

Биологические системы

Структура амилоидных агрегатов лизоцима по данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей

© В.И. Петренко^{1,2}, М.В. Авдеев¹, V.M. Garamus³, M. Kubovcikova⁴, Z. Gažová⁴, K. Šipošová⁴, Л.А. Булавин², L. Almásy⁵, В.Л. Аксенов^{1,6}, P. Korcansky⁴

¹ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

² Киевский национальный университет им. Т. Шевченко, Киев, Украина

³ Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Geesthacht, Germany

⁴ Institute of Experimental Physics SAS, Kosice, Slovakia

⁵ Wigner Research Center for Physics HAS, Institute for Solid State Physics and Optics, Budapest, Hungary

⁶ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ „Курчатовский институт“, Гатчина, Россия

E-mail: vip@nf.jinr.ru

Методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей исследована структура филаментных амилоидных агрегатов лизоцима яичного белка в воде. Для описания экспериментальных данных использованы различные цилиндрические модели, среди которых лучшее соответствие показывает модель длинной спирали. При сравнении полученных результатов с данными малоуглового рассеяния нейтронов обнаружено влияние тяжелого компонента растворителя (смеси H_2O/D_2O) на структуру филаментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 12-02-00649-а, 12-02-12063-офи_м). This work is based on experiments performed at the Swiss spallation neutron source SINQ, Paul Scherrer Institute, Villigen, Switzerland. This work was supported by project KMR 12-1-2012-0226 granted by the National Development Agency (NDA) of Hungary and by project OTKA-NKTH 80341 granted by the Hungarian Scientific Research Fund & National Office for Research and Technology.

1. Введение

Амилоидные агрегаты белков рассматриваются сегодня как первопричина ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и др. [1]. В большинстве случаев они представляют собой вытянутые спиралевидные объекты (фибриллы), состоящие из скрученных между собой нескольких первичных филаментов (или протофиламентов), которые могут достигать микронной длины. Сами протофиламенты также имеют внутреннюю спиральную структуру, параметры которой определяются свойствами раствора, где инициируется рост амилоидных агрегатов. Рентгеновская дифракция на ориентированных образцах имеет общий характер для такого рода амилоидов, сформированных из различных белков. В частности, она дает меридиональный пик с характерным расстоянием 4.8 Å и экваториальный пик с характерным расстоянием 10 Å, которые соответствуют спиралевидной структуре β -листов из полипептидных цепей, расположенных па-

раллельно оси спирали и последовательно поворачивающихся в плоскости, перпендикулярной оси спирали [2].

Характерные размеры поперечного сечения амилоидных фибрилл лежат в нанометровом диапазоне (порядка 10 nm), что обуславливает применение методов малоуглового рассеяния в структурных исследованиях данных объектов [3–9]. Актуальный вопрос таких исследований: в рамках каких моделей и приближений возможно описание структуры фибриллярных амилоидов при интерпретации экспериментальных данных низкоразрешающих методов, которые позволяют работать с амилоидными растворами? Это важно при рассмотрении более сложных смешанных систем, в частности содержащих различные наночастицы. Так, недавние работы [10–16] показывают, что добавление наночастиц в модельные растворы влияет на амилоидную агрегацию белков.

Цель настоящей работы состояла в рассмотрении возможности описания структурной организации филаментов в водных амилоидных растворах лизоцима HEWL (белок куриного яйца) посредством малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и сравнении

полученных параметров спиралевидных филаментов с аналогичными параметрами, найденными с помощью малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН).

2. Эксперимент

Амилоидные агрегаты лизоцима (Сигма) были приготовлены путем растворения HEWL (до концентраций 2 и 10 mg/ml) в водном растворе соляной кислоты (pH = 2.5) с постоянным перемешиванием в течение 8 h при температуре 65°C. Степень фибриллизации контролировалась посредством измерения флуоресценции с использованием маркера Тиофлавин Т (ThT).

Эксперименты по МУРР были проведены на лабораторном рентгеновском малоугловом дифрактометре Nanostar, Bruker AXS GmbH, Карлсруэ, Германия. Характерные параметры: микрофокусный источник рентгеновского излучения $I\mu S$, используемая длина волны $\text{CuK}\alpha$ 1.54 Å, детектор VANTEC-2000 (размер 14×14 см, разрешение 2048×2048 пикселей), расстояние образец–детектор 103 см. Образцы были помещены в стеклянные капилляры диаметром 2 mm. Измерения проводились при температуре 37°C. Первичная обработка данных, в том числе учет рассеяния от растворителя и капилляра, учет эффективности детектора и фона, а также пересчет в абсолютные сечения, была проведена с помощью программы SuperSAXS (Jan Pedersen & Cristiano Oliveira).

3. Результаты и обсуждение

Экспериментальные кривые МУРР для двух концентраций амилоидного раствора лизоцима представлены на рис. 1, *a*. Степенная зависимость рассеяния при малых значениях q (линейная часть кривой в двойном логарифмическом масштабе) с показателем степени, близким к -1 , свидетельствует о наличии вытянутых анизотропных частиц длиной более 70 nm. Значения радиусов инерции поперечного сечения частиц были найдены из аппроксимации Гинье (вставка на рис. 1, *a*) вида $\ln(qI) \sim -R_c^2 q^2$ для анизотропных вытянутых частиц. Полученные значения радиусов инерции (см. таблицу) близки к аналогичным значениям, найденным с помощью МУРН [17]. Непосредственное сравнение кривых рассеяния МУРР и МУРН представлено на рис. 1, *b*, где изображены нормированные на контраст и концентрацию данные МУРР для раствора в H_2O (концентрации 2 и 10 mg/ml) и данные МУРН для амилоидного раствора лизоцима в смеси $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ с 80% содержанием тяжелой воды (концентрация белка 1.5 mg/ml). Последний раствор с 80% содержанием тяжелого компонента в составе растворителя имеет нейтронный контраст, близкий к рентгеновскому контрасту. Далее мы проводим сравнение результатов МУРР с результатами анализа МУРН данного раствора. Как видно, МУРР и МУРН дают сходные кривые рассеяния для $q < 0.3 \text{ nm}^{-1}$, что, согласно соотношению между

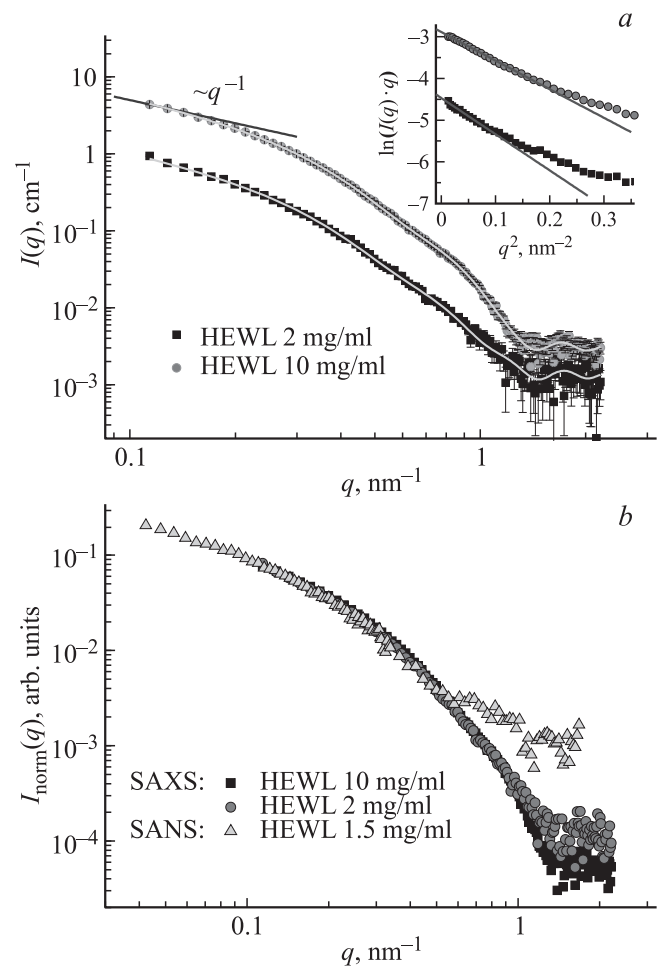


Рис. 1. *a*) Экспериментальные кривые МУРР (точки) и результаты косвенного Фурье-преобразования (сплошные линии). Начальная часть кривой моделируется степенным законом $I(q) \sim q^{-1}$, что соответствует рассеянию на анизотропных вытянутых частицах. На вставке показаны графики Гинье для поперечного сечения и результаты линейной аппроксимации. *b*) Сравнение нейтронных (треугольники) и рентгеновских (кружки и квадраты) малоугловых данных, нормированных на контраст и концентрацию.

обратным и прямым пространствами $q \sim 2\pi/D$, соответствует характерному размеру $D > 20 \text{ nm}$, т. е. рентгеновское и нейтронное рассеяние ожидаемо одинаковым образом отражает вытянутую структуру фибрилл. Для $q > 0.3 \text{ nm}^{-1}$ видно существенное различие в поведении кривых, причина которого обсуждается далее. Можно также отметить, что хорошее согласие нормированных на концентрацию данных МУРР во всем измеренном диапазоне q свидетельствует о минимальном влиянии на рассеяние структурного фактора из-за возможного взаимодействия между амилоидными фибриллами в воде для исследованного диапазона концентраций.

Экспериментальные кривые МУРР были первоначально обработаны с помощью косвенного Фурье-преобразования (КФП) согласно [9,18]. Полученные с использованием сферически-симметричных базисных функций рас-

Полученные параметры спиралевидных филаментов лизоцима

Образец	Метод	r , nm	D , nm	h , nm	R_{c1} , nm	R_{c2} , nm	R_{c3} , nm	M_L , 10^{-20} g/nm	N_{am}
2 mg/ml, H ₂ O	МУРР	3.93(5)	5.42(9)	11.5(2)	4.08(0)	4.16(7)	4.2(1)	5.7	3100
10 mg/ml, H ₂ O	МУРР	3.86(1)	5.22(2)	11.16(6)	3.97(4)	3.82(3)	3.70(4)	5.9	3200
1.5 mg/ml, 80% D ₂ O	МУРН	3.64(8)	7.06(1)	12.1(2)	4.52(4)	4.3(1)	4.3(1)	5.9	3200

Примечание. R_{c1} , R_{c2} и R_{c3} — радиусы инерции поперечного сечения, найденные из модели спирали (1), косвенного Фурье-преобразования и аппроксимации Гинье соответственно; N_{am} — число молекул аминокислот на 10 nm длины амилоидного филамента.

пределения парных расстояний (PDD^{total}) внутри амилоидных агрегатов представлены на рис. 2, *a*. Вид PDD^{total} характерен для анизотропных цилиндрических частиц с поперечным размером порядка 10 nm, определяемым по точке перегиба зависимости $P(r)$. Поведение кривой вида $I \sim q^{-1}$ при малых q позволяет в процедуре КФП выделить вклад рассеяния на усредненном поперечном сечении цилиндрической частицы с использованием ци-

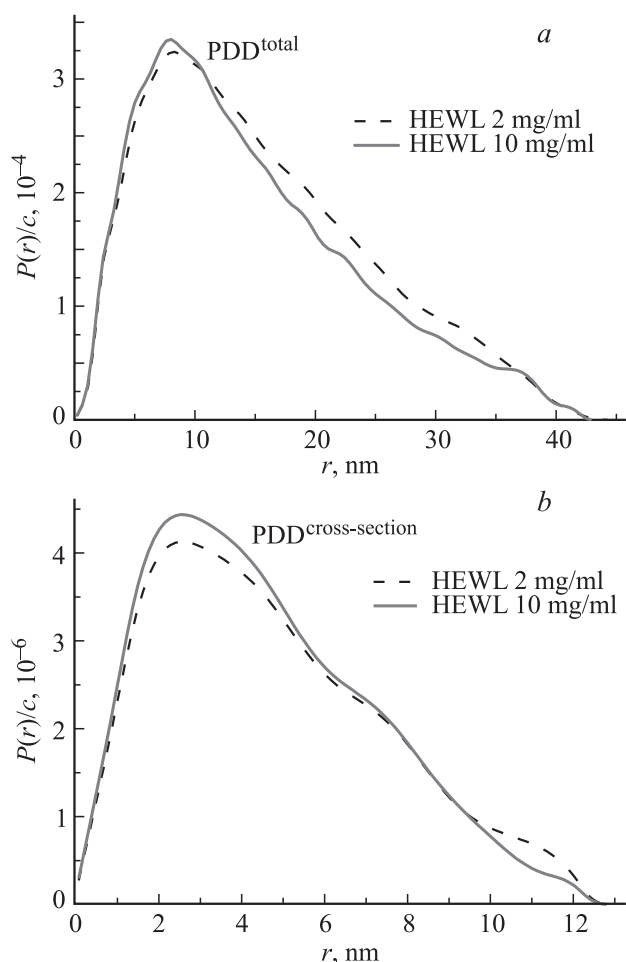


Рис. 2. Полученные в результате косвенного Фурье-преобразования нормированные на концентрацию функции распределения парных расстояний: общая (PDD^{total}) (*a*) и для поперечного сечения ($PDD^{cross-section}$) (*b*).

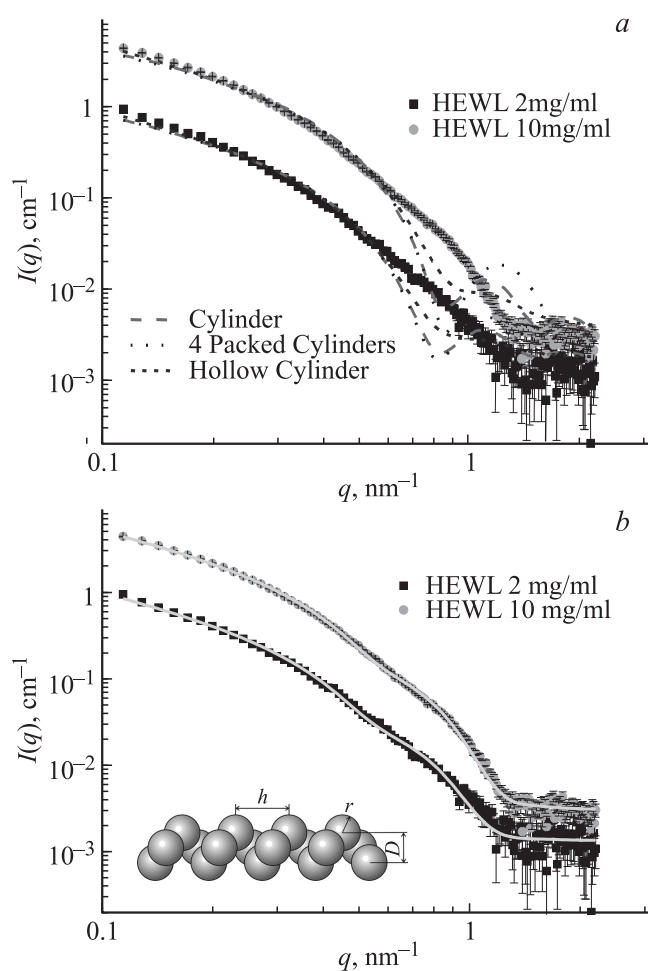


Рис. 3. Результаты аппроксимации (линии) экспериментальных данных МУРР (точки) с помощью различных цилиндрических моделей (*a*) и модели „спираль из однородных сферических частиц“ (*b*). На вставке приведено схематическое представление спирали с обозначением параметров модели.

линдрических функций Бесселя в качестве базисных функций. Соответствующие распределения парных расстояний в поперечном сечении эффективного цилиндра ($PDD^{cross-section}$) показаны на рис. 2, *b*.

Рис. 3 представляет результаты последующего прямого моделирования экспериментальных кривых МУРР с

применением различных моделей амилоидных фибрилл. На рис. 3, *a* собраны лучшие подгонки для цилиндрических моделей, использованные ранее [9,19] в случае вытянутых спиралевидных объектов: однородный цилиндр, полый цилиндр, система упакованных однородных цилиндров. Видно, что они хорошо описывают лишь начальную часть кривых ($q < 0.5 \text{ nm}^{-1}$). Для качественного описания всей кривой МУРР необходима более совершенная модель, учитывающая модуляции плотности рассеяния в направлении, перпендикулярном оси фибрилл.

С учетом спиральности амилоидных протофиламентов логичным усложнением однородных цилиндрических моделей удалось введение спиральной симметрии. Наиболее простым образом ее можно учесть, представив агрегат в виде сферических однородных единиц, образующих спиральную структуру. Соответствующая модель была предложена [19] и успешно применена ранее для описания данных рассеяния на спиралевидных агрегатах белка ResA [19] и спиралеобразных агрегатах биполярных фосфолипидов [20]. Ее использование в данном случае существенно улучшает качество подгонки (рис. 3, *b*). На вставке к рис. 3, *b* изображена схема используемой модели, иллюстрирующая ее структурные параметры: радиус структурной единицы r ; средний диаметр спирали D ; шаг спирали, или период повторяемости вдоль главной оси, h . Интенсивность рассеяния рассчитывалась по формуле для достаточно длинной жесткой спирали (общая длина намного больше периода повторяемости) [19]

$$I(q) = \frac{A}{q} \left([\Psi(q, 0)]^2 + 2 \left[\Psi \left(q, \frac{2\pi}{hq} \right) \right]^2 \right) + bkg,$$

$$\Psi \left(q, \frac{2\pi j}{hq} \right) = \begin{cases} J_j \left(\frac{qD}{2} \sqrt{1 - \left(\frac{2\pi j}{hq} \right)^2} \right) \Phi(q), & q \geq \frac{2\pi j}{hq}, \\ 0, & q < \frac{2\pi j}{hq}, \end{cases} \quad (1)$$

где A — калибровочный фактор, $J_j(x)$ — функция Бесселя j -го порядка, $\Phi(q) = \frac{\sin(qr) - qr \cos(qr)}{(qr)^3}$ — форм-фактор сферического мономера, bkg — остаточный некомпенсированный фон. При аппроксимации варьировались все указанные выше параметры спирали, а также параметры A и bkg . Согласно [19], функция разрешения дифрактометра была включена в процедуру подгонки в виде гауссова распределения со средним относительным разрешением $\Delta q/q = 0.15$.

Параметры спирали, найденные в результате аппроксимации (1) данных МУРР, представлены в таблице. Достаточно хорошее согласие модельных и экспериментальных кривых на рис. 3, *b* означает, что главным фактором, определяющим поведение кривых рассеяния в измеренном диапазоне q , является спиральная симметрия. Точный вид (т.е. отклонения от сферической формы) и внутреннее строение (т.е. отклонения от однородного приближения) основных единиц, составляющих спиральную структуру, не имеют существенного

влияния на полученные кривые рассеяния. Найденные параметры спиральной структуры амилоидов согласуются с представлениями о строении протофиламентов, полученными с помощью данных рентгеновской дифракции и электронной микроскопии [21]. Таким образом, для исследуемой системы можно говорить о преимущественном присутствии в растворе нескрученных друг с другом протофиламентов, т.е. влияние возможных мультифибрилярных образований на кривую рассеяния мало. Это также подтверждается и тем фактом, что характерный период перекручивания мультифибрилл, который детектируется с большой достоверностью в экспериментах по электронной и атомно-силовой микроскопии, составляет $\sim 100 \text{ nm}$ и выше. В этом случае поперечное сечение таких структур должно было описываться достаточно хорошо моделью плотноупакованных цилиндров (см. анализ МУРР на амилоидных образованиях глюкогона [9]). В исследуемой же нами системе такие модели (см. пример на рис. 3, *a*) не дают адекватного описания экспериментальных данных.

В таблице проведено также сравнение радиусов инерции поперечного сечения, полученных в результате КФП и рассчитанных исходя из параметров модели (1) [19],

$$R_c^2 = (3/5)r^2 + (1/4)D^2. \quad (2)$$

Сравнивая структурные параметры спирали, полученные с помощью МУРР и МУРН (см. таблицу), можно видеть, что период повторяемости и размер структурной единицы для двух методов различаются слабо (в пределах 10%), в то время как МУРН дает существенно (практически на 50%) большее значение для среднего диаметра спирали. Это отчетливо проявляется при рассмотрении определенного различными способами радиуса инерции поперечного сечения. Мы связываем такое расхождение с „изотоп-эффектом“ при использовании тяжелой воды в нейтронных экспериментах, которое приводит к некоторому „разбуханию“ спиралей в растворе. Данный вывод подтверждается сравнительным анализом атомно-силовой микроскопии [17] амилоидов лизоцима, адсорбируемых на поверхность слюды из растворов на основе H_2O и D_2O . Возможной причиной данного эффекта является различие в водородной связи между белком и молекулами растворителя для двух типов растворов [22].

Аналогично цилиндрическим мицеллярным образованиям [23] из функций распределения по расстояниям в поперечном сечении ($\text{PDD}^{\text{cross-section}}$) было определено распределение массы на единицу длины вдоль оси спирали

$$M_L = \frac{I_{cs}(0)}{\Delta\rho_m^2}, \quad (3)$$

где $I_{cs}(0)$ — нормированная на концентрацию интенсивность рассеяния в нулевой угол для поперечного сечения, $\Delta\rho_m$ — контраст (разница плотности длины рассеяния для вещества и растворителя), деленный на плотность вещества. Полученные согласно формуле (3)

значения M_L для водных амилоидных растворов лизоцима представлены в таблице. Следует отметить, что значения M_L практически совпадают для амилоидных растворов в легкой и тяжелой воде. Этот факт указывает на схожесть структурных единиц (количество белка), участвующих в формировании наблюдаемого в эксперименте протофиламента. Используя среднюю массу аминокислотного остатка ($M_{am} = 110 \text{ Da} = 182.6 \cdot 10^{-24} \text{ g}$), мы оценили число молекул аминокислот (N_{am}) на 10 nm длины (см. таблицу).

4. Заключение

В работе показано, что с точки зрения МУРР среди простых приближений наиболее адекватно структуру фибрилл в амилоидном растворе лизоцима яичного белка описывает модель „спираль из однородных сферических частиц“. Отсюда следует, что преимущественно амилоидные агрегаты в исследуемом растворе представляют собой отдельные нескрученные между собой спиралевидные филаменты. Определены период повторяемости (шаг) и средняя толщина спирали, а также эффективный радиус основных структурных единиц, составляющих спираль. При сравнении результатов из экспериментов МУРР с данными МУРН можно сделать вывод о качественном согласии структурных параметров, полученных двумя методами. Вместе с тем обнаружен „изотоп-эффект“ в структуре спирали при использовании тяжелого компонента растворителя (смеси $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$), проявляющийся в существенном увеличении диаметра спирали при переходе к раствору со значительным содержанием D_2O .

Список литературы

- [1] L. Obici, V. Perfetti, G. Palladini, R. Moratti, G. Merlini. *Biochim. Biophys. Acta* **1753**, 11 (2005).
- [2] M. Sunde, L.C. Serpell, M. Bartlam, P.E. Fraser, M.B. Pepys, C.C. Blake. *J. Mol. Biol.* **273**, 729 (1997).
- [3] A.E. Langkilde, B. Vestergaard. *FEBS Lett.* **583**, 2600 (2009).
- [4] Y. Yonezawa, S. Tanaka, T. Kubota, K. Wakabayashi, K. Yutani, S. Fujiwara. *J. Mol. Biol.* **323**, 237 (2002).
- [5] U.-S. Jeng, T.-L. Lin, J.M. Lin, D.L. Ho. *Physica B* **385–386**, 865 (2006).
- [6] P. Thiagarajan, T.S. Burkoth, V. Urban, S. Seifert, T.L.S. Benzinger, D.M. Morgan, D. Gordon, S.C. Meredith, D.G. Lynn. *J. Appl. Cryst.* **33**, 535 (2000).
- [7] B. Vestergaard, M. Groenning, M. Roessle, J.S. Kastrup, M. van de Weert, J.M. Flink, S. Frokjaer, M. Gajhede, D.I. Svergun. *PLOS Biol.* **5**, 1089 (2007).
- [8] L. Giehma, D.I. Svergun, D.E. Otzen, B. Vestergaard. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **108**, 3246 (2011).
- [9] C.L.P. Oliveira, M.A. Behrens, J.S. Pedersen, K. Erlacher, D.E. Otzen, J.S. Pedersen. *J. Mol. Biol.* **387**, 146 (2009).
- [10] W.H. Wu, X. Sun, Y.P. Yu, J. Hu, L. Zhao, Q. Liu, Y.F. Zhao, Y.M. Li. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 315 (2008).
- [11] H. Skaat, G. Shafir, S. Margel. *J. Nanopart. Res.* **13**, 3521 (2011).
- [12] L. Xiao, D. Zhao, W.H. Chan, M.M.F. Choi, H.-W. Li. *Biomaterials* **31**, 91 (2010).
- [13] S. Rocha, A.F. Thunemann, M.D.C. Pereira, M. Coelho, H. Mohwald, G. Brezesinski. *Biophys. Chem.* **137**, 35 (2008).
- [14] A.M. Saraiva, I. Cardoso, M.J. Saraiva, K. Tauer, M.D.C. Pereira, M.A.N. Coelho, H. Mohwald, G. Brezesinski. *Macromol. Biosci.* **10**, 1152 (2010).
- [15] A. Bellova, E. Bystrenova, M. Koneracka, P. Kopčanský, F. Valle, N. Tomasovicova, M. Timko, J. Bagelova, F. Biscarini, Z. Gazova. *Nanotechnology* **21**, 065 103 (2010).
- [16] K. Siposova, M. Kubovcikova, Z. Bednarikova, M. Koneracká, V. Zavisova, A. Antosova, P. Kopčanský, Z. Daxnerova, Z. Gažová. *Nanotechnology* **23**, 055 101 (2012).
- [17] M.V. Avdeev, V.L. Aksenov, Z. Gažová, L. Almásy, V.I. Petrenko, H. Gojzewski, A.V. Feoktystov, K. Šipošová, A. Antošová, M. Timko, P. Kopčanský. *J. Appl. Cryst.* **46**, 224 (2013).
- [18] J.S. Pedersen, S. Hansen, R. Bauer. *Eur. Biophys. J.* **22**, 379 (1994).
- [19] D.V. Lebedev, D.M. Baitin, A.Kh. Islamov, A.I. Kuklin, V.Kh. Shalguev, V.A. Lanzov, V.V. Isaev-Ivanov. *FEBS Lett.* **537**, 182 (2003).
- [20] A. Meister, S. Drescher, I. Mey, M. Wahab, G. Graf, V.M. Garamus, G. Hause, H.-J. Moegel, A. Janshoff, B. Dobner, A. Blume. *J. Phys. Chem. B* **112**, 4506 (2008).
- [21] M. Sunde, C. Blake. *Adv. Protein Chem.* **50**, 123 (1997).
- [22] A. Nayak, M. Sorci, S. Krueger, G. Belfort. *Proteins* **74**, 556 (2009).
- [23] V.M. Garamus, J.S. Pedersen, H. Kawasaki, H. Maeda. *Langmuir* **16**, 6431 (2000).