

УДК 577.37

ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ НА ФІБРИЛІЗАЦІЮ ЛІЗОЦИМУ ТА ІНСУЛІНУ *IN VITRO***К.О. Вус^{1*}, В.М. Трусова¹, Г.П. Горбенко¹, К.І. Слобожаніна²,
Л.М. Лук'яненко², Р. Сууд³, П. Кіннунен³**¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна²Інститут біофізики та клітинної інженерії НАН Білорусі, вул. Академічна, 27, Мінськ 220072, Білорусь³Університет Аальто, вул. Отакаарі, 3, Еспоо FI-00076, Фінляндія

e-mail: kateryna_vus@yahoo.com

Надійшла до редакції 2 грудня 2013 року

Прийнято до друку 23 грудня 2013 року

За допомогою флуоресцентного зонду Тіофлавіну Т та просвітчастої електронної мікроскопії проведено дослідження впливу іонів металів на фібрилізацію лізоциму та інсуліну. Показано, що інкубація білків у кислому середовищі за високої температури та у присутності іонів Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} та Al^{3+} призводить, як правило, до зростання лаг-періоду росту фібрил та зниження загального ступеня агрегації білка у порівнянні з контролем, причому ця здатність була більш вираженою для Cu^{2+} та Fe^{3+} , у порівнянні з Zn^{2+} та Al^{3+} . Крім того, іони Cu^{2+} та Fe^{3+} викликали утворення «розмитой» структури фібрил інсуліну, а Zn^{2+} – фібрилоподібних агрегатів білка. Ці результати дають можливість розглядати іони металів у якості потенційних терапевтичних засобів проти «конформаційних» захворювань людини.

Ключові слова: амілоїдні фібрили, інсулін, іони металів, лізоцим, Тіофлавін Т.

THE ROLE OF METAL IONS IN THE FIBRILLIZATION OF LYSOZYME AND INSULIN *IN VITRO***K.O. Vus¹, V.M. Trusova¹, G.P. Gorbenko¹, E.I. Slobozhanina²,
L.M. Lukyanenko², R. Sood³, P. Kinnunen³**¹V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv 61022, Ukraine²Institute of Biophysics and Cell Engineering, Akademicheskaya, 27, Minsk 220072, Belarus³Aalto University, Otakaari, 3, Espoo FI-00076, Finland

The effects of metal ions on the fibrillization of lysozyme and insulin were investigated using a Thioflavin T fluorescence assay and transmission electron microscopy. The incubation of the proteins in acidic buffer at high temperature in the presence of substoichiometric concentrations of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} and Al^{3+} primarily led to the decrease in lag phase of fibril growth and protein aggregation rate compared to those in control samples. Furthermore, Cu^{2+} and Fe^{3+} showed a stronger influence on the protein fibrillization than Zn^{2+} and Al^{3+} . Specifically, Cu^{2+} and Fe^{3+} provoked the formation of insulin amyloid fibrils, having a «fuzzy» appearance, while the amyloid-like insulin aggregates grew in the presence of Zn^{2+} . These results highlight the potential of metal ions as prospective therapeutic agents against human «conformational» diseases.

Key words: amyloid fibrils, insulin, lysozyme, metal ions, Thioflavin T.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ФИБРИЛЛИЗАЦИЮ ЛИЗОЦИМА И ИНСУЛИНА *IN VITRO***К.О. Вус¹, В.М. Трусова¹, Г.П. Горбенко¹, Е.И. Слобожаніна²,
Л.М. Лук'яненко², Р. Сууд³, П. Кіннунен³**¹Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск 220072, Беларусь³Университет Аальто, ул. Отакаарі, 3, Эспоо FI-00076, Финляндия

С помощью флуоресцентного зонда Тіофлавіна Т и просвечивающей электронной микроскопии проведено исследование влияния ионов металлов на фибриллизацию лізоцима и інсуліна. Показано, что инкубация белков в кислой среде при высокой температуре и в присутствии ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} и Al^{3+} приводит, как правило, к увеличению лаг-периода роста фибрилл и снижению общей степени агрегации белка по сравнению с контролем, причем Cu^{2+} и Fe^{3+} оказывали более сильное влияние, чем Zn^{2+} и Al^{3+} . Кроме того, ионы Cu^{2+} и Fe^{3+} приводили к образованию «размытой» структуры фибрилл инсулина, а Zn^{2+} – фибрилоподобных агрегатов

белка. Эти результаты дают возможность рассматривать ионы металлов в качестве потенциальных терапевтических средств при лечении «конформационных» болезней.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, инсулин, ионы металлов, лизоцим, Тιοфлавин Т.

Порушення нативної структури білків, що супроводжується утворенням високо впорядкованих β -складчатих агрегатів, які зводяться амілоїдними фібрилами, є ключовим фактором в етіології цілої низки так званих «конформаційних» захворювань, включаючи хвороби Альцгеймера, Паркінсона, системний амілоїдоз, діабет другого типу, тощо. Серед амілоїдогенних білків значний інтерес викликають лізоцим та інсулін, фібрилізація яких пов'язана з такими хворобами, як спадковий системний амілоїдоз [1] та інсулін-опосередкований локальний амілоїдоз [2]. Встановлено, що розвитку цих захворювань може сприяти дисбаланс важливих для функціонування організму іонів міді, цинку та заліза [3]. На основі таких фактів, як висока концентрація іонів міді, заліза та цинку у амілоїдних бляшках та нейрофібрилярних клубках хворих на хворобу Альцгеймера [3] та підвищений рівень іонів заліза та іонів алюмінію у тільцях Леві субстанції нігра [4] була запропонована так звана «металева» гіпотеза амілоїдогенезу. З іншого боку, багато експериментальних досліджень виявили інгібування росту фібрилярних агрегатів іонами металів завдяки стабілізації неамілоїдогенної [5] або нативної форм білка [6]. В цілому, відмінності в механізмах дії полівалентних іонів металів на стабільність просторової структури білків зумовлені різницею у їх координаційному оточенні, яке залежить від: i) електронної структури іону металу, ii) амінокислотної послідовності білка, iii) молярного співвідношення метал:білок, iv) концентрації білка, v) рН, vi) наявності денатурантів. Оскільки наявні дані щодо впливу іонів металів на агрегацію білків досить суперечливі, важливе подальше детальне вивчення цієї проблеми, особливо у контексті необхідності розробки терапевтичних засобів для інгібування росту фібрил *in vivo*. З огляду на це, метою даної роботи було дослідження ролі іонів міді, цинку, заліза та алюмінію у процесах фібрилізації лізоциму та інсуліну *in vitro* методами флуоресцентної спектроскопії та електронної мікроскопії.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Лізоцим з ячного білка (Lz), інсулін підшлункової залози бика (Ins) та Тιοфлавін Т (ThT) були від Sigma (США). Для ініціації фібрилогенезу розчини білків (~1 mM) інкубували у кислому середовищі (гліциновий буфер, рН~2) за високої температури (60 °С) без перемішування у присутності 500 μM Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} та Al^{3+} , а також за відсутності цих іонів (контрольні зразки). Концентрації білків та ThT визначали спектрофотометричним методом, використовуючи коефіцієнти екстинкції: $\epsilon_{280}=3.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (лізоцим), $\epsilon_{280}=6.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (інсулін) та $\epsilon_{412}=2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ThT). Візуалізацію фібрилярних агрегатів здійснювали за допомогою електронного мікроскопу Теспаі 12 ВіоТWІN (США). Для приготування зразків для електронної мікроскопії використовували концентровані розчини фібрил лізоциму (лише контрольний розчин розводили у 5 разів), а фібрили інсуліну розводили буфером у 3.5 рази. Під час дослідження кінетики росту фібрил аліквоти білків (20 μl), що знаходилися у термостаті, відбирали через певні проміжки часу, додавали до 6.5 μM розчину ThT (2 мл) у деіонізованій воді і вимірювали інтенсивність флуоресценції зонду, використовуючи довжину хвилі збудження та флуоресценції – 420 та 484 нм, відповідно.

Для визначення кількісних характеристик процесу фібрилізації залежності інтенсивності флуоресценції ThT (F) від часу інкубації білків (t) апроксимували

сигмоїдною кривою: $F = F_0 + \frac{F_{\max} - F_0}{1 + \exp[k(t_m - t)]}$, де F_0 та F_{\max} – інтенсивності

флуоресценції ThT за відсутності білка та у присутності зрілих фібрил лізоциму (коли залежність інтенсивності флуоресценції ThT від часу виходить на плато), відповідно; k – константа швидкості росту фібрил; t_m – час, за який інтенсивність флуоресценції ThT виросла на 50% у порівнянні з максимальною інтенсивністю флуоресценції зонду F_{\max} . Лаг-період росту фібрил розраховували за формулою: $t_m - 2/k$ [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз ізотерм росту фібрил лізоциму (Рис. 1А) показав, що серед досліджуваних іонів металів помітний вплив на процес формування агрегатів білків мав лише Fe^{3+} , який знизив лаг-період фібрилізації у ~ 4 рази (таблиця 1). Поряд з цим, на формування фібрил інсуліну ефект іонів був сильнішим (Рис. 2Б). Цікаво також, що лаг-період росту фібрил корелював із часом, коли максимум інтенсивності ThT почав зсуватися у короткохвильову область, що свідчить про зниження полярності оточення зонду у присутності зрілих фібрил.

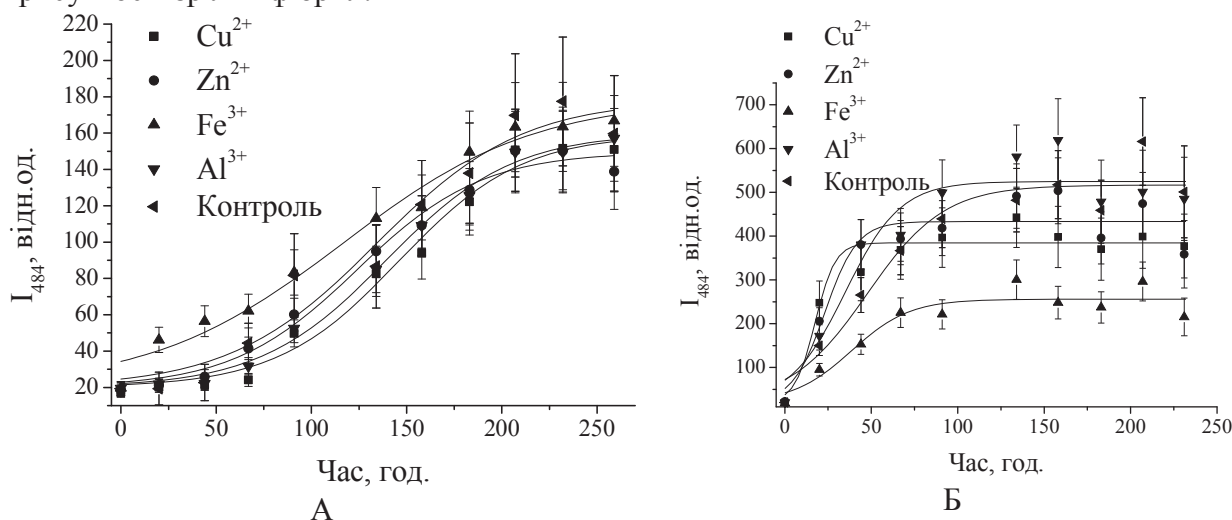


Рис. 1. Ізотерми росту фібрил лізоциму (А) та інсуліну (Б) у присутності іонів металів при молярному співвідношенні метал:білок 0.6:1 та 0.4:1, відповідно. Довжина хвилі збудження ThT була 420 нм. Концентрації лізоциму та інсуліну у пробах були 8.2 та 12.3 μM , відповідно; концентрація ThT – 6.5 μM .

Із таблиці 1 видно, що інсулін (контроль) має дуже коротку фазу нуклеації та на 1.7 раз вищу константу швидкості росту фібрил за даних умов у порівнянні з лізоцимом (контроль). Це призводить до різної морфології агрегатів білків – фібрили лізоциму у контрольному зразку були трохи довші та тонші, ніж фібрили інсуліну (Рис. 2). Наведемо загальну характеристику ефектів іонів металів на фібрилізацію лізоциму та інсуліну. У цілому, всі іони знизили (або не змінили) загальний ступінь агрегації білка та підвищили лаг-період росту фібрил (таблиця 1, Рис. 2). Такий результат підтверджує гіпотезу про те, що, коли у пробі є багато ядер нуклеації (у нашому випадку – за умов низького рН, високої температури та високої концентрації білка), іони металів, як правило, мають «негативну» дію на фібрилізацію білків [5]. Крім того,

Таблиця 1. Вплив іонів металів на кінетику фібрилізації лізоциму та інсуліну при молярному співвідношенні метал:білок 0.6:1 та 0.4:1, відповідно

Білок	Лізоцим				Інсулін			
	Параметри	k , 1/год.	t_m , год.	Лаг- період, год.	F_{max} / F_0	k , 1/год.	t_m , год.	Лаг- період, год.
Cu ²⁺	0.031	146±6	81	8	0.172	17±3	5.4	19
Zn ²⁺	0.031	124±6	59	8	0.107	23±5	4.3	22
Fe ³⁺	0.020	116±10	16	9	0.059	39±7	5.1	13
Al ³⁺	0.030	139±4	72	8	0.063	35±6	3.3	26
Контроль	0.026	134±12	57	9	0.045	48±6	3.5	26

більш значне інгібування росту фібрил інсуліну, у порівнянні з лізоцимом, можна пояснити тим, що фібрили інсуліну, за даних умов, ростуть швидше. Цікаво також, що зниження швидкості фібрилогенезу спостерігалось навіть при низьких молярних співвідношеннях метал:білок (0.6:1–0.4:1), що підтверджує літературні дані про здатність іонів Cu²⁺ [8], Zn²⁺ [9], Fe³⁺ [10] та Al³⁺ [11] подавляти фібрилізацію Аβ-пептиду, амуліну, пріонного білку, лізоциму та ін. До того ж, Cu²⁺ навіть запропоновано застосувати у якості терапевтичного засобу для інгібування агрегації ProIAPP₁₋₄₈ [12], а наночастинку Fe₃O₄ – для інгібування агрегації лізоциму [10]. Не менш цікавим є факт, що, незважаючи на низьке значення рН, при якому спорідненість іонів металів до білків може значно зменшуватись внаслідок протонування потенційних сайтів зв'язування (наприклад, залишків гістидину для Cu²⁺) [13], метали все ж здійснювали вплив на фібрилізацію лізоциму та інсуліну. Це може свідчити про низьку доступність сайтів зв'язування білків з іонами для розчинника.

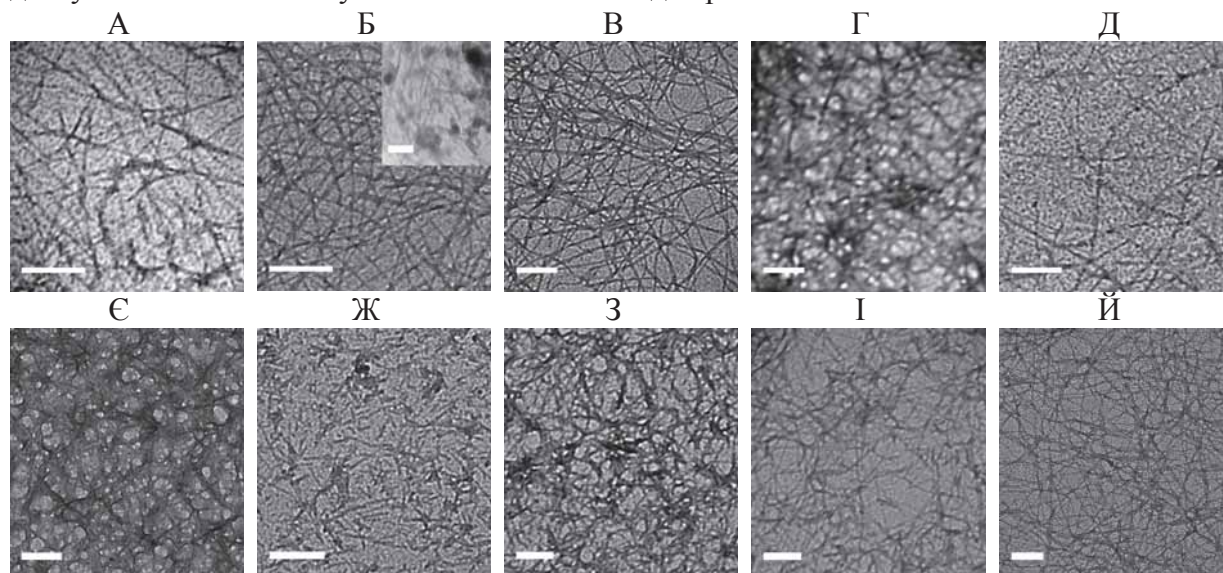


Рис. 2. Візуалізація фібрил лізоциму (А–Д) та інсуліну (Е–Й), отриманих у присутності іонів Cu²⁺ (А, Е), Zn²⁺ (Б, Ж), Fe³⁺ (В, З), Al³⁺ (Г, І) та за відсутності іонів металів (Д, Й). Контрольний зразок лізоциму було розведено у 5 разів (Д). Шкала – 200 нм.

Порівняємо тепер ефекти різних іонів на фібрилізацію лізоциму та інсуліну. Іони Cu²⁺ та Al³⁺ призвели до зниження загального ступеня агрегації лізоциму – F_{max} / F_0 (таблиця 1), причому відсутність аморфних агрегатів на електронних мікрофотографіях означає, що така дія іонів зумовлена стабілізацією неамілоїдогенної форми білка [5,6]. Окрім цього, спостерігалось значне (~30–35%) збільшення лаг-періоду росту фібрил і

t_m внаслідок зниження «ефективної» концентрації мономерів, здатних до фібрилогенезу. Параметр k виріс на ~15%, що може бути зумовлене кращою здатністю дестабілізованого іонами мономеру приєднуватися до фібрили, що росте. Останній факт може призвести до зміни морфології фібрил. Дійсно, агрегати, сформовані у присутності іонів, мали трохи більшу товщину (~12 нм), ніж товщина фібрил у контролі (~10 нм).

Зростання k у 3.8 рази, лаг-періоду росту – на 54%, зниження параметру t_m у 2.8 рази, а F_{\max} / F_0 – на 37% при фібрилізації інсуліну у присутності Cu^{2+} , у порівнянні з контролем, свідчить про різницю у морфології фібрил. Дійсно, фібрили, що виростили у присутності іону, мали «розмиту» структуру (Рис. 2С), що призводить до зниження F_{\max} / F_0 [12]. Така структура може бути зумовлена, зокрема, утворенням дисульфідних містків між мономерами при їх взаємодії з продуктами відновлення Cu^{2+} до Cu^+ – активними формами кисню [14]. Нарешті, морфологія фібрил білка, сформованих у присутності Al^{3+} , не відрізнялася від контролю, що узгоджується з відсутністю змін F_{\max} / F_0 [12]. Зміну інших параметрів росту фібрил інсуліну у присутності Cu^{2+} та Al^{3+} можна пояснити так само, як і для лізоциму.

Дія іонів Zn^{2+} на фібрилізацію лізоциму та інсуліну була не однаковою і, до того ж, менш вираженою, ніж дія Cu^{2+} [7]. Зокрема, у випадку лізоциму разом із фібрилами утворюються невпорядковані агрегати білка (Рис. 2Б). Дійсно, на відміну від Cu^{2+} , Zn^{2+} , як правило, не змінює конформацію мономерів, а призводить до формування димерів білків [15] чи аморфних агрегатів [8]. Інсулін формує фібрилоподібні агрегати у присутності цього іону: короткі (~200 нм) та трохи тонші (9 нм), ніж у контролі (12 нм). Можливо, Zn^{2+} стабілізує димери білка (при молярному співвідношенні метал:білок 0.6:1), що з високою спорідненістю приєднуються до фібрили, що росте (оскільки k зростає у порівнянні з контролем), проте агрегати виростають короткі. Цікаво, що Zn^{2+} також викликав утворення менш ТhТ-«позитивних» фібрил амуліну, причому морфологія фібрил значно відрізнялася від морфології фібрил, сформованих у присутності інших іонів [12].

Іони Fe^{3+} також по-різному впливали на фібрилізацію лізоциму та інсуліну. Зниження лаг-періоду росту фібрил лізоциму у 3.6 рази у присутності іону свідчить про швидке формування ядер нуклеації та їх перетворення у фібрили. При цьому формування димерів, стабілізованих Fe^{3+} [16], навряд чи має місце, бо морфологія фібрил однакова у порівнянні з контролем, але можливо, іон просто каталізує утворення димерів, дестабілізуючи конформацію мономерів [17]. Однак через велику кількість ядер нуклеації у контролі, цей ефект не вплинув на загальний ступінь агрегації білка. Ще цікавішим виявився ефект Fe^{3+} на фібрилізацію інсуліну: зниження F_{\max} / F_0 у 2 рази (таблиця 1) не можна пояснити утворенням аморфних агрегатів білка через їх відсутність на електронних мікрофотографіях. З іншого боку, «розмита» структура фібрил (Рис. 23) може свідчити про відновлення іону під час фібрилізації білка та утворення дисульфідних містків між мономерами білка, як було запропоновано для Cu^{2+} [10]. Зауважимо також, що Fe^{3+} навряд чи призводить до гасіння флуоресценції ТhТ при взаємодії із зондом, бо цей ефект для досліджуваних іонів, як правило, незначний [17].

Цікаво, що іони металів призводили до зростання параметру k лізоциму на 15%, і в 1.4–3.8 рази – інсуліну. При цьому стимулюючий ефект менш позитивно заряджених іонів Cu^{2+} та Zn^{2+} на параметр k інсуліну був у 2–3 рази більш вираженим, ніж іонів Fe^{3+} та Al^{3+} . Усе це може свідчити про вплив електростатичних взаємодій на фазу

елонгації фібрил. Той факт, що параметр F_{\max} / F_0 інсуліну знизився в 1.2–2 рази, а F_{\max} / F_0 лізоциму – лише на 13%, свідчить про те, що іони металів мають кращу спорідненість до білків з меншим позитивним зарядом через зниження електростатичного відштовхування, що призводить до інгібування фібрилогенезу.

В цілому, отримані нами результати узгоджуються з літературними даними: вплив Fe^{3+} на фібрилізацію білків був сильнішим, ніж Al^{3+} [12,18], а вплив Cu^{2+} – сильнішим, ніж Zn^{2+} [19]. Виявлені відмінності в дії іонів металів на процес фібрилізації означають, що їх координаційне оточення залежить як від електронної структури іону, так і від амінокислотної послідовності білка. Нарешті, «негативна» дія Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} Al^{3+} на фібрилізацію лізоциму та інсуліну дозволяє розглядати ці іони у якості потенційних терапевтичних засобів для лікування спадкового системного амілоїдозу та інсулін-опосередкованого локального амілоїдозу.

Робота виконана за підтримки грантів від Державного Фонду Фундаментальних Досліджень України (проект номер Ф.54.4/015) та фонду СІМО, Фінляндія (КВ).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lysozyme amyloidosis: report of 4 cases and a review of the literature / B. Granel, S. Valleix, J. Serratrice [et.al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2006. – Vol. 85. – P. 66–73.
2. Swift B. Examination of insulin injection sites: an unexpected finding of localized amyloidosis / B. Swift // *Diabet. Med.* – 2002. – Vol. 19. – P. 881–882.
3. Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer disease / D. J. Bonda, H. Lee, J. Blair [et.al.] // *Metallomics*. – 2011. – Vol. 3. – P. 267–270.
4. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis / E. C. Hirsch, J. P. Brandel, P. Galle [et.al.] // *J. Neurochem.* – 1991. – Vol. 56. – P. 446–451.
5. Copper (II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils / O. V. Bocharova, L. Breydo, V. V. Salnikov [et.al.] // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – P. 6776–6687.
6. Alies B. The role of metal ions in amyloid formation: general principles from model peptides / B. Alies, C. Hureau, P. Faller // *Metallomics*. – 2013. – Vol. 5. – P. 183–192.
7. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism / L. Nielsen, R. Khurana, A. Coats [et.al.] // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40. – P. 6036–6046.
8. Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease / C. J. Maynard, A. I. Bush, C. L. Masters [et.al.] // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2005. – Vol. 86. – P. 147–159.
9. Aluminum, copper, iron and zinc differentially alter amyloid- $\text{A}\beta_{1-42}$ aggregation and toxicity / S. Bolognin, L. Messori, D. Drago [et.al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 43. – P. 877–885.
10. Effect of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation / A. Bellova, E. Bystrenova, M. Koneracka [et.al.] // *Nanotechnology*. – 2010. – Vol. 21. – P. 065103.
11. Metals accelerate the formation and direct the structure of amyloid fibrils of NAC / A. Khan, A. E. Ashcroft, V. Higenell [et.al.] // *J. Inorg. Biochem.* – 2005. – Vol. 99. – P. 1920–1927.
12. Copper is a potent inhibitor of the propensity for human ProIAPP $_{1-48}$ to form amyloid fibrils in vitro / C. Exley, M. Mold, E. Shardlow [et.al.] // *J. Diabet. Res. Clin. Med.* – 2012. – Vol. 1. – P. 1–6.
13. Recent development of bifunctional small molecules to study metal-amyloid- β species in Alzheimer's disease / J. J. Braymer, A. S. Detoma, J. S. Choi [et.al.] // *Int. J. Alzheimer's Dis.* – 2011. – Vol. 623051. – P. 1–9.
14. Hydrogen peroxide can be generated by tau in the presence of Cu (II) / X. Y. Su, W. H. Wu, Z. P. Huang [et.al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 358. – P. 661–665.
15. Morante S. The role of metals in beta-amyloid peptide aggregation: X-Ray spectroscopy and numerical simulations / S. Morante // *Curr. Alzheimer. Res.* – 2008. – Vol. 5. – P. 508–524.
16. Tõugu V. Interactions of Zn (II) and Cu (II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity / V. Tõugu, A. Tiiman, P. Palumaa // *Metallomics*. – 2011. – Vol. 3. – P.250–261.
17. Faller P. Role of metal ions in the f-assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide / P. Faller, C. Hureau, O. Berthoumieu // *Inorg. Chem.* – 2013. – Vol. 52. – P. 12193–12206.

18. Does aluminium bind to histidine? An NMR investigation of amyloid β_{12} and amyloid β_{16} fragments / P. Narayan, B. Krishnarjuna, V. Vishwanathan [et.al.] // Chem. Biol. Drug Des. – 2013. – Vol. 82. – P. 48–59.
19. Uversky V. N. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure / V. N. Uversky, J. Li, A. L. Fink // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 44284–44296.