

КИНЕТИКА ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТИОФЛАВИНА Т, ИНТЕРКАЛИРОВАННОГО В АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ

А.А. Маскевич¹, В.И. Степура, С.А. Кургузенков¹,
И.М. Кузнецова², К.К. Туроверов²

¹Гродненский госуниверситет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь. e-mail: amaskevich@grsu.by

²Институт цитологии, РАН, Санкт-Петербург, Россия. e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Введение

Образование водонерастворимых упорядоченных белковых агрегатов амилоидных фибрилл [1] является причиной возникновения ряда тяжелых нейродегенеративных заболеваний. Для детекции амилоидных фибрилл наиболее часто используется флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ThT). ThT практически не флуоресцирует в маловязких растворах (например водных, спиртовых), однако при встраивании в фибриллы наблюдается значительное увеличение (более чем на три порядка) интенсивности его флуоресценции [2,3]. При проведении биохимических исследований патологий, вызванных образованием амилоидных фибрилл, принципиально важным является знать, из каких белков образованы фибриллы. Использовать для этого стационарную флуоресценцию ThT не представляется возможным, поскольку положение максимума спектра флуоресценции зонда, интеркалированного в фибриллы, практически не зависит от типа белков их образующих.

В данной работе исследована кинетика затухания флуоресценции ThT, интеркалированного в амилоидные фибриллы из инсулина и лизоцима, с целью определения возможности использования определяемых параметров для идентификации типа белка, образующего амилоид.

Методика измерений

Измерение длительности затухания флуоресценции производили на лабораторной установке, работающей в режиме времякоррелированного счета одиночных фотонов. В качестве источника возбуждения использовался пикосекундный диодный лазер PDL 800B с лазерной головкой LDH-407 (PicoQuant, Germany), генерирующий импульсы на длине волны 407 нм с длительностью 70 пс и частотой следования 10 МГц. Временное разрешение установки составляло около 40 пс, время на канал - 36 пс. Для анализа экспериментальных кривых использовали метод максимума энтропии (метод МЭМ [4]). В этом случае функция затухания флуоресценции $F(t)$ представлялась в виде непрерывного распределения по длительностям затухания (или скоростям переходов):

$$F(t) = \int_0^{\infty} \alpha(\tau) \exp\left[-\frac{t}{\tau}\right] d\tau$$

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что квантовый выход и длительность затухания флуоресценции молекулы ThT однозначно определяются скоростью торсионной релаксации аминокислотного и бензотриазольного колец, зависящей от вязкости растворителя и происходящей при переходе молекулы в возбужденное состояние [5]. Торсионная дезактивация является главным конкурирующим с излучением процессом. Анализ кинетики затухания флуоресценции ThT в модельных системах с использованием метода максимума энтропии показал, что положение максимума распределения $\alpha(\tau)$ (средняя длительность) зависит от вязкости среды, а полуширина распределения определяется гетерогенностью микроокружения.

Согласно результатам квантовохимических расчетов [6], в водном растворе в основном состоянии молекула является неплоской: торсионный угол ϕ между фрагментами молекулы составляет $\sim 35^\circ$ (рисунок 1). Мы полагаем, что при встраивании в фибриллы молекула зонда имеет такую же структуру, как и в водном растворе. Подтверждением тому являются данные рентгеноструктурного анализа [7].

Почти плоская структура молекулы ThT в основном состоянии позволяет ей эффективно интеркалировать в β -складчатую структуру амилоидных фибрилл. Спектральные характеристики ThT при встраивании в амилоидные фибриллы зависят как от ориентации молекулы относительно оси фибрилл, так и от конформации самой молекулы и от жесткости фиксации при встраивании.

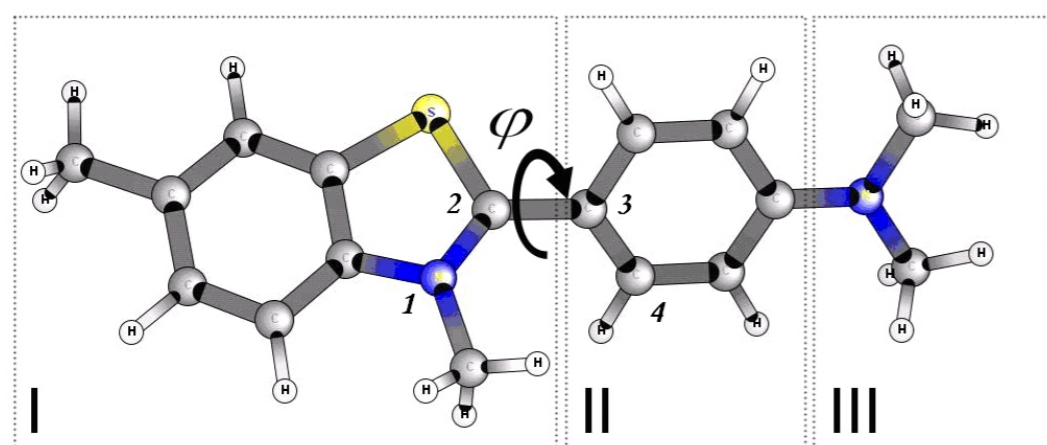


Рисунок 1. Структурная формула молекулы тиофлавина Т.

I - бензотриазольная группа, II - бензольное кольцо, III - диметиламиногруппа. Торсионный угол ϕ образован пронумерованными атомами

Кинетика затухания флуоресценции ThT при его встраивании в амилоидные фибриллы является неэкспоненциальной и с удовлетворительным качеством аппроксимации может быть представлена суммой трех экспонент (таблица)

Условия	α_1	τ_1 , нс	α_2	τ_2 , нс	α_3	τ_3 , нс	χ^2
Амилоидные фибриллы из инсулина	0,263	0,25	0,400	0,88	0,337	1,66	1,08
Амилоидные фибриллы из лизоцима	0,950	0,09	0,047	1,13	0,003	4,50	1,13

Таблица 1. Результаты моделирования дискретной суммой экспонент кинетики затухания флуоресценции ThT, интеркалированного в амилоидные фибриллы ($\lambda_{\text{возб}}=407$ нм, $\lambda_{\text{фл}}=485$ нм)

Примечание: α_1 , α_2 и α_3 - предэкспоненциальные множители, определяющие относительный вклад в кривую затухания компонент с длительностями τ_1 , τ_2 и τ_3 .

Сложный характер кинетики указывает на то, что места встраивания зонда в амилоидные фибриллы в значительной степени являются гетерогенными. Из модельных исследований следует, что молекулы ThT, торсионная релаксация которых является значительно ограниченной, будут иметь большую длительность затухания.

Анализ кривых затухания флуоресценции с использованием МЭМ показал, что кинетика флуоресценции ThT, интеркалированного в фибриллы, может быть представлена двухмодальным распределением (рисунок 2). Форма распределения зависит от типа фибрилл: при встраивании ThT в фибриллы из инсулина основной вклад вносит мода длительностью ~ 2 нс; встраивание зонда в фибриллы из лизоцима приводит к кинетике, в которой основной вклад вносит короткоживущая компонента с $\tau \sim 0,1$ нс.

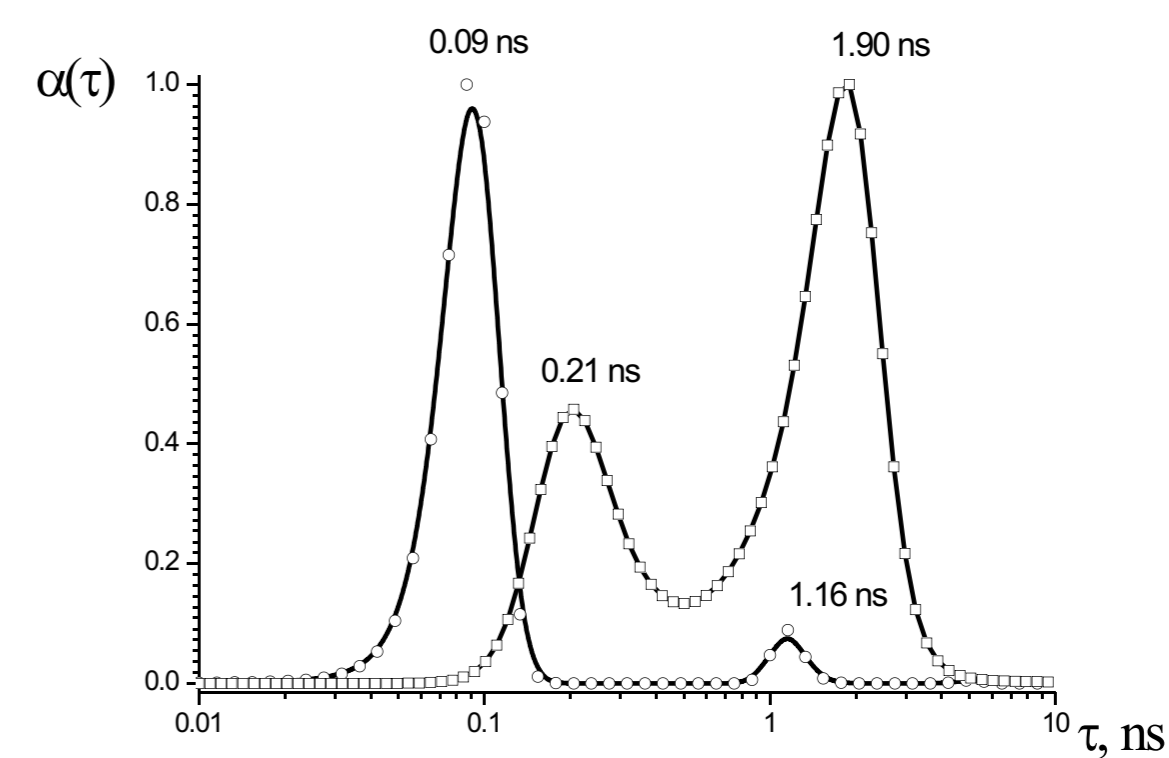


Рисунок 2. Результаты анализа кинетики затухания флуоресценции тиофлавина Т, интеркалированного в амилоидные фибриллы из инсулина (□) и лизоцима (○) методом МЭМ. $\lambda_{\text{возб}}=407$ нм, $\lambda_{\text{фл}}=485$ нм.

Мы полагаем, что двум модам в кинетике затухания флуоресценции соответствует два варианта встраивания молекул ThT в амилоидные фибриллы (рисунок 3). Основная часть молекул встраивается в бороздки фибрилл вдоль их длинной оси. Встраиванию и жесткой фиксации способствует соответствие их геометрических размеров и размеров фрагментов фибрилл [8]. Встроенные таким образом молекулы ThT имеют ограниченную свободу внутреннего вращения и характеризуются высоким квантовым выходом и большей длительностью затухания флуоресценции τ .

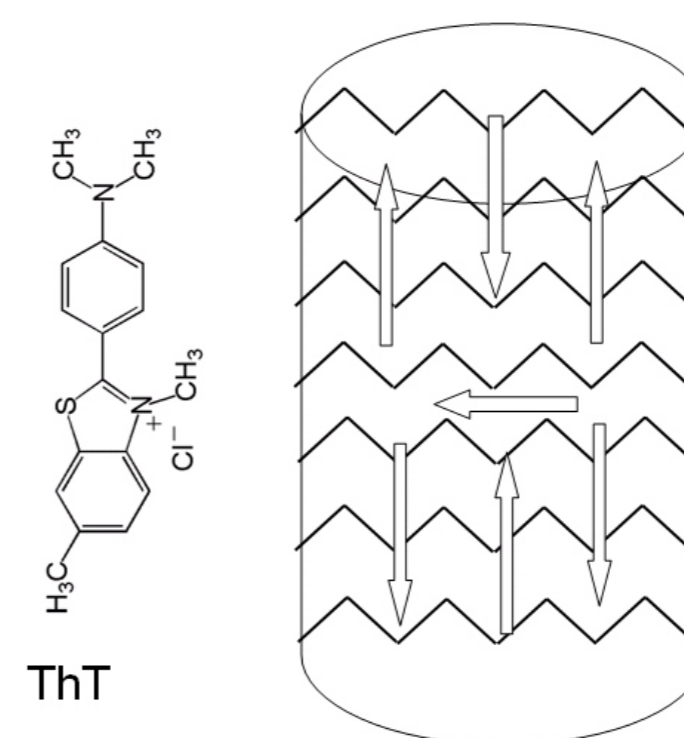


Рисунок 3. Схема встраивания тиофлавина Т в филамент амилоида.

Другая часть молекул зонда встраивается в фибриллы перпендикулярно их длинной оси (рисунок 3). Фрагменты молекул зонда имеют в этом случае большую свободу торсионных движений, что приводит к значительному уменьшению квантового выхода и длительности затухания флуоресценции. Подтверждением правильности этой модели служат опыты по тушению флуоресценции зонда [4], которые показали, что оба центра связывания ThT имеют примерно одинаковую доступность анионному тушителю I^- . Мы полагаем, что различие в жесткости локализации молекул зонда вызвано, прежде всего, различной геометрией его связывания с фибриллами.

Различие в длительности, имеющее место при встраивании в фибриллы, сформированные из различных белков, можно объяснить тем, что фибриллы из инсулина имеют значительно более жесткую структуру, по сравнению с фибриллами из лизоцима.

Литература

- Koo, E. H. et. al. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1999. - V.96. - P. 9989-9990.
- Воропай Е.С. et. al. Спектральные свойства тиофлавина Т в растворе и при комплексообразовании с амилоидными фибриллами // Ж П С. - 2003. - Т. 72. - С.767-773.
- Maskevich A.A. et. al. Spectral Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Dielectric Properties and in a Fibril-Incorporated Form // J. Proteome Res. - 2007. - V.6(4). - P.1392-1401.
- Маскевич, А.А., Степура, В.И., Балинский, П.Т. Анализ кинетики затухания флуоресценции тиофлавина Т методом максимума энтропии // ЖПС. - 2010. - Т. 77, № 2. - С. 209-217.
- Stsiapura V. I. et. al. Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Viscosity // J. Phys. Chem. B. - 2008. - V. 112 (49). - P. 15893-15902.
- Stsiapura V. I., Maskevich A. A., Kuzmitsky V. A., Turoverov K.K., Kuznetsova I. M. Computational Study of Thioflavin T Torsional Relaxation in the Excited State // J. Phys. Chem. A. 2007. - V. 111(22). - P. 4829-4835.
- Rodriguez-Rodriguez C. et. al. Crystal structure of thioflavin T and its binding to amyloid fibrils: insights at the molecular level // Chem. Commun. - 2010. - V. 46. - P. 1156-1158.
- Krebs M.R.H. Bromley E.H.C., Donald A.M. The binding of thioflavin T to amyloid fibrils: localisation and implications // J. Str. Biol. - 2005. - V. 149. - 30-37.