

DOI: 10.7868/S0041377118100168

**ВРЕМЯ ЖИЗНИ ВОЗБУЖДЕННОГО СОСТОЯНИЯ И АНИЗОТРОПИЯ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СВОБОДНОГО И СВЯЗАННОГО С АМИЛОИДНЫМИ
ФИБРИЛЛАМИ ТИОФЛАВИНА Т**

© М. И. Сулацкий,¹ А. И. Сулацкая,^{1,*} Н. П. Родина,¹
М. В. Белоусов,^{2,3} С. А. Бондарев,² Г. А. Журавлева,²
К. К. Туроверов,^{1,4} И. М. Кузнецова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

² С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034,

³ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Пушкин, Санкт-Петербург, 196608, и

⁴ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, 195251;

* электронный адрес: *ansul@mail.ru*

В настоящей работе были исследованы кривые затухания флуоресценции бензтиазольного красителя тиофлавина Т (ThT) в водно-глицериновых смесях в условиях макромолекуларного краудинга, имитирующих клеточную среду, и в амилоидных фибриллах на основе инсулина и фрагмента дрожжевого прионного белка Sup35 (Sup35NM). Показано, что анизотропия флуоресценции свободного красителя в растворах с высокой вязкостью в присутствии краудинг-агентов и встроенного в амилоидные фибриллы имеет предельно высокое значение и практически не отличается от анизотропии флуоресценции ThT в водном растворе. При этом времена затухания флуоресценции ThT, связанного с фибриллами на основе инсулина и Sup35NMp, различаются между собой и на несколько порядков превышают время жизни флуоресценции красителя в водных растворах. Сделано предположение о том, что результаты обусловлены молекулярно-роторной природой красителя. На основании данных работы сделано заключение о том, что измерение времени жизни возбужденного состояния ThT (но не анизотропии его флуоресценции) может быть использовано для исследования кинетики образования амилоидных фибрилл и их полиморфизма.

Ключевые слова: флуоресцентные зонды, тиофлавин Т (ThT), амилоидные фибриллы, анизотропия флуоресценции, время жизни возбужденного состояния, кривые затухания флуоресценции, инсулин, Sup35NMp

Флуоресценция является чувствительным методом для изучения структуры, динамики и функций биологических макромолекул. В настоящее время широко используются различные флуорофоры, изменяющие свои фотофизические характеристики при взаимодействии с объектом исследования. Одним из широко и эффективно применяемых зондов, используемых для диагностики образования и исследования структуры амилоидных фибрилл, накопление которых в тканях и органах приводит к возникновению ряда тяжелых заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и др., является бензтиазольный краситель тиофлавин Т (ThT) (см., например: LeVine, 1993, 1999). Для детектирования амилоидных фибрилл уже долгое время используется регистрация интенсивности флуоресценции этого красителя. Тем не менее в ряде недавних работ был предложен новый и, согласно литературным данным, более чувствитель-

ный подход к исследованию кинетики образования амилоидных фибрилл, основанный на регистрации кривых затухания флуоресценции ThT и определении времени жизни возбужденного состояния и анизотропии флуоресценции красителя (Sabate, Saupe, 2007; Mohanty et al., 2012). Однако для успешного применения предложенного подхода и корректной интерпретации получаемых с его помощью результатов необходимо проведение комплексного исследования, позволяющего определить время затухания и анизотропию флуоресценции для не связанный с фибриллами молекулы ThT и понять причины изменения этих характеристик при взаимодействии красителя с фибриллами. В связи с этим в настоящей работе изучали проявление торсионной и сольватной релаксации в кинетике затухания флуоресценции ThT в различных условиях, в том числе и в амилоидных фибриллах.

Материал и методика

Материалы. Использованы тиофлавин T (ThT) UltraPure Grade (AnaSpec, США), инсулин, PEG-400 и компоненты буферных растворов (Sigma, США), глицерин (Merk, Германия).

Время-разрешенная спектроскопия. Для оценки времени жизни возбужденного состояния и анизотропии флуоресценции ThT 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 (Sigma, США) получали, инкубуруя белок 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 (Сулацкая и др., 2013).

Амилоидные фибрillы на основе дрожжевого прионного белка Sup35NM получали путем инкубирования белка (0.5 мг/мл) в калий-фосфатном буфере (5 мМ, pH 7.4) в присутствии 150 мМ NaCl при 26 °C и постоянном перемешивании в течение 24 ч (Sulatskaya et al., 2016). Предварительно белок был очищен из культуры

Escherichia coli (штамм BL21, трансформированный плазмидой pET20b-SUP35NM-(His₆)) в денатурирующих условиях по протоколу, описанному ранее (Serio et al., 1999).

Электронная микроскопия (ЭМ). Зрелые амилоидные фибрillы в исследуемых образцах визуализировали с помощью ЭМ. ЭМ-фотографии получали методом негативного контрастирования 1%-ным водным раствором уранил-ацетата. Фибрillы были нанесены на медные сетки, покрытые коллоидной пленкой-подложкой с напылением углеродом.

Результаты и обсуждение

Кривые затухания флуоресценции ThT в свободном состоянии в различных растворителях. Были зарегистрированы кривые затухания флуоресценции ThT в водно-глицериновых смесях (содержание глицерина составляло 0, 20, 50, 70 и 99 % (по объему)) и в условиях макромолекулярного краудинга (Чеботарева и др., 2004), имитирующих клеточную среду (рис. 1, *a*, *b*). Для создания этих условий использовали краудинг-агент полиэтиленгликоль с мол. массой 400 кДа в концентрации 400 мг/мл. Было показано, что при увели-

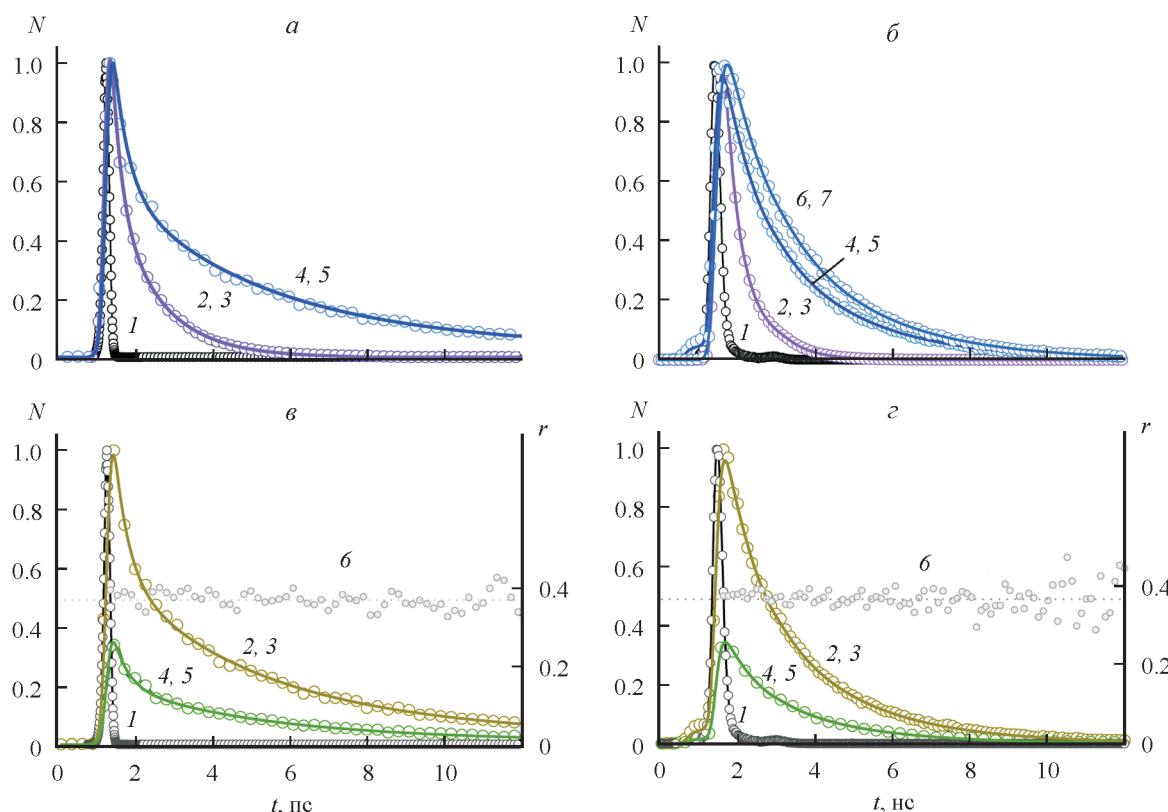


Рис. 1. Определение времени жизни возбужденного состояния и анизотропии флуоресценции (*r*) ThT в свободном и связанном с амилоидными фибрillами состояниях.

Кривая 1 (*a—e*) — функция лазера накачки (IRF). *a*: 2 и 4 — зарегистрированные *кривые затухания* флуоресценции ThT соответственно в воде и PEG-400, 3 и 5 — *кривые*, полученные в результате аппроксимации соответствующих экспериментальных данных; *N*(*t*) — зависимость числа регистрируемых импульсов от времени (*t*), нормализованная на 1 в максимуме. *b*: 2, 4 и 6 — зарегистрированные *кривые затухания* флуоресценции ThT соответственно в 99%-ном глицерине, в амилоидных фибрillах на основе Sup35NMp и инсулина; 3, 5 и 7 — *кривые*, полученные в результате аппроксимации соответствующих экспериментальных данных. *c*: 2 и 4 — зарегистрированные *кривые затухания* вертикальной и горизонтальной составляющих флуоресценции ThT в PEG-400; 3 и 5 — *кривые*, полученные в результате аппроксимации соответствующих экспериментальных данных; 6 — зависимость анизотропии флуоресценции ThT от времени. *g*: 2 и 4 — зарегистрированные *кривые затухания* вертикальной и горизонтальной составляющих флуоресценции ThT, встроенного в амилоидные фибрillы на основе Sup35NMp; 3 и 5 — *кривые*, полученные в результате аппроксимации соответствующих экспериментальных данных; 6 — зависимость анизотропии флуоресценции ThT от времени.

Анизотропия флуоресценции $\langle r \rangle$ и время жизни возбужденного состояния $\langle \tau \rangle$ ThT в различных средах и в амилоидных фибриллах (АФ)

Условия	$\langle r \rangle$	$\langle \tau \rangle$, нс
Вода	0.38	$1 \cdot 10^{-3}$
Полиэтиленгликоль, 400 кДа	0.37	$7 \cdot 10^{-3}$
Глицерин 99 %	0.38	0.4
АФ на основе Sup35NMP	0.37	1.6
АФ на основе инсулина	0.39	1.8

чении вязкости растворителя, а также в условиях макромолекулярного краудинга происходит значительное увеличение времени жизни возбужденного состояния молекул ThT (см. таблицу). Это указывает на существование внутримолекулярной подвижности, которая приводит к безызлучательной дезактивации энергии возбужденного состояния молекул красителя в растворителях малой вязкости, что характерно для молекулярных роторов.

Согласно результатам квантово-химических расчетов в основном состоянии минимуму энергии соответствует конформация ThT с углом между его бензтиазольным и аминобензольным кольцами, равным 37° (145° , 217° и 325°) (Maskevich et al., 2007). Максимуму энергии соответствуют конформации с торсионными углами ϕ равными 0 и 90° (или 180 и 270°). Однако эти состояния разделены низкими энергетическими барьерами, и фрагменты красителя способны поворачиваться друг относительно друга. Поворот колец ThT в возбужденном состоянии на угол, равный 90° , приводит к безызлучательной дезактивации молекул красителя и соответственно к тушению его флуоресценции. В вязких растворах и в условиях макромолекулярного краудинга происходит замедление подвижности колец ThT друг относительно друга, в результате чего возрастает время жизни возбужденного состояния красителя.

Нужно отметить, что анизотропия флуоресценции свободного красителя в водно-глицериновых смесях и в присутствии краудинг-агентов имеет предельно высокое значение (см. таблицу) и практически не отличается от анизотропии флуоресценции ThT в водном растворе

(Kuznetsova et al., 2016). Это позволило сделать заключение о том, что высокое значение анизотропии флуоресценции красителя в водных растворах обусловлено его молекулярно-роторной природой. Направление дипольного момента молекул красителя совпадает с осью вращения его бензтиазольного и аминобензольного кольца друг относительно друга. В связи с этим поворот фрагментов красителя не может изменить направление дипольного момента молекулы ThT. Поскольку в водных растворах скорость поворота фрагментов ThT (приводящего к его безызлучательной дезактивации) значительно выше, чем скорость поворота молекул красителя как целого (приводящего к снижению анизотропии его флуоресценции), молекулы ThT не успевают изменить свою пространственную ориентацию за время жизни возбужденного состояния.

Кривые затухания флуоресценции ThT, встроенного в амилоидные фибриллы на основе различных белков. Амилоидные фибриллы на основе инсулина и дрожжевого прионного белка Sup35pNM были получены с использованием отработанных ранее протоколов (см. раздел «Материал и методика»). Присутствие зрелых амилоидных фибрилл в исследуемых образцах контролировали с помощью ЭМ (рис. 2).

Анализ кривых затухания флуоресценции ThT при взаимодействии с этими амилоидными фибриллами (рис. 1, б, г) позволил показать, что значение анизотропии флуоресценции связанного с фибриллами красителя остается предельно высоким и практически не отличается от анизотропии флуоресценции ThT в водных растворах (см. таблицу). Можно предположить, что в жестком микроокружении (например, в растворах с высокой вязкостью, в условиях макромолекулярного краудинга или при связывании с амилоидными фибриллами) происходит ограничение торсионной подвижности фрагментов ThT друг относительно друга, а также затрудняется поворот молекулы красителя как целого. В итоге анизотропия флуоресценции ThT в этих условиях остается предельно высокой.

При этом показано, что время жизни возбужденного состояния ThT, связанного с фибриллами, на несколько порядков превышает время затухания флуоресценции красителя в водных растворах (см. таблицу) за счет за-

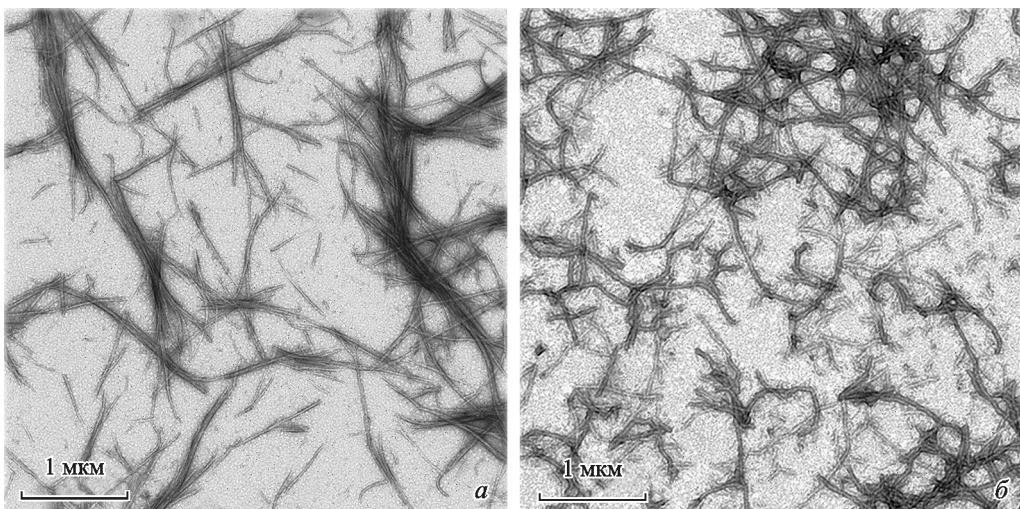


Рис. 2. Визуализация амилоидных фибрилл на основе инсулина (а) и Sup35NMP (б). Электронная микроскопия.

медления торсионной релаксации его фрагментов. Кроме того, можно заметить, что время затухания флуоресценции ThT в присутствии амилоидных фибрилл на основе исследуемых амилоидогенных белков различно. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что время жизни флуоресценции ThT, но не его анизотропия, как это отмечается в литературе (Sabate, Saupe, 2007), может быть использовано для исследования кинетики образования амилоидных фибрилл и их полиморфизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01614_а), стипендии Президента РФ (СП-841.2018.4), грантов Президента РФ (МК-512.2017.4) и СПбГУ (1.42.720.2017 и 1.40.1327.2017).

Список литературы

Сулацкая А. И., Волова Е. А., Комиссарчик Я. Ю., Снигиревская Е. С., Маскевич А. А., Дробченко Е. А., Кузнецова И. М., Туроверов К. К. 2013. Исследование кинетики образования амилоидных фибрилл на основе инсулина. Цитология. 55 (11) : 809—814. (Sulatskaya A. I., Volova E. A., Komissarchik Ya. Yu., Snigirevskaya E. S., Maskevich A. A., Drobchenko E. A., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2014. Investigation of the kinetics of insulin amyloid fibrils formation. Cell Tissue Biol. 8 : 186—191.)

Чеботарева Н. А., Курганов Б. И., Ливанова Н. Б. 2004. Биохимические эффекты молекулярного краудинга. Биохимия.

69 : 1522—1536. (Chebotareva N. A., Kurganov B. I., Livanova N. B. 2004. Biochemical effects of molecular crowding. Biochemistry. 69 (11) : 1239—1251.)

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.

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.

Mohanty J., Choudhury S. D., Pal H., Bhasikuttan A. C. 2012. Early detection of insulin fibrillation: a fluorescence lifetime assay to probe the pre-fibrillar regime. Chem. Commun. 48 : 2403—2405.

Sabate R., Saupe S. J. 2007. Thioflavin T fluorescence anisotropy: an alternative technique for the study of amyloid aggregation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 360 : 135—138.

Serio T. R., Cashikar A. G., Moslehi J. J., Kowal A. S., Lindquist S. L. 1999. Yeast prion [PSI⁺] and its determinant, Sup35. Methods Enzymol. 309 : 649—673.

Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Belousov M. V., Bondarev S. A., Zhouravleva G. A., Turoverov K. K. 2016. Stoichiometry and affinity of thioflavin T binding to Sup35p Amyloid Fibrils. PLoS ONE. 11: e0156314.

Поступила 6 VII 2018

FLUORESCENCE LIFETIME AND ANISOTROPY OF FREE AND BOUND TO AMYLOID FIBRILS THIOFLAVIN T

M. I. Sulatsky,¹ A. I. Sulatskaya,^{1,*} N. P. Rodina,¹ M. V. Belousov,^{2,3} S. A. Bondarev,²
G. A. Zhouravleva,² K. K. Turoverov,^{1,4} I. M. Kuznetsova¹

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

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034,

³ All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, 196608, and

⁴ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: ansul@mail.ru

In the present work, fluorescence decay curves of benzothiazole dye, thioflavin T (ThT), in water-glycerol mixtures, under macromolecular crowding conditions simulating the densely populated cell medium and bound to insulin and yeast prion protein (Sup35NM) amyloid fibrils were studied. It was shown that the dye fluorescence anisotropy in solutions with high viscosity, in the presence of crowding agents and bound to amyloid fibrils, is extremely high and practically does not differ from that of ThT in water solution. At the same time, the fluorescence lifetimes of ThT bound to insulin and Sup35NM fibrils differ from each other and several orders of magnitude longer than that in aqueous solutions. It was suggested that the obtained results are caused by ThT molecular rotor nature. On the basis of this work results, it was concluded that the measurement of the ThT fluorescence lifetime (but not its fluorescence anisotropy) can be used to study the kinetics of amyloid fibrils formation and their polymorphism.

Ключевые слова: флуоресцентные красители, thioflavin T (ThT), амилоидные фибриллы, флуоресценция анизотропия, флуоресценция lifetime, флуоресценция decay curves, инсулин, Sup35NM.