

DOI: 10.7868/S0041377118100144

ЧЕМ ОБУСЛОВЛЕНО ИЗМЕНЕНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТИОФЛАВИНА Т ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ?

© А. И. Сулацкая,^{1,*} М. И. Сулацкий,¹ И. М. Кузнецова,¹ К. К. Туроверов^{1,2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251;

* электронный адрес: ansul@mail.ru

В настоящей работе был проведен анализ существующих в литературе гипотез об агрегации молекул флуоресцентного зонда тиофлавина Т (ThT) в свободном состоянии и при взаимодействии с амилоидными фибриллами. Экспериментально показана способность ThT образовывать эксимеры в водном растворе при высокой концентрации красителя. Проведено сравнительное изучение фотофизических характеристик ThT в мономерной и агрегированной формах и красителя, связанного с амилоидными фибриллами на основе лизоцима. Полученные результаты позволили показать необоснованность предположений о том, что изменение фотофизических характеристик ThT при встраивании в амилоидные фибриллы обусловлено агрегацией молекул красителя. Получено подтверждение мономерной модели связывания ThT с амилоидными фибриллами и сделано заключение о том, что возрастание квантового выхода флуоресценции ThT при встраивании в фибриллы обусловлено только молекулярно-роторной природой красителя (ограничением подвижности фрагментов ThT относительно друг друга за счет увеличения жесткости его микроокружения).

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, флуоресцентные зонды, тиофлавин Т, эксимеры, фотофизические свойства

Накопление упорядоченных белковых агрегатов (амилоидных фибрилл) сопутствует различным тяжелым заболеваниям, таким как нейродегенеративные болезни Альцгеймера и Паркинсона, прионные болезни и др. (Merlini, Bellotti, 2003). Для изучения амилоидных фибрилл применяется широкий спектр разнообразных физико-химических подходов, одним из которых является исследование взаимодействия флуоресцентных зондов с фибриллами.

Бензтиазольный краситель тиофлавин Т (ThT) является наиболее известным и широко используемым зондом для диагностики образования амилоидных фибрилл (Naiki et al., 1990) и изучения их структуры (Kuznetsova et al., 2012). Это обусловлено существенным возрастанием интенсивности флуоресценции красителя при связывании с фибриллами, а также специфичностью этого взаимодействия. Эффективность применения ThT для изучения амилоидных фибрилл в значительной мере зависит от того, насколько корректны представления о фотофизических свойствах красителя в свободном и связанном с амилоидными фибриллами состояниях и о механизме его взаимодействия с фибриллами. Однако на этот счет в литературе существует ряд противоречивых гипотез: исследователи уже долгое время пытаются показать, что флуоресценция ThT, связанного с амилоидными фибриллами, обусловлена димерами, эксимерами или даже мицеллами красителя (Khurana et al., 2005; Groenning,

2010; Sabate et al., 2013). В частности, в одной из недавних работ с применением квантово-химических расчетов была показана принципиальная возможность формирования эксимеров молекулами ThT в растворе, затем без каких-либо экспериментальных доказательств было сделано заключение об агрегации молекул красителя в связанном с амилоидными фибриллами состоянии (Sabate et al., 2013).

Настоящая работа направлена на то, чтобы разобраться в представлениях о спектральных свойствах ThT в свободном и связанном с амилоидными фибриллами состояниях, выявить причину изменения фотофизических характеристик красителя при связывании с амилоидными фибриллами и создать единую картину взаимодействия ThT с фибриллами.

Материал и методика

Материалы. В работе были использованы тиофлавин Т (ThT) (Ultrapure Grade, AnaSpec, США), флуоресцентный краситель ATTO-425 (ATTO-TEC, Германия), глицерин (Merk, Германия), лизоцим (Fluka, США), KH_2PO_4 и NaOH (Реахим, Россия).

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра U-3900H (Hitachi, Япония). Для проведения экспериментов были использованы кюветы

(Helma, Германия) с различной длиной оптического пути (0.001—5 см). Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции измеряли с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия). Зарегистрированные спектральные характеристики корректировали с учетом эффектов первичного и вторичного внутренних фильтров с применением методик, разработанных ранее (Fonin et al., 2014). Для оценки времени жизни возбужденного состояния и анизотропии флуоресценции ThT измеряли кривые затухания флуоресценции красителя с использованием спектрометров FluoTime 300 (PicoQuant GmbH, Германия) и FOG-100 (ООО «КДП», Россия).

Получение амилоидных фибрilll. Амилоидные фибрillы на основе лизоцима были получены путем инкубирования белка в 0.05 М буфере $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ в присутствии 3 М GdnHCl (рН 6.3) при 57 °C и постоянном перемешивании в течение 24 ч.

Равновесный микродиализ. Равновесный микродиализ проводили с использованием приспособлений (Harvard Apparatus/Amika, США), которые состоят из двух камер равного объема (500 мл), разделенных мембраной, непроницаемой для частиц массой больше 10 000 Да.

Результаты и обсуждение

Способность тиофлавина Т образовывать агрегаты в высококонцентрированном водном растворе. Для получения экспериментального обоснования принципиальной возможности (или невозможности) формирования агрегатов молекулами ThT исследовали фотофизические свойства красителя в водном растворе в экстремально широком диапазоне его концен-

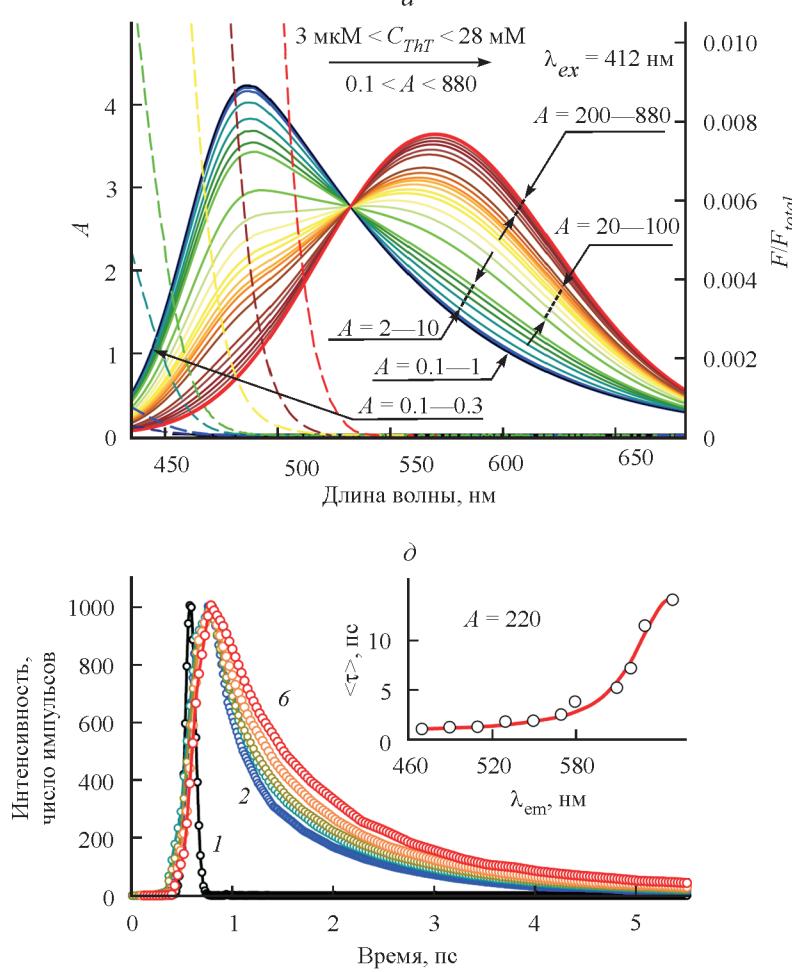
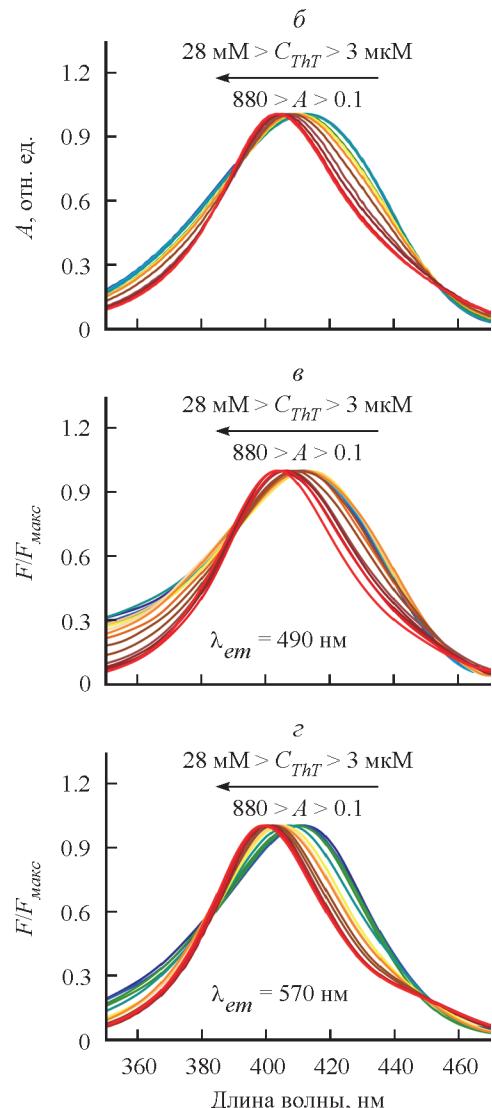


Рис. 1. Спектральные свойства высококонцентрированных водных растворов ThT.

a: сплошные линии — нормированные спектры флуоресценции, штриховые — спектры поглощения растворов ThT с оптической плотностью от 0.1 до 880, F — интенсивность флуоресценции (ИФ) при дискретной длине волн, F_{total} — интегральная ИФ; C_{ThT} — концентрация растворов, A — оптическая плотность растворов при длине волны 412 нм. *b* — нормированные спектры поглощения. *в, г* — нормированные спектры возбуждения флуоресценции при длине волны регистрации (λ_{em}) соответственно 490 и 570 нм. *д* — нормированный временной профиль импульса возбуждающего света (кривая 1) и нормированные кривые затухания (2—6) флуоресценции высококонцентрированного раствора ThT ($A = 220$), зарегистрированные при $\lambda_{em} = 490, 510, 530, 550$ и 570 нм соответственно. На вставке показана зависимость рассчитанных значений времени жизни возбужденного состояния ($\langle\tau\rangle$) исследуемого раствора от длины волны регистрации (λ_{em}).



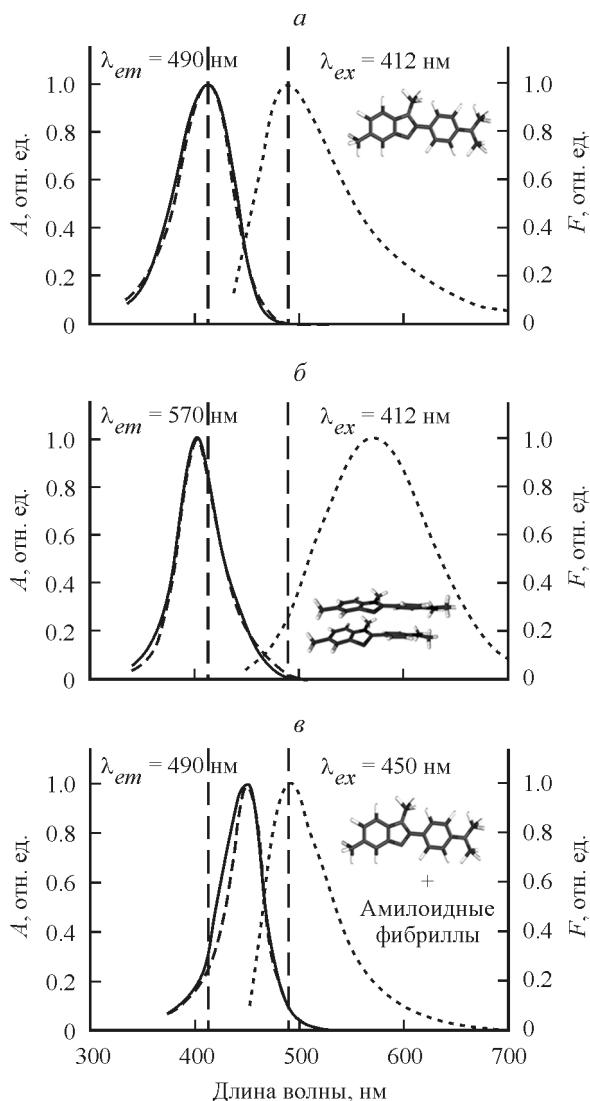


Рис. 2. Спектральные свойства мономеров (а) и эксимеров (б) ThT в свободном состоянии в водном растворе, а также молекул красителя, связанных с амилоидными фибрillами на основе лизоцима (в).

Сплошные линии — спектры поглощения, штриховые — спектры возбуждения флуоресценции, пунктирные — спектры флуоресценции ThT; A — оптическая плотность, F — интенсивность флуоресценции, λ_{ex} и λ_{em} — длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции соответственно.

траций (3 мкМ—30 мМ). Нужно отметить, что эти эксперименты стали возможными благодаря использованию спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия), конструктивные особенности которого позволяют работать с растворами, существенно различающимися по концентрации при одних и тех же условиях проведения эксперимента. Применение этого оборудования облегчило коррекцию зарегистрированных спектральных характеристик ThT с учетом первичного эффекта внутреннего фильтра, обусловленного ослаблением возбуждающего светового потока при прохождении через поглощающий образец (Fonin et al., 2014). Анализ полученных результатов показал, что спектры поглощения и спектры флуоресценции красителя значительно перекрываются, в связи с чем коротковолновая область спектров флуоресценции искается за счет вторичного эффекта внутреннего

фильтра, обусловленного перепоглощением излучаемого образцом света. Данный эффект, который наиболее существенно проявляется в случае высококонцентрированных растворов, также учитывали с помощью специально разработанного протокола (Fonin et al., 2014).

Полученные результаты свидетельствуют о сдвиге максимума спектра флуоресценции ThT в длинноволновую область при увеличении концентрации красителя (рис. 1, а), что хорошо согласуется с гипотезой об агрегации молекул ThT. Для того чтобы определить, образуются эти комплексы в основном или только в возбужденном состоянии, были проанализированы спектры поглощения тех же растворов красителя, а также спектры возбуждения флуоресценции при регистрации в максимуме спектра флуоресценции мономеров (490 нм) и агрегатов (570 нм) ThT (рис. 1, б—г). Показано, что скорректированные на вторичный эффект внутреннего фильтра спектры возбуждения флуоресценции ThT, как и ожидалось, совпадают со спектрами его поглощения. При увеличении концентрации красителя происходит сдвиг спектров поглощения и возбуждения флуоресценции в коротковолновую область, но этот сдвиг значительно меньше, чем сдвиг спектра флуоресценции. Этот факт свидетельствует о том, что в основном состоянии молекулы красителя сближены друг с другом и оказывают друг на друга влияние, чем обусловлен незначительный сдвиг спектра поглощения, но образование комплекса молекул происходит только в возбужденном состоянии. Таким образом, полученные результаты позволили сделать заключение о том, что обнаруженные комплексы являются эксимерами.

Для того чтобы охарактеризовать агрегаты ThT, было рассчитано значение квантового выхода флуоресценции эксимеров красителя ($q_{\text{экс}} \sim 10^{-3}$) (значение квантового выхода флуоресценции мономеров ThT $q_{\text{мон}} \sim 10^{-4}$ (Sulatskaya et al., 2010)). Кроме того, были исследованы кривые затухания флуоресценции красителя при различных длинах волн регистрации, в том числе в максимуме флуоресценции мономеров (490 нм) и эксимеров (570 нм) (рис. 1, д), и определено время жизни возбужденного состояния эксимерной формы ThT $\langle \tau \rangle_{\text{экс}} \sim 10^{-2}$ нс (время жизни возбужденного состояния мономерной формы красителя $\langle \tau \rangle_{\text{мон}} \sim 10^{-3}$ нс (Kuznetsova et al., 2016)) (рис. 1, д, вставка).

Модель связывания тиофлавина Т с амилоидными фибрillами и причины изменения его характеристик при взаимодействии с фибрillами. Следующим этапом стало проведение анализа спектральных свойств ThT, связанного с амилоидными фибрillами на основе лизоцима. Как оказалось, это является нетривиальной задачей, поскольку раствор красителя с амилоидными фибрillами представляет собой равновесную систему свободного и связанного с фибрillами зондов. Для решения проблемы нами предложен подход, основанный на подготовке тестируемых растворов методом равновесного микродиализа (Kuznetsova et al., 2012). Применение этого подхода позволило получить раствор образца, с использованием которого были зарегистрированы суммарные спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции свободного и связанного с фибрillами красителей. Кроме того, был получен раствор сравнения, с использованием которого были зарегистрированы спектральные характеристики свободного красителя в той же концентрации, что и в растворе образца. Это в свою очередь позволило определить спектральные характеристики фракции молекул ThT, связанных с амилоидными фибрillами (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что спектр поглощения связанного с фибрillами красителя сдвинут в длинноволновую область относительно спектра мономеров в водном растворе, в то время как спектр поглощения эксимеров сдвинут в коротковолновую область. Сдвиг спектра поглощения красителя в длинноволновую область при связывании с амилоидными фибрillами обусловлен изменением его микроокружения, что подтверждается данными о фотофизических свойствах ThT в растворах различной полярности (Stsiapura et al., 2016). Кроме того, оказалось, что спектры флуоресценции связанного с фибрillами красителя практически совпадают со спектрами флуоресценции мономеров красителя и не имеют ничего общего со спектрами эксимеров ThT. Таким образом, было получено экспериментальное подтверждение мономерной модели встраивания красителя в амилоидные фибрillы. Было сделано заключение о том, что гипотезы об агрегации молекул ThT в связанном с фибрillами состоянии необоснованны, а изменение фотофизических характеристик ThT при встраивании в амилоидные фибрillы обусловлено только молекулярно-роторной природой красителя.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 18-74-10100).

Список литературы

- Fonin A. V., Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2014. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction. PLoS ONE. 9 : e103878.
- 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.
- Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S. A., Krishna V., Grover R. K., Roy R., Singh S. 2005. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. J. Struct. Biol. 151 : 229—238.
- Kuznetsova I. M., Sulatskaya A. I., Maskevich A. A., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2016. High fluorescence anisotropy of thioflavin T in aqueous solution resulting from its molecular rotor nature. Anal. Chem. 88 : 718—724.
- Kuznetsova I. M., Sulatskaya A. I., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2012. A new trend in the experimental methodology for the analysis of the thioflavin T binding to amyloid fibrils. Mol. Neurobiol. 45 : 488—498.
- Merlini G., Bellotti V. 2003. Molecular mechanisms of amyloidoses. New England J. Med. 349 : 583—596.
- Naiki H., Higuchi K., Matsushima K., Shimada A., Chen W. H., Hosokawa M., Nakakuki K., Takeda T. 1990. Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: use of the fluorescent indicator, thioflavine T. Lab. Invest. 62 : 768—773.
- Sabate R., Rodriguez-Santiago L., Sodupe M., Saupe S. J., Ventura S. 2013. Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. Chem. Commun. 49 : 5745—5747.
- Stsiapura V. I., Kurhuzenkau S. A., Kuzmitsky V. A., Bouagannov O. V., Tikhomirov S. A. 2016. Solvent polarity effect on nonradiative decay rate of thioflavin T. J. Phys. Chem. A. 120 : 5481—5496.
- Sulatskaya A. I., Maskevich A. A., Kuznetsova I. M., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2010. Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. PLoS ONE. 5 : e15385.

Поступила 16 VII 2018

WHAT CAUSES THE CHANGES OF THIOFLAVIN T PHOTOPHYSICAL CHARACTERISTICS UPON ITS BINDING TO AMYLOID FIBRILS?

A. I. Sulatskaya,^{1,*} M. I. Sulatsky,¹ I. M. Kuznetsova,¹ K. K. Turoverov^{1,2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: ansul@mail.ru

In this paper, we analyzed the existing hypotheses on the aggregation of the fluorescent probe thioflavin T (ThT) molecules in the free and bound to amyloid fibrils states. The ability of ThT to form excimers in an aqueous solution at a high dye concentration was shown experimentally. A comparative study of the photoophysical characteristics of ThT in the monomeric and aggregated forms and the dye bound to lysozyme amyloid fibrils was carried out. The obtained results allowed to show the unreasonableness of the assumption that the change in the ThT photoophysical characteristics upon incorporation into amyloid fibrils is due to aggregation of the dye molecules. It was confirmed a monomer model of ThT binding to amyloid fibrils and concluded that the increase in the ThT fluorescence quantum yield when the dye incorporated into fibrils is due only to its molecular rotor nature (by the restriction of the ThT fragments rotation relative one another due to the increase in the rigidity of its microenvironment).

Key words: amyloid fibrils, fluorescent probes, thioflavin T, excimers, photoophysical properties