

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ТИОФЛАВИНА Т ПРИ ЕГО ВСТРАИВАНИИ В НАТИВНЫЕ И ДЕНАТУРИРОВАННЫЕ БЕЛКИ

¹Маскевич А.А., ¹Степура В.И., Лавыш А.В., ²Кузнецова И.М.,
²Туроверов К.К.

¹*Гродненский госуниверситет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь,
amaskevich@grsu.by,*

²*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, kkt@incras.ru*

Считается, что тиофлавин Т (ThT) является специфическим флуоресцентным зондом на амилоидные фибриллы. При взаимодействии с белками в состоянии амилоидных фибрилл, обогащенных β -складчатой структурой его квантовый выход возрастает более чем на три порядка по сравнению со свободным красителем в водном растворе. Определение фибрилл в биологическом материале производится, как правило, при наличии в растворе белков, что может влиять на интенсивность свечения зонда. В связи с этим, целью настоящей работы было изучение влияния белков плазмы крови (человека, ЧСА и сывороточного альбумина быка, БСА) в нативном, денатурированном и частично агрегированном состоянии на интенсивность и длительность затухания флуоресценции ThT.

Для исследований использовались водные растворы зонда ($C=6,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л), к которым добавлялись растворы белков, конечная концентрация которых изменялась от 0,1 до 1,5 мг/мл. Присутствие в растворе нативных белков плазмы крови при максимальной используемой концентрации приводило к увеличению интенсивности флуоресценции зонда ~в 10 раз (рис. 1). Следует отметить, что эффект усиления флуоресценции ThT для ЧСА и БСА качественно подобен, причем увеличение концентрации белка приводит в обоих случаях к дальнейшему росту интенсивности свечения зонда (рис. 1).

Модельные исследования [1] показывают, что причиной наблюдаемого увеличения интенсивности и коротковолнового сдвига положения максимума спектра является встраивание части молекул зонда в белковую глобулу. При встраивании происходит значительное ограничение торсионной подвижности молекулы, приводящей к тушению ее флуоресценции. Поскольку квантовый выход флуоресценции раствора остается очень низким (не превосходит 0,001 при концентрации белка 1 мг/мл), то следует иметь в виду, что относительное число молекул зонда, связанных с белком, является очень незначительным.

При встраивании ThT в белковую молекулу существенные изменения претерпевает и кинетика затухания его флуоресценции. Анализ кинетики затухания флуоресценции методом максимума энтропии (МЭМ, [2]) показал, что для водных растворов ThT, в присутствии альбуминов плазмы крови в распределении $\alpha(\tau)$ наблюдается две моды с максимумами около 0,10 и 1,0 нс (рис. 2).

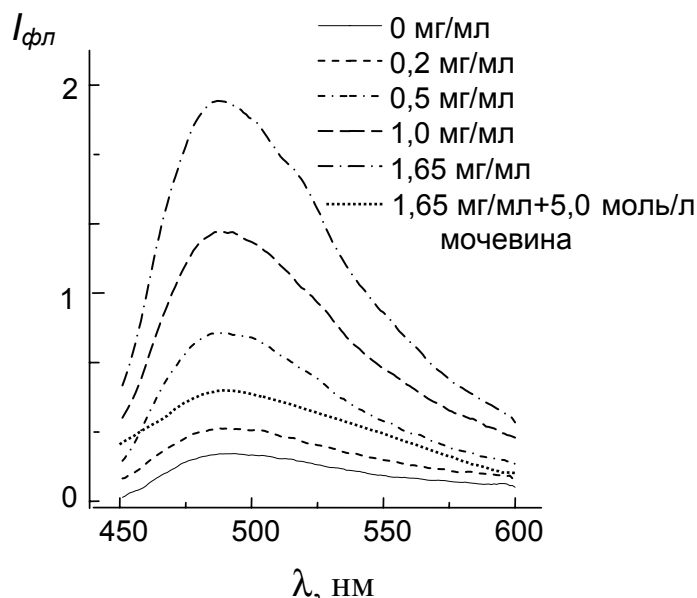


Рисунок 1 – Спектры флуоресценции водного раствора тиюфлавина Т в различных концентрациях ЧСА, $\lambda_{\text{возб}}=440$ нм, $T=25$ °С

Наблюдаемое изменение кинетики можно легко объяснить, предположив, что увеличение концентрации белка приводит к его частичной агрегации, и мода, характеризующаяся большими длительностями, образована свечением тех молекул зонда, которые встраиваются в белковые агрегаты. Вторая мода затухания, имеющая меньшие длительности, - есть свечение молекул зонда, встроенных в мономерные, или агрегированные макромолекулы вдали от мест их ассоциации.

Денатурация белка 5,0 моль/л мочевиной приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции ThT (в 3-4 раза) а также уменьшению длительности затухания флуоресценции (рис. 2). Характер изменения кинетики затухания показывает, что при денатурации, прежде всего, уменьшается вклад тех молекул зонда, которые связаны с белковыми агрегатами. Это означает, что денатурация мочевиной уменьшает число белковых агрегатов и как следствие, - уменьшается интенсивность флуоресценции ThT.

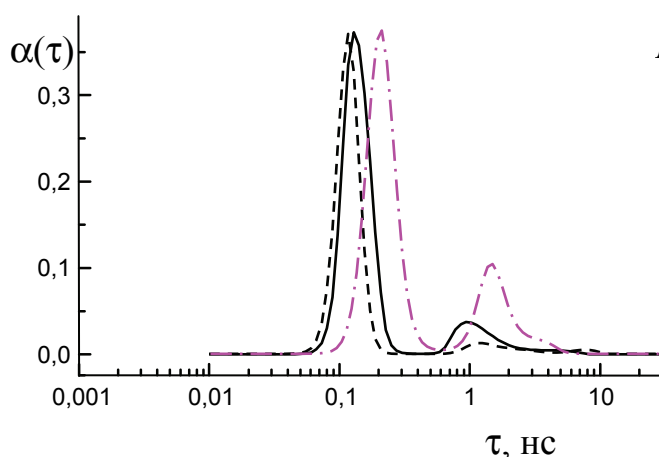


Рисунок 2 – Результаты МЭМ-анализа кинетики затухания тиофлавина Т в присутствии 1,0 мг/мл БСА (сплошная линия) и при денатурации белка 5,0 моль/л мочевиной (пунктирная) и при инкубации белка при 63 °С в течение 120 минут (штрихпунктирная линия)

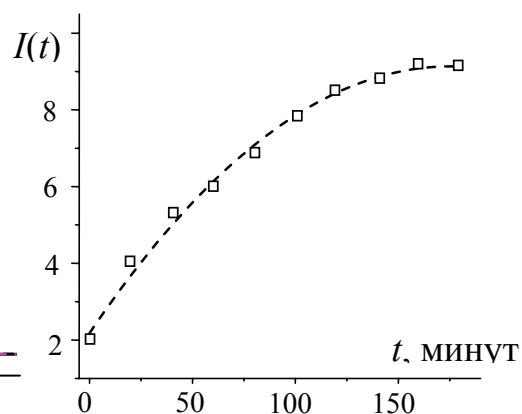


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции водного раствора тиофлавина Т в присутствии 1,3 мг/мл БСА от времени нагревания при T= 60 °С

Процесс агрегации сывороточных альбуминов может быть усилен, инкубацией раствора при температуре 62-65 °С. В последнем случае белки образуют амилоидоподобные структуры. Увеличение времени инкубации до 180 минут при T=60°C приводит к возрастанию интенсивности свечения в 4,5 раза (рис. 3) и небольшому коротковолновому сдвигу (~4 нм) максимума спектра. Одновременно увеличивается длительность затухания флуоресценции, при этом ее среднее значение изменяется от 1,0 до 1,6 нс (рис. 2). Полученные результаты показывают, что ThT является эффективным инструментом для изучения процессов агрегации белков плазмы крови.

Работа выполнена при поддержке фондов БРФФИ и РФФИ (гранты Ф11МС-046, Ф12Р-198, 12-04-01651 и 12-04-90022-Бел_а).

Литература

1. Maskevich A. A. Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form // J. Proteome Res. 2007.- V. 6.- P. 1392-1401.
2. 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.