

## ВЛИЯНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ ИЗ ЛИЗОЦИМА НА МОДИФИКАЦИЮ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Венская Е.И., Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь; e-mail: e.i.rusina@mail.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

**Аннотация.** Изучено влияние амилоидных фибрилл на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов человека *in vitro*. Контроль за процессом образования амилоидных фибрилл из лизоцима куриного яйца осуществляли флуоресцентным методом с использованием тиофлавина Т. Эксперименты проведены на эритроцитах крови практически здоровых доноров. Клетки инкубировали в растворе, содержащем амилоидные фибриллы, затем из них выделяли изолированные эритроцитарные мембраны. О структурном состоянии мембран эритроцитов человека судили по степени везикуляции клеток при их метаболическом истощении, модификацию белков эритроцитарных мембран оценивали по параметрам флуоресценции зондов N-(1-пирен) малеимида (ПМ), отражающего уровень сульфгидрильных групп, и 4-4'-диацетамидо-2,2'-стильбендисульфоната (ДИДС), специфически связывающегося с белком полосы 3. В качестве контролей использовали эритроциты, проинкубированные при таких же условиях в среде, содержащей нативный лизоцим, а также в среде, не содержащей белковых компонентов. Обнаружено, что трехчасовая инкубация клеток в растворе, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима, приводит к ускорению процесса везикуляции эритроцитов при их метаболическом истощении, снижению интенсивности флуоресценции специфического к SH-группам белков N-(1-пирен) малеимида и связанного с белком полосы 3 4-4'-диацетамидо-2,2'-стильбендисульфоната, по сравнению с контрольными клетками. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, воздействуя на эритроциты человека *in vitro*, вызывают модификацию структурного состояния их мембран, проявляющуюся в повышении отделения от эритроцитов части мембранного материала – везикул, снижении уровня белковых SH-групп и модификации структурного состояния белка полосы 3 в мембранах эритроцитов человека.

**Ключевые слова:** эритроциты, амилоидные фибриллы, лизоцим, мембранные белки.

Известно, что белковые молекулы способны образовывать нерастворимые  $\beta$ -складчатые структуры – амилоидные фибриллы, которые накапливаются в организме, образуя бляшки в головном мозге, сердце, печени, почках, поджелудочной железе, кровеносных сосудах и других органах. С накоплением амилоидов связывают такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, сахарный диабет 2 типа, боковой амиотрофический склероз и другие системные и локальные амилоидозы [1]. При этом в развитии данных патологий принимают участие конкретные специфические предшественники амилоидных белков. Например,  $\beta$ -амилоидный белок связан с развитием болезни Альцгеймера; амилин – с сахарным диабетом 2 типа;  $\beta$ 2-микроглобулин – с гемодиализным амилоидозом [1].

Считается, что все белки способны образовывать амилоидные фибриллы *in vitro*, при этом, несмотря на различия белков-предшественников, амилоидные фибриллы из них обладают общими свойствами, характерными всем амилоидам: имеют  $\beta$ -складчатую структуру и связываются со специфическими красителями - тиофлавином Т и конго красным, а также обладают двойным лучепреломлением в поляризованном свете [2]. В данной работе мы использовали амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима куриного яйца, как модельный объект для изучения влияния амилоидов на клетки крови человека. Лизоцим активно используется в качестве модельного объекта для изучения структуры и свойств белков [3], в молекуле лизоцима обнаружены участки, способные взаимодействовать друг с другом, а также амилоидогенные свойства данного белка [4]. Описаны амилоидозы, вызванные отложением амилоидных фибрилл из лизоцима, образованных *in vivo*, преимущественно в печени, селезенке и почках [5]. Однако, представленные в литературе данные не отражают полностью процессы, происходящие с мембранами клеток при действии на них амилоидов, до сих пор не ясны механизмы клеточной токсичности амилоидных фибрилл.

Целью данной работы явилось изучение влияния амилоидных фибрилл на процессы везикуляции эритроцитов человека при их метаболическом истощении и выявление степени модификации мембранных белков.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение амилоидных фибрилл.** Для получения и исследования амилоидов в данной работе был использован лизоцим куриного яйца [4]. Амилоидные фибриллы были получены кислотным методом, при котором лизоцим куриного яйца (Fluka) растворяли в 10 мМ растворе соляной кислоты (рН 2,0) и инкубировали в термостате при 65°C в течение 5-7 суток, постоянно перемешивая. Исходная концентрация лизоцима в

растворе составляла 20 мг/мл. Для предотвращения бактериального загрязнения в раствор добавляли 200 ppm азид натрия. В качестве контроля использовали раствор лизоцима куриного яйца (20мк/мл) в 10мМ соляной кислоте, который инкубировали в течение того же времени при комнатной температуре, не перемешивая.

*Выделение клеток крови.* В работе были использованы образцы крови практически здоровых доноров, полученные в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. В качестве консерванта для крови использовали гепарин (РУП «Белмедпрепараты»). Эритроциты выделяли путем центрифугирования при 3000 g, 5 мин., затем трижды отмывали в физиологическом растворе NaCl.

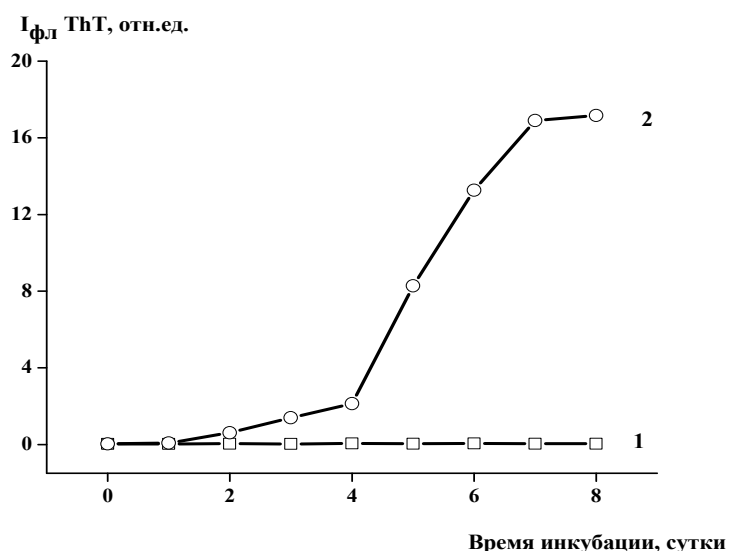
*Выделение эритроцитарных мембран.* Эритроцитарные мембраны (тени эритроцитов) выделяли по методу Доджа [6]. Гемолиз эритроцитов проводили при разведении 1 объема клеток в 10 объемах 5 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,4) при 4°C в течение 12 ч. Мембраны эритроцитов многократно отмывали от гемоглобина в 5 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) при 18000 g (центрифуга K-24, Германия). Выделение теней эритроцитов проводили при температуре 2-4°C. Концентрацию белка в тенях эритроцитов определяли по модифицированному методу Лоури [7]. В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (Merck, Германия).

*Оценка процесса везикуляции эритроцитов при метаболическом истощении.* Эксперименты проведены на 10%-ной суспензии эритроцитов в забуференном растворе NaCl, pH 7,4. Данную суспензию обрабатывали амилоидными фибриллами и инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. В процессе инкубации отдельные образцы центрифугировали (3000 g, 5 мин) и в супернатантах определяли активность ацетилхолин эстеразы (АХЭ), по величине которой судили о степени микровезикуляции эритроцитов, как в работе [8].

*Спектрально – люминесцентные измерения.* Измерение параметров зондовой флуоресценции проводили на люминесцентном спектрофотометре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь). Уровень SH-групп в мембранах эритроцитов определяли с помощью N-(1-пирен) малеимида (ПМ) – зонда, флуоресцирующего при связывании с SH-группами белков. Для проведения флуоресцентных измерений связывания ПМ с тенями эритроцитов, предварительно обработанных амилоидными структурами (концентрация белка 0,1 мг/мл) в суспензию мембран добавляли ПМ в конечной концентрации зонда 5 мкМ. Измерение параметров флуоресценции зонда проводили после 15-минутной инкубации образцов при 25 °С. Для обработки эритроцитарных мембран 4-4-диацетамидо-2,2-стильбендисульфатом (DIDS) к 5 объемам суспензии мембран (концентрация белка 0,2 мг/ мл) добавляли 1 объем 10<sup>-5</sup> М DIDS. Образцы хорошо перемешивали и выдерживали 30 мин при 37°C. Затем мембраны отмывали в забуференном NaCl, содержащем 0,5% сывороточного альбумина быка и 2 раза – без альбумина. К полученным осадкам добавляли по 2 мл забуференного NaCl. Спектры люминесценции DIDS регистрировали в области 390-600 нм при  $\lambda_{\text{возб}} = 365$  нм.

Контроль за образованием фибрилл осуществляли спектрофлуориметрическим методом с использованием зонда тиофлавина Т (Sigma). Для этого готовили стоковый раствор тиофлавина Т (1 мг/мл). Далее 1,6 мкл стокового раствора растворяли в 1 мл PBS-буфера и добавляли 5 мкл раствора амилоидных фибрилл. Конечная концентрация тиофлавина Т составляла 10 мкМ. Измерения проводили при длине волны возбуждения 435 нм, регистрации – 482 нм.

Лизоцим куриного яйца – это белок, состоящий из 129 аминокислотных остатков, обладающий амилоидогенными свойствами. Причем лизоцим относится к группе белков, амилоидные формы которых образуются *in vivo* и обнаруживаются в организме при патологиях. В процессе образования амилоидных фибрилл происходит структурная перестройка белковых молекул, они принимают типичный для всех амилоидных белков вид – фибриллы содержат большое количество упорядоченных  $\beta$ -слоев, которые могут чередоваться с  $\alpha$ -спиралями. Все фибриллы вне зависимости от их происхождения стабилизируются сетью внешних и внутримолекулярных водородных связей между основными амидными группами цепи и карбонильными группами. С помощью электронной микроскопии было установлено, что амилоидные фибриллы представляют собой нити, диаметр которых составляет 7,5-10 нм [3]. Для изучения структурной организации амилоидных фибрилл применяют специальный краситель - бензотиазолиновый зонд тиофлавин Т, который специфически связывается с фибриллами, широко используется в гистологическом анализе амилоидов *ex vivo* и *in vitro*. Известно, что этот зонд используется для определения поперечных сшивок  $\beta$ -слоя во время агрегации амилоидных фибрилл [9]. Мы использовали данный зонд для контроля образования амилоидных фибрилл из лизоцима куриного яйца. Параметры флуоресценции зонда определяли ежедневно в контрольном и опытном растворах. Обнаружено увеличение интенсивности флуоресценции зонда в течение первых 5-6 суток инкубации с выходом на плато к седьмым суткам, что позволяет сделать вывод об образовании зрелых амилоидных фибрилл. Интенсивность флуоресценции зонда в контрольном образце не изменялась (рис. 1). Полученные в течение 6-7 суток инкубации зрелые амилоидные структуры из лизоцима были использованы для проведения экспериментов.

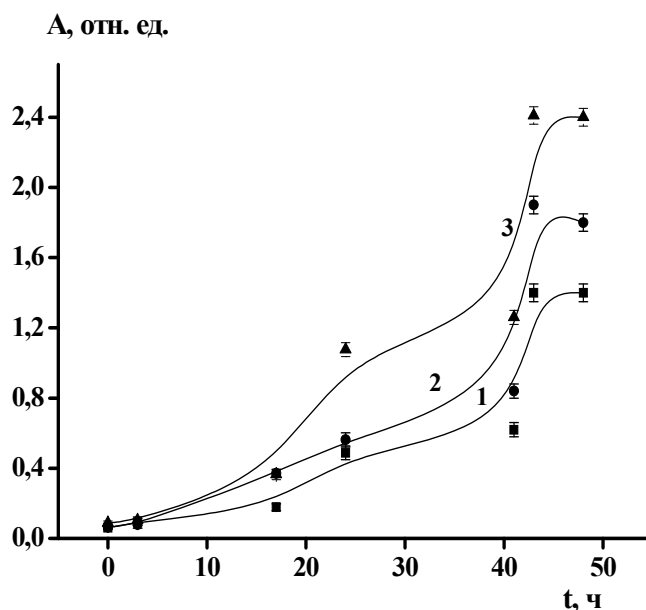


**Рисунок 1.** Изменение интенсивности флуоресценции тиафлавина Т ( $\lambda_{\text{возб.}} = 435$  нм,  $\lambda_{\text{рег.}} = 482$  нм), в зависимости от времени инкубации лизоцима в различных инкубационных средах: 1 – лизоцим, инкубируемый в 10 мМ растворе соляной кислоты (рН 2,0) при 65 °C и непрерывном перемешивании; 2 – лизоцим, инкубируемый в 10 мМ растворе соляной кислоты при комнатной температуре

С целью выяснения механизмов токсического действия амилоидов на эритроциты было изучено влияние амилоидных фибрилл на процессы везикуляции эритроцитов человека при их метаболическом истощении и выявление степени модификации мембранных белков, оцениваемой по параметрам флуоресценции ПМ, отражающего уровень сульфгидрильных групп, и ДИДС, специфически связывающегося с белком полосы 3.

Известно, что одним из параметров, характеризующих жизнеспособность эритроцитов, является их везикуляция при метаболическом истощении клеток. В результате от АТФ-истощенных эритроцитов происходит отделение микровезикул, не содержащих спектрина. Отделение части мембранного материала от эритроцитов человека может рассматриваться как окончательный этап изменения формы клеток от дискоцитов к эхиноцитам. Воздействие на организм неблагоприятных факторов окружающей среды, применение ряда лекарственных препаратов могут вызывать в эритроцитах процесс отделения с поверхности плазматической мембраны части мембранного материала (микровезикуляция клеток), что ведет к изменению функциональных свойств эритроцитов и сокращению продолжительности их жизни [8]. Отделение мембранного материала от клетки происходит и при физиологических условиях – например, при старении эритроцитов *in vivo*. Нами изучено влияние амилоидных структур, полученных из лизоцима, на степень везикуляции эритроцитов человека при метаболическом истощении клеток *in vitro*. Серия экспериментов по изучению влияния белковых олигомеров, полученных из лизоцима, на степень везикуляции эритроцитов человека показала, что предварительная инкубация эритроцитов человека с амилоидными структурами в течение 3-х часов вызывает ускорение степени везикуляции эритроцитов в безглюкозной среде. После 40-часового выдерживания клеток в безглюкозной среде уровень везикуляции эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур, был значительно выше по сравнению с эритроцитами, предварительно проинкубированными такое же время с раствором лизоцима (рис. 2).

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, воздействуя на эритроциты человека *in vitro*, вызывают модификацию структурного состояния их мембран, проявляющуюся в повышении отделения от эритроцитов части мембранного материала – микровезикул.



**Рисунок 2.** Влияние амилоидных структур на активность ацетилхолинэстеразы (А, отн. ед.) в супернатантах, полученных после осаждения эритроцитов, после инкубации их суспензии в забуференном NaCl при 37 °С: 1 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4 (контроль); 2 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем 10 мг/мл лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере; 3 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем амилоидные структуры из лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере. За 100% принято значение активности ацетилхолинэстеразы в супернатантах, полученных после осаждения контрольных эритроцитов

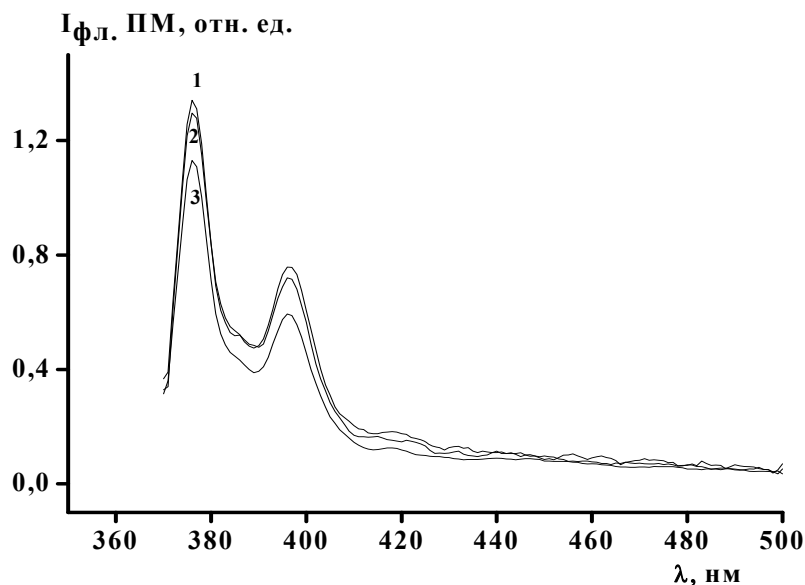
Для выяснения механизмов действия амилоидов на белки мембран эритроцитов человека в данной работе исследовали влияние амилоидных фибрилл на уровень белковых SH-групп и структурное состояние интегрального белка полосы 3, ответственного за транспорт анионов в эритроцитарных мембранах.

Сульфгидрильные группы, находящиеся на мембранах эритроцитов, способны взаимодействовать с различными ксенобиотиками, что приводит к изменению физико-химического состояния липидного бислоя мембран посредством нарушения белок-липидных взаимодействий, которые могут происходить при окислении SH-групп и сшивании мембранных белков. Уровень SH-групп в мембранах эритроцитов определяли с помощью N-(1-пирен) малеимида (ПМ) – зонда, флуоресцирующего при связывании с SH-группами белков. Для проведения измерений эритроциты предварительно инкубировали в буферном растворе, содержащем либо лизоцим, либо амилоидные фибриллы из лизоцима. Затем выделяли эритроцитарные мембраны (концентрация белка в мембранах составляла 0,1 мг/мл) и в суспензию теней эритроцитов добавляли ПМ в конечной концентрации зонда 5 мкМ. После 15-минутной инкубации образцов при 25 °С проводили измерение спектров флуоресценции ПМ (рис. 3).

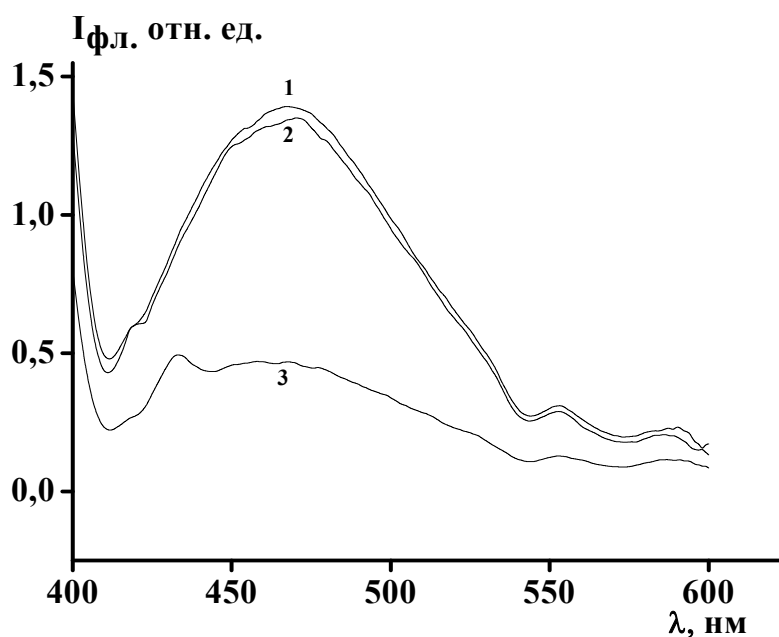
Установлено, что интенсивность флуоресценции ПМ снижается в мембранах, выделенных из эритроцитов, предварительно обработанных амилоидными структурами в течение 3 ч, по сравнению с мембранами, полученными из эритроцитов, предварительно проинкубированных то же время с раствором лизоцима (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что в мембранах эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл из лизоцима, происходит снижение уровня белковых SH-групп.

Одним из структурных компонентов цитоскелета мембраны эритроцитов является белок полосы 3, отвечающий за транспорт хлорид-, бикарбонат-, неорганических фосфат-анионов, а также играющий важную роль в стабилизации структуры цитоскелета, что обеспечивается связями между цитоплазматическими фрагментами белка полосы 3, анкирином и спектрином.

Для того чтобы оценить, влияют ли амилоидные фибриллы на структурное состояние интегрального белка полосы 3 в эритроцитарных мембранах, мы использовали специфический флуоресцирующий ингибитор анионного транспорта – 4-4-диацетамидо-2,2-стильбендисульфат (ДИДС), который связывается с белком полосы 3. Показано, что в выделенных из предварительно проинкубированных с амилоидами эритроцитов мембранах наблюдается значительное снижение интенсивности флуоресценции ДИДС по сравнению с мембранами, полученными из эритроцитов, предварительно проинкубированными в тех же условиях с раствором лизоцима (рис. 4).



**Рисунок 3.** Спектры флуоресценции ПМ, встроенного в мембраны, изолированные из эритроцитов до и после воздействия амилоидных фибрилл. Условия инкубации суспензии эритроцитов: 1 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4 (контроль); 2 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем 10 мг/мл лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере; 3 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем амилоидные структуры из лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере



**Рисунок 4.** Спектры флуоресценции ДИДС, встроенного в мембраны, изолированные из эритроцитов до и после воздействия амилоидных фибрилл. Условия инкубации суспензии эритроцитов: 1 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4 (контроль); 2 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем 10 мг/мл лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере; 3 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем амилоидные структуры из лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере ( $\lambda_{возб}=365$  нм)

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, воздействуя на эритроциты человека *in vitro*, вызывают модификацию структурного состояния их мембран, проявляющуюся в повышении отделения от эритроцитов части мембранного материала – микровезикул, снижении уровня белковых SH-групп и модификации структурного состояния белка полосы 3.

#### Список литературы / References

1. Шавловский М.М. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов. *Медицинский академический журнал*, 2010, т. 10, № 4, с. 63-81. [Schavlovsky M.M. Etiology and pathogenesis of amyloidoses: the molecular and genetic basis. *Med. Acad. Journ.*, 2010, vol. 10, no. 4, pp. 63-81. (In Russ.)]
2. Chiti F., Dobson C. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, vol. 86, pp. 27-68.
3. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V., Chandra N. Lysozyme: a model protein for amyloid research. *Adv Protein Chem Struct Biol.*, 2011, vol. 84, pp. 63-111.
4. Zou Y., Hao W., Li H., Gao Y., Sun Y., Ma G. New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach. *J. Phys. Chem. B*, 2014, vol. 118, no. 33, pp. 9834-9843.
5. Fazili N.A., Bhat I.A., Bhat W.F., Naeem A. Anti-fibrillation propensity of a flavonoid baicalein against the fibrils of hen egg white lysozyme: potential therapeutics for lysozyme amyloidosis. *J Biomol Struct Dyn.*, 2016, vol. 34, no. 10, pp. 2102-14.
6. Dodge G.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, vol. 100, pp. 119-130.
7. Markwell M.A., Haas S.M., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein sample. *Analyt. Biochem.*, 1978, vol. 87, no. 2, pp. 206-210.
8. Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И., Козарезова Т.И., Климович Н.Н. Процессы микровезикуляции эритроцитов у детей при гематологических заболеваниях. *Новости медико-биол. наук*, 2004, № 1, с. 143-146. [Zubritskaya G.P., Lukyanenko L.M., Slobozhanina E.I., Kozarezova T.I., Klimkovich N.N. Microvesicular process in erythrocytes of children with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *News of biomedical sciences*, 2004, no. 1, pp. 143-146. (In Russ.)]
9. LeVine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.*, 1993, vol. 2, no. 3, pp. 404-410.

### THE EFFECT OF AMYLOID FIBRILS FROM HEN EGG WHITE LYSOZYME ON THE MEMBRANE PROTEINS MODIFICATION OF HUMAN ERYTHROCYTES *IN VITRO*

Venskaya E.I., Zubritskaya G.P., Lukyanenko L.M., Slobozhanina E.I.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus

*Academicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus; e-mail: e.i.rusina@mail.ru*

**Abstract.** The effect of amyloid fibrils on the structural and functional state of human erythrocyte membranes *in vitro* was studied. The process of the formation of amyloid fibrils from hen egg lysozyme was monitored by the fluorescence method with a specific thioflavin T probe. Experiments were carried out on the blood erythrocytes of virtually healthy donors. Cells were incubated in a solution containing amyloid fibrils, then erythrocyte membranes were isolated from the cells. The structure of human erythrocyte membranes was estimated by the degree of cell vesiculation under metabolic depletion, protein modification of erythrocyte membranes was assessed by the fluorescence parameters of N-(1-pyrene) maleimide (PM) probes, reflecting the level of sulfhydryl groups, and 4-4', -diacetamide 2,2', -stilbendisulphonate (DIDS), specifically binding to protein of lane 3. Erythrocytes incubated under the same conditions in medium containing intact lysozyme, as well as in medium devoid of protein components were used as the controls. A three-hour incubation of cells in a solution containing amyloid fibrils from lysozyme was found to accelerate the erythrocyte vesiculation process upon their metabolic depletion, decrease the fluorescence intensity of the protein SH-groups-specific N-(1-pyrene) maleimide and lane 3 protein associated 4-4', -diacetamido-2,2', -stilbendisulphonate, compared with control cells. The results allow us to conclude that amyloid fibrils obtained from lysozyme, when acting upon human erythrocytes *in vitro*, cause a modification of their membrane structure, which manifests in an increase in the separation of the membrane material from the red blood cells - vesicles, a decrease in the level of protein SH-groups and modification of the lane 3 protein structure in human erythrocyte membranes.

**Key words:** erythrocytes, amyloid fibrils, lysozyme, membrane proteins.