

DOI: 10.7868/S0041377118100156

ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО АНАЛОГА ТИОФЛАВИНА Т, ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ DMASEBT, В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ

© А. И. Сулацкая,^{1,*} О. И. Поварова,¹ М. И. Сулацкий,¹ Н. П. Родина,¹
И. М. Кузнецова,¹ К. К. Туроревов^{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 исследованы фотофизические свойства нового аналога флуоресцентного зонда тиофлавина Т (ThT), транс-2-[4-(диметиламино)стирил]-3-этил-1,3-бензотиазолия перхлората (DMASEBT), в свободном состоянии в водных растворах и при связывании с амилоидными фибриллами. Получено подтверждение стабильности красителя в широком диапазоне рН раствора, в том числе в условиях получения исследуемых амилоидных фибрилл. С использованием специально разработанного подхода, основанного на спектроскопическом исследовании образцов, подготовленных методом равновесного микродиализа, показано, что встраивание DMASEBT в амилоидные фибриллы на основе инсулина приводит к длинноволновому сдвигу спектра его поглощения, а также к значительному возрастанию квантового выхода и времени затухания флуоресценции красителя. Кроме того, показано, что константы связывания ThT и DMASEBT с амилоидными фибриллами на основе инсулина имеют один и тот же порядок. На основании полученных результатов сделано заключение: DMASEBT обладает свойствами молекулярного ротора (что является ключевым моментом для флуоресцентного зонда), имеет сходный с ThT механизм взаимодействия с амилоидными фибриллами и улучшенные по сравнению с ThT спектральные характеристики, сдвинутые в область «окна прозрачности» биологических тканей; DMASEBT является перспективным диагностическим агентом для изучения амилоидных фибрилл.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, флуоресцентные зонды, тиофлавин Т (ThT), транс-2-[4-(диметиламино)стирил]-3-этил-1,3-бензотиазолия перхлорат (DMASEBT), фотофизические свойства, параметры связывания

Для изучения структуры и механизмов образования амилоидных фибрилл, накопление которых сопутствует широкому спектру серьезных заболеваний человека, таких как болезни Паркинсона и Альцгеймера, гемодиализный амилоидоз и др., эффективно применяют флуоресцентные зонды, из которых наиболее известным является бензтиазольный краситель тиофлавин Т (ThT) (Naiki et al., 1989; LeVine, 1993, 1999). Это обусловлено способностью ThT формировать интенсивно флуоресцирующие комплексы при взаимодействии с фибриллами. При этом, согласно литературным данным, за исключением ацетилхолинэстеразы (De Ferrari et al., 2001) и сывороточных альбуминов (Rovnyagina et al., 2018), ThT не связывается с белками в нативном, развернутом и частично свернутых состояниях, с олигомерами и аморфными агрегатами белков, т. е. взаимодействие красителя с фибриллами очень специфично.

Однако несмотря на очевидные преимущества использования ThT для исследования амилоидных фибрилл *in vitro*, спектральные свойства этого красителя ограничивают возможность его применения для проведения непосредственной диагностики амилоидных бляшек в

живых клетках и тканях. Это обусловлено тем, что спектры поглощения и флуоресценции ThT расположены в фиолетовой и синей областях спектра (см., например: Sulatskaya et al., 2017), соответствующих автофлуоресценции клеток. В связи с этим в настоящее время актуальными являются синтез и исследование производных ThT, имеющих спектральные характеристики, смешенные в область «окна прозрачности» биологических тканей. Одним из таких красителей является новый флуоресцентный зонд транс-2-[4-(диметиламино)стирил]-3-этил-1,3-бензотиазолия перхлорат (DMASEBT) (Lavysh et al., 2014).

Структура DMASEBT отличается от структуры ThT наличием длинной цепочки сопряженных связей между бензтиазольным и аминобензольным кольцами, а также заменами метильной группы бензтиазольного кольца на водород и метильной группы при атоме N5 пирольного кольца на этильную. Ранее было показано, что наличие этих модификаций обуславливает существенный сдвиг спектральных характеристик аналога относительно характеристик ThT в длинноволновую область (Lavysh et al., 2014). В настоящей работе исследовали влияние рН

раствора на стабильность DMASEBT, его параметры связывания с амилоидными фибрillами инсулина и фотофизические характеристики связанного красителя с использованием растворов, подготовленных методом равновесного микродиализа (Kuznetsova et al., 2012).

Материал и методика

Материалы. В работе использовали тиофлавин Т (ThT) (UltraPure Grade, AnaSpec, США), краситель ATTO-425 (ATTO-TEC, Германия) и инсулин и компоненты для подготовки буферных растворов (Sigma, США). DMASEBT синтезирован и предоставлен сотрудниками Гродненского государственного университета им. Янки Купалы (Гродно, Беларусь). Величину pH буферных растворов контролировали pH-метром HI 9024 (HANNA Instruments, США).

Спектры поглощения были зарегистрированы с использованием спектрофотометра U-3900H (Hitachi, Япония). Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции измеряли с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия). Зарегистрированные спектральные характеристики были скорректированы с учетом первичного эффекта внутреннего фильтра с применением методики, разработанной ранее (Fonin et al., 2014). Для оценки времени жизни возбужденного состояния DMASEBT в свободном состоянии и при связывании с амилоидными фибрillами измеряли кривые затухания флуоресценции красителя с использованием спектрометров FluoTime 300 (PicoQuant GmbH, Германия) и FOG-100 (ООО «КДП», Россия).

Амилоидные фибрillы на основе инсулина были получены путем инкубации белка в концентрации 2 мг/мл в 20%-ной (по объему) уксусной кислоте в присутствии 100 мМ NaCl (pH 2.0) при 37 °C и постоянном перемешивании в течение 24 ч.

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

Для визуализации взаимодействия DMASEBT с амилоидными фибрillами использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Olympus FV 3000 (Olympus, Япония).

Результаты и обсуждение

Стабильность DMASEBT в водных растворах с широким диапазоном pH. Для регистрации спектральных характеристик DMASEBT готовили буферные растворы с различными значениями pH: KCl—HCl (1.0—2.2), глицин—HCl (2.2—3.2), лимонная кислота—Na₂HPO₄ (2.6—7.6), Tris—HCl (7.2—9.0), глицин—NaOH (8.7—10.4), Na₂CO₃—NaHCO₃ (9.5—10.5), Na₂HPO₄—NaOH (11—12.5) и KCl—NaOH (12—13). Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции красителя были скорректированы на первичный эффект внутреннего фильтра (Fonin et al., 2014). Полученные результаты подтвердили длинноволновый сдвиг спектров поглощения и флуоресценции исследуемого красителя ($\lambda_{\text{погл}} = 512$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 590$ нм) по сравнению со спектральными характеристиками ThT ($\lambda_{\text{погл}} = 412$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 490$ нм),

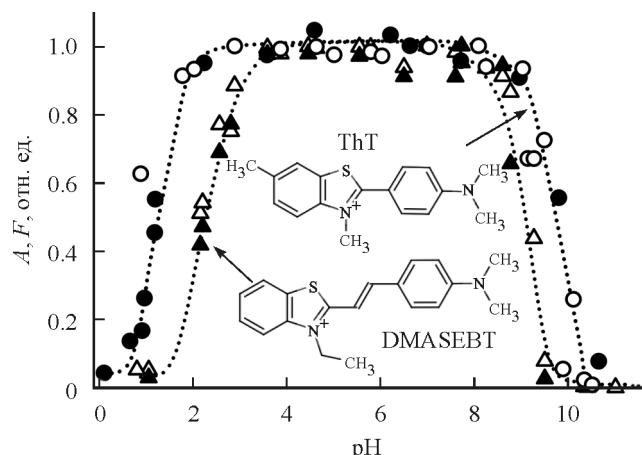


Рис. 1. Фотофизические свойства красителей DMASEBT и ThT в растворах с различными значениями pH, а также их структурные формулы.

Представлены зависимости оптической плотности (A) DMASEBT ($\lambda_{\text{погл}} = 512$ нм; белые треугольники) и ThT ($\lambda_{\text{погл}} = 412$ нм; белые кружки) и интенсивности флуоресценции (F) DMASEBT ($\lambda_{\text{возб}} = 512$ нм, $\lambda_{\text{рез}} = 605$ нм; черные треугольники) и ThT ($\lambda_{\text{возб}} = 412$ нм, $\lambda_{\text{рез}} = 490$ нм; черные кружки) от pH раствора.

что обусловлено увеличенной системой π -сопряженных связей DMASEBT.

Было показано, что поглощение (A) и интенсивность флуоресценции (F) DMASEBT чувствительны к величине pH раствора только при ее критических значениях (менее 2 и выше 9) (рис. 1), что может быть обусловлено изменением заряда и конформации молекулы красителя. Нужно отметить, что стабильность в широком диапазоне pH раствора является одним из основных требований к красителям, применяемым в качестве теста на образование амилоидных фибрill и при исследовании их структуры, поскольку для получения этих белковых агрегатов *in vitro* зачастую используются критические значения pH раствора. Применимость DMASEBT в качестве инструмента для исследования амилоидных фибрill в таких условиях (20%-ная уксусная кислота (по объему) и 100 мМ NaCl, pH 2) проверяли на примере фибрill на основе инсулина.

Взаимодействие DMASEBT с амилоидными фибрillами. В первую очередь было показано, что DMASEBT не взаимодействует с инсулином в-native состоянии, и это подтверждается неизменностью его фотофизических свойств в присутствии мономерного белка (данные не представлены). Далее с использованием растворов, подготовленных методом равновесного микродиализа (Kuznetsova, Sulatskaya, 2012), определяли спектральные характеристики DMASEBT, связанного с амилоидными фибрillами инсулина (рис. 2, *a*—*в*), константы связывания (K_{bi}) и число мест связывания (n_i) красителя с фибрillами в условиях их получения (pH 2) (см. таблицу). Взаимодействие DMASEBT с исследуемыми амилоидными фибрillами было подтверждено конфокальной микроскопией (рис. 2, *г*). С использованием рассчитанных параметров связывания, а также оптической плотности (A) и скорректированной на первичный эффект внутреннего фильтра интенсивности флуоресценции (E) растворов, подготовленных методом равновесного микродиализа, определяли фотофизические характеристики связанного красителя — коэффициенты молярной экстинкции (ε_i) и квантовые выходы флуоресценции (q_i) (см. таблицу).

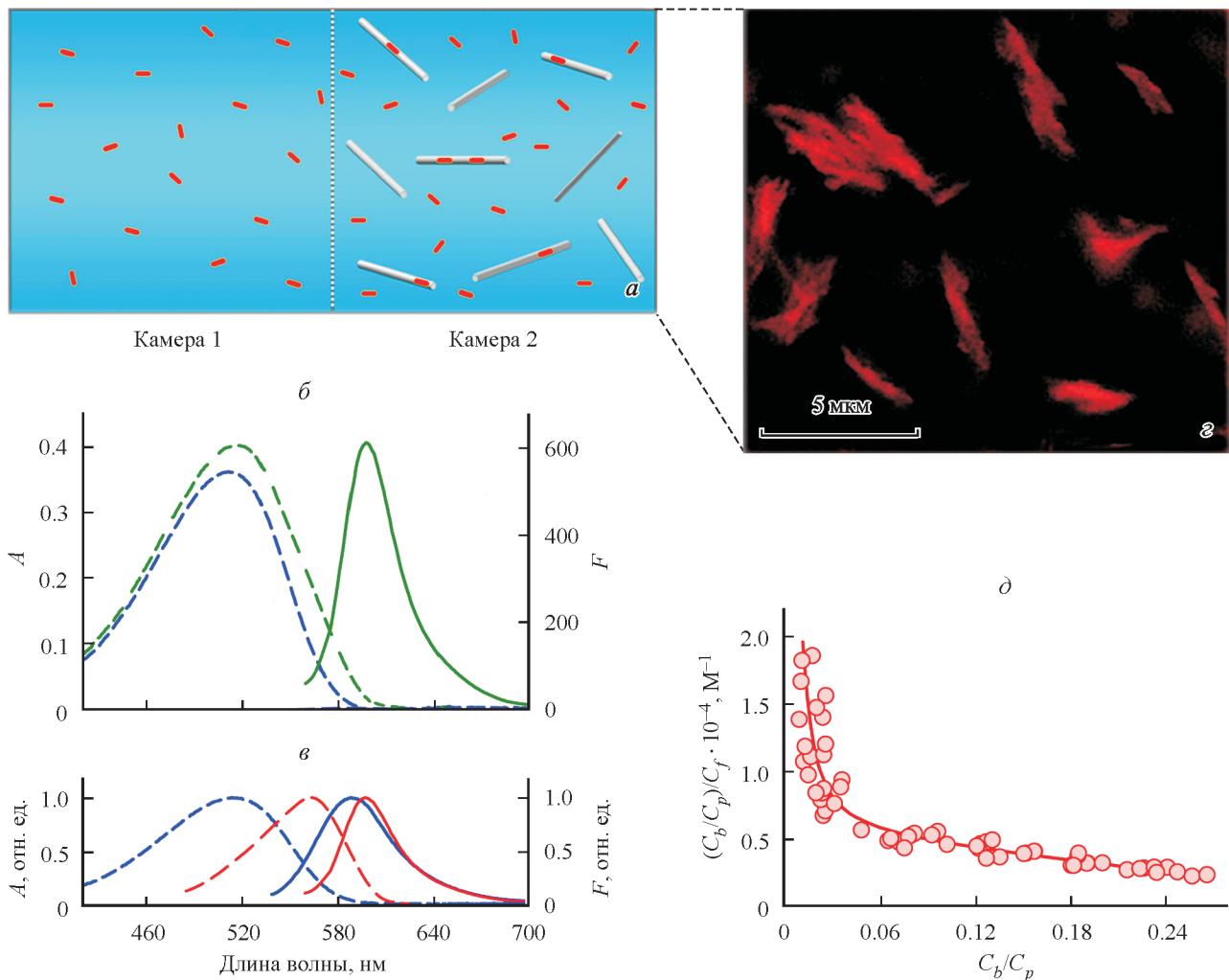


Рис. 2. Методика определения параметров связывания DMASEBT с амилоидными фибрillами на основе инсулина и спектральных характеристик связанного красителя.

a — камеры 1 и 2 для подготовки исследуемых образцов с использованием равновесного микродиализа: представлено состояние равновесия, когда концентрации свободного DMASEBT (C_f) в камерах 1 и 2 равны, а суммарная концентрация красителя в камере 2 равна сумме C_f и концентрации связанного с фибрillами красителя (C_b). *б* — спектры поглощения (штриховые кривые) и флуоресценции (сплошные кривые) свободного DMASEBT в камере 1 (синие кривые) и суммарные спектры свободного и связанного с фибрillами красителя в камере 2 (зеленые кривые). *в* — нормированные спектры DMASEBT свободного (синие кривые) и связанного с фибрillами (красные кривые). *г* — конфокальное изображение амилоидных фибрill инсулина, окрашенных DMASEBT; A — поглощение и F — интенсивность флуоресценции DMASEBT. *д* — зависимость Скетчара (C_p — концентрация амилоидных фибрill по белку), нелинейность которой показывает существование как минимум двух мод (типов) связывания DMASEBT с амилоидными фибрillами.

Параметры связывания DMASEBT и ThT с амилоидными фибрillами инсулина и характеристики свободных и связанных красителей

Краситель	Условия	$\lambda_{\text{погл.}}$, нм	$\lambda_{\text{фл.}}$, нм	$\langle \tau \rangle$, нс	Мода	$K_{bi} \cdot 10^{-5}$, M^{-1}	n_i	$\varepsilon_i \cdot 10^{-4}$, $M^{-1}cm^{-1}$	q_i
DMASEBT	Фибрillы инсулина	562	598	2.2	1 2	72 0.12	0.01 0.42	7.2 1.5	0.97 0.77
	Свободный, водный раствор	514	590	0.013	—	—	—	1.9	0.01
ThT	Фибрillы инсулина	450	488	1.8	1 2	78 0.35	0.02 0.14	7.9 2.3	0.72 0.27
	Свободный, водный раствор	412	490	0.001	—	—	—	3.2	10^{-4}

Примечание. $\lambda_{\text{погл.}}$ и $\lambda_{\text{фл.}}$ — максимумы спектра поглощения и флуоресценции соответственно, $\langle \tau \rangle$ — время жизни возбужденного состояния, i — число мод связывания, K_{bi} — константа связывания с каждой из мод связывания (i), n_i — число мест связывания в пересчете на молекулу белка, ε_i — коэффициент молярной экстинкции, q_i — квантовый выход флуоресценции. Характеристики и параметры связывания с фибрillами для ThT взяты из: Kuznetsova et al., 2012, 2016; Sulatskaya et al., 2017.

Можно заметить, что DMASEBT аналогично ThT имеет две моды связывания с фибрillами на основе инсулина (что подтверждается нелинейностью зависимости Скетчарда (рис. 2, δ)) и высокую аффинность к этим амилоидным фибрillам. Кроме того, инкорпорирование аналога в амилоидные фибрillы сопровождается длинноволновым сдвигом спектра поглощения красителя (рис. 2, ε), а также существенным возрастанием квантового выхода флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния красителя (см. таблицу).

Таким образом, результаты исследования взаимодействия DMASEBT с амилоидными фибрillами на основе инсулина свидетельствуют о том, что синтезированный краситель обладает преимуществами ThT (стабильностью в широком диапазоне pH раствора, специфичностью взаимодействия с фибрillами и изменением фотофизических характеристик при взаимодействии с ними). При этом он имеет спектральные характеристики, существенно сдвинутые относительно характеристик ThT в длинноволновую область (примерно на 100 нм). В связи с этим сделано заключение о перспективности использования зонда DMASEBT для детекции амилоидных фибрill. Полученные результаты могут быть востребованы при разработке флуоресцентных зондов для диагностики возникновения амилоидных фибрill в области «окна прозрачности» биологических тканей *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01614) и стипендии Президента РФ (СП-841.2018.4).

Список литературы

De Ferrari G. V., Mallender W. D., Inestrosa N. C., Rosenberg T. L. 2001. Thioflavin T is a fluorescent probe of the acetylcholi-

nesterase peripheral site that reveals conformational interactions between the peripheral and acylation sites. J. Biol. Chem. 276 : 23 282—23 287.

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.

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.

Lavysh A. V., Sulatskaya A. I., Lugovskii A. A., Voropay E. S., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Maskevich A. A. 2014. Photophysical properties of trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate, a new structural analog of thioflavin T. J. Appl. Spectr. 81 : 205—213.

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. Meth. Enzymol. 309 : 274—284.

*Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. 1989. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T1. Anal. Biochem. 177 : 244—249.*

Rovnyagina N. R., Sluchanko N. N., Tikhonova T. N., Fadiev V. V., Litskevich A. Y., Maskevich A. A., Shirshin E. A. 2018. Binding of thioflavin T by albumins: an underestimated role of protein oligomeric heterogeneity. Int. J. Biol. Macromol. 108 : 284—290.

Sulatskaya A. I., Lavysh A. V., Maskevich A. A., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2017. Thioflavin T fluorescence as excimer in highly concentrated aqueous solutions and as monomer being incorporated in amyloid fibrils. Sci. Rep. 7 : 2146.

Поступила 16 VII 2018

PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF A NEW THIOFLAVIN T ANALOGUE, FLUORESCENT DYE DMASEBT, IN WATER SOLUTIONS AND BOUND TO AMYLOID FIBRILS

A. I. Sulatskaya,^{1,*} O.I. Povarova,¹ M. I. Sulatsky,¹ N. P. Rodina,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

The photophysical properties of a new analogue of the fluorescent probe thioflavin T (ThT), trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate (DMASEBT), were investigated. A confirmation of the dye stability in a wide range of the solution pH was obtained, including, under the conditions of the tested amyloid fibrils preparation. Using a specially developed approach based on the spectroscopic study of samples prepared by the equilibrium microdialysis, it was shown that incorporation of DMASEBT into insulin amyloid fibrils results in a long-wave shift of its absorption spectrum, as well as a significant increase in the dye fluorescence quantum yield and lifetime. In addition, it was shown that the binding constants of ThT and DMASEBT to insulin amyloid fibrils based are of the same order. Based on the obtained results, it was concluded that DMASEBT has the properties of the molecular rotor (what is the key point for the fluorescent probe), has a similar to ThT mechanism of interaction with amyloid fibrils and the improved spectral properties compared to ThT shifted to the «transparency window» of the biological tissues. Thus, it has been shown that DMASEBT is a perspective diagnostic agent for the study of amyloid fibrils.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, флуоресцентные красители, тиофлавин Т (ThT), транс-2-[4-(диметиламинометил)-1,3-бензотиазолий]перхлорат (DMASEBT), фотофизические свойства, параметры связывания