

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА**

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ровнягина Наталия Романовна

**Флуоресцентная спектроскопия фибриллярных наноструктур:
взаимодействие с флуоресцентным зондом тиофлавином Т
и возможности в исследовании кинетики агрегации**

Специальность:

1.3.6. Оптика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук
Ширшин Евгений Александрович

Москва – 2026

Оглавление

Список сокращений	5
Введение	6
Глава 1. Современное состояние исследований по теме диссертации.....	22
1.1 Структура и свойства тиофлавина Т(ThT)	24
1.2 ThT как флуоресцентный молекулярный ротор: фотофизические свойства и их чувствительность к изменениям параметров микроокружения	26
1.3 Пространственная структура и электронные переходы в молекуле тиофлавина Т	31
1.4 Влияние вязкости на параметры нерадиационных процессов релаксации возбуждения в молекуле ThT	35
1.5 Использование ThT в качестве флуоресцентной метки и параметры его взаимодействия с фибриллами	39
1.6 Механизм связывания ThT с белками и белковыми агрегатами	53
1.7 Использование тиофлавина Т для флуоресцентного анализа фибрилл и других биологических систем: разработка новых методов оптической спектроскопии и микроскопии.	57
1.8 Совмещение анализа фотофизических свойств ThT с современными методами изучения этапов формирования амилоидных фибрилл	64
1.9 Заключение	67
Глава 2. Анализ неспецифического взаимодействия тиофлавина Т с белковыми макромолекулами и олигомерами.....	69
2.1 Объекты и методы исследования	70
2.1.1 Методы изготовления образцов	70
2.1.2 Измерение стационарных спектров флуоресценции и поглощения	71

2.1.3 Лазерная кинетическая спектроскопия флуоресценции на наносекундном временном масштабе.....	72
2.1.4 Гель-фильтрационная хроматография.....	73
2.1.5 Лазерная кинетическая спектроскопия флуоресценции на пикосекундном временном масштабе – ап-конверсия флуоресценции	74
2.2 Изменение фотофизических характеристик ThT при взаимодействии с альбумином и его олигомерами	75
2.3 Асинхронное поведения фотофизических характеристик ThT при образовании комплекса с белком.	87
2.4 Роль молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией в исследовании его взаимодействия с белками	95
2.5 Регистрация свободных и связанных молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией с помощью метода ап-конверсии флуоресценции	98
Основные выводы к главе 2.....	101
Глава 3. Анализ фотофизических характеристик тиофлавина Т при связывании с фибриллярными наноструктурами в процессе их образования.....	104
3.1 Объекты и методы исследования	105
3.1.1 Методы изготовления образцов.....	105
3.1.2 Метод динамического рассеяния света	106
3.1.3 Оптическая микроскопия анализа траекторий наночастиц	109
3.2 Асинхронное изменение времени жизни и интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при формировании фибриллярных наноструктур: регистрация сверхбыстрых процессов	110
3.3 Изменение размеров агрегатов и гетерогенности системы при формировании фибриллярных наноструктур	116

3.4 Изменение фотофизических характеристик длинноволновой производной ThT при взаимодействии с альбумином	125
3.5 Взаимосвязь между фотофизическими параметрами ThT и распределениями размеров агрегатов при формировании фибриллярных наноструктур	130
Основные выводы к главе 3	133
Глава 4. Микроскопия насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального микроскопа	136
4.1 Объекты и методы исследования	137
4.1.1 Методы изготовления образцов	137
4.1.2 Метод конфокальной микроскопии для анализа насыщения флуоресценции	137
4.1.3 Метод FLIM-микроскопии для картирования времени жизни флуоресценции	139
4.2 Насыщение сигнала флуоресценции в двухуровневой системе	140
4.3 Регистрация эффекта насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального микроскопа	143
4.4 Картирование параметра насыщения флуоресценции связанного ThT с использованием стандартного конфокального микроскопа	145
Основные выводы к главе 4	152
Заключение	154
Благодарности	157
Публикации автора по теме диссертации	158
Список литературы	160

Список сокращений

ThT	тиофлавин Т (thioflavin T)
САЧ	сывороточный альбумин человека
БСА	бычий сывороточный альбумин
α -LA	альфа-лактальбумин (α -lactalbumin)
α -Cr	α -кристалин
β -LG	β -лактоглобулин
Lys	лизоцим
CA	карбоангидраза
Tg	тиреоглобулин
STI	ингибитор трипсина сои
IRF	функция отклика прибора (instrument response function)
ФМР	флуоресцентный молекулярный ротор
ДРС	динамическое рассеяние света
ATH	оптическая микроскопия анализа траекторий наночастиц
FLIM- микроскопия	метод флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy)

Введение

Диссертационная работа посвящена изучению фотофизических процессов, происходящих при связывании флуоресцентного зонда тиофлавина Т (ThT) с белковыми макромолекулами и их агрегатами. В работе исследованы механизмы изменения фотофизических характеристик ThT – интенсивности и квантового выхода флуоресценции, а также скорости релаксации возбужденного состояния – при образовании им комплексов с высокой ($>10^6 \text{ M}^{-1}$) и низкой ($\sim 10^3\text{-}10^4 \text{ M}^{-1}$) константой взаимодействия с белками и их агрегатами, в том числе, фибриллярными наноструктурами. В работе также предложен новый метод картирования параметра насыщения флуоресценции с помощью конфокальной микроскопии. Показано, что использование данного метода позволяет повысить чувствительность и специфичность оптической визуализации биологических объектов – флуорофоров.

Актуальность исследования и степень разработанности темы

Методы флуоресцентной спектроскопии и микроскопии представляют собой мощный инструмент в химии, биологии и медицине, позволяя исследовать свойства и поведение различных молекул. Одним из основных подходов в задачах детектирования и визуализации молекул является применение экзогенных меток, в частности, флуоресцентных красителей. Применение флуоресцентных зондов позволяет селективно визуализировать определенные типы молекул и органеллы клеток, а также измерять параметры их микроокружения, такие как pH, температура, вязкость, концентрация ионов.

Так, флуоресцентный зонд тиофлавин Т (thioflavin T, ThT) широко применяется для детектирования фибриллярных наноструктур –

нерасторимых нитевидных агрегатов, образующихся в результате неправильного сворачивания белков и их последующего взаимодействия, вовлеченных в патогенез нейродегенеративных заболеваний (болезней Альцгеймера, Паркинсона, прионной болезни) [1–3]. В последующем тексте термин "фибриллы" будет использоваться для обозначения амилоидных фибрилл. Популярность ThT для детектирования фибриллярных структур основана на двух фактах: (1) ThT специфично (с высокой константой комплексообразования, $K > 10^7 \text{ M}^{-1}$) связывается с фибриллами [4] и (2) квантовый выход флуоресценции ThT на несколько порядков увеличивается при образовании им комплекса с фибриллами в сравнении со свободным ThT в растворе [5]. Под константой комплексообразования понимается термодинамическая величина, характеризующая силу взаимодействия между молекулами:

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}, \quad (1)$$

где ΔG — изменение свободной энергии Гиббса при связывании (энергия взаимодействия), R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура. Второй факт связан с тем, что ThT является молекулярным ротором: в возбужденном состоянии фрагменты молекулы ThT поворачиваются друг относительно друга, в результате чего появляется канал релаксации возбуждения со скоростью 10^{12} c^{-1} [6]. При этом изменение микровязкости окружения ThT определяет вращательную подвижность его фрагментов и влечет за собой изменение скорости релаксации возбужденного состояния в диапазоне $10^9 \div 10^{12} \text{ c}^{-1}$ (рис. 1). При специфичном (то есть, с высокой константой комплексообразования – см. рис. 1А) связывании ThT с фибриллами происходит жесткая фиксация фрагментов молекулы в сайте связывания, что влечет за собой тысячекратное усиление интенсивности флуоресценции и рост среднего времени жизни флуоресценции ThT (рис. 1Г).

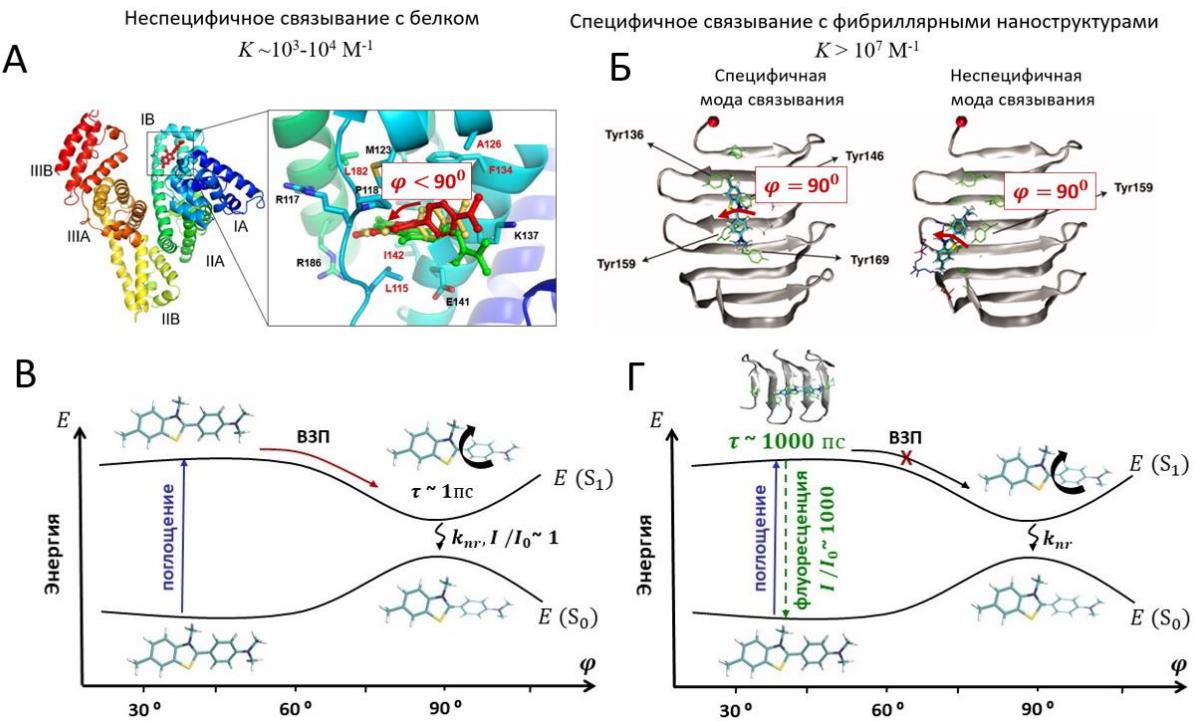


Рисунок 1. А – Схематическое изображение сайта связывания ThT при взаимодействии с альбумином. Красной стрелкой показан угол поворота фрагментов ThT относительно С-С связи, он составляет менее 36° [7]. Б – Схематическое изображение сайтов связывания ThT при взаимодействии с фибриллярными наноструктурами. Угол поворота фрагментов ThT относительно С-С связи составляет 90° [8]. В, Г – Схема, иллюстрирующая механизм формирования фотофизических свойств тиофлавина Т (ThT) в зависимости от его структуры. Молекула ThT представлена в основном (угол поворота составляет 36°) и возбужденном состоянии (угол поворота составляет 90°). Время жизни флуоресценции τ определяется скоростью нерадиационного перехода k_{nr} , которое зависит от вязкости микроокружения η . При низкой вязкости микроокружения время релаксации возбужденного состояния ThT определяется скоростью внутреннего вращения фрагментов молекулы относительно друг друга и составляет $\sim 1 \text{ ps}$ (В). При высоких значениях вязкости в специфических сайтах связывания, наличие которых характерно при образовании комплексов с фибриллами, вращение фрагментов молекулы затруднено, и время жизни возбуждения возрастает до $\sim 1 \text{ нс}$ за счет уменьшения скорости k_{nr} (Г).

Сайт связывания представляет собой специфический участок макромолекулы, участвующий в селективном взаимодействии с ThT посредством нековалентных связей (водородных, ионных, вандерваальсовых и

гидрофобных). Данный сайт характеризуется определенной структурной организацией и термодинамическими параметрами (энергией связывания). Равновесные равновероятные наборы состояний молекул ThT, связанные с такими участками и обладающие схожими фотофизическими характеристиками, мы далее будем называть модами связывания. В результате ThT можно использовать либо для селективной флуоресцентной визуализации фибрилл, либо для исследования кинетики их образования: по мере увеличения концентрации фибрилл растет доля связанного ими ThT с повышенной микровязкостью окружения, и, следовательно, интегральная интенсивность его флуоресценции.

Одним из факторов, осложняющих интерпретацию экспериментальных данных, является то, что тиофлавин Т способен встраиваться не только в фибриллы, но и в мономеры белковых макромолекул и низкомолекулярные агрегаты белков. Такие структуры различного размера образуются в процессе неправильного сворачивания и агрегации белков, предшествуют образованию фибрилл. Хотя ThT неспецифично связывается с такими структурами (константа связывания значительно ниже, чем с фибриллами, $\sim 10^3\text{-}10^4 \text{ M}^{-1}$ [9,10]), при их избытке вклад флуоресценции от их комплексов с ThT может превосходить сигнал от молекул ThT, связанных фибриллами. Этот факт затрудняет детектирование фибрилл в реальных системах, например, биожидкостях, где концентрации мономеров белков и фибрилл могут различаться на 9 порядков [11]. Кроме того, известно, что амилоидные фибриллы обладают как высоко-, так и низкоспецифичными сайтами связывания ThT (рис. 1) [12,13], поэтому интерес представляет количественная оценка параметров комплексообразования ThT с различными белками и белковыми агрегатами, а также оценка оптических свойств ThT при образовании им комплексов со структурами с высокими и низкими константами комплексообразования.

Далее, высокая чувствительность оптических свойств ThT к изменениям вязкости [14] и полярности [15] его микроокружения делает их удобными индикаторами для изучения взаимодействия ThT с белками и другими системами. Согласно принятой модели формирования флуоресцентного отклика ThT, рост интенсивности $Fluo$ и времени жизни τ связан с уменьшением скорости нерадиационной релаксации k_{nr} при неизменной скорости радиационной релаксации k_r за счет увеличения жесткости микроокружения, и эти параметры должны меняться синхронно при образовании ThT комплексов с белками и их агрегатами ($Fluo \sim \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau$) [6,14]. Однако при измерении комплексообразования ThT с белками было показано [16], что выход на плато зависимости времени жизни флуоресценции ThT τ от концентрации белка опережает выход на плато зависимости интенсивности флуоресценции $Fluo$. Более того, для молекул ThT, образующих комплекс с мономерами белков, было получено, что интенсивность флуоресценции ThT возрастает в десятки раз, тогда как время жизни флуоресценции ThT достигает единиц наносекунд, то есть, возрастает в 1000 раз. Также при исследовании кинетики образования фибриллярных структур было выявлено, что время жизни флуоресценции начинает увеличиваться раньше, чем интенсивность флуоресценции, тогда как в модели молекулярного ротора они должны изменяться синхронно. Таким образом, второй задачей из области фотофизики ThT являлось исследование несинхронного изменения интенсивности и времени жизни его флуоресценции при образовании комплексов с белками и их агрегатами.

Вариабельность параметров флуоресценции тиофлавина Т при образовании им комплексов с белками позволяет не только визуализировать фибриллярные наноструктуры [7], но и регистрировать изменение вязкости микроокружения с субмикрометровым разрешением в режиме реального времени с использованием метода конфокальной флуоресцентной

микроскопии [14,17]. Картирование фотофизических параметров зонда, отличных от интенсивности флуоресценции, позволяет повысить чувствительность и специфичность оптического молекулярного имиджинга. Помимо картирования параметров затухания флуоресценции с помощью методики Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM), в данной работе была предложена методика микроскопии насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального микроскопа [18–21]. Отклонение зависимости интенсивности излучения флуорофора от интенсивности возбуждения при больших мощностях накачки от линейного закона происходит вследствие обеднения основного состояния (т.е. когда скорость возбуждения флуорофора из основного состояния в возбужденное превышает скорость деактивации возбужденного состояния), интеркомбинационной конверсии или других эффектов, и может быть описано набором уравнений, в которых в качестве параметров фигурируют фотофизические характеристики флуорофора (сечение поглощения σ , время жизни флуоресценции τ , скорости релаксации). Таким образом, анализируя насыщение флуоресценции в разных пикселях изображения, можно составить карту молекулярно-специфичного параметра $\sigma\tau$ по всему изображению. Для этого достаточно получить флуоресцентные изображения при различных интенсивностях возбуждения в соответствующем диапазоне интенсивностей возбуждения. Эффект насыщения флуоресценции в конфокальной микроскопии ранее анализировался с точки зрения его влияния на пространственное разрешение [22–24], однако возможность использования этого эффекта для молекулярно-специфичного контрастирования изображений не рассматривалась.

Таким образом, применение методов стационарной и времязарезленной флуоресцентной спектроскопии с использованием зонда ThT позволяет проанализировать динамику внутримолекулярных процессов и

изменений свойств белковых молекул при формировании фибриллярных наноструктур, а изучение фотофизических процессов, происходящих при связывании тиофлавина Т с фибриллярными наноструктурами и другими биологическими объектами, является актуальным направлением исследований, имеющим фундаментальное и прикладное значение.

Цель и задачи работы

Целью работы является исследование фотофизических процессов в комплексах, образующихся при взаимодействии флуоресцентного зонда тиофлавина Т с фибриллярными наноструктурами, мономерами белков и их низкомолекулярными агрегатами. Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. С использованием методов флуоресцентной спектроскопии исследовать фотофизические механизмы, ответственные за усиление флуоресценции и изменение среднего времени жизни флуоресценции ThT при неспецифичном связывании с глобулярными белками с низкой константой комплексообразования.
2. Исследовать механизмы, лежащие в основе различной чувствительности фотофизических параметров ThT (времени жизни и интенсивности флуоресценции) при специфичном связывании с фибриллярными наноструктурами на различных этапах процесса агрегации.
3. Разработать метод картирования фотофизических параметров ThT на изображениях, полученных методом конфокальной микроскопии, на основе эффекта насыщения флуоресценции.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования является флуоресцентный зонд ThT, а также его фотофизические свойства при взаимодействии с белками и фибриллярными наноструктурами.

Предметом исследования является использование ThT в качестве флуоресцентного зонда для мониторинга кинетики формирования фибриллярных наноструктур с использованием методов флуоресцентной спектроскопии и микроскопии.

Методология исследования

Фотофизические свойства комплексов ThT с белками и фибриллами были исследованы методами стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии (с субпико- и субнаносекундным разрешением). Для анализа мод связывания и роли олигомеров белков была применена гель-фильтрационная хроматография с детектированием поглощения в УФ и видимой областях. Было реализовано численное моделирование кривых затухания флуоресценции ThT при образовании комплекса с белком в двухкомпонентной системе с двумя различными временами затухания флуоресценции с использованием языка программирования Python. Структурные свойства фибриллярных наноструктур охарактеризованы методами динамического светорассеяния и микроскопии анализа траекторий наночастиц. Разработка метода картирования безразмерного параметра $F_{max}\sigma t$ для флуоресцентного зонда ThT при непрерывном возбуждении, была реализована с помощью конфокальной микроскопии.

Научная новизна

1. Впервые было продемонстрировано, что асинхронное изменение времени жизни и интенсивности флуоресценции связано с наличием фракции молекул ThT со сверхбыстрым затуханием флуоресценции (~ 1 пс) и является общей чертой неспецифического взаимодействия ThT с белками и олигомерами белка.
2. Впервые выявлено две моды связывания ThT с альбумином (800 и 1300 пс), обусловленные наличием в растворах альбумина димерной фракции, для которой константа связывания ThT в ~ 6 раз выше, чем для мономера.
3. Впервые было объяснено асинхронное изменение среднего времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT при формировании фибрилл наличием свободного и связанного ThT со сверхбыстрым затуханием флуоресценции ~ 1 пс. Было продемонстрировано, что присутствие даже небольшой доли ($< 10\%$) компоненты с временем затухания флуоресценции ~ 1 нс эффективно маскирует вклад сверхбыстрой компоненты в кривую затухания флуоресценции, измеренную на установке с шириной аппаратной функции ~ 100 пс.
4. Метод насыщения флуоресценции впервые был применен для молекулярной визуализации в экспериментах по конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного зонда ThT и позволило в 2 раза повысить контраст визуализации в гетерогенной системе фибриллярных нитевидных структур по сравнению со стандартным подходом конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Научная и практическая значимость

Работа вносит вклад в понимание формирования оптических свойств ThT при взаимодействии с белками и их агрегатами, устанавливая причины

асинхронного изменения интенсивности и времени жизни флуоресценции. Выявлен эффект маскировки вклада моды связанного ThT со сверхбыстрой релаксацией ~ 1 пс в кривую затухания флуоресценции, что обосновывает её обязательный учёт при анализе связывания ThT с белками и фибриллярными наноструктурами. Обнаружены как минимум две моды связывания ThT в растворе альбумина, соответствующие мономерной и димерной фракциям, что указывает на необходимость учёта димеризации при оценке параметров связывания альбумина с лигандами.

Также в работе была предложен и протестирован метод молекулярно-специфичной визуализации в конфокальной микроскопии на основе эффекта насыщения флуоресценции. Разработанная методика картирования параметра $F_{max}\sigma\tau$ позволяет повысить чувствительность и специфичность молекулярного имиджинга, не требуя модификации стандартных конфокальных систем, и может быть использована в биоимиджинге как дополнительная модальность.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При неспецифичном (константа комплексообразования $K \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$) связывании молекулы тиофлавина Т (ThT) с белками и олигомерами белков в кинетике затухания флуоресценции ThT присутствует сверхбыстрая компонента со временем ~ 1 пс, наблюдаемая у $>50\%$ молекул ThT в растворе. Вклад данной временной компоненты в кривую затухания флуоресценции, измеренную на установке с шириной аппаратной функции ~ 100 пс, полностью маскируется фракцией ThT со временем жизни ~ 1 нс.
2. Наличие временных компонент в кинетике затухания флуоресценции ThT в растворе белка альбумина, характеризующихся временами жизни

флуоресценции 800 и 2100 пс, связано с образованием комплексов ThT с мономерами и димерами белка. Димеры альбумина обеспечивают связывание ThT в сайт с более жестким микроокружением и с константой комплексобразования в 6 раз большей, чем при связывании ThT с мономерами альбумина.

3. Асинхронное изменение времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT в процессе формирования фибриллярных наноструктур связано с наличием в системе фракций свободного и связанного ThT со сверхбыстрой релаксацией возбужденного состояния (~ 1 пс).
4. Метод микроскопии насыщения флуоресценции позволяет картировать величину безразмерного параметра $F_{max}\sigma\tau$ для флуоресцентного зонда ThT в экспериментах с использованием конфокальной микроскопии с непрерывным источником возбуждения, где $F = I/\hbar\omega$ – плотность потока фотонов, σ – сечение возбуждения, а τ – время жизни флуорофора.

Достоверность и обоснованность результатов

Результаты, представленные в диссертации, получены на основе многократно повторенных экспериментов, проведенных на современном лабораторном оборудовании с использованием актуальных методов обработки экспериментальных данных. Высокая повторяемость и хорошая воспроизводимость измеряемых величин обеспечивает обоснованность и достоверность результатов работы. Изложенные результаты не противоречат данным других научных групп и были многократно представлены на всероссийских и международных конференциях, кафедральных и лабораторных семинарах. Большая часть материалов диссертации опубликована в ведущих международных научных журналах. Это позволяет

считать представленные результаты обоснованными и достоверными, а также полностью отвечающими современному мировому уровню исследований.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены в 9 докладах на российских и международных конференциях: The 23th Annual International Conference on Advanced Laser Technologies ALT'15 (Фаро, Португалия), Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS) (Саратов, Россия), Fourth International Symposium on Optics and Biophotonics (Саратов, Россия), V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России (Сочи, Россия), AFLIM (Дагомыс, Россия), 1-я Школа AFLIM (Москва, Россия), Ломоносовские чтения – 2019 (Москва, Россия), International Conference on Ultrafast Optical Science “UltrafastLight-2019” (Москва, Россия), Ломоносовские чтения – 2020 (Москва, Россия).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 печатных работах, в том числе 5 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова. Список работ автора приведён в конце диссертации перед списком литературы.

Личный вклад

Все результаты, представленные в работе, получены либо автором лично, либо при его определяющем участии. Личный вклад автора состоял в

разработке методик приготовления и характеризации образцов, в проведении всего объёма экспериментальных исследований, обработке и анализе полученных данных, в представлении результатов в виде научных докладов. Основная часть результатов была получена в лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Публикации по теме научно-квалификационной работы были написаны при определяющем участии автора.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка цитированной литературы. Общий объем работы составляет 172 страницы, включая 44 рисунка и 10 таблиц. Библиография содержит 152 наименования на 13 страницах.

Краткое содержание диссертационной работы:

В Введении описывается актуальность и степень разработанности темы диссертационного исследования, формулируются цели и задачи работы, её научная новизна, теоретическая и практическая значимость, обоснованность и достоверность полученных результатов, формулируются положения, выносимые на защиту, приводятся сведения о публикациях, апробации результатов и структуре диссертации.

В Главе 1 диссертации представлен обзор экспериментальных и теоретических работ, посвященных тематике диссертации. Приводятся основные сведения о взаимосвязи структуры зонда тиофлавина Т и его спектральных и фотофизических свойств. Рассматриваются гипотезы, объясняющие изменения флуоресцентных свойств ThT при связывании его с

фибриллярными наноструктурами. Проводится анализ молекулярных механизмов специфического связывания ThT с амилоидными фибриллами и причин, лежащих в основе увеличения квантового выхода флуоресценции ThT при встраивании его в фибриллы. Рассматривается гипотеза о формировании флуоресцентных димеров, эксимеров и мицелл ThT при встраивании его в фибриллярные наноструктуры. Рассматривается модель, описывающая фотофизические процессы в тиофлавине Т на основе рассмотрения его как молекулярного ротора, конформационная подвижность которого определяется вязкостью микроокружения. Анализируются данные квантово-химических расчетов основного и возбужденного состояний ThT. Производится анализ параметров комплексообразования тиофлавина Т с различными макромолекулами.

Глава 2 посвящена исследованию изменения фотофизических характеристик зонда в результате низкоспецифичного связывания в белковые молекулы. В ходе проводится исследование спектров и кинетик затухания флуоресценции тиофлавина Т при образовании комплекса с белком. В данной главе показано, что для связанного ThT наблюдается \sim 1000-кратное увеличение среднего времени жизни флуоресценции τ (от 1 пс в водном растворе до \sim 1000 пс при встраивании в белок), усиление интенсивности флуоресценции *Fluo* составляет всего несколько десятков при связывании с белком (фактор усиления 35), тогда как, согласно модели молекулярного ротора, они должны меняться одинаковым образом. Более того, наблюдается асинхронность поведения фотофизических характеристик зонда *Fluo* и τ с увеличением концентрации белка. В работе были предложены механизмы, ответственные за такое асинхронное поведение фотофизических параметров ThT. С использованием лазерной кинетической спектроскопии на наносекундном временном масштабе в сочетании с гель-фильтрационной хроматографии, совмещенной с регистрацией оптических спектров, проведено

исследование вклада низкомолекулярных олигомеров белка в связывание тиофлавина Т. На примере ряда систем было показано, что асинхронное поведение и различная кинетика изменения интенсивности и времени жизни флуоресценции ThT является общей характеристикой, наблюдаваемой при анализе связывания ThT с белками. Было реализовано математическое моделирование, показывающее, что это расхождение параметров флуоресценции ThT, обусловлено ограниченным времененным разрешением при определении τ в системе ThT–белок с использованием лазерной кинетической спектроскопии на наносекундном временном масштабе с временным разрешением ~ 100 пс. В результате малая доля молекул ThT ($\sim 1\%$) с относительно медленным временем затухания ($\tau \sim 1000$ пс) полностью маскирует вклад молекул ThT с коротким временем жизни ($\tau \sim 1$ пс) в кривую затухания флуоресценции, что было также исследовано с помощью с помощью метода ап-конверсии флуоресценции с временным разрешением ~ 100 фс.

Глава 3 посвящена исследованию специфичного связывания тиофлавина Т с фибриллярнымиnanoструктурами и изучению кинетики данного процесса с использованием фотофизических характеристик зонда. Дополнительный анализ кинетики агрегации белков был реализован путем определения параметров рассеяния раствора, определения размеров образующихся олигомеров и гетерогенности их размера. Как и в случае неспецифичного связывания зонда, было показано, что изменение интенсивности *Fluo* и среднего времени жизни флуоресценции ThT τ при встраивании в белковые фибриллярные агрегаты на всех этапах процесса агрегации происходит асинхронно. Механизмы, ответственные за асинхронное поведение фотофизических характеристик ThT при специфическом взаимодействии с фибриллярными белковыми агрегатами, были исследованы с помощью метода ап-конверсии флуоресценции. В данной главе проведено исследование

механизмов, лежащих в основе различий чувствительности *Fluo* и τ к образованию белковых агрегатов в процессе формирования фибрилл. Оценка размеров агрегатов и их гетерогенности производилась с помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии и микроскопии анализа траектории наночастиц. С помощью метода лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на пикосекундном временном масштабе было показано, что τ чувствительно к появлению даже нескольких процентов молекул ThT, связанных с высокой константой комплексообразования с сайтами, которые возникают одновременно с резким увеличением среднего размера и концентрации агрегатов, а также гетерогенности раствора. Наблюдаемое расхождение между интенсивностью флуоресценции ThT и τ можно объяснить наличием фракции молекул ThT с временем затухания флуоресценции ~ 1 пс.

Глава 4 посвящена разработке метода картирования фотофизических параметров флуорофоров, в частности, ThT, с помощью конфокальной микроскопии на основе эффекта насыщения флуоресценции. В главе показано, что картирование безразмерного параметра насыщения флуоресценции $F\sigma\tau$, где $F = I/\hbar\omega$ - плотность потока фотонов, σ - сечение возбуждения, а τ - время жизни флуорофора, позволяет получать дополнительную информацию о флуорофорах в системе, что продемонстрировано на примере гетерогенной системы фибриллярного гидрогеля, окрашенного ThT.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в данной работе.

Глава 1. Современное состояние исследований по теме диссертации

В данной главе представлен обзор литературы по теме диссертационной работы. Основное внимание уделено фотофизическим свойствам молекулы тиофлавина Т (ThT), ее применению для исследования структуры и свойств белковых агрегатов и механизмам взаимодействия ThT с биомолекулами. Рассмотрены ключевые аспекты фотофизических процессов в молекуле ThT, включая ее структуру, особенности электронного строения, механизмы релаксации флуоресценции. Особое внимание уделено влиянию различных факторов микроокружения, таких как полярность, вязкость и pH, на фотофизические свойства молекулы ThT. Описан механизм изменения фотофизических свойств молекулы ThT по принципу молекулярного ротора. Рассмотрено, как изменяется геометрия молекулы ThT при переходе из основного в возбужденное состояние, и как эти изменения влияют на ее флуоресцентные характеристики. Представлена модель электронных переходов молекулы ThT, объясняющая ее флуоресцентное поведение в зависимости от угла поворота фрагментов молекулы друг относительно друга. Показано, что поворот бензотиазольного фрагмента относительно диметиламинонензольного кольца молекулы ThT вокруг С-С связи играет ключевую роль в процессах релаксации возбужденного состояния. Описано, как процесс переноса заряда в молекуле определяет сверхбыструю дезактивацию возбужденного состояния ThT при изменении вязкости микроокружения. Представлены характерные значения скорости нерадиационных процессов релаксации и времени жизни возбужденного состояния молекулы ThT, которые определяют квантовый выход флуоресценции ThT. Описано влияние вязкости микроокружения на фотофизические свойства ThT, включая зависимость интенсивности и

среднего времени жизни флуоресценции от ограничения вращательной подвижности молекулы.

Особое внимание уделено изменению фотофизических параметров молекулы ThT при образовании комплекса с амилоидными фибриллами. Описаны основные гипотезы, объясняющие усиление флуоресценции ThT в результате данного взаимодействия, включая ограничение вращательной подвижности молекулы и изменение локального микроокружения. Рассмотрены возможные моды встраивания ThT в фибриллярные структуры, такие как межмолекулярные взаимодействия с β -листами и специфическое связывание с гидрофобными участками с высокой константой комплексообразования, а также неспецифическое взаимодействие с поверхностными сайтами связывания. Выявлено, как изменяются фотофизические свойства ThT при образовании комплекса с белковыми макромолекулами, и описаны механизмы их взаимодействия, включая электростатическое и гидрофобное взаимодействие.

Представлены основные методы и подходы, используемые для исследования формирования комплекса ThT с фибриллами. Описаны современные экспериментальные и теоретические подходы, направленные на изучение динамики взаимодействия ThT с биомолекулами. Таким образом, данная глава не только охватывает ключевые аспекты фотофизики молекулы тиофлавина Т и ее взаимодействия с биомолекулами, но и демонстрирует новые возможности для исследований в области биофизики и медицины, включая разработку новых методов диагностики образования фибрилл и изучения механизмов белковой агрегации.

1.1 Структура и свойства тиофлавина Т(ThT)

Тиофлавин Т (ThT) является широко используемым флуоресцентным красителем для детектирования и исследования процесса формирования амилоидных фибрилл и изучения агрегации белков (рис.2). Молекулярная структура и физико-химические свойства молекулы ThT имеют фундаментальное значение для понимания ее уникального фотофизического поведения, определяющего применение ThT в биофизических исследованиях. Структура ThT состоит из двух основных фрагментов: бензотиазольного и диметиламинонбензольного кольца, соединенных C-C связью (рис.2) [26]. Молекула ThT характеризуется наличием постоянного положительного заряда, локализованного на атоме азота в составе бензотиазольного кольца, что обеспечивает ее высокую растворимость в водных средах[14].

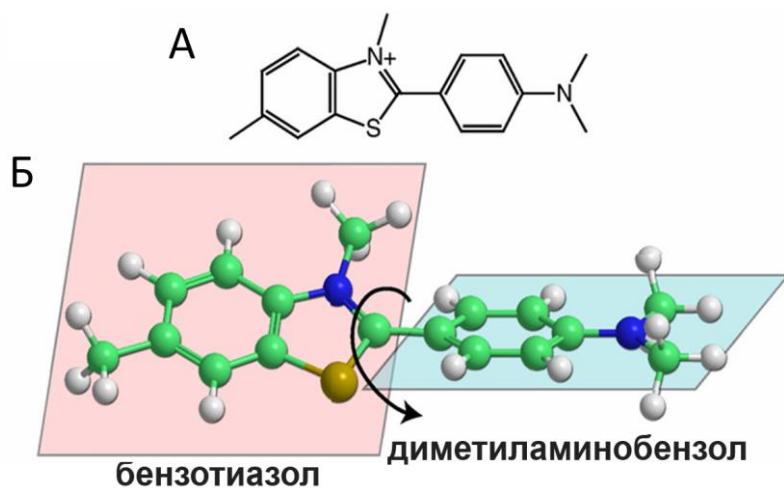


Рисунок 2. А) Структура тиофлавина Т (C₁₇H₁₇N₂S). Б) Трехмерная молекулярная модель тиофлавина Т. Стрелками указано, как происходит поворот бензотиазольного относительно диметиламинонбензольного кольца при фотовозбуждении [26].

Амилоидные фибриллы – нитевидные белковые агрегаты, достигающие от 7-5 нм в диаметре и от сотен нанометров до единиц микрометров в длину [27] (рис.3). Формирование амилоидных фибрилл является распространенной формой явления агрегации белков и связано с нарушением биологических функций белков, возникновением и прогрессированием ряда патологий [28–

33]. Образование и накопление таких структур наблюдается при более чем 30 заболеваниях человека, среди которых амилоидный латеральный склероз, болезнь Альцгеймера, Паркинсона, болезнь Хантингтона, диабет и т.д. [34–37]. Агрегация белков является сложным процессом, приводящим к образованию множества комплексов с различной структурой и морфологией. Фибриллярные белковые агрегаты образуются как промежуточные и конечные продукты процесса агрегации. Белки образуют фибриллы в результате процесса агрегации при различных внешних воздействиях [38]. Широко известным фактом является то, что фибриллы могут быть сформированы из абсолютно различных по структуре белков, при этом они обладают схожей геометрией [39]. Таким образом, детектирование амилоидных фибрилл и мониторинг процесса их формирования представляют собой важную задачу в области биофизики, физической химии и медицины.

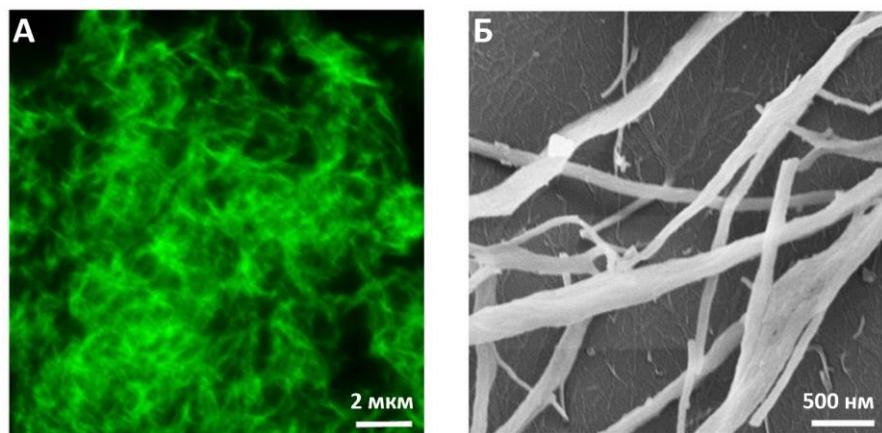


Рисунок 3. Изображение амилоидных фибрилл, окрашенных ThT, полученное с помощью флуоресцентной микроскопии (А) и атомно-силовой микроскопии (Б) [40].

Активный поиск терапевтических стратегий, направленных на борьбу с образованием фибрилл, требует глубокого понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе данного процесса. В связи с этим изучение кинетики формирования фибрилл приобретает особую значимость, поскольку позволяет выявить факторы, влияющие на их скорость и механизмы их роста. Использование молекулы ThT позволяет не только визуализировать процесс

формирования фибрилл, но и количественно оценивать динамику их образования благодаря изменению флуоресцентных свойств красителя при встраивании в белковые агрегаты. Таким образом, исследование кинетики формирования фибрилл с применением ThT способствует не только расширению фундаментальных знаний о механизмах агрегации, но и открывает новые возможности для разработки терапевтических подходов, направленных на ингибирование или модуляцию этого процесса.

1.2 ThT как флуоресцентный молекулярный ротор: фотофизические свойства и их чувствительность к изменениям параметров микроокружения

Одной из ключевых особенностей ThT является его принадлежность к классу флуоресцентных молекулярных роторов (ФМР). К ФМР относят молекулы, флуоресцентные свойства которых демонстрируют выраженную зависимость от вязкости микроокружения [41], что обусловлено влиянием структурных перестроек в возбужденном электронном состоянии (таких как цис-транс изомеризация, внутримолекулярные вращения и деформации) с процессами безызлучательной релаксации. Фотофизическое поведение ФМР определяется конкуренцией между двумя каналами дезактивации: радиационным переходом, сопровождающимся испусканием фотона, и нерадиационным переходом, связанным с внутримолекулярным вращением, приводящим к релаксации в основное состояние. Расширенная диаграмма Яблонского для молекулярных роторов иллюстрирует особенности фотофизических процессов, характерных для данного класса соединений (рис.4). Подобно другим классам флуорофоров, молекулярный ротор переходит из основного состояния (S_0) в первое возбужденное состояние (S_1) посредством поглощения фотона. При этом внутренняя конверсия и

взаимодействие с окружающей средой молекулы приводят к частичной потере энергии и формированию локально возбужденного состояния (locally excited state, LE). Молекулярная структура типичных ФМР состоит из донорной и акцепторной групп, соединенных сопряженной системой, которые могут вращаться друг относительно друга. В то время как в состоянии S_0 молекула находится в плоской конформации, из LE состояния она переходит в состояние со скрученной геометрией с внутримолекулярным переносом заряда (torsional intramolecular charge transfer, TICT). В состоянии TICT энергия возбужденного состояния (S_1) ниже, а энергия основного состояния (S_0) выше, чем в состоянии LE. Это приводит к уменьшению энергетического зазора S_1-S_0 в состоянии TICT и, соответственно, к уменьшению энергии релаксации. Для ряда ФМР, например, 4-(диметиламино)бензонитрил (DMABN), в спектрах флуоресценции которого наблюдается два характерных максимума, энергетический зазор в состоянии TICT несколько меньше, чем в состоянии LE (рис.4 А). Если же энергетический зазор S_1-S_0 в состоянии TICT значительно меньше, чем в состоянии LE (как, например, у (9-(2,2-дициановинил)юлолидина (DCVJ) или ThT), происходит безызлучательная релаксация из состояния TICT (рис.4 В). Следует отметить, что данная диаграмма не учитывает процессы интеркомбинационной конверсии, поскольку триплетные состояния не оказывают существенного влияния на флуоресцентные свойства ФМР. Скорость формирования TICT-состояния является определяющим фактором, влияющим на относительную интенсивность двух полос флуоресценции и квантового выхода флуоресценции ФМР, и существенно зависит от параметров микроокружения красителя, таких как вязкость, pH и др.

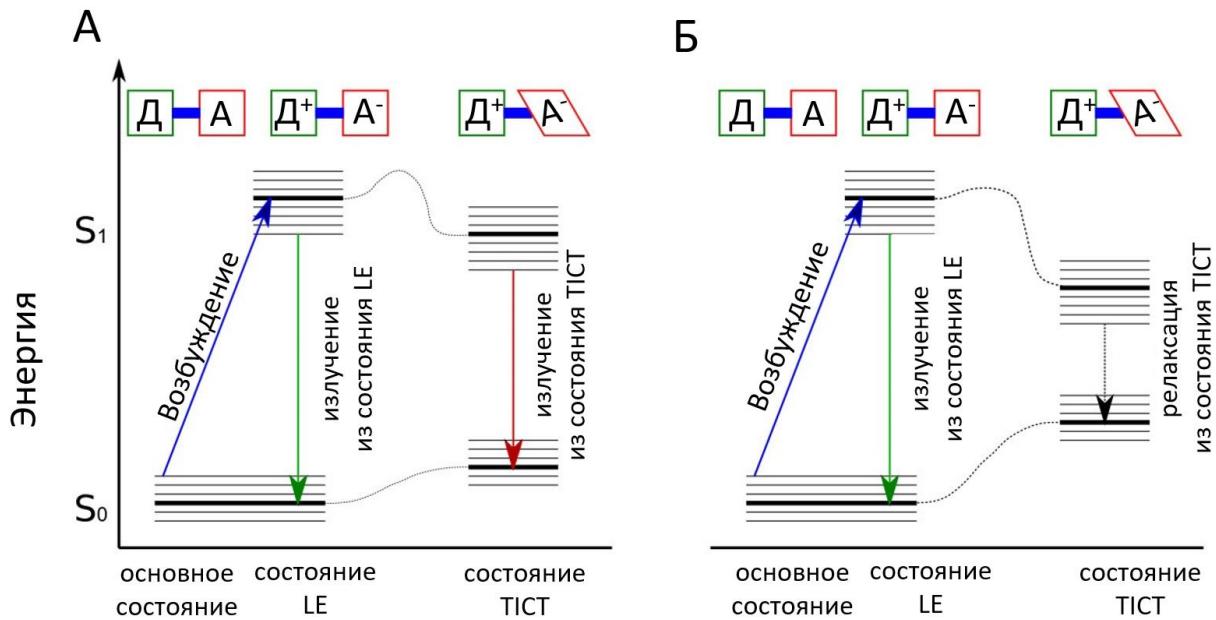


Рисунок 4. Диаграмма Яблонского, иллюстрирующая процессы, происходящие в ФМР, для двух случаев: (А) излучательный переход и (Б) безызлучательная релаксация. На схеме представлены основные электронные состояния: основное состояние (S_0), первое возбужденное состояние (S_1), локально возбужденное состояние (LE) и состояние со скрученной геометрией с внутримолекулярным переносом заряда (TICT). На схеме сверху схематично показано изменение заряда и положения донорной (Д) и акцепторной (А) групп ФМР. Показаны возможные пути деактивации возбуждённого состояния, включая переход в состояние TICT, флуоресценцию и внутреннюю конверсию [41].

Квантовый выход q и время жизни флуоресценции τ определяются радиационными и нерадиационными процессами в ФМР:

$$q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2)$$

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}, \quad (3)$$

где k_r и k_{nr} – скорости радиационных и нерадиационных переходов, соответственно, зависимость которых от вязкости локального окружения ФМР будет более подробно рассмотрена в разделе 1.4 на примере молекулы ThT. Изменения указанных параметров предоставляют возможность

количественной оценки модификаций свойств микроокружения посредством анализа величин q и τ . Так, взаимосвязь между квантовым выходом флуоресценции ФМР и вязкостью растворителя может быть описана уравнением Ферстера-Хофмана :

$$\log(q) = C + a \cdot \log(\eta), \quad (4)$$

где η – вязкость растворителя, a – константа, зависящая от свойств ФМР. Для ThT эта зависимость справедлива в широком диапазоне вязостей, что делает его эффективным датчиком вязкости локального микроокружения [42]. Так, увеличение вязкости в водном растворе глицерина в 50 раз приводит к росту квантового выхода флуоресценции ThT в 16 раз (рис. 5).

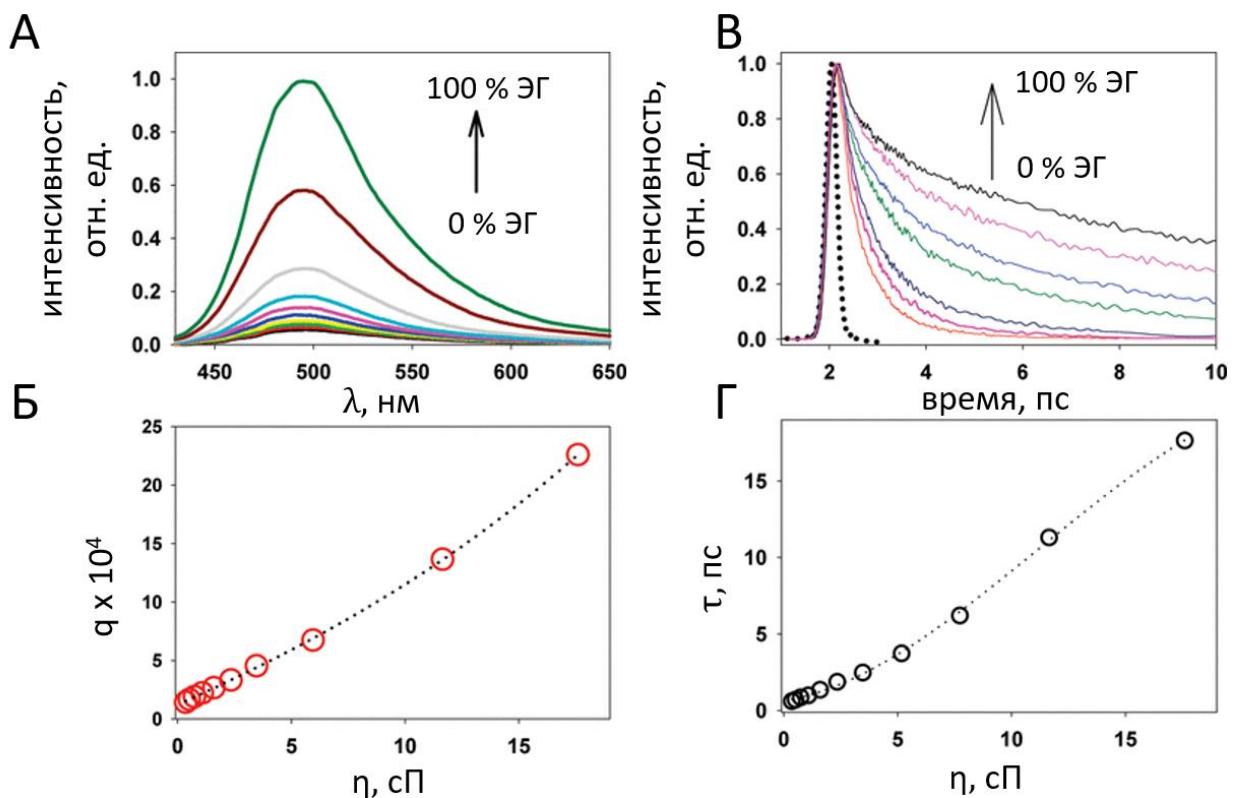


Рисунок 5. Изменение спектров (А) и квантового выхода флуоресценции (Б) ThT при увеличении вязкости растворителя при изменении концентрации этиленгликоля (ЭГ). Изменение кинетики затухания (В) и среднего времени жизни (Г) флуоресценции ThT при увеличении вязкости растворителя при изменении концентрации этиленгликоля (ЭГ) [42].

Время жизни возбужденного состояния τ ФМР также существенно зависит от вязкости η микроокружения:

$$\tau = A \cdot \eta^\alpha, \quad (5)$$

где A – константа, зависящая от молекулярных параметров, таких как объем вращающейся молекулы, температура, вязкость микроокружения молекулы, скорости радиационного и нерадиационного перехода; α – показатель степени вязкости, принимающий значения в диапазоне 0.2-1.0, где максимальное значение соответствует сферическим молекулам в вязкой среде согласно теории Дебая-Стокса-Эйнштейна, уменьшение этого значения связано с несферичностью молекул, локальной неоднородностью среды, специфическими взаимодействиями флуорофора с растворителем и другими факторами [43]. Среднее время ThT также возрастает в 30 раз в 100 % растворе глицерина по сравнению с водой (рис.5).

Изменения квантового выхода флуоресценции q и времени жизни возбужденного состояния τ ФМР представляют собой высокочувствительный метод для регистрации и картирования локальной микроповязкости η в гетерогенных системах [44,45] (рис. 6). Метод флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy) позволяет проводить измерения τ с высоким пространственным разрешением, что делает его эффективным инструментом для визуализации и анализа микроповязкости в живых клетках и тканях [46]. ФМР также находят применение в качестве сенсоров для измерения вязкости в мембранных [47], для мониторинга процесса полимеризации [48], как зонды для изучения бимолекулярных взаимодействий (в частности белок-пептид) [49], а также детектирования амилоидных фибрилл [6], белков и ДНК [50,51].

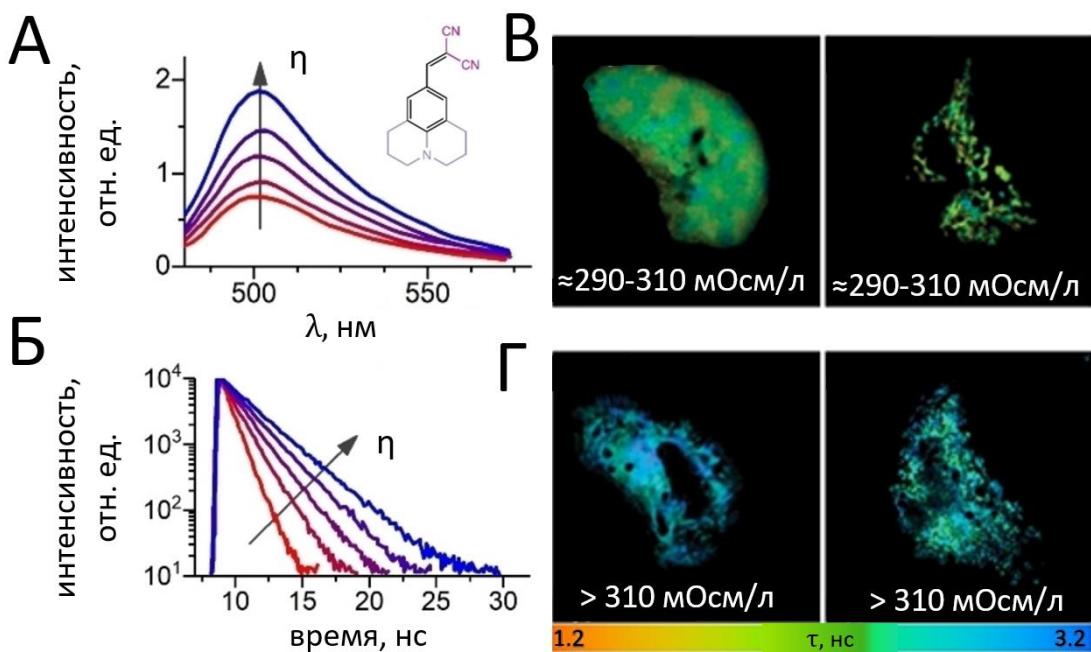


Рисунок 6. Изменение спектров (А) и кинетик затухания флуоресценции ФМР (Б) 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацена, представленного на панели А, в растворах с различной вязкостью η . В, Г) FLIM изображение клетки, окрашенной ФМР, в изотонических условиях, когда осмотическое давление равно внутриклеточному и составляет $\approx 290\text{--}310$ мОсм/л, а также в условиях увеличенной вязкости в гипертонической среде, когда осмотическое давление выше внутриклеточного и составляет > 310 мОсм/л (Г) [52].

1.3 Пространственная структура и электронные переходы в молекуле тиофлавина Т

Подобно другим ФМР, фотофизические свойства тиофлавина Т зависят от пространственной структуры молекулы и особенностей ее локального микроокружения. В результате квантово-химических расчетов было показано [53], что в основном состоянии молекула ThT обладает скрученной конформацией, в которой бензотиазольное и диметиламинобензольное кольца ориентированы под углом примерно от 33° до 37° относительно друг друга (рис.7). Наличие неплоской конформации молекулы ThT в основном состоянии объясняется отталкиванием электронных оболочек атомов

водорода в составе кольца бензотиазола и атомов метиловой группы при атоме азота в составе кольца диметиламиноbenhозла. Энергетический барьер для вращения фрагментов молекулы при этом довольно низок и составляет примерно 1-2 ккал/моль (0.043–0.087 эВ) [42,54]. При электронном возбуждении молекула стремится принять более плоскую геометрию, что усиливает сопряжение между ее фрагментами. Такое конформационное изменение имеет решающее значение для понимания механизма флуоресценции ThT, поскольку оно включает образование как локального возбужденного состояния LE, так и состояния с переносом заряда TICT [55]. LE состояние формируется в результате структурных (колебательных) и релаксационных процессов из неравновесного состояния Франка-Кондона и характеризуется скоростью $k_{\text{rel-LE}}$. Электронная структура ThT представляет собой донорно-акцепторную систему, в которой диметиламиногруппа выступает в качестве донора электронов, а бензотиазольное кольцо – в качестве акцептора электронов. Такое расположение способствует образованию состояния переноса заряда при возбуждении, на которое существенно влияет локальное микроокружение [56]. Таким образом, в возбужденном состоянии LE происходит конформационная перестройка геометрии молекул ThT, которая сопровождается поворотом колец молекулы относительно друг друга, определяющегося скоростью $k_{\text{LE-TICT}}$ [57] (рис.7). В ситуациях, когда переход $\text{LE} \rightarrow \text{TICT}$ является основным путем дезактивации LE-состояния, скорость данного процесса может быть оценена как $K_{\text{LE-TICT}} \approx 1/\tau_{\text{LE}}$. Минимум потенциальной энергии синглетного возбужденного состояния S_1 соответствует углу поворота фрагментов молекулы 90° . Следовательно, при фотовозбуждении молекула из радиационного локально возбужденного состояния LE с углом поворота 37° переходит в нерадиационное TICT-состояние с углом поворота 90° [14,59]. Изменение угла вращения от 37° до 90° кольца бензотиазола относительно

диметиламинообензола (рис.6) является преобладающим механизмом, ответственным за низкий квантовый выход флуоресценции тиофлавина Т в растворителях с низкой вязкостью. Потенциальная энергия основного состояния S_0 уменьшается на $\sim 1500 \text{ см}^{-1}$ (0.186 эВ) при уменьшении угла поворота. Кроме того, значительно меняется сила осциллятора f перехода $S_1 \rightarrow S_0$ при скручивании ThT ($f \sim 1$ при $\varphi = 37^\circ$ и $f \sim 0$ при $\varphi = 90^\circ$), что указывает на переход из флуоресцентного $\text{LE}(S_1)$ в нефлуоресцентное состояние $\text{TICT}(S_1')$. Торсионный угол φ между фрагментами ThT можно рассматривать как координату реакции для перехода $\text{LE} \rightarrow \text{TICT}$. Скорость дезактивации TICT-состояния может быть оценена $K_{\text{TICT}-S_0} = 1/\tau_{\text{TICT}}$.

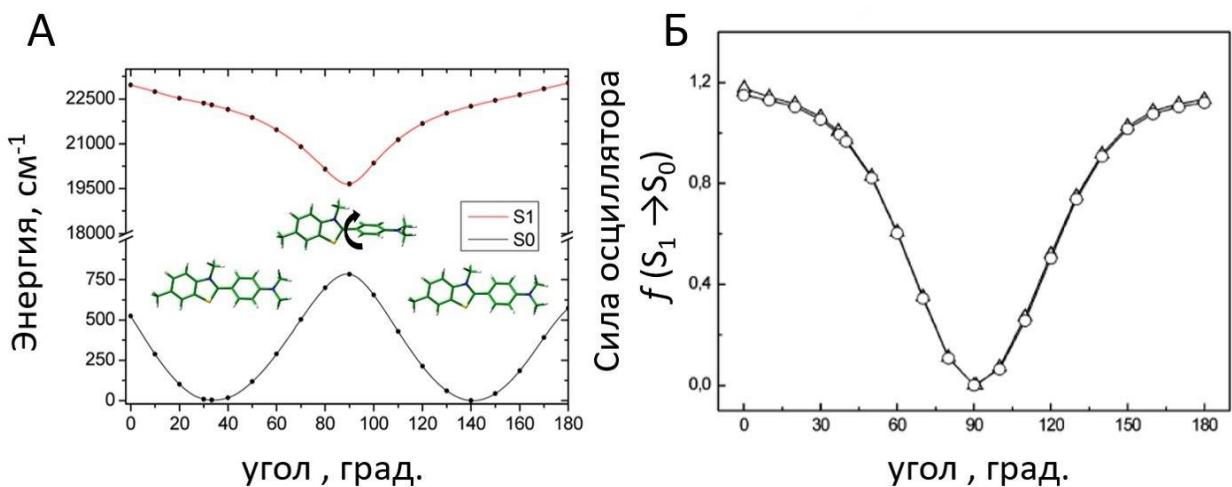


Рисунок 7. А) Кривые потенциальной энергии основного S_0 и первого возбужденного S_1 состояний ThT и Б) сила осциллятора как функция угла поворота фрагментов молекулы [59].

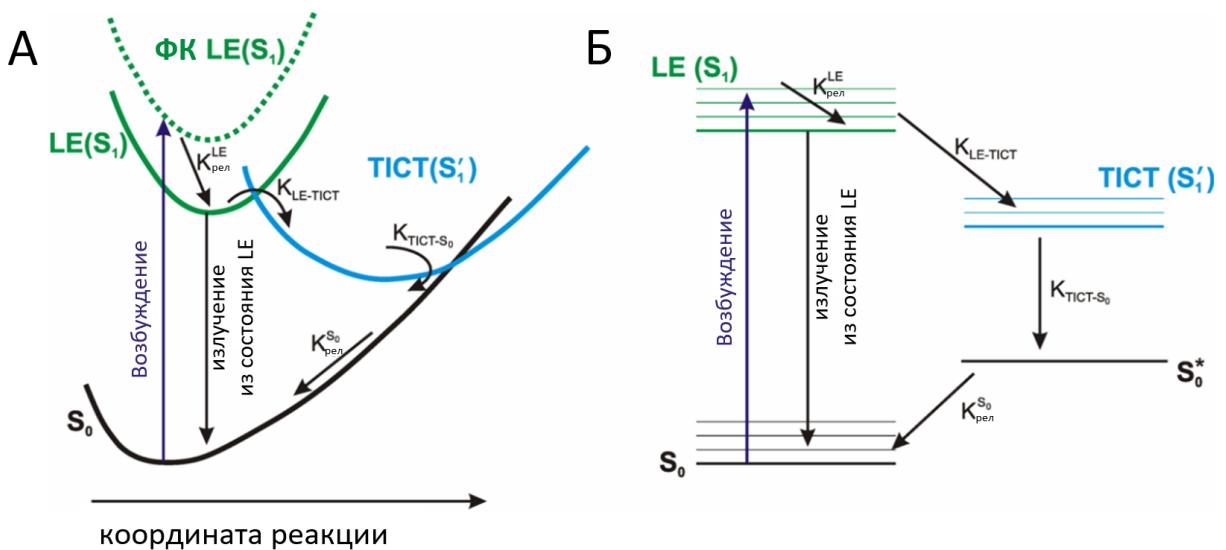


Рисунок 8. Электронная структура и переходы в молекуле тиофлавина Т. (А) Диаграмма электронных переходов в зависимости от координаты реакции; (Б) Схематическое представление энергетических уровней [55].

Возможность вращения колец молекул ThT, или, иными словами, скорость перехода $k_{LE-TICT}$, определяется вязкостью и жесткостью их микроокружения. При бесконечно высокой вязкости следует ожидать, что квантовый выход флуоресценции ThT должен стремиться к единице. Однако показано, что для ThT при бесконечно большой вязкости квантовый выход флуоресценции существенно меньше единицы и равен 0.28, что является следствием неплоской конформации молекул ThT в основном состоянии [60]. Учитывая, что даже в основном состоянии угол ϕ между бензотиазольным и диметиламинобензольным фрагментами не равен нулю, значение квантового выхода q и времени жизни флуоресценции τ могут быть выражены следующим образом:

$$q = \frac{k_{S^1-S^0}}{k_{S^1-S^0} + k_{LE-TICT} + k_{LE^0}}; \quad (6)$$

$$\tau = \frac{1}{k_{S^1-S^0} + k_{LE-TICT} + k_{LE^0}}, \quad (7)$$

где $k_{S_1-S_0}$ – скорость радиационного перехода, $k_{LE-TICT}$ – скорость нерадиационного перехода в TICT состояние с $\varphi=90$ (270) $^\circ$, k_{LE_0} – скорость нерадиационного перехода из LE состояния при $T\rightarrow 0$, $\eta\rightarrow\infty$, т.е. когда $k_{LE-TICT} = 0$

1.4 Влияние вязкости на параметры нерадиационных процессов релаксации возбуждения в молекуле ThT

Вязкоупругие свойства микроокружения оказывают значительное влияние на вращательно-колебательную динамику молекулы тиофлавина Т, что, в свою очередь, приводит к изменению эффективности нерадиационных процессов релаксации, включая внутреннюю конверсию и пересечение потенциальных поверхностей возбужденного и основного состояний. Указанные процессы находятся в прямой зависимости от локальных физико-химических свойств среды и играют важную роль в релаксации возбужденного состояния молекулы, определяя ее фотофизические свойства. Исследование параметров релаксации возбужденного состояния ThT, включая скорость релаксации и энергетические барьеры между электронными состояниями, важно для понимания механизмов взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами. Полученные данные позволяют не только оптимизировать применение ThT в качестве флуоресцентного маркера, но и способствуют разработке методов диагностики и анализа фибрилл.

В растворах с низкой вязкостью, таких как вода, фрагменты молекулы ThT в возбужденном состоянии могут подвергаться внутримолекулярному вращению, что приводит к быстрому нерадиационному переходу из возбужденного состояния. Характерное время протекания внутримолекулярного вращения в маловязких растворах находится в пикосекундном и субпикосекундном диапазонах, т.е. сопоставимо с

временным масштабом колебательной релаксации молекулы. Увеличение вязкости среды более чем в два раза приводит к значительному изменению времени жизни локально возбужденного LE состояния молекулы ThT, увеличиваясь с 1.3 пс в воде до 12 пс в бутаноле [55]. Время жизни возбужденного состояния TICT демонстрирует еще более выраженную зависимость от вязкости, увеличиваясь с 4 пс в воде до 360 пс в бутаноле. В маловязких средах переход $LE \rightarrow TICT$ является основным путем дезактивации LE-состояния. Скорость $k_{LE-TICT}$ примерно в 1000 раз больше скорости радиационного перехода из LE-состояния $k_{S_1-S_0}$. Скорость перехода из локально возбужденного LE-состояния в TICT-состояние была экспериментально установлена в работах [61,62] с применением метода ап-конверсии флуоресценции, что позволило получить детальную информацию о динамике данного процесса (таблица 1). Скорость релаксации из возбужденного TICT-состояния в основное состояние S_0 была количественно определена в исследовании [55] посредством анализа временной эволюции спектров поглощения возбужденного состояния ThT, зарегистрированных в фемтосекундном временном масштабе в маловязких растворителях, таких как вода, этанол, пропанол и др. Скорость дезактивации TICT-состояния ThT в воде составляет $0.26 \times 10^{12} \text{ с}^{-1}$ (таблица 1). Из таблицы 1 видно, что обе скорости $k_{LE-TICT}$ и k_{TICT-S_0} значительно зависят от вязкости растворителя. Например, увеличение вязкости в 2.5 раза – от 1.1 сП в этаноле до 2.7 сП в бутаноле – приводит к -трехкратному уменьшению скорости $k_{LE-TICT}$ от $2.2 \cdot 10^{11}$ до $8.5 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$ и ~13-кратному уменьшению скорости k_{TICT-S_0} от $3.6 \cdot 10^{10}$ до $2.8 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$ [55].

Существенное влияние вязкости микроокружения на фотофизические свойства ThT свидетельствует о том, что внутримолекулярные процессы, связанные с прямым ($LE \rightarrow TICT$) и обратным ($TICT \rightarrow S_0$) переносом заряда, сопровождаются значительными изменениями геометрической структуры

молекулы красителя. Вязкость среды не является единственным фактором, определяющим кинетику перехода LE → TICT [55]. Наряду с вязкостью, ключевое влияние на фотофизические процессы в молекуле ThT оказывают полярность микроокружения и его способность к образованию водородных связей, что подчеркивает комплексный характер взаимодействий между молекулой ThT и микроокружением. Чувствительность $k_{\text{TICT}-S_0}$ к изменению вязкости может также свидетельствовать о том, что координаты реакции процесса дезактивации состояния TICT могут быть связаны не только со скручиванием, как в случае перехода LE → TICT (рис. 7), но и с изгибом молекулы.

Таблица 1. Параметры скоростей $k_{\text{LE-TICT}}$ и $k_{\text{TICT}-S_0}$ нерадиационных процессов в зависимости от вязкости η микроокружения ThT.

Растворители	η , сП	$k_{\text{LE-TICT}}$ (s^{-1})	$k_{\text{TICT}-S_0}$ (s^{-1})	Ссылка
вода	0.9	7.69×10^{11} (а)	2.63×10^{11} (а)	[63]
этанол	1.1	2.17×10^{11} (а)	3.57×10^{10} (а)	[55]
1-пропанол	1.9	1.43×10^{11} (б)	-	[55]
2-пропанол	2.1	1.56×10^{11} (а)	1.43×10^{10} (а)	[61]
1-бутанол	2.7	7.69×10^{10} (в)	2.78×10^9 (а)	[55]
		8.47×10^{10} (а)	-	[61]
1-пентанол	3.5	4.76×10^{10} (в)	-	[55]

(а) $\lambda_{\text{воз}} = 390$ нм; $\lambda_{\text{фл}} = 490$ нм; (б) $\lambda_{\text{воз}} = 395$ нм; $\lambda_{\text{фл}} = 510$ нм; (в) $\lambda_{\text{воз}} = 395$ нм; $\lambda_{\text{фл}} = 490$ нм.

Рассмотрим упрощенную модель, в которой вращение фрагментов молекулы относительно друг друга от 37° до 90° (бензотиазольного относительно диметиламинобензольного кольца) является основным механизмом ответственным за нерадиационные процессы, происходящие в

молекуле ThT [62]. Время ротационной релаксации τ_{rot} может быть описано, как

$$\tau_{rot} \cong \frac{\Delta\theta}{\Omega}, \quad (8)$$

где Ω - угловая скорость вращения фенольного кольца. Изменение угла поворота фенольного кольца между двумя состояниями, $\Delta\theta$, составляет примерно 1 рад, поэтому $\tau_{rot} = 1/\Omega$. Угловая скорость вращения Ω фенольного кольца может быть записана как момент кручения, умноженный на угловую подвижность, μ :

$$\Omega = \frac{\partial E}{\partial \theta} \cdot \mu, \quad (9)$$

где $\partial E / \partial \theta$ – производная потенциальной энергии по углу вращения. Эта величина может быть рассчитана из энергии возбужденного состояния $E(S_1)$ для поворота от 37^0 до 90^0 , представленной рис. 6, и имеет значение ~ 200 мэВ (~ 1600 см $^{-1}$). Угловая подвижность, μ , может быть записана через соотношение Эйнштейна подобно тому, как это делается для поступательной подвижности заряженных частиц:

$$\mu = \frac{D_r}{KT}, \quad (10)$$

где k – постоянная Больцмана, T - абсолютная температура, D_r – коэффициент вращательной диффузии. Если считать, что движение фрагмента ThT ограничено одной осью вращения, то вращательная диффузия может быть выражена через:

$$2 D_r = \frac{KT}{\eta V}, \quad (11)$$

где η – вязкость растворителя, а V – объем врачающейся сферы.

Таким образом, можно выразить время ротационной релаксации τ_{rot} как

$$\tau_{rot} = \frac{1}{\frac{\partial E}{\partial \theta} \cdot \mu} = \frac{2 \eta V}{\frac{\partial E}{\partial \theta}}. \quad (12)$$

Для вязкости 1 сП, объема вращающегося диметиламинобензольного кольца $\sim 20 \text{ \AA}^3$ и значения момента кручения 200 мэВ/радиан время вращательной релаксации $\sim 10^{-12}\text{s}$, что соответствует скорости вращательной релаксации $k_{LE-TIST} \approx 10 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$. Данний результат демонстрирует хорошее соответствие с экспериментально определённой скоростью $k_{LE-TIST}$ ThT в воде (таблица 1) и является дополнительным доказательством того, что представленная упрощённая полуколичественная модель вращения ThT по принципу молекулярного ротора с хорошей точностью описывает фотофизические процессы в данном ФМР.

1.5 Использование ThT в качестве флуоресцентной метки и параметры его взаимодействия с фибриллами

Тиофлавин Т является одним из наиболее широко используемых флуоресцентных зондов для мониторинга кинетики агрегации и формирования фибрилл в режиме реального времени как *in vitro*, так и в живых системах [64–67]. Существует большое число работ, посвященных процессу взаимодействия флуоресцентного зонда ThT с фибриллами. В данных работах изучается то, какую геометрию принимает молекула ThT при встраивании в фибриллы, а также локализация специфических участков взаимодействия ThT с белковыми структурами – сайтов связывания. Эти участки характеризуются уникальной структурной организацией и физико-химическими свойствами, которые не только определяют характер взаимодействия ThT с фибриллами, но и влияют на его фотофизические характеристики. Субпопуляции молекул ThT, связанные с такими участками и обладающие схожими фотофизическими характеристиками, мы далее будем называть модами связывания. В ходе

исследований процесса формирования комплекса ThT с фибриллами также определяются константы связывания, анализируются изменения спектральных характеристик зонда, включая сдвиги в спектрах поглощения и флуоресценции, а также изучается кинетика изменения среднего времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT в процессе агрегации белков. Полученные данные содержат важную информацию о динамике взаимодействия зонда с фибриллами и об особенностях структурной организации фибриллярных структур.

Удобным инструментом для изучения и детектирования процесса агрегации ThT делает то, что его оптические свойства при образовании комплекса с фибриллами меняются заметным образом. В водных растворах молекула ThT демонстрирует максимум поглощения в диапазоне 412–416 нм (рис. 8 А, синяя линия) и максимум флуоресценции в диапазоне 480–490 нм (рис. 8 Б) [68]. Однако квантовый выход флуоресценции ThT в воде крайне низок ($\sim 0,0001$), что объясняется значительной степенью свободы вращения структурных элементов молекулы. При связывании ThT с фибриллами максимум спектра его поглощения смещается в сторону больших длин волн (в область 445 нм, рис. 8 А, красная линия), интенсивность флуоресценции при этом возрастает (рис. 8 Б, красная линия)[68]. Спектральный сдвиг поглощения может быть объяснен изменением локального микроокружения зонда. Исследования, проведенные в растворителях с различной полярностью, показали, что длинноволновый сдвиг в спектрах поглощения ThT коррелирует со снижением полярности среды [69]. Данное наблюдение позволяет предположить, что уменьшение полярности является одним из ключевых факторов, определяющих изменение фотофизических свойств ThT при его встраивании в фибриллы [63,70]. При этом следует учитывать, что полярность поверхности амилоидных фибрилл может варьироваться в зависимости от их структурных особенностей, что оказывает существенное влияние на процесс

связывания ThT. Например, исследования с использованием двухканальной флуоресцентной визуализации показали, что распределение ThT и гидрофобных красителей, таких как нильский красный, вдоль фибрилл является неоднородным. Это свидетельствует о наличии на поверхности фибрилл как полярных, так и неполярных доменов, которые могут модулировать взаимодействие с флуоресцентными зондами [71]. Таким образом, изменение спектральных свойств ThT при связывании с фибриллами может служить индикатором не только наличия амилоидных структур, но и особенностей их поверхностной организации.

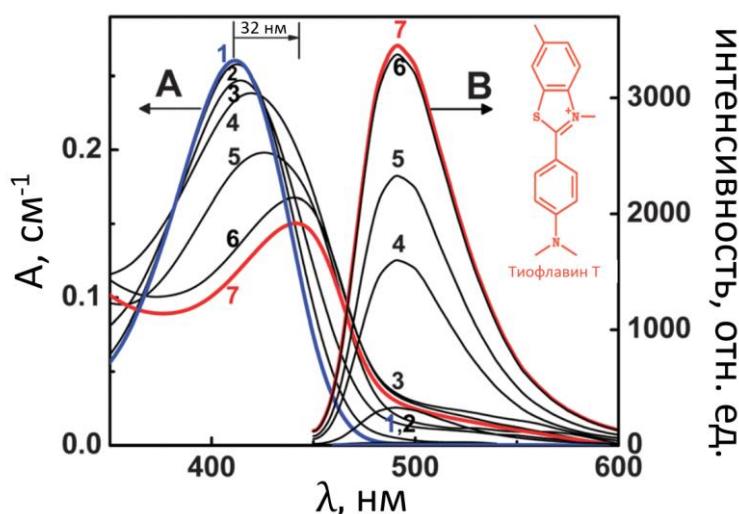


Рисунок 9. (А) Спектры поглощения тиофлавина Т при переходе от свободного состояния к связанному в процессе фибриллообразования. Синяя линия соответствует спектру поглощения ThT в воде. По мере формирования фибрилл наблюдается длинноволновый сдвиг максимума спектра поглощения на величину ~32 нм. (Б) Спектры флуоресценции ThT, измеренные в процессе фибриллообразования. Красная линия соответствует спектру флуоресценции ThT на финальной стадии формирования фибрилл [68].

Другим важным фактором, определяющим фотофизические свойства ThT, является уровень pH. Снижение pH приводит к протонированию диметиламиногруппы в молекуле ThT, тогда как при повышенных значениях pH происходит гидроксилирование бензотиазольного фрагмента. Оба эти процессы способны оказывать влияние на вращательную подвижность

фрагментов молекулы ThT [72], а также на его способность образовывать комплексы с амилоидными фибриллами. В исследовании [73], основанном на методе равновесного микродиализа, было установлено, что по мере снижения pH количество молекул ThT, связывающихся с фибриллами, возрастает. Таким образом, образование комплекса ThT-фибриллы сильно зависит от pH и ионной силы микроокружения [74]. Влияние электростатического взаимодействия на фотофизические характеристики ThT также рассматривалось в работах [75,76]. Было выдвинуто предположение, что электростатическое отталкивание между фибриллами, содержащими положительно заряженные аминокислотные остатки, и молекулами ThT может вызывать снижение интенсивности флуоресценции зонда. В исследовании [77] выявлена зависимость между флуоресценцией ThT и электростатическим зарядом на поверхности фибрилл, количественно определяемым через ζ -потенциал (рис. 9). Экспериментальные данные показали, что снижение ζ -потенциала, характеризующего поверхностный заряд на границе фибрилл, образованных белком β -амилоидом, и окружающей среды, способствует увеличению флуоресценции ThT. Другими словами, наличие отрицательного поверхностного заряда у фибрилл усиливает взаимодействие с ThT, что приводит к возрастанию интенсивности его флуоресценции.

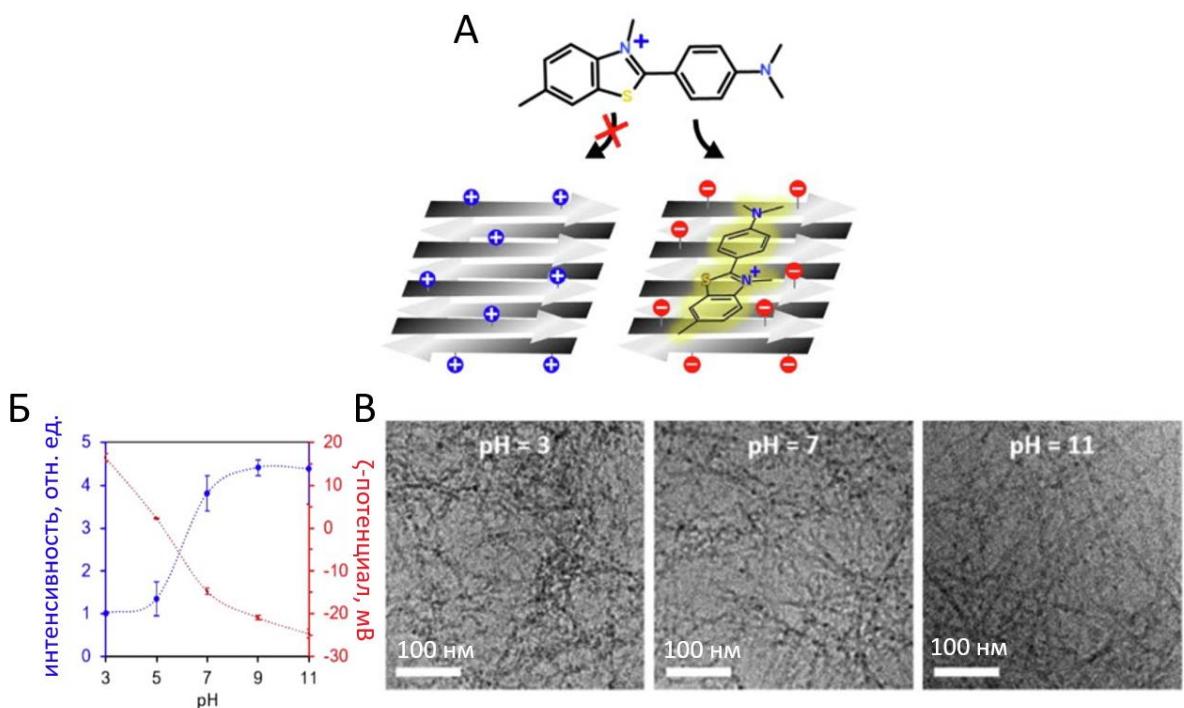


Рисунок 10. А. Влияние электростатических взаимодействий на связывание ThT с поверхностью фибрилл. Электростатическое отталкивание подавляет образование комплекса ThT с фибриллами (слева), тогда как сродство ThT к отрицательно заряженной поверхности фибрилл способствует их взаимодействию и приводит к росту флуоресценции (справа). Б. Зависимость интенсивности флуоресценции ThT при образовании комплекса с фибриллами (синяя кривая) и ζ -потенциала фибрилл β -амилоида (красная кривая) от pH раствора. В. Изображения фибрилл, полученные с использованием криогенной трансмиссионной электронной микроскопии (Cryo-TEM) при различных значениях pH. Масштабные метки составляют 100 нм [77].

Несмотря на то, что ThT активно используется для мониторинга процесса агрегации белков, механизм формирования комплекса с фибриллами и причины наблюдаемых изменений в его фотофизических свойствах в результате этого процесса до сих пор остаются не до конца изученными. Взаимодействие ThT с фибриллами было подробно изучено с помощью различных экспериментальных подходов, что привело к появлению нескольких гипотез, объясняющих наблюдаемое усиление флуоресценции. Например, в работе [12] выдвинуто предположение, что образование эксимера ThT в одном из сайтов связывания влечет за собой значительные изменения в

его спектральных свойствах вследствие электронного взаимодействия между двумя хромофорами. Так, сдвиг максимума флуоресценции в длинноволновую область спектра ~ 560 нм [78] при образовании комплексов с фибриллами был объяснен формированием эксимерного состояния ThT. В результате исследований физико-химических характеристик растворов ThT разной концентрации была также выдвинута гипотеза формирования мицелл красителя при взаимодействии с фибриллами [79]. Была выявлена корреляция между процессом образования мицелл и увеличением флуоресценции ThT. Однако это предположение было опровергнуто методом поляризационно-селективной сканирующей оптической микроскопии ближнего поля при исследовании раствора ThT в присутствии инсулиновых фибрилл [80], даже при концентрациях ThT, превышающих 8 мкМ. В работе [66] с использованием методов рентгеноструктурного анализа было показано, что ThT взаимодействует с фибриллами в форме димера и агрегатов более высокого порядка. Данная гипотеза предполагает, что усиление флуоресценции ThT в фибриллах обусловлено специфическим молекулярным расположением агрегатов ThT в сайтах связывания фибрилл, что также было продемонстрировано в более поздней работе [81]. Общим основанием для выдвижения всех вышеперечисленных гипотез служит наличие значительного красного смещения спектров возбуждения и флуоресценции ThT в присутствие фибрилл. Так в работе [65] продемонстрировано изменение положения максимума спектра возбуждения и флуоресценции ThT, которые для свободного состояния красителя составляют 385 и 445 нм, соответственно, тогда как для комплекса ThT - фибриллы данные параметры составляют 450 нм и 482 нм. Спектральные характеристики ThT в водном растворе, представленные в работе [65], не соответствуют тому факту, что максимум спектра поглощения локализован около 412 нм [63], и, с наибольшей вероятностью, обусловлены наличием флуоресцентных примесей в растворе

ThT. Ещё одним недостатком рассматриваемых гипотез является низкая вероятность димеризации и агрегации ThT вследствие положительного заряда красителя. Было высказано предположение, что электростатическое отталкивание будет препятствовать образованию димеров и мицелл ThT, особенно в неполярном микроокружении при образовании комплексов с фибриллами [14]. Таким образом, самой распространённой гипотезой усиления флуоресценции ThT при образовании комплекса с фибриллами является гипотеза молекулярного ротора [53,69,82,83]. Механизм усиления флуоресценции ThT при встраивании в фибриллы заключается ограничении торсионного поворота бензотиазольного и диметиламинонаптофенольного колец вокруг одиночной C-C связи в возбужденном состоянии ThT.

Другим направлением анализа взаимодействия ThT с фибриллами являются исследования, связанные с определением числа и геометрии сайтов связывания тиофлавина T при образовании комплекса с фибриллами. Знание механизмов и локализации специфических участков взаимодействия ThT с фибриллами, которое, несмотря на его широкое использование в клинических и фундаментальных научных приложениях, в значительной степени остается неизвестным, необходимо для корректного анализа кинетики формирования и структурных характеристик фибрилл, что является целью данной работы. Разработанные на данный момент структурные модели фибриллообразования, в том числе с использованием методов флуоресцентной спектроскопии, позволяют анализировать характеристики мод встраивания зонда. Существующие методы оптической спектроскопии позволяют в режиме реального времени детально исследовать фотофизические характеристики макромолекул, а также изучать взаимодействие разного рода экзогенных зондов с исследуемыми структурами. С использованием стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии, в частности, с использованием лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на

субпикосекундном временном масштабе (ап-конверсии флуоресценции), был произведен ряд важных исследований.

На данный момент существует гипотеза о том, что в фибриллах имеется множество специфических участков взаимодействия с ThT, и актуальной является задача определения фотофизических свойств областей взаимодействия зонда с агрегатами белков (таблица 2). В работе [12] на примере фибрилл из инсулина было обнаружено, что в результате образования комплекса наблюдается две моды встраивания ThT. Для каждой моды встраивания была определена константа комплексообразования ThT-фибриллы K . Определена мода встраивания ThT, характеризующаяся специфическим взаимодействием и высокой константой комплексообразования $K = 17 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, при которой связывается около 0.14 моль ThT на моль мономера белка в фибриллярной форме. Также определена мода с более низкой константой связывания K , составляющей $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, и стехиометрией 0.6 моль ThT на моль мономера белка в форме фибрилл. Таким образом, данное исследование указывает на то, что существует явная разница между общим количеством ThT, встроенным в фибриллы, и количеством связанного ThT с высоким значением квантового выхода флуоресценции. Характеристики мод встраивания молекул ThT различаются и были детально исследованы в ряде работ, посвященных изучению ее свойств при комплексообразовании с фибриллами, сформированными различными белками. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристики мод встраивания ThT при образовании комплекса с разным типом фибрилл: максимум спектра поглощения $\lambda_{\text{погл,макс}} \text{ нм}$, константа комплексообразования K и квантовый выход флуоресценции q_i .

Объект	моды встраивания	$\lambda_{\text{погл, макс}}, \text{нм}$	$K \times 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	q_i	ссылки
фибриллы из Sup35p	1	440	7 ± 10	0.24 ± 0.04	[84]
	2	446	0.21 ± 0.17	0.08 ± 0.03	
фибриллы из лизоцима	1	448	75 ± 11	0.44 ± 0.05	[13,85]
	2	449	0.56 ± 0.08	$(5 \pm 5) \times 10^{-4}$	
фибриллы из инсулина	1	449	200 ± 120	0.83 ± 0.05	[56,86]
	2	451	1.2 ± 0.9	0.30 ± 0.08	
фибриллы из α -синуклеина	1	438+4	0.3 ± 0.3	0.02 ± 0.01	[4]
	2	-	70 ± 10	0.13 ± 0.04	
фибриллы из β -микроглообулина	1	430	0.14 ± 0.07	0.07 ± 0.04	[87]
фибриллы из β -амилоида	1	440	0.2	0.18	[88]
водный раствор ThT	1	412	-	0.0001	[60]

В работах [13,56,86] показано, что при образовании комплекса ThT с фибриллами из инсулина максимум спектра поглощения различается для двух мод встраивания ThT и составляет 449 и 451 нм, квантовый выход флуоресценции зонда при этом в 2.8 раза больше для моды с большей константой K (таблица 2). Стоит отметить, что наличие моды связывания с более высокой константой комплексообразования ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) не характерно для фибрилл из β -микроглобулина [87] (таблица 2). В работе [84] было выдвинуто предположение, что фибриллы, обладающие одним сайтом связывания, представляют собой единичные нитевидные агрегаты, в то время как фибриллы с двумя модами связывания ThT имеют склонность к кластеризации (рис. 11 А, 11 В и 11 Г). Моды связывания ThT с высоким

значением K расположены на интерфейсе между взаимодействующими фибриллами. Ограниченнное число таких мод, вероятно, связано с их труднодоступностью и низкой степенью кластеризации фибрилл. Существование большого количества мод связывания ThT, молекулярная подвижность зонда в которых ограничена, было описано в работе [89]. Было обнаружено три моды связывания ThT при образовании комплекса с фибриллами из β -амилоида, в которые зонд может встраиваться с K (5.5 ± 3.4) $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$, (2.0 ± 1.4) $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$, (1.2 ± 0.8) $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$, что подчеркивает сложность взаимодействия ThT с фибриллярными структурами. Эти данные указывают на важность учёта структурных особенностей фибрилл при интерпретации результатов флуоресцентного анализа с использованием ThT.

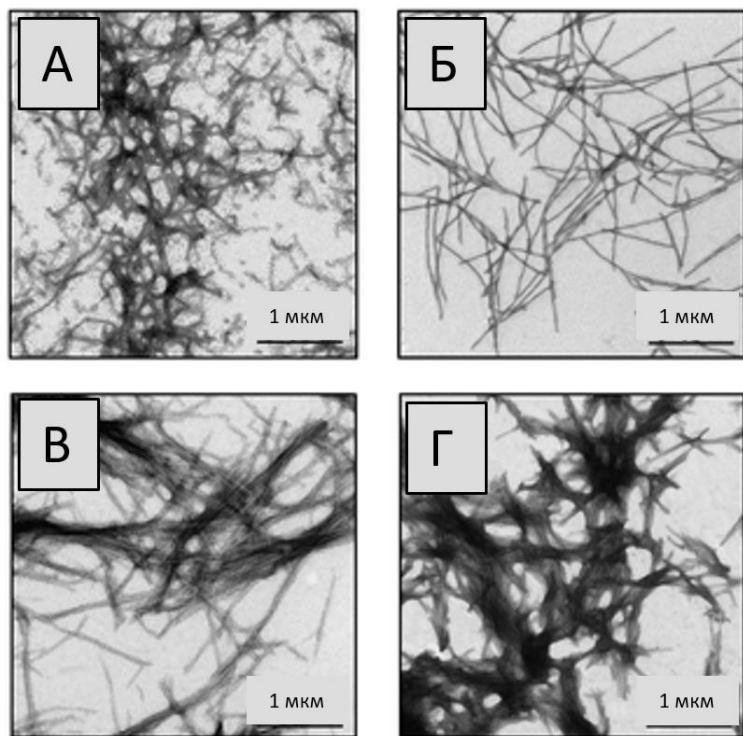


Рисунок 11. Изображения фибрилл из белков (А) Sup35p (К составляет (7 ± 10), (0.21 ± 0.17) $\times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$), (Б) β -микроглобулина (К составляет (4.2 ± 0.3) $\times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$), (В) инсулина (К составляет (200 ± 120), (1.2 ± 0.9) $\times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$), (Г) лизоцима (К составляет (5 ± 11), (0.56 ± 0.08) $\times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$), полученные с помощью электронной микроскопии [84].

Вследствие того, что большая по концентрации субпопуляция связанного тиофлавина Т с низким квантовым выходом является мономерной, моды ThT при образовании комплекса с фибриллами имеют разную скорость конформационной релаксации в возбужденном состоянии и, как следствие, разную скорость безызлучательного перехода k_{nr} (формула 3). Таким образом, измерение времени жизни флуоресценции ThT может помочь охарактеризовать субпопуляции связанного зонда. В работе [90] с использованием метода лазерной кинетической спектроскопии на наносекундном и пикосекундном временном масштабах были продемонстрированы различные оптические свойства мод встраивания ThT, а именно для них было показано различное время жизни флуоресценции – 2 пс и 1.3 нс (рис.12).

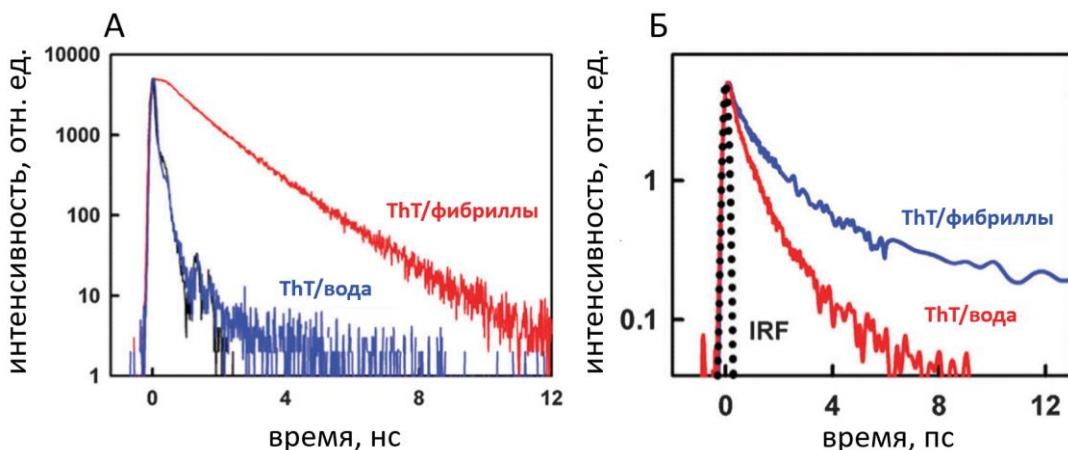


Рисунок 12. (А) Кинетика затухания флуоресценции ThT в воде (синяя кривая) и при образовании комплекса с фибриллами (красная кривая), полученная с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов. Чёрная кривая соответствует функции отклика прибора (IRF); (Б) Кинетика затухания флуоресценции ThT в воде (красная кривая) и при образовании комплекса с фибриллами (синяя кривая), полученная с помощью метода ап-конверсии флуоресценции. Чёрная пунктирная линия соответствует функции отклика прибора (IRF) [90].

Увеличившееся число работ в направлении исследования структурных моделей фибрилл послужило толчком для уточнения модели связывания ThT.

Несмотря на различие в аминокислотной последовательности белков, которые выступают строительными блоками фибрилл, ThT специфично (с высокой константой комплексообразования) связывается с ними, и его фотофизические характеристики при этом меняются схожим образом. Данный факт может свидетельствовать об общности структур, в которые встраивается ThT. Вследствие того, что структура фибрилл в основном состоит из β -листов, которые расположены перпендикулярно длинной оси фибрилл, соединены водородными связями и образуют кросс- β структуру, распространённым мнением является то, что сайты связывания ThT расположены на поверхности поперечных β -структур (рис. 13) [26]. В работах [12,91] было показано, что ThT встраивается посредством гидрофобных взаимодействий параллельно длинной оси фибриллярной структуры в бороздки, сформированные боковыми цепями вторичной структуры белка. Также было показано, что такой сайт связывания состоит из минимум пяти или шести бета-цепей поверхности β -листа [92].

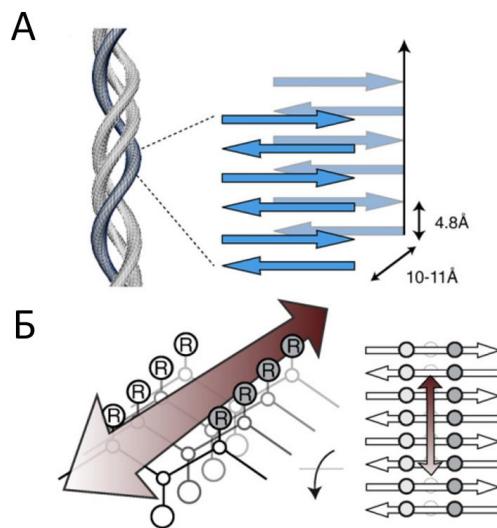


Рисунок 13. (А) – расположение бета-листов (вторичной структуры) и (Б) – расположение сайтов связывания для тиофлавина Т в амилоидных фибриллах [26].

С использованием метода молекулярной динамики было показано, что ThT также способен связываться в экспонированные в растворитель канавки

на поверхности β -листов и на концах удлиненных β -листов [92] (рис.14). Для данного типа связывания характерна более низкая константа комплексообразования $K \sim 10^4 \text{ M}^{-1}$ (таблица 2). Встраивание в поверхностный сайт связывания слабо влияет на скорость вращательной релаксации, время жизни флуоресценции ThT в таком сайте составляет 6 пс, т.е. возрастает незначительно по сравнению со значением данного параметра 1 пс для ThT в водном растворе. Несмотря на это, анализ кинетики процессов на пикосекундном временном масштабе на разных этапах формирования фибрилл, т.е. для агрегатов разной степени ассоциации, а также изучение мод встраивания ThT в такие структуры не производился. Эти аспекты представляют собой важный пробел в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования фибрилл и динамических характеристик данного процесса.

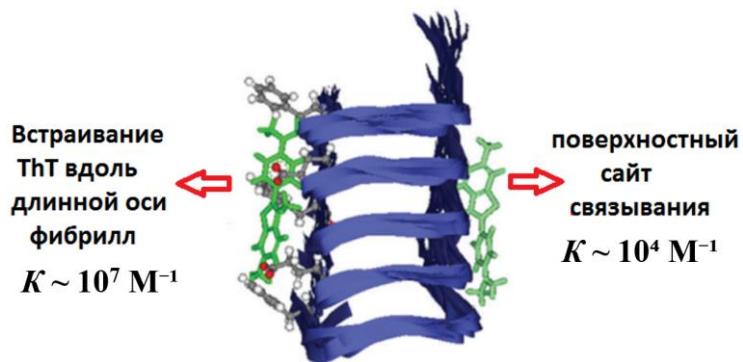


Рисунок 14. Схематическое представление различных мод встраивания ThT в фибриллах [90].

Несмотря на недостаток исследований в области анализа фотофизических свойств разных мод встраивания ThT в фибриллах, данный зонд широко применяется в качестве флуоресцентного маркера кинетики агрегации белка. Анализ изменения флуоресцентных свойств ThT при связывании является одним из наиболее популярных методов изучения механизмов и количественной оценки кинетики формирования фибриллярных наноструктур *in vitro* [26,93]. Анализируя кинетику агрегации белковых

молекул при различных условиях, можно построить модель микроскопических процессов, ответственных за образование амилоидных фибрилл [94]. Этапы, которые проходит белок на пути формирования фибрилл, играют ключевую роль в понимании кинетики и морфологии конечных фибриллярных агрегатов. Кроме того, детальное изучение взаимодействия тиофлавина Т с промежуточными структурами, образующимися в процессе формирования фибрилл, может предоставить ценную информацию о конформационных изменениях белковых молекул при агрегации. Таким образом, изменение интенсивности *Fluo* и среднего времени жизни флуоресценции ThT τ используется в качестве индикатора формирования фибрилл [68]. Согласно принятой модели формирования флуоресцентного отклика ThT, рост интенсивности *Fluo* и времени жизни τ связан с уменьшением скорости нерадиационной релаксации k_{nr} при неизменной скорости радиационной релаксации k_r за счет увеличения жесткости микроокружения, и эти параметры должны меняться синхронно при образовании им комплексов с белками и их агрегатами [6,14]:

$$Fluo \sim \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau \quad (13)$$

Однако при исследовании кинетики образования фибриллярных структур было выявлено, что время жизни флуоресценции τ начинает увеличиваться раньше, чем интенсивность флуоресценции *Fluo* (рис.15), тогда как в модели молекулярного ротора они должны изменяться синхронно [16,68]. Более того, при измерении комплексообразования ThT с белками было показано [16], что выход на плато зависимости времени жизни флуоресценции ThT τ от концентрации белка опережает выход на плато зависимости интенсивности флуоресценции *Fluo*. Для молекул ThT, образующих комплекс с мономерами белков, было получено, что интенсивность флуоресценции ThT возрастает в десятки раз, тогда как время жизни флуоресценции ThT достигает единиц

наносекунд, то есть, возрастает в 1000 раз. Задачей данной работы из области фотофизики ThT являлось исследование несинхронного изменения интенсивности и времени жизни его флуоресценции при образовании комплексов с белками и их агрегатами.

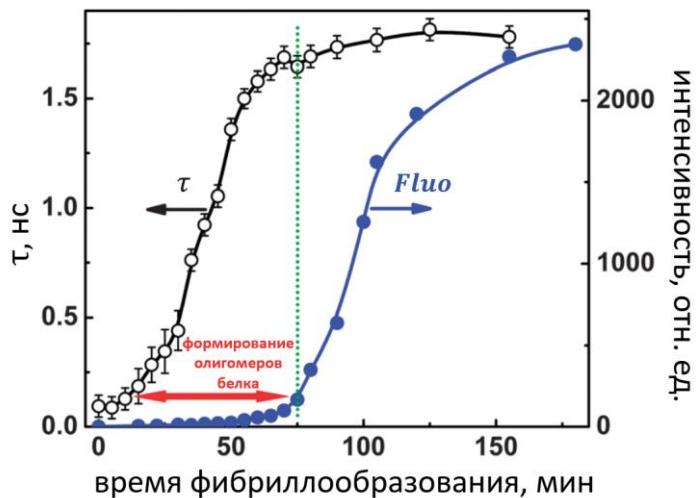


Рисунок 15. Среднее время жизни флуоресценции ThT при формировании фибрилл (черная кривая, $\lambda_{возб} = 406$ нм, $\lambda_{флуо} = 490$ нм). Интенсивность флуоресценции ThT (10 мМ) при формировании фибрилл, нормированная на интенсивность флуоресценции ThT в воде (синяя кривая, $\lambda_{возб} = 440$ нм, $\lambda_{флуо} = 490$ нм) [68].

1.6 Механизм связывания ThT с белками и белковыми агрегатами

На данный момент особый интерес для биомедицинской диагностики представляет разработка методов детектирования и количественная оценка содержания фибрилл в биологических жидкостях, а также изучение механизмов их формирования [95]. Одним из факторов, осложняющих интерпретацию экспериментальных данных, является то, что тиофлавин Т способен встраиваться не только в фибриллы, но и в мономеры белковых макромолекул и низкомолекулярные агрегаты белков – промежуточные структуры различного размера, образующиеся в процессе неправильного

сворачивания и агрегации белков и предшествующие образованию фибрилл. Несмотря на то, что ThT неспецифично связывается с такими структурами (константа связывания K с данными структурами составляет $\sim 10^3\text{-}10^4 \text{ M}^{-1}$ [9,10], что значительно ниже, чем с фибриллами, для которых $K > 10^7 \text{ M}^{-1}$), при их избытке вклад флуоресценции от их комплексов с ThT может превосходить сигнал от молекул ThT, связанных фибриллами. Исследование и верификация данного факта имеет критическое значение при разработке методик детектирования фибрилл в биожидкостях человека, например, плазме крови, поскольку неспецифическое связывание с пулом белков может повлиять на результаты флуоресцентного анализа с использованием ThT. Основную часть плазмы представляют белки (их концентрация варьируется в пределах от 65÷85 мг/мл), среднее расстояние между ними очень мало - примерно 10-20 нм, таким образом вероятность непосредственного взаимодействия белков с неправильной конформацией достаточно велика. Этот факт затрудняет детектирование фибрилл в реальных системах, например, биожидкостях, где концентрация мономеров белков может превышать концентрацию фибрилл на 9 порядков [11].

За последнее десятилетие в научной литературе появилось значительное количество исследований, демонстрирующих способность ThT взаимодействовать с различными мономерами белков. Однако механизмы связывания и фотофизические характеристики мод связывания остаются предметом дискуссий. Согласно существующим данным, основным механизмом взаимодействия ThT с мономерами белков являются гидрофобные взаимодействия. В частности, исследования комплекса ThT-альбумин показали, что ThT преимущественно связывается в гидрофобной области домена II [9]. Данное взаимодействие характеризуется низкой константой комплексообразования ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) и сопровождается низкоинтенсивной флуоресценцией, усиливающейся лишь в 20 раз по

сравнению с водным раствором ThT. Аналогичные результаты были получены для комплекса ThT с бычьим сывороточным альбумином (БСА), где константа комплексообразования составляла $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ [10] (рис.16).

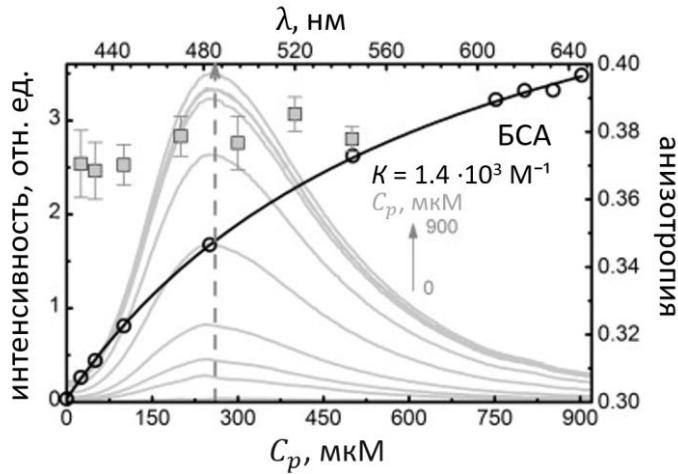


Рисунок 16. Спектры флуоресценции ThT (серые кривые, левая и верхняя шкалы) при образовании комплекса с БСА. Зависимость интенсивности флуоресценции ThT от концентраций БСА (круглые символы, левая и нижняя шкалы); аппроксимация данной зависимости моделью 1:1 комплексообразования (черная кривая, левая и нижняя шкалы). Зависимость изменения средней анизотропии флуоресценции ThT от концентрации БСА (квадратные серые символы, нижняя шкала; $\lambda_{\text{возб}} = 410 \pm 10 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{флуо}} = 500 \div 525 \text{ нм}$) [10].

При изучении взаимодействия ThT с α -лактальбумином было выявлено наличие двух мод связывания с константами комплексообразования порядка $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ [10]. Данное исследование показало, что, помимо гидрофобных взаимодействий, значительную роль в связывании ThT играют электростатические взаимодействия. В частности, локализация одного из участков взаимодействия ThT с α -лактальбумином обусловлена притяжением между катионной группой ThT и отрицательно заряженными областями на поверхности макромолекулы белка. Второй участок взаимодействия с ThT, предположительно, локализован вблизи триптофанового остатка, экспонированного в растворитель, где ThT взаимодействует с ним посредством π -стэкинга. Было высказано предположение о наличии дополнительных сайтов связывания, обусловленных катион- π

взаимодействиями между ThT и триптофановыми остатками белка. Два сайта связывания были также выявлены при исследовании комплекса ThT с ковалентным гомодимером микроглобулина – промежуточным продуктом образования амилоидных фибрилл [96]. В этом случае молекулы ThT встраиваются в две области, расположенные на поверхности между мономерными субъединицами.

Помимо различий в механизмах взаимодействия ThT с белками отмечаются также различия в фотофизических характеристиках зонда при его комплексообразовании. Так, в работе [97] было показано наличие двух мод связывания ThT при образовании комплекса с альбумином с характерными временами жизни флуоресценции 0.566 нс (40 %) и 2.225 нс (60 %). Данный результат был подтвержден в исследовании Maskevich et al. [98], где также была продемонстрирована гетерогенность флуоресцентных характеристик зонда при образовании комплекса с белком. В амилоидных фибриллах ThT связывается в двух типах сайтов с высокой ($\sim 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) и низкой ($\sim 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) константами комплексообразования [97]. Фотофизические характеристики ThT в данных сайтах различны: среднее время жизни составляет 0.82 нс (10 %) и 2.37 нс (90 %). Специфическое связывание также характерно для ThT при образовании комплекса с мономерами ацетилхолинэстеразы ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) и сопровождается значительным увеличением интенсивности флуоресценции (~ 1200 раз) [99]. Однако локализация специфических участков взаимодействия ThT в молекуле ацетилхолинэстеразы принципиально отличается от сайтов связывания в амилоидных фибриллах: такие участки содержат значительное количество ароматических аминогрупп и характеризуются высокой гидрофобностью.

Таким образом, природа сайтов связывания тиофлавина Т в белках и их влияние на фотофизические свойства зонда остаются предметом исследований. Глубокое понимание этих аспектов позволит не только

расширить представления о механизмах взаимодействия ThT с белковыми структурами, но и оптимизировать применение данного зонда в биомедицинских исследованиях. Наличие в амилоидных фибриллах как высоко-, так и низкоспецифичных сайтов связывания ThT подчеркивает необходимость количественной оценки параметров связывания зонда с различными белками и белковыми агрегатами. Исследованию данных аспектов посвящена вторая глава настоящей диссертации.

1.7 Использование тиофлавина Т для флуоресцентного анализа фибрилл и других биологических систем: разработка новых методов оптической спектроскопии и микроскопии.

Исследование фотофизических свойств тиофлавина Т (ThT) и его взаимодействия с амилоидными структурами остаётся одной из ключевых областей в биофизике и молекулярной биологии. Методы флуоресцентной спектроскопии и микроскопии находят все более широкое применение в различных областях химии, биологии и медицины. Эти методы обладают высокой чувствительностью и дают уникальную возможность изучения возбужденных состояний молекул, динамики молекулярных процессов, структуры и свойств биологических объектов от макромолекул до органов и тканей. Флуоресцентный зонд ThT, благодаря своей способности специфически связываться с фибриллами и демонстрировать усиление флуоресценции в результате этого процесса, стал незаменимым инструментом для их изучения *in vitro*. Однако в последние годы внимание исследователей сместилось в сторону применения ThT *in vivo* [100–103], что открывает новые перспективы для диагностики и изучения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона.

Первое применение ThT было предложено в 1959 году для визуализации фибрилл в срезах щитовидной железы и почек [104]. В результате данного исследования было продемонстрировано, что ThT образует комплекс с фибриллами с большей эффективностью, чем ранее используемые флуоресцентные красители, такие как конго красный и метиловый фиолетовый [104]. В более поздних работах 1980 и 1990 годов ThT стал применяться для *in vitro* и *in vivo* характеризации и количественного определения амилоидных фибрилл [26,65,105,106]. Тем не менее, применение данного зонда *in situ* для диагностики заболеваний человека осложнено тем фактом, что ThT не способен преодолевать гематоэнцефалический барьер мозга вследствие своего положительного заряда (рис.9) [107]. Несмотря на это ThT находит множество практических применений, в том числе для исследования структуры и свойств фибрилл *in vivo*. Зонд ThT активно применяется для анализа G-квадруплексов ДНК человека [50], а также других структур ДНК [106,108,109]. Исследования в данной области послужили стимулом для использования ThT для мониторинга ряда других важных биологических процессов. Например, в одной из недавних работ тиофлавин Т использовался для изучения амилоидных структур в патогенных дрожжах *Candida albicans*, которые является частью нормальной микробиоты человека, но при определенных условиях (например, при снижении иммунитета) могут вызывать серьезные инфекции, такие как кандидоз [102]. Одним из ключевых факторов их патогенности является способность формировать биопленки, которые обеспечивают устойчивость *Candida albicans* к противогрибковым препаратам и иммунной системе хозяина. Использование тиофлавина Т в данном исследовании позволило визуализировать амилоидные структуры, которые играют важную роль в формировании и стабилизации биопленок [102]. В рамках проведенного исследования был разработан специализированный конвейер для применения тиофлавина Т в качестве

флуоресцентного зонда, предназначенного для окрашивания амилоидных пептидов и биопленок, формируемых патогенными грибами, что позволило получить комплексное представление о динамике образования, стабилизации и функциональной роли амилоидных структур как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Еще одним значимым применением ThT стало исследование агрегатов белков в клеточных линиях нейробластомы и колоректального рака [110]. В данной работе продемонстрировано, что анализ флуоресцентных характеристик ThT может служить важным инструментом, дополняющим традиционные тесты оценки жизнеспособности клеток. Этот подход позволяет не только оценивать цитотоксические эффекты, но и выявлять изменения в структуре и агрегации белков, что особенно актуально при изучении воздействия лекарственных соединений на клеточные системы. Результаты исследования подчеркивают потенциал ThT как многофункционального зонда для комплексного анализа клеточных процессов, включая мониторинг образования белковых агрегатов и оценку клеточной жизнеспособности после воздействия фармакологических агентов [110].

Среди других направлений практического применения ThT можно рассмотреть разработку новых радиофармпрепаратов для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), основанных на производных ThT. Такие соединения позволяют визуализировать амилоидные фибриллы, ассоциированные с болезнью Альцгеймера [111,112], а также фибриллярные структуры, характерные для других патологий, таких как амилоидоз сердца [113]. Эффективность данных препаратов в ранней диагностике и мониторинге болезни Альцгеймера была подтверждена в исследованиях *in vivo* [114]. Кроме того, были разработаны рациометрические флуоресцентные сенсоры на основе металлоорганических структур, интегрирующих молекулу ThT, которые позволяют детектировать ключевые биомаркеры болезни Альцгеймера, включая амилоидные фибриллы и ацетилхолин,

непосредственно *in vivo* [115]. Также предприняты успешные попытки детектирования амилоидных фибрилл в биожидкостях с использованием флуоресценции ThT и других зондов [116]. Для этого была создана сенсорная система с двойным режимом детекции (флуоресцентная и абсорбционная спектроскопия), которая позволяет анализировать изменения интенсивности флуоресценции ThT и других красителей (например, конго красного и ANS) при взаимодействии с белками, а также преобразовывать визуальные данные, зарегистрированные с помощью камеры смартфона при мониторинге в анализаторе ультрафиолетового излучения, в количественные показатели. Применение методов машинного обучения для обработки данных позволило успешно дифференцировать пять типов амилоидных фибрилл, сформированных из различных белков, и идентифицировать их в 25 образцах биожидкостей, включая разбавленную плазму человека и искусственную спинномозговую жидкость.

Одной из ключевых задач является разработка и внедрение новых методик, основанных на зависимости флуоресцентных свойств ThT от характеристик микроокружения. Особую актуальность представляет применение передовых методов для анализа фотофизических параметров ThT на пикосекундном временном масштабе, что позволяет детально изучать динамику взаимодействия красителя с молекулярными структурами, а также оценивать изменения локальной вязкости микроокружения и конформационной подвижности ThT. Например, исследование затухания флуоресценции ThT в зависимости от вязкости среды было успешно проведено с использованием метода ап-конверсии флуоресценции, который обеспечивает высокую временную разрешающую способность и чувствительность к изменениям микроокружения [117] (рис. 6). Для анализа внутримолекулярных процессов переноса заряда и конформационной динамики ThT применялась время-разрешенная спектроскопия с методом

накачки и зондирования (pump-probe fluorescence spectroscopy), что позволило получить информацию о сверхбыстрых релаксационных процессах в молекуле красителя [55,118] (рис.17). В рамках настоящей работы основное внимание удалено исследованию параметров флуоресценции ThT на пикосекундном временном масштабе в сайтах связывания с различной специфичностью и жесткостью микроокружения, что важно для понимания механизмов взаимодействия красителя с модельными белковыми системами и разработки новых подходов к анализу фибриллярных агрегатов.

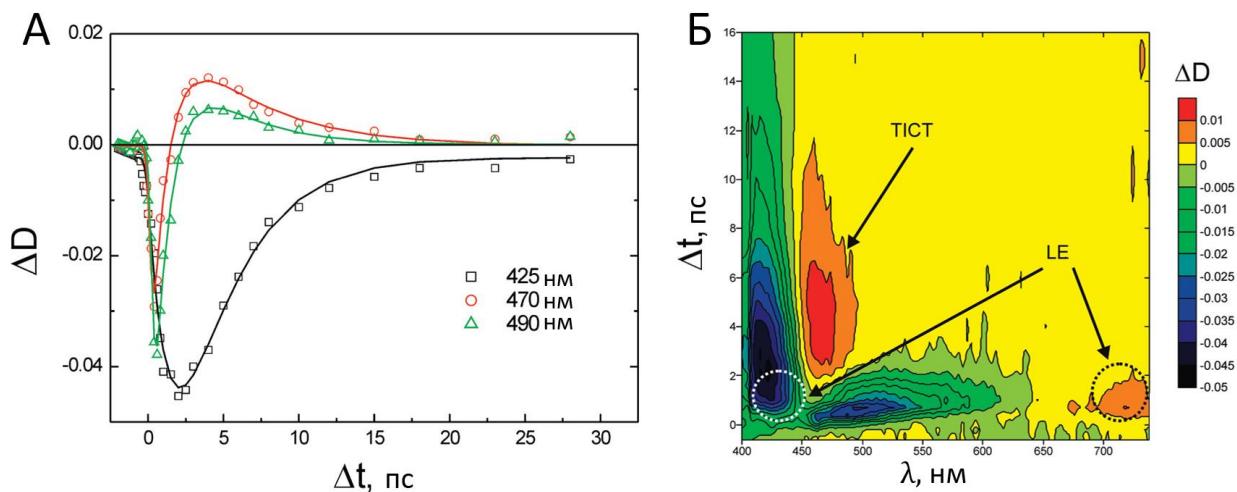


Рисунок 17. (А) Кинетика эволюции спектров поглощения возбужденного состояния ThT, зарегистрированных в фемтосекундном временном масштабе в воде на 425, 470 и 490 нм. (Б) Зависимость эволюции поглощения возбужденного состояния ThT в водном растворе, зарегистрированного в фемтосекундном временном масштабе, от длины волны регистрации и времени задержки. $\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм [55].

Поиск новых, более совершенных методов, использующих вариабельность параметров флуоресценции тиофлавина Т при образовании им комплексов с белками, может позволить повысить чувствительность и специфичность оптического молекулярного имиджинга. В одной из недавних работ было показано преимущество лазерной спектроскопии в резонаторах Фабри-Перо по сравнению с флуоресцентной спектроскопией для анализа изменения микровязкости ThT при фибриллообразовании [119]. В то время

как пороги генерации лазерного излучения позволили выявить увеличение микровязкости на ранних этапах формирования фибрилл, флуоресценция ThT возрастала лишь на более поздних стадиях. Регистрация олигомерных форм белковых агрегатов на ранних этапах их образования также была успешно реализована с помощью метода лазерного усиления спонтанной флуоресценции ThT в растворе фибрилл [120]. Прямая визуализация и мониторинг в реальном времени образования таких агрегатов с микрометровым пространственным разрешением, а также анализ их морфологии и структуры могут быть реализованы с использованием фазорного анализа данных микроскопии визуализации времени жизни флуоресценции ThT (FLIM) [121]. Этот метод позволяет визуализировать карту распределения времени жизни флуоресценции ThT в образце, обеспечивая более высокую чувствительность и специфичность по сравнению с методами, основанными исключительно на измерении интенсивности флуоресценции [121] (рис. 18). Анализ мультиэкспоненциальной кинетики затухания флуоресценции ThT с использованием фазорного анализа (phasor plot [121]) упрощает визуализацию времени жизни флуоресценции, что позволяет отслеживать структурные изменения в процессе фибриллообразования. При этом изменения вторичной структуры, выявленные методами кругового дихроизма (КД) и ИК-Фурье спектроскопии, коррелировали с увеличением жесткости фиксации ThT, что приводило к возрастанию времени жизни его флуоресценции. Преимущества фазового анализа данных микроскопии FLIM подчеркивают необходимость разработки новых подходов, основанных на картировании дополнительных фотофизических параметров флуоресцентных зондов, для повышения точности оптического молекулярного имиджинга.

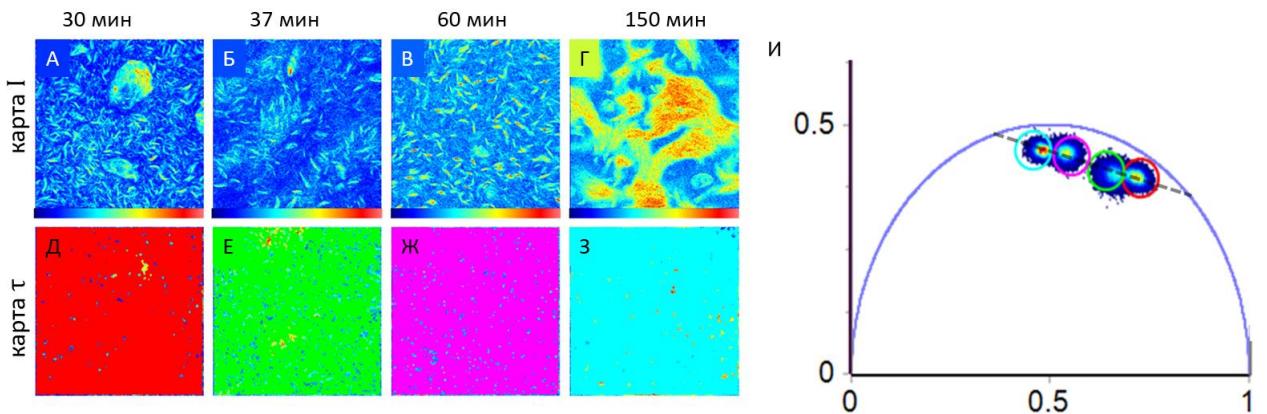


Рисунок 18. Результаты фазорного анализа изображений FLIM ThT в растворе фибрилл, полученных на разных этапах их формирования (30, 37, 60 и 150 минут) от времени их формирования. $\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм, $\lambda_{\text{флуо}} = 485 \div 600$ нм. (А–Г) Карты интенсивности I и (Д–З) соответствующие карты времени жизни флуоресценции ThT τ , окрашенные в соответствии с цветовой шкалой, обозначенной кружками на фазовой диаграмме (И). Красные пиксели соответствуют более коротким временам жизни, увеличение времени жизни при увеличении времени фибриллообразования отображено с использованием зелёного, розового и голубого цветов [121].

В настоящей диссертационной работе предлагается методика микроскопии насыщения флуоресценции, реализуемая на основе стандартного конфокального микроскопа [18–21], что открывает новые возможности для повышения чувствительности и специфичности по сравнению с традиционными методами конфокальной микроскопии. Отклонение зависимости интенсивности излучения флуорофора от интенсивности возбуждения при больших мощностях накачки от линейного закона происходит вследствие обеднения основного состояния (т.е. когда скорость возбуждения флуорофора из основного состояния в возбужденное превышает скорость деактивации возбужденного состояния), интеркомбинационной конверсии или других эффектов, и может быть описано набором уравнений, в которых в качестве параметров фигурируют фотофизические характеристики флуорофора (сечение поглощения σ , время жизни флуоресценции τ , скорости релаксации). Таким образом, анализируя

насыщение флуоресценции в разных пикселях, можно составить карту молекулярно-специфического параметра σT по всему изображению. Для этого достаточно получить флуоресцентные изображения при различных интенсивностях возбуждения в соответствующем диапазоне интенсивности возбуждения. Эффект насыщения флуоресценции в конфокальной микроскопии ранее анализировался с точки зрения его влияния на пространственное разрешение [22–24], однако возможность использования этого эффекта для молекулярно-специфического контрастирования изображений не рассматривалась и будет реализована в данной работе.

1.8 Совмещение анализа фотофизических свойств ThT с современными методами изучения этапов формирования амилоидных фибрилл

В предыдущем разделе были представлены результаты, демонстрирующие, что для всестороннего изучения молекулярных механизмов фибриллообразования, а также особенностей взаимодействия флуоресцентного зонда тиофлавина Т с амилоидными структурами, применение единственного метода исследования является недостаточным. Комплексный подход, основанный на сочетании различных экспериментальных и теоретических методов, необходим для получения более детальной картины происходящих процессов. Основной причиной является тот факт, что агрегация белка представляет собой сложный и многостадийный процесс, характеризующийся высокой степенью гетерогенности. Таким образом, для анализа молекулярной цепочки событий и получения всесторонней картины процесса агрегации требуется применение мультимодального подхода, объединяющего различные методы исследования. Данный факт связан с тем, что каждый этап в процессе агрегации может

привести к появлению одновременно нескольких олигомерных структур с определенным распределением по размерам и свойствам, что усложняет их классификацию и влечет за собой необходимость использования нескольких аналитических методов одновременно [122].

Подход к изучению многоступенчатой кинетики формирования фибрилл, использующий комплекс различных методов, сочетающий в себе анализ фотофизических свойств ThT с современными методами изучения этапов формирования амилоидных фибрилл уже зарекомендовал себя для качественного описания кинетики фибриллообразования. Однако корректная интерпретация получаемых данных сопряжена с трудностями. Наблюдаются вариации результатов при анализе одного и того же процесса. Более того, кинетическое изменение различных физических характеристик, определенных с использованием разных техник, имеет различные параметры при исследовании одной и той же системы.

Комбинированные методики, определяющие разные физические характеристики системы, активно используются для исследования многостадийной кинетики формирования фибрилл и установления механизмов данного процесса, используя несовпадение изменения физических параметров системы в качестве индикаторов различных стадий формирования фибрилл. В работе [123] различные подходы к исследованию фибриллообразования тестируют в качестве репортеров разных стадий структурных изменений белка. Так, в данной работе показана большая чувствительность собственной тирозиновой флуоресценции, флуоресцентного сигнала красителя 8-анилино-1-нафталинсульфоната (ANS) при детектировании ранних стадий процесса агрегации по сравнению динамическим светорассеянием. В работе [124] при исследовании процесса фибриллообразования с использованием методов динамического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии с применением ThT путем

сравнения кинетики изменения гидродинамического радиуса белковых агрегатов и интенсивности флуоресценции тиофлавина Т была разработана модель фибриллообразования. Было продемонстрировано, что данные характеристики системы могут показывать разную динамику изменения вследствие различия размеров олигомеров и скорости процесса самосборки в зависимости от внешних условий в рамках одной модели [124]. Данные результаты ставят необходимость дополнительной проверки возможности отслеживания различные стадии фибриллообразования по изменению ряда физических параметров системы, а также корректности интерпретации данных. В работе была изучена взаимосвязь изменения фотофизических параметров тиофлавина Т при образовании фибрилл и изменения размеров агрегатов белка по данным анализа траектории наночастиц и спектроскопии фотонной корреляционной спектроскопии.

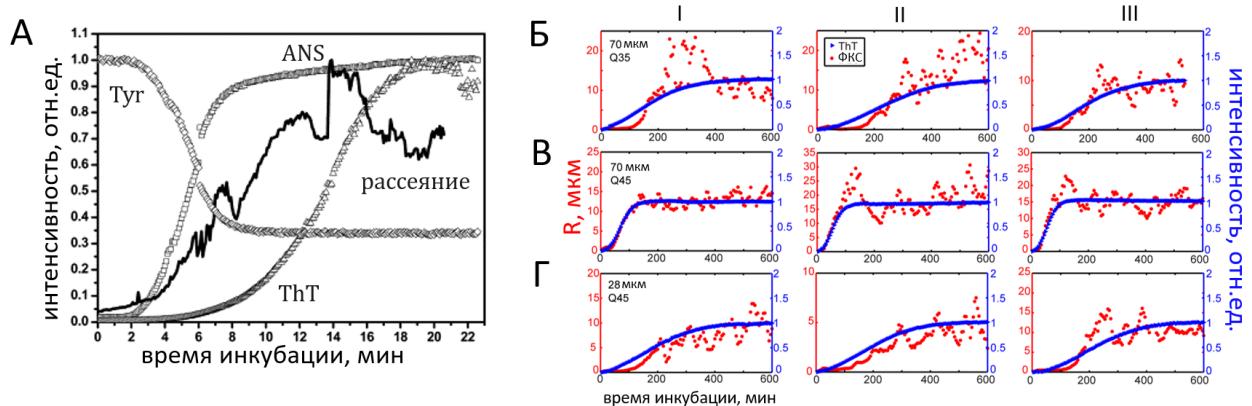


Рисунок 19. (А) Кинетика фибриллообразования, зарегистрированная по изменению интенсивности флуоресценции тирозина (Тир) в структуре белка, флуоресцентного зонда 8-анилино-1-нафталинсульфоната (ANS), тиофлавина Т (ThT) и интенсивности рассеянного света [123]. (Б-Г) Кинетика фибриллообразования, зависящая от длины белка: (Б) 28 мкм Q45, (В) 70 мкм Q45, (Г) 70 мкм Q35; и номера повторения эксперимента. Столбцы I-III соответствуют независимым повторениям эксперимента. Мониторинг процесса проводили по изменению интенсивности флуоресценции тиофлавина Т и динамике среднего гидродинамического радиуса агрегатов (R), определяемого методом динамического рассеяния света (ДРС) [124].

1.9 Заключение

Исследование механизмов формирования, а также изменения флуоресцентных свойств ThT при связывании его с фибриллами представляет собой актуальную задачу в области биофизики и медицины. Несмотря на существование общепринятой модели, объясняющей фотофизические процессы в ThT с точки зрения концепции молекулярного ротора, механизмы специфического связывания ThT с амилоидными фибриллами, а также причины увеличения квантового выхода флуоресценции ThT при его встраивании в фибриллы, остаются недостаточно изученными. Формирование фотофизических свойств и моды встраивания в белковые макромолекулы и агрегаты белка до сих пор остаются предметом детального изучения. Особый интерес представляет количественная оценка параметров связывания с различными белками и белковыми агрегатами, а также оценка оптических свойств ThT при образовании им комплексов со структурами с высокими и низкими константами комплексообразования. Другим актуальным направлением является использование вариабельности параметров флуоресценции тиофлавина Т при регистрации изменения вязкости микроокружения с субмикронным разрешением в режиме реального времени. В работе производится разработка метода картирования фотофизических параметров флуорофоров, в частности, ThT, с помощью конфокальной микроскопии на основе эффекта насыщения флуоресценции. Также продемонстрирована возможность картирования параметра насыщения $F_{\text{от}}$ для гетерогенной системы, окрашенной ThT.

Целью диссертационной работы является исследование фотофизических процессов в комплексах, образующихся при взаимодействии флуоресцентного зонда тиофлавина Т с фибриллярнымиnanoструктурами, мономерами белков и их низкомолекулярными агрегатами. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. С использованием методов флуоресцентной спектроскопии исследовать фотофизические механизмы, ответственные за усиление флуоресценции и изменение среднего времени жизни флуоресценции ThT при связывании с глобулярными белками.
2. Исследовать механизмы, лежащие в основе различной чувствительности фотофизических параметров ThT при образовании им комплексов с фибриллярными наноструктурами, мономерами белков и их низкомолекулярными агрегатами.
3. Разработать метод картирования фотофизических параметров тиофлавина Т на изображениях, полученных методом конфокальной микроскопии, на основе эффекта насыщения флуоресценции.

Глава 2. Анализ неспецифического взаимодействия тиофлавина Т с белковыми макромолекулами и олигомерами

В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A1, A2, A3]. Данное исследование направлено на анализ изменения фотофизических характеристик флуоресцентного зонда тиофлавина Т (ThT) в результате низкоспецифичного связывания с белковыми молекулами. В ходе исследования были изучены спектры и кинетики затухания флуоресценции тиофлавина Т при встраивании в мономеры белков и их низкомолекулярные агрегаты (олигомеры). При анализе изменения среднего времени и интенсивности флуоресценции ThT продемонстрировано асинхронное поведение данных параметров при связывании с белками, произведена оценка константы комплексообразования K ThT с белковыми макромолекулами и олигомерами. Анализ параметров сайтов связывания ThT с белками был реализован путем анализа олигомерных фракций белка, разделенных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии, по поглощению на длине волны 280 нм и поглощению тиофлавина Т в них на 410 нм. Проведено численное моделирование кинетики затухания флуоресценции при длительности импульса возбуждения 200 пс системы тиофлавин Т – белок. При анализе данных моделирования были исследованы зависимости среднего времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT в системе с двумя модами встраивания в белок. Использование метода ап-конверсии флуоресценции (временное разрешение ~ 200 фс) позволило выявить, что вклад сверхбыстрой компоненты (~ 1 пс) в кинетику затухания флуоресценции ThT превышает 50%. Этот вклад маскируется при измерениях кинетики затухания флуоресценции на установке с временным разрешением ~ 200 пс.

2.1 Объекты и методы исследования

2.1.1 Методы изготовления образцов

С целью анализа общих закономерностей фотофизических свойств тиофлавина Т (ThT, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) при его комплексообразовании с белковыми макромолекулами в данном исследовании были изучены водные растворы белков, представленных в таблице 3. Все белковые растворы готовились в 50 мМ Tris-HCl буфере с pH 7.4 с добавлением NaCl в концентрации 0.1 М для поддержания ионной силы среды.

Таблица 3. Спецификация белков, растворы которых были исследованы в работе: коммерческие наименования, аббревиатуры, фирмы-производители и диапазоны концентраций.

Белок	аббревиатура	производитель	диапазон концентраций, мкМ
бычий сывороточный альбумин	БСА		4÷780
сывороточный альбумин человека	САЧ		2÷800
α-лактальбумин	α-LA	Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США	0.5÷715
α-кристиалин	α-Cr		0.1÷7
β-лактоглобулин	β-LG		0.5÷990
лизоцим	Lys		2÷700
карбоангидраза	CA		2÷340
тиреоглобулин	Tg	Pharmacia, Стокгольм, Швеция	0.1÷24
ингибитор трипсина сои	STI	Reanal Fine Chemical, Будапешт, Венгрия	0.5÷500

Для исследования изменения интенсивности флуоресценции и среднего времени жизни возбужденного состояния ThT при образовании комплекса с белком проводились эксперименты с растворами белков, указанных в таблице 3, изменение концентрации которых указано в мкМ. Концентрация ThT во всех растворах была фиксирована и составляла 2 мкМ.

Влияние олигомеризации белков оценивалось методом прямого фракционирования растворов БСА и САЧ с концентрациями 150, 40 и 10 мкМ как в присутствии 80 мкМ ThT, так и без него.

Для оценки параметров мод связывания ThT на пикосекундном временном масштабе при взаимодействии с макромолекулами белка были проведены исследования кинетики затухания флуоресценции методом пикосекундной лазерной кинетической спектроскопии. В данных экспериментах анализировался раствор ThT (2 мкМ) в буферной среде, а также в присутствии 714 мкМ α -LA, 500 мкМ STI и 870 мкМ БСА.

2.1.2 Измерение стационарных спектров флуоресценции и поглощения

Стационарные спектры флуоресценции в видимом и ближнем ИК диапазоне измерялись с помощью спектрофлуориметра FluoroMax-4 (Horiba, Jobin Yvon, Япония). Спектры флуоресценции были получены при возбуждении на длине волны 410 нм (ширина полосы возбуждения – 1 нм) в диапазоне 425–660 нм (с разрешением 2 нм). Длина волны возбуждения 410 нм соответствует максимуму спектра поглощения ThT в воде. Для всех регистрируемых спектров флуоресценции производилась корректировка, учитывающая эффект внутреннего фильтра [125], который может способствовать уменьшению интенсивности флуоресценции рассматриваемых образцов при высоких значениях оптических плотностей.

Стационарные спектры поглощения в видимом диапазоне измерялись с помощью спектрофотометра UV-Vis Lambda 25 (Perkin-Elmer, США) в кварцевых кюветах с величиной оптического пути 1 см.

2.1.3 Лазерная кинетическая спектроскопия флуоресценции на наносекундном временном масштабе

Измерение кинетики затухания флуоресценции ThT в наносекундном диапазоне с пикосекундным временным разрешением осуществлялось с использованием специально сконструированного лазерного флуориметра, основанного на методе время-коррелированного счета единичных фотонов. В качестве источника возбуждения применялся импульсный диодный лазер (длина волны 405 нм, длительность импульса 40 пс, энергия в импульсе 11 пДж, частота повторения импульсов 10 МГц).

Регистрация флуоресценции образца осуществлялась с применением фокусирующей линзы и многомодового оптического волокна с сердцевиной диаметром 600 мкм, доставлявшего сигнал на детектор. Оптическая система канала регистрации была оснащена полосовым светофильтром с диапазоном пропускания 425–660 нм, обеспечивающим селективное подавление излучения накачки в регистрируемом сигнале. Регистрация кинетики затухания флуоресценции выполнялась с использованием системы детектирования, включающей фотоэлектронный умножитель (ФЭУ, PMC-100, Becker&Hickl, Германия) и плату время-коррелированного счета фотонов SPC130EM (Becker&Hickl, Германия), обеспечивающую прецизионное измерение временного интервала между моментом генерации синхроимпульса возбуждающего излучения и регистрацией фотона флуоресценции. Принципиальная схема экспериментальной установки представлена на рисунке 20.

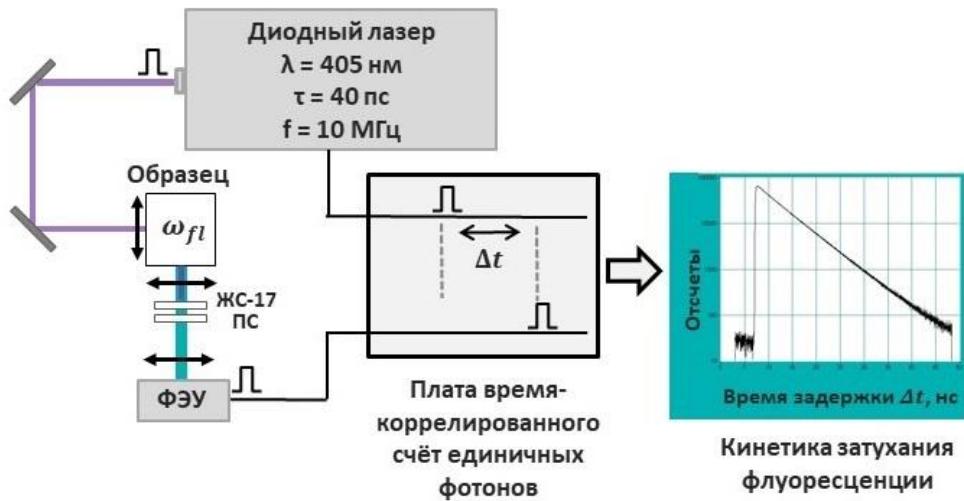


Рисунок 20. Принципиальная схема установки, использованной для измерения кинетики затухания флуоресценции с временным разрешением ~ 150 пс с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов.

2.1.4 Гель-фильтрационная хроматография

Метод гель-фильтрационной хроматографии был использован для разделения растворов БСА на фракции с целью измерения поглощения ThT при образовании комплекса с олигомерами белковых макромолекул. Разделение методом гель-фильтрационной хроматографии проводилось для образцов объемом 100 мкл с различным содержанием белка с использованием колонки Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США), диапазон фракционирования которой составляет от 10 до 600 кДа. Колонка была предварительно наполнена фильтрованным и дегазированным буферным раствором 20 mM Tris-HCl с pH 7.4, содержащим 100 mM NaCl. Фракционирование проводилось при температуре 25°C со скоростью потока 1.2 мл/мин. С использованием детектора ProStar325 UV/Vis HPLC/FPLC (Varian Inc., Мельбурн, Австралия) измерялись кинетики изменения оптической плотности от объема выхода образца в проточной ячейке с длиной оптического пути 9 мм и разрешением 6 нм на заданной длине волны.

Измерение собственного поглощения олигомерных фракций белка и поглощения молекулы ThT в белковых фракциях производилось на длине волны 280 и 410 нм, соответственно. Молекулярный вес фракций исследуемых образцов оценивался путем предварительной калибровки колонки с использованием стандартов с заранее известными характеристиками: при анализе растворов белка α -кристаллина (200 кДа), β -лактоглобулина (18 кДа) и α -лактальбумина (15 кДа).

2.1.5 Лазерная кинетическая спектроскопия флуоресценции на пикосекундном временном масштабе – ап-конверсия флуоресценции

Для измерения кинетики затухания флуоресценции с разрешением 100 фс была использована система, реализующая метод оптического стробирования флуоресцентного сигнала посредством его взаимодействия с импульсами накачки на нелинейном кристалле (метод ап-конверсии флуоресценции) с использованием спектрометра FOG100 (CDP Systems, Россия). Принципиальная схема экспериментальной установки приведена на рисунке 21.

Возбуждение флуоресценции в образце происходило под воздействием излучения второй гармоники импульсного титан-сапфирового лазера (405 нм), длительностью импульса 100 фс, частотой следования 80 МГц и средней мощностью 30 мВт (осциллятор Mia-Tai, Spectra Physics, Санта-Клара, Калифорния, США). Для предотвращения фотодеградации образца кювета с исследуемыми растворами находилась в непрерывном вращении, обеспечивая постоянное перемешивание в кювете с длиной оптического пути 1 мм. После генерации флуоресцентного отклика импульсом на частоте второй гармоники коллимированный флуоресцентный сигнал ω_f направлялся на нелинейный

кристалл бета-бората бария (0.5 мм), где он сбивался с импульсом на фундаментальной частоте ω (80 фс, 810 нм), предварительно прошедшим через систему оптической задержки на основе ретрорефлектора, управляемого шаговым двигателем. В результате нелинейно-оптического взаимодействия в кристалле генерировался сигнал на суммарной частоте $\omega + \omega_{fl}$, длительность процесса генерации которого не превышает 100 фс. Данный сигнал регистрировался при помощи двойного монохроматора (со спектральным разрешением менее 1.5 нм) и фотоэлектронного умножителя на длине волны 300 нм.

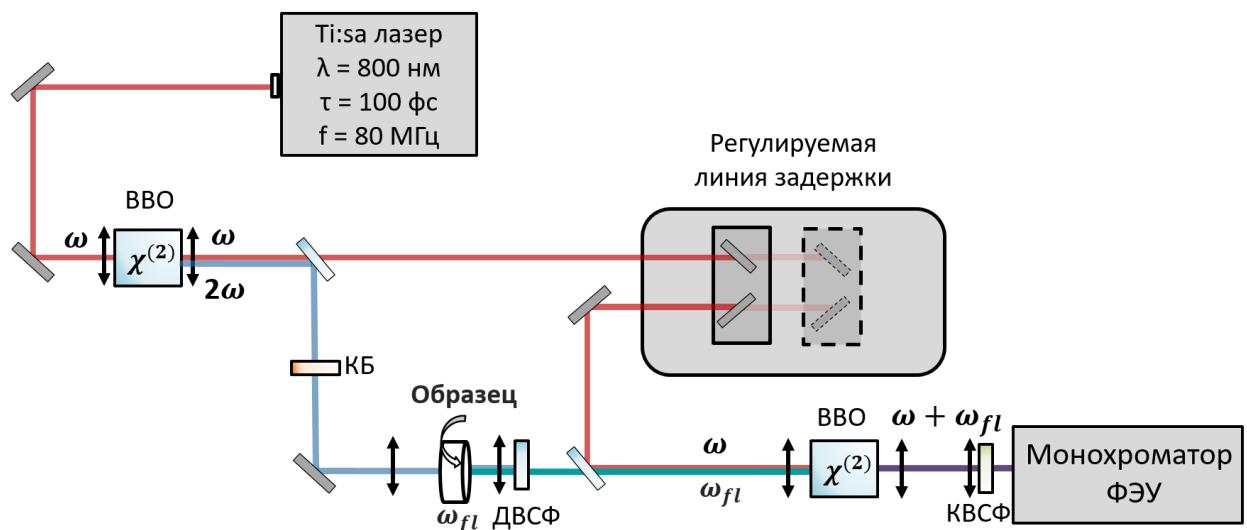


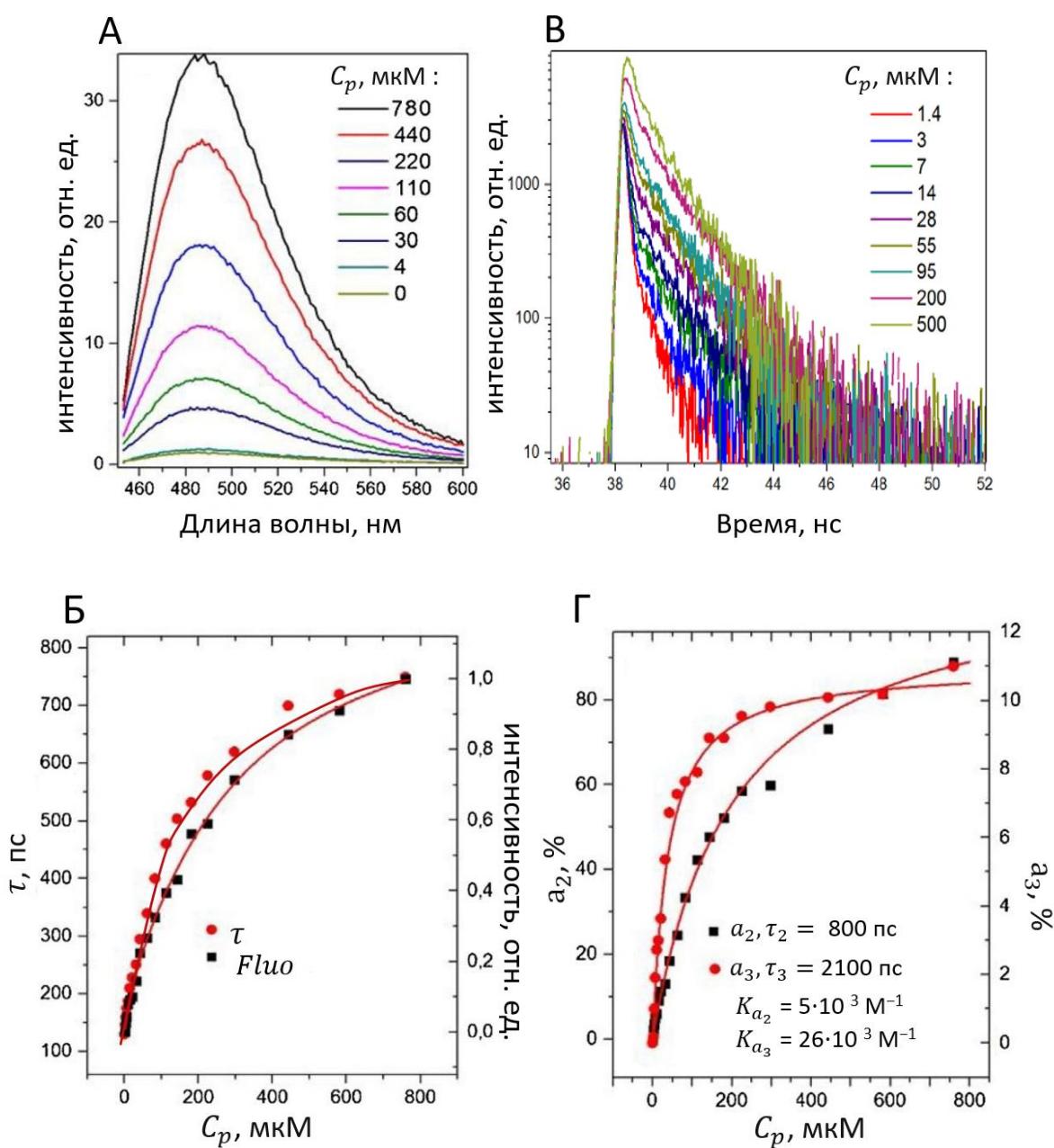
Рисунок 21. Принципиальная схема установки, использованной для измерения кинетики затухания флуоресценции с временным разрешением 100 фс с помощью метода ап-конверсии флуоресценции.

2.2 Изменение фотофизических характеристик ThT при взаимодействии с альбумином и его олигомерами

Для количественного определения параметров процесса неспецифичного связывания ThT исследовалось изменение интенсивности флуоресценции зонда при увеличении концентрации белка альбумина в

растворе. На рис. 22 А показаны спектры флуоресценции ThT при различных концентрациях альбумина.

Как уже упоминалось, квантовый выход флуоресценции ThT в воде мал и составляет 0,00033. При добавлении альбумина в раствор относительное усиление интенсивности флуоресценции по сравнению с водным раствором ThT составляло 35. Данный факт, указывает на наличие взаимодействия в системе и позволяет предположить, что увеличения квантового выхода ThT происходит вследствие его встраивания в альбумин.



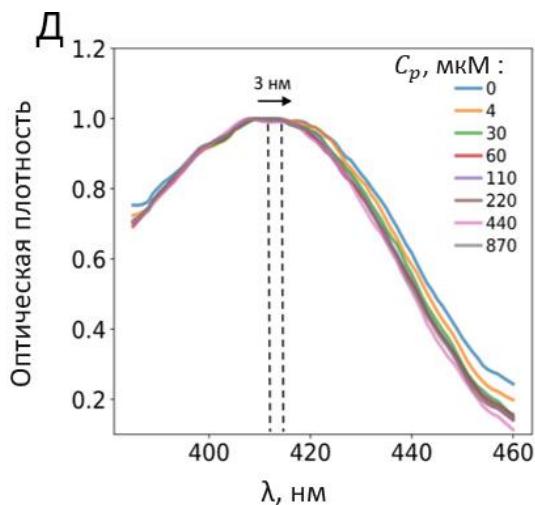


Рисунок 22 – А) Спектры флуоресценции ThT при различных концентрациях альбумина, нормированные на максимальную интенсивность свободного ThT в воде. Б) Кинетики затухания флуоресценции ThT с временным разрешением ~ 200 пс при различных концентрациях альбумина, нормированные на максимальную интенсивность свободного ThT в воде. В) Зависимость интенсивности флуоресценции (черные символы), нормированной на интервал [0;1] и среднего времени жизни флуоресценции ThT (красные символы) в растворе альбумина. Красная кривая соответствует аппроксимации экспериментальной зависимости уравнением (20). Г) Зависимость амплитуд a_2 и a_3 , определяющих относительный вклад в кинетику затухания флуоресценции ThT, компонент с временем затухания флуоресценции $\tau_2 = 800$ пс и $\tau_3 = 2100$ пс от концентрации альбумина. Красная кривая соответствует аппроксимации зависимостей уравнением (20). Константы комплексообразования составили $(2.6 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(0.50 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ для a_3 и a_2 , соответственно. Д) Изменение спектров поглощения ThT при увеличении концентрации альбумина. Спектры нормированы на интервал [0;1]. Концентрация тиофлавина в экспериментах составляла $C_{\text{ThT}} = 2 \text{ мкМ}$.

На рис. 22 Б черными точками представлена нормированная на интервал [0;1] зависимость интенсивности флуоресценции ThT при встраивании в альбумин, полученная из анализа спектров флуоресценции (рис. 22 А). Далее была рассчитана константа комплексообразования путем аппроксимации данной зависимости следующим образом. Константа комплексообразования K по определению равна:

$$K = \frac{C_{p-ThT}^f}{C_p^f C_{ThT}^f}, \quad (14)$$

где C_p^f – концентрация свободного белка, C_{ThT}^f – концентрация свободного ThT, C_{p-ThT} – концентрация комплекса белок - ThT. Выражая концентрацию C_{p-ThT} через полную концентрацию белка C_p и ThT C_{ThT} , получим:

$$C_p^f = C_p - C_{p-ThT} \quad (15)$$

$$C_{ThT}^f = C_{ThT} - C_{p-ThT} \quad (16)$$

$$K = \frac{C_{p-ThT}}{(C_p - C_{p-ThT})(C_{ThT} - C_{p-ThT})} \quad (17)$$

Преобразуя выражение (17), получаем квадратное уравнение относительно C_{p-ThT} :

$$C_{p-ThT}^2 + C_{p-ThT} (-C_p - C_{ThT} - 1/K) + C_p C_{ThT} = 0 \quad (18)$$

Решение этого квадратного уравнения выглядит следующим образом:

$$C_{p-ThT} = \frac{C_{ThT} + C_p + 1/K}{2} - \sqrt{\left(\frac{C_{ThT} + C_p + 1/K}{2}\right)^2 - C_p \cdot C_{ThT}} \quad (19)$$

Тогда зависимость измеряемого в эксперименте параметра y (интенсивности флуоресценции, времени жизни или амплитуды компоненты в кинетике затухания флуоресценции) можно аппроксимировать следующей формулой, где y_{max} – его максимальное значение, соответствующее выходу параметра на плато:

$$y(C_p) = y_{max} \cdot \left(\frac{C_{ThT} + C_p + 1/K}{2} - \sqrt{\left(\frac{C_{ThT} + C_p + 1/K}{2}\right)^2 - C_p \cdot C_{ThT}} \right) \quad (20)$$

Так, с использованием описанной выше аппроксимации зависимости интенсивности флуоресценции ThT, *Fluo*, от концентрации белка была определена константа комплексообразования K для системы ThT-альбумин: она составила $5.9 \pm 0.7 \text{ мМ}^{-1}$.

В данной работе также было произведено измерение кинетики затухания флуоресценции ThT (рис.22 В) при добавлении альбумина с использованием лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на наносекундном масштабе с временным разрешением ~ 200 пс (более подробно метод описан в пункте 2.1.3). Полученную с использованием данного метода кинетику затухания флуоресценции образца можно представить в виде суммы экспонент:

$$F(t) = \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (21)$$

где a_i - предэкспоненциальные коэффициенты, определяющие относительные вклады в кривую затухания компонент с временем затухания τ_i , для которых верно соотношение:

$$\sum_i a_i = 1 \quad (22)$$

Среднее время жизни возбужденной молекулы определяется выражением:

$$\tau = \sum_i a_i \tau_i / \sum_i a_i \quad (23)$$

Таким образом было определено среднее время жизни флуоресценции ThT. Данный параметр используется в качестве индикатора изменения параметров микроокружения зонда, таких как локальная вязкость и полярность [14,61]. Исследование закона затухания флуоресценции позволяет производить анализ мод связывания ThT при образовании комплекса с белком и белковыми агрегатами [58]. В данном эксперименте кинетика затухания флуоресценции

аппроксимировалась трехэкспоненциальным законом (рис.22 Б). Из данного графика видно, что для связанного ThT наблюдалось \sim 1000-кратное увеличение среднего времени жизни флуоресценции (от 1 пс в водном растворе до 840 пс при встраивании в альбумин), а усиление интенсивности флуоресценции *Fluo* составляло всего несколько десятков при связывании с белком (фактор усиления 35), тогда как, согласно модели молекулярного ротора, они должны меняться одинаковым образом (формула 13). Таким образом, при исследовании процесса связывания ThT с белком наблюдается асинхронность поведения фотофизических характеристик зонда *Fluo* и τ с увеличением концентрации белка C_p . За этот эффект могут быть ответственны разные процессы, происходящие в системе, например, молекулы ThT связываются с разными сайтами связывания в белке, характеризующимися разной константой комплексообразования, или встраиваются в олигомеры, формирующиеся при высоких концентрациях белка в растворе.

Для исследования данного эффекта был произведен анализ параметров кинетики затухания ThT, а именно оценивались предэкспоненциальные коэффициенты a_i , определяющие относительный вклад в кривую затухания компонент с временем затухания τ_i . При этом первая компонента a_1 с самым быстрым затуханием флуоресценции была отнесена к флуоресценции свободного ThT в растворе. Две другие компоненты a_2 и a_3 с более медленным затуханием флуоресценции были отнесены к модам связанного в альбумине зонда. Соответствующие времена затухания флуоресценции фиксировались и составляли $\tau_1 = 200$ пс, $\tau_2 = 800$ пс и $\tau_3 = 2100$ пс. Стоит напомнить, что время жизни флуоресценции свободного ThT составляет ~ 1 пс и не может быть разрешено на используемой экспериментальной установке. Так, в работе τ_1 составляло ~ 200 пс, τ_2 и τ_3 были определены путем аппроксимации кинетики затухания флуоресценции ThT в растворе белка при концентрации 780 μM (~ 400 раз превышающей концентрацию ThT), когда зависимость интенсивности

флуоресценции ThT в растворе белка выходит на плато, и весь зонд связан с белком. Стоит отметить, что вклад первой компоненты в кривую затухания флуоресценции в данной системе незначителен (< 5%). На рис. 22.Г показана зависимость вкладов a_2 и a_3 компонент τ_2 и τ_3 в закон затухания флуоресценции ThT от концентрации белка. Из данного графика видно, что амплитуда самой медленной компоненты a_3 с временем жизни 2100 пс достигает плато при значении $\sim 11\%$ при концентрации белка $\sim 300 \mu\text{M}$, в то время как соответствующая зависимость для амплитуды a_2 выходит на плато чуть позднее. Вклад a_3 в среднее время жизни является значительным из-за его большего значения времени жизни, в то время как интенсивность флуоресценции в основном определяется a_2 , в предположении, что квантовые выходы флуоресценции мод связанных ThT одного порядка. Исходя из того факта, что компоненты a_2 и a_3 демонстрируют различное поведение в зависимости от концентрации белка в растворе, можно предположить, что данные параметры характеризуют две различные моды связывания ThT и пропорциональны его концентрации в различных сайтах связывания. Из зависимостей a_2 и a_3 от концентрации белка в растворе были рассчитаны константы комплексообразования путем аппроксимации зависимости уравнением 20. Они составили $(2.6 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(0.50 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ для a_3 и a_2 , соответственно.

Локализация сайтов связывания ThT с альбумином была далее исследована путем анализа собственного поглощения олигомерных фракций белка на 280 нм и поглощения тиофлавина Т в белковых фракциях на 410 нм. На рис.22 Д представлены нормированные на интервал [0;1] спектры поглощения ThT в присутствии альбумина при изменении его концентрации в диапазоне $0 \div 870 \text{ мкM}$. Как видно из данного графика, в присутствии большой концентрации белка, спектр поглощения красителя претерпевает сдвиг максимума в длинноволновую область на 3 нм (см. рис.22 Д). Положение

максимума поглощения тиофлавина Т чувствительно к полярности микроокружения. В полярной водной среде спектр сдвинут в коротковолновую область. Переход в более гидрофобное микроокружение при связывании с альбумином вызывает сдвиг максимума спектра поглощения в длинноволновую сторону на 3 нм. Более выраженное последовательное увеличение этого сдвига до 38 нм наблюдается при встраивании красителя в фибриллярные нитевидные агрегаты, что свидетельствует о сильном уменьшении полярности микроокружения вследствие экранирования молекулы зонда от воды и её встраивания в гидрофобные участки фибрилл.

Локализация сайтов связывания ThT с альбумином была далее исследована путем анализа собственного поглощения олигомерных фракций белка на 280 нм и поглощения тиофлавина Т в белковых фракциях на 410 нм, разделенных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии (рис. 23). Данная техника позволяет разделять смесь веществ по молекулярной массе с помощью фильтрации через хроматографическую колонку, заполненную гранулированным гелем. Гранулы геля обладают строго определённым размером внутренних пор. Молекулы, достаточно малые, чтобы проникать в эти поры, задерживаются в колонке, тогда как более крупные молекулы, не способные войти внутрь гранул, быстрее проходят через межгранульное пространство. С использованием детектора на выходе колонки измерялись кинетики изменения оптической плотности от объема выхода образца в проточной ячейке.

Были получены зависимости оптической плотности на 280 и 410 нм от объема выхода раствора альбумина при добавлении ThT и без него (рис. 23). В данном исследовании были рассмотрены бычий сывороточный альбумин БСА и сывороточный альбумин человека САЧ. Длины волн регистрации были выбраны по следующему принципу: 280 нм – максимум спектра поглощения альбумина, 410 нм – максимум спектра поглощения ThT в растворе белка.

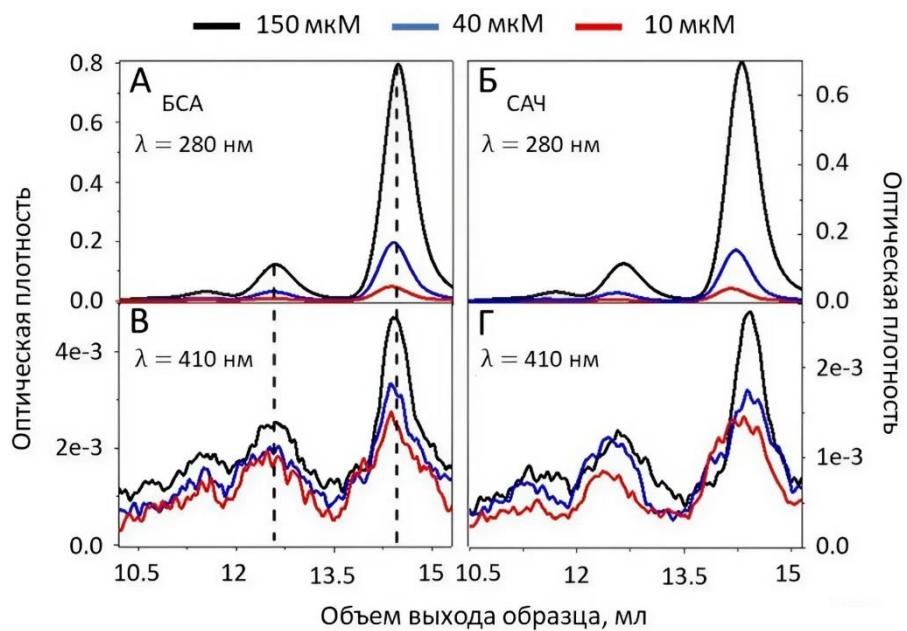


Рисунок 23 – А, Б) Поглощение олигомерных фракций альбумина (БСА и САЧ) на 280 нм, разделенных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии. Коэффициент молярной экстинкции на 280 нм для БСА и САЧ составляют $43\ 824\ M^{-1}\ cm^{-1}$ и $35\ 700\ M^{-1}\ cm^{-1}$, что объясняет разницу в амплитудах пиков на панелях А и Б. В, Г) Поглощение ThT при образовании комплексов с олигомерными фракциями альбумина на 410 нм, разделенных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии. $C_{ThT} = 80\ \mu M$; черные, синие и красные кривые соответствуют 150, 40 и 10 μM белка. Кривые были получены с использованием колонки для гель-фильтрации Superdex200 Increase 10/300 (~ 24 мл) со скоростью элюции 1,5 мл / мин. Объем нанесения – 100 мкл.

Анализируя зависимости оптической плотности растворов при детектировании на 280 нм видно, что исходный раствор альбумина имеет три различимые олигомерные фракции: мономеры (объем выхода 14 мл), димеры (объем выхода 12.8 мл) и тримеры (объем выхода 11.5 мл). Принимая во внимание, что коэффициент молярной экстинкции для димеров в два раза выше, чем для мономеров, из сопоставления амплитуд пиков было показано, что димерная фракция белка не является незначительной и составляет 7% мономерной фракции. Из рис.23 В и Г видно, что ThT в основном связывается в мономерную и димерную фракции альбумина, приблизительно в

соотношении 2:1, которое может быть получено из соотношения соответствующих оптических плотностей.

Таблица 4. Концентрация мономерной (C_M), димерной (C_D) и тримерной (C_T) фракций альбумина, а также концентрация ThT, связанного в мономеры (C_{M-ThT}) и димеры (C_{D-ThT}), рассчитанные из данных, представленных на рис.23. Концентрация альбумина 150 мкМ. Концентрация ThT 20 мкМ. Все концентрации представлены в мкМ.

	Белок	БСА	САЧ
C_M	17.9	18.5	
C_D	1.36	1.40	
C_T	0.23	0.24	
C_D/C_M	0.076	0.075	
C_T/C_M	0.014	0.013	
C_{M-ThT}	0.17	0.21	
C_{D-ThT}	0.08	0.11	
K^D/K^M	6.2	7.4	

Анализируя полученные значения оптических плотностей и определяя относительные концентрации мономерной C_M и димерной C_D фракций белка, а также ThT, встроенного в данные фракции C_{M-ThT} и C_{D-ThT} , соответственно, было рассчитано соотношение констант комплексообразования для систем ThT-мономер (K^M), ThT-димер (K^D):

$$\frac{K^D}{K^M} = \frac{C_{D-ThT} \cdot C_M}{C_{M-ThT} \cdot C_D} \quad (24)$$

Рассчитанные значения соответствующих концентраций представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы 4, константа комплексообразования при образовании комплекса ThT с димерами БСА примерно в шесть раз выше, чем при образовании комплекса с мономерами, что согласуется с результатами, полученными с помощью лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на наносекундном временном масштабе для a_2 и a_3 (рис.22 Г). Данный факт может означать, что в димере на границе раздела между мономерами альбумина образуется новый сайт связывания, который имеет более высокое сродство к ThT. Следует отметить, что каждый димер уже обладает двумя сайтами связывания ThT, расположенными в его мономерах. Таким образом, относительное содержание связанного с димером ThT, определяемое с помощью гель-фильтрационной хроматографии, увеличивается, тогда как в случае лазерной кинетической флуоресцентной спектроскопии на наносекундном временном масштабе константы диссоциации рассчитываются независимо для различных сайтов связывания. Это может объяснить несколько повышенное значение K^D/K^M , полученное с помощью гель-фильтрационной хроматографии (таблица 4) по сравнению с тем же соотношением, определенным с помощью время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии (рис.22).

Для того, чтобы дополнительно исследовать димерную фракцию и определить, имеет ли место в растворе альбумина быстро установившееся обратимое равновесие, был проведен следующий эксперимент. Предварительно отобранные мономерная (М) и димерная (Д) фракции раствора альбумина были повторно пропущены через гель-фильтрационную колонку. Соответствующие зависимости оптической плотности растворов на

длине волны 280 нм от объема выхода образца представлены на рис.24. Из данного рисунка видно, что в течение \sim 1 часа, компонентный состав раствора мономеров (М) и димеров (Д) остался неизменным. При этом в системе не наблюдается быстро устанавливающегося обратимого равновесия $D \leftrightarrow 2M$. Таким образом, димеры в растворе альбумина являются стабильными и образованы в результате ковалентного взаимодействия мономеров, и их учет необходим для корректной оценки эффективности комплексообразования альбумина с любыми молекулами, что было доказано в данной работе на примере ThT.

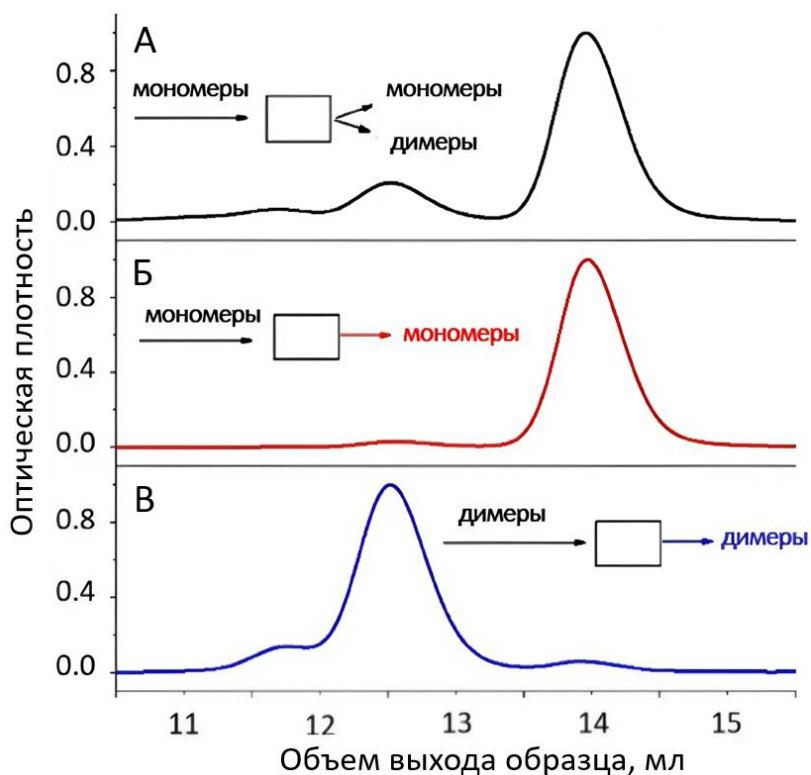


Рис.24. Нормированные на интервал [0,1] зависимости оптической плотности раствора БСА при детектировании на 280 нм для А - исходного раствора БСА с концентрацией 150 мкМ, Б – предварительно отобранной мономерной фракции БСА, повторно пропущенной через колонку, В – предварительно отобранной димерной фракции БСА, повторно пропущенной через колонку. Кривые были получены с использованием колонки для гель-фильтрации Superdex200 Increase 10/300 (\sim 24 мл) со скоростью элюции 1,5 мл / мин. Объем нанесения – 100 мкл.

2.3 Асинхронное поведение фотофизических характеристик ThT при образовании комплекса с белком.

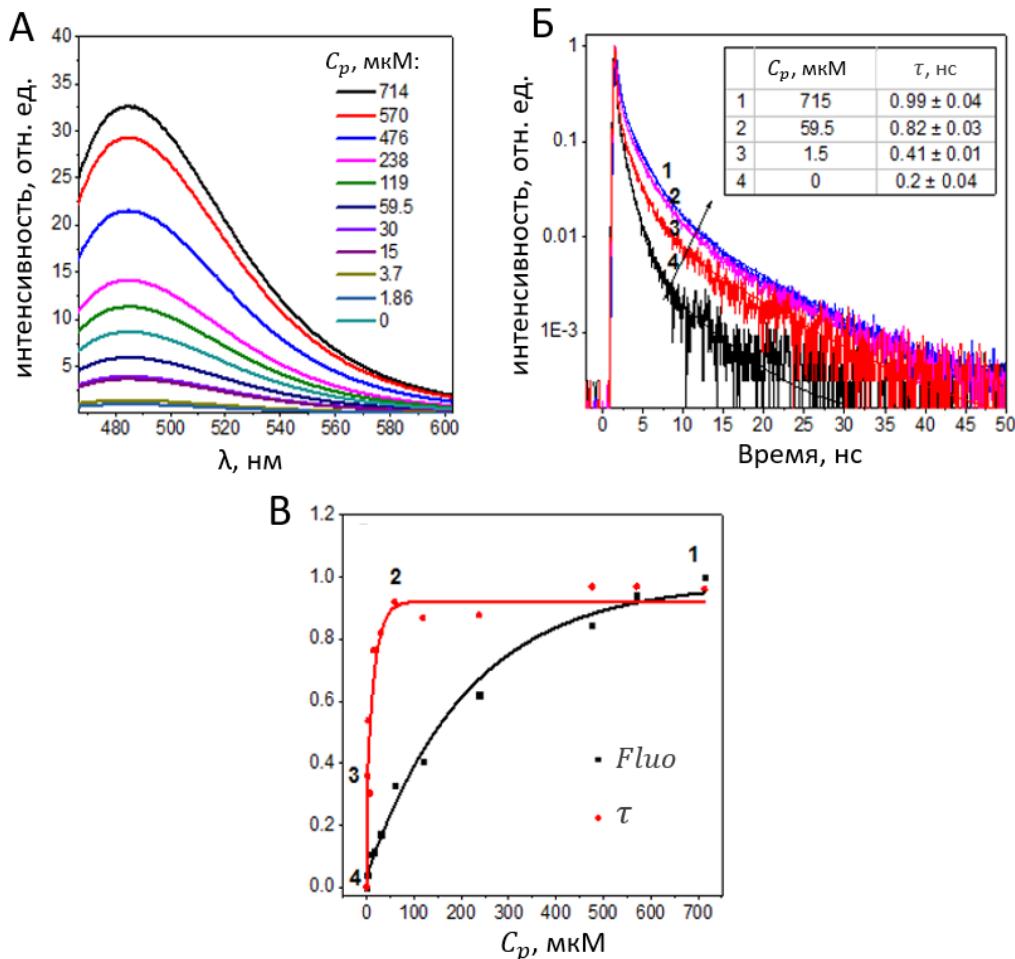


Рисунок.25. А. Спектры флуоресценции тиофлавина Т при различных концентрациях α -ЛА в растворе при возбуждении на длине волны 410 нм. Б. Кинетика затухания флуоресценции ThT при различных концентрациях α -ЛА в растворе и возбуждении на длине волны 405 нм. Сплошные кривые соответствуют аппроксимации кинетики затухания флуоресценции трехэкспоненциальным законом. В. Зависимость среднего времени жизни (красная линия, τ , пс) и максимума (черная кривая, $Fluo$) флуоресценции ThT от концентрации белка. Сплошная линия соответствует аппроксимации полученных зависимостей уравнением 30 при стехиометрии связывания 1:1. Константы комплексообразования для обеих зависимостей составители $K = (8.3 \pm 1.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(1.9 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, соответственно. Кривые нормированы на интервал [0;1].

Для дальнейшего исследования природы мод связывания и фотофизических характеристик ThT в работе был подробно изучен процесс образования комплекса ThT с модельным белком α -лаклальбумином (α -LA). В процессе образования комплекса между тиофлавином Т и белком α -LA наблюдается схожее с альбумином поведение зонда. На рис. 25 А показаны спектры флуоресценции ThT при различных концентрациях α -LA. Также, как и при связывании с альбумином, интенсивность флуоресценции ThT увеличивается при добавлении 700 мкМ белка в раствор 2 мкМ зонда и возрастает в 32,5 раза, что указывает на взаимодействие в системе (рис. 25.А).

На рис.25 Б показано изменение кинетики затухания флуоресценции ThT при добавлении в раствор белка. Среднее время жизни флуоресценции определялось путем аппроксимации кривых на рис.25 Б трехэкспоненциальным законом (формула 23). Тогда как параметр τ достигал плато при 50 мкМ α -LA и составлял 990 ± 40 пс, выход на плато зависимости $Fluo$ от C_P наступал при гораздо более высоких концентрациях, ~1 мМ, а фактор усиления флуоресценции составлял 32,5 (рис.25 В). Значения константы комплексообразования K , полученные из указанных зависимостей с помощью формулы 20, составляли $K = (8.3 \pm 1.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(1.9 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, соответственно, то есть, отличались в ~40 раз.

Подобная динамика поведения фотофизических параметров тиофлавина Т была получена при исследовании процесса его связывания с рядом других белков, таких как лизоцим (Lys), лактоглобулин (β -LG), карбоангидраза (CA), ингибитор трипсина сои (STI), тиреоглобулин (Tg), α -кристиалин (α -Cr). На рис. 26 показана зависимость интенсивности флуоресценции ThT при образовании комплекса с белком по сравнению с водным раствором, $Fluo$, а также зависимость среднего времени жизни τ , рассчитанного по формуле 23, при аппроксимации кинетик затухания флуоресценции ThT трехэкспоненциальным законом затухания от концентрации белка. Из рисунка

видно, что время жизни флуоресценции ThT выходит на плато при более низкой концентрации белка по сравнению с интенсивностью флуоресценции ThT для всех систем.

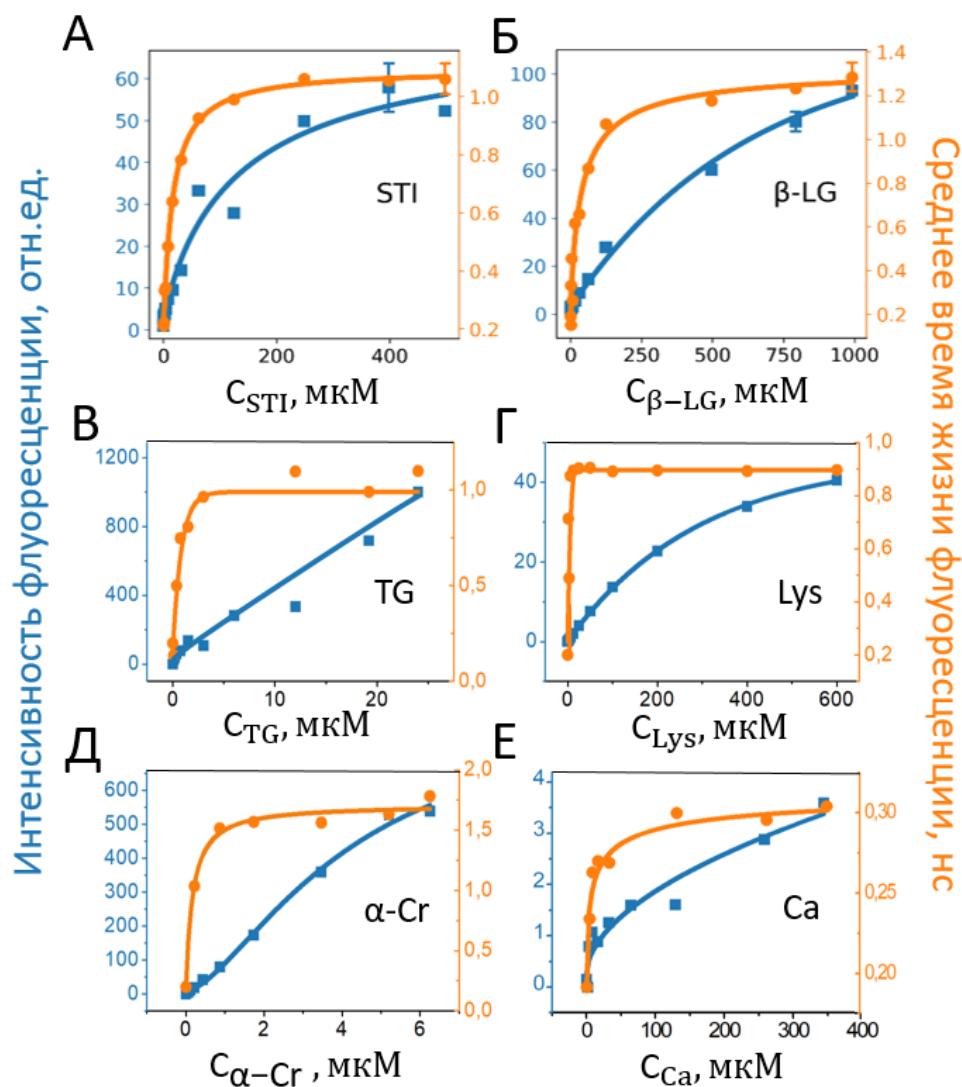


Рисунок.26. Зависимость максимума (синяя линия, *Fluo*) и среднего времени жизни (оранжевая линия, τ , пс) флуоресценции ThT от концентрации белка: А - ингибитор трипсина сои (STI), Б - β -лактоглобулин (β -LG), В - тиреоглобулин (Tg), Г - лизоцим (Lys), Д - α -кристиалин (α -Cr), Е - карбоангидраза (CA). Сплошная линия соответствует аппроксимации полученных зависимостей уравнение (20) при стехиометрии связывания 1:1.

Для детальной характеристики сайтов связывания тиофлавина Т в глобулярных белках и анализа изменений его фотофизических свойств при

образовании комплекса с белковыми структурами были определены следующие параметры в условиях полного связывания зонда: положение максимума спектра поглощения, фактор усиления флуоресценции ThT при образовании комплекса с белком относительно флуоресценции ThT в водном растворе, среднее время жизни флуоресценции, константа комплексообразования, определенная при аппроксимации зависимости фактора усиления флуоресценции от концентрации белка (формула 20). Данные параметры приведены в таблице 6.

В настоящей работе дополнительно проводился комплексный анализ временных характеристик флуоресценции с использованием двух взаимодополняющих подходов к расчету среднего времени жизни. Основной анализ выполнялся путем расчета среднего времени жизни флуоресценции τ , взвешенного по амплитуде, которое определялось согласно уравнению 23. Данный параметр чувствителен к вкладу компонент с коротким временем жизни в системах, описываемых мультиэкспоненциальным законом затухания. Дополнительно был реализован расчет среднего времени жизни флуоресценции, как взвешенного по интенсивности среднего отдельных экспоненциальных компонент [126]. Данный параметр чувствителен к вкладу компонент с длительным временем затухания, часто маскируемых в традиционном анализе и вычисляется по формуле:

$$\tau' = \frac{\sum_{i=1}^n \tau_i^2 a_i}{\sum_{i=1}^n \tau_i a_i}, \quad (25)$$

где n — количество используемых компонент, a_i — амплитуда i -го компонента в законе затухания, τ_i — время жизни i -го компонента. Некоторые исследования оценивают параметр τ' или оба параметра τ и τ' , в том числе при анализе фотофизических процессов в гетерогенных системах [127]. Так, в работе на примере системы ThT - β - LG показано, что несмотря на различия абсолютных значений параметров τ и τ' , они демонстрируют согласованный

характер изменения в результате связывания ThT с белком, существенно возрастая с увеличением концентрации белка (таблица 5, рис. 27). Это подтверждает, что каждый из параметров, будучи независимым, отражает одни и те же фундаментальные процессы в системе.

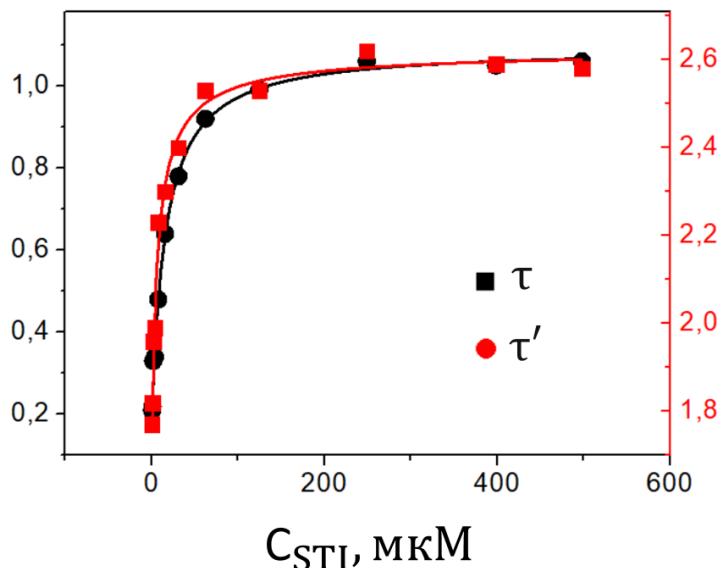


Рисунок 27. Зависимость среднего времени жизни флуоресценции ThT τ (черные символы) и τ' (красные символы) от концентрации белка. Параметры аппроксимации кинетики затухания флуоресценции представлены в таблице. Концентрация тиофлавина составляла $C_{ThT} = 2 \text{ мкМ}$.

Из таблицы 6 видно, что для всех исследуемых систем константы ассоциации отличаются не более, чем на порядок. Изменение положения полосы поглощения тиофлавина Т по сравнению с водным раствором не превышает 3 нм. В то же время встраивание зонда в данные белковые структуры (молекулярная масса варьируется от 14 до 69 кДа) вызывает рост интенсивности флуоресценции примерно в 10 раз. Полученные значения близки к параметрам, наблюдаемым для системы тиофлавин Т – БСА. Исключение составляют белки, обладающие сложной олигомерной структурой: α -Cr, относящийся к классу белков теплового шока и

Таблица 5. Значение параметров, полученных в результате аппроксимации кинетики затухания флуоресценции ThT трехэкспоненциальным законом, при увеличении концентрации белка: амплитуда i -го компонента в законе затухания a_i , время жизни i -го компонента τ_i , τ и τ' - значения среднего времени жизни флуоресценции ThT, рассчитанного в соответствии с формулами (23) и (25).

C_{STI} , мкМ	a_1	τ_1	a_2	τ_2	a_3	τ_3	τ	τ'
498	62	0,38	35	1,76	3	7,41	1,06	2,58
398,4	62	0,37	35	1,77	3	7,44	1,05	2,59
249	63	0,37	35	1,8	2	7,61	1,06	2,62
124,5	64	0,34	33	1,7	3	7,05	0,99	2,53
62,25	65	0,3	32	1,66	3	7,02	0,92	2,53
31,13	68	0,23	29	1,51	3	6,33	0,78	2,4
15,6	73	0,18	24	1,42	3	6,07	0,64	2,3
7,8	79	0,13	19	1,38	2	6	0,48	2,23
3,9	84	0,1	14	1,3	2	5,33	0,34	1,99
1,95	86	0,11	12	1,31	2	5,74	0,33	1,96
0,97	91	0,08	8	1,18	1	5,17	0,22	1,82
0,48	92	0,08	7	1,22	1	5,5	0,21	1,77

проявляющий шаперонную активность [128,129]; а также Tg, являющийся димером [130], для которого не удалось зарегистрировать выход на плато зависимости роста интенсивности флуоресценции в исследуемом диапазоне концентраций белка. При связывании с данными белками для тиофлавина Т наблюдается больший фактор усиления флуоресценции по сравнению со значением данного параметра при образовании комплекса с мономерными белками, при этом значительного сдвига положения максимума спектра

поглощения тиофлавина Т при встраивании в α -Cr и Tg также не наблюдается (отметим, что данный параметр для системы фибриллы-тиофлавин Т составляет ~ 40 нм). Отсутствие значительного сдвига максимума спектра положения и одновременный рост интенсивности флуоресценции ThT при встраивании в α -Cr и Tg более чем в 500 раз позволяет предположить, что в данных системах присутствуют множественные сайты связывания, что объясняет более высокое значение фактора усиления флуоресценции по сравнению с другими белками.

Таблица 6. Сравнение фотофизических параметров тиофлавина Т при связывании с белками: максимума спектра поглощения тиофлавина Т, $\lambda_{\text{погл}}$, среднего времени жизни, τ ; усиления флуоресценции тиофлавина Т в белковых структурах по сравнению с водным раствором, $Fluo$; а также константы комплексообразования, K , и молекулярной массы исследуемых белковых структур, MW.

	MW, kDa	$\lambda_{\text{погл}}, \text{нм}$	$\tau, \text{пс}$	$Fluo$	$K \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
α -LA	14	412	900	35	8.3
Lys	14.3	412	900	40.7	2.60
β -LG	18.4	410	1200	60	1.60
CA	29	412	330	3.6	22.2
STI	20.1	412	900	22.8	10.9
Tg	670	415	1100	~ 1000	-
α -Cr	800	415	1800	546	17.2
BCA	69	413	840	35	4.95

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что все исследованные глобулярные белки способны неспецифично связывать тиофлавин Т (константа связывания $\sim 10^3\text{-}10^4$ М), при этом имеет место рост времени жизни флуоресценции зонда и усиление его флуоресценции при незначительном (не более 3 нм) сдвиге положения максимума спектра поглощения по сравнению с системой ThT-фибриллы. Более того, для всех исследуемых систем также наблюдается асинхронное изменение среднего времени жизни и интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при связывании (рис. 26).

Данные, представленные на рис. 22 Б, 25 В, 26, вызывают два вопроса. Во-первых, в то время как для полностью связанного ThT в белок наблюдалось ~ 1000 -кратное увеличение τ , коэффициент усиления флуоресценции $Fluo$ составлял всего несколько десятков. Как уже упоминалось ранее, ThT относится к классу молекулярных роторов. Сверхбыстрая релаксация флуоресценции свободного ThT обусловлена процессом внутреннего переноса заряда, сопровождаемым поворотом фрагментов молекулы друг относительно друга, (torsional internal charge transfer, TICT состояние) при возбуждении, что приводит к безызлучательной релаксации во временном масштабе ~ 1 пс [14,54,55]. Жесткая фиксация ThT при встраивании в соответствующие сайты связывания, например, в фибриллах, предотвращает этот путь релаксации, что приводит к резкому снижению скорости безызлучательного распада k_{nr} до $\sim (1 \text{ нс})^{-1}$ [14]. Интенсивность флуоресценции $Fluo$ изменяется пропорционально времени жизни флуоресценции τ и зависит от скорости радиационного k_r и нерадиационного k_{nr} распада. Таким образом, при встраивании ThT в сайт связывания с последующей жесткой фиксацией зонда, интенсивность и время жизни флуоресценции должны одновременно увеличиваться в 1000 раз. Однако экспериментальные данные этого не подтверждают: полное связывание ThT с

белками вызывает 10-кратное увеличение интенсивности флуоресценции ThT при росте времени жизни до ~ 1 нс.

Во-вторых, при исследовании образования комплекса ThT с белками наблюдается асинхронность динамики изменения фотофизических характеристик зонда *Fluo* и τ с увеличением концентрации белка, C_p . Данный факт позволяет предположить, что за этот эффект могут быть ответственны разные процессы, происходящие в системе, например, молекула ThT связывается с разными сайтами связывания с разной константой комплексообразования K .

Для количественного объяснения выявленного несоответствия между усилением интенсивности и времени жизни флуоресценции, а также асинхронной динамики изменения *Fluo* и τ в зависимости от концентрации белка, было проведено математическое моделирование кинетики затухания флуоресценции ThT в системе с двумя модами связывания с временами релаксации возбужденного состояния ~ 1 пс и 1 нс. С помощью данного моделирования была исследована роль молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией при анализе неспецифического взаимодействия флуоресцентного зонда с белками.

2.4 Роль молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией в исследовании его взаимодействия с белками

Для анализа асинхронного поведения фотофизических характеристик ThT при образовании комплекса с белком было проведено численное моделирование кривых затухания флуоресценции в двухкомпонентной системе со следующими параметрами: $\tau_1 \ll \tau_{\text{IRF}}, \tau_2 \gg \tau_{\text{IRF}}$, где τ_{IRF} – аппаратная функция установки, типичная ширина которой для систем с времязадержкой счетом фотонов составляет $\tau_{\text{IRF}} \sim 200$ пс. Такие соотношения

справедливы для системы ThT-белок, где $\tau_1 = 1$ пс время жизни флуоресценции свободного ThT, $\tau_2 = 990$ пс время жизни флуоресценции связанного ThT. Затухание флуоресценции в такой системе можно описать следующим уравнением:

$$\frac{dn_i}{dt} = I(t) \cdot \sigma \cdot (1 - n_i) - n_i / \tau_i, \quad (26)$$

где n_i , σ_i , и τ_i соответствуют концентрации возбужденного состояния, сечению поглощения и времени жизни флуоресценции i -й компоненты соответственно, а $I(t)$ - временной профиль лазерного импульса. Затухание флуоресценции в такой системе можно описать следующим уравнением:

$$Fluo(t) = C_1 \cdot n_1(t) \cdot k_{r1} + C_2 \cdot n_2(t) \cdot k_{r2}, \quad (27)$$

где C_i и k_{ri} - концентрация и скорость радиационного распада i -й компоненты.

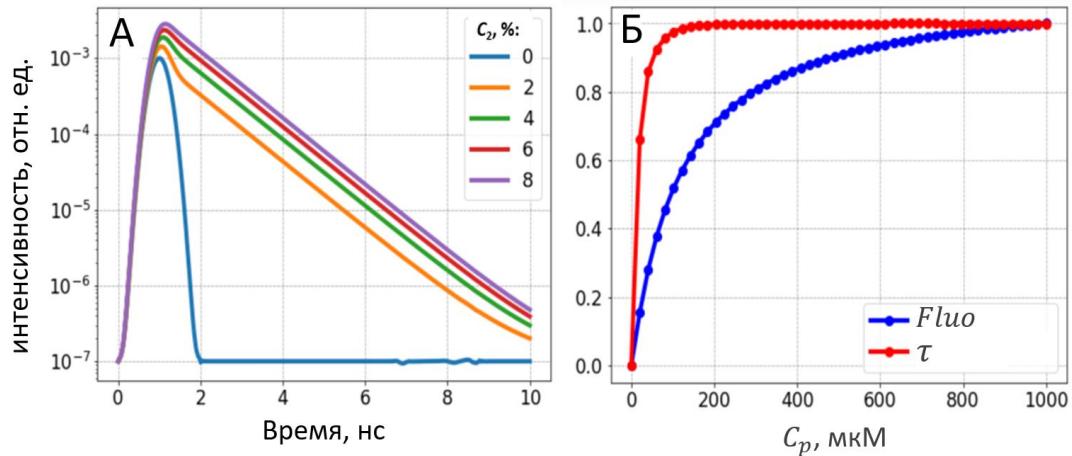


Рисунок 28. А. Кривые затухания флуоресценции двухкомпонентной системы, вычисленные с помощью формул 23, 26, 27 для различных соотношений концентраций компонент C_2/C_1 . $\tau_1 = 1$ пс, $\tau_2 = 990$ пс, $\tau_{IRF} = 200$ пс. Б. Зависимость интегральной интенсивности и среднего времени жизни флуоресценции ThT от концентрации белка. $K = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Кривые нормированы на интервал [0;1].

На рис. 28.А представлены модельные кривые затухания флуоресценции для описанной двухкомпонентной системы при различных соотношениях

C_2/C_1 и равных значениях сечения поглощения и скорости радиационного затухания компонент. Временная зависимость интенсивности лазерного импульса была выбрана в виде гауссовой кривой с полушириной 200 пс.

Далее был произведен расчет концентрации свободного (C_1) и связанного (C_2) ThT с помощью уравнения 20 и параметров $K = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $C_{\text{ThT}} = 2 \mu\text{M}$. Используя полученные значения C_1 и C_2 с использованием уравнений (26), (27) было произведено математическое моделирование кривых затухания флуоресценции. Рассчитанные кривые затухания флуоресценции были аппроксимированы двухэкспоненциальным законом затухания (формула 21), были определены значения среднего времени (формула 23) и интенсивности флуоресценции, рассчитанной как интеграл под кинетикой затухания флуоресценции. Зависимость данных параметров от концентрации белка C_p представлена на рис. 28 Б. и демонстрирует ту же тенденцию, что наблюдалась в эксперименте для систем белок-ThT (рис. 22 Б, 25 В, 26): время жизни флуоресценции ThT достигает плато при C_p , намного меньшем, чем требуется для насыщения интенсивности флуоресценции. Результаты моделирования показывают, что в то время как амплитуда второй (медленной) компоненты увеличивается на протяжении всего лазерного импульса вследствие эффективного накопления возбужденных молекул с $\tau_2 >> \tau_{\text{IRF}}$, амплитуда первой (быстрой) компоненты мала из-за ее немедленной релаксации после поглощения фотона. Следовательно, уже при $C_2 / C_1 \sim 5\%$ быстрая компонента практически не видна, и аппроксимация соответствующей кривой биэкспоненциального затухания флуоресценции приводит к значениям времени жизни, аналогичным значениям времени жизни в приближении одной (медленной) составляющей. То есть, амплитуды компонент затухания флуоресценции a_i в формуле 21 при конечном τ_{IRF} определяются не только их концентрациями, но и временем жизни флуоресценции: при равных концентрациях отношение $a_1 / a_2 \approx \tau_{\text{IRF}} / \tau_2$. Иными

словами, наличие небольшой доли ($\sim 5\%$) ThT с временем релаксации ~ 1 нс может полностью маскировать вклад ThT со сверхбыстрой релаксацией в кривую затухания флуоресценции. Зависимость среднего времени жизни при этом выходит на насыщение при меньших концентрациях белка в растворе, чем интенсивность флуоресценции. При измерении на установке с длительностью возбуждающего импульса $\sigma \sim 100$ пс происходит свертка возбуждающего импульса с кинетикой затухания флуоресценции. При этом амплитуда компоненты с быстрым затуханием τ умножается на $\sim \exp(-x^2) \cdot \text{erfc}(x)$, где $x = \sigma/\sqrt{2}\tau$. При $\tau = 1$ пс и $\sigma = 100$ пс этот множитель равен 0.008. Таким образом, даже небольшая (>0.008) доля специфических сайтов связывания ThT с характерным временем затухания флуоресценции ~ 1 нс может маскировать вклад молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией в кинетику затухания флуоресценции.

2.5 Регистрация свободных и связанных молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией с помощью метода ап-конверсии флуоресценции

Расхождение роста интенсивности и времени жизни флуоресценции, наблюдаемое для системы ThT-белок, требует объяснения. Даже при концентрациях белка, когда интенсивность флуоресценции ThT достигает плато, и весь ThT связан с белком, усиление флуоресценции составляет ~ 40 . При этом время жизни флуоресценции ThT возрастает от 1 пс до ~ 1 нс, то есть изменение достигает 1000, что сильно больше, чем значение для увеличения интенсивности. Для изучения указанного несоответствия в работе кинетики затухания флуоресценции ThT при полном связывании с белком были исследованы с использованием метода ап-конверсии флуоресценции с временным разрешением 200 фс. Временное разрешение было определено как

ширина аппаратной функции установки, измеренная по сигналу комбинационного рассеяния воды.

На временном диапазоне 12 пс были измерены кинетики затухания свободного и полностью связанного зонда ThT с белками α -LA, STI и БСА (рис. 29). Время затухания флуоресценции свободного ThT составило 0.95 пс.

Кинетика затухания флуоресценции ThT аппроксимировалась экспоненциальным распадом с двумя компонентами (формула 20). Результаты аппроксимации представлены в таблице 7. Первая компонента с временем жизни 0.95 пс соответствует свободному ThT, присутствующему в растворе, а также молекулам ThT, неспецифично связанным с белком. Вторая компонента с характерным временем жизни \sim 10 пс предположительно соответствует фракции ThT, связанной в сайты с более жестким микроокружением. Более того, при анализе экспериментальных данных во всех исследованных системах наблюдалась компонента с длительным временем затухания (\sim 1 нс). Тем не менее, данная компонента не может быть разрешена из-за ограничений установки, что делает невозможным его прямое сравнение со значениями, полученными с при анализе кинетик затухания флуоресценции, измеренных методом лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на наносекундном временном масштабе. В системе ThT-белок для всех исследуемых систем наблюдается слабое неспецифическое взаимодействие с ThT (константа комплексообразования 10^3 М^{-1}), что сопровождается (i) слабым усилением флуоресценции (\sim 40) и (ii) наличием сверхбыстрой компоненты в затухании флуоресценции. Этот факт объясняет низкий фактор усиления интенсивности флуоресценции для системы ThT-белок и служит дополнительным доказательством того, что асинхронное изменение интенсивности флуоресценции и времени жизни при увеличении концентрации белка связано с невозможностью определить быструю компоненту при измерении кинетики затухания флуоресценции с помощью

техники лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на наносекундном временном масштабе.

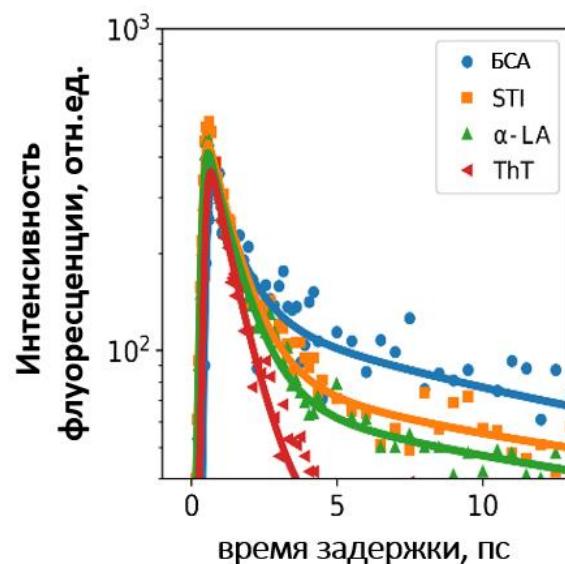


Рисунок 29. Кинетика затухания флуоресценции ThT в воде (красная линия) и при добавлении α -LA (зеленая), STI (оранжевая) и BSA (синяя), измеренные с помощью ап-конверсии. Концентрация тиофлавина Т во всех растворах составляла $2 \mu\text{M}$, $C_{\alpha\text{-LA}} = 714 \text{ мкM}$, $C_{\text{STI}} = 500 \text{ мкM}$, $C_{\text{BSA}} = 870 \text{ мкM}$.

Таким образом, исследование связывания тиофлавина Т с различными глобулярными белками с помощью стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии с субнано- и субпикосекундным временным разрешением позволило наблюдать слабое неспецифическое взаимодействие ThT-белок, которое сопровождалось слабым усилением флуоресценции (фактор усиления ~ 40), а также охарактеризовать долю связанных молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией возбужденного состояния ($>80\%$ молекул ThT).

Таблица 7. Сравнение фотофизических параметров ThT при связывании с различными белками (среднее время жизни, измеренное с использованием методом лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на наносекундном временном масштабе τ , фактор усиления флуоресценции $Fluo$ (отношение интенсивности флуоресценции ThT при встраивании к интенсивности флуоресценции зонда в водном растворе) и параметры аппроксимации кинетики затухания флуоресценции ThT, измеренные с использованием метода ап-конверсии флуоресценции (τ_1 было зафиксировано и равнялось значению времени жизни флуоресценции ThT в водном растворе).

Белок	$Fluo$	τ , нс	ап-конверсия флуоресценции		
			τ_1 , пс	τ_2 , пс	a_1 / a_2
ThT	-	0.200 ± 0.05	0.95	--	--
α -LA	32,5	0.99 ± 0.05	0.95	11.9 ± 2.6	9.2 ± 1.7
STI	52	1.06 ± 0.05	0.95	11.2 ± 2.1	8.5 ± 1.1
БСА	35	0.84 ± 0.05	0.95	12.3 ± 4.1	2.8 ± 0.5

Основные выводы к главе 2

В данной главе было изучено образование комплекса ThT с макромолекулами белка. Хотя ThT считается флуоресцентным зондом, специфически встраивающимся в фибриллы, он также демонстрирует низкоспецифичное связывание (константа комплексообразования $K \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$) с белками и их олигомерами низкого порядка, в структуре которых отсутствуют β -листы, характерные для фибриллярных структур. Так, в ходе проделанной работы с использованием метода стационарной флуоресцентной спектроскопии была определена констант комплексообразования для ThT при

встраивании в альбумин, которая составила $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. С использованием лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на наносекундном масштабе с временным разрешением ~ 200 пс было определено, что при образовании комплекса с альбумином у ThT существует две моды встраивания со схожими фотофизическими характеристиками зонда в них. Для субпопуляции связанного тиофлавина Т с временем затухания флуоресценции $\tau_3 = 2100$ пс была получена константа комплексообразования, составляющая $2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, для субпопуляции связанного тиофлавина Т с временем затухания флуоресценции $\tau_3 = 800$ пс $5.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Результаты анализа поглощения белка на 280 нм и поглощения тиофлавина Т в белковых фракциях на 410 нм, разделенных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии, показали, что в растворе альбумина также есть димерная фракция, афинность связывания тиофлавина Т в которую в ~ 7 раз выше, чем в мономерную фракцию. Было показано, что образованные димеры являются стабильными структурами, и в системе отсутствует обратимое $D \leftrightarrow 2M$ -равновесие. Таким образом, димеры в растворе альбумина являются стабильными и образованы в результате ковалентного взаимодействия мономеров, и их учет необходим для корректной оценки эффективности комплексообразования альбумина с любыми молекулами, что было показано в данной работе на примере ThT. Данные результаты являются актуальными, т.к. роль олигомеров альбумина низкого порядка, а именно димеров, часто недооценивается при исследовании связывания лигандов с альбумином, поскольку в случае димеризации может образовываться новый сайт связывания, сформированный на границе раздела субъединиц.

Также в ходе проделанной работы было установлено, что оптические свойства ThT при взаимодействии с белками, а именно интенсивность и среднее время жизни флуоресценции при различных концентрациях белка, изменяются асинхронно. Было обнаружено, что время жизни флуоресценции

ThT, измеренное с разрешением порядка долей наносекунды, достигает плато при концентрациях белка, намного меньших, чем концентрации, необходимые для насыщения интенсивности флуоресценции. Более того, хотя наблюдалось увеличение времени жизни ThT с ~ 1 пс до ~ 1 нс для всех исследуемых систем, интенсивность флуоресценции ThT увеличилась только в несколько десятков раз. Для объяснения наблюдаемого расхождения между изменением интенсивности и временем затухания флуоресценции было выполнено численное моделирование двухкомпонентной системы со сверхбыстрой ($\tau \ll \tau_{\text{IRF}}$) и медленной ($\tau \gg \tau_{\text{IRF}}$) компонентами. Было продемонстрировано, что присутствие даже небольшой доли компоненты с наносекундным временем затухания флуоресценции эффективно маскирует вклад сверхбыстрой компоненты в кривую затухания флуоресценции, измеренную на субнаносекундном диапазоне. Из чего следует, что наблюдаемое насыщение времени жизни ThT при низкой концентрации белка в растворе может быть связано с появлением нескольких процентов фракции ThT, встроенного в белок. Дополнительно с использованием метода ап-конверсии флуоресценции при возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами с временным разрешением 200 фс в диапазоне времен 200 фс – 12 пс после возбуждающего импульса было показано наличие связанный субпопуляции ThT со сверхбыстрой релаксацией, которая может быть ответственна за низкое усиление флуоресценции ThT при связывании с белком. Полученные в главе результаты являются новыми и имеют большое значение при дальнейшем исследовании взаимодействия ThT с белками и другими системами, демонстрирующими низкую специфичность, например, при анализе связывания зонда с неспецифическими агрегатами белка, что будет более подробно исследовано в следующей главе.

Глава 3. Анализ фотофизических характеристик тиофлавина Т при связывании с фибриллярными наноструктурами в процессе их образования

В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A3, A4]. Данное исследование направлено на анализ специфичного связывания тиофлавина Т с фибриллярными наноструктурами и изучение кинетики данного процесса с использованием фотофизических свойств зонда. Как и в случае неспецифичного связывания зонда с белками, было показано, что изменение фотофизических характеристик ThT при образовании комплексов с фибриллярными наноструктурами происходит асинхронно. Для объяснения этого эффекта в работе были проанализированы кинетики затухания флуоресценции с временным разрешением ~200 фс с помощью метода лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на пикосекундном временном масштабе. С помощью данного метода были исследованы растворы ThT в присутствие белковых агрегатов на разной стадии формирования фибрилл. Было продемонстрировано различие фотофизических параметров ThT при анализе затухания флуоресценции на субнаносекундном временном диапазоне на разных стадиях формирования фибриллярных наноструктур. Также был проведен дополнительный анализ кинетики агрегации белков путем определения параметров рассеяния раствора, определения размеров образующихся олигомеров и гетерогенности их размера. Для этого в работе были использованы метод динамического рассеяния света и анализа траекторий наночастиц наблюдаемых с помощью оптической микроскопии. С использованием данных техник было показано, что изменение параметров рассеяния и гетерогенности раствора, а также изменения формы и размеров агрегатов демонстрируют различный характер поведения при исследовании одной и той же системы, что позволяет получить

дополнительную информацию о процессе формирования фибриллярных наноструктур при совместном использовании нескольких методов.

3.1 Объекты и методы исследования

3.1.1 Методы изготовления образцов

В данной работе было проведено исследование кинетики формирования фибрилл и изменения фотофизических свойств тиофлавина Т в результате данного процесса. Фибриллы из белка человеческого рекомбинантного инсулина (PanEco, Москва, Россия) были получены путем термического воздействия при температуре 62°С в течении 10-400 минут согласно методике, описанной в работе [131]. Инсулин с концентрацией 26 μM добавлялся в раствор 25 mM соляной кислоты HCl (значение pH раствора составляло 2.0) и 0.1 M NaCl для поддержания ионной силы. Концентрация ThT (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США) в растворе была постоянной и составляла 2 мкМ.

Для экспериментов по анализу траекторий наночастиц дополнительно были приготовлены образцы фибрилл в присутствие производной тиофлавина Т: флуоресцентного зонда 2M-DMASEBT (транс2 - ('-(диметиламино)-2,6-диметилстирил) -3-этил-1,3-бензотиазол тозилат), химическая структура которого представлена на рис.30 [132]. Флуоресцентный краситель 2M-DMASEBT был предоставлен группой А. А. Маскевича и В. И. Степуро из Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь. Раствор фибрилл из инсулина был исследован при постоянной концентрации 2M-DMASEBT 2 мкМ.

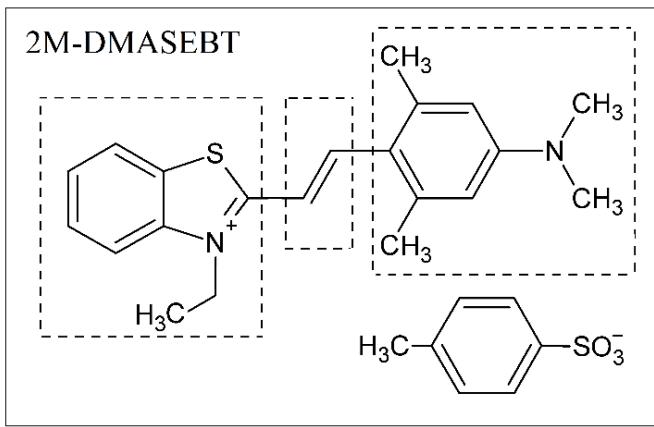


Рисунок 30. Химическая структура флуоресцентного зонда 2M-DMASEBT.

3.1.2 Метод динамического рассеяния света

Анализ кинетики изменения фотофизических характеристик тиофлавина Т в результате формирования фибрилл был дополнен исследованием изменения размера агрегатов макромолекул белка и гетерогенности системы в процессе агрегации. Для этого с помощью прибора Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) был реализован метод динамического рассеяния света. В качестве источника излучения данный прибор использует гелий-неоновый лазер мощностью 4 мВт и с длиной волны возбуждения 633 нм. Лавинный фотодиод детектирует флуктуации интенсивности обратного рассеяния на локальных неоднородностях показателя преломления (угол рассеяния 173°). Флуктуации интенсивности рассеянного света соответствуют флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц.

В ходе обработки для временной зависимости интенсивности вычисляется автокорреляционная функция второго порядка $g(t)^{(2)}$. Для того, чтобы определить характерное время релаксации флуктуаций, вычислить коэффициент диффузии и размер частиц, решается обратная задача рассеяния и вычисляется корреляционная функция первого порядка $g(t)^{(1)}$. Связь

корреляционных функций первого и второго порядков может быть описана соотношением Зигерта [133]:

$$g(t)^{(1)} = \frac{1}{\sqrt{\beta}} \sqrt{g(t)^{(2)}(t) - 1} \quad (28)$$

где β – фактор когерентности, который зависит от геометрии установки и соотношения объема диффузии и рассеивающего объема.

В приближении монодисперсного раствора невзаимодействующих сферических частиц одинакового размера автокорреляционная функция рассеянного света затухает экспоненциально:

$$g(t)^{(1)} = e^{-\Gamma t} = e^{-Dq^2 t} \quad (29)$$

где Γ – скорость релаксации, которая определяется через коэффициент диффузии D и волновой вектор q следующим образом:

$$\Gamma = D q^2 \quad (30)$$

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\vartheta}{2} \quad (31)$$

где n – показатель преломления среды, λ – длина волны падающего света, ϑ – угол рассеяния света.

В случае полидисперсного раствора для нахождения распределения частиц по размерам (коэффициентам диффузии) необходимо решать обратную задачу в виде интегрального уравнения следующего вида:

$$g(t)^{(1)} = \int F(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma \quad (32)$$

Формула Стокса-Эйнштейна позволяет определить зависимость коэффициента поступательной диффузии от размера сферических невзаимодействующих частиц:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (33)$$

где k_B - констант Больцмана, T - абсолютная температура и η - сдвиговая вязкость среды, в которой взвешены частицы радиуса R [134].

При исследовании фибриллообразования корреляционная функция затухала мульти-экспоненциально в силу высокой гетерогенности раствора со скоростью, зависящей от диффузии измеряемых частиц. Для оценки гетерогенности раствора и распределения частиц по размерам для каждого образца регистрировалось 100 автокорреляционных функций, для каждой из которой измерение занимало 1 с. Образцы помещались в одноразовые кюветы с оптическим путем 1 см. Математическая обработка измеряемых функций производилась с помощью алгоритма определения узких мод (Multiple Narrow Modes, MNM) метода регуляризации с ограничениями для решения обратных задач CONTIN (The Constrained Regularization Method for Inverting Data) [135–137]. Метод представляет собой численный подход для обратного преобразования экспериментально измеренной автокорреляционной функции в распределение частиц по размерам и основан на применении регуляризации Тихонова для минимизации влияния шумов на вид распределения. Данный подход сочетает регуляризацию Тихонова с методом, направленным на выделение узких мод в получаемом распределении частиц по размерам. Особенностью использованной реализации является введение дополнительных ограничений на ширину мод распределения и применение селективной регуляризации, позволяющей сохранять узкие пики при сохранении физической осмыслинности решения. Таким образом, основной минимизируемый функционал в алгоритме CONTIN, сочетающий критерий согласия с экспериментальными данными и регуляризацию Тихонова, может быть записан следующим образом:

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^N (1/\sigma_i^2) \left[g^{(1)}(\tau_j) - \int F(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma \right]^2 + \alpha^2 \|LF(\Gamma)\|^2, \quad (34)$$

где N – количество точек в экспериментальных данных, σ_i^2 – квадрат стандартной погрешности измерения в точке j , α – параметр

регуляризации, L – оператор регуляризации (стабилизирующий оператор)[138–140].

3.1.3 Оптическая микроскопия анализа траекторий наночастиц

Размеры агрегатов и гетерогенность системы при образовании фибрилл также регистрировалась методом оптической микроскопии анализа траекторий наночастиц с помощью Nanosight NS300 (Malvern Instruments Ltd., Малверн, Великобритания). Данный метод позволяет визуализировать броуновское движение частиц размером от 10 нм до 2 мкм по рассеянному на них сфокусированному лазерному излучению с длиной волны 485 нм. Запись траектории движения частиц реализована в проточной кювете при помощи ПЗС-камеры в течение 30 секунд не менее 5 раз для каждого образца. Программное обеспечение NTA 3.0 было использовано для анализа траекторий движения агрегатов, определения их коэффициента диффузии, гидродинамического радиуса и концентрации [141] через уравнение Стокса-Эйнштейна:

$$\frac{\overline{(x,y)^2}}{4} = D_t t = \frac{T k_B}{3\pi\eta d_h}, \quad (35)$$

где D_t – коэффициент поступательной (трансляционной) диффузии, k_B - постоянная Больцмана, T - абсолютная температура, η - вязкость жидкости, d_h - гидродинамический диаметр частицы.

Также в работе был использован флуоресцентный канал визуализации движения частиц. Для этого был использован флуоресцентный зонд 2М-DMASEBT (Рис.30) [142]. Максимум спектра поглощения данного зонда сдвинут в длинноволновую область спектра на 100 нм по сравнению с ThT [143]. Для минимизации эффекта фотообесцвечивания визуализация

броуновского движения агрегатов производилась в проточной камере с постоянной скоростью потока 1 мкл/мин.

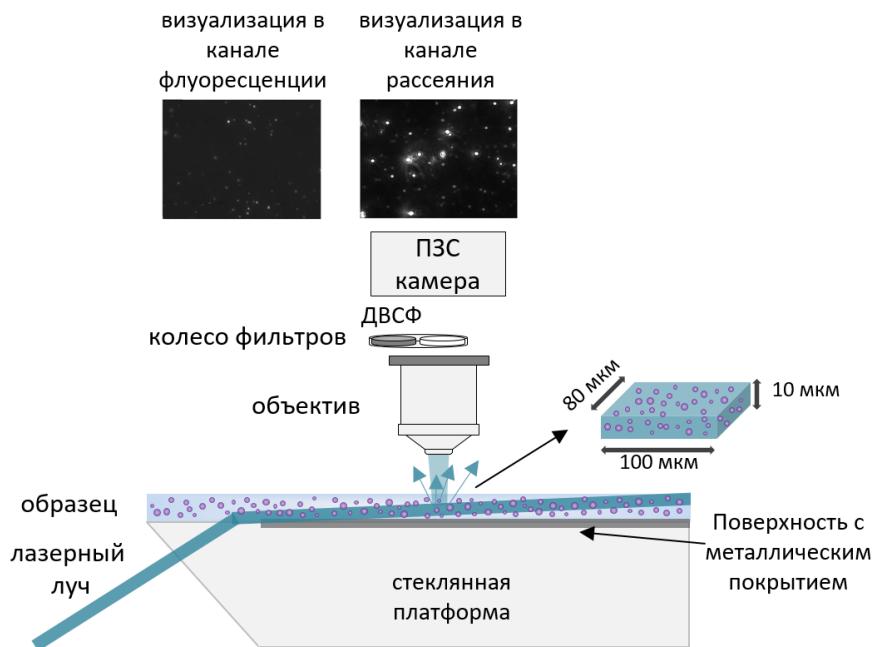


Рисунок 31. Принципиальная схема установки, использованной для оптической микроскопии анализа траекторий наночастиц.

3.2 Асинхронное изменение времени жизни и интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при формировании фибриллярных наноструктур: регистрация сверхбыстрых процессов

В работе с использованием метода стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением ~ 200 пс и использованием зонда ThT была исследована кинетика формирования фибриллярных наноструктур. Было исследовано изменение спектров флуоресценции ThT (рис.32 А) и кинетики затухания флуоресценции ThT на масштабе 150 пс – 20 нс (рис. 32 Б) в процессе формирования фибриллярных наноструктур из мономера белка. Для расчета среднего времени жизни флуоресценции ThT кинетика затухания флуоресценции аппроксимировалась

двумя экспонентами (формулы 21 - 23). Было изучено изменение спектров поглощения ThT при образовании комплекса с фибриллами (рис. 32 В). Было показано, что формирование фибриллярных агрегатов сопровождается длинноволновым сдвигом спектров поглощения тиофлавина Т на 38 нм на поздних этапах формирования фибрилл (см. рис. 32 В). Наблюдаемый длинноволновый сдвиг спектра поглощения при формировании им комплекса с фибриллами относительно водного раствора может быть объяснен влиянием диполь-дипольных взаимодействий между молекулами зонда и полярными молекулами растворителя [63,144].

В предыдущей главе при исследовании неспецифического связывания ThT с белками было показано, что в то время как среднее время жизни флуоресценции ThT, τ , возрастает в 1000 раз при меньших концентрациях белка, интенсивность флуоресценции ThT, $Fluo$, возрастает лишь в десятки раз при больших концентрациях белка. В данной главе поведение $Fluo$ и τ было исследовано при анализе специфичного связывания ThT в белковые агрегаты в зависимости от времени формирования фибриллярных наноструктур. Как и в случае неспецифичного связывания зонда (глава 2) было показано, что при исследовании изменения $Fluo$ и τ при встраивании в белковые фибриллярные агрегаты на всех этапах процесса агрегации происходит асинхронно (рис.33 А), а именно: время жизни флуоресценции начинает увеличиваться раньше и достигает плато при значении ~ 1 нс, когда фактор увеличения интенсивности флуоресценции составляет ~ 10 , по сравнению с ~ 400 для раствора полностью сформированных агрегатов.

Асинхронное поведение $Fluo$ и τ при формировании фибрилл было описано ранее в работе [12] (раздел 1.5, рис.15) и было интерпретировано как следствие более высокой чувствительности времени жизни флуоресценции ThT к наличию в растворе олигомерных фракций белка. Однако, как было описано в разделе 1.5, данный факт не согласуется с механизмом

формирования фотофизических свойств ThT по принципу молекулярного ротора [14,17, 55].

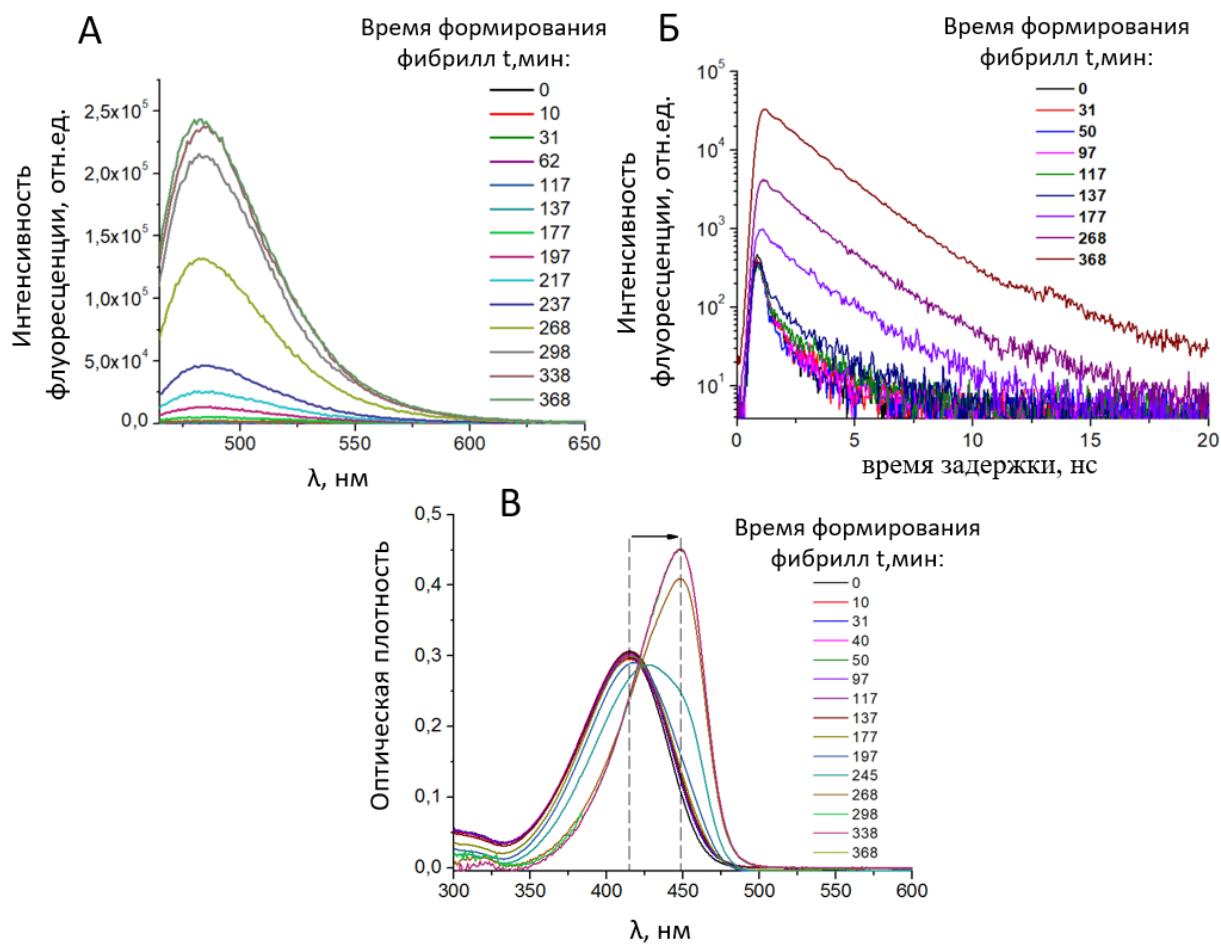


Рисунок 32. Изменение спектров (А), кинетик затухания флуоресценции ThT (Б) и спектров поглощения ThT (В) в процессе формирования фибрилл. Концентрация ThT составляет 2 мкМ, концентрация инсулина, из которого были сформированы фибриллы, составляет 26 мкМ.

А именно, сверхбыстрая релаксация свободного ThT обусловлена образованием при фотовозбуждении состояния с внутримолекулярным переносом заряда и скрученной геометрией (TICT), что приводит к нерадиационному переходу во временном диапазоне ~ 1 пс [14,54,142]. Жесткая фиксация фрагментов молекулы ThT, когда он образует комплекс с фибриллярными наноструктурами, приводит к резкому снижению скорости

нерадиацией релаксации возбужденного состояния k_{nr} до $\sim(1 \text{ нс})^{-1}$ [14]. В результате интенсивность флуоресценции $Fluo$ и время жизни τ увеличиваются в 1000 раз вследствие того, что $Fluo \sim \tau = (k_r + k_{nr})^{-1}$. Таким образом, наблюдаемое 10-кратное увеличение интенсивности флуоресценции ThT при связывании с фибриллярными наноструктурами является слишком малым в рамках описанной схемы при одновременном увеличении времени жизни флуоресценции ThT до 2 нс.

Механизмы, ответственные за асинхронное поведение фотофизических характеристик ThT при специфичном взаимодействии с фибриллярными белковыми агрегатами были исследованы с использованием лазерной кинетической спектроскопии на пикосекундном временном масштабе. Выбор данной методики обусловлен следующими фактами. Во-первых, в [90] было продемонстрировано, что в фибриллярных агрегатах существует как минимум два типа сайтов связывания ThT с различными фотофизическими параметрами зонда в них. Несмотря на наблюдаемое 1000-кратное увеличение интенсивности и среднего времени жизни флуоресценции ThT, в фибриллярных наноструктурах на поздних этапах формирования фибрилл существует слабо флуоресцирующая субпопуляция связанных молекул ThT со сверхбыстрой релаксацией на пикосекундном временном диапазоне [90]. Эти молекулы характеризуются низким значением интенсивности флуоресценции $Fluo$, что приводит к снижению общей флуоресценции системы. Однако наличие таких молекул не было проверено на различных временных этапах формирования фибрилл. Во-вторых, во второй главе было показано, что аналогичное асинхронное поведение фотофизических параметров ThT может наблюдаться и при неспецифичном связывании ThT и обусловлено наличием превалирующей фракции связанного ThT со сверхбыстрой релаксацией. Таким образом, требуется дополнительное исследование для проверки гипотезы о существовании субпопуляции связанных молекул ThT со

сверхбыстрой релаксацией на различных стадиях формирования фибрилл и определения корреляции её наличия с асинхронной динамикой параметров $Fluo$ и τ в зависимости от времени формирования фибрилл.

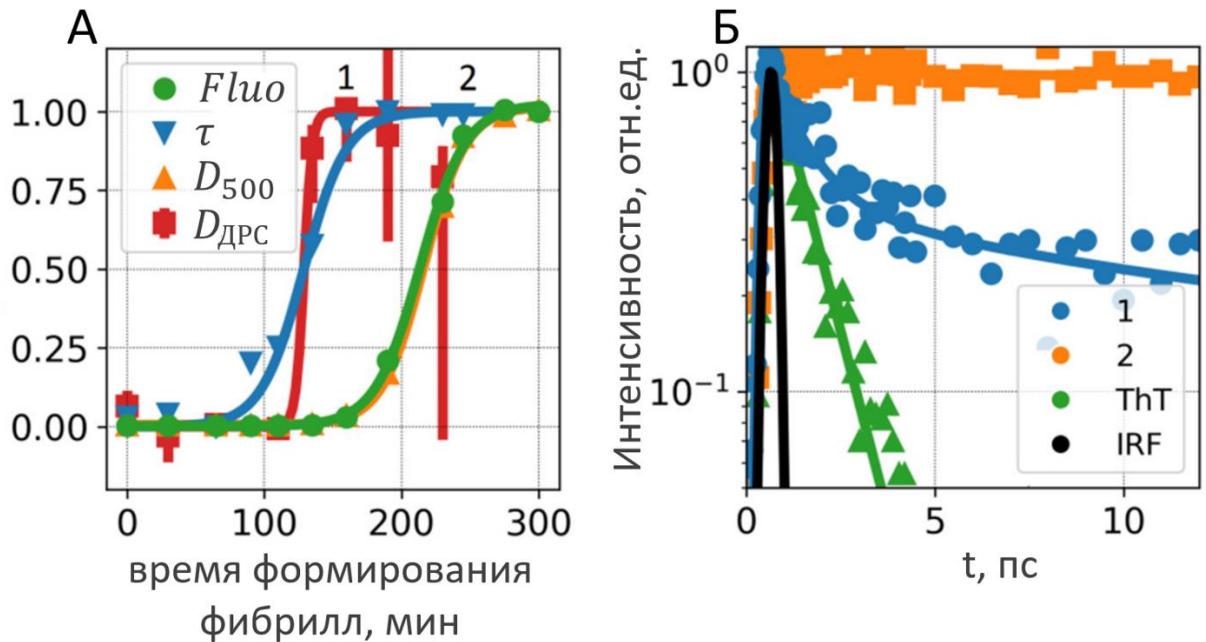


Рисунок 33 – А) Зависимость интенсивности флуоресценции ThT (зеленые символы) и времени жизни флуоресценции ThT (синие символы) в процессе формирования фибриллярных наноструктур. Ст_{ThT} = 2 μ M. Время жизни флуоресценции было рассчитано из кинетики релаксации возбужденного состояния, полученной с помощью метода время - коррелированного счета единичных фотонов (временное разрешение \sim 200 фс). Оранжевые символы соответствуют оптической плотности раствора на 500 нм (D_{500}). Красные символы соответствуют значениям логарифма средних размеров частиц, полученных с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС). Красными линиями отмечены 25-й и 75-й перцентили распределения частиц по размерам, полученного с помощью ДРС. Все зависимости нормированы на интервал [0;1]. Б) Кинетика затухания флуоресценции водного раствора ThT (зеленые символы) и образца фибриллы-ThT на этапах формирования 1 и 2, полученные с помощью метода ап-конверсии флуоресценции (временное разрешение \sim 200 фс). Значения параметров, полученных в результате аппроксимации кривых моно- и биэкспоненциальным законом распада (формулы 21-23) представлены в таблице 8. IRF соответствует временному профилю сигнала комбинационного рассеяния воды.

Таблица 8. Сравнение фотофизических параметров ThT при связывании с фибрillами на разной стадии формирования (фактор усиления флуоресценции *Fluo*, определяемый как отношение интенсивности флуоресценции ThT при встраивании к интенсивности флуоресценции зонда в водном растворе, среднее время жизни, измеренное с использованием методом лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции на наносекундном временном масштабе τ , и параметры аппроксимации кинетики затухания флуоресценции ThT, измеренные с использованием метода ап-конверсии флуоресценции: τ_1 было зафиксировано и равнялось значению времени жизни флуоресценции ThT в водном растворе).

Система	<i>Fluo</i>	τ , нс	ап-конверсия флуоресценции		
			τ_1 , пс	τ_2 , пс	a_1 / a_2
Водный раствор ThT	-	0.200 ± 0.05	0.95	--	--
Точка (1) на рис.27А	9.4	1.42 ± 0.07	0.95	10.6 ± 2.4	2.8 ± 0.8
Точка (2) на рис. 27А	415	1.66 ± 0.08	315 ± 15	--	--

Для решения наблюдаемого противоречия с помощью метода ап-конверсии флуоресценции были измерены кинетики релаксации возбужденного состояния системы ThT-инсулин на двух разных этапах формирования агрегатов: на этапе выхода на плато среднего времени жизни флуоресценции (1) и интенсивности флуоресценции (2) (рис. 33 Б). Показано, что в то время, как при анализе затухания флуоресценции ThT в системе (2) наблюдалась только компонента с длительным временем затухания ~ 300 пс, в системе (1) была обнаружена компонента со сверхбыстрым затуханием флуоресценции и амплитудой $>50\%$ (рис. 33 Б, таблица 8). Существование молекул ThT с временем жизни флуоресценции ~ 1 пс и низким квантовым

выходом флуоресценции, которые находятся в растворе как в свободной, так и в связанной форме, объясняет низкое усиление флуоресценции, наблюдаемое на стадии (1), когда время жизни флуоресценции ThT, измеренное с субнаносекундным разрешением методом времязадержки коррелированного счета единичных фотонов, достигает плато.

3.3 Изменение размеров агрегатов и гетерогенности системы при формировании фибриллярных наноструктур

Для дальнейшего изучения взаимосвязи между фотофизическими параметрами ThT и определенными стадиями формирования белковых агрегатов были использованы два взаимодополняющих метода: метод динамического рассеяния света (ДРС) и анализ траекторий наночастиц (АТН) для оценки распределений размеров и гетерогенности частиц по размеру. Анализ данных динамического светорассеяния показал последовательный сдвиг точки перегиба усреднённых корреляционных функций интенсивности рассеянного света (рис. 34 А). Наблюдаемый сдвиг указывает на увеличение среднего размера частиц в исследуемой системе. Усреднение по большому времени накопления может значительно маскировать информацию о размерах агрегатов в силу высокой степени неоднородности системы: так, на рис. 34 Б показаны 17 корреляционных функций для одного и того же образца, каждая из которых измерялась в течение 1 секунды – наблюдается заметный разброс формы кривых.

Усреднение корреляционных функций, измеренных для определенной стадии агрегации белка, может привести к ошибочным расчетам размеров агрегатов в связи с гетерогенностью системы. Анализ корреляционных функций, полученных методом ДРС, при решении обратной задачи позволяет восстановить распределение частиц в исследуемой системе по их

гидродинамическим размерам. В рамках данного подхода возможен расчет распределения интенсивности рассеянного света I по размерам частиц $D_{\text{ДРС}}$, а также распределения числа частиц в зависимости от их размеров $D_{\text{ДРС}}$, полученное в соответствии с теорией Ми [146]. Эти распределения различаются по своей физической природе. Распределение интенсивности рассеяния отражает вклад частиц разных размеров в общий сигнал рассеянного света, который пропорционален шестой степени гидродинамического радиуса частицы $D_{\text{ДРС}}$ (в приближении Релея):

$$I \sim D_{\text{ДРС}}^6 \quad (36)$$

В то время как распределение числа частиц по размерам характеризует количество фракций различных размеров в исследуемой системе. Анализ этого распределения позволяет оценить относительный вклад отдельных пиков в распределение частиц по размерам. Таким образом оба распределения представляют взаимодополняющую информацию о гетерогенной системе.

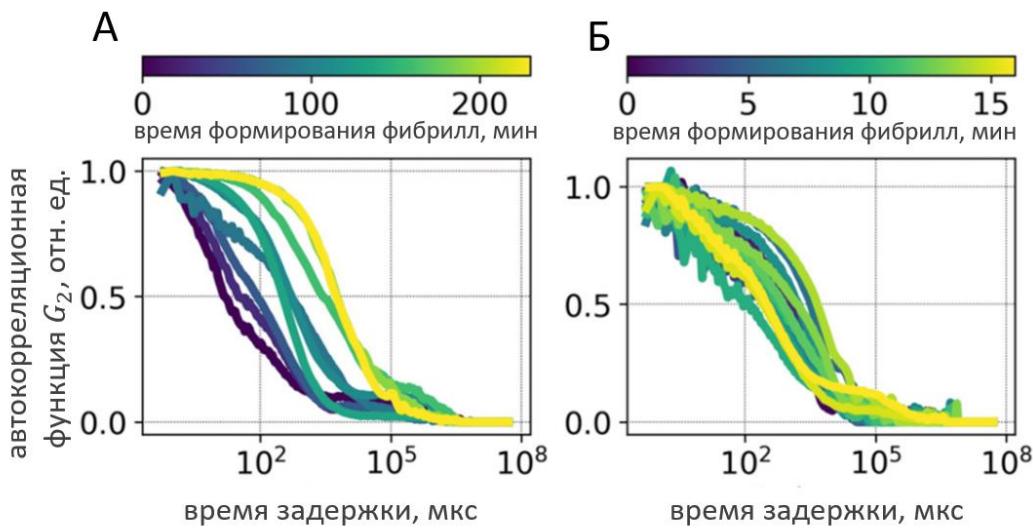


Рисунок 34 – А) Изменение корреляционных функций, полученных с использованием метода ДРС и усредненных по 100 измерениям в каждой точке кинетики формирования фибриллярных наноструктур. Каждое измерение проводилось в течение 1 секунды. Б) Семнадцать репрезентативных корреляционных функций одного образца, измеренных в течение 1 секунды.

На рис. 35 представлены логарифмические распределения размеров частиц, полученные из распределения интенсивности рассеянного света (1, рис. 35 А); из распределения числовой концентрации частиц (2, рис. 35 Б). Данные были рассчитаны при анализе корреляционных функций раствора фибриллярных наноструктур, измеренных с использованием методом ДРС. Как видно из данного графика, вследствие сильной степенной зависимости интенсивности рассеянного света от гидродинамического радиуса, даже незначительное содержание частиц размером ~ 100 нм существенно влияет на вид распределения агрегатов по размерам в зависимости от времени формирования фибрилл (определенного способом 1). В связи с этим, для анализа динамики изменения размеров агрегатов в процессе формирования фибрилл методом ДРС было выбрано распределение, представленное на рис. 35 Б, соответствующее распределению числовой концентрации частиц в зависимости от их размеров. Распределение эффективных размеров частиц (размер может отличаться от реального размера частиц в силу несферичности белковых агрегатов) варьируется в диапазоне до ~ 3 нм на начальном этапе формирования агрегатов (до 90 мин процесса формирования фибрилл на рис. 33 А). На более поздних стадиях значительно возрастает гетерогенность системы, появляются частицы размером ~ 100 нм и ~ 1 мкм, что было также подтверждено данными АТН. Наблюдаемый рост размеров агрегатов коррелирует с ростом среднего времени жизни флуоресценции ThT (рис. 33 А, более 90 мин процесса формирования фибрилл), при этом оптическая плотность раствора на длине волн 500 нм D_{500} , и интенсивность флуоресценции ThT начинают увеличиваться на более поздних станциях (рис. 33 А, более 160 мин процесса формирования фибрилл). На основе полученных данных (рис. 33 А) была сформулирована следующая модель, описывающая изменение оптических свойств ThT в процессе образования фибрилл. По мере протекания процесса формирования фибрилл свыше 90 минут в системе

формируется популяция крупных агрегатов (~ 100 нм). Их появление приводит к встраиванию ThT в участки с жёстким микроокружением ($\sim 1\%$ молекул ThT), что проявляется в увеличении времени жизни их флуоресценции. Дальнейшее образование более крупных агрегатов приводит к увеличению интенсивности флуоресценции ThT до тех пор, пока все молекулы ThT не будут встроены в сайты с жестким микроокружением, а появление значительного числа крупных агрегатов приводит к увеличению оптической плотности раствора на длине волны 500 нм (рис. 33 А).

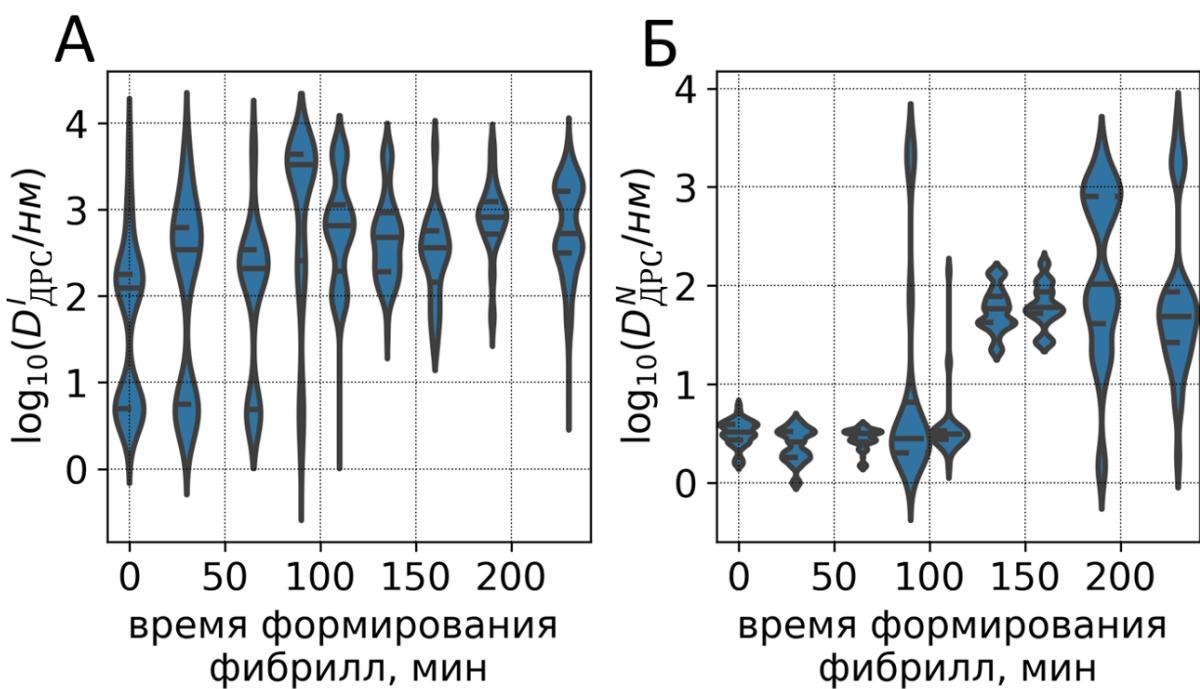


Рисунок 35 – Логарифмические распределения размеров частиц, рассчитанные на основе (А) распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц; (Б) распределения числовой концентрации частиц в зависимости от их размеров, полученные при анализе корреляционных функций раствора фибриллярныхnanoструктур методом динамического рассеяния света (ДРС).

Одновременно с техникой ДРС в работе использовалась методика АТН, основанная на анализе треков броуновского движения одиночных наночастиц, детектируемых по их сигналам рассеяния или флуоресценции. Преимущество

данной техники заключается в том, что в отличие от ДРС, АТН может измерять более низкие концентрации частиц, а также количественно определять их концентрацию и визуализировать их геометрию [141].

Подобно измерениям ДРС, в экспериментальных данных, полученным с помощью АТН, наблюдалась высокая степень гетерогенности раствора. Эта тенденция проиллюстрирована на рис. 36 А, где продемонстрировано распределение интенсивности рассеяния частиц от размера в логарифмических координатах. Видно, что данное распределение является широким и, в основном, мономодальным с гауссовым профилем. Уровень, соответствующий полувысоте подобранного гауссова распределения, изображен красным эллипсом (рис. 36 А). Кинетика изменения среднего размера частиц и дисперсии данной величины при формировании фибриллярных наноструктур показаны на рис. 36 Б. Из данного рисунка видно, что значительное увеличение среднего размера частиц происходит одновременно с увеличением времени жизни флуоресценции ThT (рис. 33 А), что находится в соответствии с результатами, полученными с помощью ДРС. Однако динамический диапазон среднего размера частиц, обнаруженный АТН, довольно узкий и составляет от ~ 50 нм до ~ 250 нм. Нижний предел может быть связан с тем, что сигнал рассеянного света от более мелких объектов не может быть зарегистрирован вследствие чувствительности системы, а верхний связан с сильной зависимостью интенсивности рассеянного света от размера частицы (формула 26), а также предположительной несферической формой рассеивающих объектов, что может способствовать наблюдению сигнала от множественных рассеивающих центров одного объекта и вносить ошибку в измерения.

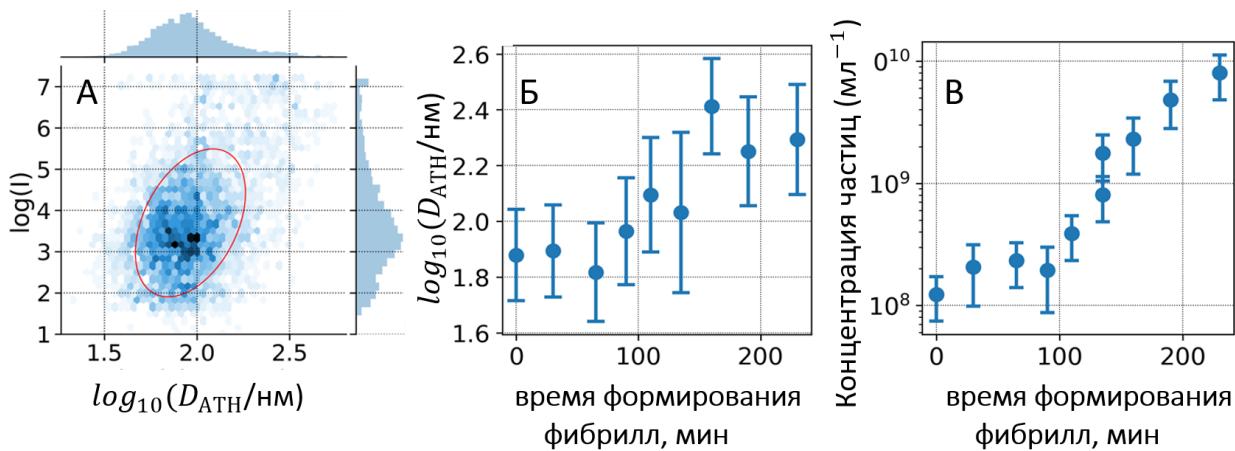


Рисунок 36. А. Распределение интенсивности и размера обнаруженных частиц на 90 минуте инкубации. Б. Изменение размера частиц, определенного с помощью АТН, при фибриллообразовании. Погрешности соответствуют стандартному отклонению, полученному с использованием распределения интенсивности. В. Зависимость концентрации частиц от времени инкубации при фибриллообразовании.

С помощью техники АТН были также определены концентрации детектируемых частиц при формировании фибриллярных наноструктур. Как показано на рис. 36 В, концентрация агрегатов начинает экспоненциально увеличиваться на этапе формирования фибрилл, когда время жизни флуоресценции ThT начинает расти (рис. 33 А, этап формирования фибрилл более 90 мин). Концентрация частиц увеличивается от 10^8 мл^{-1} до 10^{10} мл^{-1} , когда интенсивность флуоресценции ThT выходит на плато (рис. 33 А, этап формирования фибрилл более 245 мин).

Используя канал детектирования флуоресценции АТН, был исследован процесс образования фибрилл на этапах формирования более 160 мин на рис. 33 А, когда среднее время жизни флуоресценции ThT выходит на плато и интенсивность флуоресценции ThT начинает возрастать. В качестве флуоресцентного зонда, используемого в работе, выступал краситель 2M-DMAEBT [132,142]. Применение данного зонда обусловлено конфигурацией АТН, а именно наличием источника возбуждения на 485 нм. 2M-DMAEBT

является производной ThT, максимум его спектра поглощения сдвинут в длинноволновую область спектра по сравнению с ThT и составляет 516 нм в водном растворе, максимум спектра флуоресценции составляет 570 нм. Подробно процесс и параметры связывания 2M-DMASEBT с белками и белковыми агрегатами, а также сравнение фотофизических параметров производной с фотофизическими параметрами ThT будет рассмотрено в разделе 3.4.

В работе с использованием зонда 2M-DMASEBT была реализована визуализация агрегатов белка при формировании фибрилл с использованием техники АТН. Усиление интенсивности флуоресценции 2M-DMASEBT было недостаточным для визуализации белковых структур на этапах формирования менее 160 мин (рис. 33 А). Использование флуоресцентного канала детектирования фибрилл позволило визуализировать крупные агрегаты белка размером около нескольких микрон. Агрегаты такого размера не могут быть зарегистрированы в гетерогенном растворе вместе с агрегатами ~100 нм в канале рассеяния при аналогичных параметрах обнаружения из-за низкой концентрации (менее одной частицы на объем детектирования) и гораздо более высокого сечения рассеяния, приводящего к насыщению детектора, когда частица находится в объеме детектирования.

Для количественного анализа динамики агрегации белка и характеристик образующихся фибрилл по данным флуоресцентной микроскопии АТН была применена комплексная методика обработки изображений, включающая несколько ключевых этапов. Первоначально для выделения отдельных флуоресцирующих частиц на изображениях применялись два взаимодополняющих алгоритма - метод MeanShift и вейвлет-анализ, описанные в работе [147]. Эти методы были выбраны благодаря их способности эффективно разделять сигнал от фонового шума и надежно детектировать объекты различной интенсивности. Первичная детекция частиц

выполнялась с использованием метода ComDet пакета ImageJ (рис. 37 А), после чего для построения траекторий частиц в последовательных кадрах применялась библиотека trackpy языка программирования Python, учитывающая пространственно-временные корреляции положений объектов (рис. 37 Б). Далее проводился анализ диффузионной динамики обнаруженных частиц, включающий процедуру вычитания направленного дрейфа системы [148], расчет коэффициентов диффузии по методу среднеквадратичного смещения и последующую статистическую обработку полученных данных. Среднеквадратичное смещение MSD в случае направленного дрейфа частиц может быть записано:

$$MSD = \overline{(x, y)^2} = 4D_t\Delta t + v^2\Delta t^2, \quad (37)$$

где D_t – коэффициент поступательной (трансляционной) диффузии, v - скорость двумерного течения. В рассматриваемом случае кажущееся значение гидродинамического радиуса частицы $d_{\text{каж}}$, измеряемое при движении в потоке, должно быть скорректировано:

$$d_{\text{каж}} = \frac{d}{1+kQ^2} \quad (38)$$

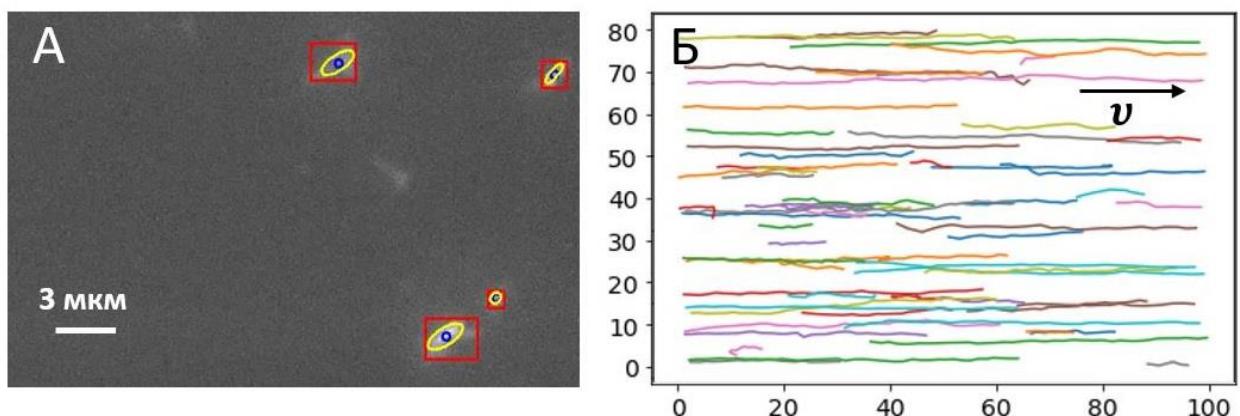


Рисунок 37. А – Агрегаты белка в присутствие зонда 2M-DMASEBT, наблюдаемые в флуоресцентном канале АТН в окне регистрации 80 x 100 мкм и выделенные с помощью описанного алгоритма; Б – траектории движения центров агрегатов, наблюдаемые при флуоресцентном детектировании.

где Q — средняя скорость потока, d — истинный гидродинамический диаметр частицы в покое, k - эмпирическая константа, учитывающая влияние потока на измеряемый размер.

Количественный анализ морфологических характеристик фибрилл включал определение их геометрических параметров, таких как ширина a и длины l . На рис. 38 А представлено изображение агрегата, окрашенного 2M-DMASEB, измеряемые параметры a и l обозначены соответственно зеленой и оранжевой линиями. Полученные данные позволили исследовать динамику изменения эксцентриситета ε фибрилл в процессе их формирования на этапах 3 и 4 (рис. 38 Б):

$$\varepsilon = \sqrt{1 - \frac{a^2}{l^2}}, \quad (39)$$

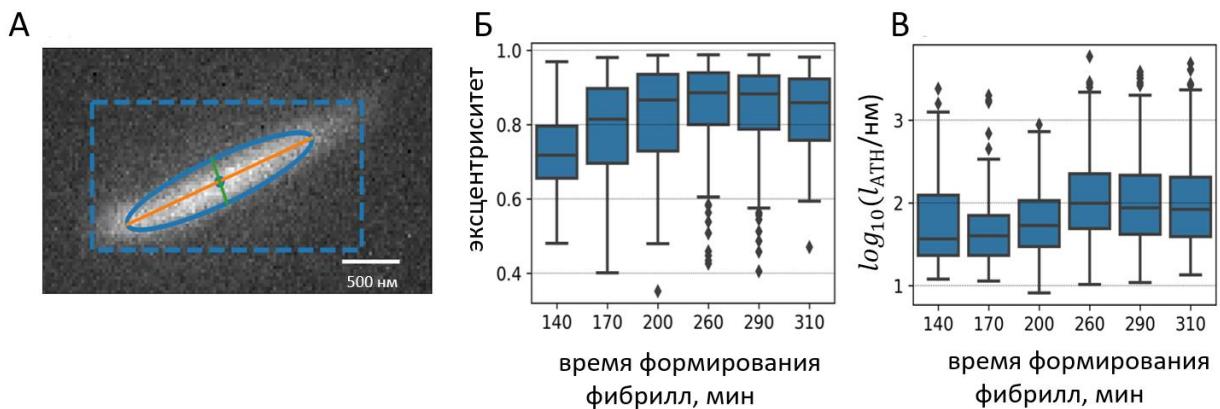


Рисунок 38. Эволюция морфологии фибрилл, охарактеризованная с помощью метода АТН при флуоресцентном детектировании. А – Изображение фибриллы, меченной красителем 2M-DMASEBT. Синий пунктирный прямоугольник соответствует объекту, обнаруженному алгоритмом. Синяя точка соответствует центру фибриллы, взвешенному по интенсивности. Синий эллипс и его оси (желтый и зеленый сегменты) соответствуют длине и ширине фибриллы. Б – Зависимость распределения эксцентриситета фибрилл от времени инкубации. Эксцентриситет увеличивается до 260 минут инкубации, демонстрируя непрерывный рост фибрилл. В – Зависимость распределения длины фибрилл от времени инкубации.

Также было исследовано распределение длины частиц l по размерам в процессе формирования фибрилл при флуоресцентной визуализации АТН (рис. 38 В).

Из рис. 38 видно, что распределение длин и эксцентриситетов фибрилл является широким из-за большого разнообразия размеров агрегатов и их вращения во время наблюдения. Среднее значение распределения эксцентриситета смещается в сторону более высоких значений, демонстрируя их непрерывный рост и удлинение на более поздних этапах формирования фибрилл, когда происходит значительное увеличение интенсивности флуоресценции ThT и мутности раствора (рис. 33 А).

3.4 Изменение фотофизических характеристик длинноволновой производной ThT при взаимодействии с альбумином

В работе для визуализации агрегатов белка при формировании фибрилл с помощью техники АТН был использован флуоресцентный зонд 2M-DMASEBT, являющийся длинноволновой производной ThT. Стехиометрия и кинетические параметры связывания зонда 2M-DMASEBT с фибриллами описаны в работе [132]. В качестве структурного аналога 2M-DMASEBT, обладающего сходными фотофизическими характеристиками, рассматривается соединение DMASEBT (перхлорат транс-2-[4-(диметиламино)стирил]-3-этил-1,3-бензотиазолия). Механизм его комплексообразования с фибриллами изучен при анализе агрегации различных белковых систем [132,149,150]. Фотофизические параметры данных зондов, а также параметры комплексообразования в присутствии фибрилл приведены в таблице 9. В работах [132,149] описано сходство фотофизических параметров ThT, 2M - DMASEBT и DMASEBT, а также

показано, что данные зонды взаимодействуют с одними и теми же сайтами связывания фибрилл со схожей специфичностью. Основное различие между зондами 2M - DMASEBT и ThT заключается в длине линкера между бензольным и бензотиазольным кольцами. Как и ThT, 2M - DMASEBT относится к классу молекулярных роторов, т.е при специфичном связывании DMASEBT с фибриллами происходит жесткая фиксация фрагментов молекулы, что влечет за собой тысячекратное усиление интенсивности флуоресценции и рост среднего времени жизни флуоресценции [58] и делает данный зонд удобным для визуализации фибриллярных наноструктур в флуоресцентном канале детектирования АТН. Стоит отметить, что при анализе кинетики затухания флуоресценции производных в присутствие фибрилл также наблюдается наличие двух встраивания. Для DMASEBT было показано наличие двух мод с временем жизни флуоресценции 0.25 и 1.58 нс, а для 2M-DMASEBT – 0.51 и 1.35 нс. Время жизни флуоресценции в водном растворе для производных составляет 0.09 нс для DMASEBT, и 0.06 нс для 2M- DMASEBT.

Необходимо отметить, что анализ изменений фотофизических параметров 2M-DMASEBT при образовании комплексов с белком и белковыми олигомерами, а также их сравнительная характеристика с соответствующими параметрами ThT ранее не проводились и важны для оценки общности поведения данных зондов при взаимодействии с различными белковыми структурами. В связи с этим в настоящей работе было выполнено сравнительное исследование фотофизических характеристик обоих зондов при формировании комплекса с альбумином. Для количественного определения параметров процесса неспецифического связывания производной 2M-DMASEBT, также, как и в случае ThT, исследовалось изменение интенсивности флуоресценции зонда при

Таблица 9. Характеристики мод встраивания ThT и DMASEBT при образовании комплекса с разным типом фибрилл: максимум спектра поглощения $\lambda_{\text{погл,макс}}$, константа комплексообразования K и квантовый выход флуоресценции q_i .

зонд	объект	$\lambda_{\text{погл,макс}},$ нм	моды встраивания	$K \times 10^{-5},$ M^{-1}	q_i	ссылки
DMASEBT	фибриллы из лизоцима	569	1	0.63	0.02	[149]
			2	71	0.99	
	фибриллы из инсулина	562	1	0.12	0.77	[150]
			2	72	0.97	
	фибриллы из β - амилоида	569	1	360	-	[132]
			2	1.6	-	
	буферный раствор (pH 2)	524	-	-	0.02	[149]
	водный раствор	514	-	-	-	[132]
2M - DMASEBT	фибриллы из β - амилоида	566	1	52	-	[132]
			2	1.2	-	
	водный раствор	516	-	-	-	[149]
ThT	фибриллы из лизоцима	450	1	0.60	10^{-4}	[151]
			2	72	0.44	
	фибриллы из инсулина	450	1	0.35	0.27	[86]
			2	78	0.72	
	буферный раствор (pH 2)	421	-	-	2×10^{-4}	[149]

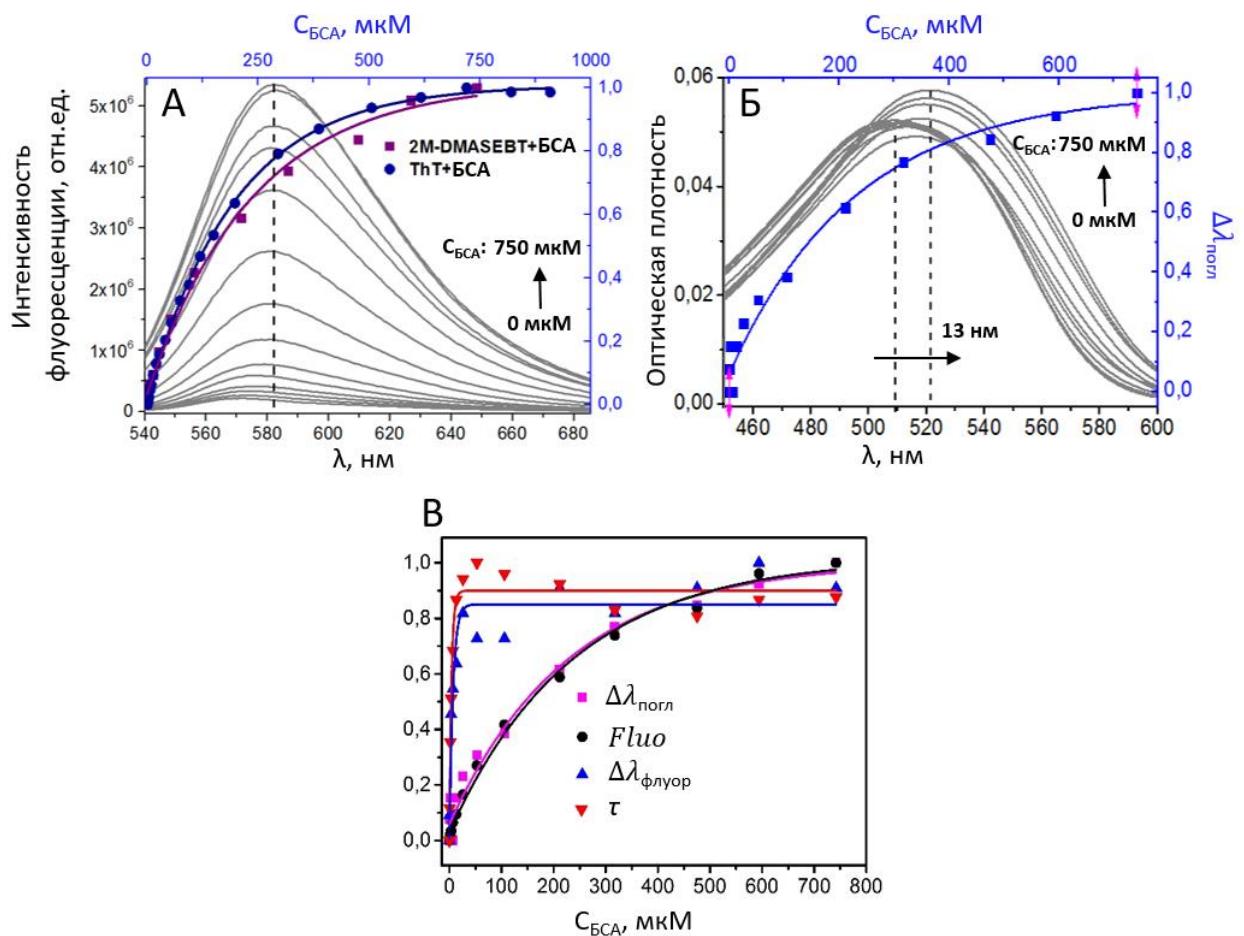


Рисунок 39. А - Спектры флуоресценции 2M-DMASEBT при увеличении концентрации альбумина (серые линии); зависимость усиления флуоресценции зонда при образовании комплекса с белком по сравнению с водным раствором от концентрации альбумина (2M-DMASEBT-фиолетовая линия, ThT-голубая линия). Б - Спектры поглощения 2M-DMASEBT при увеличении концентрации альбумина (серые линии); зависимость сдвига спектров поглощения 2M-DMASEBT в максимуме (голубая линия) от концентрации белка ($\Delta\lambda_{\text{погл}}$ рассчитывалась как разница положения максимума спектра поглощения водного раствора 2M-DMASEBT и положения максимума спектра поглощения альбумин - 2M-DMASEBT). В - Зависимость $\Delta\lambda_{\text{погл}}$ (фиолетовая кривая), зависимость усиления флуоресценции зонда при образовании комплекса с белком по сравнению с водным раствором от концентрации альбумина $Fluo$ (черная кривая), зависимость сдвига спектра флуоресценции зонда от концентрации белка $\Delta\lambda_{\text{флуор}}$ (голубая кривая), зависимость среднего времени жизни флуоресценции зонда от концентрации белка τ (красная кривая). Кривые нормированы на интервал (0;1). Концентрация 2M-DMASEBT была фиксирована и составляла 10 μM .

увеличении концентрации белка альбумина в растворе. На рис. 39 А показаны спектры флуоресценции 2M-DMASEBT при различных концентрациях альбумина. Как видно из данного графика, интенсивность флуоресценции возрастает в ~ 25 раз при увеличении концентрации белка в растворе и демонстрирует схожий тренд с системой альбумин-ThT. В результате аппроксимации данной зависимости уравнением 20 была определена константа комплексообразования для системы 2M-DMASEBT-альбумин, которая составила $3.9 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1}$, и сопоставима со значением данного параметра для системы ThT-альбумин, составляющим $5.9 \pm 0.7 \text{ mM}^{-1}$. Необходимо отметить, что увеличение концентрации белка в системе также сопровождается сдвигом спектров флуоресценции 2M-DMASEBT в длинноволновую область спектра \sim на 10 нм, что также было описано в работе [132] для данного зонда в присутствие фибрилл.

На рис. 39 Б показано изменение спектров поглощения флуоресцентного зонда 2M-DMASEBT при увеличении концентрации альбумина. Как видно из данного графика, при увеличении концентрации белка, максимумы спектров поглощения тиофлавина 2M-DMASEBT смещаются в длинноволновую область примерно на 14 нм. Коротковолновое положение спектра поглощения свободной формы красителя в буферном растворе может быть проявлением взаимодействия красителя с окружающими его полярными молекулами растворителя. При связывании красителя с альбумином, молекула зонда находится в более гидрофобном микроокружении. Краситель 2M-DMASEBT является более чувствительным к полярности микроокружения, чем ThT. При исследовании спектров поглощения для системы фибриллы - тиофлавин Т, было обнаружено, что по мере формирования фибрилл наблюдается сдвиг спектра в длинноволновую область на 38 нм, что свидетельствует о сильном уменьшении полярности микроокружения зонда в результате формирования его комплекса с фибриллами. Длинноволновый сдвиг спектров поглощения

2M-DMASEBT при образовании комплекса с фибриллами также был описан в работах [132,149].

Было произведено сравнение изменений фотофизических параметров флуоресцентного зонда 2M-DMASEBT при связывании с альбумином (рис. 39 В). Показано, что зависимость усиления флуоресценции красителя совпадает с зависимостью сдвига спектров поглощения от концентрации белка в отличие от зависимости сдвига спектров флуоресценции и роста среднего времени жизни флуоресценции 2M-DMASEBT при добавлении белка. Стоит отметить, что, как и в случае системы альбумин - ThT, наблюдается асинхронное поведение параметров *Fluo* и τ . Полученные результаты подтверждают молекулярно-роторную природу 2M-DMASEBT, а также его универсальность как инструмента для диагностики образования амилоидных фибрилл и анализа связывания с белками.

3.5 Взаимосвязь между фотофизическими параметрами ThT и распределениями размеров агрегатов при формировании фибриллярных наноструктур

Подводя итог проделанной работе, можно описать следующую картину молекулярных процессов агрегации и ее взаимосвязь с параметрами флуоресценции ThT. На начальной стадии (до 90 мин процесса фибриллообразования) в растворе присутствуют в основном белковые мономеры (по данным ДРС). Тем не менее, на данной стадии с помощью АТН в системе была обнаружена небольшая доля 10^8 см^{-3} ($\approx 10^{-13} \text{ М}$) частиц размером 60 нм (таблица 10). Вследствие сильно нелинейной зависимости интенсивности рассеянного света от диаметра частиц малую фракцию высокомолекулярных олигомеров, образовавшихся до начала агрегации, можно наблюдать с использованием распределений интенсивности,

полученных методом ДРС. Тем не менее, на начальной стадии фибриллообразования (до 90 мин) концентрация олигомеров намного ниже, чем концентрация мономеров. Указанные олигомеры могут образовывать неупорядоченные агрегаты или белковые комплексы, способствующие запуску формирования фибрилл.

Таблица 10. Параметры системы инсулин-ThT на разных стадиях фибриллообразования (рис. 33 Б).

Время инкубации, мин	0	90	160	245
τ , нс	0.85 ± 0.03	1.02 ± 0.05	1.77 ± 0.09	1.80 ± 0.08
<i>Fluo</i> , отн. ед.	1	3.6	9.4	415
Мутность, отн. ед.	1	38	130	4900
$\log(D_{\text{ДРС}/\text{нм}})$	0.50 ± 0.13	0.28 ± 0.35	1.77 ± 0.13	1.69 ± 0.30
$\log(D_{\text{ATH}/\text{нм}})$	1.89 ± 0.16	1.96 ± 0.19	2.4 ± 0.17	2.29 ± 0.20

На начальной стадии фибриллообразования (до 90 мин) наблюдается слабое усиление флуоресценции ThT, равное 3.6 (рис. 33 А, таблица 10). Это можно объяснить неспецифическим связыванием ThT с мономерами белка и / или их агрегатами, которое, как было показано, сопровождается слабым увеличением флуоресценции. На следующем этапе (90–130 мин) начинается рост времени жизни флуоресценции ThT, сопровождающийся появлением значительного количества агрегатов и увеличением гетерогенности раствора. Кроме того, с ~ 90 минуты формирования фибрилл наблюдается экспоненциальный рост количества агрегатов, детектируемых с помощью АТН. Между 140 и 160 минутами формирования фибрилл зависимость среднего времени жизни флуоресценции ThT достигает плато ~ 2 нс. В то же время измерения кривых затухания флуоресценции зонда с помощью метода лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции с субпикосекундным временным разрешением позволило выявить наличие двух фракций ThT со сверхбыстрой релаксацией (0,95 пс, 67%; 10,6 пс, 22%) и присутствие ThT,

встроенного в фибриллы, с затуханием флуоресценции ~ 2 нс (11%). Измерение кривых затухания флуоресценции с использованием лазерной кинетической спектроскопии на наносекундном временном масштабе не позволяет увидеть фракции зонда со сверхбыстрой релаксацией, что приводит к насыщению определяемого среднего времени жизни флуоресценции ThT. Тем не менее, измерения, выполненные с помощью метода лазерной кинетической спектроскопии флуоресценции с субпикосекундным временным разрешением, позволяют сделать вывод о том, что преобладающая доля ThT остается слабо флуоресцирующей, то есть молекулы зонда не встроены в сайты с высокой константой комплексообразования в фибриллах. Наличие времени затухания флуоресценции ThT ~ 2 нс можно объяснить существованием популяции молекул, специфически связанных агрегатами и, таким образом, характеризующихся высоким квантовым выходом флуоресценции. Последующее протекание процесса фибриллообразования приводит к изменению кинетики сверхбыстрой флуоресценции, а именно к уменьшению вклада субпопуляции тиофлавина T с характерным временем затухания флуоресценции ~ 1 пс.

Появление субпопуляции ThT, встроенной в сайты со специфичным связыванием (с высокой константой комплексообразования), коррелирует с началом резкого увеличения размеров и концентрации агрегатов, выявленных с помощью ДРС и АТН (рис. 33 А); 400-кратное увеличение интенсивности флуоресценции ThT происходит синхронно с увеличением оптической плотности раствора на 500 нм (190–310 мин формирования фибрилл). Данная стадия связана с образованием крупных фибриллярных агрегатов, вторичная структура которых обогащена бета-листами. В работе был также использован флуоресцентный канал детектирования АТН для оценки свойств высокомолекулярных фибриллярных агрегатов и фибрилл, демонстрирующих

изменение геометрии, а именно, удлинение и увеличение эксцентризитета частиц после 190 мин формирования фибриллярных агрегатов.

Приведенное объяснение асинхронного поведения фотофизических параметров ThT при формировании комплекса с фибриллами и при связывании с белками ранее не было описано в литературе. Наличие слабо флуоресцирующей фракции ThT необходимо учитывать при анализе интегральных характеристик ThT при фибриллообразовании. Использованный в работе метод флуоресцентного детектирования частиц с помощью техники АТН был впервые применен для мониторинга поздних стадий процесса формирования фибрилл, что представляет собой новый оптический подход для отслеживания кинетики агрегации. Совместное применение набора оптических методов, использованных в работе, выявило самосогласованную картину, которая позволяет лучше понять взаимосвязь между количеством и размером агрегатов и параметрами флуоресценции ThT при фибриллообразовании.

Основные выводы к главе 3

В данной главе исследован процесс специфичного связывания тиофлавина T с фибриллярными наноструктурами и изучена кинетика данного процесса с использованием фотофизических характеристик зонда. Также проведен дополнительный анализ кинетики агрегации белков путем определения параметров рассеяния раствора, определения размеров образующихся олигомеров и гетерогенности их размера. Было показано, что среднее время затухания флуоресценции ThT чувствительно к формированию в растворе сайтов связывания ThT с жесткой фиксацией фрагментов молекулы друг относительно друга: наличия нескольких процентов таких сайтов в растворе достаточно для того, чтобы зависимость среднего времени жизни

флуоресценции ThT вышла на плато. Выход на плато среднего времени жизни флуоресценции ThT происходит одновременно с резким увеличением среднего размера частиц, их концентрации и гетерогенности раствора. Рост интенсивности флуоресценции ThT и оптической плотности раствора, происходит на более поздних стадиях агрегации. Асинхронное поведение интенсивности и времени жизни флуоресценции ThT, определенного с помощью метода время-коррелированного счета единичных фотонов с временным разрешением ~ 200 пс, можно объяснить как следствие присутствия в растворе фракции молекул ThT со сверхбыстрым затуханием и маленьkim квантовым выходом флуоресценции. Фотофизические свойства данной фракции были исследованы с помощью метода ап-конверсии флуоресценции на установке с временным разрешением ~ 200 фс. Наличие данной фракции является общей чертой неспецифического взаимодействия ThT с белками и белковыми олигомерами, и его невозможно обнаружить при измерении кинетики затухания флуоресценции ThT на наносекундном временном масштабе. Стоит отметить, что параметры, определенные с помощью используемых методов, являются индикаторами одного и того же процесса – образования агрегатов более высокого порядка, но демонстрируют разное поведение кинетики вследствие чувствительности и предела обнаружения каждого метода. Например, если бы время жизни флуоресценции ThT было измерено с временным разрешением ~ 200 фс с использованием метода ап-конверсии флуоресценции, данный фотофизический параметр изменялся бы синхронно с интенсивностью флуоресценции ThT, поскольку оба параметра связаны с изменениями скорости безызлучательного перехода из возбужденного состояния. Аналогично, более ранний рост и выход на плато параметров ДРС по сравнению с оптической плотностью раствора на 500 нм связан с разной чувствительностью этих методов к формированию в растворе агрегатов, при

этом обе методики позволяют получить индикаторы изменения размера агрегатов. В соответствии с данными, полученными в работе, можно сделать вывод, что использование и правильная интерпретация получаемых экспериментальных данных позволяет описать различные стадии кинетики формирования фибриллярных наноструктур.

Глава 4. Микроскопия насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального микроскопа

В данной главе используются материалы, опубликованные в статье [A5]. В данной главе описывается методика микроскопии насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального микроскопа. Описывается процесс насыщения сигнала флуоресценции в рамках двухуровневой системы. Эффект насыщения флуоресценции в конфокальной микроскопии ранее анализировался с точки зрения его влияния на пространственное разрешение [22–24], однако возможность использования этого эффекта для молекулярно-специфического контрастирования изображений с использованием стандартного конфокального микроскопа с непрерывным режимом возбуждения не рассматривалась и реализована в данной работе. Демонстрируется возможность посредством анализа насыщения флуоресценции в разных пикселях изображения составить карту молекулярно-специфического параметра $\sigma\tau$ по всему изображению, где σ - сечение поглощения, τ - время жизни флуоресценции. Для этого были получены флуоресцентные изображения при различных интенсивностях возбуждения для системы ThT-фибриллярный гидрогель. Используя различия фотофизических характеристик ThT в зависимости от микроокружения была показана возможность наблюдения линейного режима и режима насыщения флуоресценции с помощью конфокального микроскопа с использованием непрерывного режима возбуждения для тиофлавина Т в водном растворе, а также для ThT, связанного с фибриллярными белковыми агрегатами. Была продемонстрирована возможность картирования параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ в гетерогенной системе фибриллярного гидрогеля, полученного в результате самосборки пептида Fmoc-FF и содержащего как фибриллы, так и сферические агрегаты, окрашенные ThT. Картирование параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ ThT позволило визуализировать различие фотофизических

характеристик зонда и связанных параметров микроокружения при встраивании в фибриллярные нитевидные наноструктуры и сферические агрегаты в гидрогеле.

4.1 Объекты и методы исследования

4.1.1 Методы изготовления образцов

В работе был исследовался водный раствор 10 мкМ ThT, а также раствор, содержащий комплексы фибрилл и ThT, которые были приготовлены в соответствии с методом, описанном в разделе 3.1.1. В работе была продемонстрирована возможность картирования параметра насыщения $F_{max\sigma T}$ для гетерогенной системы, окрашенной ThT. В качестве фибриллярной компоненты комплекса использовались фибриллы в составе гидрогеля, полученного при самосборке пептида N-фторенилметоксиарбонил дифенилаланина (Fmoc-FF, GL Biochem, Китай). Фибриллярный гидрогель готовился следующим образом: раствор пептида Fmoc-FF с концентрацией 100 мг/мл в 100 % растворе диметилсульфоксида (ДМСО) разбавлялся водным раствором ThT (30 мкМ) до конечной концентрации пептида 1,9 mM, конечная концентрация ДМСО в растворе составляла 1 %. В результате этой процедуры образовывалась мутная суспензия Fmoc-FF, которая становилась оптически прозрачной через ~2 часа при Т 25⁰C за счет образования фибрилл и геля из приготовленной суспензии. После этого гидрогель измерялся с помощью конфокальной микроскопии.

4.1.2 Метод конфокальной микроскопии для анализа насыщения флуоресценции

Конфокальная визуализация проводилась с использованием системы конфокальной микроскопии Olympus Fluoview-3000 с 60-кратным масляно-

иммерсионным объективом с числовой апертурой $NA = 1.42$ (UPLXAPO60XO, Olympus, Япония) с использованием непрерывного лазерного источника возбуждения с длиной волны возбуждения 405 нм (OBIS405 50LX, Coherent Inc., США) и максимальной выходной мощностью после объектива (для всех длин волн возбуждения) равной $\sim 1\text{ мВт}$. В конфокальной схеме детектирования использовалось значение пинхола 200 мкм . Флуоресцентный сигнал регистрировался с помощью фотоэлектронного умножителя на основе GaAsP (ФЭУ, FV31-HSD, Olympus, Япония) в спектральном диапазоне $430\text{--}700\text{ нм}$. Для картирования параметров насыщения флуоресценции ThT проводилось сканирование одного и того же поля зрения микроскопа в области образца при разных мощностях возбуждения: от 0 до 0.5 мВт с шагом 0.05 мВт сначала в сторону увеличения интенсивности возбуждения, а затем в сторону уменьшения интенсивности возбуждения для того, чтобы исключить влияние эффекта фообесцвечивания на получаемые результаты. Фотообесцвечивание может играть значительную роль при высоких плотностях потока фотонов возбуждающего излучения. Важную роль играет не только плотность мощности, но и полная доза облучения. Для минимизации дозы в работе был использован резонансный сканер, обеспечивающий время сканирования на пиксель менее 0.1 мкс , что позволило снизить влияние фотообесцвечивания на образцы.

Для оценки параметров насыщения флуоресценции ThT в разных пикселях изображения использовалась следующая процедура. Изображения, полученные для одного и того же поля зрения микроскопа в области образца при разных интенсивностях лазерного излучения, объединялись в один 3D-стек, содержащий значения флуоресценции $Fluo$ в заданном пространственном положении x,y при интенсивности возбуждения I . Проводилось пространственное усреднение сигнала флуоресценции с использованием скользящего окна (матрицы свертки) размером 13×13

пикселей для каждого пикселя изображения. Таким образом были получены зависимости интенсивности флуоресценции от плотности потока фотонов накачки для водного раствора ThT, системы ThT- фибриллярные наноструктуры, а также системы ThT- фибриллярный гидрогель.

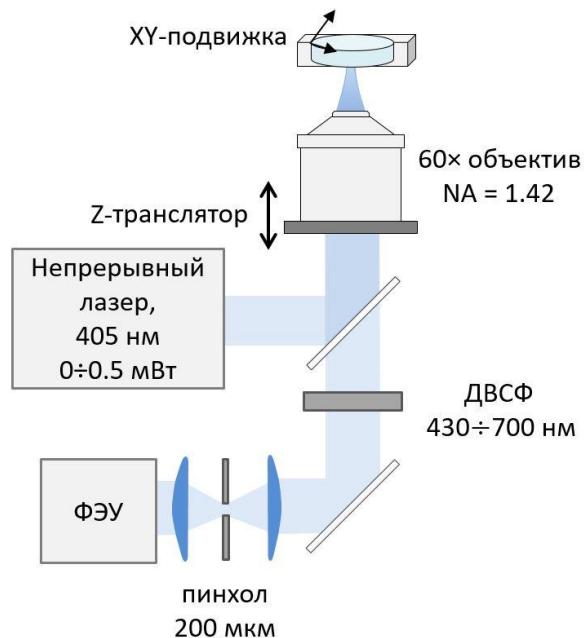


Рисунок 40. Принципиальная схема установки конфокальной микроскопии, использованной для анализа насыщения флуоресценции.

4.1.3 Метод FLIM-микроскопии для картирования времени жизни флуоресценции

Картирование методом FLIM-микроскопии (FLIM, fluorescence-lifetime imaging microscopy) времени жизни флуоресценции проводилось с использованием микроскопа MicroTime 200 STED (PicoQuant GmbH, Германия), оснащенным лазерным импульсным источником излучения с длиной волны 405 нм. Измерения выполнялись при частоте импульсов 40 МГц, длительности импульса 40 пс и максимальной средней мощностью 50 мкВт. Лазерный луч фокусировался на образце с помощью иммерсионного объектива 100× с числовой апертурой 1.4 (UplanSApo, Olympus, Япония).

Флуоресцентное излучение регистрировалось с использованием детектора (SPCM SPAD, Excelitas, США). Для того, чтобы отрезать излучение накачки в канале регистрации был использован длинноволновый светофильтр (ET425Ip), пропускающий излучение в диапазоне более 425 нм.

При времени накопления сигнала 0.3 мс на пиксель и размере пикселя 0.100 мкм/px общее время получения изображения составило 70 с при регистрации области 400×400 пикселей (40×40 мкм). Все измерения проводились при температуре 20 °C.

4.2 Насыщение сигнала флуоресценции в двухуровневой системе

Рассмотрим более подробно процесс насыщения сигнала флуоресценции в рамках модели двухуровневой системы. В двухуровневой системе при однофотонном возбуждении вероятность возбуждения в единицу времени пропорциональна произведению плотности потока фотонов (количество фотонов на единицу площади и в единицу времени) $F = I/\hbar\omega$, где I – интенсивность возбуждающего излучения, $\hbar\omega$ – энергия фотона, σ – сечение поглощения фотона на длине волны возбуждения. Динамика распада возбуждённого состояния определяется конкуренцией радиационных и нерадиационных переходов, что определяет время жизни возбужденного состояния τ . Диаграмма фотофизических процессов, описывающих эту модель, представлена на рис. 41. В этом случае динамика населенности возбужденного и основного состояний может быть описана следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dn_e}{dt} = F\sigma n_g - \frac{n_e}{\tau} \\ n_e(t=0) = 0 \\ n_e + n_g = 1 \end{cases} \quad (40)$$

где $F = I/\hbar\omega$ - плотность потока фотонов, σ - сечение поглощения, n_g и n_e - доли флуорофоров в основном и возбужденном состояниях, соответственно. В случае непрерывного возбуждения, пренебрегая нестационарными процессами, можно считать долю возбужденных флуорофоров постоянной (т.е. $\frac{dn_e}{dt} = 0$), откуда n_e можно оценить как:

$$F\sigma(1 - n_e) - \frac{n_e}{\tau} = 0 \Rightarrow n_e = \frac{F\sigma\tau}{1 + F\sigma\tau} \quad (41)$$

Тогда сигнал флуоресценции, полученный при возбуждении в непрерывном режиме генерации возбуждения, будет пропорционален доле флуорофоров в возбужденном состоянии n_e , общей концентрации флуорофоров N и квантовому выходу флуоресценции φ :

$$Fluo(F) \propto \varphi N n_e = \frac{\varphi NF\sigma\tau}{1 + F\sigma\tau} \quad (42)$$

Анализируя экспериментально полученные зависимости интенсивности флуоресценции от интенсивности возбуждения, необходимо учитывать аддитивный фоновый шум детектора, поэтому окончательная простейшая формула может иметь вид:

$$Fluo(I) = \frac{AI}{1 + BI} + C \quad (43)$$

где $A = \frac{k\varphi NF\sigma\tau}{\hbar\omega}$ характеризует как чувствительность детектора k , так и фотофизические характеристики флуорофора, иными словами, учитывает зависимость интенсивности флуоресценции от интенсивности возбуждения в линейном режиме, $B = \sigma\tau/\hbar\omega$ - параметр насыщения флуоресценции, а C - средний уровень фонового шума детектора. Параметры A , B и C оценивались с использованием нелинейного метода наименьших квадратов. Параметр BI_{max} , где I_{max} – максимальная интенсивность возбуждения, используемая в экспериментах, аналогичен безразмерному параметру $F_{max}\sigma\tau$.

Как видно из данного уравнения, величина безразмерного параметра $F\sigma\tau$ определяет, находится ли система в линейном режиме или в режиме насыщения флуоресценции. При $F\sigma\tau \ll 1$ интенсивность флуоресценции линейно зависит от F , а при $F\sigma\tau \gtrsim 1$ наблюдается насыщение флуоресценции. Учитывая, что типичное сечение поглощения флуорофоров составляет порядка $\sigma \sim 10^{-16} \text{ см}^2$, а время жизни флуоресценции $\tau \sim 10^{-9}-10^{-8} \text{ с}$, можно ожидать, что при плотностях потока фотонов $F \sim 10^{24}-10^{25} \text{ см}^{-2}\text{с}^{-1}$ можно наблюдать эффект насыщения на стандартной установке, реализующей метод конфокальной микроскопии. Так, для системы с мощностью лазера $P = 1 \text{ мВт}$, длиной волны возбуждения $\lambda = 405 \text{ нм}$, диаметром пучка в фокальной области $d = 0.81 \lambda/NA = 0.23 \text{ мкм}$, где $NA = 1.4$ – числовая апертура объектива, $F \sim P/(\hbar\omega S)$, где $\hbar\omega$ - энергия возбуждающего фотона, S - площадь пучка в фокальной области, плотность потока фотонов составляет порядка $\sim 3 \times 10^{24} \text{ см}^{-2}\text{с}^{-1}$.

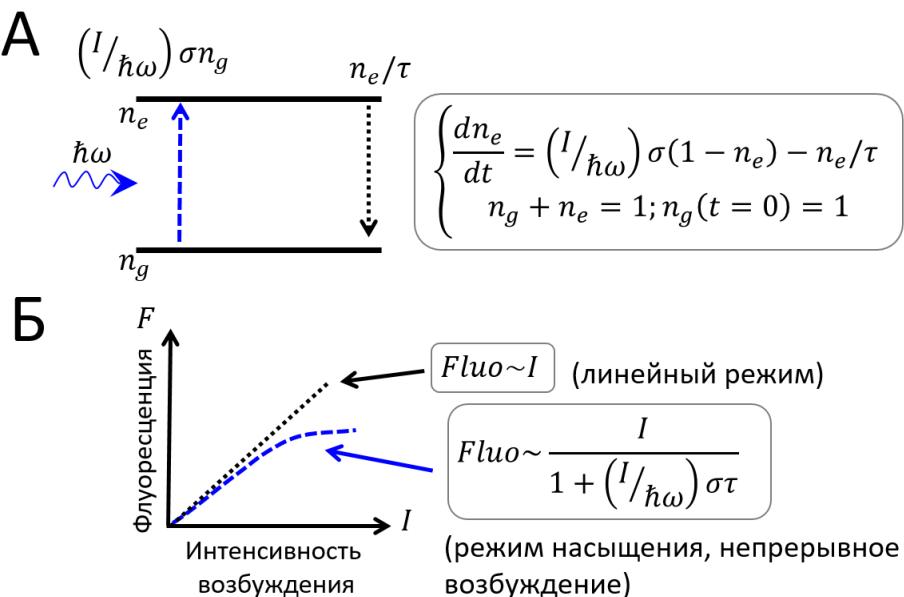


Рисунок 41. Схематическое описание эффекта насыщения флуоресценции при однофотонном возбуждении флуоресценции для двухуровневой системы. На рисунке приводится дифференциальное уравнение, описывающее долю флуорофоров в возбужденном состоянии n_e , где I – интенсивность возбуждения, $\hbar\omega$ – энергия фотона возбуждения, τ - время затухания флуорофора.

4.3 Регистрация эффекта насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального микроскопа

В работе была исследована возможность наблюдения линейного режима и режима насыщения флуоресценции с помощью конфокального микроскопа с использованием непрерывного режима возбуждения. Объектами исследования выступили растворы тиофлавина Т (ThT) в воде, а также ThT, специфически связанные с фибриллярными белковыми агрегатами. Разница параметра $F_{max}\sigma\tau$ для двух систем составляет три порядка, поскольку время жизни возбужденного состояния свободного и связанного ThT можно оценить как 1 и 1000 пс, тогда как сечение поглощения у них примерно одинаково.

При анализе зависимости $Fluo$ (I) водного раствора ThT и системы ThT – фибриллярные наноструктуры сигнал интенсивности флуоресценции усреднялся по всему полю детектирования и представлен на рис. 42. Как видно из данного графика, в растворах свободного ThT сигнал флуоресценции линейно возрастает при увеличении плотности потока фотонов до $\sim 1.1 \times 10^{24}$ см $^{-2}$ с $^{-1}$ (рис. 42 А), тогда как при специфичном связывании зонда с фибриллярными наноструктурами насыщение флуоресценции наблюдалось при плотностях потока фотонов, превышающих $\sim 0.5 \times 10^{24}$ см $^{-2}$ с $^{-1}$ (рис. 42 Б). Данный факт говорит о принципиальной возможности реализации метода микроскопии насыщения с использованием стандартного конфокального микроскопа.

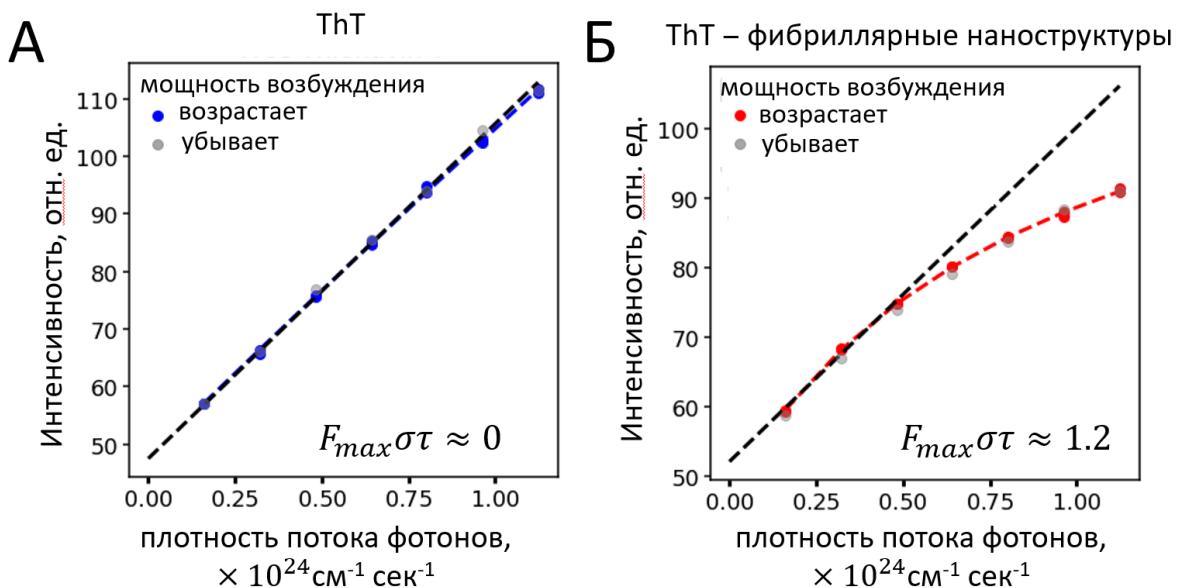


Рисунок 42. А,Б) Зависимость интенсивности флуоресценции от плотности потока фотонов накачки для водного раствора ThT и системы ThT- фибриллярные наноструктуры, соответственно.

Для оценки величины безразмерного параметра насыщения флуоресценции в различных пикселях изображения анализировалась зависимость интенсивности флуоресценции $Fluo$ от интенсивности возбуждения I (формула 43). Параметры А, В и С оценивались с помощью нелинейного метода наименьших квадратов.

Для того, чтобы убедиться, что наблюдаемые отклонения интенсивности флуоресценции от линейного закона не вызваны фотообесцвечиванием, в работе использовался резонансный сканер, обеспечивающий короткое время пребывания (не более 0.1 мкс) в пикселе, что минимизирует дозу возбуждающего излучения на пиксель. Мониторинг фотообесцвечивания был реализован с помощью следующего метода. Сначала измерялась зависимость интенсивности флуоресценции от плотности потока фотонов возбуждения (мощности источника) при увеличении мощности накачки. Затем та же зависимость была измерена при уменьшении мощности накачки для того же участка образца (рис. 42 А, Б). В случае значительного

влияния эффекта фотообесцвечивания ожидалось, что кривые, измеренные в обоих направлениях, не будут совпадать, при этом кривая, измеренная в обратном направлении, будет показывать меньшую интенсивность флуоресценции. Однако в эксперименте наблюдалось совпадение кривых $Fluo (I)$, измеренных в режиме увеличения и уменьшения мощности сигнала возбуждения (рис. 42 А, Б). Таким образом, экспериментально была продемонстрирована возможность наблюдения насыщения флуоресценции в режиме непрерывного возбуждения. Для водного раствора ThT, характеризующегося временем жизни флуоресценции порядка 1 пс, зависимость флуоресценции ThT от интенсивности возбуждения оставалась линейной во всём исследованном диапазоне интенсивностей. В то же время для раствора ThT, специфически связанного с фибриллярными белковыми агрегатами (время жизни ~ 1000 пс), для зависимости $Fluo (I)$, наблюдался режим насыщения. Следовательно, разработанный подход может быть применен для пространственно-разрешённого определения параметров насыщения насыщения флуоресценции $F_{max}\sigma t$ гетерогенной системы.

4.4 Картирование параметра насыщения флуоресценции связанного ThT с использованием стандартного конфокального микроскопа

В работе для анализа возможности картирования параметра насыщения $F_{max}\sigma t$ с использованием стандартного конфокального микроскопа с непрерывным возбуждением был использован гидрогель, полученный в результате самосборки пептида Fmoc-FF, окрашенный ThT и являющийся гетерогенной системой. Для картирования параметров насыщения $F_{max}\sigma t$ в непрерывном режиме возбуждения была охарактеризована гетерогенность модельной системы: была исследована взаимосвязь структур фибриллярного

гидрогеля, в которые встраивается ThT, и времени жизни флуоресценции ThT в них, при агрегации пептида Fmoc-FF на пути формирования гидрогеля. Для этого был использован метод картирования времени жизни флуоресценции или FLIM-микроскопия (FLIM, fluorescence-lifetime imaging microscopy), а также измерение коэффициента пропускания лазерного излучения на длине волны 635 нм. Такой подход позволил визуализировать процесс самосборки пептида и исследовать пространственную неоднородность раствора.

Формирование гидрогеля пептида Fmoc-FF является многостадийным процессом, инициируемым изменением физико-химических условий системы. На начальном этапе пептид растворяют в полярном органическом растворителе (например, этаноле или диметилсульфоксиде) при высокой концентрации, после чего систему разбавляют водой, что приводит к резкому снижению полярности среды и запускает процесс самоорганизации молекул [152]. Первоначально происходит ассоциация молекул Fmoc-FF в наносферические кластеры (рис. 43 А, панели I, II). Карты распределения среднего времени жизни флуоресценции ThT для данной системы были получены следующим образом. Зависимость интенсивности флуоресценции ThT в каждом пикселе, зарегистрированная как функция времени после импульсного возбуждения, аппроксимировалась двухэкспоненциальным законом затухания (уравнение 21). По результатам данной аппроксимации с помощью уравнения 23 рассчитывалось среднее время жизни флуоресценции ThT. Как видно из данного рис. 43 А, время жизни ThT в таких кластерах довольно велико и оставляет от 2.7 до 3 нс, что свидетельствует о специфичном характере взаимодействия зонда с регистрируемыми структурами. Формирование стабильных сферических кластеров происходит при достижении критической концентрации пептида, при которой система переходит в перенасыщенное состояние. Критический размер таких кластеров определяется параметрами системы, включая растворимость пептида и его

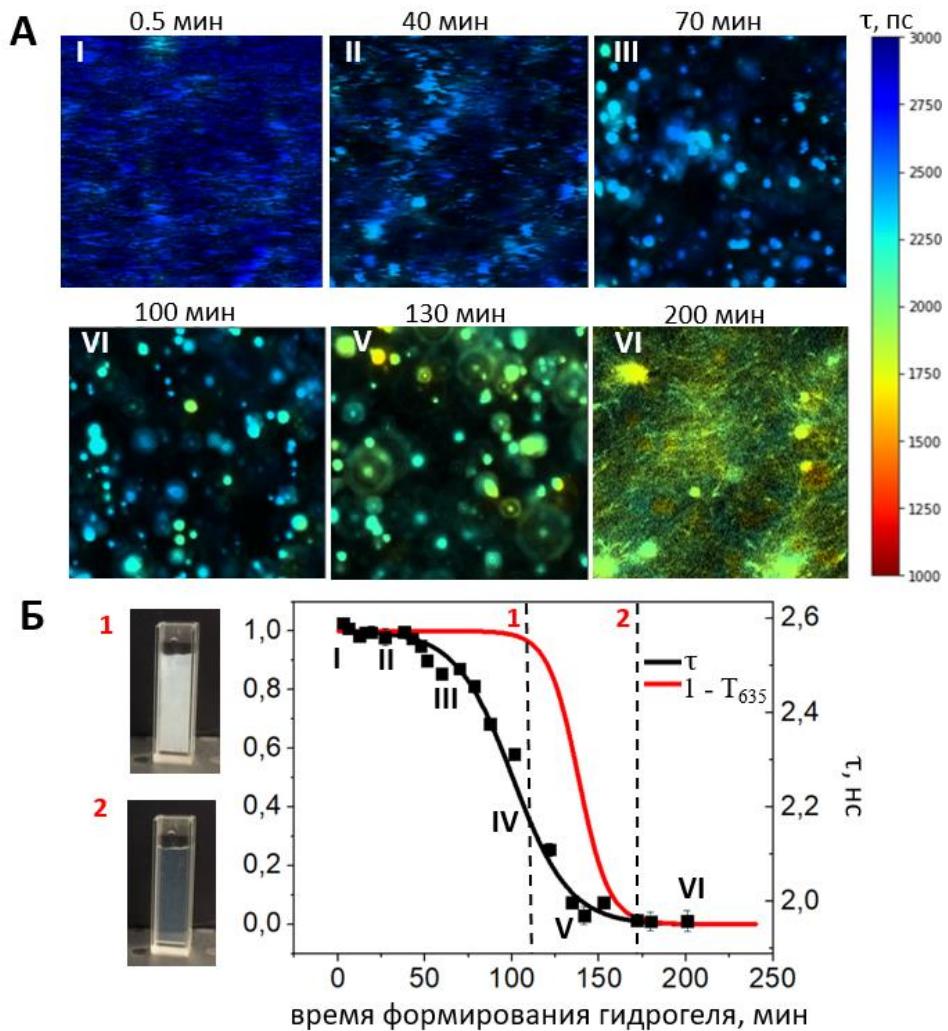


Рисунок 43. А - Изображения, полученные с использованием FLIM-микроскопии, при анализе формирования фибриллярного гидрогеля из пептида Fmoc-FF в присутствии 3 мкМ ThT. Б - Зависимость усредненного по изображению времени жизни флуоресценции ThT τ (черные квадраты обозначают τ в абсолютных значениях, которым соответствует правая шкала; черной линией представлена аппроксимация данной зависимости сигмоидой) и изменение параметра 1 - T_{635} (красная линия) в системе Fmoc-FF + ThT от времени формирования фибриллярного гидрогеля, где T_{635} - коэффициент пропускания излучения на длине волны 635 нм. На фотографиях 1 и 2 изображены моменты перехода мутного фибриллярного гидрогеля в прозрачный.

молекулярную массу. Время жизни тиофлавина Т в таких структурах варьируется от 2 до 2.75 нс в зависимости от размера агрегата (рис. 43 А, панели III, IV, V). При дальнейшем гелеобразовании внутри сферических

агрегатов начинается реорганизация молекулярной упаковки, приводящая к образованию фибрилл, которые затем удлиняются, формируя каркас гидрогеля. Время жизни флуоресценции ThT в таких гидрогелях варьируется от 1 до 2 нс (рис. 43 А, панели VI). Так, на рис. 43 А, панели VI видно, что даже на финальном этапе формирования гидрогеля система остается сильно гетерогенной. Наблюдаются сферические агрегаты пептида Fmoc-FF, а также фибриллярные нити, время жизни флуоресценции ThT в которых от 1.75 до 2 нс, а также области фибриллярного гидрогеля, отмеченные красным цветом, время жизни флуоресценции ThT в которых варьируется от 1 до 1.5 нс. На рис. 43 Б представлено усредненное по изображению изменение времени жизни флуоресценции ThT τ при формировании гидрогеля. Из данного графика видно, что значения среднего времени жизни тиофлавина Т при встраивании в сферические агрегаты и фибриллы демонстрирует сигмоидальную зависимость и варьируется в диапазоне от 3 до 1 нс, соответственно.

В ходе исследования кинетики агрегации пептидов проводились измерения коэффициента пропускания лазерного излучения на длине волны 635 нм T_{635} через кювету с оптическим путем 2 мм с использованием спектрометра Maya 2000 PRO (Ocean Optics, США). Угол между источником излучения и детектором составлял 180°. Время накопления составляло 100 мс. На рис. 43 Б красной линией представлено изменение параметра 1 - T_{635} , демонстрирующее сигмоидальное изменение, отражающее процесс структурной перестройки системы от начальной гетерогенной суспензии (фотография 1 на рис. 43 Б) к прозрачному фибриллярному гидрогелю (фотография 2 на рис. 43 Б). При анализе кинетики формирования фибриллярного гидрогеля наблюдается асинхронный характер изменения параметра 1 - T_{635} и времени жизни флуоресценции ThT: уменьшение времени жизни флуоресценции ThT предшествует уменьшению параметра 1 - T_{635} . Изменение параметра 1 - T_{635} характеризуется длительной начальной стадией

и резким переходом между состояниями (от мутной суспензии к прозрачному раствору, что видно из изображений FLIM), в то время как время жизни флуоресценции ThT изменяется практически с начальной стадии формирования гидрогеля и достигает минимального значения синхронно с установлением оптической прозрачности системы. Таким образом можно сделать вывод, что данные параметры отражают различные стадии процесса формирования гидрогеля, а именно, параметр $1 - T_{635}$ является индикатором макроскопической структурной перестройки (переход от сферических агрегатов к фибриллярным структурам), в то время как время жизни флуоресценции ThT чувствительно к молекулярным перестройкам и изменению микровязкости, происходящим на протяжении всего процесса самоорганизации.

Результаты проведенного исследования фотофизических характеристик ThT в процессе формирования гидрогеля свидетельствуют о высокой специфичности связывания данного флуоресцентного зонда со структурами, сформированными из пептида Fmoc-FF в ходе агрегации. Полученные данные демонстрируют, что время жизни флуоресценции ThT при образовании комплекса со структурами в гидрогеле Fmoc-FF превышает 1 нс и характеризуется пространственно-временной гетерогенностью, отражающей различные стадии процесса самоорганизации. Структура гидрогеля Fmoc-FF неоднородна и содержит как волокна, так и сферические частицы, образующиеся на промежуточных стадиях формирования гидрогеля (рис. 43). Из выше сказанного следует, что измерение с помощью метода флуоресцентной конфокальной микроскопии с использованием параметров, примененных при измерении системы ThT – фибриллярные наноструктуры, позволит наблюдать картирование параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ в системе ThT – Fmoc-FF.

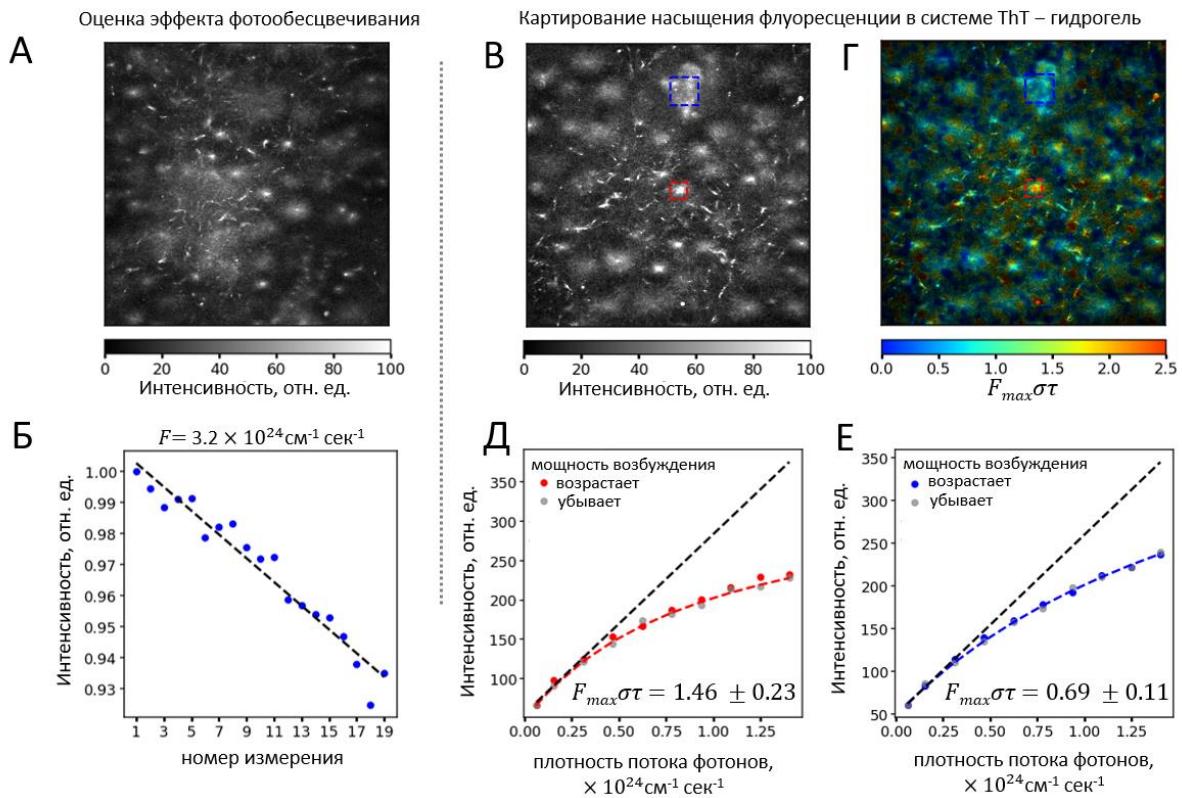


Рисунок 44. – А) Флуоресцентное изображение системы ThT - Fmoc-FF, картированное для оценки эффекта фотообесцвечивания. Б) Зависимость средней интенсивности, нормированной на среднюю интенсивность флуоресценции изображения при первом сканировании. В,Г) Карты интенсивности флуоресценции и параметров насыщения флуоресценции $F_{max}\sigma\tau$ гетерогенной системы гидрогеля, окрашенной ThT. Д,Е) Зависимость интенсивности флуоресценции от плотности потока фотонов для областей карт, изображенных красными (Д) и синими (Е) прямоугольниками на панелях В,Г.

В работе была исследована возможность картирования параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ для гидрогеля, полученного в результате самосборки пептида Fmoc-FF, окрашенного ThT. Особое внимание было уделено доказательству того факта, что уменьшение интенсивности флуоресценции при высокой интенсивности возбуждения не вызвано фотообесцвечиванием. Для этого выбранная область образца ThT – Fmoc-FF измерялась при максимальной мощности лазера ($P = 1 \text{ мВт}, F \sim 3.2 \times 10^{24} \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$) повторно несколько раз (рис. 44 А). Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции от номера сканирования представлена на рис. 44 Б. Было

получено, что при высоких мощностях лазера в использованных экспериментальных условиях наблюдается лишь незначительное фотообесцвечивание – порядка 0.5 % на скан. В эксперименте по картированию параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ системы ThT – Fmoc-FF наблюдалось отклонение интенсивности флуоресценции от линейного изменения на $\approx 20 \%$, что подтверждает, что наблюдаемое в системе уменьшение интенсивности флуоресценции не вызвано фотообесцвечиванием.

На рис.44 В и Г представлены изображения, полученные с помощью метода флуоресцентной конфокальной микроскопии для гидрогеля, окрашенного ThT, и соответствующая карта параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$, где F_{max} - максимальная интенсивность возбуждения, использованная в экспериментах. На рис. 44 Д и Е также представлены кривые насыщения флуоресценции для областей, выделенных красными и синими прямоугольниками. Как видно из данных кривых, параметр $F_{max}\sigma\tau$ отличается более чем в два раза и для красной области насыщается при значении 1.46 ± 0.23 , в то время как для синей области достигает значения 0.69 ± 0.11 , в то время как выделенные области имеют практически одинаковую интенсивность флуоресценции ThT. Сечение поглощения ThT, встроенного в фибриллярный гидрогель, в исследуемых областях примерно одинаково. При этом различие параметра $F_{max}\sigma\tau$ в данной гетерогенной системе, вероятнее всего, обусловлены отличием во времени жизни возбужденного состояния связанного ThT, измеренном методом FLIM на финальной стадии формирования фибриллярного гидрогеля, которое варьировалось от 1 до 2 нс. Таким образом, наблюдаемое различие параметра $F_{max}\sigma\tau$ позволяет выявить молекулы ThT с различным микроокружением, которое влияет на время жизни флуоресценции ThT. При этом напрямую в данном эксперименте время жизни не измеряется, а молекулярно-специфичное картирование фотофизических

параметров возможно за счет эффекта насыщения флуоресценции. Полученные карты параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ для гидрогеля Fmoc-FF (рис. 44) позволяют сделать вывод, что картирование параметра насыщения флуоресценции связанного ThT с использованием стандартного конфокального микроскопа может быть реализовано для мониторинга процесса самосборки гидрогеля, аналогичного FLIM-микроскопии.

Основные выводы к главе 4.

Повышение специфичности является одной из центральных задач молекулярной визуализации, поскольку позволяет проводить глубокий анализ процессов в исследуемой системе. Картирование параметра насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального микроскопа расширяет возможности молекулярного имиджинга, добавляя параметр насыщения флуоресценции к набору молекулярно-специфических индикаторов, которые могут быть использованы в качестве контраста для визуализации структур на изображении. В данной работе показано, что применение режима непрерывного возбуждения в экспериментах с использованием стандартного конфокального микроскопа позволяет достичь плотности потока фотонов достаточно высокой для того, чтобы вызвать насыщение флуоресценции. Такой подход позволяет получить новую информацию о пространственном распределении флуорофоров в исследуемой системе без необходимости использования дополнительного оборудования используемого, например, при реализации метода FLIM. Было продемонстрировано, что с использованием конфокальной микроскопии в непрерывном режиме возбуждения флуоресценции можно наблюдать различие параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ для ThT в системах с различным микроокружением. Данный подход был применен для визуализации гетерогенности фибриллярного гидрогеля, окрашенного ThT. Значение

параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ ThT, встроенного в различные структуры фибриллярного гидрогеля, при одинаковой интенсивности флуоресценции ThT в них различалось более чем в два раза и составило 1.46 ± 0.23 и 0.69 ± 0.11 . Таким образом, картирование параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$ позволило визуализировать различие фотофизических характеристик зонда при встраивании в фибриллярные нитевидные наноструктуры и сферические агрегаты в гидрогеле.

Заключение

В заключении диссертации сформулированы основные результаты и выводы, полученные в настоящей работе:

1. С использованием время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии при анализе связывания флуоресцентного зонда ThT с белком альбумином было определено наличие по крайней мере двух мод связывания ThT со схожими фотофизическими характеристиками зонда в них. Для моды связанного ThT с временем затухания флуоресценции $\tau_2 = 800$ пс константа комплексообразования составляла $(0.50 \pm 0.02) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$, для моды связанного ThT с временем затухания флуоресценции $\tau_3 = 2100$ пс константа комплексообразования составила $(2.6 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$.
2. Анализ поглощения белка на 280 нм и ThT в белковых фракциях на 410 нм, разделенных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии показал, что в растворе альбумина присутствует димерная фракция, константа комплексообразования с ThT для которой в ~ 6 раз выше, чем для мономерной фракцией. Было показано, что димеры альбумина являются стабильными структурами, и в системе отсутствует обратимое равновесие мономер-димер.
3. При образовании комплекса ThT-белок интенсивность и среднее время жизни флуоресценции изменяются асинхронно при увеличении концентрации белка. При росте времени жизни ThT с ~ 1 пс до ~ 1 нс при встраивании в белок, интенсивность его флуоресценции увеличивается только в несколько десятков раз, что может быть объяснено наличием субпопуляции связанного ThT со сверхбыстрой релаксацией и является общей особенностью неспецифического взаимодействия ThT с белками и/или белковыми олигомерами.
4. С использованием численного моделирования двухкомпонентной системы со сверхбыстрым ($\tau \ll \tau_{\text{IRF}}$) и медленным ($\tau \gg \tau_{\text{IRF}}$) временами релаксации

возбужденного состояния было продемонстрировано, что присутствие даже небольшой доли компоненты с временем затухания флуоресценции ~ 1 нс эффективно маскирует вклад сверхбыстрой компоненты в кривую затухания флуоресценции, измеренную на субнаносекундном диапазоне.

5. С использованием метода ап-конверсии флуоресценции было показано наличие более 50% связанный субпопуляции ThT со сверхбыстрой релаксацией ~ 1 пс, которая ответственна за низкое усиление флуоресценции ThT при встраивании в белок.
6. Исследование формирования фибрилл показало, что образование некоторого количества крупных (~ 100 нм) агрегатов приводит к связыванию $\sim 1\%$ молекул ThT в участки с жестким микроокружением, что приводит к увеличению времени жизни флуоресценции ThT, измеренному с субнаносекундным разрешением; дальнейшее образование более крупных агрегатов приводит к увеличению интенсивности флуоресценции ThT до тех пор, пока все молекулы ThT не будут встроены в сайты с жестким микроокружением.
7. При исследовании взаимодействия ThT с фибриллами было показано, что асинхронное поведение интенсивности и времени жизни флуоресценции ThT, измеренного на установке с шириной аппаратной функции ~ 200 пс, можно объяснить как следствие присутствия в растворе фракции молекул ThT со сверхбыстрым затуханием (~ 1 пс) и маленьким квантовым выходом флуоресценции. Фотофизические свойства данной фракции были получены с помощью метода ап-конверсии флуоресценции с временным разрешением ~ 200 фс.
8. Разработан метод картирование параметра насыщения флуоресценции $F_{max,\sigma T}$ с использованием конфокального микроскопа. Методология апробирована на примере гетерогенной системы ThT - фибриллярный гидрогель, сформированный из пептида Fmoc-FF. Было показано, что при

схожих значениях интенсивности флуоресценции ThT, значение параметра $F_{max}\sigma\tau$ составило 1.46 ± 0.23 и 0.69 ± 0.11 и различалось более чем в два раза в различных структурах гидрогеля.

Благодарности

Автор желает выразить благодарность своему научному руководителю д.ф.-м.н. Ширшину Е.А. за предложенную интересную работу, за постоянное внимание и помошь в ее проведении. Автор признателен сотрудникам лаборатории лазерной биофотоники к.ф.-м.н. Будылину Г.С., к.ф.-м.н. Тихоновой Т.Н. за помошь с технической работой, моделированием и обработкой, а также к.ф.-м.н. Якимову Б.П., к.ф.-м.н. Давыдову Д.А. и Рубекиной А.А. за помошь в проведении экспериментов.

Публикации автора по теме диссертации

*Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих
Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова:*

- A1. **Rovnyagina N.R.**, Sluchanko N.N., Tikhonova T.N., Fadeev V.V., Litskevich A.Yu., Maskevich A.A., Shirshin E.A. *Binding of thioflavin T by albumins: An underestimated role of protein oligomeric heterogeneity* // International Journal of Biological Macromolecules, 2018, Vol. 108, P. 284–290. Импакт-фактор 8,5 (JIF). EDN: LYUMDJ. Общий объём статьи = 0,44 п.л., личный вклад = 0,35 п.л.
- A2. Tikhonova T.N., **Rovnyagina N.R.**, Zhrebker A.Ya., Sluchanko N.N., Rubekina A.A., Orekhov A.S., Nikolaev E.N., Fadeev V.V., Uversky V.N., Shirshin E.A. *Dissection of the deep-blue autofluorescence changes accompanying amyloid fibrillation* // Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, Vol. 651, P. 13–20. Импакт-фактор 3,0 (JIF). EDN: XXFFWX. Общий объём статьи = 0,5 п.л., личный вклад = 0,4 п.л.
- A3. **Rovnyagina N.R.**, Tikhonova T.N., Kompanets V.O., Sluchanko N.N., Tugaeva K.V., Chekalin S.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darvin M.E., Shirshin E.A. *Free and bound Thioflavin T molecules with ultrafast relaxation: implications for assessment of protein binding and aggregation* // Laser Physics Letters, 2019, Vol. 16, No. 7, P. 075601. Импакт-фактор 1,4 (JIF). EDN: HUNFQT. Общий объём статьи = 0,25 п.л., личный вклад = 0,2 п.л.
- A4. **Rovnyagina N.R.**, Budylin G.S., Vainer Yu.G., Tikhonova T.N., Vasin S.L., Yakovlev A.A., Kompanets V.O., Chekalin S.V., Priezzhev A.V., Shirshin E.A. *Fluorescence lifetime and intensity of Thioflavin T as reporters of different fibrillation stages: insights obtained from fluorescence up-conversion and particle size distribution measurements* // International Journal of Molecular Sciences, 2020, Vol. 21, No. 17, P. 6169. Импакт-фактор 4,9 (JIF).

EDN: MPEIHS. Общий объём статьи = 0,5 п.л., личный вклад = 0,4 п.л.

- A5. Yakimov B., **Rovnyagina N.**, Hasan A., Zhang J., Wang H., Fadeev V., Urusova L., Khoroshilov E., Sharkov A., Mokrysheva N., Shirshin E. *Fluorescence saturation imaging microscopy: molecular fingerprinting with a standard confocal microscope* // Biomedical Optics Express, 2024, Vol. 15, No. 6, P. 3755–3769. Импакт-фактор 3,2 (JIF). EDN: QMBVPF. Общий объём статьи = 0,53 п.л., личный вклад = 0,42 п.л.

Список литературы

1. Rekatsina M. et al. Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review // *Adv. Ther.* 2020. Vol. 37, № 1. P. 113–139.
2. Zarkali A. et al. Neuroimaging and fluid biomarkers in Parkinson’s disease in an era of targeted interventions // *Nat. Commun.* 2024. Vol. 15, № 1. P. 5661.
3. Zhang S. et al. Targeting amyloid proteins for clinical diagnosis of neurodegenerative diseases // *Fundam. Res.* 2023. Vol. 3, № 4. P. 505–519.
4. Sulatskaya A.I. et al. Investigation of α -Synuclein Amyloid Fibrils Using the Fluorescent Probe Thioflavin T // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, № 9.
5. LeVine H. Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T // *Methods Enzymol.* Academic Press Inc., 1999. Vol. 309. P. 274–284.
6. Amdursky N., Erez Y., Huppert D. Molecular rotors: What lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker // *Acc. Chem. Res.* American Chemical Society, 2012. Vol. 45, № 9. P. 1548–1557.
7. Rovnyagina N.R. et al. Binding of thioflavin T by albumins: An underestimated role of protein oligomeric heterogeneity // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V., 2018. Vol. 108. P. 284–290.
8. Malmos K. et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation // *Amyloid*. 2017. Vol. 24. P. 1–16.
9. Sen P. et al. Interactions of thioflavin T with serum albumins: Spectroscopic analyses // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier, 2009. Vol. 74, № 1. P. 94–99.
10. Dasgupta M., Kishore N. Characterization and analysis of binding of Thioflavin T with partially folded and native states of α -lactalbumin protein by calorimetric and spectroscopic techniques // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 95. P. 376–384.
11. Manafikhi R. et al. Plasma amyloid β levels in Alzheimer’s disease and cognitively normal controls in Syrian population // *Med. J. Islam. Repub. Iran.* Iran University of Medical Sciences, 2021. Vol. 35. P. 19.
12. Groenning M. et al. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils // *J. Struct. Biol.* Academic Press, 2007. Vol. 159, № 3. P. 483–497.
13. Sulatskaya A.I., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. Interaction of Thioflavin

- T with Amyloid Fibrils: Stoichiometry and Affinity of Dye Binding, Absorption Spectra of Bound Dye // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2011. Vol. 115, № 39. P. 11519–11524.
14. 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. American Chemical Society, 2008. Vol. 112, № 49. P. 15893–15902.
 15. Stsiapura V.I. et al. Solvent Polarity Effect on Nonradiative Decay Rate of Thioflavin T // J. Phys. Chem. A. American Chemical Society, 2016. Vol. 120, № 28. P. 5481–5496.
 16. Bhasikuttan A.C., Mohanty J. Detection, inhibition and disintegration of amyloid fibrils: the role of optical probes and macrocyclic receptors // Chem. Commun. Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 53, № 19. P. 2789–2809.
 17. Stsiapura V.I. et al. Charge transfer process determines ultrafast excited state deactivation of thioflavin T in low-viscosity solvents // J. Phys. Chem. A. American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 32. P. 8345–8350.
 18. Fadeev V. V et al. Saturation spectroscopy as a method for determining the photophysical parameters of complicated organic compounds // Opt. Commun. 1999. Vol. 166, № 1. P. 25–33.
 19. Fadeev V. V, Gorbunov M.Y., Gostev T.S. Studying photoprotective processes in the green alga Chlorella pyrenoidosa using nonlinear laser fluorimetry // J. Biophotonics. Wiley Online Library, 2012. Vol. 5, № 7. P. 502–507.
 20. Zhang Y. et al. Super-resolution fluorescence microscopy by stepwise optical saturation // Biomed. Opt. Express. Optica Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 4. P. 1613–1629.
 21. Visscher K., Brakenhoff G.J., Visser T.D. Fluorescence saturation in confocal microscopy // J. Microsc. Wiley Online Library, 1994. Vol. 175, № 2. P. 162–165.
 22. Hell S.W. Toward fluorescence nanoscopy // Nat. Biotechnol. 2003. Vol. 21, № 11. P. 1347–1355.
 23. Zhao G. et al. Resolution enhancement of saturated fluorescence emission difference microscopy // Opt. Express. Optica Publishing Group, 2016. Vol. 24, № 20. P. 23596–23609.
 24. Nawa Y. et al. Saturated excitation microscopy using differential excitation for efficient detection of nonlinear fluorescence signals // APL Photonics. 2018. Vol. 3, № 8. P. 80805.

25. Qing-xin Hua, Weiss M.A. Mechanism of insulin fibrillation. The structure of insulin under amyloidogenic conditions resembles a protein-folding intermediate // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 20, P. 21449–21460.
26. Biancalana M., Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier, 2010. Vol. 1804, № 7. P. 1405–1412.
27. Stine W.B. et al. The Nanometer-scale structure of amyloid- β visualized by atomic force microscopy // *Protein J.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1996. Vol. 15, № 2. P. 193–203.
28. Chiti F., Dobson C.M. Amyloid formation by globular proteins under native conditions // *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 5, № 1. P. 15–22.
29. Chiti F., Dobson C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade // *Annu. Rev. Biochem.* Annual Reviews, 2017. Vol. 86, № 1. P. 27–68.
30. Iadanza M.G. et al. A new era for understanding amyloid structures and disease // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 19, № 12. P. 755–773.
31. Vaquer-Alicea J., Diamond M.I. Propagation of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases // *Annu. Rev. Biochem.* Annual Reviews, 2019. Vol. 88, № 1. P. 785–810.
32. Greenwald J., Riek R. Biology of amyloid: Structure, function, and regulation // *Structure*. Structure, 2010. Vol. 18, № 10. P. 1244–1260.
33. Maji S.K. et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science (80-.).* Science, 2009. Vol. 325, № 5938. P. 328–332.
34. Sipe J.D. et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis // *Amyloid*. 2010. Vol. 17, № 3–4. P. 101–104.
35. Jarrett J.T., Lansbury P.T. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? // *Cell*. Cell Press, 1993. Vol. 73, № 6. P. 1055–1058.
36. Lansbury P.T., Lashuel H.A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic // *Nature*. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 443, № 7113. P. 774–779.
37. Chiti F., Dobson C.M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human

Disease // Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews, 2006. Vol. 75, № 1. P. 333–366.

38. Chiti F. et al. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 1999. Vol. 96, № 7. P. 3590–3594.
39. Calamai M., Chiti F., Dobson C.M. Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein // Biophys. J. Biophysical Society, 2005. Vol. 89, № 6. P. 4201–4210.
40. Malishev R. et al. The pro-apoptotic domain of BIM protein forms toxic amyloid fibrils // Cell. Mol. Life Sci. 2021. Vol. 78, № 5. P. 2145–2155.
41. Haidekker M.A., Theodorakis E.A. Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors // J. Biol. Eng. 2010. Vol. 4, № 1. P. 11.
42. Singh P.K. et al. Viscosity Effect on the Ultrafast Bond Twisting Dynamics in an Amyloid Fibril Sensor: Thioflavin-T // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 17. P. 5920–5927.
43. Förster T., Hoffmann G. Die Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten einiger Farbstoffsysteme. 1971. Vol. 75, № 1_2. P. 63–76.
44. Haidekker M.A., Theodorakis E.A. Molecular rotors - Fluorescent biosensors for viscosity and flow // Org. Biomol. Chem. Royal Society of Chemistry, 2007. Vol. 5, № 11. P. 1669–1678.
45. Kuimova M.K. et al. Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death // Nat. Chem. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 1, № 1. P. 69–73.
46. Kuimova M.K. Molecular rotors image intracellular viscosity // Chimia. 2012. Vol. 66, № 4. P. 159–165.
47. López-Duarte I. et al. A molecular rotor for measuring viscosity in plasma membranes of live cells // Chem. Commun. Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 50, № 40. P. 5282–5284.
48. Loutfy R.O., Teegardent D.M. Effect of Polymer Chain Tacticity on the Fluorescence of Molecular Rotors // Macromolecules. American Chemical Society, 1983. Vol. 16, № 3. P. 452–456.
49. Goh W.L. et al. Molecular rotors as conditionally fluorescent labels for rapid detection of biomolecular interactions // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, 2014. Vol. 136, № 17. P. 6159–6162.
50. Murudkar S. et al. Ultrafast molecular rotor: An efficient sensor for

premelting of natural DNA // Chem. Commun. The Royal Society of Chemistry, 2012. Vol. 48, № 43. P. 5301–5303.

51. Murudkar S. et al. Ultrafast molecular rotor based DNA sensor: An insight into the mode of interaction // J. Photochem. Photobiol. A Chem. Elsevier, 2014. Vol. 295. P. 17–25.
52. Paez-Perez M., Kuimova M.K. Molecular rotors: Fluorescent sensors for microviscosity and conformation of biomolecules // Angew. Chemie. Wiley Online Library, 2024. Vol. 136, № 6. P. e202311233.
53. Stsiapura V.I. et al. Computational Study of Thioflavin T Torsional Relaxation in the Excited State // J. Phys. Chem. A. American Chemical Society, 2007. Vol. 111, № 22. P. 4829–4835.
54. Singh P.K. et al. Ultrafast bond twisting dynamics in amyloid fibril sensor // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 7. P. 2541–2546.
55. Stsiapura V.I. et al. Charge transfer process determines ultrafast excited state deactivation of thioflavin T in low-viscosity solvents // J. Phys. Chem. A. American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 32. P. 8345–8350.
56. Kuznetsova I.M. et al. Analyzing thioflavin t binding to amyloid fibrils by an equilibrium microdialysis-based technique // PLoS One / ed. Gasset M. 2012. Vol. 7, № 2. P. e30724.
57. Krebs M.R.H., Bromley E.H.C., Donald A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications // J. Struct. Biol. Academic Press, 2005. Vol. 149, № 1. P. 30–37.
58. Freire S. et al. Photophysical study of Thioflavin T as fluorescence marker of amyloid fibrils // Dye. Pigment. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 110. P. 97–105.
59. Erez Y. et al. Modeling the Nonradiative Decay Rate of Electronically Excited Thioflavin T // J. Phys. Chem. A. American Chemical Society, 2011. Vol. 115, № 30. P. 8479–8487.
60. Sulatskaya A.I. et al. Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils // PLoS One. Public Library of Science, 2010. Vol. 5, № 10.
61. Amdursky N. et al. Pressure Effect on the Nonradiative Process of Thioflavin-T // J. Phys. Chem. A. American Chemical Society, 2011. Vol. 115, № 24. P. 6481–6487.
62. Amdursky N. et al. Temperature Dependence of the Fluorescence Properties of Thioflavin-T in Propanol, a Glass-Forming Liquid // J. Phys. Chem. A.

American Chemical Society, 2011. Vol. 115, № 12. P. 2540–2548.

63. 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. American Chemical Society , 2007. Vol. 6, № 4. P. 1392–1401.
64. Rodríguez-Rodríguez C. et al. Design, Selection, and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating Properties for Application in Alzheimer’s Disease // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, 2009. Vol. 131, № 4. P. 1436–1451.
65. LEVINE-III H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer’s disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution // Protein Sci. 1993. Vol. 2. P. 404–410.
66. Groenning M. et al. Study on the binding of Thioflavin T to β -sheet-rich and non- β -sheet cavities // J. Struct. Biol. 2007. Vol. 158, № 3. P. 358–369.
67. Sabaté R., Saupe S.J. Thioflavin T fluorescence anisotropy: An alternative technique for the study of amyloid aggregation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. Vol. 360, № 1. P. 135–138.
68. Mohanty J. et al. Early detection of insulin fibrillation: A fluorescence lifetime assay to probe the pre-fibrillar regime // Chem. Commun. Royal Society of Chemistry, 2012. Vol. 48, № 18. P. 2403–2405.
69. Voropai E.S. et al. Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils // J. Appl. Spectrosc. Springer, 2003. Vol. 70, № 6. P. 868–874.
70. Murugan N.A. et al. Amyloid Fibril-Induced Structural and Spectral Modifications in the Thioflavin-T Optical Probe // J. Phys. Chem. Lett. American Chemical Society, 2013. Vol. 4, № 1. P. 70–77.
71. Mahato J. et al. Sensitized Emission Imaging Allows Nanoscale Surface Polarity Mapping of α -Synuclein Amyloid Fibrils // ACS Chem. Neurosci. American Chemical Society, 2024. Vol. 15, № 1. P. 108–118.
72. Foderà V. et al. Thioflavin T Hydroxylation at Basic pH and Its Effect on Amyloid Fibril Detection // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2008. Vol. 112, № 47. P. 15174–15181.
73. Sulatsky M.I. et al. Prediction of the Feasibility of Using the «Gold Standard» Thioflavin T to Detect Amyloid Fibril in Acidic Media // Anal. Chem. American Chemical Society, 2024. Vol. 96, № 5. P. 2158–2164.
74. Sabaté R., Lascu I., Saupe S.J. On the binding of Thioflavin-T to HET-s amyloid fibrils assembled at pH 2 // J. Struct. Biol. Academic Press, 2008.

Vol. 162, № 3. P. 387–396.

75. Castellano L.M., Shorter J. The Surprising Role of Amyloid Fibrils in HIV Infection // *Biology*. 2012. Vol. 1, № 1. P. 58–80.
76. Easterhoff D. et al. Fluorescence detection of cationic amyloid fibrils in human semen // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. Vol. 23, № 18. P. 5199–5202.
77. Arad E. et al. Revisiting thioflavin T (ThT) fluorescence as a marker of protein fibrillation – The prominent role of electrostatic interactions // *J. Colloid Interface Sci.* 2020. Vol. 573. P. 87–95.
78. Maskevich A.A. et al. Spectral Manifestations of Thioflavin T Aggregation // *J. Appl. Spectrosc.* Springer New York LLC, 2015. Vol. 82, № 1. P. 33–39.
79. Khurana R. et al. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils // *J. Struct. Biol.* Academic Press, 2005. Vol. 151, № 3. P. 229–238.
80. Kitts C.C., Vanden Bout D.A. Near-field scanning optical microscopy measurements of fluorescent molecular probes binding to insulin amyloid fibrils // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2009. Vol. 113, № 35. P. 12090–12095.
81. Yu L. et al. Molecular recognition of human islet amyloid polypeptide assembly by selective oligomerization of thioflavin T // *Sci. Adv. American Association for the Advancement of Science*, 2025. Vol. 6, № 32. P. eabc1449.
82. Friedhoff P. et al. Rapid Assembly of Alzheimer-like Paired Helical Filaments from Microtubule-Associated Protein Tau Monitored by Fluorescence in Solution // *Biochemistry. American Chemical Society*, 1998. Vol. 37, № 28. P. 10223–10230.
83. Lindgren M., Sörgjerd K., Hammarström P. Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2005. Vol. 88, № 6. P. 4200–4212.
84. Sulatskaya A.I. et al. Stoichiometry and affinity of thioflavin T binding to Sup35p amyloid fibrils // *PLoS One. Public Library of Science San Francisco, CA USA*, 2016. Vol. 11, № 5. P. e0156314.
85. Sulatskaya A.I., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: Fluorescence quantum yield of bound dye // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2012. Vol. 116, № 8. P. 2538–2544.
86. Kuznetsova I.M. et al. A New Trend in the Experimental Methodology for

the Analysis of the Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils // Mol. Neurobiol. 2012. Vol. 45, № 3. P. 488–498.

87. Sulatskaya A.I. et al. Investigation of amyloid fibrils on the basis of full-length and truncated forms of beta-2-microglobulin with the use of equilibrium microdialysis // The Seventh European Conference on Biology and Medical Sciences. 2015. P. 11–17.
88. Fonin A. V et al. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction // PLoS One. Public Library of Science San Francisco, USA, 2014. Vol. 9, № 7. P. e103878.
89. Frieg B. et al. Binding modes of thioflavin T and Congo red to the fibril structure of amyloid- β (1–42) // Chem. Commun. Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 56, № 55. P. 7589–7592.
90. Singh P.K., Mora A.K., Nath S. Ultrafast fluorescence spectroscopy reveals a dominant weakly-emissive population of fibril bound thioflavin-T // Chem. Commun. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 51, № 74. P. 14042–14045.
91. Groenning M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status // Journal of Chemical Biology. Springer, 2010. Vol. 3, № 1. P. 1–18.
92. Wu C. et al. The Binding of Thioflavin T and Its Neutral Analog BTA-1 to Protomembranes of the Alzheimer's Disease A β 16–22 Peptide Probed by Molecular Dynamics Simulations // J. Mol. Biol. Elsevier BV, 2008. Vol. 384, № 3. P. 718–729.
93. Nilsson M.R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro // Methods. Academic Press, 2004. Vol. 34, № 1. P. 151–160.
94. Michaels T.C.T. et al. Chemical Kinetics for Bridging Molecular Mechanisms and Macroscopic Measurements of Amyloid Fibril Formation // Annu. Rev. Phys. Chem. Annual Reviews, 2018. Vol. 69, № 1. P. 273–298.
95. Griffin M.D.W. et al. Thioflavin T fluorescence in human serum: Correlations with vascular health and cardiovascular risk factors // Clin. Biochem. Elsevier, 2010. Vol. 43, № 3. P. 278–286.
96. Halabelian L. et al. A covalent homodimer probing early oligomers along amyloid aggregation // Sci. Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 14651.
97. Wu C. et al. Binding Modes of Thioflavin-T to the Single-Layer β -Sheet of the Peptide Self-Assembly Mimics // J. Mol. Biol. Academic Press, 2009. Vol. 394, № 4. P. 627–633.

98. Maskevich A.A., Kurhuzenkau S.A., Lavysh A. V. Fluorescent properties of thioflavin T incorporated in native and denatured proteins // Vestn. Grodno State Univ. 2013. Vol. 151. P. 75–85.
99. Harel M. et al. Crystal Structure of Thioflavin T Bound to the Peripheral Site of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Reveals How Thioflavin T Acts as a Sensitive Fluorescent Reporter of Ligand Binding to the Acylation Site // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, 2008. Vol. 130, № 25. P. 7856–7861.
100. Kuzu B., Acikgoz E., Cakir M. Design, synthesis, and applications of nucleic acid-specific benzoxazole-N,N-dialkylphenylamines derivatives for nucleolus imaging in the cells // J. Mol. Struct. 2024. Vol. 1309. P. 138199.
101. Rodríguez-Rodríguez C. et al. Thioflavin-based molecular probes for application in Alzheimer's disease: from *in silico* to *in vitro* models† // Metallomics. 2015. Vol. 7, № 1. P. 83–92.
102. Mourer T., d'Enfert C., Bachellier-Bassi S. Use of the Fluorescent Dye Thioflavin T to Track Amyloid Structures in the Pathogenic Yeast *Candida albicans* // Bio-protocol. 2024. Vol. 14, № 3. P. e4932.
103. Min J.-H. et al. Thioflavin-T: application as a neuronal body and nucleolar stain and the blue light photo enhancement effect // Sci. Rep. 2024. Vol. 14, № 1. P. 24846.
104. PS V., CF C. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. // Arch. Pathol. 1959. Vol. 68. P. 487–498.
105. Naiki H. et al. Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: use of the fluorescent indicator, thioflavine T // Amyloid and Amyloidosis 1990: VIth International Symposium on Amyloidosis August 5–8, 1990, Oslo, Norway. Springer, 1991. P. 393–396.
106. Verma S., Ravichandiran V., Ranjan N. Beyond amyloid proteins: Thioflavin T in nucleic acid recognition // Biochimie. 2021. Vol. 190. P. 111–123.
107. Klunk W.E. et al. Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain // Life Sci. 2001. Vol. 69, № 13. P. 1471–1484.
108. Limongelli V. et al. The G-Triplex DNA // Angew. Chemie Int. Ed. Wiley Online Library, 2013. Vol. 52, № 8. P. 2269–2273.
109. Zhao L.-L. et al. New G-Triplex DNA Dramatically Activates the Fluorescence of Thioflavin T and Acts as a Turn-On Fluorescent Sensor for Uracil-DNA Glycosylase Activity Detection // Anal. Chem. American Chemical Society, 2024. Vol. 96, № 21. P. 8458–8466.

110. Correia A.S. et al. Potential Translational Thioflavin T Methodology as a Complement of Cell-Based Assays and after Drug Exposition // International Journal of Translational Medicine. 2022. Vol. 2, № 2. P. 134–147.
111. Singh V., Dorbala S. Positron emission tomography for cardiac amyloidosis: Timing matters! // J. Nucl. Cardiol. 2022. Vol. 29, № 2. P. 790–797.
112. Klunk W.E. et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B // Ann. Neurol. Off. J. Am. Neurol. Assoc. Child Neurol. Soc. Wiley Online Library, 2004. Vol. 55, № 3. P. 306–319.
113. Boczar K.E. et al. Radiolabeled Thioflavin-T Derivative PET Imaging for the Assessment of Cardiac Amyloidosis // Curr. Cardiol. Rep. 2022. Vol. 24, № 12. P. 1883–1891.
114. Bateman R.J. et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease // N. Engl. J. Med. Mass Medical Soc, 2012. Vol. 367, № 9. P. 795–804.
115. Wang X.Z. et al. Driving force to detect Alzheimer's disease biomarkers: application of a thioflavine T@ Er-MOF ratiometric fluorescent sensor for smart detection of presenilin 1, amyloid β -protein and acetylcholine // Analyst. Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 145, № 13. P. 4646–4663.
116. Du J.-Q. et al. Machine learning-assisted fluorescence/fluorescence colorimetric sensor array for discriminating amyloid fibrils // Sensors Actuators B Chem. 2024. Vol. 417. P. 136173.
117. Kuznetsova I.M. et al. High Fluorescence Anisotropy of Thioflavin T in Aqueous Solution Resulting from Its Molecular Rotor Nature // Anal. Chem. American Chemical Society, 2016. Vol. 88, № 1. P. 718–724.
118. Han N.S. et al. Time-resolved spectroscopy of thioflavin T solutions: Asynchronous optical sampling method with two frequency-upconverted mode-locked lasers // J. Chem. Phys. 2022. Vol. 156, № 6. P. 64201.
119. Rusakov K. et al. Thioflavin T—a Reporter of Microviscosity in Protein Aggregation Process: The Study Case of α -Synuclein // J. Phys. Chem. Lett. American Chemical Society, 2024. Vol. 15, № 25. P. 6685–6690.
120. Hanczyc P., Fita P. Laser Emission of Thioflavin T Uncovers Protein Aggregation in Amyloid Nucleation Phase // ACS Photonics. American Chemical Society, 2021. Vol. 8, № 9. P. 2598–2609.
121. Anselmo S., Sancataldo G., Vetri V. Deciphering amyloid fibril molecular maturation through FLIM-phasor analysis of thioflavin T // Biophys. Reports. Elsevier, 2024. Vol. 4, № 1.

122. Ross C.A., Poirier M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease // Nat. Med. Nature Publishing Group, 2004. Vol. 10, № 7. P. S10.
123. Bekard I.B., Dunstan D.E. Tyrosine autofluorescence as a measure of bovine insulin fibrillation // Biophys. J. Biophysical Society, 2009. Vol. 97, № 9. P. 2521–2531.
124. Streets A.M. et al. Simultaneous Measurement of Amyloid Fibril Formation by Dynamic Light Scattering and Fluorescence Reveals Complex Aggregation Kinetics // PLoS One. Public Library of Science, 2013. Vol. 8, № 1.
125. Yappert M.C., Ingle J.D. Correction of Polychromatic Luminescence Signals for Inner-Filter Effects // Appl. Spectrosc. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 1989. Vol. 43, № 5. P. 759–767.
126. Sillen A., Engelborghs Y. The correct use of “average” fluorescence parameters // Photochem. Photobiol. Wiley Online Library, 1998. Vol. 67, № 5. P. 475–486.
127. Li Y. et al. Investigations on average fluorescence lifetimes for visualizing multi-exponential decays // Front. Phys. Frontiers Media SA, 2020. Vol. 8. P. 576862.
128. Ryazantsev S.N. et al. 3D structure of the native α -crystallin from bovine eye lens // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 117. P. 1289–1298.
129. Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. // Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. Vol. 89, № 21. P. 10449–10453.
130. Citterio C.E. et al. Relationship between the dimerization of thyroglobulin and its ability to form triiodothyronine // J. Biol. Chem. Elsevier, 2018. Vol. 293, № 13. P. 4860–4869.
131. Brange J. et al. Toward Understanding Insulin Fibrillation // J. Pharm. Sci. 1997. Vol. 86, № 5. P. 517–525.
132. Лавыш А.В. et al. Стехиометрия и спектрально-кинетические свойства новых производных тиофлавина т, встроенных в амилоидные фибриллы. Минск: Изд. центр БГУ, 2016.
133. Eiser E. Dynamic light scattering // Multi Length-Scale Characterisation. Wiley Online Library, 2014. P. 233–282.
134. Twomey S. Introduction to the Mathematics of Inversion in Remote Sensing and Indirect Measurements. New York: Elsevier Science, 1977. Vol. 3.
135. Provencher S.W. A constrained regularization method for inverting data

- represented by linear algebraic or integral equations // Comput. Phys. Commun. Elsevier, 1982. Vol. 27, № 3. P. 213–227.
136. Provencher S.W., Štěpánek P. Global analysis of dynamic light scattering autocorrelation functions // Part. Part. Syst. Charact. Wiley Online Library, 1996. Vol. 13, № 5. P. 291–294.
 137. Provencher S.W. CONTIN: a general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations // (No Title). Mendeley, 2019.
 138. Tikhonov A.N. On solving ill-posed problem and method of regularization // Doklady Akademii Nauk USSR. 1963. Vol. 153. P. 501–504.
 139. HAN Q., Shen J., Sun X. A posterior choice strategies of the Tikhonov regularization parameter in the inverse algorithm of the photon correlation spectroscopy particle sizing techniques // Acta Photonica Sin. 2009. Vol. 38, № 11. P. 2917–2926.
 140. Kindermann S., Navasca C. Optimal control as a regularization method for ill-posed problems // J. INVERSE ILL POSED Probl. VSP, 2006. Vol. 14, № 7. P. 685.
 141. Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates // Pharm. Res. 2010. Vol. 27, № 5. P. 796–810.
 142. Lavysh A. V et al. Aggregation of thioflavin T and its new derivative in the presence of anionic polyelectrolyte // Biointerface Res. Appl. Chem. 2016. Vol. 6, № 5. P. 1525–1530.
 143. Mora A.K. et al. Benzothiazole-Based Neutral Ratiometric Fluorescence Sensor for Amyloid Fibrils // Chem. - A Eur. J. Wiley-VCH Verlag, 2016. Vol. 22, № 46. P. 16505–16512.
 144. Turoverov K.K. et al. ThT as an instrument for testing and investigation of amyloid and amyloid-like fibrils // International Conference on Lasers, Applications, and Technologies 2007: Environmental Monitoring and Ecological Applications; Optical Sensors in Biological, Chemical, and Engineering Technologies; and Femtosecond Laser Pulse Filamentation / ed. Matvienko G. et al. SPIE, 2007. Vol. 6733. P. 67331R.
 145. Singh P.K. et al. Ultrafast torsional dynamics of protein binding dye thioflavin-t in nanoconfined water pool // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2009. Vol. 113, № 25. P. 8532–8538.
 146. Stetefeld J., McKenna S.A., Patel T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences // Biophys. Rev. 2016. Vol. 8,

№ 4. P. 409–427.

147. Smal I. et al. Quantitative Comparison of Spot Detection Methods in Fluorescence Microscopy // IEEE Trans. Med. Imaging. 2010. Vol. 29, № 2. P. 282–301.
148. Matsuura Y., Nakamura A., Kato H. Determination of Nanoparticle Size Using a Flow Particle-Tracking Method // Anal. Chem. American Chemical Society, 2018. Vol. 90, № 6. P. 4182–4187.
149. Sulatskaya A.I. et al. Structural Analogue of Thioflavin T, DMASEBT, as a Tool for Amyloid Fibrils Study // Anal. Chem. American Chemical Society, 2019. Vol. 91, № 4. P. 3131–3140.
150. Sulatskaya A.I. et al. Trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate - New fluorescent dye for testing of amyloid fibrils and study of their structure // Dye. Pigment. 2018. Vol. 157. P. 385–395.
151. Sulatskaya A.I. et al. Different conditions of fibrillogenesis cause polymorphism of lysozyme amyloid fibrils // J. Mol. Struct. 2017. Vol. 1140. P. 52–58.
152. Hsieh M.-C., Lynn D.G., Grover M.A. Kinetic Model for Two-Step Nucleation of Peptide Assembly // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2017. Vol. 121, № 31. P. 7401–7411.