

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КУПЕРМАН Марина Володимирівна

УДК 577.343 + 577.112.7 + 577.112.824

**ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЙ МІЖ ГЛОБУЛЯРНИМИ БІЛКАМИ І
БОРВМІСНИМИ КАРКАСНИМИ МАКРОЦИКЛІЧНИМИ
КОМПЛЕКСАМИ**

03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертація подається на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Науковий керівник
Ковальська Владислава Борисівна
доктор біологічних наук

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Куперман М.В. Вивчення взаємодій між глобулярними білками і борвмісними каркасними макроциклічними комплексами. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2020.

Пошук та розробка макроциклічних та каркасних сполук, які здатні до розпізнавання елементів на поверхні білкової молекули за рахунок супрамолекулярних взаємодій - актуальне питання для таких завдань, як формування і регулювання білок-білкових взаємодій, створення сенсорів, іммобілізація білків, розробка матеріалів на основі білків. Розмір і геометрія молекули грає важливу роль: молекули середнього розміру і об'ємної геометрії здатні специфічно зв'язуватися завдяки багатоточковій взаємодії з структурними елементами білку. Метою даної роботи є дослідження взаємодій між рядом глобулярних білків і біоактивними борвмісними каркасними об'ємними макроциклами (*клозо*-боратами, клатрохелатами заліза (II)).

Для дослідження взаємодії між білками і біоактивними борвмісними каркасними сполуками використовували метод гасіння власної флуоресценції білку і спектроскопію кругового дихроїзму, для характеристики комплексоутворення білок-ліганд використовували ізотермічну калориметрію титрування, визначення сайтів зв'язування ліганду у білку здійснювали методом замісного титрування, зміни структури білку при зв'язуванні з *клозо*-боратами, а також протягом фібрилоутворення визначали методом кругового дихроїзму білку в УФ області, для дослідження кінетики агрегації білків використовували флуоресцентну спектроскопію на основі амілоїдчутливого барвника, для характеристики

морфології окремих агрегатів використовували трансмісійну електронну мікроскопію.

Було досліджено взаємодію альбумінів та інших глобулярних білків (лізоциму, БЛГ, Ig G) з незаміщеними і функціоналізованими *клозо*-боратами. Альбуміни утворюють комплекси з незаміщеними і заміщеними кластерами бору. Показано, що на зв'язування альбумінів з *клозо*-боратами впливає структура кластеру і природа його замісників. Обидва сироваткових альбуміни найбільш чутливі до ариламино- і галоген- заміщених похідних серед *клозо*-декаборатів. При взаємодії альбуміну і галоген- кластерів бору, вплив *клозо*-боратів на флуоресценцію обох білків посилюється у ряду від $[B_{10}Na_{10}]^{2-}$ до $[B_{12}Na_{12}]^{2-}$, а також від хлорпохідних до йодпохідних.

Методом ізотермічної калориметрії титрування була показана більша спорідненість альбумінів до галоген- кластерів бору $[B_{12}Na_{12}]^{2-}$ (К зв'язування порядку $10^4 - 10^6 M^{-1}$), у порівнянні з незаміщеними і функціоналізованими гідроген *клозо*-боратами того ж типу (К зв'язування порядку $10^3 M^{-1}$). Стехіометрія зв'язування альбумін-*клозо*-борат також визначається наявністю і природою замісників у кластері: 4-5 галоген- чи ариламино- похідних або 2 молекули незаміщеного гідроген *клозо*-борату на молекулу білку. Вища афінність між альбуміном і галоген *клозо*-боратами в порівнянні з гідроген кластерами бору сумісно з більшою кількістю аніонів у комплексі робить їх більш привабливими для досліджень, як потенційні агенти для бор нейтрон захоплюючої терапії онкологічних захворювань і бор нейтрон захоплюючої сіновектомії.

Досліджено і охарактеризовано реакцію фібрилізації білку під дією дианіонного кластеру бору – гідроген *клозо*-додекаборату $[B_{12}H_{12}]^{2-}$. Показано, що вплив кластеру залежить від його концентрації. Зокрема, відбувається рання денатурація інсуліну під впливом *клозо*-борату; причому при 10 μM концентраціях кластеру прискорюється утворення амілоїдних фібрил. *Клозо*-борат також індукуює зміни у морфології фібрил: формуються нерозгалужені структури з більшим

діаметром, ніж при фібрилізації вільного інсуліну, при збільшенні концентрацій $[V_{12}H_{12}]^{2-}$ до 100 μM сильно збільшується здатність до латеральної агрегації. Завдяки таким властивостям *клозо*-борат представляє інтерес для дослідження, як агент для спрямування реакції фібрилізації і подальшого аналізу ефектів аніонів на конформаційні зміни білку і агрегації.

Було розроблено ряд амілоїдчутливих триметинових ціанінових барвників, що значно (до 70 разів) підвищують власний флуоресцентний сигнал у присутності амілоїдних фібрил і здатні для моніторингу реакції фібрилоутворення.

Досліджено і охарактеризовано взаємодію сироваткових альбумінів з рядом клатрохелатів заліза (II) методами флуоресцентної спектроскопії, спектроскопії кругового дихроїзму, ізотермічної калориметрії титрування. Показано що при взаємодії білок-ліганд оптично неактивні клатрохелати заліза (II) здатні давати характерні КД-відгук у видимій області спектру (350 – 600 нм).

Встановлено, що природа замісників у молекулі клатрохелату, їх кількість та ізомерія визначає силу зв'язування з білками, а також амплітуду і форму відповідного КД-відгуку. Згідно методу гасіння власної флуоресценції білку найбільш інтенсивне альбумін зв'язується з клатрохелатами з двома або шістьма карбоксильними замісниками. Проте, найбільш інтенсивні КД-сигнали при взаємодії з БСА генерують клатрохелати з двома карбоксифенільними групами. Для дикарбоксифеніл клатрохелатів, які інтенсивно зв'язуються з білками і мають найбільш виражені КД-відгуки, показано низьку цитотоксичність ($IC_{50} = 40 - 150 \mu\text{M}$) для ракових клітин.

Показано, що клатрохелати здатні відрізнити родинно-близькі білки (бичачий і людський сироваткові альбуміни), а також різні конформації альбуміну (які спричинені змінами рН середовища) за різницею форми та інтенсивності КД-смуг. Таким чином, клатрохелати заліза (II) можуть бути використані як КД-репортери, чутливі до конформаційних відмінностей білків.

Виходячи з впливу гекса-карбоксіфеніл- заміщених клатрохелатів переважно на триптофанову флуоресценцію альбумінів, зроблено припущення, що молекули клатрохелату зв'язуються у головному сайті 1 альбумінів (де розташовані Трп-залишки). Методом ІТК отримані константи зв'язування БСА з гекса-карбоксіфенільними ізомерами (порядку $10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$).

Запропоновано модель зв'язування білок-клатрохелат, згідно якої електростатична взаємодія між реберними карбокси групами клатрохелату та позитивно зарядженими амінокислотними залишками білків є ключовою для утворення комплексу білок-ліганд. Геометрія сайту білку зумовлює вибір відповідної оптично-активної конформації клатрохелату.

Ключові слова: глобулярні білки, сироваткові альбуміни, амілоїдні фібрили, клозо-борати, клатрохелати заліза (II), флуоресцентна спектроскопія, флуоресцентні зонди, спектроскопія кругового дихроїзму, ізотермічна калориметрія титрування.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. Induced CD of iron (ii) clathrochelates: sensing of the structural and conformational alterations of serum albumins / V. Kovalska, **M. Kuperman**, M. Losytskyu, S. Vakarov, S. Potocki, S. Yarmoluk, Y. Voloshin, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka // *Metallomics*. – 2019. – Vol. 11(2). – P. 338-48. *Особистий внесок здобувача – дослідження клатрохелатів як потенційних конформаційно чутливих ІКД-репортерів.*
2. N-alkylaryl styrylcyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids detection / **M.V. Kuperman**, Y.V. Snihirova, D.V. Kryvorotenko, M.Y. Losytskyu, V.B. Kovalska, S.M. Yarmoluk // *Biopolymers and Cell*. – 2018. – Vol. 34(5). – P. 374-386. *Особистий*

внесок здобувача – дослідження можливості застосування серії ціанінових барвників, як зондів для нуклеїнових кислот і білків *in vitro* спектральними методами.

3. Induced chirality of cage metal complexes switched by their supramolecular and covalent binding / V. Kovalska, S. Vakarov, **M. Kuperman**, M. Losytskyu, E. Gumienna-Kontecka, Y. Voloshin, O. Varzatskii // Dalton Trans. – 2018. – Vol. 47(4). – P. 1036-1052. *Особистий внесок здобувача – дослідження зв'язування клатрохелатів з альбуміном спектральними методами і можливості індукувати клатрохелатами КД-сигнал при зв'язуванні.*

4. The discovery of the effect of *closo*-borate on amyloid fibril formation / **M. Kuperman**, S. Chernii, O. Varzatskii, A. Zhdanov, A. Bykov, K. Zhizhin, S. Yarmoluk, V. Kovalska // ChemistrySelect. – 2017. – Vol. 2(34). - P. 10965 – 10970. *Особистий внесок здобувача – дослідження здатності клозо-борату впливати на фібрилоутворення білків спектральними методами.*

5. Effective binding of perhalogenated *closo* -borates to serum albumins revealed by spectroscopic and ITC studies / **M.V. Kuperman**, M.Yu. Losytskyu, A.Yu. Bykov, S.M. Yarmoluk, K.Yu. Zhizhin, N.T. Kuznetsov, O.A. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka, V.B. Kovalska // Journal of Molecular Structure. – 2017. – Vol. 1141. - P. 75-80. *Особистий внесок здобувача – дослідження зв'язування галоген клозо-боратів з сироватковими альбумінами спектральними методами і методом ізотермічної калориметрії титрування.*

6. An interaction of the functionalized *closo*-borates with albumins: the protein fluorescence quenching and calorimetry study, J. Lumin / M. Yu. Losytskyu, V. B. Kovalska, O. A. Varzatskii, **M. V. Kuperman**, S. Potocki, E. Gumienna- Kontecka, A. P. Zhdanov, S. M. Yarmoluk, Ya. Z. Voloshin, K. Yu. Zhizhin, N. T. Kuznetsov, A. V. Elskaya // J. Lumin. – 2016. – Vol. 169. - P. 51–60. *Особистий внесок здобувача – спектрально-люмінесцентні дослідження зв'язування клозо-боратів з сироватковими альбумінами.*

7. Trimethine cyanine dyes as fluorescent probes for amyloid fibrils: the effect of N,N'-substituents / **M. V. Kuperman**, S. V. Chernii, M. Yu. Losytskyy, D. V. Kryvorotenko, N. O. Derevyanko, Yu. L. Slominski, V. B. Kovalska, S. M. Yarmoluk // *Anal Biochem.* – 2015. – Vol. 484. - P. 9-17. *Особистий внесок здобувача – спектральні дослідження серії амілоїд-чутливих ціанінів: визначення залежності між хімічною структурою барвника і його здатністю підвищувати флуоресцентний сигнал у присутності фібрилярних білків.*

Тези наукових доповідей

1. ICD-sensitivity of iron(II) clathrochelates to globular proteins / M. Kuperman, S. Vakarov, N. Chornenka, S. Yarmoluk, E. Gumienna-Kontecka, Ya. Voloshin, V. Kovalska // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine September 3-5 2018, Kyiv, Ukraine. – P. 152.
2. Study of CD sensitivity of iron(II) clathrochelates on various globular proteins / M. Kuperman, S. Vakarov, E. Gumienna-Kontecka, Y. Voloshin, O. Varzatskii, V. Kovalska // Abstract of the 43rd FEBS congress “Biochemistry forever”, July 7 - 12 2018, Prague, Czech Republic. – P. 215-216.
3. The Study of Effect of *Closo*-borate on Fibril Formation of Insulin / M.V. Kuperman, S.V. Chernii, O.A. Varzatskyy, K.Yu. Zhizhin, S.M. Yarmoluk, V.B. Kovalska // Abstract of XXIII Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals", September 20 – 25 2017, Kyiv, Ukraine. - P. 122.
4. CD sensing of conformation's alterations of serum albumin by iron (II) clathrochelates / M. Kuperman, M. Losytskyy, S. Vakarov, E. Gumienna-Kontecka, O. Varzatskii, V. Kovalska Abstract of International research and practice conference

“Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO -2017), August 23 - 26 2017, Chernivtsi, Ukraine. - P. 112.

5. Effective interactions between perhalogenated *closo*-borates and serum albumins / M. Kuperman, M. Losytskyy, K. Zhizhin, A. Bykov, N. Kuznetsov, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka, V. Kovalska // Abstract of XXIV Young Research Fellow Meeting – SCT, February 8 - 10 2017, Châtenay-Malabry, France. - P 162.

6. Effect of the substituents isomery in functionalized clathrochelates on their interaction with proteins / M. Kuperman, V. Kovalska, S. Vakarov, M. Losytskyy, E. Gumienna-Kontecka, O. Varzatskii // Abstract of FEBS 2016: Molecular and Systems Biology for a better life, September 3 -8 2016, Kuşadası, Turkey. – P. 312.

7. CD study of supramolecularly induced chirality of the monoribbed-functionalized optically active amide carboxyphenylsulfide iron(II) clathrochelates / Varzatskii O.A., Kovalska V.B., Vakarov S.V., Kuperman M.V., Vologzhanina A.V., Voloshin Y.Z. // Abstract of VIIth international symposium «Design and synthesis of supramolecular architectures», April 25 -29 2016, Kazan, Russia. – P. 193.

8. Study of the interaction of serum albumin with iron (II) clathrochelate by spectral methods / M.V.Kuperman, V.B.Kovalska, M.Yu.Losytskyy, S.M. Yarmoluk // Abstract of Conference for Young Scientists (CYS), September 21 – 25 2015, Kiev, Ukraine. – P. 70.

9. Effect of the *closo*-borates substitution on its binding with proteins / M.V. Kuperman, V.B. Kovalska, M.Yu. Losytskyy, O.A. Varzatskii, S.M. Yarmoluk, K.Yu. Zhizhin // 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю „Хімічні проблеми сьогодення”, Збірник тез, 17-20.03.2014, Донецьк, Україна. – P. 158.

10. Study of trimethine cyanine dyes with different N,N'-substitutions as amyloid-sensitive probes / M.V. Kuperman, S.V.Chernii, M.Yu.Losytskyy, D. V. Kryvorotenko, Yu.L. Slominski // Abstract of BIO Congress 2014, September 9-12 2014, Warsaw, Poland. - P. 285.

SUMMARY

Kuperman M.V. Investigation of interactions between globular proteins and boron containing macrocyclic complexes – Manuscript.

Thesis for scientific degree of Candidate of Sciences in Biology (Doctor of Philosophy), speciality 03.00.03 – Molecular biology. Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

Nowadays, search of the macrocyclic compounds are able to the protein surface elements recognition by supramolecular interactions is of interest. New developments are applied for modulation protein-protein interactions, sensors design, immobilization techniques and protein-based materials. The molecule size and geometry are important, since middle-sized molecules of three-dimension structure are able to target large protein surface elements by multiple interactions with protein structural elements. The goal of this work is to investigate the interactions between series globular proteins and bioactive boron containing three-dimensional macrocycles (*closo*-borates, iron (II) clathrochelates).

A protein fluorescence quenching spectroscopy and circular dichroism spectroscopy were used for the investigation of the interactions between globular proteins and bioactive boron containing macrocyclic compounds. An isothermal titration calorimetry was used to characterize the protein-ligand complexes formation, a displacement titration – to determine the protein-binding site of clathrochelates. To monitor protein secondary structure upon boron clusters binding and during protein fibrillization process a circular dichroism in UV range were used. A fluorescent dye based assay was used to study the kinetics of protein aggregation; the morphology of the protein aggregates was investigated by the transmission electron microscopy.

The interactions of serum albumins and series globular proteins (lysozyme, β -lactoglobulin, immunoglobulin G) with non-substituted and functionalized *closo*-borates were investigated. The complexes formation between serum albumins and *closo*-borate clusters $[B_{10}H_{10}]^{2-}$, $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ and their functionalized derivatives was confirmed by

fluorescent spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC). The clusters structure and their substituents nature were shown to affect the intensity of the binding. Both serum albumins are more sensitive to arylamine-substituted and halogen *closo*-borate derivatives. Upon the interaction of albumin with halogen boron clusters, the *closo*-borates effect on protein fluorescence intensifies in row from $B_{10}Hal_{10}^{2-}$ to $B_{12}Hal_{12}^{2-}$ and from chlorine to iodine derivatives.

The complexes of albumins with halogen *closo*-borates $[B_{10}Hal_{10}]^{2-}$ are characterized by higher binding affinity (K about $10^4 - 10^6 M^{-1}$) as compared to functionalized or non-substituted hydrogen clusters (K about $10^3 M^{-1}$). The substituents presence and their nature determine the protein-ligand binding ratio: albumin complexes with halogen/arylamine clusters are characterized by larger number of boron clusters (4-5 anions) bound per one protein molecule in comparison with hydrogen *closo*-borates (2 anions). Due to this halogen *closo*-borates are proposed for further studies as agents for using in BNCT method with higher “target delivery” potency comparing with hydrogen *closo*-borates.

The amyloid protein fibrillization affected by the dianionic boron cluster, hydrogen *closo*-borate $[B_{12}H_{12}]^{2-}$, was investigated and characterized. The concentration dependent effect of the cluster was shown. The early insulin denaturation is intensified in *closo*-borate presence; at 10 μM concentration cluster speeds up the amyloid fibril formation. In addition, the cluster changes the morphology of the amyloid fibrils: formed structures are unbranched with larger diameter than that upon fibrillization of free insulin. Upon $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ concentration increases to 100 μM the fibrils ability to lateral aggregation strongly intensifies. Due to these features, the *closo*-borates are of the interest for studies as agents allowing to modify (i.e. to direct) the fibrillization reaction and for further exploring of the effect of anions on protein conformation changes and aggregation.

The series of amyloid-sensitive trimethine cyanine dyes was characterized. Their ability to intensively increase (up to 70 times) the fluorescent signal in amyloid fibrils presence and to monitor protein fibrillization process was shown.

The interactions between serum albumin and iron (II) clathrochelates were investigated and characterized by fluorescent and circular dichroism spectroscopy, ITC. Upon the protein-ligand interaction, optically inactive iron (II) clathrochelates are able to acquire CD-signal in visible range of spectra (350-600 nm). The nature of clathrochelate terminal groups, their number and isomery affect both binding intensity and properties of the corresponding ICD-signal (shape, peaks values).

According to protein fluorescence quenching studies, the protein binding with the clathrochelates containing two or six carboxyl terminal groups is the most intensive. However, upon serum albumin binding, more intensive ICD-responses acquire clathrochelates with two carboxyphenyl groups. For the dicarboxyphenyl clathrochelates, which intensively interact with albumins and acquire the most intensive ICD-signals, low cytotoxicity ($IC_{50} = 40 - 150 \mu M$) on human promyelocytic leukemia cell line was shown.

Hexa-carboxyphenylsulfide iron(II) clathrochelates discriminate between proteins of similar structure, in this case human and bovine serum albumin, giving distinct ICD-spectra. Also iron(II) clathrochelates bound to albumin could reflect the transitions of the protein conformation (caused by pH change) by the changes of the band profile and intensity of their CD spectra. Thus, cage metal complexes iron(II) clathrochelates have shown potency as molecular three-dimensional scaffolds for the design of CD-sensitive reporters able to recognize specific elements of protein surfaces.

Based on hexa-carboxyphenyl clathrochelates impact on mainly tryptophan fluorescence of albumin, binding of macrocycles to site 1 of albumins is suggested (where Trp-resudues are located). Binding constants of complex formation BSA with hexa-carboxyphenyl isomers were obtained by ITC method (K about $10^3 - 10^4 M^{-1}$).

According to supposed binding mode of protein-clathrochelate interaction, the electrostatic (polar) interactions between its carboxyl groups and complementary binding groups of a protein play a key role for clathrochelate-to-protein assembling. The protein binding site geometry defines the clathrochelates' optically active conformation.

Keywords: globular proteins, serum albumins, amyloid fibrils, *closo*-borates, iron (II) clathrochelates, fluorescent spectroscopy, fluorescent probes, circular dichroism spectroscopy, isothermal titration calorimetry.

LIST OF PUBLICATIONS OF THESIS FOR GETTING A PHD DEGREE

Articles

1. Induced CD of iron (ii) clathrochelates: sensing of the structural and conformational alterations of serum albumins / V. Kovalska, **M. Kuperman**, M. Losytskyu, S. Vakarov, S. Potocki, S. Yarmoluk, Y. Voloshin, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka // *Metallomics*. – 2019. – Vol. 11(2). – P. 338-48. *Особистий внесок здобувача – дослідження клатрохелатів як потенційних конформаційно чутливих ІКД-репортерів.*
2. N-alkylaryl styrylcyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids detection / **M.V. Kuperman**, Y.V. Snihirova, D.V. Kryvorotenko, M.Y. Losytskyu, V.B. Kovalska, S.M. Yarmoluk // *Biopolymers and Cell*. – 2018. – Vol. 34(5). – P. 374-386. *Особистий внесок здобувача – дослідження можливості застосування серії ціанінових барвників, як зондів для нуклеїнових кислот і білків in vitro спектральними методами.*
3. Induced chirality of cage metal complexes switched by their supramolecular and covalent binding / V. Kovalska, S. Vakarov, **M. Kuperman**, M. Losytskyu, E. Gumienna-Kontecka, Y. Voloshin, O. Varzatskii // *Dalton Trans*. – 2018. – Vol. 47(4). – P. 1036-1052. *Особистий внесок здобувача – дослідження зв'язування клатрохелатів з альбуміном спектральними методами і можливості індукувати клатрохелатами КД-сигнал при зв'язуванні.*

4. The discovery of the effect of *closo*-borate on amyloid fibril formation / **M. Kuperman**, S. Chernii, O. Varzatskii, A. Zhdanov, A. Bykov, K. Zhizhin, S. Yarmoluk, V. Kovalska // ChemistrySelect. – 2017. – Vol. 2(34). - P. 10965 – 10970. *Особистий внесок здобувача – дослідження здатності клозо-борату впливати на фібрилоутворення білків спектральними методами.*
5. Effective binding of perhalogenated *closo* -borates to serum albumins revealed by spectroscopic and ITC studies / **M.V. Kuperman**, M.Yu. Losytskyu, A.Yu. Bykov, S.M. Yarmoluk, K.Yu. Zhizhin, N.T. Kuznetsov, O.A. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka, V.B. Kovalska // Journal of Molecular Structure. – 2017. – Vol. 1141. - P. 75-80. *Особистий внесок здобувача – дослідження зв'язування галоген клозо-боратів з сироватковими альбумінами спектральними методами і методом ізотермічної калориметрії титрування.*
6. An interaction of the functionalized *closo*-borates with albumins: the protein fluorescence quenching and calorimetry study, J. Lumin / M. Yu. Losytskyu, V. B. Kovalska, O. A. Varzatskii, **M. V. Kuperman**, S. Potocki, E. Gumienna- Kontecka, A. P. Zhdanov, S. M. Yarmoluk, Ya. Z. Voloshin, K. Yu. Zhizhin, N. T. Kuznetsov, A. V. Elskaya // J. Lumin. – 2016. – Vol. 169. - P. 51–60. *Особистий внесок здобувача – спектрально-люмінесцентні дослідження зв'язування клозо-боратів з сироватковими альбумінами.*
7. Trimethine cyanine dyes as fluorescent probes for amyloid fibrils: the effect of N,N'-substituents / **M. V. Kuperman**, S. V. Chernii, M. Yu. Losytskyu, D. V. Kryvorotenko, N. O. Derevyanko, Yu. L. Slominski, V. B. Kovalska, S. M. Yarmoluk // Anal Biochem. – 2015. – Vol. 484. - P. 9-17. *Особистий внесок здобувача – спектральні дослідження серії амілоїд-чутливих ціанінів: визначення залежності між хімічною структурою барвника і його здатністю підвищувати флуоресцентний сигнал у присутності фібрилярних білків.*

Conference abstracts

8. ICD-sensitivity of iron(II) clathrochelates to globular proteins / M. Kuperman, S. Vakarov, N. Chornenka, S. Yarmoluk, E. Gumienna-Kontecka, Ya. Voloshin, V. Kovalska // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine September 3-5 2018, Kyiv, Ukraine. – P. 152.
9. Study of CD sensitivity of iron(II) clathrochelates on various globular proteins / M. Kuperman, S. Vakarov, E. Gumienna-Kontecka, Y. Voloshin, O. Varzatskii, V. Kovalska // Abstract of the 43rd FEBS congress “Biochemistry forever”, July 7 - 12 2018, Prague, Czech Republic. – P. 215-216.
10. The Study of Effect of *Closo*-borate on Fibril Formation of Insulin / M.V. Kuperman, S.V. Chernii, O.A. Varzatsky, K.Yu. Zhizhin, S.M. Yarmoluk, V.B. Kovalska // Abstract of XXIII Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals", September 20 – 25 2017, Kyiv, Ukraine. - P. 122.
11. CD sensing of conformation's alterations of serum albumin by iron (II) clathrochelates / M. Kuperman, M. Losytsky, S. Vakarov, E. Gumienna-Kontecka, O. Varzatskii, V. Kovalska Abstract of International research and practice conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO -2017), August 23 - 26 2017, Chernivtsi, Ukraine. - P. 112.
12. Effective interactions between perhalogenated *closo*-borates and serum albumins / M. Kuperman, M. Losytsky, K. Zhizhin, A. Bykov, N. Kuznetsov, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka, V. Kovalska // Abstract of XXIV Young Research Fellow Meeting – SCT, February 8 - 10 2017, Châtenay-Malabry, France. - P 162.
13. Effect of the substituents isomery in functionalized clathrochelates on their interaction with proteins / M. Kuperman, V. Kovalska, S. Vakarov, M. Losytsky, E.

Gumienna-Kontecka, O. Varzatskii // Abstract of FEBS 2016: Molecular and Systems Biology for a better life, September 3 -8 2016, Kuşadası, Turkey. – P. 312.

14. CD study of supramolecularly induced chirality of the monoribbed-functionalized optically active amide carboxyphenylsulfide iron(II) clathrochelates / Varzatskii O.A., Kovalska V.B., Vakarov S.V., Kuperman M.V., Vologzhanina A.V., Voloshin Y.Z. // Abstract of VIIth international symposium «Design and synthesis of supramolecular architectures», April 25 -29 2016, Kazan, Russia. – P. 193.

15. Study of the interaction of serum albumin with iron (II) clathrochelate by spectral methods / M.V.Kuperman, V.B.Kovalska, M.Yu.Losytskyu, S.M. Yarmoluk // Abstract of Conference for Young Scientists (CYS), September 21 – 25 2015, Kiev, Ukraine. – P. 70.

16. Effect of the closo-borates substitution on its binding with proteins / M.V. Kuperman, V.B. Kovalska, M.Yu. Losytskyu, O.A. Varzatskii, S.M. Yarmoluk, K.Yu. Zhizhin // 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю „Хімічні проблеми сьогодення”, Збірник тез, 17-20.03.2014, Донецьк, Україна. – P. 158.

17. Study of trimethine cyanine dyes with different N,N'-substitutions as amyloid-sensitive probes / M.V. Kuperman, S.V.Chernii, M.Yu.Losytskyu, D. V. Kryvorotenko, Yu.L. Slominski // Abstract of BIO Congress 2014, September 9-12 2014, Warsaw, Poland. - P. 285.

Зміст

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1.	29
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1 Супрамолекулярні взаємодії білок-ліганд.....	29
1.1.1 Комплекси білок-ліганд для створення нових наноматеріалів.	30
1.1.2 Металокомплекси як ліганди що зв'язуються з білками.....	31
1.2 Борвмісні "каркасні" макроциклічні сполуки з біологічною активністю.....	31
1.2.1 Клозо-борати.....	31
1.2.2 Клатрохелати	34
1.3 Глобулярні білки різних типів, що досліджувались як модельні системи	36
1.3.1 Сироваткові альбуміни.....	36
1.3.2 Імуноглобулін G	38
1.3.3 Лізоцим.....	39
1.3.4 Бета-лактоглобулін	40
1.4 Конформаційна рухливість білків.....	42
1.4.1 Конформаційні зміни білків при патологіях	43
1.4.2 Амілоїдна агрегація	43
1.4.3 Клінічна значимість кількісного аналізу і аналізу конформаційних змін альбуміну	45
1.5 Методи дослідження взаємодій білок-ліганд.....	47
1.5.1 Дослідження взаємодій білок-ліганд методом гасіння флуоресценції білків	47

	17
1.5.2 Метод кругового дихроїзму	48
1.5.2.1 Аналіз вторинної структури білків	48
1.5.3 Ізотермічна калориметрія титрування	51
1.5.4 Замісне титрування	53
1.6 Флуоресцентні зонди	54
РОЗДІЛ 2.	56
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	56
2.1. Використані матеріали	56
2.2 Приготування стокових розчинів	56
2.3 Приготування робочих розчинів	57
2.4 Спектральні методи	58
2.4.1 Вивчення гасіння власної люмінесценції білка лігандами	58
2.4.2 Корекція ефекту внутрішнього фільтру і реабсорбції	59
2.4.3 Вивчення часу життя збудженого стану люмінесценції альбумінів у присутності лігандів	59
2.4.4 Визначення констант зв'язування при взаємодії альбумінів з <i>клозо-</i> <i>боратами</i>	60
2.4.5 Спектри поглинання	61
2.4.6 Вивчення зв'язування глобулярних білків з клатрохелатами методом спектроскопії кругового дихроїзму	61
2.4.7 Вивчення змін вторинної структури БСА при зв'язуванні з <i>клозо-</i> <i>боратами</i>	61

2.4.8 Вивчення вторинної структури інсуліну протягом процесу фібрилоутворення в присутності і у відсутності <i>клозо</i> -борату В-6 за допомогою методу кругового дихроїзму	62
2.5 Отримання характеристик комплексоутворення альбумінів з лігандами методом ізотермічної калориметрії титрування	62
2.6 Отримання фібрилярних білків.....	63
2.6.1 Отримання фібрилярного інсуліну	63
2.6.2 Отримання фібрилярного лізоциму	63
2.7 Дослідження флуоресцентних барвників	64
2.8 Трансмійсна електрона мікроскопія	64
2.9 Гель-електрофорез	64
2.10 Цитотоксичні дослідження.....	66
2.11 Статистична обробка отриманих результатів	66
РОЗДІЛ 3.	68
ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЙ ГЛОБУЛЯРНИХ БІЛКІВ З <i>КЛОЗО</i> -БОРАТАМИ	68
3.1 Дослідження взаємодій глобулярних білків з <i>клозо</i> -боратами флуоресцентним методом	69
3.1.1 Механізм гасіння флуоресценції при взаємодії білків з кластерами бору	72
3.1.2 Спектрально-люмінесцентні дослідження зв'язування галоген <i>клозо</i> -боратів з альбумінами	73
3.2 Вплив зв'язування альбуміну з <i>клозо</i> -боратом на вторинну структуру білку	75

3.3 Визначення термодинамічних параметрів комплексоутворення альбумінів з <i>клозо-боратами</i>	77
РОЗДІЛ 4.	82
ЗМІНИ РЕАКЦІЇ АМІЛОЇДНОЇ АГРЕГАЦІЇ БІЛКУ У ПРИСУТНОСТІ <i>КЛОЗО-БОРАТІВ</i> ТА РОЗРОБКА АМІЛОЇДЧУТЛИВИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ БАРВНИКІВ.....	82
4.1 Вивчення процесу фібрилоутворення інсуліну в присутності дианіонного <i>клозо-борату В-6</i>	82
4.1.1 Дослідження вторинної структури інсуліну за впливу <i>клозо-борату</i> під час фібрилоутворення за допомогою КД-спектроскопії.....	83
4.1.2 Дослідження кінетики фібрилоутворення інсуліну під дією <i>клозо-борату</i> за допомогою флуоресцентного амілоїдчутливого барвника.....	85
4.1.3 Дослідження кінцевих продуктів фібрилоутворення інсуліну у присутності і за відсутності <i>клозо-борату</i> методом ТЕМ.....	88
4.2 Розробка барвників для досліджень пов'язаних з амілоїдною агрегацією.....	90
4.2.1 Дослідження триметинових ціанінових барвників для визначення амілоїдних фібрил	91
4.2.2 N-алкіларил бензотіазол стирилціанінові барвники для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот	94
РОЗДІЛ 5.	99
ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЙ БІЛКІВ З КЛАТРОХЕЛАТАМИ ЗАЛІЗА (II)	99
5.1 Дослідження зв'язування альбумін-клатрохелат методом гасіння власної флуоресценції білку.....	102
5.2 Дослідження КД-спектрів клатрохелатів, індукованих внаслідок їх взаємодії з альбуміном.....	106

5.3 Чутливість клатрохелатів до конформаційних відмінностей білків	109
5.3.1 КД-чутливість клатрохелатів до структури білків різної та родинно- близької природи	109
5.3.2 Вивчення чутливості клатрохелатів до змін конформації альбуміну.....	111
5.4 Визначення сайту зв'язування клатрохелатів з альбуміном	114
5.5 Дослідження термодинамічних параметрів утворення комплексу БСА- клатрохелат	116
5.6 Механізм виникнення КД-смуг при зв'язуванні білок-клатрохелат.....	118
5.7 Модель комплексу альбумін-клатрохелат.....	119
5.8 Визначення цитотоксичності клатрохелатів до клітин.....	120
ВИСНОВКИ	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	126
ДОДАТОК А	150
ДОДАТОК Б.....	154
ДОДАТОК В.....	155
ДОДАТОК Г	159
ДОДАТОК Д	160
ДОДАТОК Е.....	161

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АСМ	– атомна силова мікроскопія
БНЗС	– бор нейтрон захоплююча сіновектомія
БНЗТ	– бор нейтрон захоплююча терапія
БСА	– бичачий сироватковий альбумін
ВАР	– варфарин
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДСН	– додецилсульфат натрію
ЕВФ	– ефект внутрішнього фільтру
ІБУ	– ібупрофен
ІКД	– індукований кругової дихроїзм
ІНС	– інсулін
ІТК	– ізотермічна калориметрія титрування
КД	– круговий дихроїзм
ЛСА	– людський сироватковий альбумін
НК	– нуклеїнові кислоти
СПЗ	– смуги переносу заряду
T7 РНК полімераза	– РНК полімераза бактеріофага T7
Taq ДНК полімераза	– термостабільна ДНК-полімераза бактерії <i>Thermus aquaticus</i>
ТЕМ	– трансмісійна електрона мікроскопія
Тир	– тирозин
Трп	– триптофан
Фен	– фенілаланін
ЯМР	– ядерний магнітний резонанс
ADME	– абсорбція, розподіл, метаболізм і екскреція
ANS	– 8-Анілінонафталін-1-сульфонова кислота

АСМ	– атомна силова мікроскопія
Ig G	– імуноглобулін G
MRE	– середня еліптичність на залишок
MTT	– тетразолієвий барвник
TRIS	– тріс-гідроксиметил-аміно-метан

ВСТУП

Актуальність теми. На даний час активно іде пошук та розробка сполук, які здатні розпізнавати структурні елементи поверхні білкової молекули. Макроциклічні та каркасні сполуки, молекули яких мають середній розмір та об'ємну будову, здатні забезпечити багатоточкову супрамолекулярну взаємодію та більш специфічно зв'язуватися зі структурними елементами поверхні білка [van Dun S., 2017] порівняно з молекулами малого розміру, які класично використовуються у біомедичних цілях.

Такі макромолекули можуть знайти своє використання у різних біохімічних та біомедичних галузях, зокрема, як терапевтичні агенти, модифікатори перебігу білок-білкових взаємодій, інгібітори каталітичної активності ферментів, складові функціональних наноконструктивних матеріалів на основі білків, інструменти для методів іммобілізації білків та пептидів та аналітичних методів. Раніше вивчалася взаємодія макроциклічних сполук – фулеренів, каліксаренів, циклодекстринів, порфіринів та їх похідних [van Dun S., 2017, Friedman S., 1998] – з білками та можливість розпізнавання ними елементів білкової поверхні.

Процес утворення комплексу білок-ліганд може, з одного боку, призводити до впливу ліганду на функції білка (тобто виявляти біоактивність). З іншого боку, ця асоціація може впливати на властивості лігандів, зокрема їх спектральні характеристики (репортерні властивості).

Для ряду сполук визначена здатність індукувати специфічні сигнали у спектрах кругового дихроїзму (КД) при зв'язуванні з біомолекулами. Такі сигнали є чутливими до просторової будови відповідного сайту зв'язування, тому ці сполуки можуть бути застосовані для досліджень конформаційних перетворень білків та їх інтермедіатів, таких як розплавлена глобула.

У даній роботі були досліджені взаємодії між глобулярними білками і борвмісними сполуками двох типів: *клозо*-боратами і клатрохелатами заліза (II), молекули яких мають об'ємну каркасну будову.

Кластери бору, *клозо*-борати, використовуються як агенти для бор нейтрон захоплюючої терапії онкологічних захворювань [Grimes R.N., 2004]. Тому, дослідження взаємодій між глобулярними білками, зокрема, сироватковими альбумінами, і цими сполуками, вивчення їх впливу на процеси самоасоціації білків є актуальним з огляду на їх використання в біомедичних цілях.

Клатрохелати заліза (II) – каркасні координаційні комплекси з інкапсульованим іоном заліза, для яких була показана висока інгібуюча активність на T7 РНК [Novikov V.V., 2013] полімеразі, здатність зв'язуватися з сироватковими альбумінами [Losytskyu M.Y., 2013] і пригнічувати реакцію самоасоціації білків [Kovalska V., 2017]. Завдяки можливості їх функціоналізації різними замісниками, клатрохелати є перспективними «скафолдами» для дизайну агентів, специфічних до певних сайтів білків, і тому вивчення їх взаємодії з білками є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалася в рамках бюджетної теми «Рациональний дизайн інгібіторів протеїнкіназ як попередників лікарських засобів» (№ держ. реєстрації 0112U004110, 2012-2017 рр.), гранту Європейського Союзу «Горизонт 2020» Дослідна і інноваційна програма Марії Складовської-Кюрі (грант № 778245), гранту Європейської федерації біохімічних товариств (FEBS) (2016, 2018).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є дослідження взаємодій між глобулярними білками і біоактивними борвмісними каркасними молекулами (*клозо*-боратами, клатрохелатами заліза (II)).

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити взаємодію альбумінів і інших глобулярних білків з незаміщеними і функціоналізованими *клозо*-боратами, охарактеризувати комплекс альбумін-*клозо*-борат за допомогою флуоресцентних методів, абсорбційної і КД-спектроскопії, ізотермічної калориметрії титрування.

2. Дослідити зміни перебігу реакції амілоїдної агрегації модельного білка інсуліну в присутності дианіонного *клозо*-борату $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ та визначити вплив цієї сполуки на морфологію утворених агрегатів. Охарактеризувати в якості потенційних флуоресцентних зондів для визначення амілоїдних агрегатів білків серію триметинових ціанінових барвників.

3. Дослідити взаємодію альбумінів з функціоналізованими клатрохелатами заліза (II) за допомогою флуоресцентних методів, абсорбційної спектроскопії, ізотермічної калориметрії титрування та КД-спектроскопії.

4. Дослідити клатрохелати заліза (II) як потенційні КД-репортери, чутливі до просторової структури білка: визначити їх здатність генерувати різні відгуки в індукованих спектрах КД (ІКД-відгуки) у присутності родинно-близьких білків (сироваткових альбумінів) та при конформаційних змінах альбуміну, спричинених змінами рН середовища.

5. Визначити, як на утворення комплексу з білком і відповідний ІКД-відгук впливає природа та ізомерія замісників у молекулі клатрохелату. Запропонувати модель утворення комплексу альбумін-клатрохелат.

6. Визначити токсичність для живих клітин (лінії клітин людської промієлоцитарної лейкемії, HL-60) ди-карбоксіфенільних клатрохелатів заліза (II).

Об'єкт дослідження: глобулярні білки, борвмісні макроциклічні сполуки: *клозо*-борати і клатрохелати заліза (II).

Предмет дослідження: взаємодія сироваткових альбумінів і інших глобулярних білків з борвмісними каркасними макроциклами (*клозо*-боратами і клатрохелатами заліза (II)) та вплив цих сполук на процеси агрегації білків.

Методи дослідження: флуоресцентна спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія з розділенням у часі, спектроскопія кругового дихроїзму, ізотермічна калориметрія титрування, абсорбційна спектроскопія, трансмісійна електрона мікроскопія, гель-електрофорез, МТТ-тест.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше охарактеризовано взаємодії глобулярних білків з функціоналізованими *клозо*-боратами; виявлена висока афінність галогензаміщених борних кластерів до сироваткових альбумінів. Визначено вплив дианіонних кластерів бору на процес фібрилоутворення білків та морфологію утворених агрегатів. Охарактеризовано комплекси альбумінів з моно-, ди- та гекса-карбоксіфеніл заміщеними клатрохелатами заліза. Показано, що клатрохелати заліза (II) здатні генерувати відгук в КД спектрі при взаємодії з глобулярними білками. Показано, що такі сполуки здатні давати різний індукований КД-відгук на білки родинно-близької (бичачий і людський сироваткові альбуміни) природи, а також чутливі до конформаційних змін сироваткового альбуміну. Показано низьку токсичність ди-карбоксіфеніл заміщених клатрохелатів для ракових клітин. Визначено, що природа замісників в молекулі клатрохелатів, зокрема, наявність карбоксільної групи, відіграє ключову роль для можливості утворення комплексу з білком та індукції відповідного КД-відгуку. Запропоновано модель утворення комплексу альбумін-клатрохелат.

Практичне значення одержаних результатів. Відомості про зв'язування сироваткових альбумінів з *клозо*-боратами та залежність їх афінності від типу функціональних замісників у кластерах корисні для досліджень їх подальшого використання в бор нейтрон захоплюючій терапії онкологічних захворювань і бор нейтрон захоплюючій сіновектомії.

Клатрохелати заліза (II) запропоновано в якості чутливих до глобулярних білків КД-репортерів. Такі репортери можуть бути здатними до розпізнавання білків, зокрема, родинно-близької природи, та визначення конформаційних змін протеїнів.

Запропоновано амілоїдчутливий триметиновий бензотіазоловий ціаніновий барвник для детекції амілоїдних агрегатів і моніторингу реакції фібрилоутворення.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальної частини, обробка й аналіз отриманих результатів, пошук та обробку літературних даних виконано здобувачем особисто. Автором самостійно проведено спектральні дослідження взаємодій макроциклічних сполук з глобулярними білками методами флуоресцентної і абсорбційної спектроскопії, зв'язування клатрохелатів з альбумінами методом спектроскопії кругового дихроїзму, вплив *клозо*-боратів на фібрилоутворення інсуліну методом флуоресцентної і КД спектроскопії. Дослідження впливу *клозо*-боратів на процес фібрилоутворення за допомогою КД-спектроскопії були проведені у лабораторії д.б.н. З.Ю. Ткачука. Експерименти з дослідження взаємодії клатрохелатів заліза (II) з білками методом КД, а також комплексоутворення каркасних сполук з сироватковими альбумінами методом ізотермічної калориметрії титрування виконано у співпраці з проф. Е. Гумієнною-Контецькою (Вроцлавський Університет, Польща). Експерименти з цитотоксичності клатрохелатів до культури клітин виконано у співпраці з проф. А. Мохіром (Університет Ерлангена-Нюрнберга, Німеччина). Аналіз спектрів гасіння флуоресценції, КД-спектрів, ІТК даних, обчислення констант зв'язування макроциклів з білками та часу життя збудженого стану білків було здійснено спільно з к.ф.-м.н. М.Ю. Лосицьким. Клатрохелати заліза (II) були синтезовані в Інституті загальної і неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАН України д.х.н. О.А. Варзацьким і асп. С.В. Вакаровим. *Клозо*-борати були синтезовані в лабораторії Інституту загальної і неорганічної хімії ім. Н.С. Курнакова РАН д.х.н., проф. К.Ю. Жижин.

Постановку наукових завдань та інтерпретацію отриманих результатів здійснено спільно з науковим керівником д.б.н., пр.н.с. В.Б. Ковальською. Одержані результати обговорено і викладено у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на вітчизняних та міжнародних фахових наукових конференціях, у тому числі, на XI Парнасівській конференції (Київ, Україна, 2018), на Конгресі FEBS 2018 і 2016 (Прага, Чехія, 2018 і Кушадасі, Туреччина, 2016), XXIII Міжнародній школі-семінарі ім. Г. Пучковської «Спектроскопія молекул і кристалів» (Київ, Україна, 2017), Міжнародній дослідно-практичній конференції «Нано-2017» (Чернівці, Україна, 2017), XXIV Конференції молодих дослідників SCT товариства (Шатне-Малабрі, Франція, 2017), VII Міжнародному симпозиумі «Дизайн і синтез супрамолекулярних структур» (Казань, Росія, 2016), Конференції молодих вчених «CYS» (Київ, Україна, 2015), 8 Всеукраїнській науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення» (Донецьк, Україна, 2014), Міжнародному конгресі ВІО 2014 (Варшава, Польща, 2014).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковано у 7 статтях у наукових фахових журналах, а також представлено на 10 наукових конференціях у вигляді усних доповідей і стендових презентацій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, експериментальної частини (3 розділів), висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 161 сторінці стандартного друкованого тексту, проілюстровано 38 рисунками та 9 таблицями. Список використаної літератури охоплює 245 найменувань.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Супрамолекулярні взаємодії білок-ліганд

Розпізнавання елементів білкової поверхні – актуальне питання для використання у різних біомедичних сферах при виконанні таких завдань, як формування та регулювання білок-білкових взаємодій, створення сенсорів, іммобілізація білків, розробка матеріалів на основі білків. Для цих цілей біоактивні молекули повинні вступати у супрамолекулярні взаємодії з великими білковими елементами або множинними активними ділянками на поверхні білків [1]. Це складні мішені для малих молекул, які традиційно використовують як біоактивні сполуки [2]. Тому активно розробляють біоактивні синтетичні молекули більшого розміру, які повинні мати рухливі структурні ділянки для підлаштування до великих ділянок білкової поверхні при зв'язуванні [1].

При взаємодії між білками та біоактивними сполуками відбувається супрамолекулярне зв'язування білок-ліганд. Комплексоутворення з білками реалізується, в основному, завдяки гідрофобному ефекту [2, 3], а афінність зв'язування визначається розміром і формою ліганду. Специфічність зв'язування досягається за рахунок полярних взаємодій – водневих зв'язків, сольових містків, катіон-π пар [3]. З іншого боку, такі синтетичні сполуки мають бути достатньо гідрофільними, щоб розчинятися у воді [2]. Тому мінімальні характеристики ліганду для ефективного зв'язування з білком – наявність гідрофобної серцевини, оточеної полярними/зарядженими (частіше аніонними) групами [3, 4]. Крім того, раніше була показана важливість ароматичних кілець [3, 5] для взаємодії білок-ліганд. У літературі для таких взаємодій описані приклади використання краун

етерів, кукурбітурилів, пиларенів, порфіринів, циклодекстринів, каліксаренів, молекулярних пінцетів, фулеренів, металокомплексів [2, 6-8].

У певних випадках супрамолекулярне зв'язування з лігандом веде до асоціації білку [9], наприклад, у випадку каліксаренів [10]. Таке «молекулярне склеювання» [11, 12] було використано для створення функціональних матеріалів [13]. Зокрема, було створено каліксарен-контрольовані системи асоціації-дисоціації цитохрому С [10]. Крім того, було показано, що каліксарени можуть зв'язуватися з декількома різними білками, в залежності від будови молекули ліганду. Зв'язування кукурбітурилів з білками може модулювати активність біомолекул (зокрема, веде до інгібування амінопептидази N, ендонутлеази типу-II, амілоїдного фібрилоутворення) або змінювати конформацію білку. У якості інгібіторів амілоїдних фібрил було запропоновано також циклодекстрини, каліксарени, молекулярні пінцети. Наприклад, було показано, що молекулярний пінцет CLR01 ефективно інгібує самоасоціацію декількох амілоїдів через руйнування електростатичних і гідрофобних взаємодій, що вносять важливий вклад у фібрилоутворення [2].

1.1.1 Комплекси білок-ліганд для створення нових наноматеріалів.

Системи білок-ліганд мають ряд переваг при розробці заснованих на білках наноструктур. Ця взаємодія вимагає невеликого простору, звичайно не викликає зміни конфігурації білку. Більш того, велика різноманітність пар білок-ліганд надає різні константи зв'язування, що задовольняє вимогам для створення різних молекулярних білкових асоціатів. Додатково, реактивність і оборотність взаємодій білок-ліганд дозволяє динамічний контроль асоціації/дисоціації білку та його функціональних похідних [13]. Наприклад, раніше були створені нанонитки – функціональні асоціати з білкових глобул гомодимеру глутатіону S-трансферази, які модифіковані трипептидом, через з'єднання молекулами кукурбіт[8]урилу [14]. Привертає увагу також розробка біоматеріалів на основі асоціатів білків, які відповідають на стимули. Нанопружина, яка контрольовано рухається

пружиноподібно, може імітувати «м'язи» у штучних матеріалах [13]. Було показано, що нанонитки з білкових асоціатів з кукурбіт[8]урилом структурно змінюються у відповідь на додання Ca^{2+} . Ці зміни структури між стиснутим і розтягнутим станом приводять до пружиноподібних рухів [15].

1.1.2 Металокомплекси як ліганди що зв'язуються з білками. Перспективність металокомплексів заснована на їх різноманітності за рахунок різної кількості і геометрії лігандів, чого неможливо досягти для органічних молекул. При синтезі таких комплексів ліганди легко модифікувати і комбінувати. Також, унікальність металокомплексів полягає у можливості дизайну сполук з заданими характеристиками, таких як спектроскопічні властивості, кінетика обміну лігандів, каталітичні властивості, окислювально-відновна активність, магнітні властивості, радіоактивність.

Металічний центр у комплексі може грати не тільки структурну роль, а також координувати амінокислотні залишки при взаємодії з білковою поверхнею [8]. Завдяки лігандам, що міцно зв'язують катіон металу вдається знизити або виключити його токсичну дію [16].

Наприклад, для сполук, у яких метал грає структурну роль, раніше було показано активність октаедральних органорутенієвих комплексів як інгібіторів протеїнкінази, трісгетеролептичних рутенієвих поліпіридинських комплексів як інгібіторів ацетилхолінестерази, комплексів заліза з основами Шиффа (біс(п-амідиносаліциліден-L-аланілато)залізо(III)) як інгібіторів трипсину і тромбіну, поліоксометалатів рутенію як інгібіторів ВІЛ-1 зворотної транскриптази [8].

1.2 Борвмісні "каркасні" макроциклічні сполуки з біологічною активністю

1.2.1 Клозо-борати. Сучасна хімія бороводнів за своїм різноманіттям наближається до варіативності вуглеводнів [17]. Кластерні аніони бору, клозо-

борати (рис. 1.1), $[B_nH_n]^{2-}$, $n = 6 - 12$ та їх гетероаналоги – карборани [17, 18], азаборани [19] аналогічно фулеренам [20] є прикладами унікальних повністю неметалічних кластерів. Їх властивості здебільшого визначаються характером хімічного зв'язку між атомами каркасу кластеру [17].

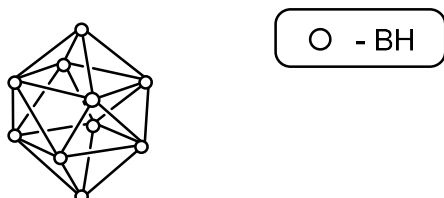


Рис. 1.1. Структура *клозо*-декаборату

Кластерні аніони бору мають псевдоароматичну делокалізацію електронів за рахунок мультицентрового зв'язку В-В-В з дефіцитом електронної густини [21, 22]. У даному типі зв'язку одна пара електронів поділена між трьома атомними центрами, тобто загальний заряд молекули делокалізований по всьому кластеру [17, 19]. Завдяки цьому, кластери мають унікальні властивості – вони термостабільні, резистентні до катаболізму, гідрофобні, кінетично інтерні до різних реагентів, а також низькотоксичні. Кластери мають сферичну геометрію, їх легко модифікувати [19, 20, 23].

Кластери бору – *клозо*-борати широко використовуються в рамках бор нейтрон захоплюючої терапії (рис. 1.2) онкологічних захворювань [24-26] і бор нейтрон захоплюючої синовектомії [20, 27-29]. Було показано, що при бор нейтрон захоплюючій терапії пошкоджуються тільки клітини, у яких локалізовані кластери [20].

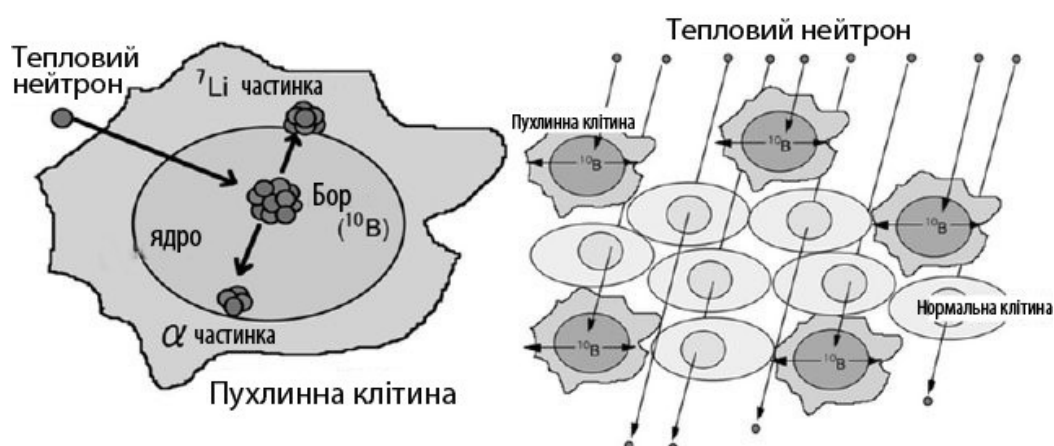


Рис. 1.2. Принцип дії бор нейтрон захоплюючої терапії онкологічних захворювань. Адаптовано з [30]

Раніше було показано, що комплекси сполук з сироватковими альбумінами сильно адсорбуються пухлинними клітинами [31,32]. Тому альбуміни були запропоновані як переносники для адресної доставки біоактивних сполук у пухлинні клітини [33, 34]. Проте, висока гідрофобність кластерів перешкоджає потраплянню сполук до пухлинних клітин, тому необхідне функціоналізування кластерів для набуття гідрофільних властивостей [35]. Тобто дослідження зв'язування ряду глобулярних білків, серед яких є сироваткові альбуміни, з функціоналізованими кластерами, важливе для отримання інформації щодо розподілу цих сполук в організмі в залежності від структури і заміників у кластері [36].

Унікальні фізико-хімічні властивості, зокрема, наявність гідрофобної стабільної структури, роблять можливим використання цих кластерів бору в якості основи для фармакофорів для участі у супрамолекулярних взаємодіях з біомолекулами [35]. Наприклад, карборани були досліджені в якості тривимірного гідрофобного ядра для дизайну потенційних естроген агоністів і ретиноїд антагоністів, модуляторів протеїн кінази С, інгібіторів глутамат карбоксипептидази II [37-42]. Раніше фармакофори, що містять карборан, показали здатність до

модулювання білок-білкових взаємодій транстиретину, зокрема, запобігання амілоїдної агрегації білку внаслідок стабілізації його тетрамеру [26]. Карборани також використовувались як маркери для візуалізації розподілу біоактивних молекул у клітині за допомогою Рамановської спектроскопії [43].

Внаслідок комбінації унікальних властивостей і характеристик незаміщені аніонні кластери бору – *клозо*-борати є зручною модельною системою для дослідження впливу сферичних негативно заряджених молекул на конформаційний стан білку протягом процесу фібрилізації.

1.2.2 Клатрохелати. Клатрохелати є тримірними макрополіциклічними комплексами з інкапсульованим іоном металу (рис. 1.3). За рахунок спряженої системи у трьох диоксимних фрагментах макробіциклічний каркас має квазіароматичну електронну систему. Клатрохелат без полярних замісників є гідрофобним.

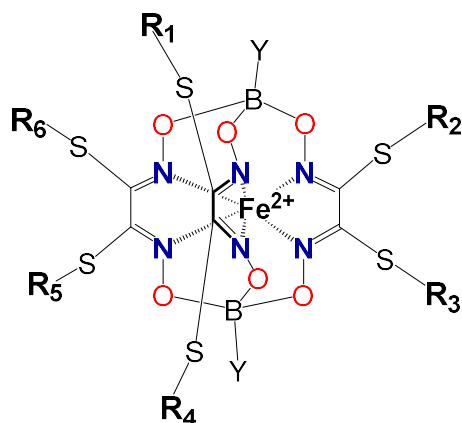


Рис. 1.3. Структура клатрохелату заліза (II). $R_1 - R_6$ – реберні замісники, Y – апікальні замісники. $N=C-C=N$ - диоксимний хелатуючий фрагмент

Клатрохелати високостабільні за фізіологічних умов, макробіцикл захищає метал від безпосередньої взаємодії і компенсує його заряд [44]. Макроцикли можна легко модифікувати хімічно [44, 45], в залежності від замісників це змінює такі характеристики комплексів, як просторова геометрія, каталітична активність, електронні й спектральні властивості, біологічна активність [46, 47]. Тому завдяки

унікальним фізичним і хімічним характеристикам, їх біологічні властивості активно вивчалися [48 - 53]. Зокрема, показано, що моно- і біс-клатрохелати заліза (II) є ефективними інгібіторами системи транскрипції T7 РНК полімерази *in vitro* (навіть у субмікромолярних концентраціях) [48] і Таq ДНК полімерази (у мікромолярних концентраціях) [49]. Моделювання механізму інгібування активності T7 РНК полімерази *in silico* (рис. 1.4) показало включення клатрохелату у кишеню зв'язування, яка сформована молекулою полімерази, матрицею ДНК і РНК, що синтезована (тобто, є інгібуванням взаємодії білок-нуклеїнова кислота). Найбільш виражений ефект інгібування було показано для комплексів функціоналізованих реберними карбоксифенілсульфідними замісниками у хелатного α -діоксиматного фрагменту макроциклу [48].

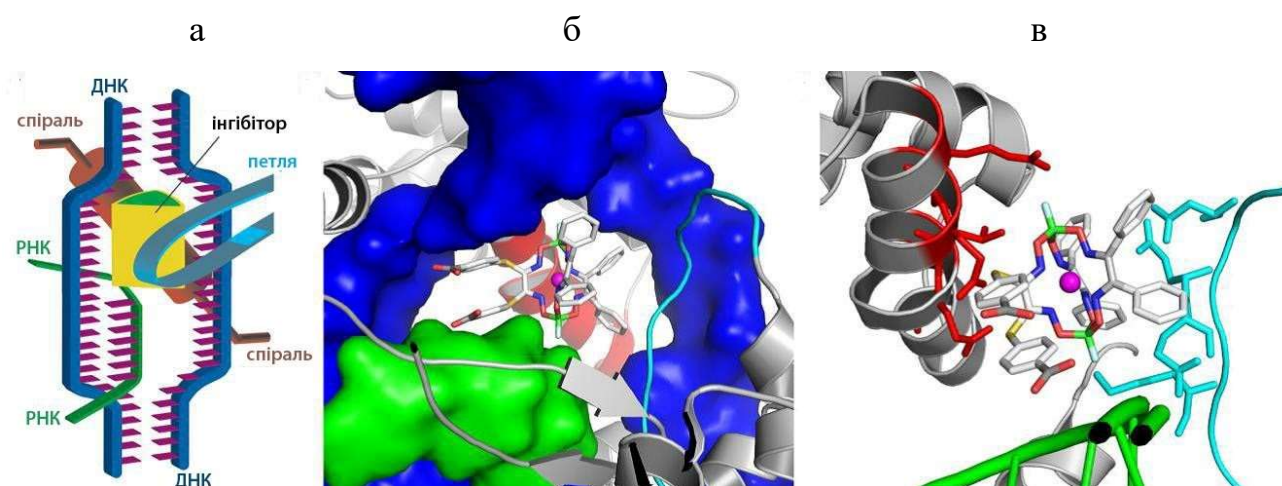


Рис. 1.4. Інгібування T7 РНК полімерази відповідно молекулярному докінгу: а) схематична репрезентація механізму інгібування; б) докінг клатрохелату заліза (II) (ДНК і РНК - показані як поверхні); в) докінг клатрохелату заліза (II), вид збоку (ДНК не показана). Адаптовано з [48]

Крім того, такі карбоксифенілсульфідні моно- і біс- клатрохелати заліза (II) здатні впливати на білок-білкові взаємодії у процесі амілоїдної самоасоціації. На прикладах фібрилоутворення інсуліну і лізоциму *in vitro* було показано, що у

присутності макроциклів змінюється кінетика процесу і морфологія сформованих фібрил [50, 51]. Раніше за допомогою спектральних методів була досліджена здатність функціоналізованих групами клатрохелатів заліза (II) формувати супрамолекулярні асоціати з глобулярними білками (зокрема, сироватковими альбумінами, інсуліном, β -лактоглобуліном, лізоцимом). Було показано, що природа замісників клатрохелату сильно впливає на ці взаємодії. По методу гасіння власної флуоресценції білку сироваткові альбуміни найбільш ефективно зв'язуються з трис-діоксиматами заліза (II) з карбоксифенілсульфідними функціональними групами [52].

При зв'язуванні білок-ліганд, де в якості ліганда виступає біоактивна сполука, активно вивчається функція білків у ролі транспортера, який інкапсулює й захищає сполуку від деградації (від дії світла, тепла, окислювачей і рН середовища) [54 - 56]. Для цих цілей найбільш активно досліджуються взаємодії з двома головними білками плазми крові – сироватковим альбуміном (основний транспортер позитивно заряджених сполук) і α -1-кислий глікопротеїн (основний транспортер негативно заряджених сполук) [57]. В якості транспортера для гідрофобних сполук вивчається білок сімейства ліпокалінів – β -лактоглобулін [55, 56, 58].

1.3 Глобулярні білки різних типів, що досліджувались як модельні системи

У даній роботі було досліджено взаємодії ряду глобулярних білків різної структури і функціональності з біоактивними сполуками (клого-боратами, клатрохелатами).

1.3.1 Сироваткові альбуміни. Сироватковий альбумін - 66 кДа водорозчинний і найбільш розповсюджений білок у сироватці крові (40-50 мг/мл). Альбумін – головний білок, який служить модулятором розподілу рідини до частин тіла, тобто на 70-80% несе відповідальність за колоїдний осмотичний тиск

крові [33, 59]. Альбумін здатний до оборотного зв'язування з структурно різними ендogenous та екзогенними сполуками, тобто, він є їх постачальником через сироватку до органів і тканин організму [60]. Серед таких сполук - катіони (Cu(II), Ni(II), Ca(II), Zn(II)), білірубін, жирні кислоти (бере участь у метаболізмі ліпідів) і терапевтичні речовини та їх метаболіти [60 - 62]. Звільнення речовини з комплексу з альбуміном може відбуватися при зміні афінності до альбуміну цих речовин внаслідок зміни конформації під впливом зовнішніх факторів (рН). Крім того, завдяки здатності дискримінувати стереоізомери, альбумін є білком плазми з високою енантиселективністю [63, 64]. Альбумін проявляє антиоксидантну активність (залежить від наявності амінокислот з вмістом сірки і від потенціалу зв'язування N-термінальної ділянки молекули) [65, 66]. Також сироватковий альбумін має протизапальні властивості (здатний зв'язувати поверхневі речовини Грам-позитивних і Грам-негативних бактерій) [63]. Крім того, альбумін модулює імунну функцію через регулювання біодоступних ліпідних посередників - простагландинів [67, 68], які виконують ключову роль у генерації запальної реакції [69]. Cys34 залишок альбуміну здатний зв'язуватись з оксидом азоту (NO) з утворенням S-нітросо-альбуміну. Це зв'язування веде до антитромботичної дії через регулюючу тромбоз властивість NO [70].

Один з перспективних засобів використання альбумінів – для адресної доставки ліків. Для цього активно досліджують штучні системи доставки речовин за допомогою альбуміну [71, 72], таких як білкові гідрогелі [73], кон'юганти [74], комплекси з наночастинками [75], димери, полімери альбуміну [76], нанотрубки на основі альбуміну [77]. Крім збільшення часу піврозпаду біоактивних сполук, комплексоутворення з альбуміном підвищує їх розчинність, проникність до клітини за допомогою пасивного транспорту і зменшують токсичні властивості [78].

Молекула сироваткового альбуміну (рис. 1.5) складається з трьох доменів (**I**, **II** і **III**) переважно α -спіральної структури, кожних з яких має два субдомени (**A** і **B**, рис. 1.5). Сайт зв'язування 1 (Sudlow сайт 1) – кишень для зв'язування у центрі

субдомену **IIA** (усі 6 α -спіралей), містить петлю-спіраль субдомену **IV** (залишки 148-154). Домен **III** містить сайт зв'язування 2 (Sudlow сайт 2) у субдомені **IIIA**, тоді як субдомен **IV** – сайт зв'язування 3 [79, 80].

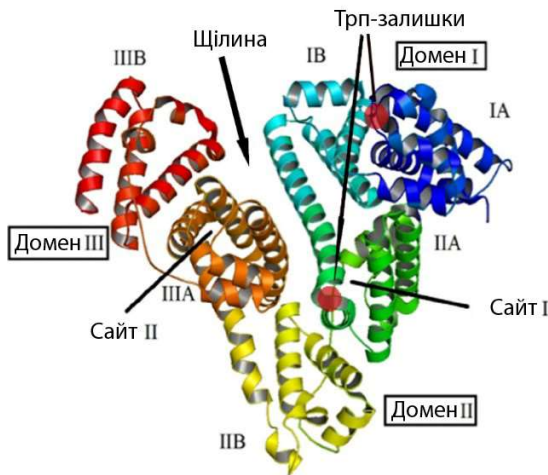


Рис. 1.5. Структура бичачого сироваткового альбуміну. Адаптовано з [81]

Сироваткові альбуміни (БСА і ЛСА) мають 76 % подібність амінокислотної послідовності [82], їх кристалічна структура дуже схожа [83]. Незважаючи на подібність молекулярних структур БСА і ЛСА, білки мають декілька регіонів з відмінностями в амінокислотній послідовності [84], також макромолекула БСА менш конформаційно гнучка у порівнянні з ЛСА [85]. Тому тип сироваткового альбуміну впливає на асоціацію з різними лігандами/токсинами, такими як варфарин, охратоксин А, фенілбутазон [85, 86] у сайті 1, тобто впливає на константи стікості й конкуруючий об'єм. Флуоресценція сироваткових альбумінів спричинена, в основному, двома (БСА) або одним (ЛСА) триптофановими (Трп) і, у значно меншій мірі, 20 (БСА) або 18 (ЛСА) тирозиновими (Тир) амінокислотними залишками [87-89].

1.3.2 Імуноглобулін G. Імуноглобулін G (Ig G, рис. 1.6) – глобулярний білок сімейства глікопротеїнів, головна функція якого – захист тіла від вторгнення

патогенів [90]. Поряд з ЛСА і трансферином, IgG є найбільш розповсюдженим білком крові людини [91].

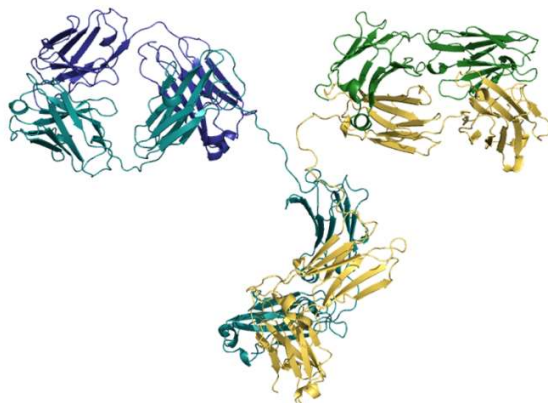


Рис. 1.6. Структура імуноглобуліну G. Адаптовано з [92]

Молекула білку має переважно β -складчасту структуру з невеликою кількістю α -спіральных ділянок [93] і складається з 4 пептидних ланцюгів: двох ідентичних легких (навколо 25 кДа) та двох ідентичних важких (навколо 50 кДа), які зв'язуються між собою дисульфідними зв'язками [94].

1.3.3 Лізоцим. Лізоцим – глобулярний білок, який містить приблизно 40–45% α -спіральных ділянок і 20% β -складчастих структур у нативному стані [95]. Лізоцим – противірусний і антибактеріальний білок з ферментативною активністю, який є в різних біологічних рідинах і тканинах організму (сльозах, слині, шкірі, крові, печінці, лімфатичних тканинах людини та інших тварин). Інші біологічні властивості включають протизапальну, антисептичну, антигістамінну і протипухлинну активність. Лізоцим містить 129 амінокислотних залишків, серед яких 6 триптофанів (рис. 1.7), три з яких (Трп-62, Трп-63, Трп-108) присутні у сайті зв'язування (активному центрі) білка, два знаходяться у гідрофобній порожнині білка і один знаходиться окремо від інших [96]. Активний сайт лізоциму складається з глибокої щілини, яка розділяє білок на дві частини, що з'єднані за допомогою α -спіралі. Один з доменів (домен β , амінокислотні залишки 40-85)

майже повністю складається з β -листів, другий (домен α , залишки 89-99) - більше зі спіральних структур [97].

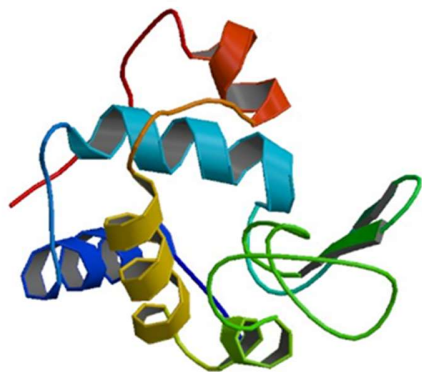


Рис. 1.7. Структура лізоциму (PDB ID 1GXV).

Відомо, що Трп-63 і Трп-108 дають 80 % білкової флуоресценції, тому якщо при зв'язуванні лігандів відбувається гасіння флуоресценції через перенос енергії, ліганди знаходяться біля цих Трп залишків [98, 99].

Лізоцим добре охарактеризований і широко використовується як модельний білок для вивчення зв'язування з лігандами завдяки маленькому розміру, високій стабільності, потенціалу зв'язування з різноманітними препаратами [100, 101].

1.3.4 Бета-лактоглобулін. β -лактоглобулін (БЛГ) – глобулярний білок, який має переважно β -складчасту структуру: містить 41 % β -складчастих і 16 % α -спіральних ділянок. БЛГ – білок сімейства ліпокалінів, більшість з яких зв'язують гідрофобні ліганди і є специфічними транспортерами.

Структура білку має форму β -бочки, яка складається з 8 антипаралельних β -листів і одної головної α -спіралі [102]. З кристалічної структури БЛГ (рис. 1.8) видно, що β -складчасті ділянки формують центральну внутрішню гідрофобну порожнину з двома триптофановими амінокислотними залишками, які розташовані по периферії: Трп-19 у гідрофобній порожнині і Трп-61 на поверхні білку близько до неї [103].



Рис. 1.8. Структура β -лактоглобуліну у двох проекціях. Адаптовано з [104]

При нейтральному рН БЛГ переважно знаходиться у димерному стані, він дисоціює у мономерний стан при $\text{pH} < 3.5$ [105,106]. Його власна Трп-флуоресценція високочутлива до змін у оточенні [107]. Крім того, передбачається, що молекула БЛГ має додаткові зовнішні сайти зв'язування: на поверхні гідрофобної кишені у борозенки між α -спіраллю і β -бочкою (зовнішня поверхня біля Трп-19-Арг-124), сайт біля отвору β -бочки і на межі мономер-мономер у БЛГ-димері [58]. Завдяки наявності множинних сайтів зв'язування, БЛГ є одним з добре досліджених білків-транспортів [55, 58]. Зокрема, для БЛГ було показано афінність до широкого ряду біоактивних сполук, таких як жирні кислоти, ретиноїди, стероїди, вітаміни і поліфеноли [108].

1.3.5 Інсулін. Інсулін (ІНС) – маленький глобулярний білок, в організмі він відповідає за підтримку метаболічного гомеостазу і використовується для лікування діабету (тип I) [109]. Інсулін має переважно α -спіральну структуру [110], складається з двох поліпептидних ланцюгів (А і В), які з'єднані дисульфідними містками (рис. 1.9) [111]. Завдяки маленькому розміру цього глобулярного білку і добре дослідженій структурі, інсулін служить моделлю для вивчення фолдингу

білків, в тому числі в процесах білкової агрегації і формування амілоїдних фібрил [109].

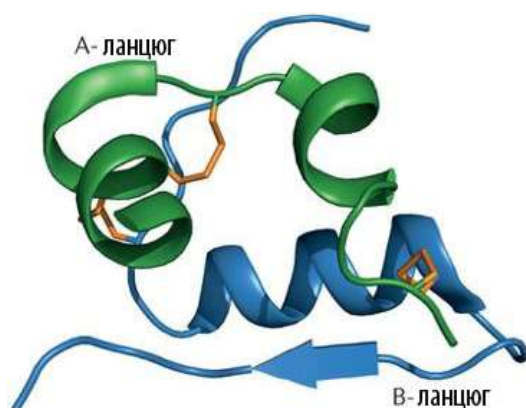


Рис. 1.9. Структура інсуліну. Адаптовано з [112]

1.4 Конформаційна рухливість білків

Нативна структура білків відповідає найбільш термодинамічно стабільним структурам за фізіологічних умов [113]. Більшість білків можна поділити на функціонально значимі частини – структурні домени, які взаємодіють між собою, перебувають у постійній динаміці і визначаються як частково незалежні частини білкової макромолекули, її структурні блоки [114, 115]. Домени, як правило, рухаються у відповідь на взаємодію білку з лігандами [116, 117]. Рухи доменів зумовлюють каталіз, регуляторну активність, асоціацію, транспорт речовин, білок-білкове і білок-нуклеїнове розпізнавання, роботу молекулярних моторів і таких білкових машин, як рибосоми, реплікони, АТФ-синтетази, цитотоксичність, тощо [118-128]. Існують також білки з неупорядкованими ділянками або білки з цілком неупорядкованою структурою, які набувають властивостей після повністю або часткового упорядкування структури при активації лігандами [129].

1.4.1 Конформаційні зміни білків при патологіях. Проте, існує певна конкуренція між сприятливим згортанням білку і переходом у неправильну конформацію [13, 130]. У нормі спеціалізовані білки (шаперони) допомагають білкам згорнутися заново, а у випадку несправності білки у неправильній конформації зазнають деградації протеасомами. Незважаючи на такий механізм контролю, під дією несприятливих умов (рН, температура, концентрація білку), при помилках у посттрансляційних модифікаціях, оксидативному стресі або внаслідок спорадичних причин численні білки можуть прийняти неправильну конформацію [131, 132]. Ці фактори можуть діяти самостійно або разом [133]. Неправильне згортання веде до певних захворювань [134]. Серед них нейродегенеративні захворювання (таких як хвороба Альцгеймера і Паркінсона), діабет другого типу, амілоїдоз, бічний аміотрофічний склероз, фронтотемпоральна дегенерація, онкологічні захворювання, серцево-судинні захворювання, тощо [135, 136]. Ці захворювання пов'язані з втратою білками певних властивостей (що відповідно впливає на підвищення помилок в ідентифікації, сигналіngu в клітині й зниження здатності до зв'язування з потрібними лігандами), а також утворенням і накопиченням нерозчинних білкових агрегатів, фібрилярних структур або амілоїдних фібрил [136]. З іншого боку, білкові молекули можуть утримувати аморфні агрегати, які складаються з суміші розчинних мономерів, організованих у формі динамічних крос- β -структур, вони можуть проявляти властивості рідини або утримувати гелеподібні комплекси. Стан гідрогелю дуже важливий для утворення різних немембранних структур, таких як стрес-гранули, рибонуклеїнові комплекси тощо [135].

1.4.2 Амілоїдна агрегація. Властивості білкових молекул утворювати амілоїдні структури використовуються також для різних специфічних цілей. У склад деяких білків входять прионоподібні домени, які наділяють білок додатковими властивостями, у тому числі, здатністю до самозбирання [137]. Білки з прионоподібними ділянками можуть, з одного боку, виконувати корисні функції,

наприклад, активувати клітинний імунітет (білок MAVS), забезпечувати довготривалу пам'ять (білок CREB) [138-140], з іншого – створювати стрес-гранули під час дії несприятливих умов для клітини [141]. Таким чином, структура білків у процесі функціонування знаходиться у динамічній рівновазі між різними конформаційними станами, що потрібно для реалізації їх властивостей.

1.4.2.1 Механізм амілоїдної фібрилізації білків. Зміна конформації білку, яка веде до утворення патологічних нерозчинних агрегатів, інтенсивно досліджується на предмет визначення способів і засобів впливу на нього для запобігання та інгібування агрегації. Утворення амілоїдних фібрил включає три стадії (рис. 1.10), ключовим моментом є процес нуклеації. Спочатку, протягом першої стадії (лаг-період) молекула білку розплітається до частково розплетеного інтермедіату, а потім до розтопленої глобули, яка злипається в олігомери. У кінці цього періоду виникають зародки майбутніх фібрил. Далі, на другому етапі (елонгація) відбувається зростання фібрилярних зародків до зрілих фібрил.

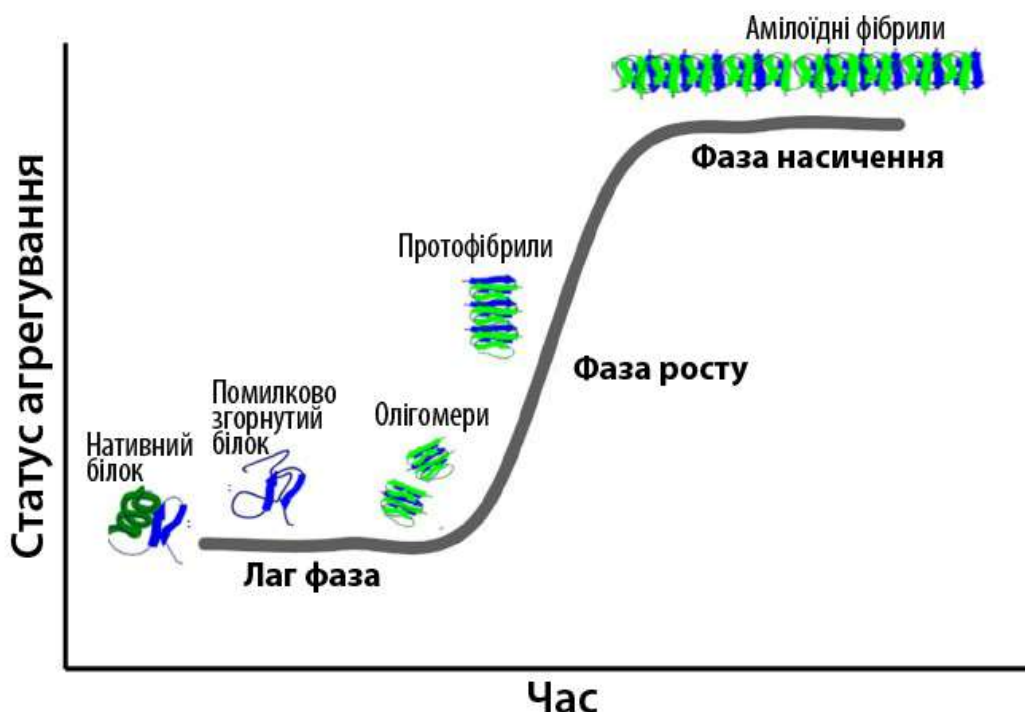


Рис. 1.10. Схематичне зображення процесу утворення амілоїдних фібрил

Також β -структуровані олігомери можуть перетворюватися на не-фібрилярні β -структуровані асоціати або на великі аморфні агрегати, які потім можуть структурно реорганізуватися до фібрил. Третій етап, стадія насичення, полягає у перетворенні всіх розчинних частинок на зрілі фібрили за допомогою латеральної асоціації [136]. Властивості процесу, такі як тривалість фібрилізації, характеристики фаз, структура отриманих фібрил варіюються у залежності від природи білку та умов процесу [109, 142, 143].

У процесі конформаційних перетворень білки чутливі до окислювачів, змін концентрації, іонного оточення, варіювання рН середовища, температури, макромолекул – факторів, зміна яких може привести до самоасоціації білкових молекул [50, 51, 144]. Раніше було досліджено вплив іонних рідин на конформаційну [145] і функціональну [146] стабільність нативних білків. Дія іонів на фібрилоутворення білків залежить від їх природи, заряду і концентрації [147].

1.4.3 Клінічна значимість кількісного аналізу і аналізу конформаційних змін альбуміну. Було показано, що зміни концентрації і просторової структури сироваткових альбумінів можуть грати роль маркерів при ряді захворювань: глікозилювання при діабеті [148 - 150], окислювання при хворобах печінки [151], N-кінцеве модифікування при ішемії/реперфузії [152], аллостеричні модифікації пухлинними метаболітами при онкологічних захворюваннях, тощо [60].

Отже, розроблені методи для відображення структурних і функціональних змін білку дозволяють аналізувати кількісні та якісні зміни альбуміну в організмі при ряді фізіологічних і патологічних станів. Наприклад, було показано, що зв'язування дансилсаркозин, специфічного маркеру сайту II, значно зменшується у пацієнтів з захворюванням нирок, ступінь зменшення зворотно корелює з залишковою функцією нирок [60]. Таким чином, актуальним для біомедичних потреб є створення молекул, здатних специфічно зв'язуватися з сироватковими альбумінами і відображати їх структурні особливості.

Для визначення конформаційних змін білку як правило використовують різноманітні методи, серед яких найбільш поширені спектроскопічні. Дослідження конформації здійснюють як через вторинну структуру білку, так і опосередковано через ліганди, які змінюють власні спектроскопічні характеристики при зв'язуванні [153, 154]. Наприклад, флуоресцентні зонди підсилюють інтенсивність власного емісійного сигналу (флуорогенні барвники) або змінюють власний колір (сольватохромні барвники) при зв'язуванні зі специфічною ділянкою біомакромолекули. Вони застосовуються для визначення таких загальних параметрів мікрооточення сайту зв'язування біооб'єктів, як полярність (гідрофільність/гідрофобність), в'язкість, ступінь гідратації, електростатичні характеристики [155]. Таким чином, у випадку конформаційних змін білку, такі барвники будуть придатні тільки у випадках змін зазначених параметрів [153]. Наприклад, чутливий до гідрофобних ділянок флуоресцентний барвник ANS (8-Анілінонафталін-1-сульфонова кислота) використовується для моніторингу конформаційних змін білку під час агрегації і для визначення конформаційних змін у домені III БСА при денатурації альбуміну [156, 157]. Проте, для коректності таких досліджень необхідні зміни характеристик сайту зв'язування білку: було показано, що ANS також має чутливість до олігомерів і префібрилярних агрегатів білків, тому що обидва мають гідрофобні ділянки у структурі [158].

Вивчається також придатність сполук, які беруть участь у супрамолекулярних взаємодіях білок-ліганд, до відстежування конформаційних змін білку [159]. Для цього потрібно, щоб при зв'язуванні з білком у ліганда з'являвся певний сигнал, який змінює власні параметри при конформаційних змінах білку. За рахунок відносно великого розміру лігандів і багатоточковості взаємодії, за допомогою таких репортерних молекул потенційно можливе більш детальне вивчення змін білку.

1.5 Методи дослідження взаємодій білок-ліганд

1.5.1 Дослідження взаємодій білок-ліганд методом гасіння флуоресценції білків. Флуоресценція білків і поліпептидів спричинена наявністю ароматичних амінокислотних залишків триптофану (Трп), тирозину (Тир) і фенілаланіну (Фен) [160]. При збудженні флуоресценції на довжині хвилі 280 нм відбувається випромінювання флуоресценції, в основному, Тир і Трп, а при 295 нм – лише Трп амінокислотних залишків. Було показано, що найбільш значний вклад у флуоресцентний сигнал вносять Трп залишки, чия флуоресценція зумовлена випромінюванням індольних кілець.

Це відбувається за рахунок переносу енергії від Тир до Трп амінокислотних залишків у молекулі білку, також гасінням флуоресценції Тир близько розташованими карбоксильними або незарядженими аміногрупами. Триптофан – чутливий до оточення флуорофор, тобто наявність гасників, зміна полярності оточення, реакції асоціювання, впливають на його флуоресценцію і, відповідно, на спектри білків. Таким чином, при наявності у білках флуоресцентних амінокислотних залишків методом флуоресцентної спектроскопії можливо вивчати взаємодії між білком і лігандом, у тому випадку коли ліганд певним чином на них впливає.

Одним з методів для визначення взаємодій між білком і лігандом є метод гасіння власної флуоресценції білку. Гасіння люмінесценції (флуоресценції, чи фосфоресценції) – це процес, який веде до зменшення інтенсивності люмінесцентного сигналу. Зменшення люмінесцентного сигналу може бути спричинено наступними обставинами: (1) перенос енергії при зіткненні люмінофора і гасника, (2) утворення комплексів між люмінофором у незбудженому стані і лігандом, (3) реакції люмінофору у збудженому стані, (4) утворення комплексів з переносом енергії.

Існує два основних механізми гасіння флуоресценції: статичний і динамічний.

До статичного гасіння відносять усі процеси, в яких зменшення квантового виходу люмінесценції не супроводжуються зменшенням середньої тривалості життя збудженого стану. Окремим випадком статичного гасіння є концентраційне гасіння, яке пов'язане з утворенням нефлуоресціюючих димерів і великих асоціатів молекул за високої концентрації флуоресціюючої сполуки.

До динамічного гасіння відносять процеси, в яких зменшення квантового виходу люмінесценції спричинено впливом на збуджений стан молекули люмінофору протягом часу, сумірного з часом життя збудженого стану. Таким чином, відбувається безвипромінювальна дезактивація збуджених молекул внаслідок передачі енергії від збуджених молекул до незбуджених, або через хімічні реакції за участю збуджених молекул, або завдяки переходу енергії збудження в енергію коливання ядер [161].

1.5.2 Метод кругового дихроїзму. Метод кругового дихроїзму (КД) оснований на різній ступені поглинання право- і лівополяризованого світла розчинами оптично активних сполук. Тому необхідними умовами для виникнення КД спектру є наявність асиметрії (хіральності) і хромофорної компоненти у сполуки або комплексу [162]. Різниця між поглинанням право- і лівополяризованого світла змінюється в межах смуги поглинання хромофору в залежності від довжини хвилі і може приймати як позитивні, так і негативні значення. Найбільші значення ця величина приймає близько до максимуму поглинання хромофору [163].

1.5.2.1 Аналіз вторинної структури білків. Метод кругового дихроїзму широко використовується для ідентифікації і кількісного визначення вторинної структури білків і пептидів у розчині (при доступних даних кристалічної структури білку) [164]. Основні переваги КД у порівнянні зі спектроскопією ядерного магнітного резонансу і рентгено-структурним аналізом – можливість проведення вимірювання на малих об'ємах у необхідному розчиннику та можливість

моніторингу структурних змін у розчині білку в залежності від змін оточення (рН середовища, температури, іонної сили та інших) [165]. Спектри КД у дальній УФ області (170-250 нм) білків переважно базуються на наявності електронних переходів у амідних групах білку. Форма спектральних смуг залежить від геометрії поліпептидного ланцюга і, відповідно, відображає різні типи вторинної структури білку або поліпептиду [164]. Таким чином, білки з перевагою канонічних α -спіральних ділянок, β -складчастих листів або β -поворотів мають специфічні КД-спектри (рис. 1.11) [166, 167]. Білкові структури, які не відповідають жодному з вказаних типів, описані як «інші» [166].

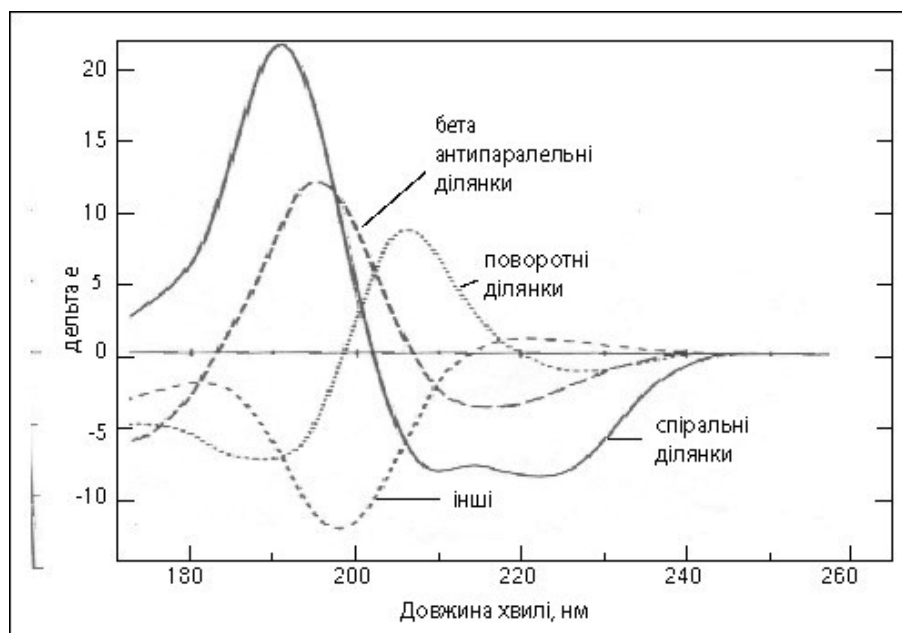


Рис. 1.11. Спектри кругового дихроїзму поліпептидів з переважанням канонічних α -спіральних, β -складчастих листів, β -поворотів і інших у чистому вигляді. Адаптовано з [168]

Було показано, що КД-спектри β -структурованих білків можуть сильно відрізнятися, що визначається довжиною, ступенем, напрямком і кутом перекручування послідовності, а також орієнтуванням сусідніх β -структурованих ділянок, тобто паралельною або непаралельною структурою [169]. Розрахунок

співвідношення типів ділянок у білку або поліпептиді відбувається за допомогою розрахунку за різними математичними алгоритмами [162].

1.5.2.2 КД-спектроскопія у супрамолекулярних системах. У супрамолекулярних системах виникнення КД-сигналу можливе у наступних випадках [162]:

1) При взаємодії хірального «гостя» і ахіральної сполуки з хромофорною частиною у якості «господаря». Наприклад, краун-етери, каліксарени, біс-порфіринові системи можуть формувати хіральні комплекси «господар-гість», які дають КД-смуги в області абсорбційних смуг «господаря».

2) Навпаки, при взаємодії ахіральних молекул «гостя» з хромофорною частиною з хіральними біополімерами, такими як білки, поліпептиди, олігонуклеотиди, олігосахариди (у тому числі циклодекстрини).

3) При з'єднанні декількох молекул хромофору на макромолекулі «господаря» з формуванням супрамолекулярної хіральності за рахунок з'єднання екситону;

4) При зв'язуванні хіральних лігандів з металом і таким чином активації f- або d- переходів у абсорбційних спектрах;

У деяких випадках метод КД дозволяє не лише визначати факт взаємодії, а також аналізувати механізм зв'язування, кінетику і термодинаміку зв'язування [162]. Специфічні індуковані КД (ІКД) смуги чутливі до будови сайту біомолекули, з якою вони зв'язуються, отже потенційно мають відображати структурні особливості білків в спектрах КД і таким чином бути зручним інструментом для дослідження структури білків [159].

Раніше ряд органічних і металокомплексних сполук були описані як ІКД-репортери, які індукують ІКД-відгук при взаємодії з біомолекулами (білками, ДНК). Цей ІКД-відгук є чутливим до структурних змін білку [170, 171]. Найбільш інтенсивні характеристичні КД сигнали описані [172] для сполук, які переходять до стану різних хіральних ізомерів (через швидку реорганізацію структури каркасу

молекули) після зв'язування з біомолекулами. Зокрема, металопорфірини описані як КД-сенсори елементів вторинної структури ДНК [173], а також як стереохімічні репортери чутливі до різних хіральных субстратів і пептидів [174 - 179]. Також серед КД-репортерів описано похідне аденозину, чутливе до гідрофобної порожнини БСА [180] та білірубін, який здатний відображати за допомогою КД-спектрів конформаційні зміни ЛСА [181]. Діазепам і дансилгліцин описані [162, 182] як сайт-специфічні ліганди для сайту зв'язування 2 альбуміну. Цис-парінарова і ретиноєва кислоти досліджувались [162, 183] як ліганди до гідрофобної порожнини β -лактоглобуліну. Похідне порфірину кобальту було запропоноване [184] як хірооптичний зонд для дослідження певних глобулярних білків, серед яких альбумін, лізоцим та інсулін. Відомий органічний барвник Конго червоний використовували [185] для моніторингу структурних змін макромолекули альбуміну і детектування утворення амілоїдних агрегатів за допомогою ІКД.

Раніше було показано, що сироваткові альбуміни стереоселективно зв'язують хіральні молекули з рацемату [186, 187]. Таким чином, кожен з енантіомерів має різні властивості ADME (аббревіатура для абсорбції, розподілу, метаболізму і екскреції).

Основна перевага використання для аналізу КД-репортерів у тому, що вони здатні індукувати специфічний КД-відгук (за інтенсивністю, довжинами хвиль піків і формою спектру) у присутності певного оточення сайту зв'язування біомакромолекули.

1.5.3 Ізотермічна калориметрія титрування. Ізотермічна калориметрія титрування (ІТК) широко використовується для дослідження супрамолекулярної взаємодії. При ІТК-експерименті відбувається титрування розчину біомакромолекули розчином ліганду при постійній температурі для отримання теплового ефекту реакції. При цьому загальна концентрація ліганду є незалежною змінною [188]. У випадках біосистем досліджують зв'язування таких біомакромолекул, як білки, ДНК, РНК, ліпіди та інші органічні макромолекули [189]

- 191]. За допомогою цього методу можливо визначити константи зв'язування, K , і стехіометрію комплексу, n , а також термодинамічні характеристики зв'язування (ентальпію ΔH , ентропію ΔS , енергію Гіббса ΔG). При цьому створюється повний термодинамічний профіль реакції. Отримані дані не лише визначають спорідненість до зв'язування, але й дозволяють зробити висновки щодо природи сил (гідрофобний характер зв'язку, сили Ван дер Ваальса, водневі зв'язки, електростатичні взаємодії), що сприяють утворенню комплексу між двома молекулами, та щодо специфічності взаємодії [192]. Термодинамічний аналіз отриманого теплового ефекту дозволяє характеризувати енергетичні процеси, які асоційовані зі зв'язуванням. Проте ІТК надає інформацію не лише про взаємодію біомакромолекула-ліганд [188, 194], але й щодо денатурації білків, аллостеричних переходів і інгібування ензимів, зв'язування субстрату з системою ензим-ліганд [188, 195].

Переваги методу:

- Дослідження можна адаптувати до умов певної біосистеми (підбирання буферу, температури дослідження, швидкості перемішування) [196].
- За один експеримент можна визначити всі термодинамічні параметри зв'язування.
- Метод неструктивний, він вивчає спорідненість зв'язування молекул у системі в нативному стані.
- Метод є швидким, експеримент триває приблизно 1-3 години [197].

Недоліки методу:

- Для точного визначення параметрів реакції необхідно використовувати відносно високі концентрації речовин (мінімально значимий тепловий ефект - вище 10 μ кал) [198]. Якщо це не співпадає з концентраціями системи у нативних умовах, отримані термодинамічні характеристики у цих двох випадках можуть відрізнятися.

- При вивченні систем білок-ліганд, обидві сполуки повинні повністю розчинятися у необхідних концентраціях [199]. Звичайно білки мають низьку розчинність у водному середовищі, тому не всі системи можливо дослідити.

- Треба враховувати тепловий ефект буферного розчину. Небажано використовувати буферні розчини з високим тепловим ефектом, буфер не повинен взаємодіяти з компонентами системи [197, 198].

- Іноді сполуки, які не розчиняються у водному розчині, необхідно розчинити у ДМСО, що може призвести до додаткового теплового ефекту [199].

- Обидва розчини (білку і ліганду) повинні бути з однаковими параметрами: рН, буфер, іонна сила та інше, інакше можливе виникнення додаткових теплових ефектів [200].

Для комплексів «гість-господар» величина константи зв'язування визначає силу молекулярного розпізнавання і, відповідно, зумовлює селективність зв'язування. Зв'язування з білками плазми крові досліджується для визначення розподілу препарату в організмі і, внаслідок цього, його ефективності. Крім того, інтенсивність зв'язування з альбумінами впливає на виведення сполуки з організму, фармакокінетику і фармакодинаміку, допомагає обрати клінічні дози і визначити межі безпеки. Типові константи зв'язування для альбумінів з різними лігандами – становлять близько $10^{4.6 \pm 0.9} \text{ M}^{-1}$ [201].

1.5.4 Замісне титрування. Для визначення сайту зв'язування і спорідненості лігандів до білку використовується метод замісного титрування, за допомогою ЯМР, флуоресцентної спектроскопії та інших [202]. Суть методу полягає у проведенні конкурентного титрування зі стандартними молекулами для певних сайтів зв'язування у білку [186]. Ці сайт-специфічні ліганди повинні мати високу спорідненість до сайту зв'язування білку, щоб витіснити ліганд з його комплексу з білком [204]. При переформуванні комплексу білок-досліджувана сполука на білок-

референтний ліганд відбуваються зміни, які відображаються у сигналі і фіксуються обраним методом [202].

1.6 Флуоресцентні зонди

Використання флуоресцентних молекул у біологічних дослідженнях є стандартним методом – від аналітичного визначення до оптичної візуалізації, їх використання постійно зростає завдяки універсальності, чутливості і можливості проводити кількісні виміри [205, 206]. Флуоресцентним зондом є сполука, яка змінює один з власних параметрів (наприклад, інтенсивність сигналу, час життя збудженого стану, максимуми збудження або емісії) при зв'язуванні з мішенню.

Флуоресцентні зонди реагують на певну молекулу, іон або органелу клітини. Широко розповсюджені зонди на нуклеїнові кислоти для різних біомедичних цілей від рутинних експериментів типу гель-електрофорезу до візуалізації клітинних органел [207]. Серед флуоресцентних зондів на іони, найбільш розповсюджені зонди на катіони Ca^{2+} . Ca^{2+} бере участь у багатьох різних фізіологічних функціях: від роботи нейротрансмітерів до сигналіngu при згортанні крові [206]. Проте, флуоресцентні зонди можуть бути чутливими до змін фізичних параметрів середовища, наприклад, температури, рН, в'язкості (молекулярні ротори), полярності (сольватохромні барвники), гідрофобності/гідрофільності. Сольватохромні барвники використовують як для контролю складу середовища при проведенні реакції, так і в біологічних мембранах для вивчення апоптозу та ендоцитозу [208]; чутливі до гідрофобного оточення – для моніторингу білок-білкових взаємодій [209].

Стабільність, специфічність до певного об'єкту досліджень, різкі зміни інтенсивності флуоресценції при взаємодії, низка токсичність, низька межа визначення, необхідний специфічний діапазон довжин хвиль є найбільш важливими властивостями флуоресцентних зондів.

У біології флуоресцентні зонди часто використовуються для детекції та дослідження нуклеїнових кислот (ціаніни) [210, 211], білків (ANS, Bis-ANS, Конго червоний, DCVJ, Тіофлавін Т) [209], їх конформаційних переходів (ANS, Bis-ANS) [156, 157] і їх агрегації (Тіофлавін Т) [209].

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Використані матеріали

У роботі були використані: бичачий β -лактоглобулін, яєчний лізоцим, людський інсулін, бичачий і людський альбумін, імуноглобулін G з людської сироватки, дЛДНК (сім'яник лосося), ціла дріжджова РНК, TRIS(трис-гідроксиметил-аміно-метан)-HCl, додецилсульфат натрію (ДСН), МТТ барвник виробництва «Sigma-Aldrich» (США). HL-60 клітини виробництва Gibco. Соляна кислота, оцтова кислота, дигідрофосфат калію, гідрофосфат натрію, гідроксид натрію, ДМСО (диметилсульфоксид) вітчизняного виробництва. Триметинові ціанінові барвники і стирилціанінові барвники, що досліджувались, люб'язно надані к.х.н., Д. В. Криворотенко, Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ. Амілоїд-чутливий ціаніновий барвник 7519 люб'язно наданий Інститутом органічної хімії НАНУ. Чистота всіх досліджуваних сполук була >95%.

2.2 Приготування стокових розчинів

Стоковий розчин мономерного білку для фібрилоутворення готували розчиняючи наважку у HCl; наважку яєчного лізоциму розчиняли у 0,01 М HCl, людський інсулін – у 0,1 М HCl. Концентрація лізоциму та інсуліну в стокових розчинах становила 14,3 г/л (986 μ M) і 2 г/л (340 μ M) відповідно. Концентрація фібрилярних протеїнів у стокових розчинах дорівнювала концентрації відповідних стокових розчинів мономерних білків.

Стоковий розчин білків для флуоресцентної спектроскопії (БСА і ЛСА, яєчного лізоциму, БЛГ, імуноглобуліну G) готували, розчиняючи наважку у 0,05 М TRIS-HCl буфері (pH 7,9), концентрація білків становила 0.2 г/л.

Стокові розчини білків для ізотермічної калориметрії титрування (БСА і ЛСА) готували, розчиняючи наважку у 0.15 М ацетату натрію, концентрація білків становила 0.5 мМ.

Стокові розчини барвників готували, розчиняючи наважку барвників до концентрації 2 мМ у ДМСО. Стокові розчини дЛДНК і РНК готували, розчиняючи відповідну нуклеїнову кислоту (НК) у буфері TRIS-HCl (50 мМ, pH 7.9) до концентрації 6.15 мМ пар основ для дЛДНК і 24.6 мМ основ для РНК.

В основному, усі виміри проводили у 50 мМ буфері TRIS-HCl (pH 7.9), якщо не вказано інше.

Буферний розчин з pH 3.7 готували за допомогою оцтової кислоти і гідроксиду натрію, C = 50 мМ. Буферні розчини з pH 5.0, 6.0, 7.0 готували за допомогою дигідрофосфату калію і гідрофосфату натрію, C = 50 мМ.

2.3 Приготування робочих розчинів

Бензотіазольні триметинові ціанінові барвники. Робочі розчини вільних барвників були отримані розведенням стокових розчинів буфером TRIS-HCl (pH 7.9) до концентрації 2 μ М. Робочі розчини барвнику з амілоїдними фібрилами були приготовані змішуванням аліквоти барвнику і аліквоти стокового розчину фібрил інсуліну або лізоциму у 50 мМ TRIS-HCl буфері (pH 7.9) до кінцевих концентрацій фібрил інсуліну – 3,4 μ М і фібрил лізоциму – 10 μ М.

Бензотіазольні стирилціанінові барвники. Робочі розчини вільних барвників були отримані розведенням стокових розчинів буфером TRIS-HCl (pH 7.9) до концентрації 2 μ М. Робочі розчини барвнику з НК були приготовані змішуванням аліквоти барвнику і аліквоти стокового розчину ДНК/РНК у 50 мМ TRIS-HCl

буфері (рН 7.9) до кінцевих концентрацій длДНК – 61.5 μM пар основ і РНК – 246 μM основ, відповідно.

2.4 Спектральні методи

Спектри абсорбції реєстрували на спектрофотометрі Specord M-40 (Німеччина), який має дві дифракційні ґратки по 1302 штрих/мм. Спектральний діапазон приладу становив 185-900 нм. Похибка визначення довжини хвилі при 185 нм була 0,03 нм, а при 900 нм — 0,1 нм. Точність вимірювання оптичної густини дорівнювала 0,005. Роздільна здатність приладу становила 0,06 нм при 250 нм та 0,12 нм при 500 нм. Виміри проводили в кварцових кюветах (1 см \times 1 см).

Для реєстрації спектрів флуоресценції та збудження флуоресценції використовували спектрофлуориметр «Cary Eclipse» (Varian, Австралія). Усі виміри проводились у кварцовій кюветі (1 см \times 1 см). Для збудження флуоресценції використовували випромінювання ксенонової лампи (150 Вт). Похибка визначення довжини хвилі флуоресценції та збудження флуоресценції становила 1 нм.

Спектри загасання флуоресценції білків отримували на модульному спектрофлуориметрі Fluorolog 3 (Horiba Jobin Yvon).

Спектри кругового дихроїзму реєстрували на спектрополяриметрі Jasco – J-715 (вивчення зв'язування ряду глобулярних білків з лігандами) або Jasco 815 CD (вплив *клозо*-боратів на вторинну структуру білків). Дані отримували в одиницях еліптичності (мґрад) безпосередню з приладу. Всі виміри проводили при кімнатної температурі.

2.4.1 Вивчення гасіння власної люмінесценції білка лігандами. Для вивчення гасіння люмінесценції білків лігандами (*клозо*-боратами або клатрохелатами) були отримані спектри флуоресценції білка, що досліджували, без і з лігандами (у різних концентраціях). Для приготування робочих розчинів аліквоти стокових розчинів відповідних лігандів у концентраціях 0 – 50 μM (у залежності від

експерименту) додавали до стокового розчину білку (0.2 г/л) у буфері (50 мМ TRIS-HCl, рН 7.9, якщо не вказано інше). Довжина хвилі збудження, $\lambda_{зб}$, становила 280 нм (збудження як триптофанових так і тирозинових амінокислотних залишків) або 295 нм (збудження тільки триптофанових амінокислотних залишків). Інтенсивність люмінесцентного сигналу вважали рівною значенню на довжині хвилі максимуму емісії (λ_{max}).

2.4.2 Корекція ефекту внутрішнього фільтру і реабсорбції. Додавання лігандів (клатрохелатів і декількох *клозо*-боратів) значно підвищує оптичну густина розчинів на довжині хвилі збудження білку, що приводить до зменшення інтенсивності флуоресценції за «ефектом внутрішнього фільтру» (ЕВФ) [212]. В випадку клатрохелатів і високих концентрації *клозо*-боратів ($[B_{12}I_{12}]^{2-}$), поглинання є також на довжині хвилі емісії білку, і сприяє реабсорбції флуоресцентного випромінювання [107]. Щоб запобігти помилок, спричинених явищами ЕВФ та реабсорбції, інтенсивність флуоресцентного сигналу коректували за допомогою рівняння (2)[212, 213]:

$$I_{кор} = I_{сп} \times 10^{(D_{зб} + D_{ем})/2} \quad (2.1),$$

де $I_{кор}$ і $I_{сп}$ – інтенсивності корегованого і спостережуваного флуоресцентного сигналу, відповідно; $D_{зб}$ і $D_{ем}$ – значення оптичної густини ліганду за довжинами хвиль збудження та емісії, відповідно.

2.4.3 Вивчення часу життя збудженого стану люмінесценції альбумінів у присутності лігандів. Збудження флуоресцентного сигналу здійснювали з допомогою імпульсного джерела NanoLED з імпульсом тривалістю 40 пс на довжині хвилі збудження - 293 нм, випромінювання реєстрували на довжині хвилі 350 нм; отримані криві загасання аналізували за допомогою програми DAS6 v.6.4. Концентрації стокових та робочих розчинів були такими ж як в експерименті по гасінню власної флуоресценції білку. Апроксимація двома експонентами давала значення χ^2 (параметр якості апроксимування) від 1.08 до 1.25, криві були близькі до отриманих експериментально. З іншого боку, апроксимація однією експонентою

призводить до значних відхилень від експериментальної кривої, а трьох-експоненційна апроксимація не покращує ні значення χ^2 , ні якість апроксимації. Тому для аналізу отриманих даних було використано двох-експоненційна апроксимація. Для того, щоб характеризувати кожну криву загасання, було розраховано середній час загасання $\tau_{\text{ср}}$, виходячи з наступного рівняння:

$$\tau_{\text{ср}} = (A_1 \times \tau_1 + A_2 \times \tau_2) / 100 \quad (2.2),$$

де τ_1 і τ_2 – часи життя компонентів апроксимованих кривих загасання; A_1 і A_2 – відповідні відносні амплітуди. У даній роботі представлено лише значення $\tau_{\text{ср}}$ (табл. 3.1).

2.4.4 Визначення констант зв'язування при взаємодії альбумінів з клозо-боратами. Для визначення констант зв'язування альбумінів (БСА і ЛСА) з клозо-боратами використовували криві Штерна-Фольмера (дані, що отримані при $\lambda_{\text{сб}} = 295$ нм). Титрування білку клозо-боратами виконували тричі для кожного ліганду. Графіки Штерна-Фольмера були побудовані для середніх значень з стандартним відхиленням від нього. Апроксимування було проведено при допущенні, що: 1) білки формують комплекс з клозо-боратами з стехіометрією 1:1 і 2) концентрація гаснику більше 10 μM , тому кількість незв'язаного клозо-борату у грубому наближенні дорівнює його загальній концентрації. Позначимо інтенсивність флуоресценції незв'язаного білка як I_0 , а цілком зв'язаного з клозо-боратом – як I_{min} . Тоді, якщо позначить інтенсивність флуоресценції білка у присутності клозо-борату концентрації $C_{\text{ліг}}$ як I , у координатах Штерна-Фольмера отримуємо:

$$I_0/I = (1 + K \times C_{\text{ліг}}) / (1 + A \times K \times C_{\text{ліг}}) \quad (2.3),$$

де K – константа зв'язування, $A = I_{\text{min}}/I_0$, мінімальна залишкова відносна флуоресценція, що протилежна максимальній ступені гасіння, відповідно. Таким чином, крива Штерна-Фольмера (залежність I_0/I від $C_{\text{ліг}}$) була апроксимована з допомогою рівняння (2.3), від цієї апроксимації були отримані параметри A і K . Значення констант зв'язування отримані приблизно у зв'язку з кількома припущеннями.

2.4.5 Спектри поглинання. Для вирахування ефекту внутрішнього фільтру спектри поглинання розчинів лігандів (клатрохелатів чи *клозо*-боратів) були зареєстровані. Для приготування робочих розчинів аліквоти стокових розчинів відповідних лігандів розчиняли у TRIS-HCl буфері (pH 7,9), концентрації дорівнювали таким, як у флуоресцентному дослідженню.

2.4.6 Вивчення зв'язування глобулярних білків з клатрохелатами методом спектроскопії кругового дихроїзму. Спектри КД реєстрували у діапазоні 300 – 600 нм. Для експериментів використовували TRIS-HCl буфер (pH 7.55), співвідношення БСА – клатрохелат становило 2:1 ($C_{\text{БСА}} = 8 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{\text{клт}} = 4 \cdot 10^{-5}$ М). Концентрації ібупрофену і варфарину при замісному титруванні були у 50 разів вище концентрації клатрохелату, що становило 2×10^{-3} М.

2.4.7 Вивчення змін вторинної структури БСА при зв'язуванні з *клозо*-боратами. Спектри КД реєстрували у діапазоні 200 - 300 нм. Для приготування робочих розчинів аліквоти стокових розчинів *клозо*-боратів додавали до стокового розчину БСА ($C_{\text{БСА}} = 0.1$ г/л, TRIS -HCl буфер, pH 7,9) до концентрації *клозо*-борату 5, 10 і 20 μM .

Для того, щоб оцінити можливі зміни вмісту α -спіральних ділянок у БСА після додавання *клозо*-боратів, результати КД були виражені як середня еліптичність на залишок (mean residue ellipticity, MRE) у град*см²*дмоль⁻¹, відповідно наступного рівняння:

$$MRE = \frac{\text{отр КД (мград)}}{C_6 \times n \times l \times 10} \quad (2.4);$$

Де C_6 – молярна концентрація білку, n – кількість амінокислотних залишків у білку, l – ширина кювети. Потім, вміст α -спіральних ділянок БСА у вільному стані і у присутності *клозо*-боратів було розраховано з MRE при 222 нм відповідно наступного рівняння [214]:

$$\alpha - \text{спіраль, \%} = \frac{MRE - 2340}{30300} \times 100 \quad (2.5).$$

2.4.8 Вивчення вторинної структури інсуліну протягом процесу фібрилоутворення в присутності і у відсутності *клозо-борату В-6* за допомогою методу кругового дихроїзму. Спектри КД реєстрували у діапазоні 200 - 270 нм. Кожний експеримент було проведено двічі. Базова смуга була скоригована відніманням спектру буферу. Для приготування робочих розчинів аліквоти стокового розчину інсуліну під час термоінкубації (після 0; 60-70 і 150 хвилин інкубації) з і без В-6, а також чисті розчини В-6 додавали до TRIS-HCl буферу (0,05 М, рН 7.9). Концентрація інсуліну у робочих розчинах складала 4.25 μM , співвідношення інсулін-*клозо-борат* 34:1 і 3,4:1 (що відповідало 10 і 100 μM концентраціям В-6 в розчинах термоінкубованого інсуліну).

2.5 Отримання характеристик комплексоутворення альбумінів з лігандами методом ізотермічної калориметрії титрування

Експеримент було зроблено за допомогою приладу Nano ITC calorimeter (TA Instruments) у стандартній кюветі об'ємом 0,95 мл, при температурі 25 °С. До стокового розчину БСА (0.5 мМ) в водному розчині ацетату натрію були додані аліквоти розчинів лігандів (10 мМ для *клозо-боратів* або 5 мМ для клатрохелатів) за допомогою 250 $\mu\text{л}$ шприцу. Було отримано стехіометрію від 0 до 5.8 або від 0 до 3 молекул ліганду (*клозо-борату* або клатрохелату відповідно) на молекулу білка. Розчин ацетату натрію було обрано завдяки низькому додатковому тепловому ефекту. Рівень гасіння власної люмінесценції альбуміну *клозо-боратами* у розчині ацетату натрію і TRIS-HCl буфері не відрізнявся. Калориметр керувався програмою Nano ITC Run software v. 2.2.3, дані аналізовано програмами NanoAnalyze v. 2.4.1 і v. 3.5.0.

2.6 Отримання фібрилярних білків

2.6.1 Отримання фібрилярного інсуліну. Стоковий розчин мономерного інсуліну (концентрація білку 340 μM) у 0,1 М НСІ (рН 2) інкубували при 65°C у водяній бані в одноразових поліпропіленових пробірках на 1500 $\mu\text{л}$ (типу «Епендорф»). Загальний об'єм реакційної суміші у кожній пробірці був 300 $\mu\text{л}$.

Через 0; 90; 150; 240; 300 хвилин інкубації від реакційної суміші відбирали аліквоти (10 $\mu\text{л}$), що додавалися до 2 μM розчину амілоїд-специфічного барвнику 7519 [215,216] (або до бензотіазольних триметинових ціанінових барвників, що нами досліджувались) та вимірювали інтенсивність емісії барвнику в присутності протеїну при довжині хвилі збудження 580 нм (або при інших довжинах хвиль для барвників, що досліджувались). За допомогою цих даних побудували графіки кінетики фібрилоутворення (залежності інтенсивності флуоресценції барвника від часу інкубації білку). Процес фібрилоутворення вважався завершеним, коли зі збільшенням часу інкубації інтенсивність флуоресценції барвника не збільшувалася (300 хвилин). Наявність фібрил було підтверджено методом трансмісійної електронної мікроскопії.

Для вивчення фібрилізації інсуліну під дією *клозо*-борату В-6, аліквоти його стокового розчину додавали до інсуліну перед інкубацією, кінцеві концентрації В-6 були 10, 50 і 100 μM .

2.6.2 Отримання фібрилярного лізоциму. Розчин яєчного лізоциму (концентрація білку 14,5 мг/мл або 1 мМ) у 0,1 М НСІ інкубували при 65°C при постійному перемішуванні в одноразових поліпропіленових пробірках на 1500 $\mu\text{л}$ (типу «Епендорф»). Загальний об'єм реакційної суміші у кожній пробірці – 500 $\mu\text{л}$. Кожну реакцію амілоїдної агрегації здійснювали в декількох повтореннях. Процес фібрилоутворення вважався завершеним через 24 години. Морфологію амілоїдних агрегатів було підтверджено методом атомно-силової мікроскопії.

2.7 Дослідження флуоресцентних барвників

Усі вимірювання зроблено відповідно довжин хвиль максимумів збудження кожного барвника. Кожне вимірювання проводили три рази. Значення квантових виходів (ϕ) для певних барвників (у присутності фібрил або ДНК, відповідно завдання) визначені за допомогою розчину барвнику Родамін 6G в етиловому спирті, в якості референтної речовини, $\phi = 0.95$ [217].

2.8 Трансмісійна електрона мікроскопія

Зображення фібрил були отримані з використанням трансмісійного електронного мікроскопу, експеримент зроблено у центрі колективного використання Інституту Вірусології і Мікробіології ім. Д.К. Заболотного НАНУ.

Для трансмісійної електронної мікроскопії аліквоти розчинів інсуліну після фібрилоутворення без і з *клозо*-боратом були розведені у 15 разів дистильованою водою, адгезовані на покриття за допомогою Formvar мідну решітку і позитивно забарвлені розчином ураніл ацетату (5%) протягом 5 хвилин. Потім зразки мили тричі дистильованою водою і сушили на повітрі. Забарвлені решітки вивчали на електронному мікроскопі JEM-1400 (JEOL, Японія) при 80 кВ. Довжина та діаметр фібрил інсуліну були отримані програмою ImageJ.

2.9 Гель-електрофорез

Дослідження гель-електрофорезу проводили за допомогою лінійки «GeneRuler DNA 50bp DNA Ladder» (Fermentas # SM0371) у 2.5 % гелі агарози у 40 мМ буфері TAE, рН 8.4 [218]. Забарвлювання гелю було проведено у розчині барвнику у 50 мМ TRIS-HCl буфері, рН 7.9 протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, у темному приміщенні. Стоковий розчин бромистого етидію ($C = 25$

мМ) був розведений у 2000 разів. Концентрація інших барвників була 5 μ М. Концентрацію ДНК і розміри представлено у таблиці 2.1. Забарвлений агарозний гель аналізували під дією UV просвічування (λ max = 312 nm, ECX-F20.M, Vilber Lourmat). Зображення гелю отримано за допомогою цифрової камери.

Таблиця 2.1

Розмір і кількість фрагментів ДНК у гелі

Смуга №	Довжина фрагменту, пар основ	Кількість на смугу, нг	
		Ліва доріжка	Права доріжка
1	1031	73.3	14.66
2	900	63.9	12.78
3	800	56.9	11.38
4	700	50.0	10
5	600	42.7	8.54
6	500	71.0	14.2
7	400	28.4	5.68
8	300	21.3	4.26
9	250	17.8	3.56
10	200	28.5	5.7
11	150	10.7	2.14
12	100	21.3	4.26
13	50	14.2	2.84

2.10 Цитотоксичні дослідження

Клітинні дослідження проводили на лінії клітин людської промієлоцитарної лейкемії (HL-60). Клітини були підготовлені згідно стандартної процедури [219]. Дисперсія культури клітин була очищена через дворазове центрифугування (6,000 rpm, 6 хв) і редиспергована у фосфатному буферному розчині. До другого центрифугування, флуоресценція живих HL-60 клітин була виміряна кількісно за допомогою проточної цитометрії. Після останнього центрифугування до клітин додали розчин середовища (середовище з додаванням 5 % фосфатного буферного розчину, 1% L-глутамину, 1% пеніцилін/стрептоміцин) таким чином, щоб отримати концентрацію 50 000 клітин/мл.

Клатрохелати заліза (II) у різних концентраціях (об'ємом 1 μ л, розчинені у ДМСО) були додані до суспензії клітин (100 μ л). Після цього клітини були інкубовані у темній камері в атмосфері CO₂ (5%) при 37°C протягом 48 годин. Для кожної концентрації клатрохелатів заліза (II) було зроблено чотири експерименти. Далі, до комірок з клітинами додали барвник МТТ (20 μ л у фосфатному буфері 5 мг/мл) і після інкубації з ним протягом 3 годин у темній камері в атмосфері CO₂ (5%) при 37°C – розчин ДСН (90 μ л). Через приблизно 20 годин вимірювали поглинання суспензій при $\lambda = 590$ і 690 нм. Значення A (590 нм) – A (690 нм) рахували як величину, пропорційну проценту живих клітин.

2.11 Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням пакету програм OriginLab. Загальноприйнятими методами підраховували середнє арифметичне значення, стандартне відхилення (σ , визначено на графіках з обробленими даними). Обробку

та графічну ілюстрацію отриманих експериментальних даних здійснювали у програмному пакеті OriginPro 8.1.

РОЗДІЛ 3.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЙ ГЛОБУЛЯРНИХ БІЛКІВ З КЛОЗО-БОРАТАМИ

У даній роботі досліджено взаємодії ряду глобулярних білків з біоактивними борвмісними каркасними макроциклічними комплексами. Для дослідження взаємодії з лігандами були обрані наступні білки: сироваткові альбуміни (бичачий і людський), β -лактоглобулін, лізоцим, імуноглобулін G. Вибір групи білків зумовлений відповідно наступним критеріям:

- білки повинні бути добре охарактеризовані і тому широко використовуватись як модельні об'єкти;
- білки повинні бути розповсюджені у живих організмах;
- для вивчення зв'язування білок-ліганд флуоресцентними методами, у них повинні бути флуоресцентні амінокислотні залишки;
- в обраній групі повинні бути як подібні, так і різноманітні по структурі білки.

У якості модельних лігандів були обрані біоактивні кластери – клозо-борати. Структури гідроген клозо-боратів, які досліджувались у даній роботі, відображені на рис. 3.1.

Серед кластерів нефункціоналізовані клозо-декаборат ($[B_{10}H_{10}]^{2-}$, В-5) і клозо-додекаборат ($[B_{12}H_{12}]^{2-}$, В-6), та їх функціональні похідні: аліфатичне (В-4), ароматичні (В-8, В-9), а також галоген клозо-борати ($[B_{10}Hal_{10}]^{2-}$ (Hal= Cl, Br, I), $[B_{12}Hal_{12}]^{2-}$ (Hal= Cl, I)). Зв'язування білок-ліганд вивчалось методом гасіння власної флуоресценції білку лігандом. Оскільки для сироваткових альбумінів спостерігалось найбільш інтенсивне гасіння власної люмінесценції клозо-боратами, методом кругового дихроїзму в УФ-області досліджували вплив кластерів на

вторинну структуру альбуміну, ізотермічною калориметрією титрування отримували термодинамічні характеристики комплексоутворення з альбумінами.

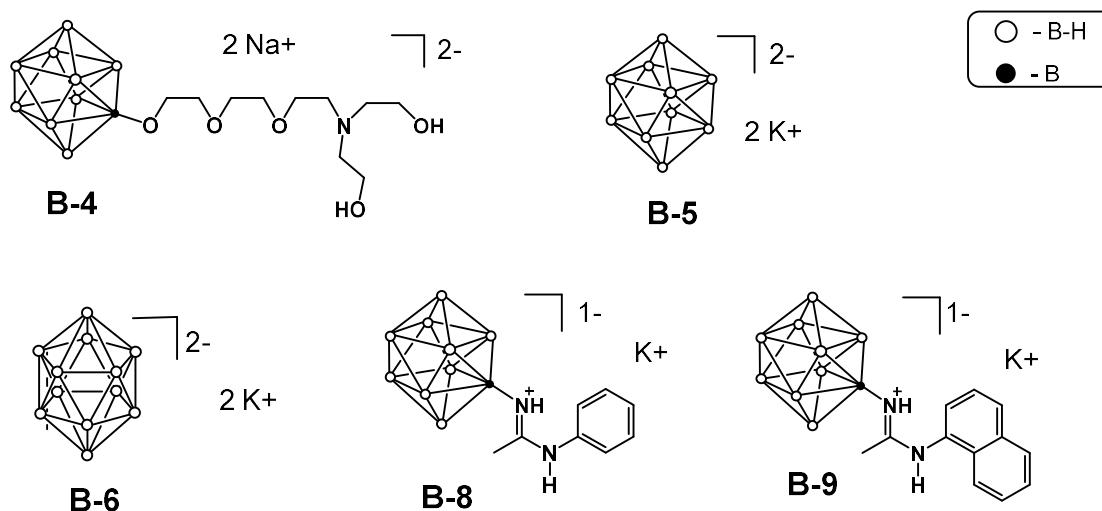


Рис. 3.1. Структури гідроген *клозо*-боратів

3.1 Дослідження взаємодій глобулярних білків з *клозо*-боратами флуоресцентним методом

Можливість взаємодії між глобулярними білками і гідроген *клозо*-боратами було досліджено шляхом вивчення впливу цих лігандів на власну флуоресценцію білку. Дослідження було проведено для ряду глобулярних білків (БСА, ЛСА, БЛГ, IgG і лізоциму) з *клозо*-декаборатом B-5, *клозо*-додекаборатом B-6 та їх функціоналізованими похідними.

Результати експерименту, що показують зміни інтенсивності флуоресценції білку при збільшенні концентрації кластерів відносно концентрації білку, представлено на рис. 3.2.

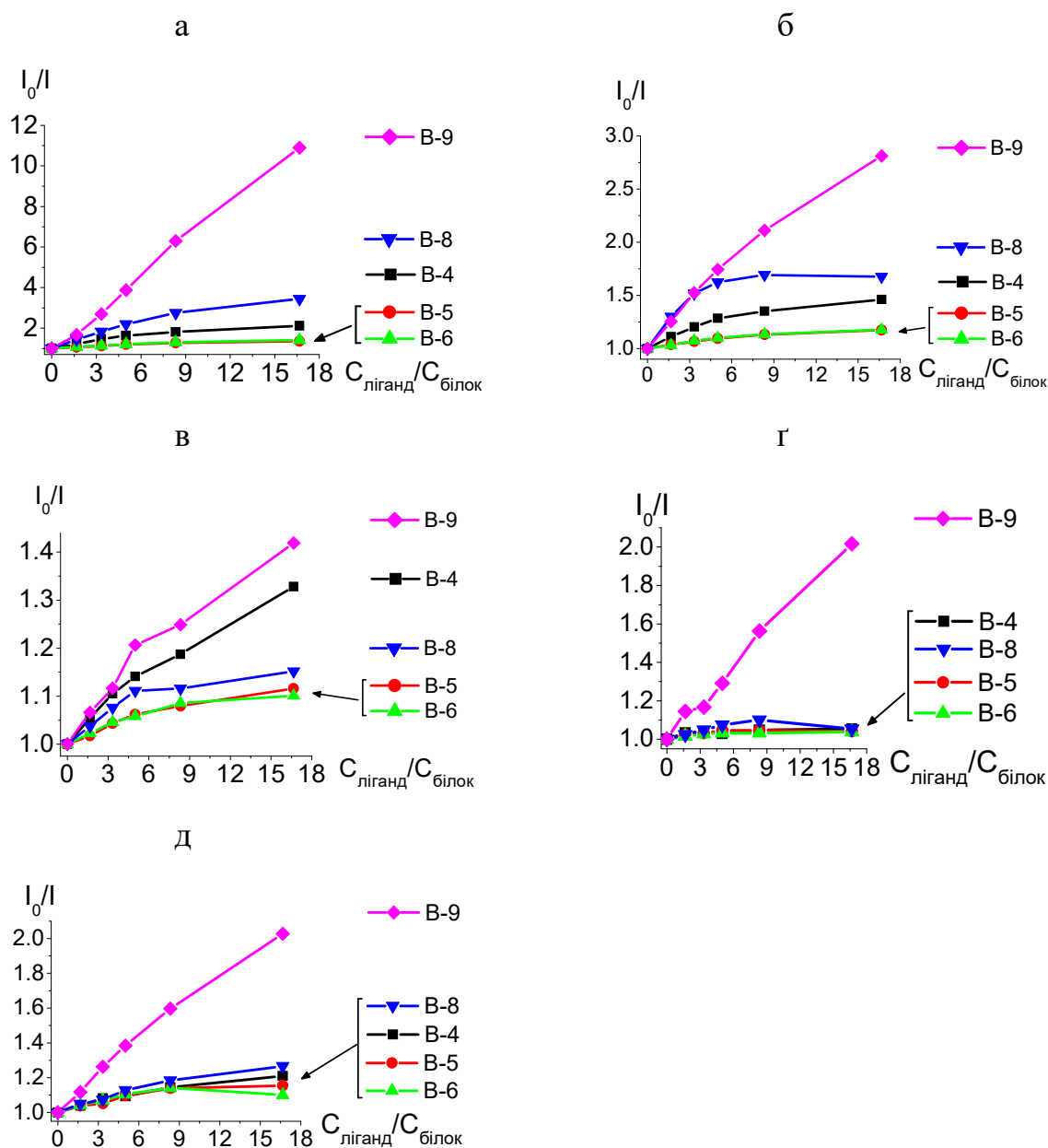


Рис. 3.2. Графіки гасіння люмінесценції білків (а – БСА, б – ЛСА, в- лізоциму, г – БЛГ, д – Ig G) *клозо*-боратами у залежності від співвідношення концентрацій *клозо*-борату до білку. I_0 та I – інтенсивність флуоресценції білку за відсутності та в присутності *клозо*-борату

Найбільш виражений ефект гасіння флуоресценції білків *клозо*-боратами був у випадку сироваткових альбумінів (до 11 і 3 разів для БСА і ЛСА, відповідно).

Гасіння флуоресценції інших білків було менш значним: до 1,4 рази для лізоциму, до 2 разів для БЛГ, до 2 разів для Ig G, (рис. 3.2 в – 3.2 д). З графіків видно, що *клозо*-борати з ароматичними замісниками (В-8, В-9) гасили флуоресценцію всіх білків інтенсивніше, причому В-9 значно сильніше ніж В-8 (гасіння емісії БСА до 11 і 3.4 разів, відповідно). Додавання до білків *клозо*-боратів без замісників (В-5, В-6) призводить до слабкого зменшення інтенсивності флуоресценції, що дорівнює впливу ДМСО на білок. Вплив *клозо*-борату В-4 з алкіламін- замісником на флуоресценцію БЛГ і Ig G був подібний до В-5 і В-6, але він значно гасив емісію БСА, ЛСА і лізоциму. Цей ефект не можна пояснити тільки впливом ДМСО, він свідчить про взаємодію трьох білків з алкіламіно *клозо*-боратом В-4.

Різний вплив *клозо*-боратів на сироваткові альбуміни можна пояснити різною будовою білків та різною кількістю флуоресцентних амінокислотних залишків у молекулах. Молекула людського альбуміну містить тільки один триптофан (Трп-214) [220], який знаходиться у гідрофобному (неполярному) оточенні субдомену ІА [79]. Бичачий альбумін крім Трп-213 додатково містить Трп-134 [221], який знаходиться на поверхні субдомену ІВ. Таким чином більш інтенсивне гасіння БСА порівняно з ЛСА може бути пояснене більшою доступністю Трп-134, тоді як Трп-213 і Трп-214 БСА і ЛСА, відповідно, сховані усередині глобули [79].

З другого боку, абсолютна інтенсивність емісії БСА, яка початково вище ніж ЛСА, стає нижче сигналу ЛСА у присутності однієї і тієї ж кількості *клозо*-боратів (В-8, В-9). Отже, якщо припустити, що Трп-213 БСА і Трп-214 ЛСА мають однакову інтенсивність флуоресценції, коли білки знаходяться у вільному стані, вплив *клозо*-боратів до Трп-213 БСА сильніше ніж до Трп-214 ЛСА. Це може відбуватися за різницею у структурі сироваткових альбумінів, що призводить до різниці зв'язування *клозо*-боратів з двома альбумінами, тому: 1) взаємне розміщення Трп-214 у ЛСА і *клозо*-борату менш сприятливо для гасіння, чим у випадку Трп-213 у БСА і/або 2) відстань між гасником і флуорофором у випадку Трп-214 у ЛСА більше порівняно з Трп-213 у БСА.

Час життя збудженого стану люмінесценції БСА і ЛСА у відсутності і у присутності *клозо*-боратів представлено у таблиці 3.1. Вплив *клозо*-боратів на час загасання флуоресценції БСА і ЛСА також відрізнявся в залежності від функціональних замісників цих кластерів.

Таблиця 3.1

Зменшення часу життя збудженого стану люмінесценції альбумінів у присутності *клозо*-боратів

Система	$\tau_{\text{ср}}$, нс	Система	$\tau_{\text{ср}}$, нс
БСА	6.10±0.012	ЛСА	5.33±0.02
БСА + ДМСО, 25µl	5.71±0.013	ЛСА + ДМСО, 25µl	4.86±0.02
БСА + В-4, 10 µМ	5.52±0.014	ЛСА + В-4, 10 µМ	4.94±0.02
БСА + В-5, 10 µМ	5.89±0.012	ЛСА + В-5, 10 µМ	5.01±0.02
БСА + В-6, 10 µМ	5.74±0.015	ЛСА + В-6, 10 µМ	5.11±0.02
БСА + В-8, 10 µМ	4.91±0.012	ЛСА + В-8, 10 µМ	4.53±0.015
БСА + В-9, 10 µМ	4.65±0.012	ЛСА + В-9, 10 µМ	4.50±0.02

Зменшення часу згасання люмінесценції у присутності кластерів В-5 і В-6 на рівні ефекту ДМСО, тоді як у випадку алкіламін заміщеного похідного В-4 децю більше виражене. Проте, взаємодії з альбумінами ариламино- заміщених *клозо*-боратів В-8 і В-9 приводить до більш значного (до 1.3 рази) зменшення часу життя збудженого стану флуоресценції білків порівняно з кластерами В-4 – В-6.

3.1.1 Механізм гасіння флуоресценції при взаємодії білків з кластерами бору. Гасіння флуоресценції може відбуватися за статичним (через зв'язування з утворенням нефлуоресцентного комплексу) або динамічним (за рахунок дифузії гасника) механізмам. Апроксимація графіків Штерна-Фольмера (гасіння ЛСА при збудженні на 295 нм) для *клозо*-боратів В-8, В-9 за допомогою рівняння $I_0/I = 1 + K_{\text{ШФ}} \times [Q]$ (де $K_{\text{ШФ}}$ – константа гасіння, $[Q]$ – концентрація *клозо*-борату) дає $K_{\text{ШФ}}$

близько 10^5 M^{-1} . Оскільки час життя збудженого стану Трп-214 (τ_0) приблизно дорівнює 5 нс, бімолекулярна константа гасіння, яка вираховується як $K_{\text{ШФ}}/\tau_0$, буде вищою ніж $10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, що приблизно від сто до тисячі разів більше за максимально допустиме значення цієї константи (отриманої для маленьких молекул кисню) [107]. Отже, викладене вище виключає динамічний механізм гасіння. Таким чином, гасіння флуоресценції білків є результатом зв'язування *клозо*-боратів з білками.

Отже, методом гасіння власної флуоресценції білку було показано зв'язування ряду білків з алкіл та ариламиін заміщеними кластерами бору. Найбільш інтенсивне зв'язування (за гасінням власної люмінесценції білку) спостерігалось у випадку основних транспортних білків крові - сироваткових альбумінів, і ариламино- заміщених кластерів бору. Оскільки головні сайти зв'язування альбуміну (сайт 1 і 2) гідрофобні, можливо, ароматичні замісники сприяють зв'язуванню *клозо*-боратів з білком. Далі взаємодії з бичачим і людським сироватковими альбумінами було вивчено для ряду галоген *клозо*-боратів.

3.1.2 Спектрально-люмінесцентні дослідження зв'язування галоген *клозо*-боратів з альбумінами. Можливість взаємодії між білками і борними кластерами було досліджено шляхом вивчення впливу галоген *клозо*-боратів типу $[\text{B}_{10}\text{Hal}_{10}]^{2-}$ (Hal= Cl, Br, I) і $[\text{B}_{12}\text{Hal}_{12}]^{2-}$ (Hal= Cl, I) (рис. 3.3) на власну флуоресценцію білку. Графіки гасіння люмінесценції показують значний вплив на флуоресценцію БСА (гасіння до 19 разів) та менший у випадку ЛСА (лише до 2.1. разів). Як у випадку гідроген *клозо*-боратів – В-8, В-9, так і для галоген кластерів, менший вплив на флуоресценцію ЛСА можна пояснити меншою доступністю лише одного триптофану (у порівнянні з двома у БСА) та відмінністю структур білків (див. вище).

У випадках обох білків гасіння залежить від типу кластеру та атомів галогену у структурі кластеру; воно зростає від $[\text{B}_{10}\text{Hal}_{10}]^{2-}$ до $[\text{B}_{12}\text{Hal}_{12}]^{2-}$ і у рядах $[\text{B}_{10}\text{Cl}_{10}]^{2-} \rightarrow [\text{B}_{10}\text{Br}_{10}]^{2-} \rightarrow [\text{B}_{10}\text{I}_{10}]^{2-}$ і $[\text{B}_{12}\text{Cl}_{12}]^{2-} \rightarrow [\text{B}_{12}\text{I}_{12}]^{2-}$ (рис. 3.3). У всіх випадках гасіння люмінесценції галоген кластерами більше ніж гідроген кластерами того ж складу.

Це можна пояснити зовнішнім ефектом важкого атому [107], що відбувається при гасінні галоген *клозо*-боратами.

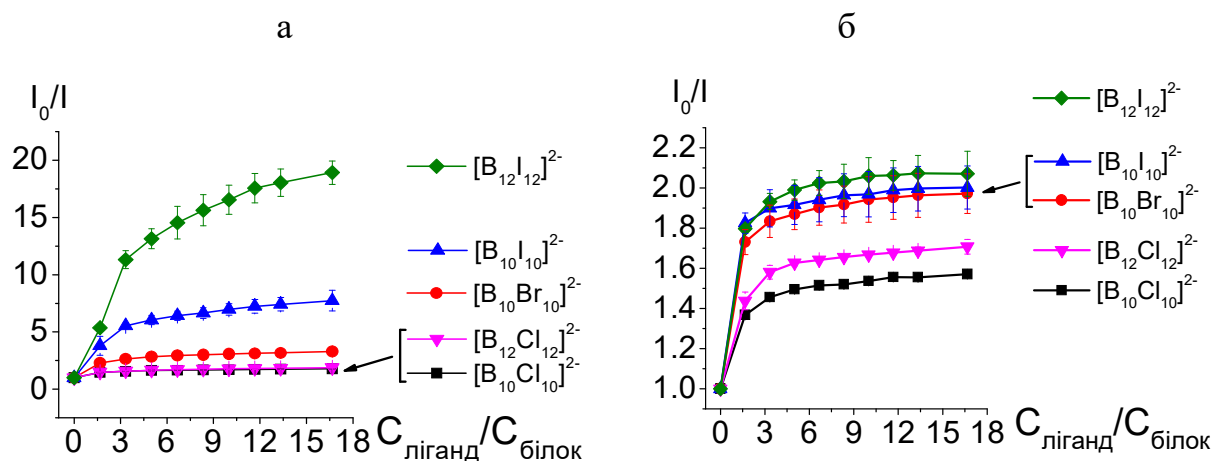


Рис. 3.3. Графіки гасіння люмінесценції білків (а – БСА, б - ЛСА) *клозо*-боратами у залежності від співвідношення концентрацій *клозо*-борату до білку. I_0 та I – інтенсивність флуоресценції у відсутності та присутності *клозо*-боратів у різній концентрації, відповідно

Щоб отримати кількісні характеристики взаємодії, графіки Штерна-Фольмера були апроксимовані рівнянням (2.3), Розділ 2.4.4. Отримані значення співвідношення I_{min}/I_0 (A – мінімальна залишкова відносна флуоресценція, протилежна максимальній ступені гасіння) і констант зв'язування, K , наведено у таблиці 3.2 (коефіцієнт кореляції R^2 рівняння (2.3), Розділ 2.4.4, до кривих гасіння Штерна-Фольмера був не менше 0.97).

У випадку БСА, співвідношення I_{min}/I_0 (A , табл. 3.2) зменшується у ряду $[B_{10}Cl_{10}]^{2-} \rightarrow [B_{10}Br_{10}]^{2-} \rightarrow [B_{10}I_{10}]^{2-}$ (до 4.5 разів), і $[B_{12}Cl_{12}]^{2-} \rightarrow [B_{12}I_{12}]^{2-}$ (до 13 разів); мінімальні значення A спостерігалися для йодпохідних (0.12 і 0.04 для $[B_{10}I_{10}]^{2-}$ і $[B_{12}I_{12}]^{2-}$, відповідно). У випадку ЛСА, значення A слабо відрізнялись (до 1.4 разів в серії $[B_{10}NaI_{10}]^{2-}$) для всіх *клозо*-боратів серії через незначний вплив на флуоресценцію ЛСА, як описано вище.

Таблиця 3.2

Параметри зв'язування для взаємодій клозо-боратів з БСА і ЛСА

Білок	Параметри	<i>Клозо-борати</i>				
		$[B_{10}Cl_{10}]^{2-}$	$[B_{10}Br_{10}]^{2-}$	$[B_{10}I_{10}]^{2-}$	$[B_{12}Cl_{12}]^{2-}$	$[B_{12}I_{12}]^{2-}$
БСА	A	0.54	0.29	0.12	0.51	0.04
	K, $10^6 M^{-1}$	0.38	0.66	1.17	0.28	1.90
ЛСА	A	0.62	0.50	0.49	0.58	0.47
	K, $10^6 M^{-1}$	0.49	0.87	1.25	0.64	1.05

Незважаючи на слабкий вплив на люмінесценцію ЛСА, значення констант зв'язування, отримані при апроксимації даних зв'язування з БСА і ЛСА, знаходяться в одному діапазоні ($10^5 - 10^6 M^{-1}$, табл. 3.2). Це свідчить про сильне зв'язування з кожним з двох білків. В обох випадках константи зв'язування зростають від хлор-заміщених кластерів бору до йод-заміщених (табл. 3.2).

У випадку БСА константи зв'язування кластерів $[B_{10}Cl_{10}]^{2-}$ і $[B_{12}Cl_{12}]^{2-}$ достатньо близькі, тоді як константа для $[B_{12}I_{12}]^{2-}$ ($1.9 \times 10^6 M^{-1}$, табл. 3.2) значно більша ніж для $[B_{10}I_{10}]^{2-}$ ($1.17 \times 10^6 M^{-1}$, табл. 3.2). Найбільш ефективні взаємодії між БСА і $[B_{10}I_{10}]^{2-}$ можливі внаслідок більшої гідрофобності кластеру або відповідності розміру сайту зв'язування білка.

3.2 Вплив зв'язування альбуміну з клозо-боратом на вторинну структуру білку

Оскільки флуоресцентний сигнал БСА значно зменшується при додаванні клозо-боратів, методом КД-спектроскопії були оцінені можливі зміни у вторинній структурі білку внаслідок взаємодії з кластерами бору.

БСА має КД-спектр, типовий для білку з перевагою α -спіральної структури [222], у якому є дві характеристичні негативні смуги на 210-222 нм. КД-експеримент проводили шляхом додавання до БСА *клозо*-борату у зростаючій концентрації (до співвідношення БСА: *клозо*-борат – 1:13). Зв'язування *клозо*-борату з білком призводить до незначних змін обох смуг (до 2%, рис. 3.4).

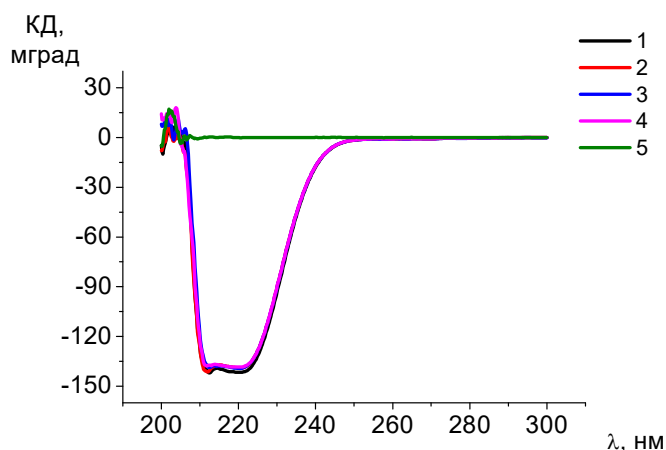


Рис. 3.4. КД спектри БСА у відсутності та присутності *клозо*-борату:

1. БСА,
2. БСА + 5 μM $[\text{B}_{10}\text{Cl}_{10}]^{2-}$,
3. БСА + 10 μM $[\text{B}_{10}\text{Cl}_{10}]^{2-}$,
4. БСА + 10 μM $[\text{B}_{10}\text{Cl}_{10}]^{2-}$,
5. 10 μM $[\text{B}_{10}\text{Cl}_{10}]^{2-}$

Ці зміни означають, що зменшення α -спірального вмісту БСА не перевищує 1% (по рівнянню (2.5), Розділ 2.4.7) навіть при найвищій концентрації кластеру. Таким чином, зв'язування *клозо*-боратів з альбумінами не викликає значних змін у вторинній структурі білку, можливо, кластери асоціюються у порожнинах на поверхні білка переважно через слабкі міжмолекулярні взаємодії (ймовірно, гідрофобні і електростатичні).

3.3 Визначення термодинамічних параметрів комплексоутворення альбумінів з *клозо*-боратами

Термодинамічні параметри зв'язування альбумінів з кластерами бору були отримані за допомогою ізотермічної калориметрії титрування. Експеримент проводили для гідроген *клозо*-декаборатів (незаміщеного – В-5 і ариламіно-заміщеного – В-8) і галоген *клозо*-декаборатів $[B_{10}Hal_{10}]^{2-}$ ($Hal = Cl, Br, I$). Графіки співвідношення ентальпії від концентрації *клозо*-борату наведено у Додатку Б (рис. Б.1), термодинамічні параметри, отримані при апроксимації даних – у табл. 3.3 і 3.4. Дані ІТК свідчать про зв'язування з альбумінами всіх досліджуваних кластерів бору.

Таблиця 3.3

Термодинамічні характеристики взаємодій між ЛСА і гідроген *клозо*-боратами, отримані методом ІТК, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

<i>Клозо</i> -борат	$K, 10^3$	n	ΔH	ΔS	$T\Delta S$	ΔG
(В-5) $[B_{10}H_{10}]^{2-}$	1.4	1.9	-11.7	20.7	6.2	-17.9
(В-8) $[B_{10}H_9]-R^{1-}$	1.2	4.1	-24.3	-22.9	-6.8	-17.5

Примітка. ΔH , ΔS , ΔG – зміни ентальпії, ентропії, енергії Гіббса при зв'язуванні відповідно; K – константа асоціації комплексу; n – кількість зв'язаних молекул *клозо*-борату на одну глобулу білку. $[\Delta H]$, $[T\Delta S]$, $[\Delta G]$ – кДж/моль; $[\Delta S]$ – Дж/моль \times К; $[K]$ – M^{-1}

За даними ІТК, комплексоутворення ЛСА з гідроген *клозо*-боратами відбувається в сайтах зв'язування з близькими енергетичними параметрами, при цьому значення ΔG і K близькі (табл. 3.3), тобто кластери мають схожу спорідненість до білку. З іншого боку, відмінність у ΔH та ΔS для В-5 і В-8 свідчить

про різницю міжмолекулярних взаємодій при комплексоутворенні. В утворенні комплексу з ЛСА у випадку В-5 беруть участь гідрофобні взаємодії та сили міжмолекулярного притягання, причому, остання компонента більш значна ($\Delta H = -11.7$ кДж/моль), ніж перша ($T\Delta S = 6.2$ кДж/моль). Вірогідно, сили міжмолекулярного притягання переважно включають електростатичні взаємодії через заряд борного кластера.

Таблиця 3.4

Термодинамічні характеристики взаємодії між БСА і галоген *клозо-*боратами отримані методом ІТК, $t = 25$ °С

<i>Клозо-</i> борат	K_1 , 10^6	n_1	ΔH_1	ΔS_1	$T\Delta S_1$	ΔG_1	K_2 , 10^4	n_2	ΔH_2	ΔS_2	$T\Delta S_2$	ΔG_2
$[B_{10}Cl_{10}]^{2-}$	2.6	1.8	0.1	123.2	36.7	-36.6	10.6	3.1	-9.8	63.3	18.9	-28.7
$[B_{10}Br_{10}]^{2-}$	1.1	1.1	-7.9	89.3	26.6	-34.5	2.3	2.7	-16.9	26.7	8.0	-24.9
$[B_{10}I_{10}]^{2-}$	1.6	1.1	-4.9	102.0	30.4	-35.3	1.1	2.9	-11.3	39.0	11.6	-22.9

Примітка. $\Delta H_{1,2}$, $\Delta S_{1,2}$, $\Delta G_{1,2}$ – зміни ентальпії, ентропії, енергії Гіббса при зв'язуванні; $K_{1,2}$ – константа асоціації комплексу; $n_{1,2}$ – кількість зв'язаних молекул *клозо-*борату на одну глобулу білку. $[\Delta H]$, $[T\Delta S]$, $[\Delta G]$ – кДж/моль; $[\Delta S]$ – Дж/моль \times К; $[K]$ – M^{-1}

З іншого боку, зв'язування ЛСА з моноаніоном ариламін *клозо-*борату веде до вдвічі більшої зміни ентальпії ($\Delta H = -24.3$ кДж/моль) у порівнянні зі зв'язуванням з незаміщеним кластером. Це може бути спричинено наступними факторами: 1) іншим загальним зарядом В-8 (-1) у порівнянні з В-5 (-2); 2) наявністю позитивно зарядженої аміногрупи у В-8, здатної взаємодіяти з карбоксильними групами білку; 3) наявністю аміногруп у В-8, які здатні

утворювати водневі зв'язки; 4) наявністю дипольного моменту у В-8 через присутність позитивно зарядженого N-замісника; 5) наявністю ароматичних груп, здатних до участі у Ван дер Ваальсових взаємодіях. Ариламиновий замісник зменшує гідрофобність *клозо*-борату, отже, внесок гідрофобних взаємодій до комплексоутворення ($\Delta S < 0$).

У випадку галоген *клозо*-боратів найбільш придатна модель для апроксимування даних ІТК – модель множинного зв'язування, яка припускає зв'язування кластерів у двох типах сайтів БСА з близькими енергетичними параметрами (табл. 3.4). Кластери мають більшу афінність до сайтів одного типу, про що свідчать високі константи зв'язування (K_1 порядку 10^6 M^{-1}). Показано, що таким чином на молекулу білку зв'язуються одна (у випадках $[\text{B}_{10}\text{Br}_{10}]^{2-}$ і $[\text{B}_{10}\text{I}_{10}]^{2-}$) або дві ($[\text{B}_{10}\text{Cl}_{10}]^{2-}$) молекули *клозо*-борату. Високі позитивні зміни ентропії та перевага ентропійного внеску ($T\Delta S$) над ентальпійним виявляють гідрофобний характер взаємодії. Сайти другого типу характеризуються меншою спорідненістю кластерів до білку (K_2 порядку $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$), і на одну глобулу білку приходиться приблизно 3 молекули *клозо*-борату. Дані ІТК свідчать про значний внесок міжмолекулярних взаємодій при зв'язуванні у сайтах цього типу. З одного боку, подібну спорідненість з БСА мають всі галоген кластери (ΔG_1 і ΔG_2 порядку 34.5 – 36.5 і 23 – 29 кДж/моль, відповідно), з іншого – для різних кластерів бору до асоціації долучені різні сили зв'язування (ΔH і ΔS дещо відрізняються).

Оскільки значення констант, отриманих флуоресцентним титруванням (табл. 3.2), одного порядку з константами для сайтів першого типу, K_1 (табл. 3.4), припускаємо, що ці сайти розташовані навколо Трп амінокислотних залишків альбуміну (вірогідно, сайту I альбуміну, домен ІА [223]). За флуоресцентними даними, константи зростають від хлорпохідних до йодпохідних, але цієї кореляції не виявлено ІТК методом. Різниця у результатах флуоресцентного та ІТК методів може бути пов'язана з тим, що калориметричний аналіз показує лише взаємодії з

ненульовим тепловим ефектом які, проте, відбуваються при помітно більших концентраціях білку.

Отже, альбуміни взаємодіють з галоген кластерами $[B_{10}Na_{10}]^{2-}$ з більшою афінністю (К порядку 10^4 - 10^6 M^{-1}), ніж гідроген *клозо*-борати тієї ж структури (К порядку 10^3 M^{-1}). Також, у випадках галоген або ариламін *клозо*-боратів з альбуміном зв'язується більше кластерів (4-5), ніж незаміщеного гідроген *клозо*-борату (тільки 2 аніони на білок). Таким чином, вища спорідненість між альбуміном і галоген *клозо*-боратами в порівнянні з гідроген кластерами бору разом з більшою кількістю аніонів у комплексі робить їх більш привабливими для досліджень, як потенційні агенти для бор нейтрон захоплюючої терапії онкологічних захворювань і бор нейтрон захоплюючої сіновектомії.

Висновки до розділу:

1. Утворення комплексів між альбумінами і незаміщеними і заміщеними кластерами бору було досліджено методами ІТК і флуоресцентної спектроскопії.
2. Методом гасіння власної флуоресценції білку було показано, що сироваткові альбуміни (зокрема БСА) чутливі до гідроген *клозо*-боратів, тоді як флуоресценція інших білків (БЛГ, лізоциму, Ig G) незначно змінюється у їх присутності.
3. Було показано, що на зв'язування альбумінів з *клозо*-боратами впливає структура кластеру і природа його замісників. За даними флуоресцентної спектроскопії, обидва сироваткових альбуміни найбільш чутливі до ариламін- і галоген- заміщених похідних *клозо*-боратів. При взаємодії альбумінів з галоген кластерами бору, вплив *клозо*-боратів на флуоресценцію обох білків підсилюється від $[B_{10}Na_{10}]^{2-}$ до $[B_{12}Na_{12}]^{2-}$ і у ряду від хлорпохідних до йодпохідних.
4. Методом ІТК було показано, що альбуміни взаємодіють з галоген кластерами бору $[B_{10}Na_{10}]^{2-}$ з більшою спорідненістю (К порядку 10^4 - 10^6 M^{-1}), ніж незаміщеними і функціоналізованими гідроген *клозо*-боратами того же типу (К

порядку 10^3 M^{-1}). Стехіометрія зв'язування альбумін-клозо-борат також визначається наявністю і природою замісників кластеру: 4-5 для галоген- / ариламино- похідних, або 2 молекули незаміщеного гідроген клозо-борату на молекулу білку. Таким чином, було показано як змінюються характеристики комплексоутворення альбумін-клозо-борат при варіюванні параметрів кластерів бору. Вища спорідненість між альбуміном і галоген клозо-боратами у порівнянні з гідроген кластерами бору сумісно з більшою кількістю аніонів у комплексі робить їх більш привабливими для досліджень, як потенційні агенти для бор нейтрон захоплюючої терапії онкологічних захворювань і бор нейтрон захоплюючої сіновектомії.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1. Effective binding of perhalogenated *closo* -borates to serum albumins revealed by spectroscopic and ITC studies / M. Kuperman, M. Losytskyy, A. Bykov, S. Yarmoluk, K. Zhizhin, N. Kuznetsov, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka, V. Kovalska // Journal of Molecular Structure. – 2017. – Vol. 1141. - P. 75-80.
2. An interaction of the functionalized *closo*-borates with albumins: the protein fluorescence quenching and calorimetry study, J. Lumin / M. Losytskyy, V. Kovalska, O. Varzatskii, M. Kuperman, S. Potocki, E. Gumienna-Kontecka, A. Zhdanov, S. Yarmoluk, Ya. Voloshin, K. Zhizhin, N. Kuznetsov, A. Elskaya // J. Lumin. – 2016. – Vol. 169(A). - P. 51–60.

РОЗДІЛ 4.

ЗМІНИ РЕАКЦІЇ АМІЛОЇДНОЇ АГРЕГАЦІЇ БІЛКУ У ПРИСУТНОСТІ *КЛОЗО-* БОРАТІВ ТА РОЗРОБКА АМІЛОЇДЧУТЛИВИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ БАРВНИКІВ

Зміни у процесі фібрилоутворення під впливом дианіонного кластеру В-6 ($[\text{V}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$) досліджено на прикладі інсуліну. Інсулін має малий розмір, є добре вивченим білком, тому часто використовується для досліджень, пов'язаних з агрегацією, і є зручним модельним білком для дослідження різних аспектів процесу фібрилоутворення [109]. Зміни у процесі фібрилоутворення інсуліну в присутності *клозо-*борату В-6 вивчалися за впливом (1) на вторинну структуру білку протягом агрегації методом кругового дихроїзму в УФ області, (2) на кінетику фібрилоутворення білку флуоресцентним методом і (3) на морфологію кінцевих продуктів агрегації за допомогою ТЕМ. Кінетика фібрилоутворення інсуліну в присутності та за відсутності *клозо-*борату В-6 контролювалася за допомогою флуоресцентного методу з амілоїдчутливим флуоресцентним барвником 7519. Збудження флуоресцентного барвника 7519 здійснювали на довжині хвилі 580 нм (λ_{36}), випромінювання фіксували на довжині хвилі 590 нм (λ_{em}). Оцінювання впливу кластеру здійснювали на основі порівняння зразків з дианіонним кластером зі зразками вільного інсуліну.

4.1 Вивчення процесу фібрилоутворення інсуліну в присутності дианіонного *клозо-*борату В-6

Амілоїдна агрегація білків відбувається через зміну нативної конформації білку на неправильну і білок-білкові взаємодії внаслідок різних екзогенних або

ендогенних факторів, що призводить до певних захворювань (хвороби Альцгеймера і Паркінсона) [135]. Вплив кластерів бору на білок-білкові взаємодії було досліджено на прикладі вивчення амілоїдної фібрилізації інсуліну під дією дианіонного *клозо*-борату $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ (В-6) *in vitro*. Дослідження реакції агрегації проводили у відсутності та присутності різних концентрацій *клозо*-борату.

4.1.1 Дослідження вторинної структури інсуліну за впливу *клозо*-борату під час фібрилоутворення за допомогою КД-спектроскопії. КД спектроскопія в УФ області – метод, який широко використовується для моніторингу конформаційних змін вторинної структури білку [224, 225]. Раніше було показано, що під час агрегації бичачого або людського інсуліну, його структура змінюється з α -спіральної до β -складчастої [224]. Інсулін у нативному стані або під час лаг-фази у фібрилоутворенні має спектр, характерний для α -спіральної конформації, при появі прото-фібрил [224, 225] спектр змінюється на типовий для β -складчастої структури. Показано, що ці зміни форми та інтенсивності КД-смуг у спектрі інсуліну відбуваються на 50 – 65 хвилинах стандартного процесу фібрилізації [226]. Для оцінки впливу *клозо*-борату на конформаційні зміни інсуліну, його КД спектри вивчались під час фібрилоутворення інсуліну, дослідження проводили у присутності та за відсутності *клозо*-борату. КД-вимірювання здійснювали до термоінкубації, на 60 хвилині (або 70 хвилині для вільного інсуліну) і на 150 хвилині фібрилізації.

КД-спектр інсуліну (рис. 4.1 а) у вільному стані до термоінкубації має дві негативні смуги близько 208 і 222 нм. Цей спектр є характерним для білку з переважно α -спіральною структурою і відповідає нативній структурі білку. Через 70 хвилин термоінкубації при рН 2 (65 °С) КД-спектр залишається незмінним (рис. 4.1 а). Через 150 хвилин КД-профіль білку значно перетворюється: з'являється негативна смуга на 218-220 нм (рис. 4.1 а), яка характерна для білку з переважно β -складчастою структурою. Ці зміни свідчать про утворення префібрилярних агрегатів або амілоїдних фібрил [224].

Зміни у КД-спектрах інсуліну інкубованого з *клозо*-боратом спостерігалися після 60 хвилин фібрилізації: у порівнянні зі спектром білку у нативному стані інтенсивність КД смуг зменшилась (більш виражено на 208 нм, ніж на 222 нм, рис. 4.1 б).

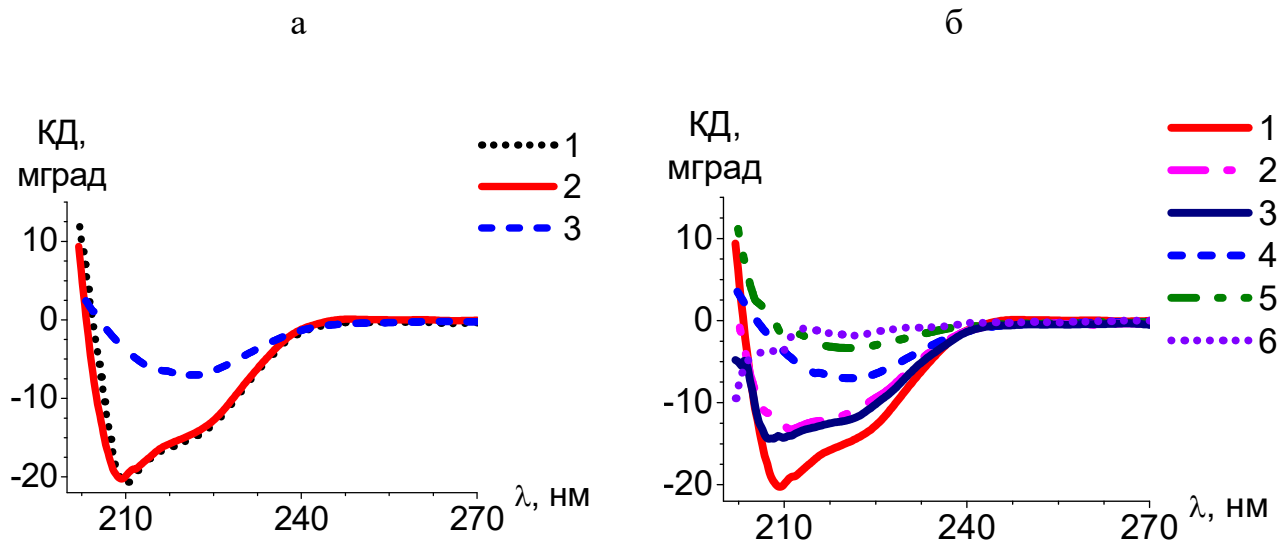


Рис. 4.1. КД-спектри інсуліну під час інкубації при 65 °С (рН 2). а – КД спектри інсуліну під час фібрилізації у вільному стані: 1 – інсуліну до інкубації; 2 – інсуліну через 70 хв. інкубації; 3 – інсуліну через 150 хв. інкубації; б – КД-спектри інсуліну інкубованого у вільному стані та у присутності В-6: 1 – інсуліну у вільному стані через 70 хв. інкубації; 2 – інсуліну з В-6 (10 μM) через 60 хв. інкубації; 3 – інсуліну з В-6 (100 μM) через 60 хв. інкубації; 4 – інсуліну у вільному стані через 150 хв. інкубації; 5 – інсуліну з В-6 (10 μM) через 150 хв. інкубації; 6 – інсуліну з В-6 (100 μM) через 150 хв. інкубації

Для обох концентрації кластеру цей ефект був однаковий. Тобто присутність *клозо*-борату сприяє втраті α -спіральної ділянок на ранніх стадіях фібрилізації у порівнянні з інсуліном у вільному стані. Після 150 хвилин фібрилізації КД-смуги стали менш інтенсивні (рис. 4.1 б). Взагалі, КД-спектри обох зразків з В-6 були менш інтенсивні (до 3.8 разів), ніж інсулін у вільному стані після того ж часу

термоінкубації. Це, можливо, пов'язано з утворенням меншої кількості β -складчастих інсулінових агрегатів або/і наявністю у них нерегулярних ділянок або злипанням фібрил у згустки і латеральні агрегати. Інсулін складається з двох поліпептидних ланцюгів – А і В, обидва містять фібрилогенну послідовність (за допомогою якої утримуються бета-складчасті ділянки). Ланцюг В – основний, він утворює ядро амілоїдних фібрил, тоді як ланцюг А може бути як залучено, так і вилучено з цього ядра [227, 228]. Тобто, наявність нерегулярних ділянок може бути зумовлена вилученням ланцюга А інсуліну з фібрилярного ядра.

Зразки інсуліну з *клозо*-боратом (10 або 100 μM В-6), КД-спектри до термоінкубації подібні таким для вільного білку – мають дві характеристичні смуги близько 208 і 222 нм (дані не наведено). Додавання до аліквот інсуліну, який інкубувався у вільному стані, на 30 і 70 хвилинах фібрилізації *клозо*-борату (100 μM) також не впливало на форму або інтенсивність КД сигналу білку і, відповідно, його вторинну структуру (дані не наведено).

Таким чином, присутність дианіонних кластерів бору у процесі фібрилоутворення сприяє частковій денатурації інсуліну і втраті α -спіральних ділянок у молекулі білку. Припускаємо, що зв'язування частково розгорнутих інтермедіатів інсуліну з *клозо*-боратом також змінює рівновагу між електростатичними та гідрофобними взаємодіями, які є критичними для процесу фібрилізації [229, 230].

4.1.2 Дослідження кінетики фібрилоутворення інсуліну під дією *клозо*-борату за допомогою флуоресцентного амілоїдчутливого барвника. Кінетику фібрилоутворення інсуліну в присутності *клозо*-борату В-6 (рис. 4.3) було досліджено флуоресцентним методом з амілоїдчутливим ціаніновим барвником 7519. Барвник 7519 (рис. 4.2) значно підвищує власний флуоресцентний сигнал при зв'язуванні з β -складчастими структурами, тому даний метод показує їх відносну кількість протягом фібрилізації.

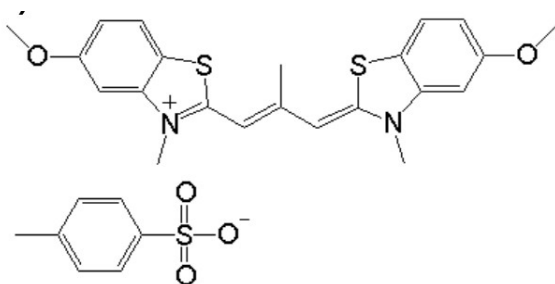


Рис. 4.2. Структура амілоїд-чутливого ціанінового барвника 7519

Щоб бути впевненими у відсутності впливу аніонного кластеру бору на інтенсивність емісії катіонного барвника 7519, були записані флуоресцентні спектри розчинів фібрил інсуліну з 7519, а також ці розчини з еквівалентною кількістю В-6 (доданого безпосередньо у кювету). Впливу В-6 на флуоресцентний сигнал 7519 виявлено не було (дані не наведено).

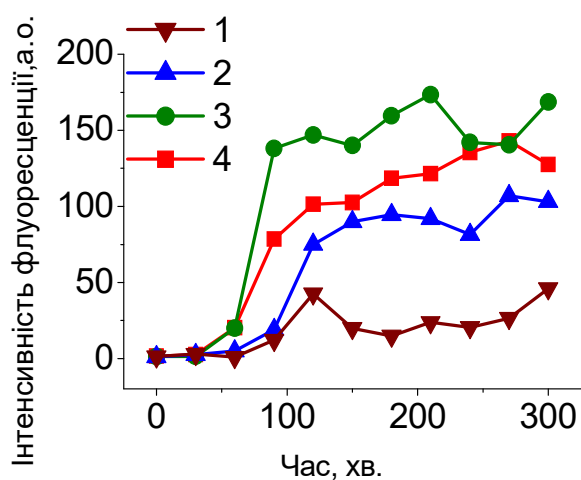


Рис. 4.3. Кінетика утворення амілоїдних фібрил від інсуліну у вільному стані та у присутності *клозо*-борату в різних концентраціях (10, 50, 100 μM) оцінена за допомогою флуоресцентного барвника 7519: 1 – інсулін з 100 μM В-6; 2 – інсулін з 50 μM В-6; 3 – інсулін з 10 μM В-6; 4 – інсулін у вільному стані.

По даним флуоресцентної спектроскопії зміна кінетики фібрилоутворення інсуліну у присутності *клозо*-борату залежить від його концентрації. Флуоресцентний відгук ціанінового барвника зростає більш інтенсивно у порівнянні з фібрилоутворенням вільного інсуліну при низькій концентрації кластеру (10 μM , рис. 4.3). При 50 μM концентрації *клозо*-борату спостерігалася невелике продовження лаг-фази і зниження інтенсивності флуоресцентного сигналу в другій частині реакції. Проте, спостерігалася незначна інтенсивність флуоресцентного відгуку амілоїдчутливого барвника протягом усього процесу при високій концентрації *клозо*-борату (100 μM).

Раніше було показано, що інтенсивніший флуоресцентний відгук амілоїд чутливого барвнику Тіофлавіну Т і скорочення лаг-фази фібрилізації відносно стандартного процесу має бути при утворенні префібрилярних інтермедіатів на початку процесу агрегації білку, що передують утворенню зрілих фібрил [229, 230]. Тому припускаємо, що утворенню префібрилярних інтермедіатів сприяє низька концентрація кластеру В-6. Це також підтверджують дані КД, які вказують на ранню втрату α -спіральної структури інсуліном, інкубованим з В-6 (у порівнянні з вільним інсуліном).

Вплив діаніонного *клозо*-борату на фібрилізацію інсуліну було порівняно також з раніше вивченим ефектом сульфат діаніону [231]. Згідно даних кінетики агрегації за допомогою флуоресцентного барвника Тіофлавіну Т, зміна концентрації сульфат іону з 2.5 до 100 мМ значно збільшила лаг-фазу і половинний час агрегації людського інсуліну (до 1.7 і 2.4 разів відповідно). Зростання концентрації сульфат іону з 2.5 до 5 мМ незначно інгібувало агрегацію, тоді як 50 і 100 мМ концентрації діаніону призводили до утворення аморфних агрегатів з великою кількістю α -спіральних ділянок [231].

Отже ефект *клозо*-борату на агрегацію інсуліну відрізняється від ефекту сульфат діаніону, а саме:

- низькі концентрації кластеру В-6 сприяють агрегації інсуліну;

- форма кривих кінетики агрегації для вільного білку подібна таким у присутності 10 μM і 50 μM *клозо*-борату, тобто ефект *клозо*-борату на лаг-фазу і половинний час фібрилізації менш виражений, ніж описано для сульфат діаніону;
- відбувається прискорення втрати α -спіральных ділянок інсуліном у присутності *клозо*-борату, тоді як сульфат аніон сприяє утворенню аморфних агрегатів з великим вмістом α -спіральных структур [231].

Вважаємо, що висока концентрація кластеру $[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$ (100 μM) значно підвищує схильність фібрилярних інтермедіатів і зрілих фібрил до злипання у згустки і латеральні агрегати (див. нижче), що спричиняє слабкий відгук флуоресцентного барвника.

4.1.3 Дослідження кінцевих продуктів фібрилоутворення інсуліну у присутності і за відсутності *клозо*-борату методом ТЕМ. Дані ТЕМ показали, що фібрили – основний продукт агрегації інсуліну як у присутності, так і у відсутності В-6 (рис. 4.4). При термоінкубації інсуліну у вільному стані переважно утворюються пучки фібрил, які містять розгалужені фібрили і незначну кількість поодиноких зрілих фібрил (близько 10-17 нм у діаметрі, близько 50-280 нм у довжині, рис. 4.4 а-в). Фібрилізація інсуліну у присутності *клозо*-борату призводить до утворення агрегатів у вигляді великих згустків або грудок фібрил різної морфології (розгалужені і нерозгалужені, рис. 4.4 г-и).

При низькій концентрації *клозо*-борату (10 μM), ТЕМ дані показують утворення невеликої кількості поодиноких фібрил (товстіших, ніж для вільного інсуліну, у діаметрі близько 15-30 нм) і латерально агрегованих асоціатів цих фібрил близько 60-310 нм у діаметрі (рис. 4.4 г-е). У випадку високої концентрації *клозо*-борату (100 μM), великі грудки (близько до 330-960 нм, рис. 4.4 з) домінують над розгалуженими латеральними асоціатами (близько 30-320 нм у діаметрі, рис. 4.4 и). У даному випадку поодинокі фібрили знайдено не було (взагалі вони злипаються у нитки діаметром близько 40-50 нм, рис. 4.4 ж). Це свідчить про високу

схильність до злипання фібрил інсуліну в присутності В-6, що підвищується зі збільшенням концентрації кластеру.

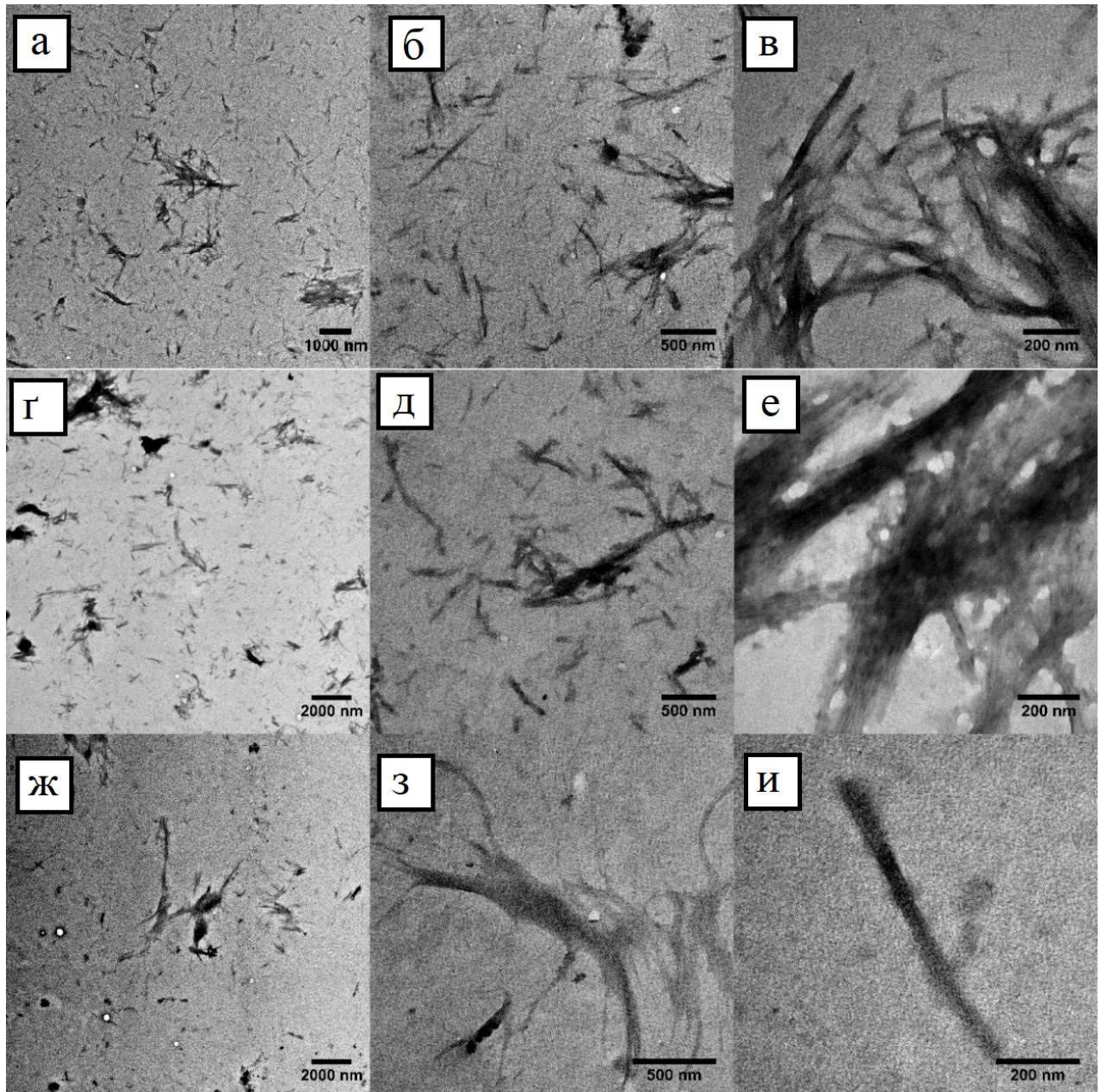


Рис. 4.4. TEM зображення продуктів фібрилоутворення інсуліну: а, б, в – у вільному стані; г, д, е – інсулін з 10 μM В-6; ж, з, и – інсулін з 100 μM В-6

При фібрилізації інсуліну в присутності сульфат дианіону, агрегати, які утворюються, поліморфні. Цей поліморфізм залежить від концентрації аніонів.

Мономери інсуліну утворюють амілоїдні фібрили при низькій концентрації сульфату (0-5 мМ), але при підвищенні концентрації сульфату кінцеві агрегати складаються з суміші аморфних і фібрилярних структур, які відрізняються від звичайних амілоїдних фібрил. Крім того, присутність сульфат аніону індукує утворення більш коротких і розгалужених фібрил у порівнянні з аніоном хлору, який є однозарядним аніоном [231].

Взагалі, морфологія фібрил інсуліну у присутності *клозо*-борат аніону інша, ніж у присутності сульфат аніону. Агрегати, утворенні у присутності *клозо*-борату мають більший діаметр, ніж такі для інсуліну у вільному стані. Інсулін, інкубований з низькими концентраціями кластеру бору (10 μ М), утворює переважно нерозгалужені фібрили (вільний інсулін, навпаки, розгалужені). Проте, інтенсивна агрегація зрілих фібрил, що веде до утворення фібрилярних латеральних агрегатів і грудок, відбувається при високій концентрації *клозо*-борату.

4.2 Розробка барвників для досліджень пов'язаних з амілоїдною агрегацією

Один з найбільш розповсюджених методів для вивчення білок-білкових взаємодій, білок-нуклеїнова кислота, і білок-ліганд є флуоресцентний метод. За його допомогою можна досліджувати процеси агрегації білку, у тому числі, формування амілоїдних фібрил, зв'язування білок-ліганд, зокрема, визначення сайту зв'язування лігандів у білку, сили і механізм зв'язування.

На сьогодні амілоїдна агрегація білків досліджується у двох ключових напрямках: у рамках проблеми утворення патологічних агрегатів і для розробки наноматеріалів на їх основі. Відомо, що білкові агрегати токсичні, у числі їх токсичних властивостей є інтенсивне зв'язування з органелами і компонентами клітини. Раніше вивчалось зв'язування агрегатів лізоциму з нуклеїновими кислотами (НК) у порівнянні з аналогічним нативним білком [232]. Для проведення

подібних досліджень необхідні флуоресцентні барвники двох типів: чутливі до амілоїдних агрегатів і, навпаки, нечутливі до білків і їх агрегатів, а лише до НК різних типів (ДНК, РНК).

Тому у рамках даної роботи вивчалися ціанінові та стирилціанінові флуоресцентні барвники як потенційні зонди для моніторингу і детекції агрегації білків (ціанінові барвники), а також барвинки для визначення НК (стирилціанінові барвники), які потенційно не чутливі до білків і білкових агрегатів.

Було досліджено ефект N,N'-замісників у триметинових ціанінових бензотіазольних барвниках на чутливість до амілоїдних фібрил. Також досліджувалась можливість використання N-алкіларил бензотіазольних стирилціанінових барвників для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот.

4.2.1 Дослідження триметинових ціанінових барвників для визначення амілоїдних фібрил. Було досліджено ефект різних N,N'-замісників у молекулі бензотіазольних триметинових ціанінових барвників (рис. 4.5) на їх здатність детектувати амілоїдні агрегати білку.

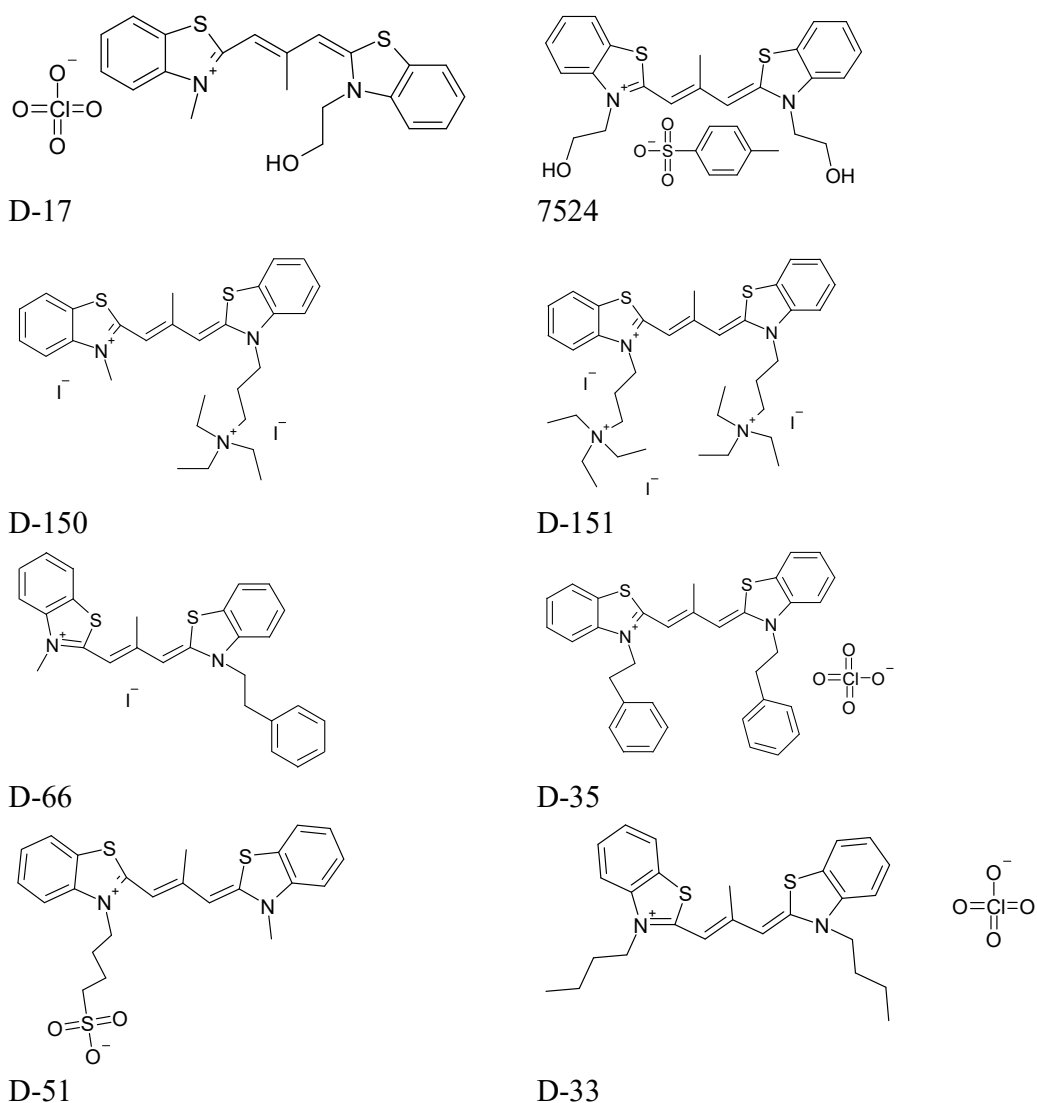


Рис. 4.5. Структури триметинових ціанінових барвників з різними N,N'-замісниками

Барвники, що досліджувались, мають низьку інтенсивність флуоресценції сигнали у вільному стані і у присутності мономерів білку. У присутності агрегованого білку (інсуліну або лізоциму) їх емісійний сигнал різко зростає (рис. 4.6). З таблиць В.1, В.2 (Додаток В) видно, що у залежності від N,N'-замісників, барвники здатні збільшувати емісійний сигнал на порядок при додаванні фібрил.

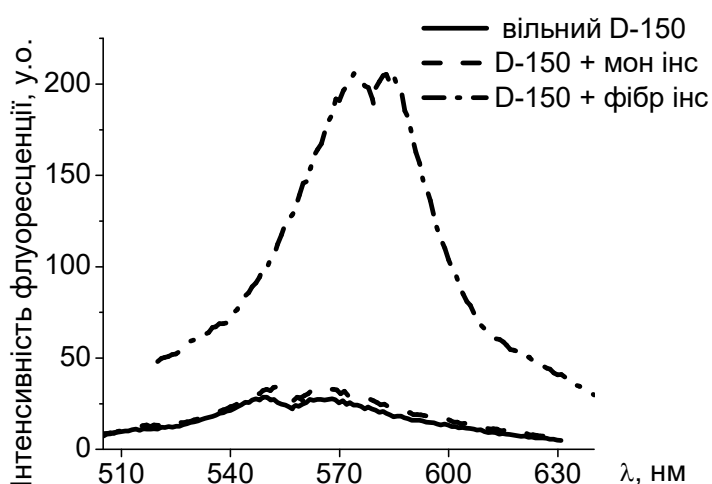


Рис. 4.6. Спектри збудження флуоресценції і емісії флуоресцентного барвнику D-150 у вільному стані, у присутності мономерного і фібрилярного інсуліну

Максимуми спектрів збудження вільних барвників у водному буфері знаходяться у області 547 – 559 нм, спектрів емісії – 564-574 нм. Додавання інсуліну або лізоциму не призводить до зсуву положення максимумів збудження або емісії або зміщує незначно (до 9 нм) у довгохвильовий бік (наприклад у випадку 7524 з інсуліном, табл. В.1, Додаток В).

Барвники з бутильними (D-33), гідроксиалкільною (D-17), фенілалкільною (D-66, D-35) групами мають вищу флуоресцентну чутливість до фібрил лізоциму, тоді як з четвертинними аміногрупами (D-151) приводить до чутливості до фібрил інсуліну. Найбільш інтенсивний флуоресцентний відгук на присутність обох фібрилярних білків було показано для барвнику D-51 з сульфоалкільною групою (до 70 разів, Додаток В, таблиці В.1, В.2). Барвники мають високі значення квантового виходу (до 0.42 для барвнику D-51 з фібрилярним інсуліном, Додаток В, табл. В.3).

За допомогою ціанінових барвників з N-сульфоалкільним (D-51) і N,N'-аміноалкільними (D-151) замісниками можливо проводити моніторинг кінетики реакції фібрилізації білку з задовільною відтворюваністю (рис. 4.7).

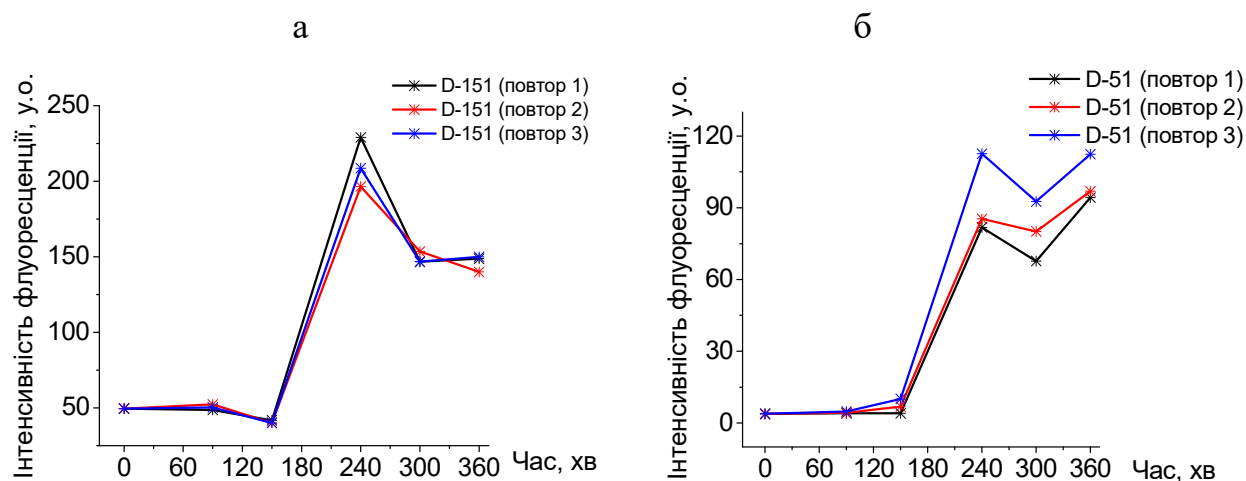


Рис. 4.7. Кінетика фібрилоутворення людського інсуліну, оцінена за допомогою барвників D-51 (а) і D-151 (б). Концентрація барвнику 2 μM

Барвники, які досліджувались, мають широкий лінійний діапазон детекції фібрилярних агрегатів від 0.8 до 300 мг/мл (у випадку D-51 з фібрилярним лізоцимом [233]). Значення констант зв'язування барвників з фібрилярним інсуліном порядку 10^4 M^{-1} [233].

Значний ефект природи N,N'-замісників на флуоресцентну чутливість молекули барвнику до фібрилярного білку свідчить про важливу роль цих груп при зв'язуванні і/або при орієнтації молекули ціанінових барвників при взаємодії між цими замісниками і бічними ланцюгами білків.

4.2.2 N-алкіларил бензотіазол стирилціанінові барвники для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот. Серія бензотіазольних стирилціанінів з різними N-алкіларильними замісниками, **Sbt1 – Sbt4** (рис. 4.8) була охарактеризована у якості потенційних флуоресцентних зондів для визначення нуклеїнових кислот, які не чутливі до амілоїдних агрегатів або нативних білків.

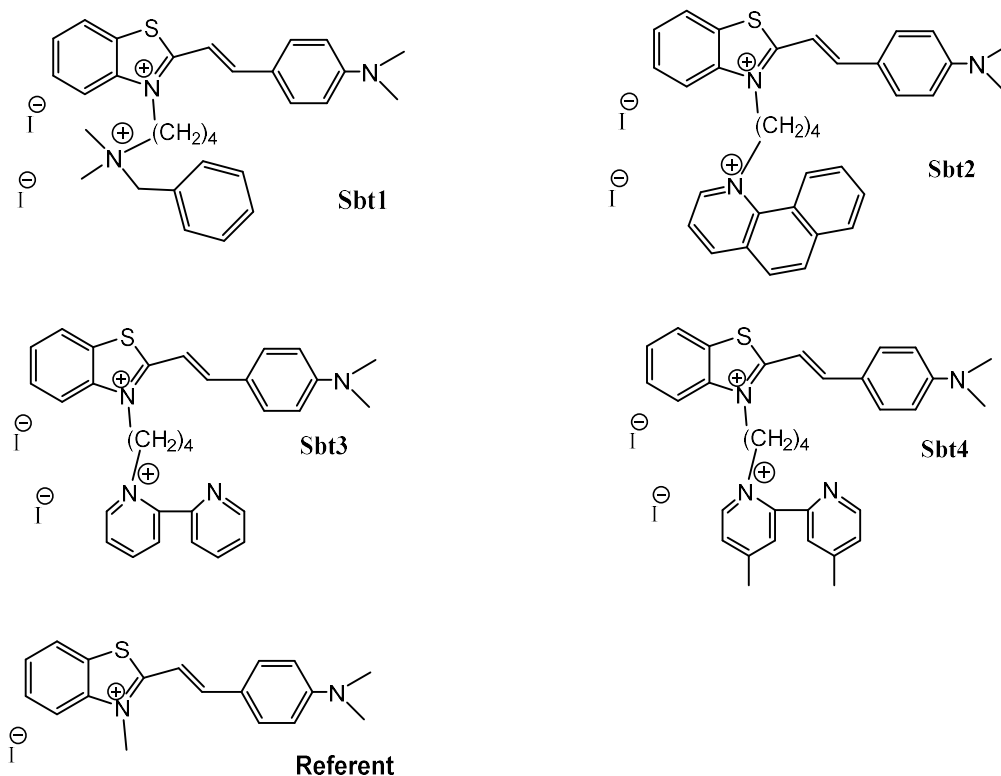


Рис. 4.8. Структури бензотіазол стирилціанінових барвників

Флуоресцентні максимуми барвників знаходяться у області 533–535 нм і 596–597 нм, що на 6 нм зміщено відносно референтного бензотіазольного стирилціанінового барвника з N-метильним замісником (Додаток В, табл. В.4). Барвники мають слабку флюоресценцію у вільному стані, але при зв'язуванні з длДНК / РНК значно підвищують емісію (до 83 разів при зв'язуванні **Sbt1** з N-алкілбензиламіною групою з ДНК, рис. 4.9, Додаток В, табл. В.4), положення максимумів збудження/емісії зсуваються у довгохвильовий бік (до 38 нм). Проте, барвники низько чутливі до амілоїдних фібрил інсуліну і нативного білку (БСА): збільшення інтенсивності сигналу у 2-11 разів і 2-4 рази відповідно (Додаток В, таблиця В.5). Було показано, що стирилціанін **Sbt1**, який має найбільш інтенсивний сигнал у присутності обох типів НК, найменш чутливий до нативного білку і фібрилярних агрегатів (підвищення сигналу лише у 2 рази у обох випадках).

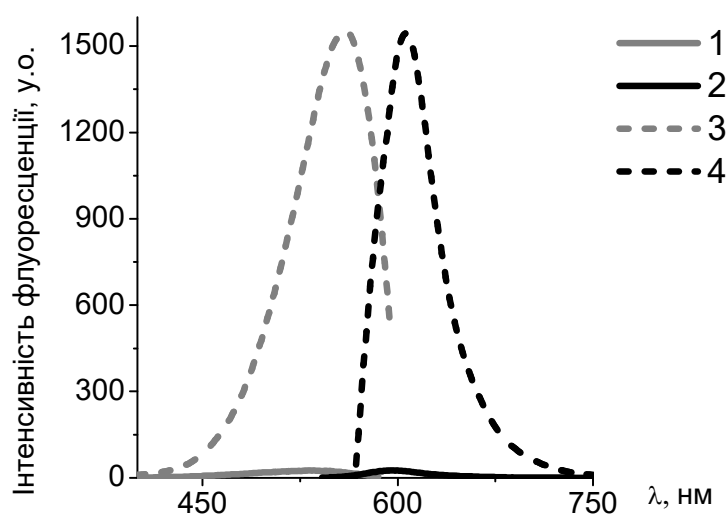


Рис. 4.9. Спектри збудження (1, 3) і емісії (2, 4) **Sbt1** за відсутності (1, 2) та у присутності (3, 4) длДНК

У комплексі з ДНК квантові виходи стирилціанінів є середніми (до 22%, Додаток В, табл. В.4). Структура термінальної ароматичної групи в N-заміснику може визначати здатність барвнику відрізняти длДНК і РНК, наприклад у **Sbt2** з N-алкілфенантроліновою групою емісія зростає в 14 і 55 разів відповідно (Додаток В, табл. В.4). Константа зв'язування **Sbt1** з длДНК (K_b) має середнє значення ($5.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) [234], що є типовим для інтеркаляторів. Межа визначення длДНК у розчині для **Sbt1** 0.4 μg ($6.2 \cdot 10^7 \text{ M}$ пар основ) [234]. Показано, що пост-електрофоретичне забарвлення низької концентрації ДНК (3.6 нг/лінія) за допомогою **Sbt3** барвника з N-алкілдіпіридилною групою дає більш чітку візуалізацію у порівнянні з широко використовуваним бромистим етидієм (рис. 4.10).

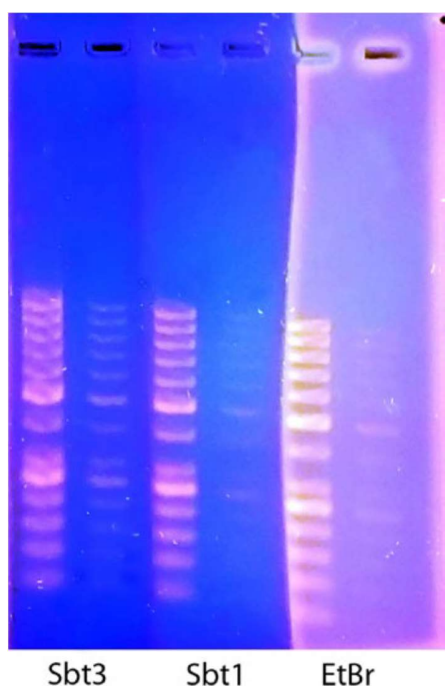


Рис. 4.10. Пост-електрофоретичне забарвлення ДНК в агарозному гелі за допомогою бромистого етидію (EtBr) і стирилціанінових барвників. Збудження флуоресценції УФ-світлом на 312 нм

Висновки до розділу:

1. Вперше було досліджено і охарактеризовано реакцію фібрилізації білку під дією дианіонного кластеру бору – гідроген *клозо*-додекаборату $[B_{12}H_{12}]^{2-}$. Було показано, що денатурація інсуліну інтенсифікується під дією *клозо*-борату, при низьких концентраціях кластеру (10 μ M) прискорюється утворення амілоїдних фібрил. *Клозо*-борат індукує зміни у морфології фібрил: формуються нерозгалужені структури з більшим діаметром, ніж при фібрилізації вільного інсуліну; здатність до латеральної агрегації сильно збільшується при збільшенні концентрації В-6 (до 100 μ M). Завдяки цим властивостям *клозо*-борат представляє інтерес для дослідження, як агент для спрямування реакції фібрилізації і подальшого аналізу ефектів аніонів на конформаційні зміни білку і агрегацію.

2. Досліджено ряд бензотіазольних триметинових ціанінових барвників з N,N'-замісниками, які показали значне підвищення інтенсивності флуоресценції і високі значення квантового виходу у присутності амілоїдних фібрил (до 70 разів і до 0.42, відповідно). Показано, що модифікування барвників функціональними замісниками по N,N'-позиціях змінює чутливість до типу фібрилярного білку (показано на інсуліні і лізоцимі), тому може бути запропоновано як ефективний шлях створення молекул з підвищеною чутливістю до фібрилярного білку.
3. Досліджено серію бензотіазольних стирилціанінових барвників з різними N-алкіларильними замісниками, які показали значне підвищення інтенсивності флуоресценції при зв'язуванні з длДНК / РНК (до 83 разів). Ці барвники низькочутливі до нативного білку і фібрилярних агрегатів, що важливо при проведенні досліджень у присутності цих компонентів. Завдяки чутливості нових стирилціанінів до НК в розчині та при гель-електрофорезі, вони можуть бути запропоновані в якості фотостабільних низькотоксичних недорогих флуоресцентних зондів для рутинних лабораторних експериментів.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1. The discovery of the effect of *closo*-borate on amyloid fibril formation / M. Kuperman, S. Chernii, O. Varzatskii, A. Zhdanov, A. Bykov, K. Zhizhin, S. Yarmoluk, V. Kovalska // ChemistrySelect. – 2017. – Vol. 2(34). - P. 10965–10970.
2. N-alkylaryl styrylcyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids detection / Kuperman MV, Snihirova YV, Kryvorotenko DV, Losytskyu MY, Kovalska VB, Yarmoluk SM // Biopolymers & Cell. – 2018. - Nov 1;34(5) – P. 374-386.
3. Trimethine cyanine dyes as fluorescent probes for amyloid fibrils: the effect of N,N'-substituents / M. Kuperman, S. Chernii, M. Losytskyu, D. Kryvorotenko, N. Derevyanko, Yu. Slominski, V. Kovalska, S. Yarmoluk // Anal Biochem. – 2015. – Vol. 484. - P. 9-17.

РОЗДІЛ 5.

ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЙ БІЛКІВ З КЛАТРОХЕЛАТАМИ ЗАЛІЗА (II)

Для дослідження зв'язування білок-ліганд з біоактивними макроциклами – клатрохелатами заліза (II) – були обрані сироваткові альбуміни (бичачий і людський) і β -лактоглобулін. Вибір білків був зроблений враховуючи те, що усі три білки є транспортними, але структурно два з них є подібними (родинними) і один відрізняється. Для визначення ролі замісників клатрохелату при цій взаємодії було обрано ряд макроциклів з різними типами, ізомерією і кількістю реберних замісників (ди- карбоксиалкільні, ди- гідроксиалкільні, ди- метил естерні, ди- метил амідні; моно/ди/гекса- карбоксифенільні, рис. 5.1, 5.2).

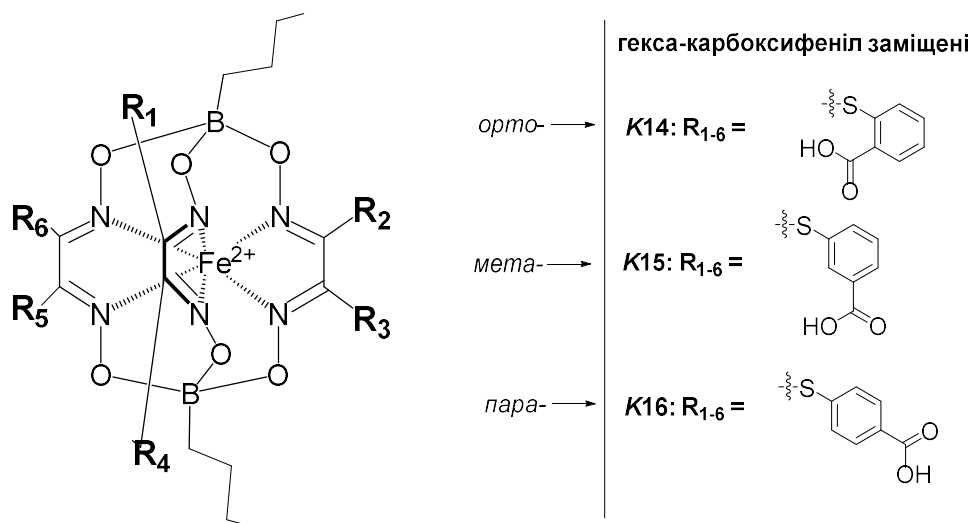
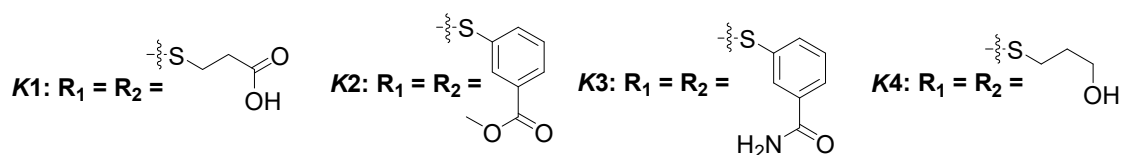


Рис. 5.1. Структури гекса- заміщених клатрохелатів заліза (II)



клатрохелати з карбоксифенільними замісниками:

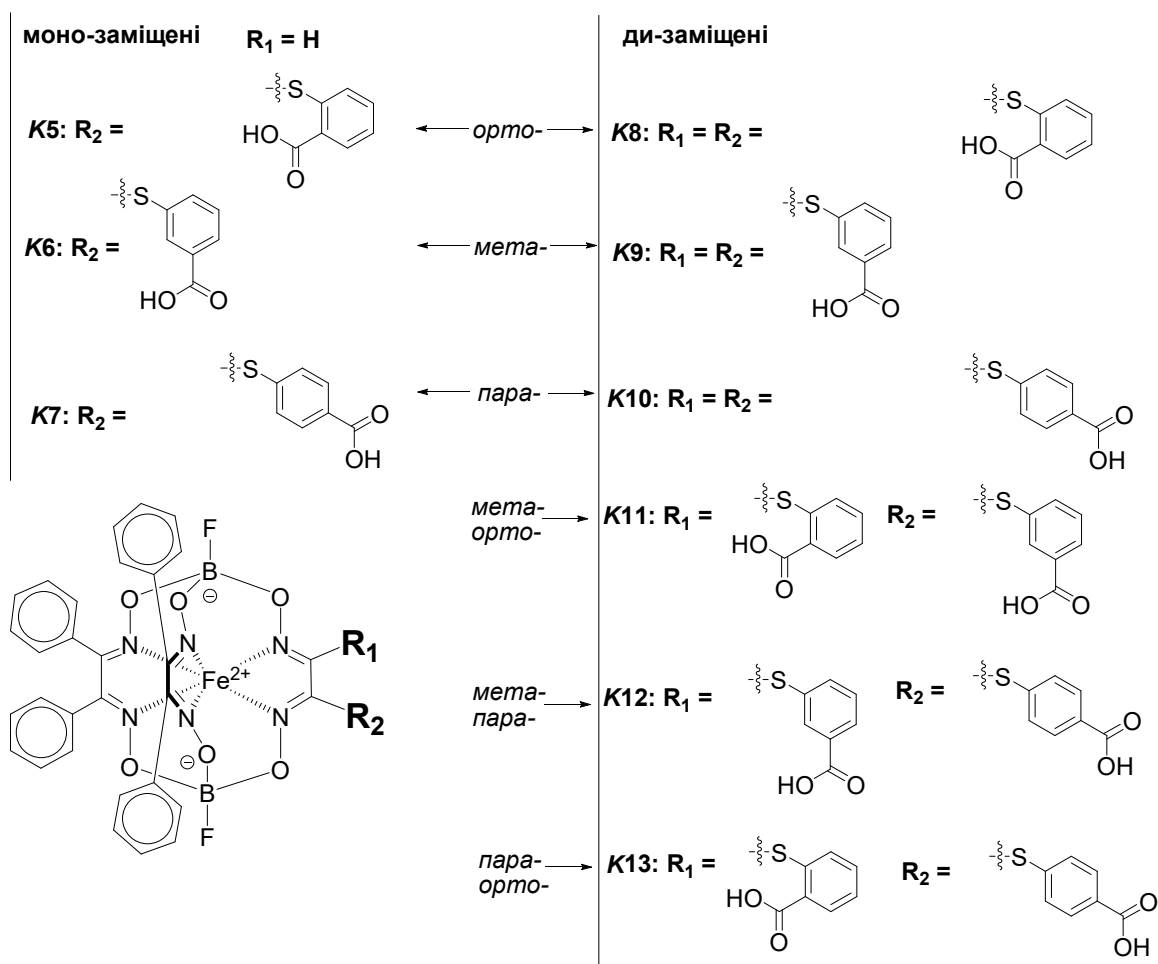


Рис. 5.2. Структури клатрохелатів заліза (II)

Розчини клатрохелатів заліза (II) мають смуги переносу заряду (СПЗ) $Fed \rightarrow L\pi^*$ в π -спряженому клатрохелатному остові: у видимій області спектру з максимумом у діапазоні 480 – 520 нм у залежності від замісників (рис. 5.3). Крім того, спектри макроциклів містять інтенсивні смуги у УФ області, які зумовлені

π, π^* -переходами у α -діоксиматних хелатуючих фрагментах клатрохелатного остову і ароматичних фрагментах реберних замісників.

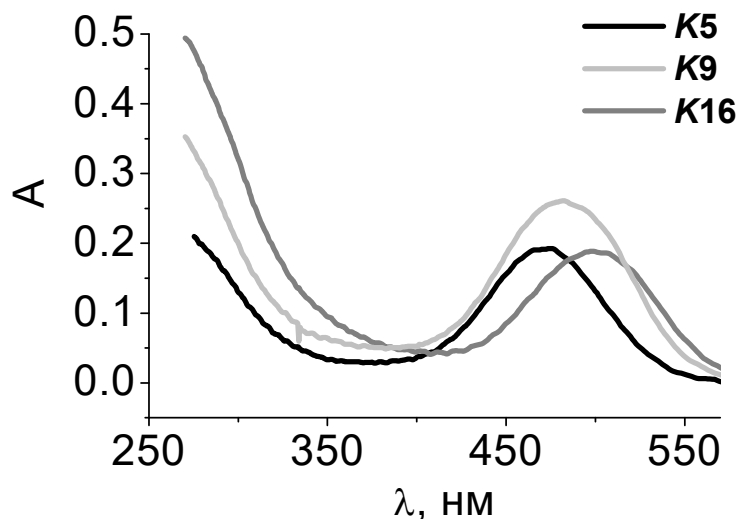


Рис. 5.3. Спектри поглинання клатрохелатів заліза (II). (моно-орто-, **K5**, ди-мета-, **K9**, гекса-пара-, **K16**, ізомери)

Взаємодію білка з клатрохелатом і залежність сили зв'язування від типу, ізомерії і кількості замісників в макроциклі досліджували за допомогою методу гасіння власної флуоресценції білку.

Завдяки специфічній геометрії MN_6 поліедру клатрохелат може генерувати специфічну КД-відповідь при зв'язуванні макроциклу з хіральним індуктором, яким може виступати білок у комплексі білок-клатрохелат [235]. Це означає, що у вільному стані клатрохелат хіральний, але не має оптичної активності тому, що його конформація знаходиться у динамічній рівновазі між перекрученими у лівий і правий бік формами. При взаємодії білок-клатрохелат фіксування клатрохелату в одній з форм призводить до виникнення у нього оптичної активності, що проявляється у появі КД сигналу. Здатність клатрохелатів заліза (II) індукувати хірооптичний сигнал у видимій області спектру і залежність інтенсивності КД сигналу від типу, ізомерії і кількості замісників у клатрохелаті було досліджено за допомогою спектроскопії кругового дихроїзму. Можливість клатрохелатів

генерувати відмінні КД-спектри при взаємодії білок-ліганд визначали на подібних (бичачий і людський сироваткові альбуміни) білках. Також досліджували чутливість клатрохелатів до різних конформацій альбуміну (через різні зміни значень рН) методами гасіння власної флуоресценції білку і спектроскопії кругового дихроїзму.

Визначення сайту зв'язування клатрохелатів у білку було проведено методом замісного титрування клатрохелату у комплексі з альбуміном специфічними до сайтів 1 і 2 лігандами (варфарином і ібупрофеном відповідно) методом кругового дихроїзму. Термодинамічні характеристики комплексоутворення альбумін-клатрохелат були отримані методом ізотермічної калориметрії титрування.

5.1 Дослідження зв'язування альбумін-клатрохелат методом гасіння власної флуоресценції білку

Можливість утворення комплексів між альбумінами та клатрохелатами заліза (II) було досліджено шляхом аналізу впливу цих металокомплексів на власну флуоресценцію білку. Для експерименту були обрані БСА і ЛСА. Результати експерименту показують зміни інтенсивності флуоресценції білку при збільшенні концентрації клатрохелатів, представлено на рис. 5.4, 5.7 а. Було показано, що взаємодія БСА з клатрохелатами призводить до значного гасіння емісії білку (рис. 5.4, 5.7 а), а також до короткохвильового зсуву максимуму цього піку (рис. 5.5). Це вказує на утворення комплексу між білком і клатрохелатом [52]. Найбільш виражений ефект на власну флуоресценцію білку був у випадку клатрохелатів **K1**, з двома карбоксиалкільними, **K8 – K16**, двома і шістьма карбоксифенільними групами (гасіння флуоресценції у 7 – 17 разів), тоді як гасіння флуоресценції було менш значним у випадку клатрохелатів **K5 – K7**, з однією карбоксифенільною групою (у 4.1 – 6.6 разів) або не вираженим для комплексів **K2 – K4**, з естерними, амідними, гідроксиалкільними групами (до 1.2 разів).

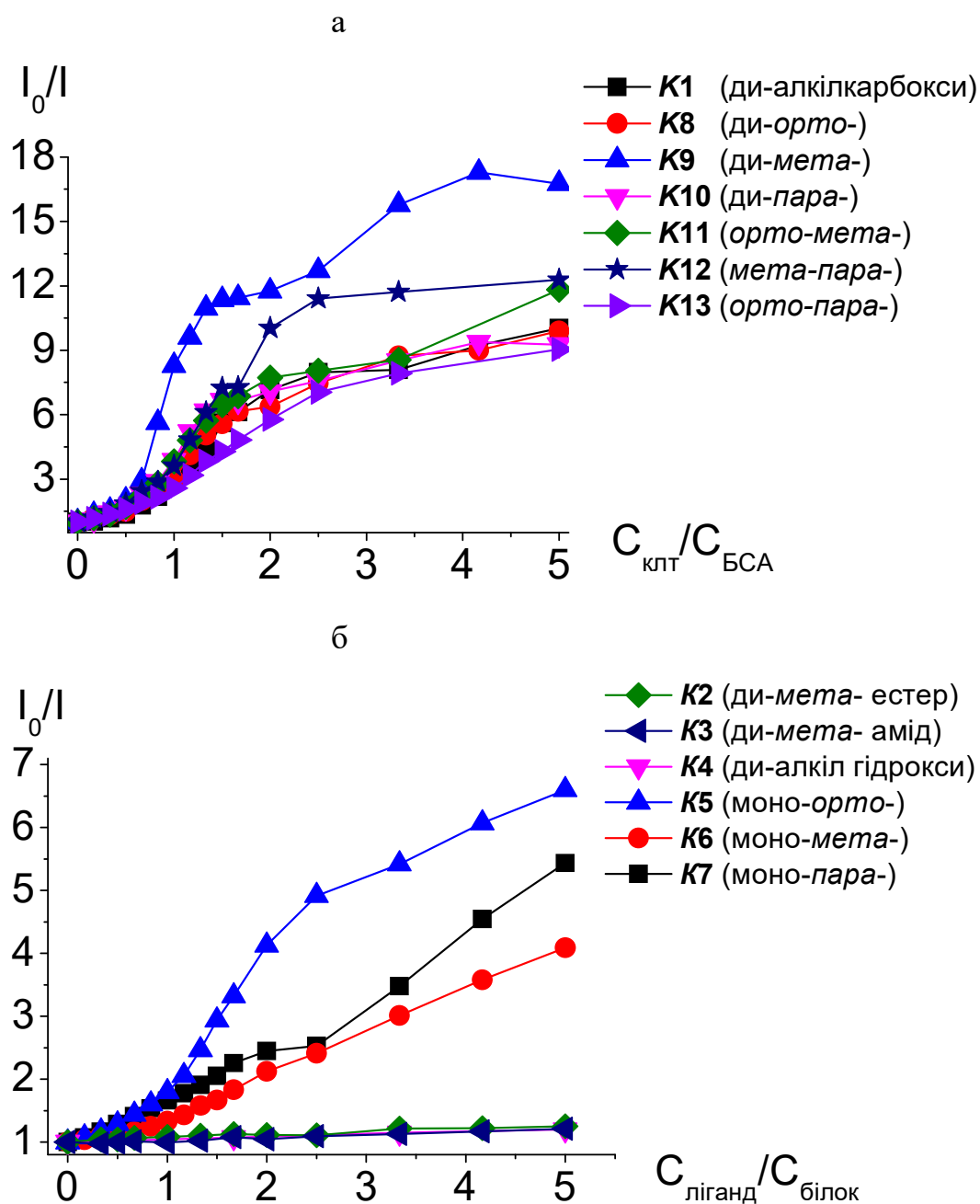


Рис. 5.4. Графіки гасіння люмінесценції БСА клатрохелатами у залежності від співвідношення концентрацій клатрохелату до білку. I_0 та I – інтенсивність флуоресценції у відсутності та у присутності клатрохелатів заліза (II)

З графіків видно, що до точки, де співвідношення білку до клатрохелату 2:1, гасіння власної флуоресценції незначне (до 2.7 разів у випадку гекса- карбоксо-

заміщеного клатрохелату, рис. 5.7 а). При еквімолярних кількостях БСА і клатрохелату, гасіння флуоресценції БСА ди-*мета*-карбоксіфеніл заміщеним клатрохелатом, **K9**, було значно більше (гасіння у 8.3 разів), ніж іншими металокомплексами (2.9 – 5.2 разів, рис. 5.4, 5.7 а). Гасіння емісії БСА клатрохелатами з двома карбоксильними групами (крім ізомерів з *мета*- групою, **K9**, **K11**, **K12**) було схожим (у 9.0 – 10.0 разів), що дещо відрізнялося від комплексів з 6 карбоксильними групами, **K13** - **K16** (гасіння у 6.9 -7.6 разів, рис. 5.7 а). Найбільш інтенсивно гасять флуоресценцію БСА клатрохелати з *мета*-карбоксіфенільними замісниками: ди-*мета*- ізомер, **K9**, інтенсивніше (до 16.7 разів), ніж ізомери з лише з одною *мета*- карбоксіфенільною групою з двох, **K11**, **K12** (до 12.3 разів).

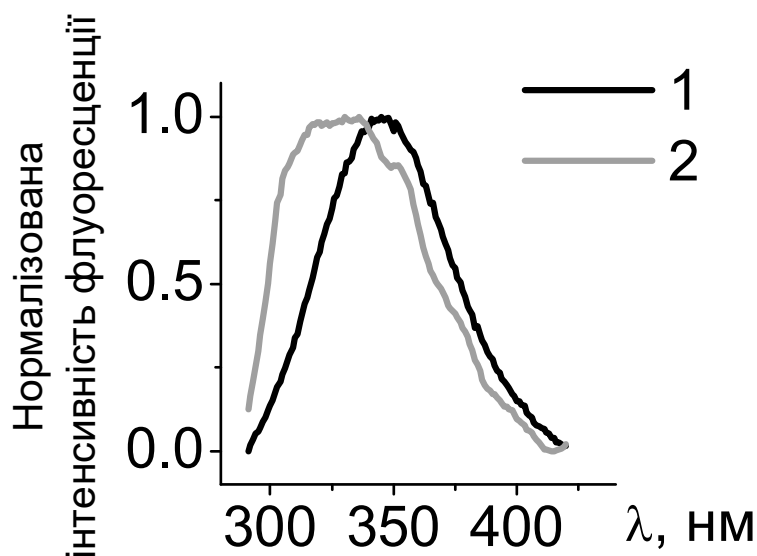


Рис. 5.5. Нормалізовані спектри флуоресценції бичачого альбуміну у вільному стані і у присутності ди-*мета*-карбоксіфенільного клатрохелату, **K9**:

1 – БСА у вільному стані,

2 – БСА у присутності 15 μM **K9**

Вплив на емісію ЛСА був менш значним (гасіння до 2.3 разів, рис. 5.6), що може бути пов'язано з кількома чинниками, у тому числі, менш доступним лише одним Трп амінокислотним залишком (див. вище, розділ 3.1).

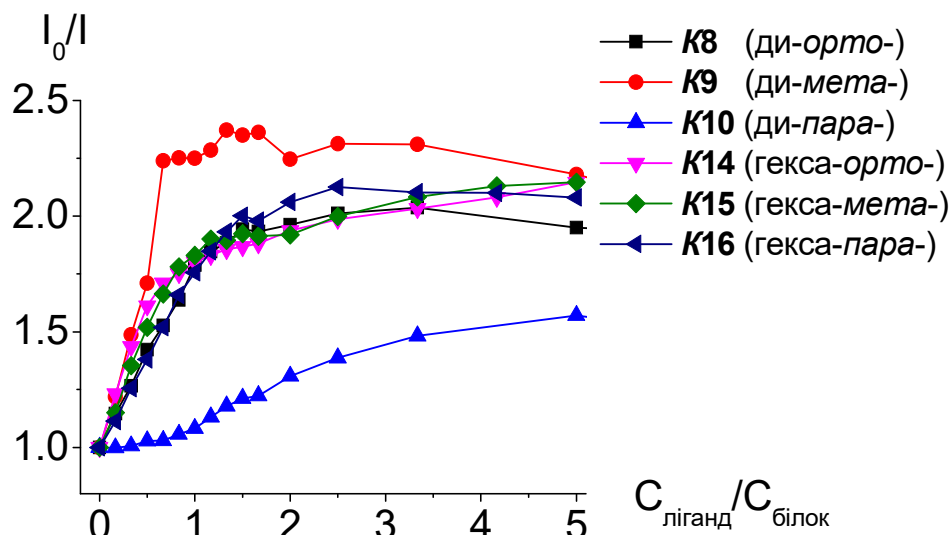


Рис. 5.6. Графіки гасіння люмінесценції ЛСА клатрохелатами у залежності від співвідношення концентрацій клатрохелату до білку. I_0 та I – інтенсивність флуоресценції у відсутності та у присутності клатрохелатів

Схоже гасіння флуоресценції БСА і ЛСА (дані при збудженні на 295 нм не наведено) гекса-карбоксіфеніл заміщеними клатрохелатами при збудженні на довжинах хвиль 280 і 295 нм вказує на вплив, переважно, на флуоресценцію Трп амінокислотних залишків (рис. 5.7). Триптофанові залишки розташовані у сайті 1 альбумінів (Трп-213 і Трп-134 у субдоменах **IIA** і **IIB** БСА; Трп-214 у субдомени **IIA** ЛСА), тому можна припустити, що зв'язування між клатрохелатом і білком відбувається біля них.

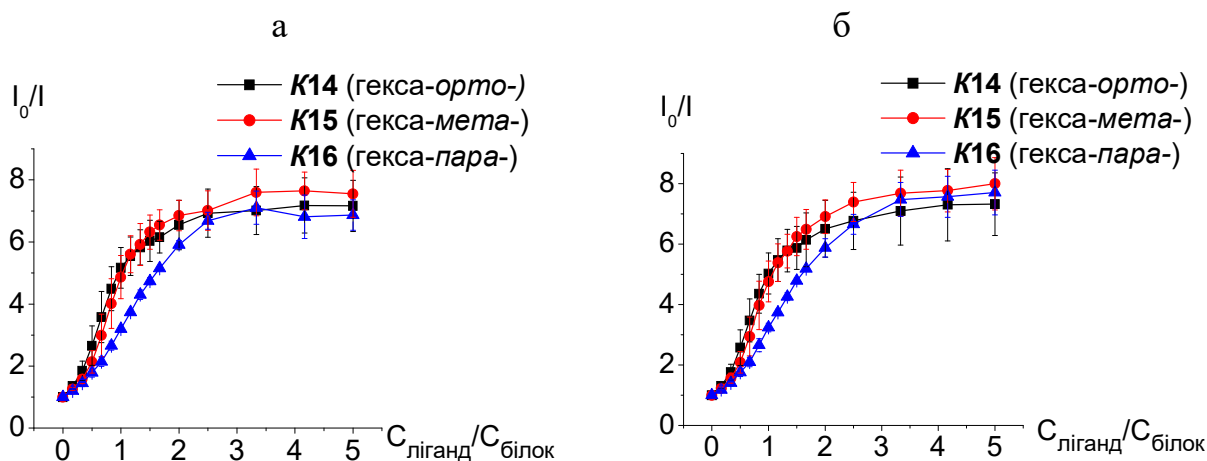


Рис. 5.7. Графіки гасіння люмінесценції БСА (а – при $\lambda_{\text{збф}} = 280$ нм; б – при $\lambda_{\text{збф}} = 295$ нм) клатрохелатами у залежності від співвідношення концентрацій клатрохелату до білку. I_0 та I – інтенсивність флуоресценції у відсутності та присутності клатрохелатів

5.2 Дослідження КД-спектрів клатрохелатів, індукованих внаслідок їх взаємодії з альбуміном

Здатність клатрохелатів заліза (II) генерувати хірооптичний сигнал було досліджено у видимій області спектру (350 – 600 нм), де знаходяться характеристичні СПЗ $Fed \rightarrow L\pi$ металокомплексів цього типу.

У вільному стані клатрохелати заліза (II) оптично неактивні, тому смуги у КД-спектрах їх буферних розчинів відсутні (K9, рис. 5.8 б). При додаванні альбуміну, клатрохелати здатні генерувати КД-відгук, який за інтенсивністю і формою залежить від структури і кількості замісників у молекулі макроциклу. У присутності і за відсутності БСА КД-спектри клатрохелатів в області 300 – 600 нм показані на рис. 5.8; інтенсивності КД-відгуку, виражені як різниця між максимумом і мінімумом інтенсивності піку по модулю (ΔK_D) наведені у таблиці 5.1.

Зв'язування альбуміну і клатрохелатів з карбоксифенільними групами індукувало найбільш виражені КД-сигнали у спектрах (рис. 5.8 а). У випадку

клатрохелатів з двома або однією карбоксифенільними групами КД-спектри мають схожу форму, з максимумами близько 350, 450, 515 нм, причому інтенсивність КД-смуг залежить від кількості та ізомерії замісників.

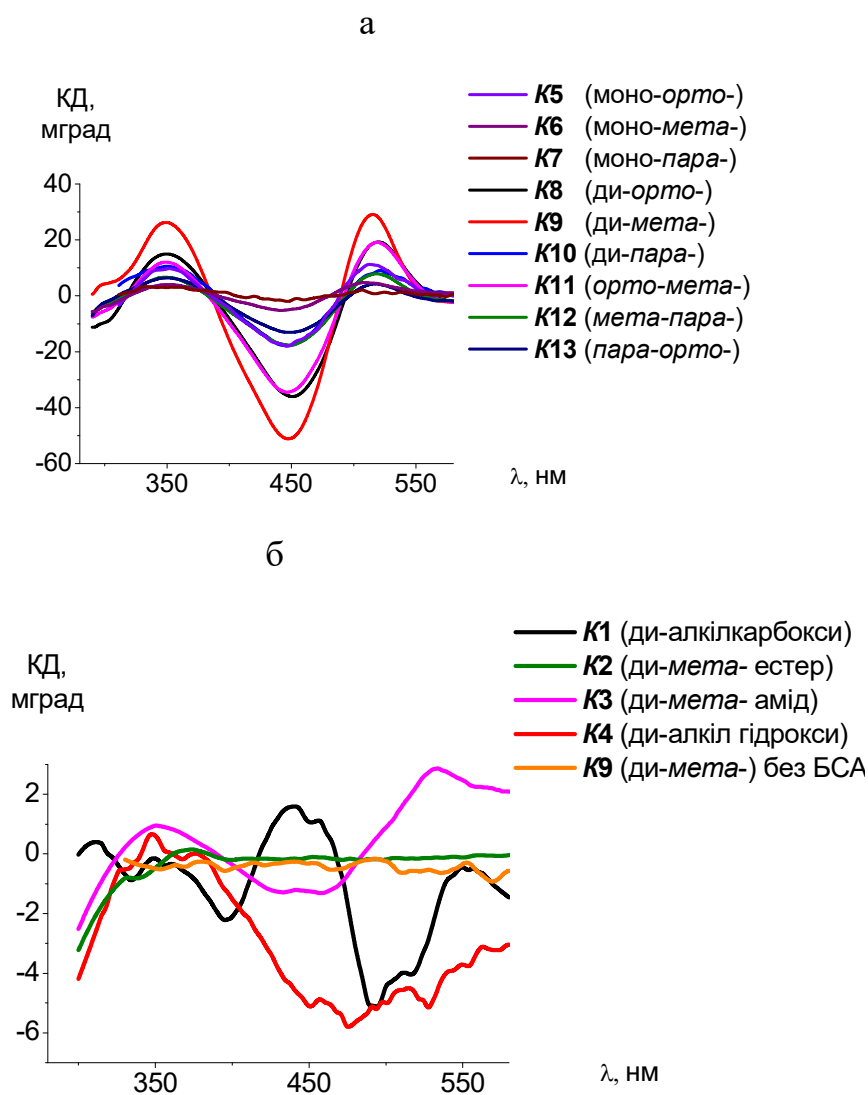


Рис. 5.8. ІКД спектри комплексів БСА з клатрохелатами

Найбільш інтенсивний КД-сигнал (80.2 мград, табл. 5.1) був у випадку зв'язування альбуміну з клатрохелатом з двома *мета*- карбоксифенільними групами, **K9**. КД-смуги у випадках *ди-орто*- і *ди-пара*- карбоксифенільними, **K8** -

K10, а також ізомерних моно-карбоксифеніл- заміщених клатрохелатів, **K5 – K7**, були менш інтенсивні (5.0 – 55.3 мград, табл. 5.1). Клатрохелати, **K1, K3, K4**, з карбоксиалкільними, амідними, гідроксиалкільними групами у присутності БСА мали низькоінтенсивні КД-спектри (до 6.7 мград), з естерними групами, **K2** – не генерували сигнал (рис. 5.8, табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Інтенсивність КД-спектрів клатрохелатів у складі комплексу з БСА і у вільному стані (для K9)

Клатрохелат	*ΔКД (міліград)	Клатрохелат	*ΔКД (міліград)
K1	6.7	K8	55.3
K2	0.3	K9	80.2
K3	4.2	K10	28.1
K4	6.4	K11	53.5
K5	29.1	K12	25.4
K6	10.0	K13	19.4
K7	5.0	K9 без БСА	1.6

Примітка. *ΔКД= /КД_{max}/+ /КД_{min}/ – інтенсивність КД сигналу у присутності БСА

КД-спектри були отримані при молярному співвідношенні білку до клатрохелату 2 до 1, коли виникають найбільш інтенсивні КД-сигнали (рис. 5.9). Зміна молярного співвідношення до 1:4, в основному, впливає на інтенсивність відповідних КД-сигналів, тоді як форма і довжина хвилі максимумів змінюється незначно (рис. 5.9).

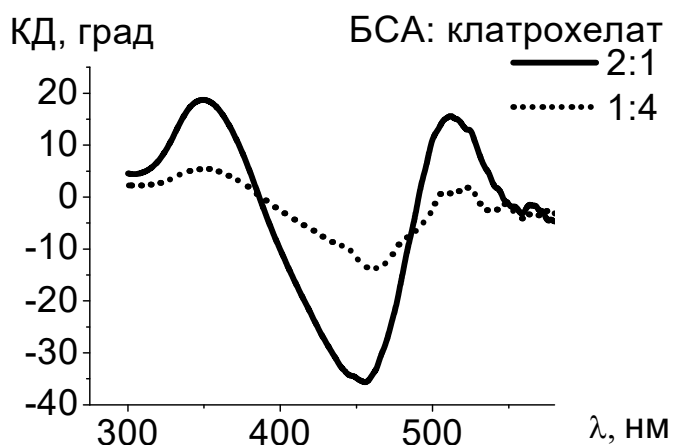


Рис. 5.9. КД-спектри ди-*мета*-карбоксіфенільного клатрохелату з білком при різних співвідношеннях БСА до клатрохелату

Таким чином, було показано, що при зв'язуванні альбуміну з клатрохелатами металокомплекси здатні генерувати КД-сигнали у видимій області спектру. Інтенсивність і форма КД-відгуку на білок зумовлювалась природою, кількістю і ізомерією замісників у молекулі клатрохелату. Клатрохелати з кінцевими карбоксіфенільними групами індукували найбільш інтенсивні КД-сигнали.

5.3 Чутливість клатрохелатів до конформаційних відмінностей білків

5.3.1 КД-чутливість клатрохелатів до структури білків різної та родинно-близької природи. Для визначення чутливості клатрохелатів до структури білку було порівняно КД-відгуки при зв'язуванні з білками різної (β -лактоглобулін і альбуміни) або родинно-близької природи (БСА і ЛСА). Дослідження було зроблено для металокомплексів **K14** – **K16**, з 6 ізомерними (*орто*-, *мета*-, або *пара*-) карбоксіфенільними групами.

При утворенні комплексів з БСА і ЛСА в залежності від ізомерії клатрохелату його КД-відгук відрізняється за інтенсивністю (у випадку *мета*-ізомеру, **K15**) або також за формою (для *орто*- і *пара*-ізомерів, **K14** і **K16**, рис. 5.10) КД-смуг.

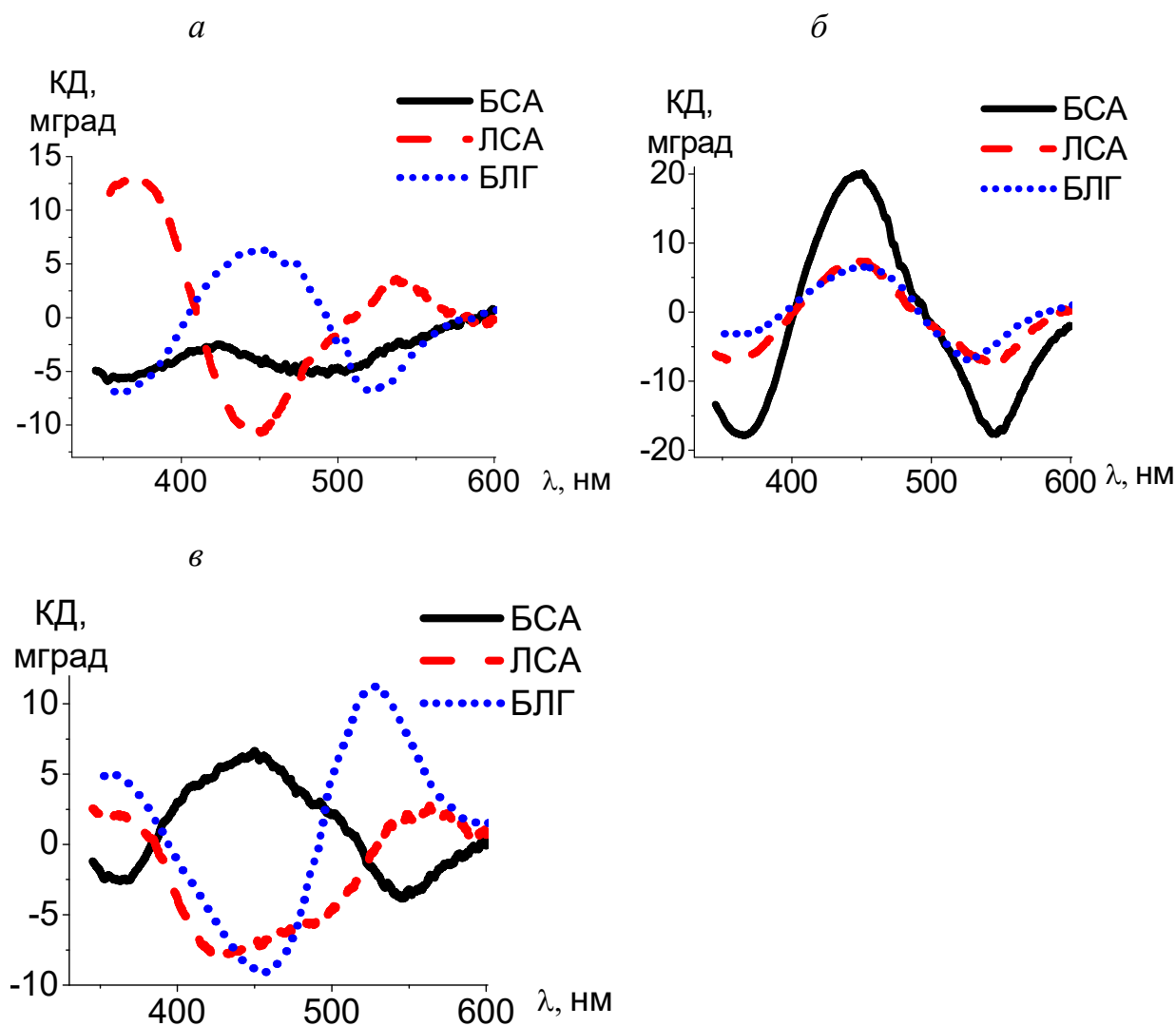


Рис. 5.10. ІКД спектри орто- (а), мета- (б), пара- (в) ізомерів гекса-карбокси клатрохелатів у присутності БСА, ЛСА і БЛГ

ІКД-спектр *орто*- ізомеру, **K14**, у присутності ЛСА інтенсивніше, ніж у комплексі з БЛГ, положення максимумів і форма КД-смуг відрізняються (з ЛСА мінімумом близько до 447 нм, з БЛГ максимумом близько до 447 нм, рис. 5.10 а). ІКД-спектр *орто*- ізомеру у присутності БСА слабковиражений (рис. 5.10 а). ІКД-смуги *пара*- ізомеру, **K16**, з БСА і ЛСА подібні дзеркальним відображенням одне відносно одного до горизонтальної осі (позитивний спектр для БСА з максимумом на 445 нм і негативний для ЛСА з мінімумом на 435 нм, рис. 5.10 в). ІКД-смуги

пара- ізомеру у присутності БЛГ відрізняються від індукованих альбумінами формою і положенням екстремумів (інтенсивні максимум на 456 нм і мінімум на 526 нм, рис. 5.10 в).

З рис. 5.8 і 5.10 також видно, що ІКД-смуги у присутності БСА для гексакарбоксифеніл- заміщених клатрохелатів значно менш інтенсивні, ніж такі для дикарбоксифеніл- заміщених аналогів. Проте, у комплексі з альбумінами ди- і монокарбоксифеніл- заміщені ізомери мають ІКД-спектри однакової форми, з інтенсивним негативним піком близько до 450 нм.

Завдяки значним відмінностям між ІКД-спектрами, які виникають при зв'язуванні білків з ізомерними клатрохелатами, можна припустити, що ізомерія кінцевих карбоксифенільних груп впливає на організацію комплексу з білком і його стабільність.

Таким чином, клатрохелати проявляють ІКД-чутливість до білків різної та родинно-близької природи, тобто здатні відрізнити БЛГ, БСА і ЛСА за різницею ІКД-спектрів (більш виражено у випадках *орто*- і *пара*- заміщених макроциклів, **K14**, **K16**, менш виражено для *мета*- ізомеру, **K15**).

Різниця у послідовності, а отже й структурі альбумінів веде до перебудови сайтів зв'язування БСА і ЛСА. Тому різні ІКД-сигнали можуть бути наслідком різної організації комплексів БСА-клатрохелат і ЛСА-клатрохелат через структурні відмінності сайтів зв'язування.

5.3.2 Вивчення чутливості клатрохелатів до змін конформації альбуміну.

Чутливість клатрохелатів до конформаційних змін білку було вивчено методом гасіння власної флуоресценції білку і спектроскопії кругового дихроїзму. Конформаційні зміни альбуміну були спричинені змінами рН середовища (табл. 5.2). Відомо, що альбуміни змінюють власну конформацію при різних рН [236, 237].

Таблиця 5.2

Конформації альбуміну при різних рН значеннях середовища

Конфомер	F (швидка)	↔	N (нормальна)	↔	B (основна)
Інтервал рН	2.7- 4.3		4.3 – 8		8-10
рН перехід		4.3		8	

Альбумін має нормальну або *N*-форму у області рН 4.3 – 8. При рН 2.7 – 4.3 альбумін знаходиться у швидкій формі (*F*-формі), яка, головним чином, пов'язана з розвертанням домену **III** (і, відповідно, сайту зв'язування 2) без значного впливу на решту молекули. При переході з *N*-форми до основної конформації (*B*-форми, рН 8-10), відбуваються зміни нативної конформації у домені **I** [238]. Було показано, що у нативній конформації субдомени **IIA** і **IIIA** мають спільну межу, що припускає існування взаємодії між двома головними сайтами зв'язування (сайт 1 і сайт 2). При *B*-конформації збільшується відстань між цими субдоменами і, внаслідок цього, взаємодія зникає [239]. Зміни у ІКД-спектрах комплексів білок-клатрохелат були досліджені для обох альбумінів, тоді як експеримент з гасіння флуоресценції – лише для БСА (оскільки гасіння емісії ЛСА менш виражене).

5.3.2.1 Дослідження впливу клатрохелатів на власну флуоресценцію білку. Флуоресцентне титрування БСА гекса- клатрохелатними ізомерами при різних рН виявило (рис. 5.11 а, рис. Г.1, Додаток Г): слабкий ефект на власну флуоресценцію БСА при рН 3.7 (гасіння до 1.8 разів, *F*-конформація), значний ефект – при рН 6 (гасіння у 15-37 разів, *N*-конформація), середній ефект – при рН 7.9 (гасіння близько 7 разів, *N*–*B* перехід).

Інтенсивність гасіння власної флуоресценції білку також залежить від ізомерії (*орто*- / *мета*- / *пара*-) молекули клатрохелату. Максимальна різниця інтенсивності гасіння флуоресценції від рН (від 2 до 37 разів для *F*- і *N*-форм БСА відповідно) була отримана для гекса-*пара*-карбоксифеніл- заміщеного

клатрохелату, **K16** (Додаток Г, рис. Г.1). Найбільш значна відмінність кривих гасіння була при рН 6, інтенсивність гасіння флуоресценції БСА зростала з 15 до 37 разів у ряду ізомерів клатрохелатів: *орто*-, **K14** < *мета*-, **K15** < *пара*-, **K16** (Додаток Г, рис. Г.1).

5.3.2.2 ІКД спектри. Було показано, що у складі комплексів з БСА або ЛСА ІКД-смуги виникали у випадку всіх ізомерів гекса-карбокси клатрохелатів, **K14** – **K16**, в області рН 4-9 (рис. 5.11 б, Додаток Г, рис. Г.1). Конформаційні зміни білкової глобули, спричинені зміною рН, ведуть до змін у спектрах ІКД ліганду – клатрохелату. Ці зміни ІКД-смуг залежать від типу сироваткового альбуміну (БСА або ЛСА) і ізомерії макроциклу.

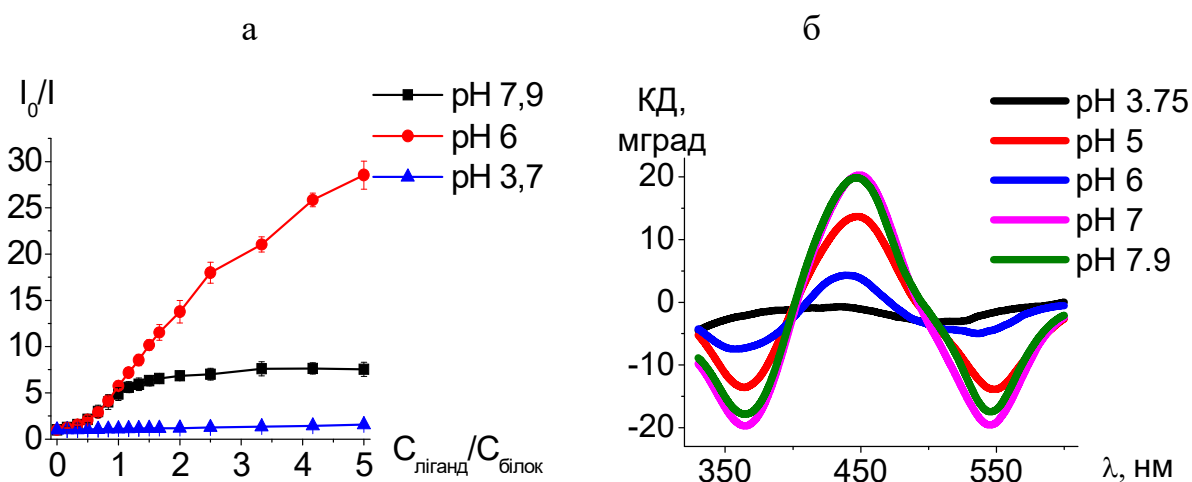


Рис. 5.11. Графіки гасіння флуоресценції БСА мета-ізомером, **K15** (а) і ІКД спектри клатрохелату **K15**, зв'язаного з БСА (б) при різних рН

У асоціатах з ЛСА клатрохелати заліза (II) змінювали форму і інтенсивність ІКД-смуг при варіюванні значень рН, що свідчить про реорганізацію [240240] комплексу білок-клатрохелат. Найбільш виражені зміни інтенсивності були у випадку *мета*-ізомеру (рис. 5.11 б, рис. Г.1, Додаток Г). При змінах конформації БСА через варіювання рН у випадку *мета*- і *пара*-ізомерів, **K15** і **K16**, змінювались

інтенсивність і максимуми ІКД-смуг, а у випадку *орто*-ізомеру, **K14**, також форма смуг (рис. Г.1, Додаток Г).

У кислому середовищі (рН 3.7) усі досліджені клатрохелати заліза (II) генерують ІКД спектри низької інтенсивності (до $\Delta\text{КД} = 2.2$ мград для *орто*-ізомеру, **K14**, у комплексі з БСА). Це, а також і низька ступінь гасіння флуоресценції (рис. Г.1, Додаток Г) може свідчити про дисоціацію комплексу альбумін-клатрохелат у кислому середовищі при конформаційному переході білка (часткове відмежування домену III і домену I БСА).

В області рН 5-9 ІКД-смуги асоціатів альбумін-клатрохелат найбільш інтенсивні (рис. Г.1, Додаток Г), тобто можливість відрізнити БСА і ЛСА за різницею ІКД-сигналів найбільш виражена. Ймовірно, ІКД спектри відображають реорганізацію асоціатів альбумін-клатрохелат, що має місце при рН 7-8 внаслідок змін конформації білку з N-форми до В-форми.

Отже, потенційно клатрохелати заліза (II) можуть бути використані як інструмент для моніторингу змін конформації білку.

5.4 Визначення сайту зв'язування клатрохелатів з альбуміном

Для того, щоб визначити, в якому сайті альбуміну знаходиться клатрохелат при зв'язуванні, було проведено експеримент з витіснення клатрохелату з його комплексу з альбуміном специфічними до сайтів 1 і 2 лігандами. Для цього використовували широко відомі ліганди варфарин і ібупрофен (які специфічно зв'язуються у головних сайтах альбуміну 1 і 2 відповідно [241, 242]). Ці сайт-специфічні речовини показують високу спорідненість до альбуміну, їх константи зв'язування близько $2.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ для варфарину [243] та $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для ібупрофену [244]. Відомо, що зв'язування варфарину або ібупрофену з альбуміном не призводить до виникнення ІКД сигналу у видимій області [241]. Тому оцінити схильність клатрохелату до певного сайту зв'язування можливо через моніторинг

змін у ІКД спектрах клатрохелату після додавання до комплексу білок-клатрохелат кожного з сайт-специфічних лігандів.

Для замісного титрування було вибрано *пара*-гекса-карбоксіфеніл заміщений ізомер, **K16**, тому що він зв'язується з альбуміном у співвідношенні 1 : 1 (Розділ 5.5). Взагалі, додавання низьких концентрацій сайт-специфічних речовин до комплексу білок-клатрохелат не впливало на КД-сигнал. Лише надлишок сайт-специфічних речовин (починаючи з 30-кратного надлишку) призводить до зменшення інтенсивності ІКД смуг клатрохелату (рис. 5.12).

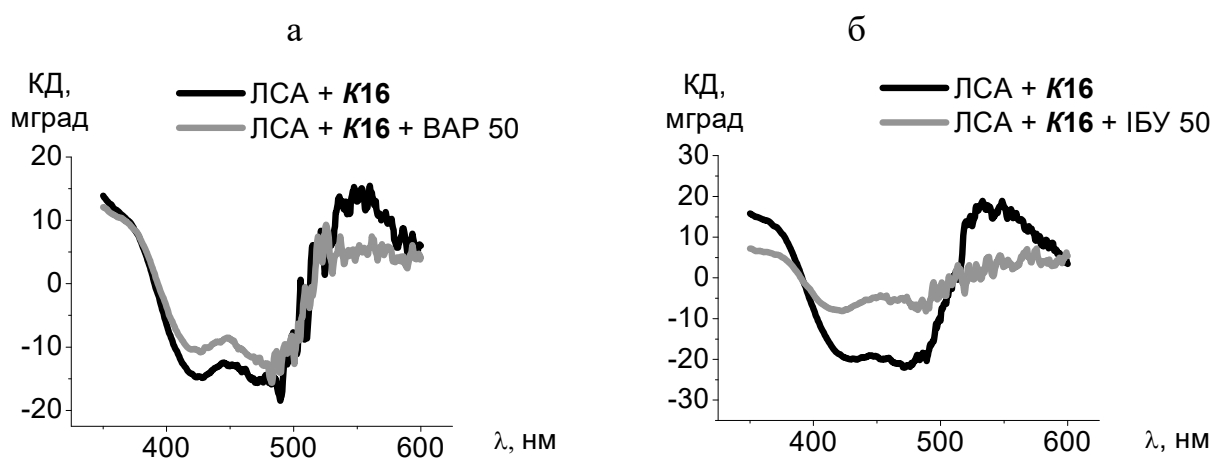


Рис. 5.12. ІКД-спектри комплексу клатрохелат-альбумін, а також ІКД-спектри при додаванні до комплексу надлишків а) варфарину, ВАР, або б) ібупрофену, ІБУ

Схильність сайт-специфічних речовин на порядки вище ніж така для клатрохелату ($2.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ для варфарину, $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для ібупрофену і $5.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ для *пара*-клатрохелату, **K16**, табл. 5.3). Лише 50-кратний надлишок ібупрофена відносно клатрохелату у комплексі ЛСА-клатрохелат значно, до 2.5 разів, зменшує інтенсивність ІКД смуг (рис. 5.12). Це свідчить про незначне витіснення клатрохелату з його комплексу з альбуміном ібупрофеном або варфарином. Таким

чином, замісне титрування не надає додаткової інформації про місцезнаходження у молекулі альбуміну сайтів зв'язування клатрохелатів.

5.5 Дослідження термодинамічних параметрів утворення комплексу БСА-клатрохелат

Термодинамічні параметри комплексу БСА-клатрохелат були досліджені методом ІТК (Додаток Д, рис. Д.1), отримані термодинамічні значення показані у таблиці 5.3. Для дослідження були обрані гекса-карбоксіфеніл-заміщені клатрохелати, **K14** – **K16**, тому що вони добре розчинні у водному середовищі, чого потребує метод ІТК. З форми кривих теплового ефекту зв'язування від співвідношення клатрохелат-БСА (Додаток Д, рис. Д.1), а також зі значень відповідних термодинамічних параметрів (табл. 5.3) видно різницю між зв'язуванням з білком *орто*- і *мета*-ізомерів, **K14** і **K15**, та *пара*-ізомеру, **K16**. Зокрема, значення ΔG для комплексоутворення БСА з **K14** і **K15**, *мета*- і *орто*-ізомерними клатрохелатами схожі, тоді як з *пара*-заміщеною сполукою, **K16** – менше. Звідси значення констант зв'язування K_a близькі для *орто*- і *мета*-ізомерів, **K14** і **K15** (2.4 і $2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ відповідно). Таким чином, зв'язування БСА з *орто*- і *мета*-заміщеними клатрохелатами заліза (II), **K14** і **K15**, більш сильне у порівнянні з *пара*-заміщеним аналогом, **K16**.

Таблиця 5.3

**Термодинамічні характеристики зв'язування кластрохелатів з БСА,
отримані методом ізотермічної калориметрії титрування, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$**

Клатрохелат	$K_a, 10^3$	n^*	ΔH	ΔS	$T\Delta S$	ΔG
<i>K14</i> (гекса <i>орто</i> -)	24	1.95	-9.1	53.2	15.8	-24.9
<i>K15</i> (гекса <i>мета</i> -)	28	1.9	-17.2	27.2	8.1	-25.3
<i>K16</i> (гекса <i>пара</i> -)	5.3	0.9	-23.2	-6.5	-1.9	-19.3

Примітка. ΔH , ΔS , ΔG – зміни ентальпії, ентропії, енергії Гіббса при зв'язуванні; K_a – константа асоціації комплексу; n – кількість зв'язаних молекул клатрохелату на одну глобулу білку. $[\Delta H]$, $[T\Delta S]$, $[\Delta G]$ – кДж/моль; $[\Delta S]$ – Дж/моль \times К; $[K]$ – M^{-1}

Зміни ентальпії (ΔH) і ентропії (ΔS) при утворенні комплексів БСА-клатрохелат також залежать від ізомерії ліганду – клатрохелату (табл. 5.3). Гідрофобні взаємодії ($\Delta S > 0$) і сили міжмолекулярного притягання ($\Delta H < 0$) сприяють утворенню комплексів між БСА і *орто*- і *мета*- заміщеними ізомерами, ***K14*** і ***K15***. Можна припустити, що зв'язування з БСА *пара*- ізомеру переважно відбувається за рахунок сил міжмолекулярного притягання ($\Delta H < 0$). Внесок гідрофобних взаємодій не перевищує втрату ентропії завдяки зменшенню ступеню свободи відповідного клатрохелату при його фіксуванні у комплексі білок-клатрохелат (тому $\Delta S < 0$). Гідрофобний ефект зменшується у ряду *орто*- > *мета*- > *пара*- заміщених сполук, а ентальпійний ефект зростає у тому напрямку.

Отримані результати можуть бути пояснені через просторове розташування кінцевих функціональних замісників. У випадку гекса-*пара*-карбоксіфенільного ізомеру клатрохелату, ***K16***, зовнішня «оболонка» молекули сформована «розчепіреними» полярними карбоксі групами, заважаючи цій молекулі вступати у гідрофобні взаємодії. Проникнення до гідрофобних порожнин білку полегшується за рахунок щільніше притиснутих до центру молекули термінальних карбоксі груп

орто- або *мета*- заміщених клатрохелатів, **K14** і **K15**, що робить цю взаємодію більш енергетично сприятливою.

Кількість молекул клатрохелату на макромолекулу БСА (n) теж залежить від ізомерії макробіциклічних комплексів заліза (II). При комплексоутворенні з БСА для *орто*- і *мета*- заміщених клатрохелатів, **K14** і **K15**, це співвідношення було оцінено як $n = 2$, тоді як для **K16**, пара - $n = 1$. Тобто, можна припустити, що один додатковий сайт зв'язування на молекулі БСА доступний лише для «стабільного зв'язування» з *орто*- і *мета*- ізомерами, **K14** і **K15**. Це може бути пояснено більшою кількістю геометричних конформацій (тобто варіацій форм) молекули клатрохелату, які доступні завдяки обертанню асиметричних термінальних груп *орто*- і *мета*- у функціональних замісниках клатрохелату. Більша структурна варіабельність призводить до більших можливостей прилаштування геометрії клатрохелату до форми сайту зв'язування і сприяє кращій адаптації карбоксифенільних груп при компліментарному зв'язуванні з білком.

5.6 Механізм виникнення КД-смуг при зв'язуванні білок-клатрохелат

Виникнення КД-відгуку при зв'язуванні білок-клатрохелат спричинене появою оптичної активності у клатрохелату, вірогідно, внаслідок його фіксування у певній оптично-активній конформації.

Механізм появи оптичної активності було досліджено нашими колегами д.х.н О.А. Варзацким, асп. С.В. Вакаровим (Інститут загальної та неорганічної хімії) [235235]. Було показано, що клатрохелат реалізує MN_6 координацію, яка є проміжною між тригональною призмою (ТП) і тригональною антипризмою (ТАП). Причому ТП ахіральна, тоді як інверсія оптично активних форм відбувається у ТАП макробіциклічних молекул. Динамічну рівновагу між перекрученими у лівий і правий бік конфомерами клатрохелату можна спостерігати у розчині при кімнатній температурі.

Інкапсульований металоцентр (залізо (II)) повністю ізольований від зовнішніх факторів негнучким об'ємним поліазометиновим клітинним каркасом. Таким чином, хіральний індуктор (білок) не здатний безпосередньо взаємодіяти з іоном металу з наступним виникненням ефекту Коттона.

При утворенні комплексів відбувається фіксування оптично-активної ТП-ТАП скрученої конфігурації клатрохелатного остову за допомогою різного типу взаємодій. Було показано, що альбумін стереоселективно зв'язує хіральні молекули з рацемату [186, 187], тому, ймовірно, він селективно фіксує обраний конформер клатрохелату завдяки асиметричному оточенню сайту зв'язування. Було показано, що для зв'язування з білком клатрохелату необхідна наявність карбоксильної групи. Тому електростатичні (полярні) взаємодії грають важливу роль у зв'язуванні білок-клатрохелат. Вірогідно, вони формуються між кінцевими карбокси групами і бічними групами амінокислотних залишків лізину і аргініну. Взаємодія може відбуватися за допомогою слабких зв'язків (ароматичні і водневі зв'язки). Ароматичні зв'язки (π -стекінг) можливо, реалізуються за рахунок зв'язування реберних фенільних груп клатрохелату і ароматичних бічних груп амінокислотних залишків Фен, Тир або Трп. Жорсткість лінкеру (ароматичного або аліфатичного) у реберних замісниках значно впливає на КД-відгук, але не впливає на зв'язування. Тобто, згідно флуоресцентного методу білок зв'язується з усіма клатрохелатами з карбоксильними групами, а КД-відгук у комплексі з альбуміном дають лише клатрохелати з карбоксифенільними групами.

5.7 Модель комплексу альбумін-клатрохелат

Моделювання комплексу було проведено співробітником ІЗНХ НАН України асп. С.В. Вакаровим. Для цього були обрані ЛСА і ди-*мета*-карбоксифеніл-заміщений клатрохелат (**K9**). Згідно розрахунків молекулярного докінгу,

зв'язування альбумін-клатрохелат відбувається у сайті 1 альбуміну (рис. 5.13 а), що узгоджується з даними експерименту з гасіння власної флуоресценції білку.

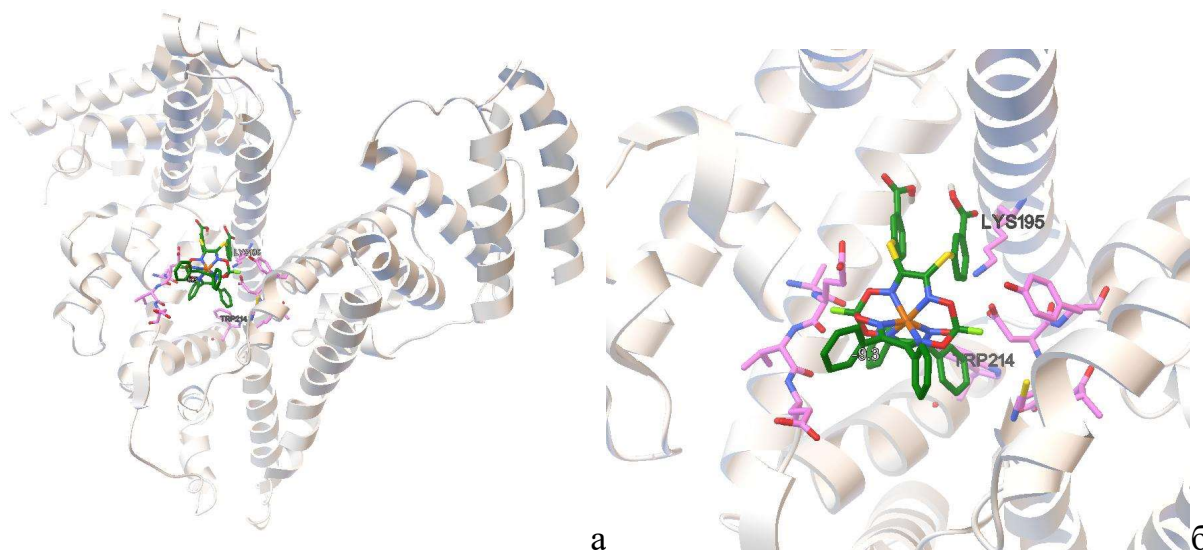


Рис. 5.13. Локалізація у молекулі ЛСА клатрохелату (*K9*) при зв'язуванні згідно молекулярного докінгу

Порожнина сайту 1 здебільшого гідрофобна, але також містить полярні амінокислотні залишки (в основному позитивно заряджені лізин і аргінін [245]), з якими можливі електростатичні зв'язки карбокси груп. З рис. 5.13 б видно, що у сайті 1 альбуміну клатрохелат знаходиться близько до Ліз-195 і Трп-214.

5.8 Визначення цитотоксичності клатрохелатів до клітин

Однією з необхідних властивостей для впливу на клітину є проникнення до неї, що може бути здійснено активним або пасивним транспортом. При пасивному транспорті передбачається перенесення речовини через клітинну мембрану за рахунок утворення комплексу з альбуміном [60]. Тому для визначення цитотоксичності для клітин були вибрані клатрохелати, які інтенсивно зв'язуються з білками і мають найбільш виражені ІКД-відгуки – з двома карбокси фенільними групами. Токсичні властивості речовин визначали через МТТ-аналіз, для

експерименту використовували лінію клітин людської промієлоцитарної лейкемії (HL-60). Для дослідження впливу ізомерії кінцевих груп на токсичність до клітин було проаналізовано ряд ди- карбоксифеніл- заміщених клатрохелатів з однаковими (ди-орто-, **K8**/ди-мета-, **K9**/ди-пара, **K10**) або різними (орто-мета-, **K11**/мета-пара-, **K12**/ орто-пара-, **K13**) ізомерними карбоксифенільними групами. Взагалі, клатрохелати продемонстрували низьку цитотоксичність (табл. 5.4; Додаток Е, рис. Е.1). Згідно клітинного експерименту, всі клатрохелати з однаковими ізомерними групами і мета-пара- клатрохелат (**K12**) мають однакову токсичність у клітинах ($IC_{50} \approx 41 \mu M$). Клатрохелат з орто-мета- (**K11**) замісниками небагато менш токсичний, $IC_{50} \approx 80 \mu M$. Ізомер з орто-пара- (**K13**) групами значно відрізняється від інших і має $IC_{50} > 150 \mu M$, тобто є найменш токсичними серед досліджених.

Таким чином, просторова структура клатрохелату, яка визначається його замісниками, сильно впливає на цитотоксичні властивості сполук.

Таблиця 5.4

Значення IC_{50} для ряду клатрохелатів з двома ізомерними карбоксифенільними замісниками, лінія клітин людської промієлоцитарної лейкемії (HL-60)

Клатрохелат	IC_{50}
K8 (ди-орто-)	40-42
K9 (ди-мета-)	40-42
K10 (ди-пара-)	40-42
K11 (орто-мета-)	80
K12 (мета-пара-)	40-42
K13 (орто-пара-)	> 200

Висновки до розділу:

1. Досліджено та охарактеризовано взаємодію сироваткових альбумінів з рядом клатрохелатів заліза (II) методами флуоресцентної спектроскопії, спектроскопії кругового дихроїзму, ізотермічної калориметрії титрування.

2. Вперше було показано, що при взаємодії білок-ліганд оптично неактивні клатрохелати заліза (II) здатні давати характерний КД-відгук у видимій області спектру (350-600 нм).

3. Встановлено, що природа реберних замісників у молекулі клатрохелату, їх кількість та ізомерія визначає силу зв'язування з білками, а також амплітуду і форму відповідного ІКД-відгуку.

4. Найбільш інтенсивно альбумін зв'язується з клатрохелатами з двома або шістьма карбоксильними замісниками (за даними методу гасіння власної флуоресценції білку). Проте, для індукування значного КД-сигналу при зв'язуванні з білком необхідна наявність (1) карбоксильних груп, (2) жорстких замісників (макроцикли з карбоксиалкільними замісниками не дають КД-сигналу). Найбільш інтенсивні сигнали при взаємодії з БСА були у клатрохелатів з двома карбоксифенільними групами.

5. Вперше показано, що клатрохелати здатні «відрізнити» різні (БЛГ і альбуміни) та родинно-близькі білки (БСА і ЛСА), а також різні конформації альбуміну (які спричинені змінами рН середовища), очере́з варіації форми та інтенсивності ІКД смуг. Таким чином, клатрохелати заліза (II) можуть бути використані як КД-репортери, чутливі до конформаційних відмінностей білків.

6. Виходячи з впливу гекса-карбоксифеніл-заміщених макроциклів переважно на триптофанову флуоресценцію альбумінів (БСА і ЛСА), зроблено припущення, що молекули клатрохелату зв'язуються у головному сайті 1 альбумінів (де

розташовані Трп-залишки). Методом ІТК отримані константи зв'язування БСА з гекса- карбоксифенільними ізомерами (порядку $10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$).

7. Електростатична взаємодія між реберними карбокси групами клатрохелату та позитивно зарядженими амінокислотними залишками білків є ключовою для утворення комплексу білок-ліганд. Геометрія сайту білку зумовлює вибір відповідної оптично-активної конформації клатрохелату.

8. Для ди-карбоксифеніл клатрохелатів, які інтенсивно зв'язуються з білками і мають найбільш виражені ІКД-відгуки, показана низька цитотоксичність для ракових клітин.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1. Induced CD of iron (ii) clathrochelates: sensing of the structural and conformational alterations of serum albumins / V. Kovalska, **M. Kuperman**, M. Losytskyy, S. Vakarov, S. Potocki, S. Yarmoluk, Y. Voloshin, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka // *Metallomics*. – 2019. – Vol. 11(2). – P. 338-48.
2. Induced chirality of cage metal complexes switched by their supramolecular and covalent binding / V. Kovalska, S. Vakarov, **M. Kuperman**, M. Losytskyy, E. Gumienna-Kontecka, Y. Voloshin, O. Varzatskii // *Dalton Trans.* – 2018. – Vol. 47(4). – P. 1036-1052.

ВИСНОВКИ

Представлена робота присвячена дослідженню взаємодії між глобулярними білками і борвмісними макроциклічними каркасними сполуками. Показано, що афінність до білків та структура відповідних комплексів таких каркасних молекул в значній мірі залежать від хімічної природи замісників в їх складі.

1. Вперше було досліджено і охарактеризовано взаємодії глобулярних білків, зокрема альбумінів, з незаміщеними і функціоналізованими *клозо*-боратами. Показана вища афінність до альбумінів галоген-заміщених *клозо*-боратів (константи зв'язування порядку $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$, стехіометрія зв'язування становить 4-5 кластерів на молекулу білку) у порівнянні з відповідними незаміщеними кластерами бору (константа зв'язування порядку 10^3 M^{-1} , стехіометрія зв'язування – 2 кластери на молекулу білку).

2. Вперше досліджено процес фібрилоутворення інсуліну *in vitro* під впливом дианіонного кластеру бору. Показано, що присутність при агрегації білка *клозо*-борату $[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$ прискорює денатурацію інсуліну і сприяє латеральній агрегації зрілих фібрил.

3. Запропоновано бензтіазоловий триметиновий ціаніновий барвник, що підвищує флуоресцентний сигнал до 70 разів та квантовий вихід до 0,4 у присутності амілоїдних агрегатів білків. Показано придатність барвнику до моніторингу процесу фібрилізації.

4. Вперше показано, що взаємодія оптично неактивних клатрохелатів заліза (II) з білками може призводити до індукції хіральності клатрохелатів та появи інтенсивних КД-смуг у видимій області спектру (350-600 нм). Клатрохелати здатні «відрізнати» родинно-близькі білки (БСА і ЛСА), а також різні конформації альбумінів, через зміну форми та інтенсивності (до 9 разів) ІКД смуг. Таким чином,

клатрохелати заліза (II) запропоновані як ІКД-репортери, чутливі до структурних відмінностей та конформаційних перетворень білків.

5. Охарактеризовано взаємодію альбумінів з різними ізомерами гексакарбоксифеніл-заміщених клатрохелатів методами флуоресцентної і КД-спектроскопії та ІТК. Визначено, що для комплексів БСА–клатрохелат величина константи зв'язування має порядок $10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$, а стехіометрія зв'язування становить 1-2 молекули клатрохелату на молекулу альбуміну. Для ди-карбоксифеніл-заміщених клатрохелатів показана їх досить низька токсичність ($\text{IC}_{50} = 40 - 150 \text{ }\mu\text{M}$) для ракових клітин.

6. Показано, що зв'язування з білками та індукція КД-відгуку визначається природою замісників у молекулі клатрохелату, зокрема, присутністю карбоксифенільної групи. Запропоновано, що електростатична взаємодія між карбоксильними групами клатрохелату та позитивно зарядженими амінокислотними залишками є ключовою для утворення комплексу білок-ліганд. Ізомерія та кількість замісників в молекулі клатрохелату впливають на структуру його комплексу з білком і, таким чином, – на характер ІКД-відгуку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hamuro Y, Calama MC, Park HS, Hamilton AD. A calixarene with four peptide loops: an antibody mimic for recognition of protein surfaces. *Angew. Chem., Int. Ed.* 1997;36(23):2680-2683.
2. van Dun S, Ottmann C, Milroy LG, Brunsveld L. Supramolecular chemistry targeting proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2017;139(40):13960-13968.
3. Crowley PB, Ganji P, Ibrahim H. Protein surface recognition: structural characterisation of cytochrome c–porphyrin complexes. *ChemBioChem.* 2008;9(7):1029-1033.
4. Mallon M, Dutt S, Schrader T, Crowley PB. Protein camouflage: supramolecular anion recognition by ubiquitin. *ChemBioChem.* 2016;17(8):774-783.
5. Meyer EA, Castellano RK, Diederich F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2003;42(11):1210-1250.
6. Friedman SH, Ganapathi PS, Rubin Y, Kenyon GL. Optimizing the binding of fullerene inhibitors of the HIV-1 protease through predicted increases in hydrophobic desolvation. *J. Med. Chem.* 1998;41(13):2424-2429.
7. Davies CL, Dux EL, Duhme-Klair AK. Supramolecular interactions between functional metal complexes and proteins. *Dalton Trans.* 2009;(46):10141-10154.
8. Meggers E. Targeting proteins with metal complexes. *Chem. Commun.* 2009;(9):1001-1010.
9. Doolan AM, Rennie ML, Crowley PB. Protein recognition by functionalized sulfonatocalix [4] arenes. *Chem.: Eur. J.* 2018;24(4):984-991.
10. Rennie ML, Fox GC, Pérez J, Crowley PB. Auto-regulated Protein Assembly on a Supramolecular Scaffold. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018;130(42):13960-13965.
11. Rennie ML, Doolan AM, Raston CL, Crowley PB. Protein dimerization on a phosphonated calix [6] arene disc. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017;56(20):5517-5521.

12. McGovern RE, Fernandes H, Khan AR, Power NP, Crowley PB. Protein camouflage in cytochrome c–calixarene complexes. *Nat. Chem.* 2012;4(7):527-533.
13. Luo Q, Hou C, Bai Y, Wang R, Liu J. Protein assembly: Versatile approaches to construct highly ordered nanostructures. *Chem. Rev.* 2016;116(22):13571-13632.
14. Hou C, Li J, Zhao L, Zhang W, Luo Q, Dong Z, et al. Construction of Protein Nanowires through Cucurbit [8] uril-based Highly Specific Host–Guest Interactions: An Approach to the Assembly of Functional Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013;52(21):5590-5593.
15. Si C, Li J, Luo Q, Hou C, Pan T, Li H, Liu J. An ion signal responsive dynamic protein nano-spring constructed by high ordered host–guest recognition. *Chem. Commun.* 2016;52(14):2924-2927.
16. Hewitt SH, Wilson AJ. Metal complexes as “protein surface mimetics”. *Chem. Commun.* 2016;52(63):9745-9756.
17. Lesnikowski ZJ. Challenges and opportunities for the application of boron clusters in drug design. *J. Med. Chem.* 2016;59(17):7738-7758.
18. Grimes RN. Carboranes. In 2nd ed. Elsevier, 2011.
19. Driess M, Nöth H. Molecular clusters of the main group elements. Wiley-VCH, 2004.
20. Grimes RN. Boron clusters come of age. *Journal of chemical education*, 2004;81(5):657.
21. Poater J, Solà M, Viñas C, Teixidor F. π Aromaticity and Three-Dimensional Aromaticity: Two sides of the Same Coin?. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014;53(45):12191-12195.
22. King RB. Three-dimensional aromaticity in polyhedral boranes and related molecules. *Chem. Rev.* 2001;101(5):1119-1152.
23. Julius RL, Farha OK, Chiang J, Perry LJ, Hawthorne MF. Synthesis and evaluation of transthyretin amyloidosis inhibitors containing carborane pharmacophores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(12):4808-4813.

24. Soloway AH, Tjarks W, Barnum BA, Rong FG, Barth RF, Codogni IM, Wilson JG. The Chemistry of Neutron Capture Therapy. *Chem. Rev.* 1998;98(6):2389-2390.
25. Hawthorne MF. The role of chemistry in the development of boron neutron capture therapy of cancer. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1993;32(7):950-984.
26. Sweet W, Soloway AH, Wright RL. Evaluation of boron compounds for use in neutron capture therapy of brain tumors. II. Studies in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1962;137(2):263-266.
27. Yanch JC, Shortkroff S, Shefer RE, Johnson S, Binello E, Gierga D, et al. Boron neutron capture synovectomy: Treatment of rheumatoid arthritis based on the nuclear reaction. *Med. Phys.* 1999;26(3):364-375.
28. Valliant JF, Schaffer P. A new approach for the synthesis of isonitrile carborane derivatives.: Ligands for metal based boron neutron capture therapy (BNCT) and boron neutron capture synovectomy (BNCS) agents. *J. Inorg. Biochem.* 2001;85(1):43-51.
29. Valliant JF, Schaffer P, Britten JF, Davison A, Jones AG, Yanch JC. The synthesis of corticosteroid-carborane esters for the treatment of rheumatoid arthritis via boron neutron capture synovectomy. *Tetrahedron Lett.* 2000;41(9):1355-1358.
30. Kawabata S, Matsushita Y, Furuse M, Miyatake SI, Kuroiwa T, Ono K. Clinical study on modified boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. *Advances in the Biology, Imaging and Therapies for Glioblastoma*, 2011;325-338.
31. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release.* 2000;65(1-2):271-284.
32. Kratz F, Beyer U. Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: a review. *Drug Deliv.* 1998;5(4):281-299.
33. Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Control. Release.* 2008;132(3):171-183.
34. Kratz F, Senter P, Steinhagen H. Drug delivery in oncology: from basic research to cancer therapy. John Wiley & Sons, 2013.

35. Endo Y, Iijima T, Yamakoshi Y, Fukasawa H, Miyaura C, Inada M, et al. Potent estrogen agonists based on carborane as a hydrophobic skeletal structure: a new medicinal application of boron clusters. *Chem. Biol.* 2001;8(4):341-355.
36. Hodgson J. ADMET—turning chemicals into drugs. *Nat. Biotechnol.* 2001;19(8):722.
37. Endo Y, Iijima T, Yamakoshi Y, Yamaguchi M, Fukasawa, H, Shudo K. Potent Estrogenic Agonists Bearing Dicarba-closo-dodecaborane as a Hydrophobic Pharmacophore. *J. Med. Chem.* 1999;42(9):1501-1504.
38. Ohta K, Iijima T, Kawachi E, Kagechika H, Endo, Y. Novel retinoid X receptor (RXR) antagonists having a dicarba-closo-dodecaborane as a hydrophobic moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004;14(23):5913-5918.
39. Hawthorne MF, Pushechnikov A. Polyhedral borane derivatives: Unique and versatile structural motifs. *Pure Appl. Chem.* 2012;84(11):2279-2288.
40. Youn S, Im Kim K, Ptacek J, Ok K, Novakova Z, Kim Y, et al. Carborane-containing urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II: Synthesis and structural characterization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015;25(22):5232-5236.
41. Ohta K, Ogawa T, Oda A, Kaise A, Endo Y. Design and synthesis of carborane-containing estrogen receptor-beta (ER β)-selective ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015;25(19):4174-4178.
42. Endo Y, Yoshimi T, Kimura K, Itai A. Protein kinase C modulators bearing dicarba-closo-dodecaborane as a hydrophobic pharmacophore. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999;9(17): 2561-2564.
43. Mochizuki M, Sato S, Asatyas S, Leśnikowski ZJ, Hayashi T, Nakamura H. Raman cell imaging with boron cluster molecules conjugated with biomolecules. *RSC Adv.* 2019;9(41):23973-23978.
44. Voloshin Y, Belaya I, Krämer R. Cage metal complexes: clathrochelates revisited. Springer, 2017.

45. Voloshin YZ, Novikov VV, Nelyubina YV. Recent advances in biological applications of cage metal complexes. *RSC Adv.* 2015;5(89):72621-72637.
46. Voloshin YZ, Varzatskii OA, Kron TE, Belsky VK, Zavodnik VE, Strizhakova NG, Palchik AV. Triribbed-functionalized clathrochelate iron (II) dioximates as a new and promising tool to obtain polynucleating and polynuclear compounds with improved properties. *Inorg. Chem.* 2000;39(9):1907-1918.
47. Lebed EG, Belov AS, Dolganov AV, Vologzhanina AV, Szebesczyk A, Gumienna-Kontecka E et al. First clathrochelate iron and cobalt (II) tris-dioximates with reactive apical substituents. *Inorg. Chem. Commun.* 2013;30:53-57.
48. Novikov VV, Varzatskii OA, Negrutka VV, Bubnov YN, Palchykovska LG, Dubey IY, Voloshin YZ. Size matters, so does shape: inhibition of transcription of T7 RNA polymerase by iron (II) clathrochelates. *J. Inorg. Biochem.* 2013;124:42-45.
49. Varzatskii OA, Vologzhanina AV, Novikov VV, Vakarov SV, Oblap RV, Voloshin YZ. Inhibition of DNA synthesis in the transcription system of Taq DNA polymerase by various iron and cobalt (II) tris-dioximate clathrochelates: In vitro study and X-ray structure of leader inhibitors, the carboxyl-terminated macrobicyclic complexes. *Inorganica Chim. Acta.* 2018;482:90-98.
50. Kovalska VB, Losytskyi MY, Varzatskii OA, Cherepanov VV, Voloshin YZ, Mokhir AA, et al. Study of anti-fibrillogenic activity of iron (II) clathrochelates. *Bioorg. Med. Chem.* 2014;22(6):1883-1888.
51. Kovalska V, Chernii S, Cherepanov V, Losytskyi M, Chernii V, Varzatskii O, et al. The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme. *J. Mol. Recognit.* 2017;30(8):e2622.
52. Losytskyi MY, Kovalska VB, Varzatskii OA, Sergeev AM, Yarmoluk SM, Voloshin YZ. Interaction of the iron (II) cage complexes with proteins: protein fluorescence quenching study. *J. Fluoresc.* 2013;23(5):889-895.

53. Kovalska V, Vakarov S, Losytskyy M, Kuperman M, Chornenka N, Toporivska Y, et al. Dicarboxyl-terminated iron (ii) clathrochelates as ICD-reporters for globular proteins. *RSC Adv.* 2019;9(42):24218-24230.
54. De Wolf FA, Brett GM. Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands. *Pharmacol. Rev.* 2000;52(2):207-236.
55. Zhang J, Liu X, Subirade M, Zhou P, Liang L. A study of multi-ligand beta-lactoglobulin complex formation. *Food Chem.* 2014;165:256-261.
56. Sneharani AH, Karakkat JV, Singh SA, Rao AA. Interaction of curcumin with β -lactoglobulin; stability, spectroscopic analysis, and molecular modeling of the complex. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58(20):11130-11139.
57. Vuignier K, Schappler J, Veuthey JL, Carrupt PA, Martel S. Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;398(1):53-66.
58. Liang L, Subirade M. Study of the acid and thermal stability of β -lactoglobulin-ligand complexes using fluorescence quenching. *Food Chem.* 2012;132(4):2023-2029.
59. Fernández J, Monteagudo J, Bargallo X, Jiménez W, Bosch J, Arroyo V, Navasa M. A randomized unblinded pilot study comparing albumin versus hydroxyethyl starch in spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*, 2005;42(3):627-634.
60. Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, Bartolini M, Caraceni P. Structural and functional integrity of human serum albumin: Analytical approaches and clinical relevance in patients with liver cirrhosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017;144:138-153.
61. Peters JT. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Academic press, 1995.
62. Bertucci C, Domenici E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. *Curr. Med. Chem.* 2002;9(15):1463-1481.
63. Arroyo V, García-Martínez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J. Hepatol.* 2014;61(2):396-407.

64. Pistolozzi M, Bertucci C. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: a circular dichroism study. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry*. 2008;20(3-4):552-558.
65. Carballal S, Radi R, Kirk MC, Barnes S, Freeman BA, Alvarez B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Biochemistry*. 2003;42(33):9906-9914.
66. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VTG, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, et al. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. 2014;9(1);e85216.
67. O'Brien AJ, Fullerton JN, Massey KA, Auld G, Sewell G, James S, et al. Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E 2. *Nat. Med.*. 2014;20(5):518.
68. Fitzpatrick FA, Wynalda MA. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J. Biol. Chem.* 1983;258(19):11713-11718.
69. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(5):986-1000.
70. Spinella R, Sawhney R, Jalan R. Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. *Hepatol. Int.* 2016;10(1):124-132.
71. Okamoto Y, Taguchi K, Yamasaki K, Sakuragi M, Kuroda, SI, Otagiri M. Albumin-encapsulated liposomes: a novel drug delivery carrier with hydrophobic drugs encapsulated in the inner aqueous core. *J. Pharm. Sci.* 2018;107(1):436-445.
72. Bhushan B, Khanadeev V, Khlebtsov B, Khlebtsov N, Gopinath P. Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017;246:13-39.
73. Baler K, Michael R, Szeleifer I, Ameer GA. Albumin hydrogels formed by electrostatically triggered self-assembly and their drug delivery capability. *Biomacromolecules*. 2014;15(10):3625-3633.

74. Caspersen MB, Kuhlmann M, Nicholls K, Saxton MJ, Andersen B, Bunting K, et al. Albumin-based drug delivery using cysteine 34 chemical conjugates—important considerations and requirements. *Ther. Deliv.* 2017;8(7):511-519.
75. Karimi F, Shojaei AF, Tabatabaeian K, Karimi-Maleh H, Shakeri S. HSA loaded with CoFe₂O₄/MNPs as a high-efficiency carrier for epirubicin anticancer drug delivery. *IET Nanobiotechnol.* 2017;12(3):336-342.
76. More J, Bulmer M. Human serum albumin: A multifunctional plasma protein in Production of plasma proteins for therapeutic use. Wiley, 2013:159-183.
77. Kragh-Hansen U. Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin–ligand complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1830(12):5535-5544.
78. Karimi M, Bahrami S, Ravari SB, Zangabad PS, Mirshekari H, Bozorgomid M, et al. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2016;13(11):1609-1623.
79. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2005;353(1):38-52.
80. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1998;5(9):827.
81. Moradi N, Ashrafi-Kooshk MR, Ghobadi S, Shahlaei M, Khodarahmi R. Spectroscopic study of drug-binding characteristics of unmodified and pNPA-based acetylated human serum albumin: does esterase activity affect microenvironment of drug binding sites on the protein?. *J. Lumin.* 2015;160:351-361.
82. Huang BX, Kim HY, Dass C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004;15(8):1237-1247.

83. Patel S, Sharma KK, Datta A. Competitive binding of Chlorin p6 and Dansyl-L-Proline to Sudlow's site II of human serum albumin. *Spectrochim. Acta A*. 2015;138:925-931.
84. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1998;5(9):827-835.
85. Akdogan Y, Reichenwallner J, Hinderberger D. Evidence for water-tuned structural differences in proteins: an approach emphasizing variations in local hydrophilicity. *PLoS One*. 2012;7(9):e45681.
86. Poór M, Li Y, Matisz G, Kiss L, Kunsági-Máté S, Kőszegi T. Quantitation of species differences in albumin–ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: A test case with some Sudlow's site I ligands. *J. Lumin.* 2014;145:767-773.
87. Tayeh N, Rungassamy T, Albani JR. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009;50(2):107-116.
88. Šantrůček J, Strohalm M, Kadlčík V, Hynek R, Kodíček M. Tyrosine residues modification studied by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;323(4):1151-1156.
89. Shi JH, Pan DQ, Wang XX, Liu TT, Jiang M, Wang Q. (2016). Characterizing the binding interaction between antimalarial artemether (AMT) and bovine serum albumin (BSA): Spectroscopic and molecular docking methods. *J. Photochem. Photobiol.* 2016;162:14-23.
90. Lux A, Aschermann S, Biburger M, Nimmerjahn F. The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69(Suppl 1):i92-i96.
91. Liu Y, Lu Y, Liu Z. Restricted access boronate affinity porous monolith as a protein A mimetic for the specific capture of immunoglobulin G. *Chem. Sci.* 2012;3(5):1467-1471.

92. Douglas FF Immunoglobulins [Internet]. Endotext, 2016.
93. Amani S, Naeem A. Acetonitrile can promote formation of different structural intermediate states on aggregation pathway of immunoglobulin G from human and bovine. *Int. J. Biol. Macromol.* 2011;49(1):71-78.
94. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
95. Cho TY, Byrne N, Moore DJ, Pethica BA, Angell CA, Debenedetti PG. Structure–energy relations in hen egg white lysozyme observed during refolding from a quenched unfolded state. *ChemComm.* 2009;(29):4441-4443.
96. Ansari SS, Yousuf I, Arjmand F, Siddiqi MK, Naqvi S. Exploring the intermolecular interactions and contrasting binding of flufenamic acid with hemoglobin and lysozyme: A biophysical and docking insight. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008;116:1105-1118.
97. Jash C, Kumar GS. Binding of alkaloids berberine, palmatine and coralyne to lysozyme: a combined structural and thermodynamic study. *RSC Adv.* 2014;4(24):12514-12525.
98. Bhattacharyya K, in *Reviews in Fluorescence*, ed. Geddes CD and Lakowicz JR. Springer, 2005:1–23.
99. Imoto T, Forster LS, Rupley JA, Tanaka F. Fluorescence of lysozyme: emissions from tryptophan residues 62 and 108 and energy migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1972;69(5):1151-1155.
100. Mangialardo S, Gontrani L, Leonelli F, Caminiti R, Postorino P. Role of ionic liquids in protein refolding: native/fibrillar versus treated lysozyme. *RSC Adv.* 2012;2(32):12329-12336.
101. McGovern RE, Snarr BD, Lyons JA, McFarlane J, Whiting AL, Paci I, et al. Structural study of a small molecule receptor bound to dimethyllysine in lysozyme. *Chem. Sci.* 2015;6(1):442-449.

102. Taulier N, Chalikian TV. Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* 2001;314(4):873-889.
103. Albani JR., Vogelaer J, Bretesche L, Kmiecik D. Tryptophan 19 residue is the origin of bovine β -lactoglobulin fluorescence. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014;91:144-150.
104. Peng Y, Turner NW, Britt DW. Trifluorosilane induced structural transitions in beta-lactoglobulin in sol and gel. *Colloids Surf. B.* 2014;119:6-13.
105. Renard D, Lefebvre J, Griffin MCA, Griffin WG. Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 1998;22(1)41-49.
106. Fugate RD, Song PS. Spectroscopic characterization of beta-lactoglobulin-retinol complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1980;625(1):28-42.
107. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer Science & Business Media, 2013.
108. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Int. J. Dairy Sci.* 2004;87(4).785-796.
109. Groenning M, Frokjaer S, Vestergaard B. Formation mechanism of insulin fibrils and structural aspects of the insulin fibrillation process. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2009;10(5):509-528.
110. Gladytz A, Lugovoy E, Charvat A, Häupl T, Siefermann KR, Abel B. Intermediates caught in the act: tracing insulin amyloid fibril formation in time by combined optical spectroscopy, light scattering, mass spectrometry and microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015;17(2):918-927.
111. Pandyarajan,V. Phillips NB, Rege N, Lawrence MC, Whittaker J, Weiss MA. Contribution of TyrB26 to the Function and Stability of Insulin: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS AT A CONSERVED HORMONE-RECEPTOR INTERFACE. *J. Biol. Chem.* 2016;291(25):12978-12990.

112. Zaykov AN, Mayer JP, DiMarchi RD. Pursuit of a perfect insulin. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15(6):425-439.
113. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature.* 2003;426(6968):884.
114. Brooks CL, III. Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics in *Advances in Chemical Physics.* John Wiley & Sons, 1988.
115. Beckstead JA, Block BL, Bielicki JK, Kay CM, Oda MN, Ryan RO. Combined N- and C-terminal truncation of human apolipoprotein AI yields a folded, functional central domain. *Biochemistry.* 2005;44(11):4591-4599.
116. Zhang XJ, Wozniak JA, Matthews BW. Protein flexibility and adaptability seen in 25 crystal forms of T4 lysozyme. *J. Mol. Biol.* 1995;250(4):527-552.
117. Gerstein M, Anderson BF, Norris GE, Baker EN, Lesk AM, Chothia C. (1993). Domain closure in lactoferrin: two hinges produce a see-saw motion between alternative close-packed interfaces. *J. Mol. Biol.* 1993;234(2):357-372.
118. He HW, Zhang J, Zhou HM, Yan YB. Conformational change in the C-terminal domain is responsible for the initiation of creatine kinase thermal aggregation. *Biophys. J.* 2005;89(4):2650-2658.
119. Goodey NM, Benkovic SJ. Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat. Chem. Biol.* 2008;4(8):474.
120. Nooren IM, Thornton JM. Diversity of protein–protein interactions. *The EMBO journal.* 2003;22(14):3486-3492.
121. Schneider S, Sharp KH, Barker PD, Paoli M. An induced fit conformational change underlies the binding mechanism of the heme transport proteobacteria-protein HemS. *J. Biol. Chem.* 2006;281(43):32606-32610.
122. Karplus M, Kuriyan J. Molecular dynamics and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102(19):679-6685.
123. Stark H, Rodnina MV, Wieden HJ, Van Heel M, Wintermeyer W. Large-scale movement of elongation factor G and extensive conformational change of the ribosome during translocation. *Cell.* 2000;100(3):301-309.

124. Henzler-Wildman KA, Thai V, Lei M, Ott M, Wolf-Watz M, Fenn T, .et al. Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature*. 2007;450(7171):838.
125. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110(6):673-687.
126. Changeux JP, Edelstein SJ. Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science*. 2005;308(5727):1424-1428.
127. Vu PJ, Yao XQ, Momin M, Hamelberg D. Unraveling Allosteric Mechanisms of Enzymatic Catalysis with an Evolutionary Analysis of Residue–Residue Contact Dynamical Changes. *ACS Catal*. 2018;8(3):2375-2384.
128. Eisenmesser EZ, Bosco DA, Akke M, Kern D. Enzyme dynamics during catalysis. *Science*, 2002;295(5559):1520-1523.
129. Uversky VN. Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins. *FEBS J*. 2015;282(7):182-1189.
130. Schulenburg C, Hilvert D. Protein conformational disorder and enzyme catalysis. *Top. Curr. Chem*. 2013;337:41–67.
131. Midic U, Oldfield CJ, Dunker AK, Obradovic Z, Uversky VN. Protein disorder in the human diseasome: unfoldomics of human genetic diseases. *Bmc Genomics*, 2009;10(1):S12.
132. Andersen NH. Protein Structure, Stability, and Folding in *Methods in Molecular Biology*, ed. by Kenneth P. Murphy. Humana Press, 2001.
133. Uversky VN. The triple power of D³: protein intrinsic disorder in degenerative diseases. *Front Biosci*. 2014;19:181-258.
134. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem*. 2006;75:333-366.
135. Dovidchenko NV, Leonova EI, Galzitskaya OV. Mechanisms of amyloid fibril formation. *Biochemistry (Moscow)*. 2014;79(13):1515-1527.

136. Salahuddin P. Protein Folding, Misfolding, Aggregation And Amyloid Formation: Mechanisms of A β Oligomer Mediated Toxicities. *J. Biochem. Mol. Biol. Res.* 2015;1(2):36-45.
137. Claessen D, Rink R, de Jong W, Siebring J, de Vreugd P, Boersma FH, et al. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* 2003;17(14):1714-1726.
138. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell.* 2011;146(3):448-461.
139. Bailey CH, Kandel ER, Si K. The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron.* 2004;44(1):49-57.
140. Tompa P, Friedrich P. Prion proteins as memory molecules: an hypothesis. *Neuroscience*, 1998;86(4):1037-1044.
141. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol. Cell.* 2004;15(12):5383-5398.
142. Härd T. Amyloid fibrils: formation, polymorphism, and inhibition. *J. Phys. Chem. Lett.* 2014;5(3):607-614.
143. Kurouski D. Supramolecular Organization of Amyloid Fibrils. *IntechOpen.* 2016;73-98.
144. Chaturvedi SK, Siddiqi MK, Alam P, Khan RH. Protein misfolding and aggregation: mechanism, factors and detection. *Process Biochem.* 2016;51(9):1183-1192.
145. Constatinescu D, Herrmann C, Weingärtner H. Patterns of protein unfolding and protein aggregation in ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010;12(8):1756-1763.

146. Weibels S, Syguda A, Herrmann C, Weingärtner H. Steering the enzymatic activity of proteins by ionic liquids. A case study of the enzyme kinetics of yeast alcohol dehydrogenase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012;14(13):4635-4639.
147. Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Fink AL. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry.* 2001;40(20):6036-6046.
148. Lopukhin YM, Dobretsov GE, Gryzunov YA. Conformational changes in albumin molecule: a new response to pathological process. *B Exp. Biol. Med.* 2000;130(1):615-619.
149. Oetl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br. J. Pharmacol.* 2007;151(5):580-590.
150. Arasteh A, Farahi S, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA. Glycated albumin: an overview of the in vitro models of an in vivo potential disease marker. *J. Diabetes Metab. Dis.* 2014;13(1):49.
151. Ivanov AI, Korolenko EA, Korolik EV, Firsov SP, Zhabankov RG, Marchewka MK, Ratajczak H. Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002;408(1):69-77.
152. Moergel M, Kämmerer PW, Schnurr K, Klein MO, Al-Nawas B. Spin electron paramagnetic resonance of albumin for diagnosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Clin. Oral Investig.* 2012;16(6):1529-1533.
153. Loving GS, Sainlos M, Imperiali B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotechnol.* 2010;28(2);73-83.
154. Pelton JT, McLean LR. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal. biochem.* 2000;277(2):167-176.
155. Klymchenko AS. Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications. *Acc. Chem. Res.* 2017;50(2):366-375.

156. Vetri V, Librizzi F, Leone M, Militello V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin. *Eur. Biophys. J.* 2007;36(7):717-725.
157. Rondeau P, Navarra G, Cacciabaudo F, Leone M, Bourdon E, Militello V. Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 2010;1804(4):789-798.
158. Lindgren M, Hammarström P. Amyloid oligomers: spectroscopic characterization of amyloidogenic protein states. *FEBS J.* 2010;277(6):1380-1388.
159. Graciani FS, Ximenes VF. Investigation of human albumin-induced circular dichroism in dansylglycine. *PLoS One.* 2013;8(10):e76849.
160. Lakowicz JR. *Topics in fluorescence spectroscopy.* Springer Science & Business Media, 1994.
161. Владимиров ЮА., Потапенко АЯ. Физико-химические основы фотобиологических процессов. Дрофа, 2006.
162. Berova N, Di Bari L, Pescitelli G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chem. Soc. Rev.* 2007;36(6):914-931.
163. Веллюз Л, Грожан М, Легран М. Оптический круговой дихроизм: принципы, измерения, применение. Мир, 1967.
164. Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules.* 2008;89(5):392-400.
165. Dodero VI, Quirolo ZB, Sequeira MA. Biomolecular studies by circular dichroism. *Front. Biosci.* 2011;16:61-73.
166. Lopes. JL, Miles AJ, Whitmore L, Wallace BA. Distinct circular dichroism spectroscopic signatures of polyproline II and unordered secondary structures: applications in secondary structure analyses. *Protein Sci.* 2014;23(12):1765-1772.

167. Greenfield NJ. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. biochem.* 1996;235(1):1-10.
168. Brahms S, Brahms J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* 1980;138(2):149-178.
169. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH., Goto Y, Réfrégiers M, Kardos J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015;112(24):E3095-E3103.
170. Mineo P, Micali N, Villari V, Donato MG, Scamporrino E. Reading of protein surfaces in the native state at micromolar concentrations by a chirogenetic porphyrin probe. *Chem.: Eur. J.* 2012;18(39):12452-12457.
171. Tedesco D, Bertucci C. Induced circular dichroism as a tool to investigate the binding of drugs to carrier proteins: Classic approaches and new trends. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015;113:34-42.
172. Wolf C, Bentley KW. Chirality sensing using stereodynamic probes with distinct electronic circular dichroism output. *Chem. Soc. Rev.* 2013;42(12):5408-5424.
173. Balaz M, De Napoli M, Holmes AE, Mammana A, Nakanishi K, Berova N, Purrello R. A cationic zinc porphyrin as a chiroptical probe for Z-DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005;44(26):4006-4009.
174. Matile S, Berova N, Nakanishi K, Novkova S, Philipova I, Blagoev B. Porphyrins: powerful chromophores for structural studies by exciton-coupled circular dichroism. *J. Am. Chem. Soc.* 1995;117(26):7021-7022.
175. Mizutani T, Ema T, Yoshida T, Kuroda Y, Ogoshi H. Recognition of α -amino acid esters by zinc porphyrin derivatives via coordination and hydrogen bonding interactions. Evidence for two-point fixation from thermodynamic and induced circular dichroism spectroscopic studies. *Inorg. Chem.* 1993;32(10):2072-2077.
176. Takeuchi M, Kijima H, Hamachi I, Shinkai S. A novel sugar sensing system designed with a cooperative action of a boronic-acid-appended zinc porphyrin and a 3-pyridylboronic acid axial ligand. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1997;70(3):699-705.

177. Furusho Y, Kimura T, Mizuno Y, Aida T. Chirality-memory molecule: AD 2-symmetric fully substituted porphyrin as a conceptually new chirality sensor. *J. Am. Chem. Soc.* 1997;119(22):5267-5268.
178. Sakamoto M, Ueno A, Mihara H. Multi-peptide-Metalloporphyrin Assembly on a Dendrimer Template and Photoinduced Electron Transfer Based on the Dendrimer Structure. *Chem.: Eur. J.* 2001;7(11):2449-2458.
179. Tsukube H, Shinoda S. Lanthanide complexes in molecular recognition and chirality sensing of biological substrates. *Chem. Rev.* 2002;102(6):2389-2404.
180. Nag M, Bera K, Chakraborty S, Basak S. Sensing of hydrophobic cavity of serum albumin by an adenosine analogue: fluorescence correlation and ensemble spectroscopic studies. *J. Photochem. Photobiol.* 2013;127:202-211.
181. Berova N. *Comprehensive chiroptical spectroscopy*. Wiley, 2012.
182. Graciani FS, Ximenes VF. Investigation of human albumin-induced circular dichroism in dansylglycine. *PLoS One.* 2013;8(10):e76849.
183. Zsila F, Imre T, Szabó PT, Bikádi Z, Simonyi M. Induced chirality upon binding of cis-parinaric acid to bovine β -lactoglobulin: spectroscopic characterization of the complex. *FEBS Lett.* 2002;520(1-3):81-87.
184. Mineo P, Micali N, Villari V, Donato MG, Scamporrino E. Reading of protein surfaces in the native state at micromolar concentrations by a chirogenetic porphyrin probe. *Chem.: Eur. J.* 2002;18(39):12452-12457.
185. de Vasconcelos DN, Ximenes VF. Albumin-induced circular dichroism in Congo red: Applications for studies of amyloid-like fibril aggregates and binding sites. *Spectrochim. Acta A.* 2015;150:321-330.
186. Varshney A, Sen P, Ahmad E, Rehan M, Subbarao N, Khan RH. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized?. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry.* 2010;22(1):77-87.

187. Ascoli GA, Domenici E, Bertucci C. Drug binding to human serum albumin: Abridged review of results obtained with high-performance liquid chromatography and circular dichroism. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry*. 2006;18(9):667-679.
188. Saboury AA. A review on the ligand binding studies by isothermal titration calorimetry. *J. Iran. Chem. Soc.* 2006;3(1):1-21.
189. Ababou A, Ladbury JE. Survey of the year 2005: literature on applications of isothermal titration calorimetry. *J. Mol. Recognit.: An Interdisciplinary Journal*. 2007;20(1):4-14.
190. Buurma NJ, Haq I. Advances in the analysis of isothermal titration calorimetry data for ligand–DNA interactions. *Methods*. 2007;42(2):162-172.
191. Salim NN, Feig AL. Isothermal titration calorimetry of RNA. *Methods*. 2009;47(3):198-205.
192. Nevídalová H, Michalcová L, Glatz Z. In-depth insight into the methods of plasma protein-drug interaction studies: Comparison of capillary electrophoresis-frontal analysis, isothermal titration calorimetry, circular dichroism and equilibrium dialysis. *Electrophoresis*. 2018;39(4):581-589.
193. Bouchemal K. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *Drug Discov. Today*. 2008;13(21-22):960-972.
194. Falconer RJ, Penkova A, Jelesarov I, Collins BM. Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry. *J. Mol. Recognit.* 2010;23:395-413.
195. Bradrick TD, Beechem JM, Howell EE. Unusual binding stoichiometries and cooperativity are observed during binary and ternary complex formation in the single active pore of R67 dihydrofolate reductase, a D₂ symmetric protein. *Biochemistry*. 1996;35(35):11414-11424.
196. Duff Jr MR, Grubbs J, Howell EE. Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule-ligand affinity. *J. Vis. Exp.* 2011;(55):e2796.

197. Schmidtchen FP. Isothermal titration calorimetry in supramolecular chemistry. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. Wiley, 2012.
198. Freyer MW, Lewis EA. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol.* 2008;84:79-113.
199. Damian L. Isothermal titration calorimetry for studying protein–ligand interactions. In *Protein-ligand interactions*. Humana Press, 2013:103-118.
200. Lewis EA, Murphy KP. Isothermal titration calorimetry. In *Protein-Ligand Interactions*. Humana Press, 2005:1-15.
201. Houk KN, Leach AG, Kim SP, Zhang X. Binding affinities of host–guest, protein–ligand, and protein–transition-state complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003;42(40):4872-4897.
202. Sarver RW, Gao H, Tian F. Determining molecular binding sites on human serum albumin by displacement of oleic acid. *Anal. biochem.* 2005;347(2):297-302.
203. Wybranowski T, Cyrankiewicz M, Ziomkowska B, Kruszewski S. The HSA affinity of warfarin and flurbiprofen determined by fluorescence anisotropy measurements of camptothecin. *Biosystems.* 2008;94(3):258-262.
204. Ryan AJ, Ghuman J, Zunszain PA, Chung CW, Curry S. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. *J. Struct. Biol.* 2011;174(1):84-91.
205. Vendrell. M, Zhai D, Er JC, Chang YT. Combinatorial strategies in fluorescent probe development. *Chem. Rev.* 2012;112(8)4391-4420.
206. Ueno T, Nagano T. Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nat. Methods.* 2011;8(8):642.
207. Deligeorgiev TG, Kaloyanova S, Vaquero JJ. Intercalating cyanine dyes for nucleic acid detection. *Recent Patents on Materials Science.* 2009;2(1):1-26.
208. Nigam S, Rutan S. Principles and applications of solvatochromism. *Appl. Spectrosc.* 2011;55(11):362A-370A.

209. Hawe A, Sutter M, Jiskoot W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.* 2008;25(7):1487-1499.
210. Armitage BA. Cyanine dye–nucleic acid interactions. In *Heterocyclic Polymethine Dyes*. Springer, 2008:11-29.
211. Armitage BA. Cyanine dye–DNA interactions: intercalation, groove binding, and aggregation. In *DNA binders and related subjects*. Springer, 2005:55-76.
212. Gu Q, Kenny JE. Improvement of inner filter effect correction based on determination of effective geometric parameters using a conventional fluorimeter. *Anal. Chem.* 2008;81(1):420-426.
213. Kubista M, Sjöback R, Eriksson S, Albinsson B. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra. *Analyst*, 1994;119(3):417-419.
214. Varlan A, Hillebrand M. Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. *Molecules*. 2010;15(6):3905-3919.
215. Volkova KD, Kovalska VB, Inshin D, Slominskii YL, Tolmachev OI, Yarmoluk SM. Novel fluorescent trimethine cyanine dye 7519 for amyloid fibril inhibition assay. *Biotech. Histochem.* 2011;86(3):188-191.
216. Volkova KD, Kovalska VB, Losytskyy MY, Fal KO, Derevyanko NO, Slominskii YL, et al. Hydroxy and methoxy substituted thiacyanines for fluorescent detection of amyloid formations. *J. Fluoresc.* 2011;21(2):775-784.
217. Kubin RF, Fletcher AN. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *J. Lumin.* 1982;27(4):455-462.
218. Kovalska VB, Tokar VP, Losytskyy MY, Deligeorgiev T, Vassilev A, Gadjev N, et al. Studies of monomeric and homodimeric oxazolo [4, 5-b] pyridinium cyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids visualization. *J. biochem. biophys. methods.* 2006;68(3):155-165.

219. Marzenell P, Hagen H, Sellner L, Zenz T, Grinyte R, Pavlov V, Mokhir A, et al. Aminoferrocene-based prodrugs and their effects on human normal and cancer cells as well as bacterial cells. *J. Med. Chem.* 2013;56(17):6935-6944.
220. Hosainzadeh A, Gharanfoli M, Saberi MR, Chamani J. Probing the interaction of human serum albumin with bilirubin in the presence of aspirin by multi-spectroscopic, molecular modeling and zeta potential techniques: insight on binary and ternary systems. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012;29(5):1013-1050.
221. Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* 2012;52(3-4):174-182.
222. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 2005;1751(2):119-139.
223. Moghaddam MM, Pirouzi M, Saberi MR, Chamani J. Comparison of the binding behavior of FCCP with HSA and HTF as determined by spectroscopic and molecular modeling techniques. *Luminescence.* 2014;29(4):314-331.
224. Mishra NK, Joshi KB, Verma S. Inhibition of human and bovine insulin fibril formation by designed peptide conjugates. *Mol. Pharm.* 2013;10(10):3903-3912.
225. Bhowmik S, Khanna S, Srivastava K, Hasanain M, Sarkar J, Verma S, Batra S. An efficient combinatorial synthesis of allocolchicine analogues via a triple cascade reaction and their evaluation as inhibitors of insulin aggregation. *ChemMedChem.* 2013;8(11):1767-1772.
226. Gladytz A, Lugovoy E, Charvat A, Häupl T, Siefermann KR, Abel B. Intermediates caught in the act: tracing insulin amyloid fibril formation in time by combined optical spectroscopy, light scattering, mass spectrometry and microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015;17(2):918-927.
227. Ivanova MI, Sievers SA, Sawaya MR, Wall JS, Eisenberg D. Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106(45):18990-18995.

228. Ivanova MI, Thompson MJ, Eisenberg D. A systematic screen of β 2-microglobulin and insulin for amyloid-like segments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103(11):4079-4082.
229. Chatani E, Imamura H, Yamamoto N, Kato M. Stepwise organization of the β -structure identifies key regions essential for the propagation and cytotoxicity of insulin amyloid fibrils. *J. Biol. Chem.* 2014;289(15):10399-10410.
230. Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky VN, Fink AL. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry.* 2001;40(28):8397-8409.
231. Owczarz M, Arosio P. Sulfate anion delays the self-assembly of human insulin by modifying the aggregation pathway. *Biophys. J.* 2014;107(1):197-207.
232. Ghosh S, Pandey NK, Sen S, Tripathy DR, Dasgupta S. Binding of hen egg white lysozyme fibrils with nucleic acids. *J. Photochem. Photobiol.* 2013;127:52-60.
233. Kuperman MV, Chernii SV, Losytskyy MY, Kryvorotenko DV, Derevyanko NO, Slominskii YL, et al. Trimethine cyanine dyes as fluorescent probes for amyloid fibrils: The effect of N, N'-substituents. *Anal. biochem.* 2015;484:9-17.
234. Kuperman MV, Snihirova YV, Kryvorotenko DV, Losytskyy MY, Kovalska VB, Yarmoluk SM. N-alkylaryl styrylcyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids detection. *Biopolym. Cell.* 2018;34(5):374-386.
235. Kovalska VB, Vakarov SV, Kuperman MV, Losytskyy MY, Gumienna-Kontecka E, Voloshin YZ, Varzatskii OA. Induced chirality of cage metal complexes switched by their supramolecular and covalent binding. *Dalton Trans.* 2018;47(4):1036-1052.
236. Dockal M, Carter DC, Rüker F. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *J. Biol. Chem.* 2000;275(5):3042-3050.
237. Amiri M, Jankeje K, Albani JR. Characterization of human serum albumin forms with pH. Fluorescence lifetime studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010;51(5):1097-1102.
238. El Kadi N, Taulier N, Le Huerou JY, Gindre M, Urbach W, Nwigwe I, et al. Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: ultrasound and structural studies. *Biophys. J.* 2006;91(9):3397-3404.

239. Yamasaki K, Maruyama T, Yoshimoto K, Tsutsumi Y, Narazaki R, Fukuhara A, et al. Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1999;1432(2):313-323.
240. Zsila F, Bikádi Z, Simonyi M. Circular dichroism spectroscopic studies reveal pH dependent binding of curcumin in the minor groove of natural and synthetic nucleic acids. *Org. Biomol. Chem.*. 2004;2(20):2902-2910.
241. Venturini D, De Souza AR, Caracelli I, Morgon NH, da Silva-Filho LC, Ximenes VF. Induction of axial chirality in divanillin by interaction with bovine serum albumin. *PloS one*. 2017;12(6):e0178597.
242. Sur SS, Rabbani LD, Libman L, Breslow E. Fluorescence studies of native and modified neurophysins. Effects of peptides and pH. *Biochemistry*. 1979;18(6):1026-1036.
243. Wilting J, van der Giesen WF, Janssen LH, Weideman MM, Otagiri M, Perrin JH. The effect of albumin conformation on the binding of warfarin to human serum albumin. The dependence of the binding of warfarin to human serum albumin on the hydrogen, calcium, and chloride ion concentrations as studied by circular dichroism, fluorescence, and equilibrium dialysis. *J. Biol. Chem*. 1980;255(7):3032-3037.
244. Evoli S, Mobley DL, Guzzi R, Rizzuti B. Multiple binding modes of ibuprofen in human serum albumin identified by absolute binding free energy calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2016;18(47):32358-32368.
245. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol*. 2005;353(1):38-52.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ В ЯКИХ
ОПУБЛІКОВАНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

8. Induced CD of iron (ii) clathrochelates: sensing of the structural and conformational alterations of serum albumins / V. Kovalska, **M. Kuperman**, M. Losytskyu, S. Vakarov, S. Potocki, S. Yarmoluk, Y. Voloshin, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka // *Metallomics*. – 2019. – Vol. 11(2). – P. 338-48. *Особистий внесок здобувача – дослідження клатрохелатів як потенційних конформаційно чутливих ІКД-репортерів.*
9. N-alkylaryl styrylcyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids detection / **M.V. Kuperman**, Y.V. Snihirova, D.V. Kryvorotenko, M.Y. Losytskyu, V.B. Kovalska, S.M. Yarmoluk // *Biopolymers and Cell*. – 2018. – Vol. 34(5). – P. 374-386. *Особистий внесок здобувача – дослідження можливості застосування серії ціанінових барвників, як зондів для нуклеїнових кислот і білків in vitro спектральними методами.*
10. Induced chirality of cage metal complexes switched by their supramolecular and covalent binding / V. Kovalska, S. Vakarov, **M. Kuperman**, M. Losytskyu, E. Gumienna-Kontecka, Y. Voloshin, O. Varzatskii // *Dalton Trans*. – 2018. – Vol. 47(4). – P. 1036-1052. *Особистий внесок здобувача – дослідження зв'язування клатрохелатів з альбуміном спектральними методами і можливості індукувати клатрохелатами КД-сигнал при зв'язуванні.*
11. The discovery of the effect of *closo*-borate on amyloid fibril formation / **M. Kuperman**, S. Chernii, O. Varzatskii, A. Zhdanov, A. Bykov, K. Zhizhin, S. Yarmoluk, V. Kovalska // *ChemistrySelect*. – 2017. – Vol. 2(34). - P. 10965 – 10970. *Особистий*

внесок здобувача – дослідження здатності клозо-борату впливати на фібрилоутворення білків спектральними методами.

12. Effective binding of perhalogenated *closo* -borates to serum albumins revealed by spectroscopic and ITC studies / **M.V. Kuperman**, M.Yu. Losytskyu, A.Yu. Bykov, S.M. Yarmoluk, K.Yu. Zhizhin, N.T. Kuznetsov, O.A. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka, V.B. Kovalska // Journal of Molecular Structure. – 2017. – Vol. 1141. - P. 75-80.

Особистий внесок здобувача – дослідження зв'язування галоген клозо-боратів з сироватковими альбумінами спектральними методами і методом ізотермічної калориметрії титрування.

13. An interaction of the functionalized *closo*-borates with albumins: the protein fluorescence quenching and calorimetry study, J. Lumin / M. Yu. Losytskyu, V. B. Kovalska, O. A. Varzatskii, **M. V. Kuperman**, S. Potocki, E. Gumienna- Kontecka, A. P. Zhdanov, S. M. Yarmoluk, Ya. Z. Voloshin, K. Yu. Zhizhin, N. T. Kuznetsov, A. V. Elskaya // J. Lumin. – 2016. – Vol. 169. - P. 51–60. *Особистий внесок здобувача – спектрально-люмінесцентні дослідження зв'язування клозо-боратів з сироватковими альбумінами.*

14. Trimethine cyanine dyes as fluorescent probes for amyloid fibrils: the effect of N,N'-substituents / **M. V. Kuperman**, S. V. Chernii, M. Yu. Losytskyu, D. V. Kryvorotenko, N. O. Derevyanko, Yu. L. Slominski, V. B. Kovalska, S. M. Yarmoluk // Anal Biochem. – 2015. – Vol. 484. - P. 9-17. *Особистий внесок здобувача – спектральні дослідження серії амілоїд-чутливих ціанінів: визначення залежності між хімічною структурою барвника і його здатністю підвищувати флуоресцентний сигнал у присутності фібрилярних білків.*

Тези наукових доповідей

1. ICD-sensitivity of iron(II) clathrochelates to globular proteins / M. Kuperman, S. Vakarov, N. Chornenka, S. Yarmoluk, E. Gumienna-Kontecka, Ya. Voloshin, V. Kovalska // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum

Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine September 3-5 2018, Kyiv, Ukraine. – P. 152.

2. Study of CD sensitivity of iron(II) clathrochelates on various globular proteins / M. Kuperman, S. Vakarov, E. Gumienna-Kontecka, Y. Voloshin, O. Varzatskii, V. Kovalska // Abstract of the 43rd FEBS congress “Biochemistry forever”, July 7 - 12 2018, Prague, Czech Republic. – P. 215-216.

3. The Study of Effect of *Closo*-borate on Fibril Formation of Insulin / M.V. Kuperman, S.V. Chernii, O.A. Varzatsky, K.Yu. Zhizhin, S.M. Yarmoluk, V.B. Kovalska // Abstract of XXIII Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals", September 20 – 25 2017, Kyiv, Ukraine. - P. 122.

4. CD sensing of conformation's alterations of serum albumin by iron (II) clathrochelates / M. Kuperman, M. Losytsky, S. Vakarov, E. Gumienna-Kontecka, O. Varzatskii, V. Kovalska Abstract of International research and practice conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO -2017), August 23 - 26 2017, Chernivtsi, Ukraine. - P. 112.

5. Effective interactions between perhalogenated *closo*-borates and serum albumins / M. Kuperman, M. Losytsky, K. Zhizhin, A. Bykov, N. Kuznetsov, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka, V. Kovalska // Abstract of XXIV Young Research Fellow Meeting – SCT, February 8 - 10 2017, Châtenay-Malabry, France. - P 162.

6. Effect of the substituents isomery in functionalized clathrochelates on their interaction with proteins / M. Kuperman, V. Kovalska, S. Vakarov, M. Losytsky, E. Gumienna-Kontecka, O. Varzatskii // Abstract of FEBS 2016: Molecular and Systems Biology for a better life, September 3 -8 2016, Kuşadası, Turkey. – P. 312.

7. CD study of supramolecularly induced chirality of the monoribbed-functionalized optically active amide carboxyphenylsulfide iron(II) clathrochelates / Varzatskii O.A., Kovalska V.B., Vakarov S.V., Kuperman M.V., Vologzhanina A.V., Voloshin Y.Z. //

Abstract of VIIth international symposium «Design and synthesis of supramolecular architectures», April 25 -29 2016, Kazan, Russia. – P. 193.

8. Study of the interaction of serum albumin with iron (II) clathrochelate by spectral methods / M.V.Kuperman, V.B.Kovalska, M.Yu.Losytskyy, S.M. Yarmoluk // Abstract of Conference for Young Scientists (CYS), September 21 – 25 2015, Kiev, Ukraine. – P. 70.

9. Effect of the closo-borates substitution on its binding with proteins / M.V. Kuperman, V.B. Kovalska, M.Yu. Losytskyy, O.A. Varzatskii, S.M. Yarmoluk, K.Yu. Zhizhin // 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю „Хімічні проблеми сьогодення”, Збірник тез, 17-20.03.2014, Донецьк, Україна. – P. 158.

10. Study of trimethine cyanine dyes with different N,N'-substitutions as amyloid-sensitive probes / M.V. Kuperman, S.V.Chernii, M.Yu.Losytskyy, D. V. Kryvorotenko, Yu.L. Slominski // Abstract of BIO Congress 2014, September 9-12 2014, Warsaw, Poland. - P. 285.

ДОДАТОК Б

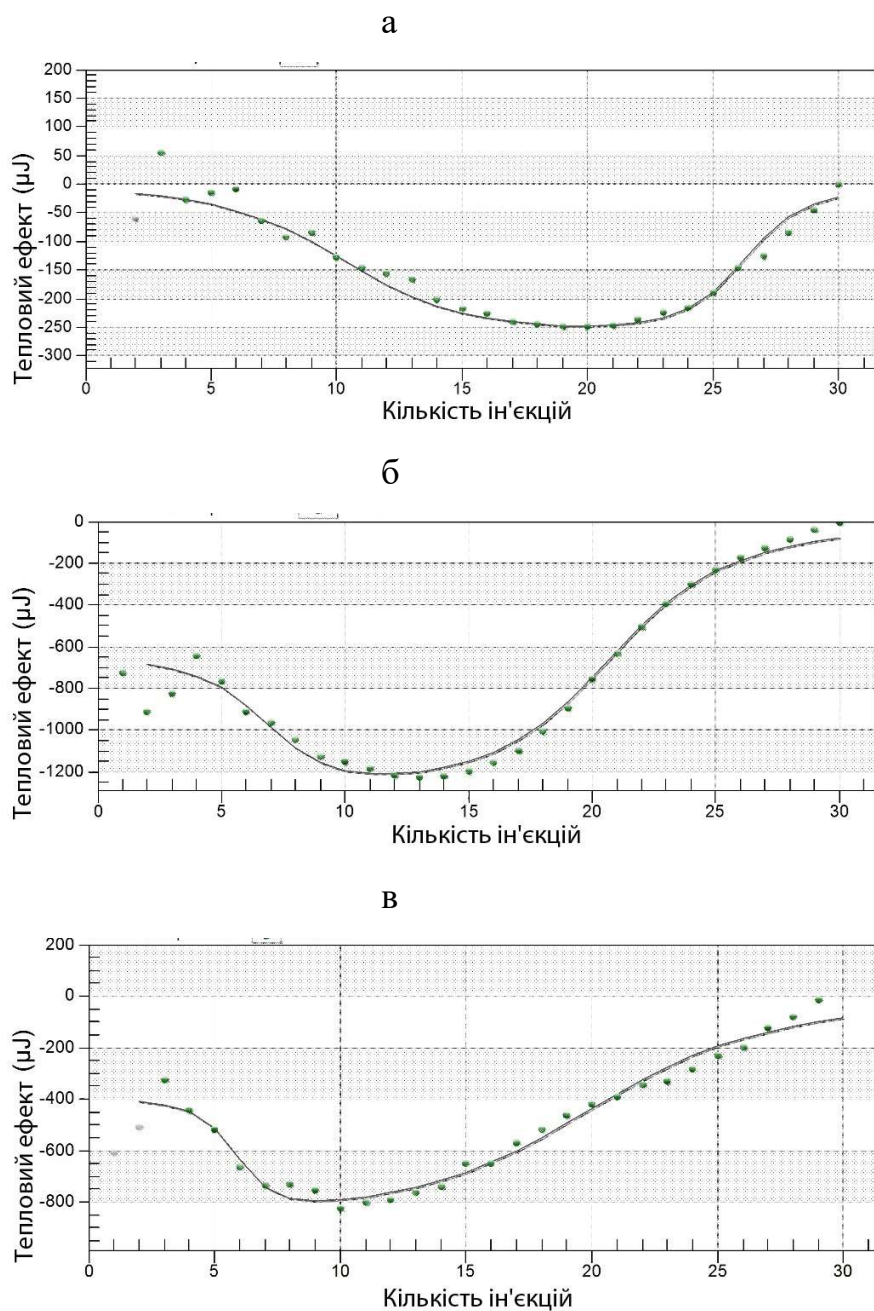


Рис. Б.1. Експериментальні дані (точки) та їх апроксимація кривими (суцільна лінія) для залежності теплового ефекту зв'язування від номеру ін'єкції (різні молярні співвідношення *клого-борату* до білку) комплексу БСА з $[B_{10}Cl_{10}]^{2-}$ (а), $[B_{10}Br_{10}]^{2-}$ (б) and $[B_{10}I_{10}]^{2-}$ (в).

ДОДАТОК В

Таблиця В.1

Спектрально-люмінесцентні властивості триметинових ціанінових барвників у вільному стані та у присутності мономерного або фібрилярного інсуліну

Назва	У вільному стані*			З мономерним інсуліном			З фібрилярним інсуліном			
	$\lambda_{зб}$, нм	$\lambda_{ем}$, нм	I_0 , у.о.	$\lambda_{зб}$, нм	$\lambda_{ем}$, нм	$I^{мон}$, у.о.	$\lambda_{зб}$, нм	$\lambda_{ем}$, нм	$I^{фібр}$, у.о.	$I^{фібр}/I_0$
D-33	549	568	25.5	549	568	33.9	570	582	65	2.6
D-17	549	568	25	550	568	34	570	578	56	2.2
7524	554	564	31	554	572	38	573	578	256	8.3
D-150	547	569	31	550	569	37	562	579	200	6.5
D-151	554	569	57.6	554	569	72	568	579	749	13
D-66	552	573	15.3	554	573	29	564	580	80	5
D-35	559	574	14	562	574	39	576	582	115	8.2
D-51	557	571	3.6	557	571	7	565	576	250	69

Примітка. * $\lambda_{зб}$, $\lambda_{ем}$ – довжини хвиль максимумів збудження і емісії, I_0 , $I^{мон}$ – інтенсивність емісії у вільному стані та у присутності мономерного білку; $I^{фібр}/I_0$ – збільшення інтенсивності емісії у присутності фібрилярного інсуліну; у.о. – умовні одиниці

Таблиця В.2

Спектрально-люмінесцентні властивості триметинових ціанінових барвників у присутності мономерного або фібрилярного лізоциму

Назва	З мономерним лізоцимом			З фібрилярним лізоцимом			
	$\lambda_{зб}$, нм	$\lambda_{ем}$, нм	$I^{мон}$, у.о.	$\lambda_{зб}$, нм	$\lambda_{ем}$, нм	$I^{фібр}$, у.о.	$I^{фібр}/I_0$
D-33	549	573	57	566	582	590	23.1
D-17	549	568	30.4	556	575	338	10.7
7524	554	564	69	570	580	832	26.8
D-150	550	569	36.8	562	579	182	5.9
D-151	554	569	68.3	568	579	142	2.5
D-66	554	574	42.3	560	581	364	23.8
D-35	564	582	45	576	589	362	25.9
D-51	560	580	21.7	565	576	225	62.5

Примітка. * $\lambda_{зб}$, $\lambda_{ем}$ – довжини хвиль максимумів збудження і емісії, I_0 , $I^{мон}$ – інтенсивність емісії у вільному стані та у присутності мономерного білку; $I^{фібр}/I_0$ – збільшення інтенсивності емісії у присутності фібрилярного лізоциму; у.о. – умовні одиниці

Таблиця В.3

Квантові виходи флуоресценції барвників у присутності фібрилярних білків

Амілоїдні фібрили	інсулін					лізоцим	
	7524	D-150	D-151	D-35	D-51	7524	D-33
Квантовий вихід, %	21	7.7	17	24	42	4.6	23

Таблиця В.4

**Спектрально-люмінесцентні властивості стирилціанінових барвників у
вільному стані і у присутності НК**

Назва	У вільному стані*			У присутності ДНК					У присутності РНК			
	$\lambda_{зб}$	$\lambda_{ем}$	I, у.о.	$\lambda_{зб}$	$\lambda_{ем}$	I, у.о.	$I^{ДНК}/I_0$	Q, %	$\lambda_{зб}$	$\lambda_{ем}$	I, у.о.	$I^{РНК}/I_0$
Sbt1	535	596	20	557	604	1655	83	19.7	571	609	1400	70
Sbt2	533	596	6	560	603	86	14	2.8	569	607	331	55
Sbt3	532	596	15	561	604	744	50	21.8	570	607	580	39
Sbt4	535	597	11	561	604	569	52	16.0	568	607	567	52
Реф	529	593	27	558	604	1098	41	24.7	568	607	1739	64

Примітка. * $\lambda_{зб}$, $\lambda_{ем}$ – довжини хвиль максимумів збудження і емісії, нм; I – інтенсивність емісії; $Q^{ДНК}$ – квантовий вихід барвнику у присутності длДНК; $I^{ДНК}/I_0$, $I^{РНК}/I_0$ – збільшення інтенсивності емісії у присутності ДНК/РНК; у.о. – умовні одиниці

Таблиця В.5

Спектрально-люмінесцентні властивості стирилціанінових барвників у вільному стані та у присутності фібрилярного інсуліну або білку у нативному стані (БСА)

	У присутності фібрилярного інсуліну				У присутності глобулярного білку (БСА)			
	$\lambda_{зб}$	$\lambda_{ем}$	I	$I^{фібр}/I_0$	$\lambda_{зб}$	$\lambda_{ем}$	I	$I^{БСА}/I_0$
Sbt1	570	603	39	2	541	594	45	2
Sbt2	574	605	43	5	543	594	24	4
Sbt3	570	601	63	4	540	593	31	2
Sbt4	570	601	117	11	540	593	37	3

Примітка. * $\lambda_{зб}$, $\lambda_{ем}$ – довжина хвиль максимумів збудження і емісії, нм; I – інтенсивність емісії; $I^{фібр}/I_0$, $I^{БСА}/I_0$ – збільшення інтенсивності емісії у присутності фібрилярного інсуліну і БСА, відповідно; у.о. – умовні одиниці

ДОДАТОК Г

ІКД-спектри БСА

ІКД-спектри ЛСА

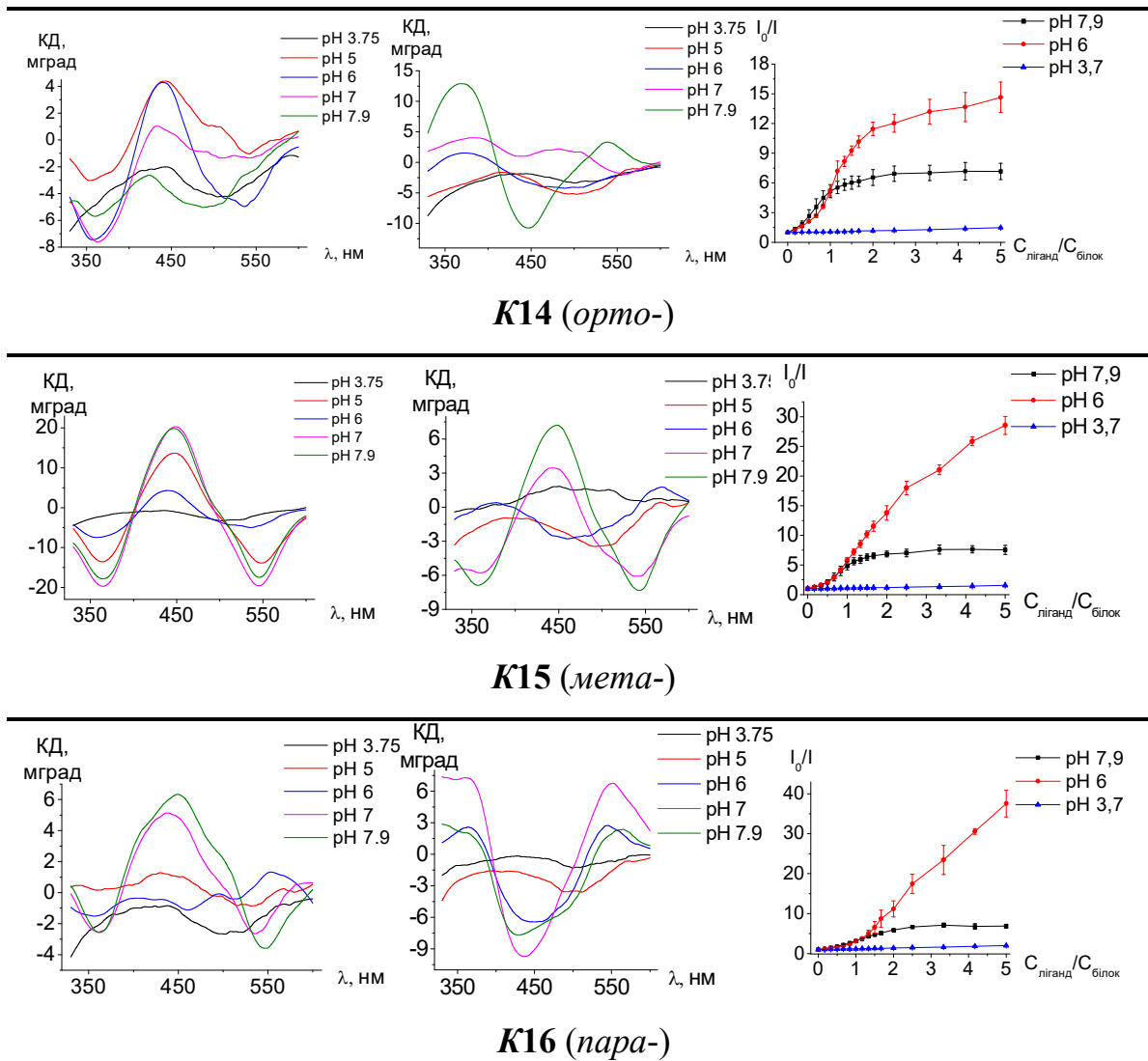
Гасіння
флуоресценції
БСА

Рис. Г.1. ІКД спектри орто-/мета-/пара- карбоксифенільних клатрохелатних комплексів, **K14** – **K16**, з БСА і ЛСА і гасіння флуоресценції БСА цими ізомерними сполуками при різних рН

ДОДАТОК Д

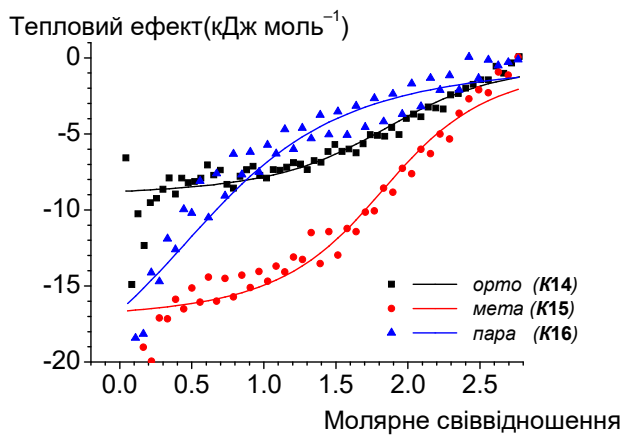


Рис. Д.1. Експериментальні дані (точки) та їх апроксимація кривими (суцільна лінія) для залежності теплового ефекту зв'язування від молярного співвідношення гекса- орто-/мета-/пара- заміщених ізомерів клатрохелату, **K14 - K1**, до білку у комплексі з БСА

ДОДАТОК Е

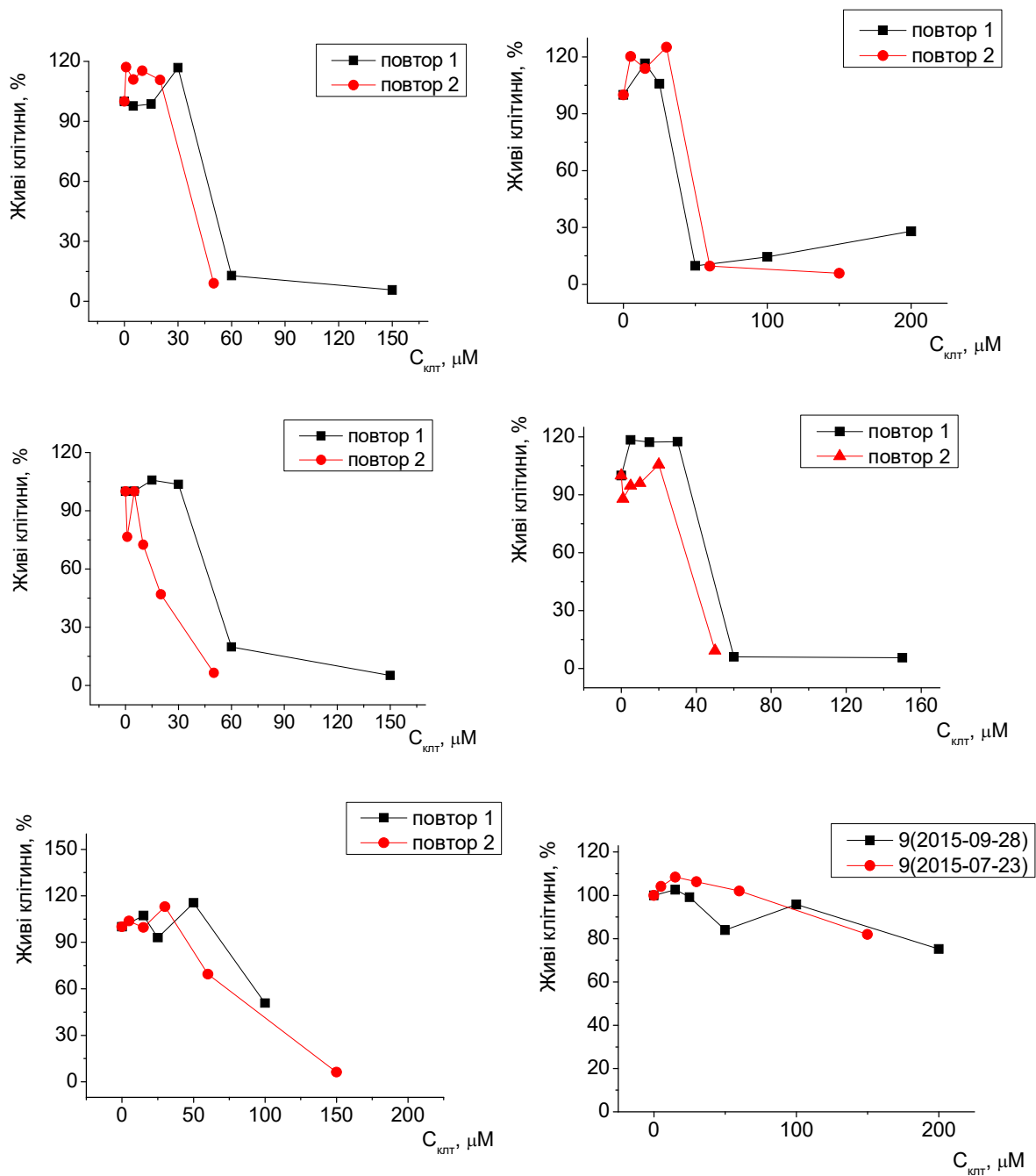


Рис. Е.1. Цитотоксичність клатрохелатів з двома ізомерними карбоксифенільними замісниками до лінії клітин людської промієлоцитарної лейкемії (HL-60)