., Шавловский М. М. 2010b. Получение природного бета2-микроглобулина человека. Молекуляр. мед. 6 : 39—43. (Polyakov D. S., Totolyan A. A., Shavlovsky M. M. 2010b. Getting beta2-microglobulin natural person. Mol. Med. 6 : 39—43.)
- Поляков Д. С., Шавловский М. М. 2014. Молекулярные основы бета2-микроглобулинового амилоидоза. Мед. академ. журн. 14 (1) : 24—41. (Polyakov D. S., Shavlovsky M. M. 2014. Molecular basis of beta 2-microglobulin amyloidosis. Med. Acad. J. 14 (1) : 24—41.)
- Соловьев К. В., Гастева А. А., Егоров В. В., Алейникова Т. Д., Сироткин А. К., Шварцман А. Л., Шавловский М. М. 2006. Роль С-концевого фрагмента транстиретина человека в аномальном фибриллогенезе. Биохимия. 71 (5) : 672—680. (Solovyov K. V., Gasteva A. A., Egorov V. V., Aleinikova T. D., Sirotkin A. K., Shvartsman A. L., Shavlovsky M. M. 2006. Role of the C-terminal fragment of human transthyretin in abnormal fibrillogenesis. Biochemistry (Moscow). 71 (5) : 543—549.)
- Шавловский М. М. 2010. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов. Мед. академ. журн. 10 (4) : 63—81. (Shavlovsky M. M. 2010. Molecular and genetic basis of etiopathogenesis amyloidosis. Med. Acad. J. 10 (4) : 63—81.)
- Biancalana M., Koide S. 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. Biochim. biophys. acta. 1804 : 1405—1412.
- Groenning M. 2010. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils — current status. J. Chem. Biol. 3 : 1—18.
- Klunk W. E., Jacob R. F., Mason R. P. 1999. Quantifying amyloid by Congo red spectral shift assay. Meth. Enzymol. 309 : 285—305.
- Klunk W. E., Pettegrew J. W., Abraham J. D. 1989. Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. J. Histochem. Cytochem. 37 : 1273—1281.
- Krebs M. R. H., Morozova-Roche L. A., Daniel K., Robinson C. V., Dobson C. M. 2004. Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils. Protein Sci. 13 : 1933—1938.
- Kuznetsova I. M., Sulatskaya A. I., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2012. Analyzing Thioflavin T binding to amyloid fibrils by an equilibrium microdialysis-based technique. PLoS ONE. 7 : e30724.
- Lade H., Govindwar S., Paul D. 2015. Mineralization and detoxification of the carcinogenic azo dye Congo red and real textile effluent by a polyurethane foam immobilized microbial consortium in an upflow column bioreactor. Int. J. Environ. Res. Public Health. 12 : 6894—6918.
- Lendel C., Bertoncini C. W., Cremades N., Waudby C. A., Vendruscolo M., Dobson C. M., Schenk D., Christodoulou J., Toth G. 2009. On the mechanism of nonspecific inhibitors of protein aggregation: dissecting the interactions of α -synuclein with Congo red and lacmoid. Biochemistry. 48 : 8322—8334.
- Myers S. L., Jones S., Jahn T. R., Morten I. J., Tennent G. A., Hewitt E. W., Radford S. E. 2006. A systematic study of the effect of physiological factors on beta2-microglobulin amyloid formation at neutral pH. Biochemistry. 45 : 2311—2321.
- Picken M. M. 2010. Amyloidosis — where are we now and where are we heading? Arch. Pathol. Lab. Med. 134 : 545—551.
- Rokitansky C. 1842. In: Handbuch der speciellen pathologischen Anatomie. Wien: Braumuller und Seidel. 311—312.
- Sereikaite J., Bumelis V.-A. 2006. Congo red interaction with α -proteins. Acta Biochim. Polonica. 53 : 87—91.
- Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M. J. M., Westermarck P. 2014. Nomenclature 2014: amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. Amyloid. 21 : 221—224.
- Sladewsky T. E., Shafer A. M., Hoag C. M. 2006. The effect of ionic strength on the UV-vis spectrum of congo red in aqueous solution. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 65 : 985—987.

Solovyov K. V., Kern A. M., Grudinina N. A., Aleynikova T. D., Polyakov D. S., Morozova I. V., Shavlovsky M. M. 2012. Genetic structures and conditions of their expression, which allow receiving native recombinant proteins with high output. *Int. J. Biomedicine*. 2 : 45—49.

Solovyov K. V., Polyakov D. S., Grudinina N. A., Egorov V. V., Morozova I. V., Aleynikova T. D., Shavlovsky M. M. 2011. Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins TTR-sfGFP and beta2M-sfGFP. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 41 : 337—349.

Stopa B., Piekarska B., Konieczny L., Rybarska J., Spolnik P., Zemanek G., Roterman I., Krol M. 2003. The structure and protein binding of amyloid-specific dye reagents. *Acta Biochim. Polonica*. 50 : 1213—1227.

Virchow R. 1854. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Archiv Path. Anat. Physiol. Klin. Med.* 6 : 135—138.

Virchow R. 1855. Ueber den Gang der amyloiden Degeneration. *Archiv Path. Anat. Physiol. Klin. Med.* 8 : 364—368.

Yaneva Z. L., Georgieva N. V. 2012. Insights into Congo red adsorption on agro-industrial materials — spectral, equilibrium, kinetic, thermodynamic, dynamic and desorption studies. A review. *Int. Rev. Chem. Eng.* 4 : 127—146.

Zhou Q., Xie C., Gong W., Xu N., Zhou W. 2011. Comments on the method of using maximum absorption wavelength to calculate Congo red solution concentration. *J. Hazard. Mater.* 198 : 381—382.

Поступила 7 X 2015

INTERACTION OF THE DYE CONGO RED WITH FIBRILS OF LYSOZYME, BETA2-MICROGLOBULIN AND TRANSTHYRETIN

O. I. Antimonova,^{1,2,*} N. A. Grudinina,^{1,2} V. V. Egorov,^{3,4} D. S. Polyakov,^{1,5}
V. V. Iljin,¹ M. M. Shavlovsky^{1,5}

¹ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376,

² V. A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, 197341,

³ Research Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, 197022,

⁴ B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Leningrad district, 188300, and

⁵ I. I. Mechnikov North-West State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, 191015;

* e-mail: oa0584@mail.ru

By means of spectrophotometric assay we investigated interaction of the dye Congo red (CR) with fibrils of model proteins — hen egg white lysozyme, recombinant human beta2-microglobulin (b2M) and recombinant human transthyretin (TTR). The commercial dye sample was found to contain a significant amount of impurities. Methods for the dye purification are disclosed and CR molar extinction coefficient at 490 nm (ϵ_{490}) was determined to be $3.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at pH above 6.0. Formation of the CR-fibril complex results in changes in the dye visible absorption spectrum. According to the data on titration of fibril solutions with excess of the dye, CR binds to lysozyme fibrils at a ratio of about 5 molecules per protein monomer within fibril structure, to b2M fibrils — about 4 molecules per monomer, to TTR fibrils — about 4 molecules per subunit of the protein.

Key words: amyloidoses, amyloidogenic proteins, lysozyme, beta2-microglobulin, transthyretin, Congo red, spectrophotometry.