

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ АЛЮМИНИЯ НА ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЛИЗОЦИМА

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

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
ул. Академическая, 27, г. Минск, 20072, РБ; e-mail: sas.alesya@gmail.com
Поступила в редакцию: 26.06.2018

Аннотация. Изучено влияние ионов алюминия в концентрации 100 мкМ на рост амилоидных структур из лизоцима. При использовании флуоресцентного зонда тиофлавина было обнаружено, что добавление ионов алюминия в среду роста амилоидных фибрилл из лизоцима вызывает увеличение интенсивности флуоресценции используемого зонда, что говорит о более высокой скорости образования амилоидных фибрилл при добавлении ионов металла. При этом использование другого флуоресцентного зонда – 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС) не позволило обнаружить структурных различий амилоидных фибрилл с и без хлорида алюминия в среде инкубации. Также нами была изучена собственная тирозиновая и триптофановая флуоресценция амилоидных фибрилл на основе лизоцима и их комплекса с ионами алюминия. Показано, что добавление в среду роста амилоидных фибрилл 100 мМ хлорида алюминия приводит к снижению интенсивности собственной флуоресценции по сравнению с амилоидными фибриллами, полученными только на основе лизоцима.

Ключевые слова: амилоидные структуры, лизоцим, хлорид алюминия, флуоресцентные зонды.

Амилоиды – это неразветвленные белковые нити, структура которых состоит из β -складчатых тяжей неопределенной длины. Таким образом, амилоиды состоят из расположенных в определенном порядке большого количества копий (обычно тысячей) пептида или белка. Амилоидные структуры легко идентифицируются с помощью электронной микроскопии как длинные неразветвленные нити диаметром 6-12 нм. Повторяющиеся поперечные β -сшивки обеспечивают характерный рисунок при двумерной рентгеновской дифракции. Предполагается, что способность формировать высокоорганизованные структуры такого типа характерна не только для пептидов, связанных с развитием различных заболеваний, но является генетически обусловленным качеством всех полипептидных цепей. На сегодняшний день уже не вызывает сомнений медицинская значимость амилоидных структур как патогенов, некоторые из которых также обладают инфекционными свойствами. Однако несмотря на то, что изучение амилоидных белков первоначально связано с исследованием патологий человека, в 2000-х гг. было доказано, что организм продуцирует некоторые амилоиды в норме и они определяют некоторые физиологические функции в различных организмах. Сейчас известно, что более 30 амилоидов человека ассоциированы с различными патологиями. Показано, что отложение амилоидных фибрилл является характерной чертой развития ряда заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (БА) [1].

В экспериментах на животных было установлено, что введение наноалюминия стимулирует синтез β -амилоидных белков, повышая активность генов предшественника амилоидного белка (APP), а также β -секретазы BACE1. Алюминий – хорошо известный нейротоксин, во многих исследованиях обсуждается его возможная связь с развитием нейродегенеративных патологий. Точные этиологические факторы возникновения этой патологии не известны, но гипотезы о ее развитии включают совокупное действие генетических факторов, травм головы, окислительного стресса, инфекционных агентов и факторов окружающей среды [2].

Известно, что собственные физико-химические характеристики (гидрофобность и заряд) влияют на способность пептидов образовывать как амилоидные фибриллы, так и потенциально более токсичные олигомерные комплексы. Более того было показано, что существует значительная корреляция между способностью белка образовывать агрегаты, и цитотоксичностью полученных структур. Амилоиды, образованные из различных белков, имеют ряд общих свойств. Так обнаружено, что в префибрилярных агрегатах различных полипептидов содержатся эпитопы, характеризующиеся общим строением, что говорит о возможности существования общих черт в механизмах агрегации различных белковых последовательностей [3]. Это дает возможность предположить, что, несмотря на отличие белков-предшественников, полученные из различных белков амилоидные фибриллы, являются сходными по структуре и физико-химическим показателям, что позволяет использовать один из амилоидогенных белков для получения модельных амилоидных фибрилл при изучении их свойств и механизмов действия. Часто в качестве модельного предшественника амилоидов используют лизоцим, который *in vitro* образует амилоидные фибриллы при определенных условиях.

Гидроксид и карбонат алюминия широко используется для связывания фосфатов у больных с хронической почечной недостаточностью, находящихся на длительном диализе, чтобы избежать гиперфосфатемии. Однако введение больших доз хелаторов фосфатов, содержащих алюминий, в течение долгого периода приводит к накоплению в организме алюминия и проявлению его токсических эффектов [4]. Показано, что у 25-30 % больных почечной недостаточностью, находящихся на длительном диализе, возникают анемии, остеомалация и

патологии, сходные по симптомам с БА. Удаление алюминия из диализных растворов или использование хелаторов алюминия приводило к реверсии симптомов, что указывает на него как причину развития патологического состояния.

Принято считать, что гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является препятствием для проникновения металлов в мозг. Однако, вероятнее всего, алюминий проникает в мозг напрямую через ГЭБ с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза через белок-переносчик железа или его поврежденные структуры и накапливается в глиальных и нейрональных клетках [5]. Известно, что ГЭБ обладает системой защиты мозга от накопления ионов алюминия, которая реализуется в активном выведении катионов посредством монокарбоксилатных транспортеров [6], но эта система не срабатывает при накоплении алюминия в крови свыше 2 нг/г [7].

Обнаружено, что в результате накопления алюминия в тканях головного мозга может развиваться энцефалопатия [8]. Период полувыведения алюминия из клеток мозга человека составляет 7 лет, что приводит к нарушению аксонального транспорта и функций нейрофиламентов. Некоторые авторы полагают, что именно это играет ключевую роль в образовании нейрофибрильных сплетений подобных тем, которые образуются при развитии БА [9]. Кроме того, благодаря своим проокислительным свойствам алюминий способен нарушать физические параметры мембраны нейронов, воздействуя на работу потенциал-активируемых ионных каналов или секрецию трансмиттера [10]. Было обнаружено, что ионы алюминия способны влиять на процесс связывания кальция с кальмодулином в клетках мозга, что приводит к повышению уровня свободного кальция в цитозоле [11].

Так как транспорт амилоидных структур и ионов алюминия в организме человека осуществляется кровью, то существует вероятность образования комплексов амилоидные фибриллы-ионы алюминия. При этом, несмотря на то, что в последнее время достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов развития болезни Альцгеймера, до сих пор остается не выясненной роль взаимосвязи амилоидных фибрилл и ионов алюминия в патогенезе этого заболевания.

Целью нашей работы было изучить влияние ионов алюминия на основные спектрально-флуоресцентные характеристики амилоидов на основе лизоцима в процессе их образования.

Амилоидные структуры получали из лизоцима куриного яйца. Для получения комплекса амилоидных структур и ионов алюминия использовали хлорид алюминия в конечной концентрации 100 мкМ. Образование амилоидов двух видов проходило в одинаковых условиях: использовали 0,1 М раствор HCl pH 2,0, лизоцим куриного яйца в концентрации 5 мг/мл. Фибрилляцию белковых олигомеров стимулировали воздействием температуры (60 °C) при постоянном перемешивании в течение 6 суток. Контроль за процессом образования амилоидов из лизоцима осуществляли ежедневно флуоресцентным методом с использованием зонда 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС) и тиофлавина Т (ТtТ), которые широко используются в качестве маркеров образования амилоидных β-слоев [12].

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь). Спектр флуоресценции тирозина в амилоидах оценивали в диапазоне 290-380 нм с длиной волны возбуждения 270 нм; спектр флуоресценции триптофана в амилоидах оценивали в диапазоне 310-400 нм с длиной волны возбуждения 290 нм [13].

Кинетика образования фибрилл может быть описана как процесс нуклеации, состоящий из трех главных шагов: нуклеация, рост фибрилл и фаза покоя. Нуклеация происходит при связывании нескольких белковых мономеров в организованные структуры – ядра, выступающие в роли предшественника для образования фибрилл. Лаг-фаза кинетики фибрилляции связана с необходимостью времени для формирования ядер. Последовательное добавление мономеров к ядру удлиняет их до состояния фибрилл. Добавление уже готовых ядер уменьшает длительность лаг-фазы [14]. Известно, что амилоидные фибриллы принимают характерную трехмерную структуру в зависимости от их индивидуальной аминокислотной последовательности, но общим признаком упаковки всех белков является то, что гидрофобные остатки находятся внутри тела упакованной молекулы.

Процесс образования амилоидных агрегатов оценивали по изменению интенсивности флуоресценции зонда тиофлавина Т. Как упоминалось выше, данный флуоресцентный зонд используется для оценки формирования поперечно складчатого β-слоя в амилоидных фибриллах. Предполагается, что образование амилоидных фибрилл начинается с образования в растворе белковых олигомерных ядер, которые затем формируют комплексы в виде длинных нитей.

Изучение формирования амилоидных фибрилл, состоящих только из лизоцима, показало, что образование белковых агрегатов проходило постепенно, с ростом интенсивности уже на 2 сутки инкубации, общее время роста составило около 6 суток, что видно по выходу интенсивности флуоресценции тиофлавина Т на плато к 6 суткам инкубации (рис. 1А).

Добавление 100 мкМ хлорида алюминия в среду инкубации амилоидных фибрилл на основе лизоцима привело к пролонгированию лаг-фазы, т.е. рост интенсивности флуоресценции зонда наблюдался на 3 сутки.

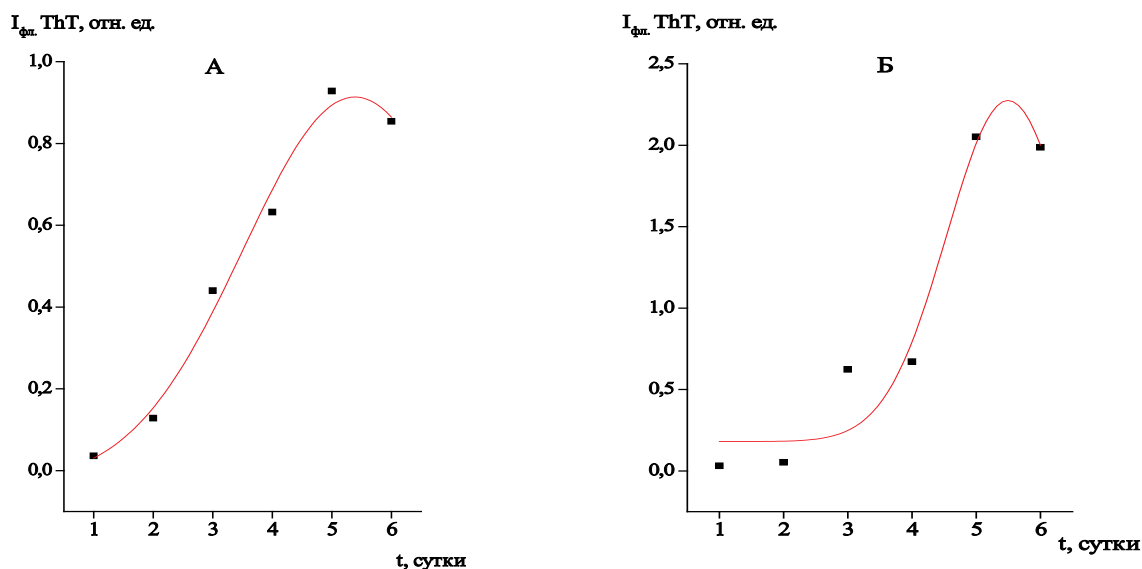


Рисунок 1. Изменение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т (ThT) в зависимости от времени инкубации раствора лизоцима (А) и раствора лизоцима с хлоридом алюминия в концентрации 100 μM (Б)

При этом общее время образования амилоидных фибрилл осталось неизменным, так как максимальный рост интенсивности флуоресценции используемого зонда также наблюдался на 6-е сутки инкубации. Однако стоит отметить, что конечное значение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т было значительно выше (примерно в 2 раза) в растворе амилоидных фибрилл, содержащих 100 μM ионов алюминия (рис. 1Б). Полученные нами данные согласуются с результатами, полученными при изучении воздействия ионов алюминия на рост амилоидных фибрилл на основе пептида А β 40 [13]. Авторы считают, что эффект ингибирования лаг-фазы роста амилоидов может быть связан с низким значением рН.

Воздействие ионов алюминия на структуру амилоидных фибрилл нами было изучено с помощью флуоресцентного зонда АНС и по изменению собственной флуоресценции остатков тирозина и триптофана в лизоциме. Известно, что квантовый выход флуоресценции АНС зависит от полярности его окружения и увеличивается при связывании в гидрофобных средах [12].

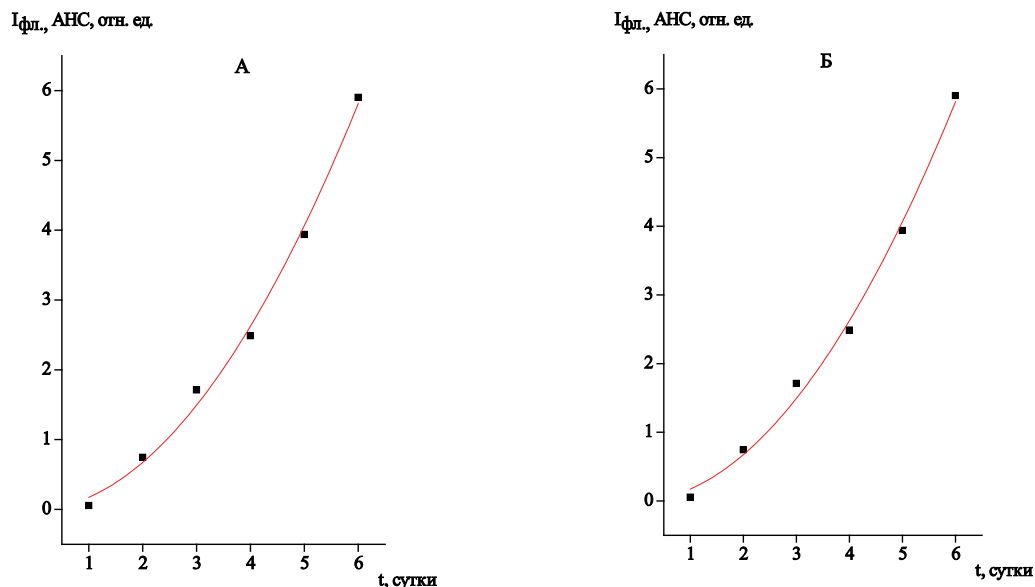


Рисунок 2. Изменение интенсивности флуоресценции АНС в зависимости от времени инкубации раствора лизоцима (А) и раствора лизоцима с хлоридом алюминия в концентрации 100 μM (Б)

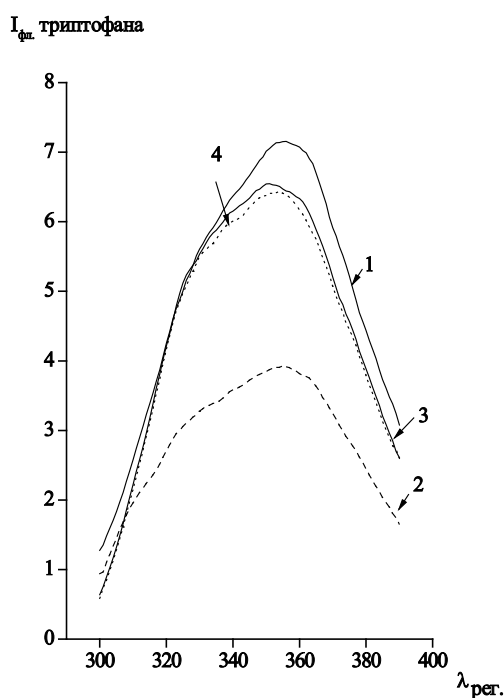


Рисунок 3. Спектры триптофановой флуоресценции в зависимости от состава амилоидных фибрилл.
 1 – амилоидные фибриллы на основе лизоцима куриного яйца
 2 – амилоидные фибриллы на основе лизоцима куриного яйца, образованные в присутствии $100 \mu\text{M AlCl}_3$
 3 – раствор лизоцима
 4 – раствор лизоцима + $100 \mu\text{M AlCl}_3$

В наших экспериментах наблюдался рост интенсивности флуоресценции АНС в растворе лизоцима в зависимости от времени инкубации (рис. 2). Сравнение результатов, полученных при инкубации лизоцима в присутствии ионов алюминия и в их отсутствии не выявило значительных отличий в интенсивности флуоресценции используемого зонда. Полученные данные демонстрируют, что добавление ионов алюминия в среду роста амилоидных структур не вызывает значимых изменений структуры получаемых фибрилл по сравнению с амилоидами, полученными только из лизоцима.

При изучении собственной флуоресценции амилоидов нами было установлено, что добавление ионов алюминия в конечной концентрации $100 \mu\text{M}$ в среду инкубации амилоидных фибрилл на основе лизоцима приводит к снижению интенсивности как триптофановой, так и тирозиновой флуоресценции по сравнению с амилоидными фибриллами, полученными только из раствора лизоцима, а также по сравнению с контрольным раствором лизоцима (рис. 3).

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что ионы алюминия стимулируют фибрилляцию белковых нитей лизоцима, а также приводят к появлению локальных изменений структуры белковой молекулы.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ), грант Б17М-098.

Список литературы / References:

1. Woodard D., Bell D., Tipton D., Durrance S., Cole L., Li B., Xu S. Gel formation in protein amyloid aggregation: A physical mechanism for cytotoxicity. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 4, pp. 1-8.
2. Zawilla N.H., Taha F.M., Kishk N.A., Farahat S.A., Farghaly M., Hussein M. Occupational exposure to aluminum and its amyloidogenic link with cognitive functions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, no. 139, pp. 57-64.
3. Kaye R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 2003, vol. 300, pp. 486-489.
4. Hosokawa S., Nishitani H., Nishio T., Imai T., Tomita Y., Tomoyoshi T., Sawanishi K., Yoshida O. Aluminum transport and Dialysance during Haemodialysis. *International Urology and Nephrology*, 1988, vol. 20, no. 1, pp. 89-100.
5. Aremu D.A., Meshitsuka S. Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. *Brain Res.*, 2005, vol. 1031, pp. 284-296.
6. Yokel R.A., Rhineheimer S.S., Sharma P., Elmore D., McNamara P.J. Entry, half-life and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single (26) Al exposure. *Toxicol. Sci.*, 2001, vol. 64, pp. 77-82.

7. Andrási E., Páli N., Molnár Z., Kösel S. Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients. *J. Alzheimers Dis.*, 2005, vol. 7, pp. 273-284.
8. Yokel A.R., Golub M.S. *Research issues in aluminum toxicity*. Washington, DC: Taylor and Francis, 1997, 116 p.
9. Sanei H., Goodarzi F., Flier-Keller E.V. Historical variation of elements with respect to different geochemical fractions in recent sediments from Pigeon Lake, Alberta, Canada. *J. Environ. Monit.*, 2001, vol. 3, pp. 27-36.
10. Lévesque L., Mizzen C.A., McLachlan D.R., Fraser P.E. Ligand specific effects on aluminum incorporation and toxicity in neurons and astrocytes. *Brain Res.*, 2000, vol. 877, pp. 191-202.
11. Zafar T.A., Uppal A. Aluminum intake and its toxic effects on health. *International J. of Agriculture and Biology*, 1999, vol. 1-3, pp. 188-191.
12. Bologni B., Kumita J.R., Barros T.P., Esbjorner E.K., Luheshi L.M., Crowther D.C., Wilson M.R., Dobson C.D., Favrin G., Yerbury J.J. ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS Chemical biology*, 2010, vol. 5, no 8, pp. 735-740.
13. Chen W-T., Liao Y-H., Yu H-M., Cheng I.H., Chen Y.R. Distinct effects of Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ and Al³⁺ on amyloid- β stability, oligomerization and aggregation: Amyloid- β destabilization promotes annular protofibril formation. *The journal of biological chemistry*, 2011, vol. 286, pp. 9646-9656.
14. Morozova-Roche L.A., Zurdo J., Spencer A., Noppe W., Receveur V., Archer D.B., Joniau M., Dobson C.M. Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants. *Journal of Structural Biology*, 2000, no. 130, pp. 339-351.

ALUMINUM IONS INFLUENCE ON CHANGES OF SPECTRAL AND FLUORESCENT PROPERTIES OF AMYLOID FIBRILLS FROM LYSOZYME

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

Institute biophysics and cell engineering of NAS of Belarus,

Akademicheskaya str., 27, Minsk, Belarus; e-mail: sas.alesya@gmail.com

Abstract. Influence of 100 μ M aluminum ions on amyloids fibril growth from lysozyme was studied. Using fluorescent probe thioflavin T it was shown that addition aluminum ions to growth medium of amyloid fibrils from lysozyme leads to increasing fluorescent intensity of applied probe. This suggests that aluminum ions stimulate formation of amyloid fibrils. However, applying another fluorescent probe - 1-anilinothalene 8-sulfonate (ANS) we couldn't find structural differences between amyloid fibril with and without aluminum chloride in the environment. Also we studied own fluorescent of tyrosine and tryptophan of amyloid fibrils from lysozyme and their complexes with aluminum ions. It was shown that 100 μ M aluminum ions lead to decreasing intrinsic fluorescence in compare with amyloid fibrils only from lysozyme.

Key words: amyloid structures, lysozyme, aluminum chloride, fluorescent probes.