



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58045 (13) U
(51) МПК
G01N 21/64 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДЕТЕКТУВАННЯ ТА ХАРАКТЕРИЗУВАННЯ АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛ

1

(21) u201011220

(22) 20.09.2010

(24) 25.03.2011

(46) 25.03.2011, Бюл.№ 6, 2011 р.

(72) ГОРБЕНКО ГАЛИНА ПЕТРІВНА, ТРУСОВА
ВАЛЕРІЯ МИХАЙЛІВНА, КИРИЛОВА ОЛЕНА МИ-
ХАЙЛІВНА, КИРИЛОВ ГЕОРГІЙ КОСТЯНТИНО-
ВИЧ, КАЛНІНІЯ ІНТА ЕДУАРДІВНА

(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-
ТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

(57) Спосіб детектування та характеризування
амілоїдних фібрил, що включає титрування флуо-
ресцентного зонда розчином досліджуваних фіб-
рилярних агрегатів білка, реєстрацію спектрів

2

флуоресценції одержаного розчину фібрилярних
агрегатів білка, математичну обробку спектраль-
них даних та побудову ізотерми зв'язування зонда
з білковими агрегатами, який **відрізняється** тим,
що як флуоресцентний зонд використовують спо-
луку 3-морфоліно-7Н-бензо[де]антрацен-7-один
(АБМ), а характеризування амілоїдних фібрил
проводять за коефіцієнтом розподілу АБМ у білко-
ву фазу, відносним квантовим виходом, максиму-
мом інтенсивності флуоресценції при різних дов-
жинах хвиль збудження, а також визначаючи
фрактальну розмірність білкових агрегатів та мік-
рооточення зонда в амілоїдних структурах.

Корисна модель, що заявляється, належить до
галузі молекулярної біофізики та молекулярної
медицини та може бути використана для тесту-
вання амілоїдних фібрил білкових молекул за до-
помогою нового флуоресцентного маркера на ос-
нові бензантронового барвника.

Агрегація водорозчинних білків, що супрово-
джується утворенням високовпорядкованих β -
складчатих фібрилярних структур, які зветься амі-
лоїдами, є ключовим фактором в етіології цілої
низки так званих конформаційних хвороб, включа-
ючи хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгто-
на, діабет другого типу, ревматоїдний артрит, губ-
часті енцефалопатії (пріонні хвороби), тощо.

Для ідентифікації фібрилярних агрегатів вико-
ристовують низку експериментальних методів.
Існує метод детектування амілоїдів, заснований на
інфрачервоній спектроскопії з перетворенням Фу-
р'є (ФП-ІЧ) [1, 2]. Основна ідея цього аналітичного
інструменту полягає у детектуванні смуги амідів I,
яка характеризує вторинну структуру білка. Аналіз
ФП-ІЧ спектрів дозволяє судити про кількість α -
спіралей та β -листів, а отже й про існування фіб-
рилярних структур. Недоліком цього способу є той
факт, що діапазон смуги амідів I ($1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$)
перекривається з іншими коливаннями бокового
ланцюга білків та пептидів, не пов'язаними із вто-

ринною структурою. До того ж, поглинання води
робить суттєвий небажаний внесок в ІЧ-спектри.

Відомий спосіб детектування амілоїдних фіб-
рил, що базується на трансмісійній електронній
мікроскопії (ТЕМ) [3]. Досліджуваний зразок розмі-
щують на вуглеводній підкладці, контрастують
спеціальним агентом та аналізують за допомогою
мікроскопа. Використання ТЕМ має ряд обмежень,
серед яких можна відзначити складність приготу-
вання зразків, наявність небажаної адсорбції зраз-
ку на підкладці, велику вартість вуглеводних під-
ложек, контрастуючих агентів та електронних
мікроскопів, складність підбору необхідної концен-
трації контрастуючого агенту, яка б не спотворю-
вала ТЕМ знімки та токсичність контрастуючих
агентів.

Найближчим аналогом до корисної моделі, що
заявляється, є спосіб детектування фібрилярних
агрегатів білків, оснований на застосуванні ряду
флуоресцентних зондів. В найпоширеніших з них
застосовують тіофлавін Т (ТТ) та конго червоний
(КЧ) [4, 5] та включають титрування флуоресцент-
ного зонду розчином досліджуваних фібрилярних
агрегатів білка, реєстрацію спектрів флуоресценції
одержаного розчину фібрилярних агрегатів білка,
математичну обробку спектральних даних та по-
будову ізотерми зв'язування зонду з білковими
агрегатами.

(13) U

(11) 58045

(19) UA

Однак використання цих зондів має ряд недоліків, пов'язаних із залежністю спектральних характеристик ТТ та КЧ від морфології фібрил, рН та іонної сили, впливом зазначених зондів на кінетику фібрилізації та стабільність фібрилярних інтермедіатів, а також чутливістю флуоресценції ТТ до присутності різних сполук, наприклад, поліфенолів та залежністю константи зв'язування ТТ з фібрилами від молекулярного пакування останніх. Окрім цього, маються докази на користь того, що механізм взаємодії КЧ з амілоїдними фібрилами не є єдиним для усіх білків. Так, наприклад, було показано, що зв'язування цього зонду з полі-L-лізином рН-залежне та контролюється електростатичними взаємодіями між позитивно зарядженими лізинними залишками поліпептиду та негативно зарядженими сульфонатними групами КЧ [6]. Наявність комплексу флуорофору з інсуліном та АР-пептидом стабілізуються гідрофобними взаємодіями [7]. Ці дані свідчать про те, що механізм взаємодії зонду з білком залежить від хімічної структури поліпептиду.

В основу корисної моделі покладено технічну задачу створення такого способу детектування та характеризовування амілоїдних фібрил, який, за рахунок використання нової сукупності суттєвих ознак, дозволив би підвищити чутливість та специфічність процесів тестування, поліпшити інтерпретацію результатів, знизити матеріальні та часові витрати.

Поставлена задача вирішується тим, що в спосіб, обраному за найближчий аналог, який включає титрування флуоресцентного зонду розчином досліджуваних фібрилярних агрегатів білка, реєстрацію спектрів флуоресценції одержаного розчину фібрилярних агрегатів білка, математичну обробку спектральних даних та побудову ізотерми зв'язування зонду з білковими агрегатами, згідно з корисною моделлю, в якості флуоресцентного зонду використовують сполуку 3-морфоліно-7Н-бензо[де]антрацен-7-один (АБМ), а характеризовування амілоїдних фібрил проводять за коефіцієнтом розподілу АБМ у білкову фазу, відносним квантовим виходом, максимумом інтенсивності флуоресценції при різних довжинах хвиль збудження, а також визначаючи фрактальну розмірність білкових агрегатів та мікрооточення зонду в амілоїдних структурах.

Сполука АБМ є амінопохідною бензантроні. Завдяки своїм привабливим фотофізичним властивостям, таким як а) великий Стоксов зсув, б) високий коефіцієнт екстинкції, в) слабка флуоресценція у водному розчині, г) висока чутливість спектральних параметрів до полярності оточення зонду, цей зонд є дуже перспективним при дослідженні біологічних молекул, особливо білків та пептидів. Внутрішньомолекулярний перенос заряду з амінозамісника на карбонільні групи призводить до значного збільшення дипольного моменту АБМ після збудження. Це, в свою чергу, викликає переорієнтацію диполів розчинника навколо диполу зонду у збудженому стані та втрату енергії, що виражається у червоному зсуві максимуму випромінювання АБМ.

АБМ локалізується у порожнечках, каналах та борозенках білкових агрегатів, притаманних амілоїдним фібрилам. Це призводить до значного зростання інтенсивності флуоресценції зонду при його асоціації з білком та дозволяє розрізнити сигнали флуоресценції АБМ, який зв'язаний з фібрилярними структурами та нативним білком.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Флуоресцентний зонд АБМ у вигляді спиртового розчину додають до буферу для досягнення концентрації 0,5 мкМ та починають титрувати розчином амілоїдних агрегатів білка з інкрементом концентрації поліпептиду 0,2-0,8 мкМ, реєструючи спектри його флуоресценції при довжині хвилі збудження 430 нм. Аналогічні вимірювання проводяться з нативним білком. По знайденим значенням інтенсивностей флуоресценції у максимумі спектру будують графіки залежностей змін інтенсивності флуоресценції АБМ від концентрації білка, знаходять коефіцієнти розподілу зонду у білкову фазу та за цими коефіцієнтами, а також за зростанням нахилу графіку для фібрилярного білка у бік вісі ординат у порівнянні з контролем (нативний білок) судять про наявність впорядкованої конформації білка.

Запропонований спосіб ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1.

Флуоресцентний зонд АБМ розчиняли в етиловому спирті до концентрації 480 мкМ. 5 мкл розчину зонду змішували із 5 мл буферу (5 мМ натрій-фосфатний буферний розчин, рН 7,4). 2 мл цієї суміші додавали до кварцевої кювети та реєстрували спектр флуоресценції зонду в області 540-660 нм на спектрофлуориметрі Perkin Elmer LS55 (Perkin-Elmer Ltd, UK). Потім титрували фібрилярним лізоцимом з білка курячих яєць до концентрації 8,4 мкМ та записували спектр флуоресценції АБМ при кожній концентрації білка. Концентрація АБМ в пробі складала 0,5 мкМ. Після цього знаходили інтенсивність флуоресценції зонду на довжині хвилі 580 нм (максимум спектру) та будували залежності зміни інтенсивності флуоресценції АБМ від концентрації білка. Аналогічну процедуру проводили із класичним амілоїд-специфічним маркером тіофлавіном Т (ТТ). Отримані ізотерми зв'язування аналізували в рамках моделі Ленгмюра. Розрахована таким чином константа зв'язування дорівнювала $1,2 \text{ мкМ}^{-1}$ для АБМ та $0,04 \text{ мкМ}^{-1}$ для ТТ, що свідчить про значно більший потенціал АБМ для детектування амілоїдних агрегатів білків.

Приклад 2.

Флуоресцентний зонд АБМ розчиняли в етиловому спирті до концентрації 480 мкМ. 5 мкл розчину зонду змішували із 5 мл буферу (5 мМ натрій-фосфатний буферний розчин, рН 7,4). До 2 мл цієї суміші додавали 220 мкл фібрилярного лізоциму для досягання концентрації білка 10,2 мкМ. Суміш інкубували протягом 30 хвилин та записували спектр флуоресценції зонду. Потім титрували скварайновим зондом SQ-1 та реєстрували зменшення інтенсивності флуоресценції АБМ внаслідок індуктивно-резонансного переносу енергії. Максимальна концентрація SQ-1 дорівнювала 0,7 мкМ. По отриманим спектрам визначали відносний

квантовий вихід донору, Q_r , як відношення інтенсивності флуоресценції АБМ при довжині хвилі 580 нм у відсутності та присутності SQ-1. Бували графіки залежності відносного квантового виходу АБМ від концентрації SQ-1. Отримані результати аналізували в рамках розширеної експоненціальної моделі, яка описується наступним рівнянням:

$$Q_r = \int_0^{\infty} \exp\left(-\lambda - C_A V_d \Gamma(1-d/6) \lambda^{d/6}\right) d\lambda \quad (1)$$

де $\lambda = t / \tau_D$,

τ_D - час життя донору у відсутності акцептору,

$V_d = \pi^{d/2} R_0^d / \Gamma\left(\frac{d}{2} + 1\right)$ - об'єм d-розмірної сфери

радіусом R_0 ,

d - розмірність розподілу флуорофору (фрактальна розмірність),

$C_A = C_B / C_P V_{PF}$,

C_P - загальна концентрація білка,

V_{PF} - об'єм молекули білка у фібрилярному стані,

C_B - молярна концентрація зв'язаного акцептору.

Аналіз отриманих даних в рамках цієї моделі дозволив визначити фрактальну розмірність розподілу АБМ, яка складала 2,2-2,9 одиниць.

Приклад 3.

Флуоресцентний зонд АБМ розчиняли в етиловому спирті до концентрації 480 мкМ. Потім готували суміш зонду із фібрилярним лізоцимом, яку інкубували протягом 30 хвилин. Молярне відношення зонд/білок у суміші складало 2,4. Після інкубації суміші реєстрували спектри флуоресценції АБМ, зв'язаного з фібрилами, при різних довжинах хвиль збудження. Максимум флуоресценції АБМ зсувався у червону область при зростанні довжини хвилі збудження від 390 до 460 нм із шагом 10 нм. По отриманим спектрам будували залежність довжини хвилі випромінювання від довжини хвилі збудження. Отримана лінійна залежність свідчить про неповну релаксацію диполів розчинника в оточенні флуорофору за час життя АБМ. Це означає,

що у фібрилярних агрегатах лізоциму АБМ розташовується у полярних ділянках, де рухливість гідратованих молекулярних груп поблизу флуорофору значно обмежена.

Використання флуоресцентного зонду АБМ дозволяє:

- підвищити чутливість способу за рахунок більшої спорідненості АБМ до фібрил та нижчого ступеню зв'язування із нативним білком у порівнянні із ТТ та КЧ;

- поліпшити точність експериментальних вимірювань за рахунок незначного внеску ефектів світлорозсіювання у реєструємий сигнал завдяки великому Стоксовому зсуву (140 нм), тоді як спектри флуоресценції ТТ суттєво викривляються світлорозсіюванням;

- знизити вартість визначення за рахунок використання значно нижчих концентрацій зонду (~0,5 мкМ) у порівнянні з ТТ (~10 мкМ).

Джерела інформації:

1. M. E. Goldberg, A. F. Chaffotte, Undistorted structural analysis of soluble proteins by attenuated total reflectance infrared spectroscopy // *Protein Sci.* - 2005. - 14. - 2781-2792.

2. M. del Mar Martinez-Senac, J. Villalain, J.C. Gomez-Fernandez, Structure of the Alzheimer β -amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles // *Eur. J. Biochem.* - 1999. - 265. - 744-753.

3. A. Steven, D. Belnap, Electron microscopy and image processing: an essential tool for structural analysis of macromolecules, in *Current Protocols in Protein Science*, ed. G. Taylor, John Wiley & Sons, Inc., New York, unit 17.12, pp. 11-39, 2007.

4. C. M. Dobson, Experimental investigation of protein folding and misfolding // *Methods.* - 2004. - V. 34. - P. 4-14.

5. M.R. Nilsson, Techniques to study amyloid fibril formation in vitro // *Methods.* - 2004. - 34. - 151-160.

6. W. E. Klunk, J. W. Pettegrew, D. J. Abraham, Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with $A\beta$ -pleated sheet conformation // *J. Histochem. Cytochem.* - 1989. - 37. - 1273-1281.

7. D. B. Carter, K. C. Chou, A model for structure-dependent binding of Congo Red to Alzheimer β -amyloid fibrils // *Neurobiol. Aging.* - 1998. - 19. - 37.